

การตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารเสพติดกลุ่มแอมเฟตามีน เคตามีน และเมตาบอไลต์
ต่างๆ ในปัสสาวะโดยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี/ แมสสเปคโตรเมตรี/
แมสสเปคโตรเมตรี*

Quantitative Analysis of Amphetamines, Ketamine and their Metabolites
in Urine by Liquid Chromatography-Tandem Mass spectrometry
(LC-MS/MS)

Received: January 23, 2019
Revised: May 17, 2019
Accepted: May 21, 2019

กรรณิกาญจน์ ศิชีวัฒน์ (Kannikan Sikiwat)**
ศิริรัตน์ ชูสกุลเกรียง (Sirirat Choosakoonkriang)***
ศุภชัย ศุภลักษณ์ (Supachai Supalaknaree)***
สุปราณี พันระตัน (Supranee Pantatan)****

บทคัดย่อ

ปัจจุบันสารเสพติดกลุ่มแอมเฟตามีน เช่น ยาบ้า ยาอี ยาเลิฟ รวมทั้งเคตามีน และเฟนเทอร์มิน ถือเป็นกลุ่มยาและสารเสพติดที่มกนิยมนักในประเทศไทย การตรวจพิสูจน์หาปริมาณยาและสารเสพติดในปัสสาวะจึงมีความสำคัญมากสำหรับงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ เนื่องจากผลการตรวจพิสูจน์สามารถนำมาประกอบการพิจารณาตัดสินของผู้กระทำความผิด และสามารถประกอบการหาสาเหตุการเสียชีวิตได้ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณยาและสารเสพติดจำนวน 8 ชนิด ในปัสสาวะโดยอาศัยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี/แมสสเปคโตรเมตรี/แมสสเปคโตรเมตรี (LC-MS/MS) และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี การวิเคราะห์ใช้ตัวอย่างปัสสาวะ 100 ไมโครลิตร ผ่านกระบวนการสกัดด้วยตัวทำละลาย ระบายแห้ง และละลายกลับด้วย mobile phase แล้ววิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS สำหรับการแยกทาง Chromatographic อาศัยคอลัมน์ Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.1 mm × 100 mm, 2.7µm particle size ใช้เวลาสำหรับการวิเคราะห์เพียง 9 นาที และการวิเคราะห์สำหรับ Mass spectrometric อาศัย electrospray ionization แบบ positive-ion และโหมด multiple reaction monitoring (MRM) ด้วยการใช้ collision energy ที่เหมาะสมกับสารแต่ละชนิด การศึกษาสามารถหาปริมาณยาและสารเสพติดได้ในช่วง 50-1500ng/mL และเทคนิคนี้มีผลการวิเคราะห์ตามพารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้ มีค่า LOD คือ 2 5 10 และ 15ng/mL LLOQ คือ 50 ng/mL ความเป็นเส้นตรง (r^2) มีค่า

* เพื่อเผยแพร่ผลงานวิจัยทางด้านนิติวิทยาศาสตร์

** นักศึกษา หลักสูตรปริญญาโทบริหารคดี สาขานิติวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

อีเมลล์ : kannikan.sikiwat@gmail.com

(Graduate student, Forensic Science Program, Faculty of Science, Silpakorn University)

*** อาจารย์ หลักสูตรปริญญาโทบริหารคดี สาขานิติวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

**** หัวหน้ากลุ่มตรวจพิสูจน์ทางเคมี สถาบันนิติวิทยาศาสตร์ กระทรวงยุติธรรม

(Head of Forensic Science Section, CIFS, Ministry of Justice)

มากกว่า 0.99 ในทุกๆชนิด สำหรับค่า within-precision และ between-precision (%RSD) คือ 1.5-19.4% และ 1.1 -9.5 % ตามลำดับ ไม่มีผลของการตกค้างของสารตัวอย่างในระบบการวิเคราะห์ เมทริกซ์ไม่มีผลต่อการวิเคราะห์ ยกเว้น Nor-ketamine และ Phentermine ที่ความเข้มข้นต่ำๆ นอกจากนี้ยาและสารเสพติดมีความคงทนที่อุณหภูมิห้องตั้งแต่ต้นถึง 30 ชั่วโมง การพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์นี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับตัวอย่างปัสสาวะได้จริง จากตัวอย่างทดสอบทั้งหมด 13 ตัวอย่าง ที่ได้สนับสนุนจากกลุ่มตรวจพิสูจน์ทางเคมี สถาบันนิติวิทยาศาสตร์ ได้ผลการวิเคราะห์ที่เปรียบเทียบกับเทคนิค GC-MS ที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และด้วยประสิทธิภาพที่สูงกว่า คือ ใช้ปริมาณตัวอย่างน้อยกว่า เวลาวิเคราะห์สั้น มีความถูกต้อง แม่นยำสูง ดังนั้นจึงสามารถใช้เทคนิค LC-MS/MS นี้แทนได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: แอมเฟตามีน เคตามีน ปัสสาวะ

Abstract

Amphetamines, MDMA, MDEA, Ketamine and Phentermine have been the most commonly abused drugs in Thailand. Quantitative analysis of drugs in urine has the important for prove in forensic science. The concentration of abuse in urine sample can be taken for inquest of suspect and determine the suspect's cause of death. This study aimed to evaluate a more effective approach to simultaneously quantify these 8 analytes in urine by Liquid Chromatography-Tandem Mass spectrometry (LC-MS/MS). Samples (100 μ L) were extracted via liquid-liquid extraction, evaporated and reconstituted in the mobile phase for injection into the LC-MS-MS. Chromatographic separation by an the Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.1 mm $\times$ 100 mm, 2.7 μ m particle size. The total run time of the method was 9.1 min. Mass spectrometric analysis was performed by electrospray ionization in positive-ion multiple reaction monitoring mode with optimized collision energy for each analytes. This method used to quantitate abused drug and their metabolites with range 50–1,500 ng/mL. Analytical parameters evaluated and resulting data are as follows: (i) LOD was 2, 5, 10 and 15ng/mL; (ii) LLOQ was 50ng/mL; (iii) calibration linearity (r^2) for all analytes was >0.99; (iv) within-precision and between-precision (%RSD) were 1.5-19.4% and 1.1 -9.5 % respectively. No effect of carryover and matrix effect except for Nor-ketamine and Phentermine at low concentrations. The analytes were stable at room temperature for 30 h. This method was successfully applied to the analysis of specimens collected from 13 unknown death cases and 15 known cases from Forensic Chemistry section, Central of Situation of Forensic Science, and the results comparison with reference GC-MS were not significantly different. The LC-MS/MS analysis was as high efficiency (less samples, short time, precise and accurate) In conclusion; the LC-MS/MS method is robust, reliable and can be used instead.

Keywords: Amphetamines, Ketamine, Urine

บทนำ

ในปัจจุบันปัญหาสารเสพติดกำลังแพร่ระบาดและขยายไปทั่วประเทศมากขึ้น ก่อให้เกิดปัญหาทางสังคม ขึ้นมามากมาย เช่น ปัญหาอาชญากรรม ปัญหาเยาวชนติดยาเสพติด เป็นต้น นอกจากนี้ยาเสพติดยังเป็นภัยร้ายแรงต่อสุขภาพจิตและสุขภาพกาย ทำให้สุขภาพทรุดโทรมอ่อนแอ ความจำเสื่อม เสี่ยงบุคลิกภาพ และส่งผลกระทบต่อสังคม เศรษฐกิจ บั่นทอนความเจริญของประเทศชาติ

ยาเสพติด มีหลายประเภท ได้แก่ ผิ่น เฮโรอีน ทินเนอร์ กัญชา ยาบ้า ยาอี สารระเหย กระเทียม และยากระตุ้นประสาท เป็นต้น การตรวจหาสารเสพติดในร่างกายของผู้เสพ สามารถใช้ตัวอย่างชีววัตถุหลายชนิด เช่น ปัสสาวะ ซิรัม เส้นผม เป็นต้น ปัสสาวะเป็นตัวอย่างชีววัตถุที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายและเป็นที่ยอมรับในกระบวนการยุติธรรมในระดับสากล (Wang et al., 2006) ข้อดีของการใช้ตัวอย่างปัสสาวะ คือ เป็นตัวอย่างที่สามารถเก็บได้ง่าย เมื่อเทียบกับสารชีววัตถุอื่นๆ และสามารถเก็บตัวอย่างในปริมาณมากได้ ทำให้มีตัวอย่างเพียงพอที่จะใช้ในการตรวจ

การตรวจสารเสพติดในร่างกาย ของกลุ่มบุคคลเพื่อทดสอบว่ามีสารเสพติดในร่างกายหรือไม่ มีหลายวิธี เช่น การตรวจวิเคราะห์เบื้องต้น ด้วยเทคนิค Immunoassay method (Kraemer, Vernaleken, & Maurer, 1997) ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก สามารถคัดแยกตัวอย่างจำนวนมาก ได้ในระยะเวลาสั้นๆ และราคาถูก แต่ยังคงมีข้อจำกัดของค่าเกณฑ์การตัดสินผลบวก (Cut-off) ที่สูง ทำให้อาจเกิดผลการวิเคราะห์เป็นผลลบลง (false negative) ได้ ถ้าตัวอย่างจากการตรวจวิเคราะห์เบื้องต้นให้ผลบวก ถือได้ว่าอาจมีสารเสพติดผสมอยู่ จึงนำไปสู่ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ยืนยันผล ด้วยเทคนิคที่มีความถูกต้องมากขึ้น เช่น การตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี (GC-MS) ซึ่งเทคนิคนี้สามารถแยก และตรวจสอบสารเสพติดได้หลายชนิด รวมทั้งเมตาบอไลต์ต่างๆด้วย นอกจากนี้ยังมีความไว และความจำเพาะเจาะจงสูง อย่างไรก็ตามการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี (GC-MS) ยังต้องอาศัยกระบวนการ Derivatization โดยการทำปฏิกิริยากับสารอนุพันธ์ TFA หรือ PFPA (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2558) ซึ่งเข้าไปแทนที่ไฮโดรเจนของเอมีน (Amine) เพื่อเพิ่มขนาดโมเลกุล เพิ่มความจำเพาะเจาะจง และเพิ่มความไว (selectivity และ sensitivity) ซึ่งกระบวนการ Derivatization มีผลเสียต่อสุขภาพ มีราคาแพง ใช้ระยะเวลานาน และเสี่ยงที่ผลการวิเคราะห์จะเกิดข้อผิดพลาด และอาจจะทำให้ผลการตรวจวิเคราะห์เป็น ผลลบลง (false negative) หรือผลบวกลง (false positive) ได้

จากตามประกาศคณะกรรมการป้องกันและปราบปรามยาเสพติด เรื่อง กำหนดหลักเกณฑ์วิธีการและเงื่อนไขการตรวจหรือทดสอบว่าบุคคลหรือกลุ่มบุคคลใด มีสารเสพติดอยู่ในร่างกายหรือไม่ ประกาศ ณ วันที่ ๑๑ กรกฎาคม พ.ศ. ๒๕๔๓ ได้กำหนดให้ถือเกณฑ์การตัดสินผลการตรวจพิสูจน์ว่าเป็นผู้มีสารเสพติดในร่างกายดังต่อไปนี้

๑. กลุ่มแอมเฟตามีน (Amphetamines) และกลุ่ม MDMA (ยาอี) เมื่อตรวจพบว่ามีสารดังกล่าวอยู่ในปัสสาวะตั้งแต่ ๑,๐๐๐ นาโนกรัม/มิลลิลิตร ขึ้นไป (สำนักงานคณะกรรมการป้องกันและปราบปรามยาเสพติด, 2556)

ด้วยเหตุผลข้างต้นผู้วิจัยจึงศึกษาวิธีการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารเสพติดกลุ่มแอมเฟตามีน เคตามีน และเมตาบอลิต์ต่างๆ ซึ่งมีการแพร่ระบาดมากในประเทศไทย โดยอาศัยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี/แมสสเปคโตรเมตรี/แมสสเปคโตรเมตรี (LC-MS/MS) ที่ได้รับความสนใจเพิ่มขึ้นสำหรับการตรวจวิเคราะห์ด้านนิติพิษวิทยา เนื่องจากมีข้อดีหลายประการ คือ มีความแม่นยำ สะดวก รวดเร็ว และไม่ต้องอาศัยกระบวนการ Derivatization (Yang, C.-A., Liu, H.-C., Lin, D.-L., Liu, R., Hsieh, Y.-Z., & Wu, S.-P., 2017)

งานวิจัยนี้จึงนำเทคนิค LC-MS/MS มาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารเสพติดกลุ่มแอมเฟตามีน ซึ่งประกอบด้วย Methamphetamine ซึ่งมีเมตาบอลิต์เป็น Amphetamine, MDEA, MDMA มีเมตาบอลิต์ คือ MDA นอกจากนี้ยังศึกษากลุ่มเคตามีน ได้แก่ Ketamine ซึ่งมีเมตาบอลิต์เป็น Norketamine เนื่องจากกลุ่มเคตามีนมักจะนิยมใช้กันมากขึ้นในกลุ่มวัยรุ่นไทยบางกลุ่ม ซึ่งมีการนำยาเคมาสูดดมเพื่อเกิดอาการมึนเมา และมักพบว่ามีกานายาเคมาใช้ร่วมกับยาเสพติดร้ายแรงชนิดอื่น เช่น ยาอี เป็นต้น ดังนั้น จึงมีการศึกษาการหาปริมาณร่วมกับสารเสพติดกลุ่มแอมเฟตามีน โดยการศึกษาวิธีตัวอย่างประสงค์ คือ ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างปัสสาวะ ให้ใช้ปริมาณตัวอย่างน้อยลง ด้วยการสกัดแบบ liquid-liquid extraction สามารถข้ามขั้นตอน Derivatization เพื่อลดเวลาในการเตรียมตัวอย่าง รวมทั้งตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีในพารามิเตอร์ต่างๆ และเปรียบเทียบวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น กับการตรวจวิเคราะห์ที่ใช้ในงานประจำของกลุ่มตรวจพิสูจน์ทางเคมีสถาบันนิติวิทยาศาสตร์

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาวิธีโดยการศึกษาสภาวะในการเตรียมตัวอย่าง และสภาวะของเครื่องมือที่เหมาะสมของการตรวจวิเคราะห์สำหรับหาปริมาณสารเสพติดกลุ่มแอมเฟตามีน เคตามีน และเมตาบอลิต์ในปัสสาวะ โดยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี/แมสสเปคโตรเมตรี/แมสสเปคโตรเมตรี
2. เพื่อตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์สำหรับหาปริมาณสารเสพติดกลุ่มแอมเฟตามีน เคตามีน และเมตาบอลิต์ในปัสสาวะ โดยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี/แมสสเปคโตรเมตรี/แมสสเปคโตรเมตรี
3. เพื่อประยุกต์ใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นกับตัวอย่างจริง และเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS

วิธีวิจัย

1. สารมาตรฐานสารเสพติดที่ใช้ในการศึกษา จำนวน 8 ชนิด ได้แก่ 3,4-methylenedioxy-N-methylamphetamine (MDMA), 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA), 3,4-methylenedioxy-N-ethylamphetamine (MDEA), Ketamine, Nor-ketamine, Methamphetamine (MA), Amphetamine (AM), Phentermine จาก Cerilliant Corporation (Sigma-Aldrich), Acetonitrile, Isopropanol และ Ammonium formate จาก Merck สารเคมีเป็น HPLC Grade, 1-Chlorobutane จาก Carlo Erba เป็น AR Grade และ Formic acid จาก Thermo Scientific เป็น LC/MS Grade

2. ตัวอย่างปัสสาวะใช้ในการศึกษา

2.1 ปัสสาวะที่ไม่มีสารที่ต้องการวิเคราะห์ (Blank Urine) โดยเป็นตัวอย่างปัสสาวะจากอาสาสมัคร จำนวน 10 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 50 ml

2.2 ตัวอย่างปัสสาวะ ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนจากห้องปฏิบัติการฯ ของกลุ่มตรวจพิสูจน์ทางเคมี สถาบันนิติวิทยาศาสตร์ ซึ่งให้ผลการตรวจกลุ่มแอมเฟตามีน เป็นบวก (Positive)

3. เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

เครื่องมือ LC/MS/MS ของบริษัท Agilent Technologies

Liquid Chromatogram รุ่น 1260 Infinity

Mass Spectrometer ยี่ห้อ Agilent รุ่น 6495 Triple Quad

4. การดำเนินการวิเคราะห์ ใช้ internal standard ได้แก่ Methamphetamine-d5 (MA-d5) สำหรับ Methamphetamine, Amphetamine (AM-d6) สำหรับ Amphetamine และ MDMA-d6 สำหรับ Ketamine และ Norketamine โดยใช้ที่ความเข้มข้น 250 ng/mL

5. ศึกษาสภาวะของการเตรียมตัวอย่าง โดยสภาวะที่ศึกษา ได้แก่ วิธีการสกัด ซึ่งผู้วิจัยใช้การสกัดแบบ liquid-liquid extraction เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย และมีค่าใช้จ่ายต่ำ, ปริมาณตัวอย่างที่ใช้ในการสกัดในการศึกษาเลือกเปรียบเทียบการใช้ปริมาณตัวอย่างปัสสาวะที่ 100 μ l และ 200 μ l, บัฟเฟอร์ในการสกัดที่เลือกใช้ คือ carbonate buffer pH 10.3 เนื่องจากเป็นบัฟเฟอร์ที่เตรียมได้ง่าย ใช้ในงานประจำของห้องปฏิบัติการตรวจพิสูจน์ทางเคมี สถาบันนิติวิทยาศาสตร์ และที่ pH 10.3 เป็น pH ที่ครอบคลุมค่า pK_a ของสารที่ต้องการวิเคราะห์ และชนิดของตัวทำละลาย ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัดระหว่างตัวทำละลาย Tert-butyl-methyl-ether (TBME) กับ Butyl chloride: isopropanol (9:1)

6. ศึกษาสภาวะของเครื่องมือที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ โดยสภาวะที่ศึกษา ได้แก่ Mobile phase เปรียบเทียบ 2 ชนิด คือ ชนิดแรก mobile phase A เป็น water และชนิดที่สอง mobile phase A เป็น Ammonium formate ที่ความเข้มข้น 10 mM (ธนสิริ ยกเชื้อ, 2561) ส่วน mobile phase B เป็น Acetonitrile สำหรับ Gradient program ผู้วิจัยศึกษาทั้งหมด 3 รูปแบบ ดังนี้

Gradient Program A		Gradient Program B		Gradient Program C	
Time (min)	% of Mobile Phase B	Time (min)	% of Mobile Phase B	Time (min)	% of Mobile Phase B
0	5	0	10	0	10
1	5	1.5	10	1.5	10
8	90	7	30	7	20
10	90	8	90	8	90
10.05	5	9	90	9	90
		9.05	10	9.05	10

สภาวะของ Mass spectrometer ที่ใช้ในการศึกษา มีดังนี้ ชนิดของ ionization source ที่ใช้เป็น Electrospray ionization (ESI) ชนิด Positive mode มีการตั้งค่า ion source โดยใช้อุณหภูมิแก๊ส 200 °C, Gas flow ที่อัตรา 14 L/min, Nebulizer ที่ความดัน 45 psi, Sheath gas flow ที่อัตรา 11 L/min ความต่างศักย์ที่ Capillary ใช้ +3500V, -3000V ความต่างศักย์ที่ Nozzle voltage ใช้ +1000V, -1500V ใช้ MRM แบบ Scheduled MRM mode การแปลผล MRM เป็น quantitative ion

7. ศึกษาการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี ด้วยพารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่ Selectivity/Specificity, Matrix effect, Precision, Accuracy, Linearity, LOD, LLOQ, Carryover และ Stability ตามแนวทางมาตรฐานสากล ของ The Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX, 2013)

ผลการวิจัย

1. การพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารเสพติดกลุ่มแอมเฟตามีน เคตามีน และเมตาบอไลต์ต่างๆ จากการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารเสพติดกลุ่มแอมเฟตามีน เคตามีน และเมตาบอไลต์ต่างๆ ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ได้สภาวะการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสม คือ นำตัวอย่างปัสสาวะ 100 μ L ใส่ลงใน Micro tube ขนาด 1.5 ml ใช้ AM-d6, MA-d5 และ MDMA-d5 เป็น internal standard เติม Carbonate buffer pH (10.3) 200 μ L สกัดด้วย 2-Propanol:Butyl Chloride (1:9) 1 mL เขย่าเป็นเวลา 5 นาที และหมุนด้วยเครื่อง Centrifuge เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายส่วนใสใส่ vial เติม 100 μ L HCl (1.25M ใน Methanol) ระเหยแห้งภายใต้แก๊สไนโตรเจน ละลายกลับด้วย Mobile phase (Acetonitrile: 10mM Ammonium formate, 1:9) 1 mL และกรองด้วย filter 0.45 μ m สำหรับสภาวะที่ใช้วิเคราะห์ในส่วนของ Liquid Chromatograph แสดงดังตารางที่ 1 และสภาวะที่ใช้ของ MRM Parameter แสดงดังตารางที่ 2 ตารางที่ 1 แสดงสภาวะที่ใช้ในส่วนของ Liquid Chromatograph

Parameter	รายละเอียด	
Chromatographic system		
Column	Agilent poroshell 120 EC-C18, 2.1 mm × 100 mm, 2.7µm particle size	
Guard column	Agilent Poroshell 120 EC-18, 2.1x5 mm, 2.7 µm particle size	
Mobile phase	Eluent A: 10 mM Ammonium formate Eluent B: Acetonitrile with 0.1% Formic acid	
Gradient program	Time (min)	B (%)
	0	10
	1.5	10
	7	20
	8	90
	9	90
	9.05	10
	Stop time: 9.10 min	
Post time: 2 min	Flow rate 0.4 mL/min	

ตารางที่ 2 แสดงสภาวะที่ใช้ของ MRM Parameter

Compound	Retention time (min)	Precursor ion (m/z)	Product Ion (m/z)	Fragment (V)	Collision energy (V)	Polarity
Amphetamine	2.26	136	119	380	5	Positive
			91	380	17	
Methamphetamine	2.78	150	119	380	9	Positive
			91	380	17	
MDA	2.51	180	163	380	9	Positive
			135	380	20	
			105	380	25	
MDMA	2.98	194.2	163	380	9	Positive
			133	380	20	
			105	380	25	
MDEA	3.86	208	163	380	9	Positive
			135	380	25	
			105	380	25	
Phentermine	4.31	150.1	133	380	10	Positive
			91.1	380	10	
Ketamine	4.54	238	67	380	45	Positive
			125	380	15	
			207	380	25	
Nor-ketamine	4.31	224	125	380	25	Positive
			179	380	10	
			206.9	380	10	

*ตัวหนา คือ quantitative ion

2. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Method validation)

2.1 การศึกษา Selectivity/Specificity

Specificity ทำได้โดยการทดสอบปัสสาวะ (blank urine) ที่เติมด้วยยาที่อยู่นอกขอบข่ายการทดสอบนี้ ซึ่งเคยมีการตรวจพบในการวิเคราะห์ของกลุ่มตรวจพิสูจน์ทางเคมี สถาบันนิติวิทยาศาสตร์ จำนวน 40 ชนิด ที่ความเข้มข้น 200 ng/mL ได้แก่ Alprazolam, Amitriptyline, Benzoylcegonine, Cocaine, Codeine, delta-9-THC, Diazepam, Ephedrine, Fenfluramine, 6-MAM, Fentanyl, Flunitrazepam, Haloperidol, Hydrocodone, Hydromorphone, Lorazepam, Methadane, Methaqualone, Methylphenidate, Midazolam, Mitragynine, Morphine, Nitrazepam, Nordiazepam, Norfurazepam,

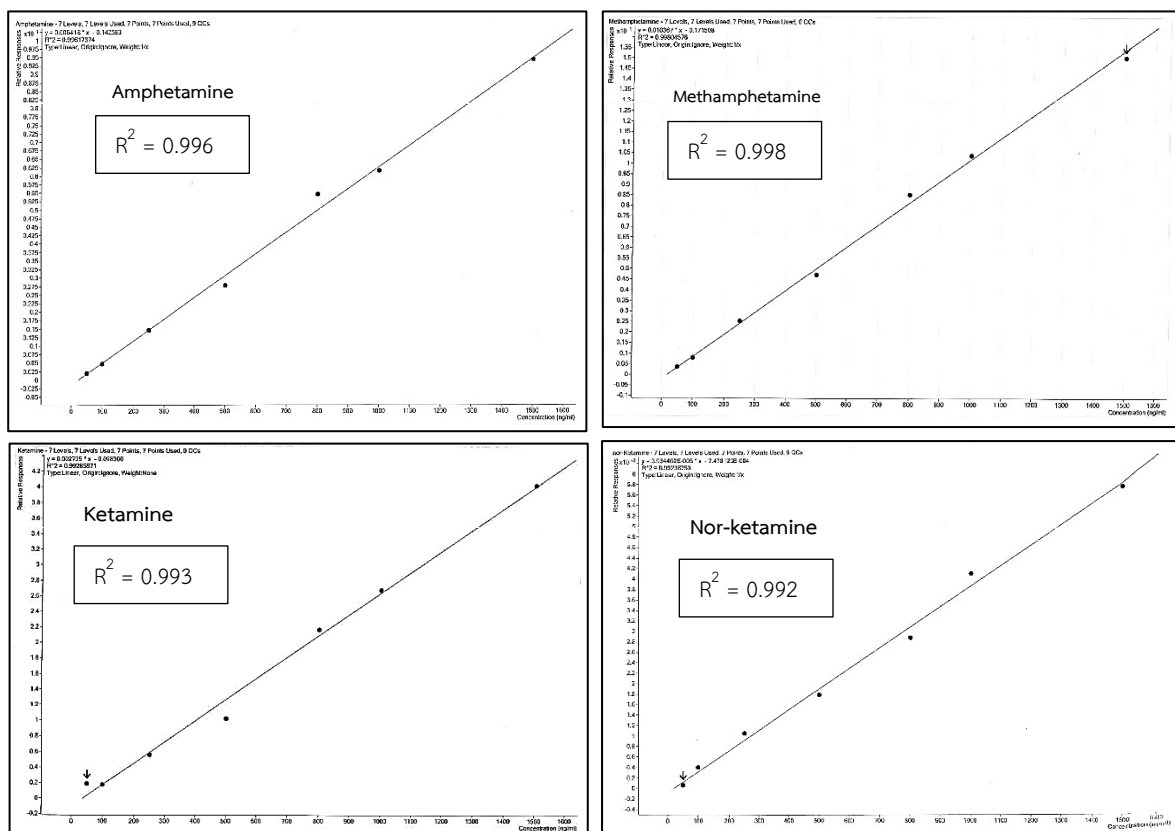
Oxazepam, Oxycodone, Oxymorphone, Paroxetine, Pentylone, Phencyclidine, Phenytoin, Sertraline, Sertraline Theophylline, Tramadol, Trazodone, Triazolam, Venlafaxine และ Zolpidem

ส่วนการทดสอบ selectivity นั้น ทำได้โดยการทดสอบวิเคราะห์ปัสสาวะจาก 10 แหล่ง ผลการทดสอบพบว่า ปัสสาวะทั้ง 10 แหล่ง ไม่มีผลต่อการวิเคราะห์ และยาทั้ง 40 ชนิดที่นำมาทดสอบ ไม่รบกวนการวิเคราะห์ยาและสารเสพติด (interference peaks) ในตัวอย่างข้างต้น

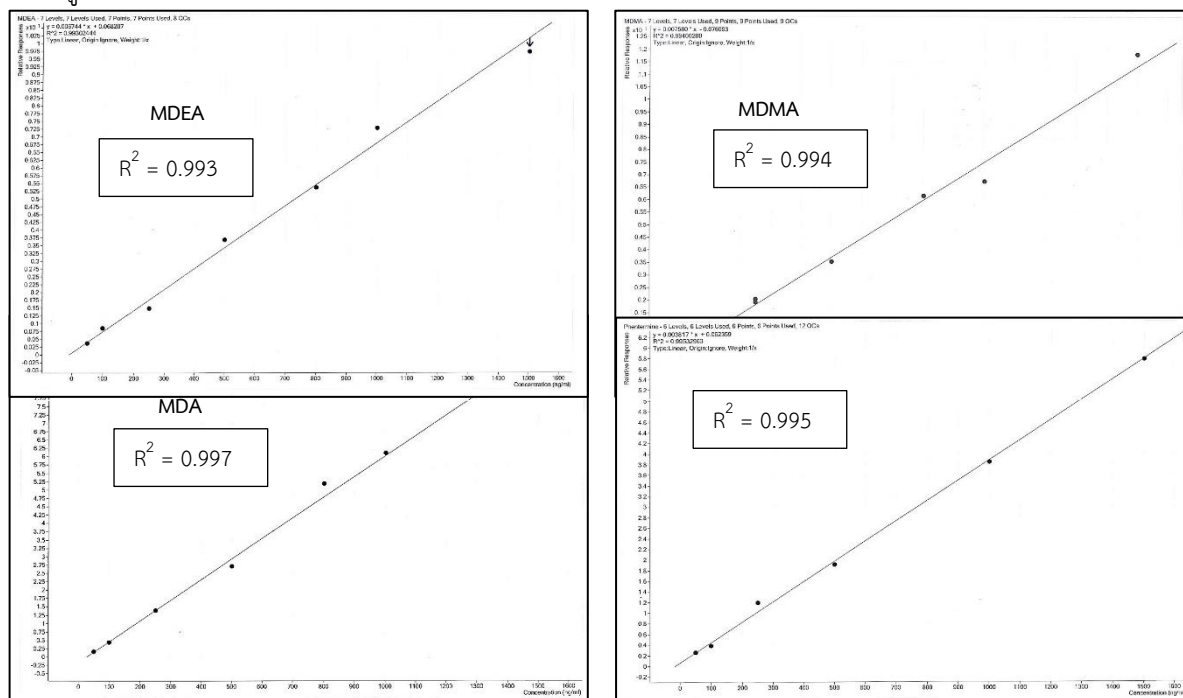
2.2 การศึกษา Linearity

ช่วงของความเข้มข้นของ calibration curves ที่ใช้ในการศึกษาและสารเสพติดทั้ง 8 ชนิด มีทั้งหมด 7 ความเข้มข้น คือ 50, 100, 250, 500, 800, 1000 และ 1500ng/mL ทำการวิเคราะห์ซ้ำทั้งหมด 7 ซ้ำ เพื่อทดสอบ Calibration Model และสารเสพติดแต่ละชนิดจะใช้ internal standard ดังนี้ Amphetamine ใช้ Amphetamine-d6, Methamphetamine ใช้ Methamphetamine-d5 สำหรับ Ketamine และ Norketamine ใช้ MDMA-d5 นอกจากนี้ในการวิเคราะห์ค่าความสัมพันธ์ จะใช้ calibration model เป็น linear และ weight 1/x จากการศึกษพบว่า ค่า Correlation Coefficient (r^2) ของยาและสารเสพติดทุกชนิดใน 7 ซ้ำนั้น มีค่ามากกว่า 0.990 แสดง Calibration curve ดังรูปที่ 1

รูปที่ 1 แสดง Calibration curve สำหรับยาและสารเสพติด



รูปที่ 1 (ต่อ)



2.3 การศึกษา Matrix Effect

ทำการทดสอบ Ionization Suppression/ Enhancement ซึ่งเป็นสิ่งที่เกิดขึ้นในขั้นตอนการกำเนิดประจุ (ionization) ของ LC/MS โดยสามารถเกิดจากในทุกขั้นตอนตั้งแต่การเตรียมตัวอย่าง ชนิดของตัวอย่าง mobile phase หรือ additives ซึ่ง matrix effect นั้นสามารถส่งผลต่อประสิทธิภาพการ ionization โดยสามารถลดหรือเพิ่มสัญญาณได้ Matrix effects ผู้วิจัยทดสอบโดยใช้ตัวอย่าง 2 ชุด ประกอบด้วย

ชุด A คือ ตัวอย่างปัสสาวะที่นำมาสกัดตามขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง แล้วจึงเติมสารมาตรฐานยาและสารเสพติด ความเข้มข้น 50 และ 500 ng/ml แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS

ชุด B คือ สารมาตรฐานยาและสารเสพติด (Standard) ที่เตรียมให้มีความเข้มข้น 50 ng/ml และ 500 ng/ml ปริมาตร 1 mL ใส่ vial แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS

การหาผลของ Ionization Suppression/ Enhancement คำนวณจากพื้นที่ใต้กราฟเฉลี่ยของแต่ละชุดความเข้มข้น ดังนี้

$$\text{Ionization suppression /enhancement (\%)} = \left(\frac{\text{พื้นที่ใต้กราฟเฉลี่ย ชุด A}}{\text{พื้นที่ใต้ กราฟเฉลี่ย ชุด B}} - 1 \right) \times 100$$

โดย ถ้ามีค่าบวก หมายถึง เกิด ionization enhancement แต่ถ้ามีค่าลบ หมายถึงเกิด ionization suppression และเกณฑ์การยอมรับ คือ % Ionization suppression / enhancement ต้อง < 25% (SWGTOX, 2013) ผลการศึกษาที่ได้ แสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการศึกษา Ionization Suppression/ Enhancement ที่ความเข้มข้น 50ng/ml และ 500ng/ml

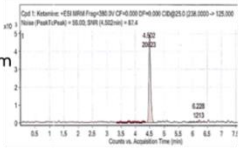
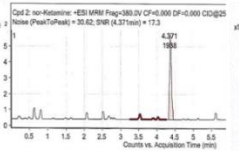
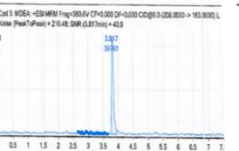
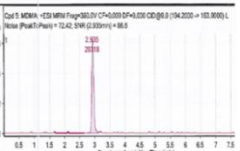
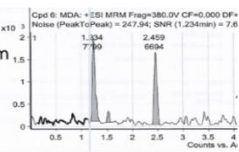
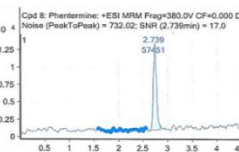
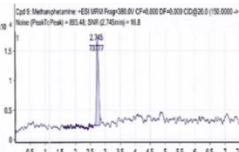
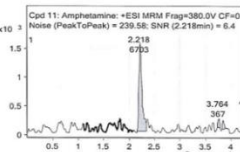
Analyte	% Ionization suppression / enhancement ((A/B)-1) *100	
	ความเข้มข้น 50ng/mL	ความเข้มข้น 500ng/ml
Ketamine	17.2	-0.8
Nor-ketamine	39.6	5.5
MDEA	5.6	0.2
MDMA	11.8	-1.5
MDA	22.2	-3.5
Phentermine	110	-7.0
Methamphetamine	12.1	0.6
Amphetamine	21.3	-1.7

จากผลการทดสอบ Ionization suppression/enhancement พบว่า ที่ความเข้มข้น 50 ng/mL มีสารเสพติด 6 ชนิด ที่มีค่าระหว่าง 5.6-22.2% ซึ่งมีค่าไม่เกินช่วง $\pm 25\%$ อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่ยอมรับได้ (SWGTOX, 2013) ยกเว้น Nor-ketamine และ Phentermine ที่ไม่อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ เนื่องจากเกิด Ionization suppression ค่อนข้างสูง ดังนั้น จึงอาจส่งผลให้ตรวจไม่พบสารเสพติดดังกล่าวในตัวอย่างกรณีที่มีความเข้มข้นต่ำได้ และที่ความเข้มข้น 500 ng/mL สารเสพติดทั้งหมด มีค่าอยู่ระหว่าง -7.0-5.5% ซึ่งมีค่าไม่เกินช่วง $\pm 25\%$ (SWGTOX, 2013) ดังนั้น Matrix จึงไม่มีผลต่อการวิเคราะห์สารดังกล่าวที่ความเข้มข้น 500ng/mL

2.4 การศึกษา Limit of Detection (LOD)

การทดสอบหาค่า LOD ทำโดยใช้ blank urine แล้วเติมสารมาตรฐานยาและสารเสพติดที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ ที่ 2, 5, 10, 15 และ 20 ng/mL แล้วทำการวิเคราะห์ใน blank urine 3 แพล่งๆ ละ 2 ซ้ำ แล้ววิเคราะห์ค่า signal-to-noise ratio (S/N) โดยการวิเคราะห์นี้ใช้ software ของ Agilent MassHunter Workstation Software โดยที่ LOD ต้องมีค่า signal-to-noise ratio (S/N) อย่างน้อยเท่ากับหรือมากกว่า 3 ($S/N \geq 3$) (SWGTOX, 2013) แสดงผลการทดสอบดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 สรุปค่า LOD ของการตรวจวิเคราะห์ยาและสารเสพติดโดยเทคนิค LC/MS/MS

Analyte	Ketamine	Nor-ketamine	MDEA	MDMA
LOD (ng/mL)	2	15	2	2
S/N ≥ 3	87.4	17.3	40.9	86.6
Chromatogram				
Analyte	MDA	Phentermine	Methamphetamine	Amphetamine
LOD (ng/mL)	10	5	2	5
S/N ≥ 3	7.6	17.0	16.8	6.4
Chromatogram				

2.5 การศึกษา Lower Limit of Quantitative (LLOQ)

Lower Limit of quantitation (LLOQ) คือ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้โดยต้องมีค่า accuracy และ precision อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้คือ $\pm 20\%$ ซึ่งในการทดสอบนี้ได้ใช้ความเข้มข้นต่ำสุดของ calibration curves เป็นค่า LLOQ สำหรับค่า accuracy และ precision ที่ LLOQ นั้น พบว่า ค่าที่ได้ของยาและสารเสพติด จำนวน 8 ชนิด อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้คือ $\pm 20\%$ (SWGTOX, 2013) โดยมีค่า %bias อยู่ระหว่าง -0.2 ถึง 3.0 ค่า %RSD อยู่ระหว่าง 6.3 ถึง 12.0 ผลการศึกษาแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงค่า accuracy และ precision ที่ LLOQ (n=15)

Analyte	Expect conc. (ng/mL)	Observed conc. (ng/mL)	Accuracy (%Bias)	Precision (%RSD)
Ketamine	50	50.0	0	7.9
Nor-ketamine	50	51.5	3.0	8.5
MDEA	50	49.9	-0.2	8.8
MDMA	50	50.6	1.2	6.3
MDA	50	50.1	0.3	8.8
Phentermine	50	50.7	1.5	7.8
Methamphetamine	50	50.4	0.7	12.0
Amphetamine	50	50.8	1.7	7.5

2.6 การศึกษา Accuracy และ Precision

Accuracy และ precision สามารถวัดได้โดยใช้ quality control samples (QCs) ที่ความเข้มข้นต่างกัน 3 ความเข้มข้น คือ 100, 500 และ 1000 ng/mL แล้วทำการวิเคราะห์หาค่า intra-assay, inter-assay precision และ %bias จากการทดสอบ พบว่า ค่าที่ได้อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้คือ $\pm 20\%$ (SWGTOX, 2013) สำหรับ inter-assay พบว่า %bias อยู่ระหว่าง -7.22 ถึง 11.4 และค่า %RSD อยู่ระหว่าง 1.1 ถึง 9.5 (n=21) สำหรับ intra-assay พบว่า %bias อยู่ระหว่าง -13.39 ถึง 8.18 และค่า %RSD อยู่ระหว่าง 1.5 ถึง 19.4 (n=4)

2.7 การศึกษาการตกค้างของสารตัวอย่างในระบบหลังจากการวิเคราะห์ (Carry over)

ศึกษาโดยการเตรียมตัวอย่างปัสสาวะตามขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS โดยให้ลำดับการวิเคราะห์ต่อจาก vial ที่มีการเตรียมความเข้มข้นไว้ที่ 3000 ng/ml ทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ซ้ำ เพื่อจะตรวจสอบว่าจะมีการตกค้างของสารตัวอย่างในระบบหลังจากการวิเคราะห์หรือไม่ ซึ่งจากการศึกษา พบว่าสารเสพติดทุกชนิดไม่มีการตกค้างในระบบ และไม่ส่งผลต่อการวิเคราะห์กรณีที่สารตัวอย่างมีความเข้มข้นสูง

2.8 การศึกษาความเสถียร (Stability)

การทดสอบความเสถียรของสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 50 และ 500ng/mL ซึ่งอยู่ใน auto sampler ภายใต้สภาวะอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 ชั่วโมง ที่เวลา 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 และ 30 ชั่วโมง พบว่าได้ผลการทดสอบ คือ ที่ความเข้มข้น 50 ng/mL มียาและสารเสพติด จำนวน 8 ชนิด มีค่าความเสถียรของสารที่ต้องการวิเคราะห์ ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึง 30 ชั่วโมง ระหว่าง 80% ถึง 116% ซึ่งมีค่าไม่เกินช่วง $\pm 20\%$ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่ยอมรับได้ (SWGTOX, 2013) ยกเว้น MDMA และ Amphetamine ที่มีบางช่วงที่ค่าไม่อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ คือ 21% และ 121% ตามลำดับ

ที่ความเข้มข้น 500 ng/mL มียาและสารเสพติด จำนวน 8 ชนิด มีค่าความเสถียรของสารที่ต้องการวิเคราะห์ ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึง 30 ชั่วโมง ระหว่าง 83% ถึง 112% ซึ่งมีค่าไม่เกินช่วง $\pm 20\%$ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่ยอมรับได้ (SWGTOX, 2013) ยกเว้น MDEA และ Nor-ketamine บางช่วงที่ค่าไม่อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ คือ 121% และ 77% ตามลำดับ

3. การประยุกต์วิธีที่พัฒนาขึ้น

ประยุกต์ใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นกับตัวอย่างปัสสาวะ คือ ตัวอย่างที่ให้ผลการตรวจเบื้องต้นด้วย Strip test ของ Methamphetamine เป็นบวก และตัวอย่างปัสสาวะที่เติมยาและสารเสพติดที่ทราบค่าแน่นอน จำนวน 28 ตัวอย่าง รวมทั้งศึกษาเปรียบเทียบกับวิธีการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Derivatize GC-MS ได้ผลการวิเคราะห์ ดังนี้

3.1 การประยุกต์ใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นจากตัวอย่างปัสสาวะที่ทราบค่าแน่นอน

จากการศึกษา พบว่า วิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณยาและสารเสพติด ที่ความเข้มข้น 100 300 500 1000 และ 1500ng/mL ได้ค่าเฉลี่ยที่ใกล้เคียงค่าจริง มีค่า Accuracy และ %RSD อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ คือ $\pm 20\%$ (SWGTOX, 2013) รายละเอียดแสดงดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลการประยุกต์ใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นกับตัวอย่างปัสสาวะที่ทราบค่าแน่นอน

Analyte	100ng/mL			300ng/mL			500ng/mL		
	Mean (n=3)	Accuracy	%RSD	Mean (n=3)	Accuracy	%RSD	Mean (n=3)	Accuracy	%RSD
Ketamine	99.5	99.5	4.2	263.4	96.0	10.8	475.5	95.1	11.7
Nor-ketamine	113.9	113.9	5.2	359.3	119.8	6.8	492.6	98.5	11.2
MDEA	100.3	100.3	5.7	301.3	100.4	9.4	506.5	101.3	6.0
MDMA	99.6	99.6	9.1	304.6	101.5	4.5	508.6	101.7	8.4
MDA	98.9	98.9	8.2	279.7	93.2	4.9	489.4	97.9	6.8
Phentermine	99.9	99.9	10.5	321.4	107.1	0.3	512.8	102.6	7.9
Methamphetamine	100.1	100.1	10.1	305.8	101.9	0.3	515.8	103.2	6.7
Amphetamine	99.2	99.2	10.5	315.5	105.2	1.3	499.0	99.8	3.9

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Analyte	1000ng/mL			1200ng/mL		
	Mean (n=3)	Accuracy	%RSD	Mean (n=3)	Accuracy	%RSD
Ketamine	1007.5	100.8	7.3	1252.5	104.4	16.7
Nor-ketamine	1016.4	101.6	6.7	1390.0	115.8	11.2
MDEA	994.1	99.4	7.5	1302.6	108.5	1.5
MDMA	1001.6	100.2	8.6	1279.4	106.6	4.3
MDA	1019.4	101.9	9.2	1237.7	103.1	8.7
Phentermine	1012.5	101.3	8.8	1032.0	86.0	6.2
Methamphetamine	1005.2	100.5	8.2	1276.7	106.4	10.6
Amphetamine	1017.9	101.8	9.6	1369.1	114.1	3.5

3.2 การเปรียบเทียบวิธีที่พัฒนาขึ้นกับเทคนิค Derivatize GC-MS

ศึกษาโดยนำตัวอย่างปัสสาวะที่มีผลการตรวจด้วยเทคนิค Strip test กลุ่มแอมเฟตามีนเป็นบวกจำนวน 13 ตัวอย่าง มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS และเปรียบเทียบผลที่ได้จากการวิเคราะห์ กับเทคนิค Derivatize GC-MS ได้ผลการวิเคราะห์ ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS กับเทคนิค GC-MS

Sample	Amphetamine		Methamphetamine	
	ผลการวิเคราะห์ด้วย เทคนิค LC-MS/MS (ng/ml)	ผลการวิเคราะห์ด้วย เทคนิค GC-MS (ng/ml)	ผลการวิเคราะห์ด้วย เทคนิค LC-MS/MS (ng/ml)	ผลการวิเคราะห์ด้วย เทคนิค GC-MS (ng/ml)
Sample 1	129.34	172.49	956.90	1286.44
Sample 2	488.16	612.11	1621.48*	2961.86
Sample 3	27.85*	0	97.79	126.45
Sample 4	178.60	224.27	830.28	1103.58
Sample 5	21.85*	0	71.70	139.00
Sample 6	101.79	131.55	384.09	547.49
Sample 7	155.77	225.07	964.52	1361.15
Sample 8	59.11	98.98	534.93	667.08
Sample 9	36.03*	82.59	39.88*	95.64
Sample 10	155.62	157.28	1047.06	1271.49
Sample 11	460.18	465.12	1285.14	1504.21
Sample 12	297.73	381.13	606.13	799.12
Sample 13	3225.85*	2777.01	9317.86*	30512.37

*ค่า linearity อยู่ในช่วง 50-1500 ng/ml

โดยผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Derivatize GC-MS ผู้วิจัยได้อ้างอิงผลจากวิธีการวิเคราะห์ของกลุ่มตรวจพิสูจน์ทางเคมี สถาบันนิติวิทยาศาสตร์ ซึ่งตัวอย่างทั้ง 13 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างเดียวกันกับที่นำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

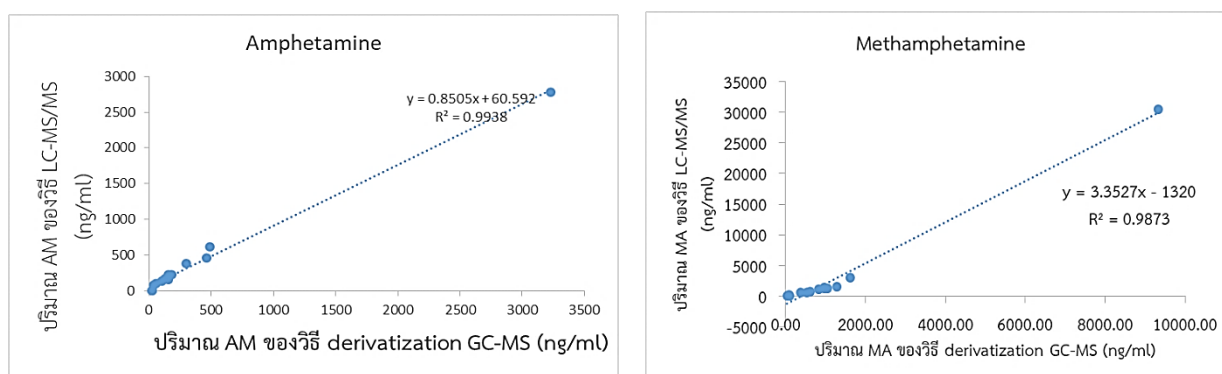
จากการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS กับเทคนิค GC-MS นำมาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยค่า paired t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ค่าที่ได้จาก 2 เทคนิค พบว่า t-stat จากการคำนวณ (t-stat= 0.020 สำหรับ Amphetamine, t-stat= -1.18 สำหรับ Methamphetamine) มีค่าน้อยกว่า t-critical แสดงว่า ทั้งสองเทคนิคไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ รายละเอียดแสดง ดังตารางที่ 8 ตารางที่ 8 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติระหว่าง 2 วิธี ด้วย paired t-test

ผลการวิเคราะห์ ด้วย t-Test	Amphetamine		Methamphetamine	
	ผลการวิเคราะห์ด้วย เทคนิค LC-MS/MS	ผลการวิเคราะห์ด้วย เทคนิค GC-MS	ผลการวิเคราะห์ด้วย เทคนิค LC-MS/MS	ผลการวิเคราะห์ด้วย เทคนิค GC-MS
n	13	13	13	13
Mean	410.6	409.8	1366.0	3259.7
t stat	0.020		-1.18	
t-critical	1.782	2.178	1.782	2.178
P	0.492*	0.984*	0.131*	0.262*

*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

นอกจากนี้ เมื่อนำผลการวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นทั้ง Amphetamine และ Methamphetamine ที่ได้จากทั้ง 2 วิธี ดังตารางที่ 7 มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น Amphetamine/ Methamphetamine (ng/ml) ของวิธี LC-MS/MS (แกน y) และวิธี derivatization GC-MS (แกน x) ดังรูปที่ 2 จากกราฟในรูปที่ 2 จะเห็นได้ว่า ปริมาณ Amphetamine จากทั้ง 2 วิธีนี้ให้ผลการทดลองไปในทิศทางเดียวกัน และมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงที่ดี ($R^2 = 0.9938$) และได้สมการ คือ $y = 0.8505x + 60.592$

และปริมาณ Methamphetamine จากทั้ง 2 วิธีนี้ให้ผลการทดลองไปในทิศทางเดียวกัน และมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง ($R^2 = 0.9873$) และได้สมการ คือ $y = 3.3527x - 1320$ จากการวิเคราะห์ความเป็นเส้นตรงนี้ แสดงให้เห็นว่า การวิเคราะห์ด้วยสองเทคนิคนี้ สามารถนำมาใช้ในการหาปริมาณ Amphetamine และ Methamphetamine ได้



รูปที่ 2 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น Amphetamine/ Methamphetamine (ng/ml) ของวิธี LC-MS/MS (แกน y) และวิธี derivatization GC-MS (แกน x)

สรุปผล

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาพัฒนาวิธีและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจหาปริมาณยาและสารเสพติดกลุ่มแอมเฟตามีน และเคตามีน รวมทั้งเมตาบอลิท์ในปัสสาวะ ทั้ง 8 ชนิด ได้แก่ Amphetamine, Methamphetamine, MDA, MDMA, MDEA, Phentermine, Ketamine และ Nor-ketamine เทคนิค LC/MS/MS นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ใช้วิธีที่พัฒนาขึ้น กับตัวอย่างปัสสาวะที่ทราบค่า และเปรียบเทียบกับเทคนิค GC-MS โดยสามารถสรุปภาพรวมของผลการวิจัยดังนี้

1. วิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมานี้สามารถนำมาใช้ในการตรวจหาปริมาณยา และสารเสพติดกลุ่ม แอมเฟตามีน และเคตามีน รวมทั้งเมตาบอลิท์ในปัสสาวะได้ โดยสามารถแก้ปัญหาในกรณีที่ตัวอย่างมีปริมาณจำกัดได้ เนื่องจากใช้ปริมาณปัสสาวะเพียง 100 ไมโครลิตร ซึ่งจะช่วยแก้ปัญหาคาณที่ตัวอย่างที่ส่งตรวจพิสูจน์มีปริมาณจำกัด การเตรียมตัวอย่างทำได้ง่าย และใช้เวลาในการวิเคราะห์เพียง 9 นาที

2. จากผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Method Validation) นั้นพบว่าวิธีการทดสอบนี้ มีความถูกต้องและแม่นยำ ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณยาและสารเสพติดกลุ่มแอมเฟตามีน และเคตามีน รวมทั้งเมตาบอลิท์ในปัสสาวะ ทั้ง 8 ชนิด โดยวิธีการที่พัฒนาขึ้นมานี้มีความจำเพาะ (Selectivity) ในการตรวจแยกสารที่ต้องการวิเคราะห์ มีค่า Linearity, Accuracy, Precision และ Matrix Effect อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ มีค่า

LOD อยู่ในช่วง 2-15 ng/mL และมีค่า LLOQ อยู่ที่ 50 ng/mL ซึ่งครอบคลุมระดับที่กฎหมายกำหนด และกรณีการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีความเข้มข้นสูงกว่าค่าสูงสุดของ Calibration curve ต้องมีการ dilute ตัวอย่างให้มีความเข้มข้นในช่วงของ Calibration curve และสำหรับกรณี Retention time ของ Phentermine และ Norketamine มีค่าเท่ากันนั้น ในการวิเคราะห์ให้พิจารณาจาก Precursor ion (m/z) และ Product ion(m/z) ซึ่งทั้งสองมีค่าต่างกัน ดังนั้น วิธีการทดสอบนี้สามารถที่จะนำไปใช้ในการการตรวจวิเคราะห์ปริมาณยาและสารเสพติดกลุ่มแอมเฟตามีน และเคตามีน รวมทั้งเมตาบอไลต์ในปัสสาวะ และรายงานผลการวิเคราะห์ได้

3. จากการประยุกต์ใช้วิธีที่พัฒนาขึ้น กับตัวอย่างปัสสาวะที่ทราบค่า พบว่า มีค่า Accuracy อยู่ในช่วง 86 ถึง 119.8 และ %RSD อยู่ในช่วง 0.3 ถึง 16.7 และจากการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับเทคนิค GC-MS ด้วย paired t-test พบว่า ทั้ง 2 วิธี ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แต่วิธีที่พัฒนาขึ้นมีขีดความสามารถในการวิเคราะห์ที่ดีกว่า ได้แก่ ใช้ปริมาณตัวอย่างน้อยกว่า 10 เท่า ใช้เวลาการวิเคราะห์เพียง 9 นาที รวมทั้งมี Sensitivity และ Specificity สูงกว่า

References

- Chusakunkriang, S. Soipetch W. Supluxnaree S. (2018) “kānwikhroḡ meṭ’ æmfetāmīn nai tuāyāṅ patsāwa Duāithēknikkætḡkhromāsokḡrafithīmīflēm’ ai’ oṅnaisēchanpentuātruatwatDoī chai withī kāntrīam’ anurūamkapsolīkhōfēt’ eksækchan læwithīhēdoḡsapēt” Veridian E-Journal, Science and Technology Silpakorn University 5, 5 (September-October): 19-31
- Department of medical sciences. Bureau of Drug and Narcotic. (2015). “ Withi ma ttratha n samrap ka ntru atphisu t sa nse ptit nai patsa wa Le mthi 1” [“Standard Methods for Analytical of Narcotics in Urine (Volume I)”], Nonthaburi: Khongkiantikanphim.
- Dziadosz, M. T., Jörg Henning, Katarina Klintschar, Michael Nordmeier, Frederike. (2018). LC–MS/MS screening strategy for cannabinoids, opiates, amphetamines, cocaine, benzodiazepines and methadone in human serum, urine and post-mortem blood as an effective alternative to immunoassay based methods applied in forensic toxicology for preliminary examination. *Forensic Chemistry*, 7, 33-37.
- Hudson, J. (2015). Amphetamines, Phentermine, and Designer Stimulant Quantitation Using an Agilent 6430 LC/MS/MS. *Agilent Technologies*.
- Jason Hudson, P. D., James Hutchings, Ph.D., and Rebecca Wagner, Ph.D. (2015). Validation of a Quantitative Method for Amphetamines, Phentermine, and Designer Stimulants Using an Agilent 6430 LC/MS/MS. *Application Note*.
- Kraemer, T., Vernaleken, I., & Maurer, H. H. (1997). "Studies on the metabolism and toxicological detection of the amphetamine-like anorectic mefenorex in human urine by gas chromatography–mass spectrometry and fluorescence polarization immunoassay." *Journal of Chromatography B* 702(1-2): 93-102.
- Kritsananuwat, O. Chusakunkriang, S. Supluxnaree, S. Tangthanuwat, W. (2017). “phonkhōṅsaphāw akhwāmpenkrotlādāṅtōparimānkhōṅgmēt’ æmfetāmīn naituāyāṅ patsāwathītruatwat doī CEDIA assay” Veridian E-Journal, Science and Technology Silpakorn University 4, 4 (July-August): 1-13

- Lin, H.-R., Choi, K.-I., Lin, T.-C., & Hu, A. (2013). Simultaneous quantification of amphetamine, opiates, ketamine and relative metabolites in urine for confirmatory analysis by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 929, 133-141.
- María del Mar Ramírez Fernández, S. M. R. W., Vincent di Fazio, Matthias Gosselin, Nele Samyn. (2010a). Analysis of amphetamines and metabolites in urine with ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 878, 1616-1622.
- Office of the Narcotics Control Board. (2013). Ruāmkotmaīyāseptit. 11. Krungthēp.
- SWGTOX. (2013). Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX). *Journal of Analytical Toxicology*, 7(37), 452-474.
- Wang, S. M., Lin, C. C., Li, T. L., Shih, C. Y., Giang, Y. S., & Liu, R. H. (2006). "Distribution characteristics of methamphetamine and amphetamine in urine and hair specimens collected from alleged methamphetamine users in northern Taiwan." *Analytica Chimica Acta* 576: 140-146.
- Yang, C.-A., Liu, H.-C., Lin, D.-L., Liu, R., Hsieh, Y.-Z., & Wu, S.-P. (2017). *Simultaneous Quantitation of Methamphetamine, Ketamine, Opiates and their Metabolites in Urine by SPE and LC-MS-MS* (Vol. 41).
- Yokchua, T. (2018). kānphatthana withī læ truāt sōp khwām chaidai khōng withikān truāt hā parimān yā nai lūat dōi theknik Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry (LC - MS / MS) tām næōthāng māttrathān sākon . ‘āchaya witthaya læ nitiwitthayaṣāt, 4 (1), 1-14.

