



การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณไมทราไจนีนในตัวอย่างเลือดและปัสสาวะด้วยออนไลน์ เอส พี อี ลิควิดโครมาโตกราฟี แมสสเปกโตรเมทรี

Method Validation for the Quantification of Mitragynine in Blood and Urine by Using Online Solid Phase Extraction Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
ภัทรพร ชดช้อย*

Phatraporn Chodchoy*

สาขานิติวิทยาศาสตร์และงานยุติธรรม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร และกลุ่มงานพิษวิทยา สถาบันนิติเวชวิทยา โรงพยาบาลตำรวจ

Forensic Science and Criminal Justice, Faculty of Science, Silpakorn University and Toxicology Division, Institute of Forensic Medicine, THAILAND

*Corresponding author e-mail: Phatraporn.IFM@gmail.com

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Article history:

Received: 18 September, 2020

Revised: 16 November, 2020

Accepted: 29 December, 2020

Available online: 18 October, 2021

DOI: 10.14456/jarst.2021.8

Keywords: mitragynine, urine, blood, online-SPE-LC-MS/MS

Kratom (*Mitragyna speciosa* Korth) is a tropical plant in Thailand, which an addictive effect. Kratom is classified as a Penal Drug Category-5 of the Thai Narcotics Act 2522 (1979), the least restrictive and punitive level. Mitragynine is a major alkaloid of Kratom and is responsible for its opioid effects, which has pharmacological action. Therefore may increase the use of kratom by pretending to be medical benefits. This research aims to study method validation to quantify Mitragynine from Kratom in serum and urine by using Online-SPE-LC-MS/MS. This method has six topics for validation. First, the linearity has r^2 (0.995 - 1.000) in blood and urine equal to 0.9998 and 0.9992, respectively. Second, the specificity has not to be disturbed in the chromatogram of Mitragynine in the blood and urine. Third, the accuracy with %recovery ($\pm 15\%$) in blood and urine equal to 95.25-109.12% and 94.98-111.20%, respectively. Forth, the precision shows that the Intraday-Precision and Interday-Precision values are %RSD ($<15\%$) within acceptable levels in both blood and urine. Fifth, the

detection limit (S/N ratio > 3) in the blood and urine is equal to 0.20, 0.15 ng/mL, respectively. And sixth, the limit of quantitation (S/N ratio > 10) in the blood and urine is equal to 1.0, 2.0 ng/mL, respectively. The obtained LOQ has to be in the right criteria. The determination of Mitragynine in the blood and urine using this method is appropriate. This method could analyze samples precisely and reliably.

บทคัดย่อ

พืชกระท่อม (*Mitragyna speciosa* Korth) เป็นพืชพื้นเมืองในประเทศไทย ที่มีฤทธิ์ทำให้เสพติดได้ ดังนั้นกระท่อมจึงถูกจัดเป็นยาเสพติดให้โทษประเภทที่ 5 ตามพระราชบัญญัติ ยาเสพติดให้โทษ พ.ศ.2522 สารสำคัญที่พบในใบกระท่อม คือ ไมทราไจนีน (Mitragynine) เป็นสารในกลุ่มอัลคาลอยด์ ซึ่งมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา จึงอาจทำให้มีการใช้กระท่อมเพิ่มมากขึ้น โดยแอบอ้างถึงประโยชน์ทางการแพทย์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณของสารไมทราไจนีน ในตัวอย่างทางชีวภาพ ได้แก่ เลือดและปัสสาวะ ด้วยวิธี Online-SPE-LC-MS/MS โดยทำการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ 6 หัวข้อ พบว่าหัวข้อที่ 1 linearity มีค่า r^2 (0.995 – 1.000) ในเลือดและปัสสาวะ เท่ากับ 0.9998 และ 0.9992 ตามลำดับ หัวข้อที่ 2 specificity ไม่พบ peak อื่นรบกวนใน chromatogram ของสารไมทราไจนีนในเลือดและปัสสาวะ หัวข้อที่ 3 accuracy มีค่า %recovery ($\pm 15\%$) ในเลือดและปัสสาวะ เท่ากับ 95.25-109.12% และ 94.98-111.20% ตามลำดับ หัวข้อที่ 4 precision พบว่าค่า Intraday-Precision และ Interday-Precision มีค่า %RSD (< 15%) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ทั้งในเลือดและปัสสาวะ หัวข้อที่ 5 limit of detection (S/N > 3) ในเลือดและปัสสาวะมีค่าเท่ากับ 0.20, 0.15 ng/mL ตามลำดับ และหัวข้อที่ 6 limit of quantitation (S/N > 10) ในเลือดและปัสสาวะมีค่าเท่ากับ 1.00, 2.00 ng/mL ตามลำดับ โดยค่า LOQ ที่ได้นั้นมี accuracy และ precision อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ดังนั้น

การหาปริมาณสารไมทราไจนีน ในเลือดและปัสสาวะด้วยวิธีวิเคราะห์นี้มีความเหมาะสม สามารถใช้วิเคราะห์ตัวอย่างได้ถูกต้อง แม่นยำและเชื่อถือได้

คำสำคัญ: ไมทราไจนีน ตัวอย่างปัสสาวะ ตัวอย่างเลือด Online-SPE-LC-MS/MS

บทนำ

พืชกระท่อม มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Mitragyna speciosa* Korth. เป็นพืชในวงศ์ Rubiaceae สามารถพบได้ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะประเทศไทยและประเทศมาเลเซีย เนื่องจากพืชกระท่อมมีฤทธิ์ทำให้เสพติดได้ จึงถูกจัดเป็นยาเสพติดให้โทษประเภทที่ 5 ตามพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ พ.ศ.2522 (1) สารที่พบได้ในกระท่อมเป็นส่วนใหญ่คือสารในกลุ่มอัลคาลอยด์รวม (Total Alkaloids) โดย อัลคาลอยด์ ที่พบได้มากที่สุดคือสารไมทราไจนีน (Mitragynine) ซึ่งเป็นสารหลักในการออกฤทธิ์ (2)

ไมทราไจนีน มีลักษณะเป็นผงสีขาว (White amorphous powder) มีสูตรโมเลกุล คือ $C_{23}H_{30}N_2O_4$ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 398.50 g/mol สามารถละลายได้ในแอลกอฮอล์ และ ตัวทำละลายอินทรีย์ (Organic solvent) ได้แก่ อะซิโตน (Acetone), กรดแอซิติก (Acetic acid), คลอโรฟอร์ม (Chloroform) และ ไดเอทิลอีเทอร์ (Diethyl ether) แต่ไม่สามารถละลายในน้ำได้ (2) โดยสารไมทราไจนีน มีคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์คือ มีความชอบไขมัน (lipophilic) โดยมีค่า log P เท่ากับ 1.73 และเป็นด่างอ่อนโดยมีค่า pKa เท่ากับ 8.1 ละลายได้ดีในกรดแต่เป็นสลายตัวได้ในสภาวะกรด (3)

ด้านเภสัชจลนศาสตร์พบว่าสารไมทราไจนีนสามารถดูดซึมได้เร็วเมื่อบริหารยาด้วยการรับประทาน และระดับยาในเลือดสามารถขึ้นถึงความเข้มข้นสูงสุดได้ในเวลาประมาณ 1.5 ชั่วโมง โดยระดับยาในเลือดสูงสุดเท่ากับ 0.3-1.8 μM และสาร ไมทราไจนีน มีค่าชีวประสิทธิผล (Bioavailability) ประมาณ 21% มีค่าการกระจายตัวของยา (Volume of distribution; Vd) เท่ากับ 37-90 L/kg มีค่าการรวมตัวกับโปรตีน (Protein binding) เท่ากับ 85-95% (3) มีการเปลี่ยนแปลงสภาพของยา ระยะที่ 1 และ 2 โดยเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) หมู่เมทิลเอสเทอร์ (Methylester) ที่ตำแหน่ง 16 และเกิดโอดีเมทิลเลชัน (O-demethylation) หมู่เมทอกซี (Methoxy) ที่ 9 และ 17 แล้ว เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation) โดยเอนไซม์ไซโทโครม พี 450 (Cytochrome P450) (4) ที่มีความเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของสารไมทราไจนีน คือเอนไซม์ไซโทโครมพี 450 สามเอสี่ (CYP3A4) ซึ่งนอกจากจะทำหน้าที่หลักในการเปลี่ยนแปลงสารไมทราไจนีน เพื่อขับออกจากร่างกายแล้วยังทำให้ได้ active metabolite ของไมทราไจนีน คือ ไฮดรอกซีไมทราไจนีน (7-Hydroxymitragynine) ในขณะที่สารไมทราไจนีน มีการเปลี่ยนแปลงผ่านเอนไซม์ ไซโทโครมพี 450 สองดีหก (CYP2D6) และ ไซโทโครมพี 450 สองซีเก้า (CYP2C9) เพียงเล็กน้อย (5) นอกจากนี้สารไมทราไจนีนยังมีผลต่อเอนไซม์ไซโทโครมพี 450 ด้วยเช่นกัน คือมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไซโทโครมพี 450 สองดีหกมากที่สุด และยังสามารถยับยั้งเอนไซม์ไซโทโครมพี 450 สองซีเก้า และ ไซโทโครมพี 450 สามเอสี่ ได้ด้วย (4) ส่วนการขับออกของสารไมทราไจนีน พบว่าส่วนใหญ่ถูกขับออกในรูปเมแทบอไลต์ทางปัสสาวะ และมีค่าการกำจัดครึ่งชีวิต (Elimination half-life) เท่ากับ 3-9 ชั่วโมง (3)

ด้านเภสัชพลศาสตร์พบว่ามีการจับกับตัวรับโอปิออยด์ (Opioid receptor) และมีความชอบจับจากมากไปน้อยคือตัวรับแคปปา (κ), ตัวรับมิว (μ) และตัวรับเดลต้า (δ) โดยออกฤทธิ์เป็นแอนตาโกนิสต์ (Antagonist) ต่อตัวรับแคปปา และเป็นอะโกนิสต์ (Agonist) ต่อตัวรับ

มิว และ ตัวรับเดลต้า ซึ่งเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต่อจิตประสาท (Psychoactive) โดยมีคุณสมบัติลดการปวด (Analgesic) มีผลยับยั้งการหดตัวของลำไส้เล็กทำให้มีฤทธิ์แก้ท้องเสีย นอกจากนี้ในระดับเซลล์สามารถปิดกั้นช่องแคลเซียม (Ca^{2+} channel) จึงสามารถลดการปลดปล่อยสารสื่อประสาท (Neurotransmitter) จาก ปลายประสาท (Nerve endings) ที่ วาส ดีเฟอเรนส์ (Vas deferens) ซึ่งเกี่ยวข้อง กับฤทธิ์ทางสรีรวิทยา และพบว่าสามารถเพิ่มระดับการคั่งของสารสื่อประสาทโมโนเอมีน (Monoamine neurotransmitter) สารสื่อประสาท ได้แก่ เซโรโทนิน (Serotonin), นอร์อะดรีนาลีน (Noradrenaline) และโดปามีน (Dopamine) จึงมีคุณสมบัติด้านการซึมเศร้า (Antidepressant effect) โดยสารไมทราไจนีน หากเสพในปริมาณน้อยมีฤทธิ์กระตุ้นประสาทคล้ายโคคา แต่หากเสพในปริมาณสูงจะออกฤทธิ์กดประสาทและทำให้เคลิ้มสุขเหมือนเสพยาจำพวกฝิ่น (4)

โดยพืชกระท่อมมีสรรพคุณในการรักษาอาการติดเชื่อในลำไส้ ท้องร่วง โรคบิด แก้ปวดมวนท้อง ท้องเพ้อ บรรเทาปวด ลดไข้ แก้ไอ (6) และยังนิยมใช้ในในกลุ่มผู้ใช้แรงงานที่ต้องการเพิ่มพลังกำลังและความสามารถในการทำงานให้นานขึ้น ส่วนใหญ่นิยมเสพยาพืชกระท่อมในรูปแบบของสูตรค็อกเทล 4x100 ที่ประกอบด้วยน้ำต้มใบกระท่อม ผสมกับน้ำอัดลม ยาแก้ไอ และยาอื่น ๆ เช่น ยากลากเรียด ยานอนหลับ ยาต้านการซึมเศร้า ยาแก้ปวด เป็นต้น ซึ่งในปัจจุบันมีการใช้พืชกระท่อมเพิ่มมากขึ้น โดยมักแอบอ้างถึงประโยชน์ทางการแพทย์

การหาปริมาณสารไมทราไจนีนในชีววัตถุ จะทำให้สามารถทราบได้ว่าการเสพยาพืชกระท่อมหรือไม่ และมีรูปแบบการเสพยาเดี่ยว ๆ หรือเสพร่วมกับยาหรือยาเสพติดอื่น ๆ ในรูปแบบของการเสพยาเพื่อความบันเทิง ดังนั้นเพื่อให้การวิเคราะห์หาปริมาณสารไมทราไจนีนในชีววัตถุ เป็นไปอย่างถูกต้องเหมาะสม จึงควรมีการหาความใช้ได้ของวิธีทดสอบก่อน โดยการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบคือ กระบวนการที่พิสูจน์ว่าวิธีทดสอบมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ทดสอบตามวัตถุประสงค์ที่ต้องการใช้งาน โดย

จัดทำหลักฐานที่เป็นรูปธรรมเพื่อแสดงถึงคุณภาพ และระดับความน่าเชื่อถือของการทดสอบนั้น ๆ ภายใต้เงื่อนไขจำเพาะของวิธีทดสอบ

ทั้งนี้มีการศึกษาของ Vania Meireles และคณะ ทำการศึกษาผลทางคลินิก พิษวิทยา และการวิเคราะห์ผลระดับยาที่ส่งผลต่อสุขภาพของพืชกระท่อมซึ่งได้กล่าวถึงการใช้เทคนิควิธีวิเคราะห์ทั้งแบบ แก๊สโครมาโทกราฟี (Gas chromatography; GC) ซึ่งมีความจำเพาะสูง แต่จำเป็นต้องทำการเตรียมสารตัวอย่างให้เป็นอนุพันธ์ (Derivatization) และใช้อุณหภูมิสูงจึงทำให้การเลือกเฟ้นของแก๊สโครมาโทกราฟี (GC stationary phases) มีข้อจำกัด และแบบลิควิดโครมาโทกราฟี (Liquid chromatography; LC) ซึ่งเป็นที่นิยมมากกว่า แต่อย่างไรก็ตามต้องมีขั้นตอนการสกัดตัวอย่างที่ดีเพื่อกำจัดสิ่งรบกวนในการวิเคราะห์ออกไป (7) โดยในงานวิจัยนี้เลือกเครื่องมือวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคการสกัดด้วยวัฏภาคของแข็งแบบออนไลน์ ร่วมกับ ลิควิดโครมาโทกราฟี แมสสเปกโตรเมตรี (Online-Solid phase extraction liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Online-SPE-LC-MS/MS) โดยเครื่องจะทำการสกัดและวิเคราะห์ตัวอย่างได้ในคราวเดียว ซึ่งการสกัดตัวอย่างโดยเทคนิคนี้มีข้อดีคือ จะมีความเสถียรมากกว่า ใช้ปริมาณตัวอย่างน้อยกว่า ลดระยะเวลาการทำงาน ลดการใช้สารเคมีและลดอันตรายจากสารเคมีมากกว่าการสกัดด้วยวิธีการสกัดด้วยวัฏภาคของแข็ง (Solid phase extraction; SPE) หรือ การสกัดด้วยวัฏภาคของเหลว (Liquid-liquid extraction; LLE)

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณของไมทราไจนีน ในตัวอย่างทางชีวภาพ ได้แก่ เลือดและปัสสาวะ ด้วยวิธี Online-SPE-LC-MS/MS เพื่อนำวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวมาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ ไมทราไจนีน ได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ และเชื่อถือได้

วิธีดำเนินการวิจัย

1. อุปกรณ์และสารเคมี

1.1 อุปกรณ์

เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer) ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 100 และ 1,000 ไมโครลิตร ไมโครทิวป์ (Microtube) ขนาด 2,000 ไมโครลิตร ขวดแก้วแอมเบอร์ (Amber Glass vial) ขนาด 1.5 ไมโครลิตร ฝาขวดสีฟ้า (Vial blue caps) ไมโครปิเปตทิป (Micropipette Tips) เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge machine) เครื่องลิควิดโครมาโทกราฟี รุ่น Thermo Scientific™ Dionex™ UltiMate™ 3000 RSLC แมสสเปกโตรมิเตอร์ รุ่น Thermo Scientific™ TSQ Quantiva™ คอลัมน์สำหรับการแยกสาร รุ่น Thermo Scientific™ HyperSep™ HPLC Columns for Online SPE คอลัมน์สำหรับการวิเคราะห์สาร รุ่น Thermo Scientific™ Hypersil GOLD™ PFP HPLC Columns

1.2 สารเคมี

อะซิโตนไตริล (Acetonitrile) จากบริษัท Honeywell® เลือดเปล่าที่ไม่มีสารเจือปน (Blood blank sample) ปัสสาวะเปล่าที่ไม่มีสารเจือปน (Urine blank sample) น้ำปราศจากไอออน (Deionized water) สารละลายไตรมีพรามินในเมทานอล (Trimipramine in methanol) จากบริษัท Sigma-Aldrich® สารมาตรฐานไมทราไจนีนในเมทานอล (Mitragynine standard in methanol) จากบริษัท Cerilliant® กรดฟอร์มิก (Formic acid) จากบริษัท Sharlau® เมทานอล (Methanol) จากบริษัท Honeywell® สารละลายแอมโมเนียมอะซิเตตในน้ำและเมทานอล (Ammonium acetate in water/methanol) (85:15 โดยปริมาตร) จากบริษัท Emsure®

1.3 เครื่องมือวิเคราะห์

วิเคราะห์หาปริมาณไมทราไจนีน ด้วยเครื่อง Online-SPE-LC-MS/MS ส่วนของคอลัมน์ที่ใช้ในการสกัดด้วยวัฏภาคของแข็ง (SPE column) ใช้คอลัมน์สำเร็จรูป Thermo Scientific HyperSep Retain Polar Enhanced

Polymer (PEP) โดยตั้งค่าสภาวะเครื่องดังนี้ อุณหภูมิภายในตู้อบสำหรับบรรจุคอลัมน์ (Column oven temperature) 55 องศาเซลเซียส

ระบบล้าง (Washing system) 10 นาที ป้อนตัวเข้าใช้อัตราการไหล 0.9 มิลลิลิตรต่อนาที เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ใช้ 0.5 เปอร์เซ็นต์ กรดฟอร์มิกในน้ำ ในอัตราส่วน 5 เปอร์เซ็นต์ และใช้ 0.5 เปอร์เซ็นต์ กรดฟอร์มิก ในอะซิโตนไตรล ในอัตราส่วน 95 เปอร์เซ็นต์ ป้อนตัวเข้าใช้อัตราการไหล 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ 2 มิลลิโมลาร์ แอมโมเนียม อะซิเตรต ในน้ำ ต่อเมทานอล (85:15) ในอัตราส่วน 100 เปอร์เซ็นต์

ระบบสมดุล (Equilibrium system) 5 นาที ป้อนตัวเข้าใช้อัตราการไหล 0.9 มิลลิลิตรต่อนาที เฟสเคลื่อนที่ ใช้ 0.5 เปอร์เซ็นต์ กรดฟอร์มิกในน้ำ ในอัตราส่วน 90 เปอร์เซ็นต์ และใช้ 0.5 เปอร์เซ็นต์ กรดฟอร์มิกในอะซิโตนไตรล ในอัตราส่วน 10 เปอร์เซ็นต์ ป้อนตัวเข้าใช้อัตราการไหล 3 มิลลิลิตรต่อนาที เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ 2 มิลลิโมลาร์ แอมโมเนียม อะซิเตรต ในน้ำ ต่อเมทานอล (85:15) ในอัตราส่วน 100 เปอร์เซ็นต์

และตั้งค่าสภาวะ แมสสเปกโตรมิเตอร์ดังนี้ แหล่งกำเนิดไอออน ชนิดอีทีเอเล็คโตรสเปรย์ ไอออนในเซชัน (Heated ESI) ตัวพ่นไอออนบวก ความต่างศักย์ 3,500 โวลต์ ตัวพ่นไอออนลบ ความต่างศักย์ 2,500 โวลต์ ชีทแก๊ส 50 อาร์บิทารี ยูนิต (Arb) แก๊สช่วย (Auxiliary gas) 15 อาร์บิทารี ยูนิต, อุณหภูมิภายในท่อส่งผ่านไอออน (Ion transfer tube temp) 350 องศาเซลเซียส อุณหภูมิภายในเครื่องทำไอระเหย (Vaporizer temp) 400 องศาเซลเซียส

2. การเตรียมสารละลายมาตรฐานไมทราไจนีน สำหรับกราฟมาตรฐาน (Calibration curve) และการควบคุมคุณภาพ (Quality control)

เตรียมสารละลายมาตรฐาน ไมทราไจนีน สำหรับการสร้างกราฟมาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 1.00, 10.00, 125.00, 250.00, 500.00 และ 1,000.00

นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และสำหรับการทำการควบคุมคุณภาพ (Quality control) ที่ความเข้มข้น 300.00 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในเลือดเปล่าที่ไม่มีสารเจือปน หรือ ปัสสาวะเปล่าที่ไม่มีสารเจือปน

3. การเตรียมตัวอย่าง

3.1 การเตรียมตัวอย่างเลือด

นำอะซิโตนไตรล 900 ไมโครลิตร กับ 5 พาร์ทเปอร์มิลเลียน (ppm; w/v) สารละลายไทรมิพรามินในเมทานอล (สารมาตรฐานภายใน; internal standard) 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติมตัวอย่างเลือดเปล่า 300 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วนใสปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ลงในขวดแก้วขนาด 1.5 มิลลิลิตร เพื่อนำเข้าเครื่อง Online-SPE-LC-MS/MS แล้ววิเคราะห์ตัวอย่างต่อไป

3.2 การเตรียมตัวอย่างปัสสาวะ

นำปัสสาวะส่วนใสปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ผสมกับ 5 ppm สารละลายไทรมิพรามินในเมทานอล 20 ไมโครลิตร ใน ขวดแก้วขนาด 1.5 มิลลิลิตร เพื่อนำเข้าเครื่อง Online-SPE-LC-MS/MS แล้ววิเคราะห์ตัวอย่างต่อไป

4. การทดสอบความถูกต้องของการวิเคราะห์ (Method Validation)

4.1 ความเป็นเส้นตรง (Linearity)

เตรียมสารละลายมาตรฐานไมทราไจนีน ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่แตกต่างกัน 6 ความเข้มข้น ได้แก่ 1.00 10.00 125.00 250.00 500.00 และ 1,000.00 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อเตรียมกราฟมาตรฐาน โดยมีความเข้มข้นตั้งแต่ช่วง 1-1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

4.2 ความจำเพาะ (Specificity)

ทดสอบโดยการเตรียมตัวอย่างที่มีการเติมสารมาตรฐานลงไป (Spiked sample) ด้วยการเติมสารมาตรฐานรวม (Mixed standard) ทั้ง 5 ชนิด คือ เซทิริซีน

(Cetirizine) ไดเฟนไฮโดรตามีน (Diphenhydramine) ไมทราไจนีน (Mitragynine) ไตรมิพรามิน (Trimipramine) และทรามาดอล (Tramadol) ลงใน ตัวอย่างที่ไม่มีสารที่ต้องการวิเคราะห์ (Sample blank) ให้มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค การมอนิเตอร์ปฏิกิริยาที่เลือกแล้ว (Selected reaction monitoring; SRM) แล้วเปรียบเทียบกับโครมาโทแกรม (Chromatogram) ระหว่างสารทั้ง 5 ชนิด ซึ่งสารไมทราไจนีน มีพีคเป้าหมาย (Target peaks) ที่มีมวลตั้งต้น (Precursor mass) และ มวลผลิตภัณฑ์ (Product mass) คือ 399.230 และ 174.100 ตามลำดับ ใช้ พลังงานของการชน (Collision energy) เท่ากับ 30.00 และมี พี คยืนยัน (Confirming peaks) ที่มีมวลตั้งต้น และ มวลผลิตภัณฑ์ คือ 399.230 และ 159.100 ตามลำดับ ใช้พลังงานของการชน เท่ากับ 40.00

4.3 ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy)

เตรียมสารละลายมาตรฐานไมทราไจนีน ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่แตกต่างกัน 3 ความเข้มข้น ได้แก่ 100.00 300.00 800.00 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในเลือดและ 100.00 300.00 750.00 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในปัสสาวะ ความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ จากนั้นวัดหาปริมาณไมทราไจนีน แล้วคำนวณหาค่าเฉลี่ยและ ร้อยละการคืนกลับ (Percent recovery)

4.4 ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (Precision)

เตรียมสารละลายมาตรฐาน ไมทราไจนีน ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่แตกต่างกัน 3 ความเข้มข้น ได้แก่ 100.00 300.00 800.00 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ 100.00 300.00 750.00 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับการวิเคราะห์เลือดและปัสสาวะตามลำดับ ทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นละ 6 ซ้ำภายในวันเดียวกัน (Intraday-Precision) และระหว่างวัน (Interday-Precision) เป็นระยะเวลา 3 วัน จากนั้นวัดหาปริมาณไมทราไจนีน แล้วคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative Standard Deviation; RSD)

4.5 ขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD)

เตรียมสารละลายมาตรฐานไมทราไจนีน ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่แตกต่างกัน 3 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.10 0.15 0.20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.10 0.15 0.25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับการวิเคราะห์เลือดและปัสสาวะตามลำดับ ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ จากนั้นวัดค่าอัตราส่วนสัญญาณต่อสัญญาณรบกวน (Signal to Noise ratio ; S/N ratio) โดยเลือกความเข้มข้นที่ให้ค่า S/N ratio > 3

4.6 ขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation ; LOQ)

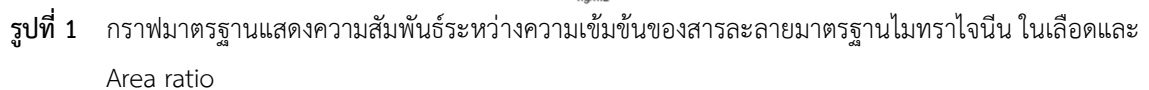
เตรียมสารละลายมาตรฐานไมทราไจนีน ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่แตกต่างกัน 3 ความเข้มข้น ได้แก่ 1.00 1.50 และ 2.00 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1.00 2.00 และ 2.50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับการวิเคราะห์เลือดและปัสสาวะตามลำดับ ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ จากนั้นวัดค่า S/N ratio โดยเลือกความเข้มข้นที่ให้ค่า S/N ratio > 10

ผลการศึกษาและอภิปรายผล

1. การทดสอบความถูกต้องของการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือด

จากการนำสารละลายมาตรฐาน ไมทราไจนีน ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่แตกต่างกัน จำนวน 6 ความเข้มข้น ได้แก่ 1.00 10.00 125.00 250.00 500.00 และ 1,000.00 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบความสัมพันธเชิงเส้นตรงด้วยวิธี Online-SPE-LC-MS/MS โดยการสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานไมทราไจนีน และอัตราส่วนพื้นที่ (Area ratio) ที่วัดได้ พบว่าได้กราฟเส้นตรงดังรูปที่ 1 ซึ่งเมื่อคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การกำหนด (Coefficient of Determination; r^2) พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.9998

สารอินทรกวนในโครมาโตแกรม (Chromatogram) ของสารไมทราไจนีน โดยเวลาที่สารไว้ในคอลัมน์ (Retention time; RT) เท่ากับ 3.46 3.30 3.41 3.50 และ 2.96 นาที ตามลำดับ ดังรูปที่ 2



ครั้งที่	ความเข้มข้น ไมทราไจนีน 100.00 (ng/ml)	%Recovery	ความเข้มข้น ไมทราไจนีน 300.00 (ng/ml)	%Recovery	ความเข้มข้น ไมทราไจนีน 800.00 (ng/ml)	%Recovery
1	98.57	98.57	309.87	103.29	761.96	95.25
2	99.11	99.11	315.48	105.16	766.31	95.79
3	100.40	100.40	327.36	109.12	797.58	99.70

ครั้งที่	ความเข้มข้น ไมทราไจนีน	%Recovery	ความเข้มข้น ไมทราไจนีน	%Recovery	ความเข้มข้น ไมทราไจนีน	%Recovery
	100.00 (ng/ml)		300.00 (ng/ml)		800.00 (ng/ml)	
4	96.50	96.50	320.88	106.96	791.93	98.99
5	95.17	95.17	322.41	107.47	793.07	99.13
6	100.81	100.81	313.76	104.59	820.74	102.59
ค่าเฉลี่ย	98.43	98.43	318.29	106.10	788.60	98.58

ตารางที่ 2 ค่าความเข้มข้นที่นำไปวิเคราะห์ ค่าความเข้มข้นที่คำนวณได้ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และค่า SD และ %RSD ของสารไมทราไจนีน ในตัวอย่างเลือด

ความเข้มข้นไมทราไจนีน (ng/ml)	Intraday-Precision			Interday-Precision		
	ค่าเฉลี่ย	SD	%RSD	ค่าเฉลี่ย	SD	%RSD
100.00	98.43	2.21	2.24	98.31	1.69	1.72
300.00	318.29	6.41	2.01	315.33	2.94	0.93
800.00	788.60	21.69	2.75	797.13	3.14	0.39

เมื่อนำสารละลายมาตรฐานไมทราไจนีน จำนวน 3 ความเข้มข้น ได้แก่ 100.00 300.00 และ 800.00 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบความถูกต้องและความเที่ยงด้วยวิธี Online-SPE-LC-MS/MS พบว่าสารละลายมาตรฐานไมทราไจนีน 100.00 300.00 และ 800.00 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าความเข้มข้นของสารไมทราไจนีน เฉลี่ยเท่ากับ 98.43 318.29 และ 788.60 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งเมื่อนำค่าเฉลี่ยที่ได้มาคำนวณหาค่า %recovery พบว่าค่าเฉลี่ยของความเข้มข้น 100.00 300.00 และ 800.00 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าอยู่ในช่วง 95.17-100.81 103.29-109.12 และ 95.25-102.59% ตามลำดับ ดังตารางที่ 1 และเมื่อนำมาทดสอบหาความแม่นยำ โดยคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของความเข้มข้น 100.00 300.00 และ 800.00 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า Intraday-Precision มีค่าเท่ากับ 2.24 2.01 และ 2.75% ตามลำดับ สำหรับการวิเคราะห์ซ้ำระหว่างวัน มีค่า Interday-Precision เท่ากับ 1.72 0.93 และ 0.39% ตามลำดับดังตารางที่ 2

จากการนำสารละลายมาตรฐานไมทราไจนีน จำนวน 3 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.10 0.15 0.20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบ limit of detection ด้วยวิธี Online-SPE-LC-MS/MS พบว่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่มีค่า S/N ratio มากกว่า 3 ทั้ง 5 ซ้ำ คือ 0.20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยได้ค่า S/N ratio เท่ากับ 5.16 3.24 4.25 3.87 และ 3.79 ดังตารางที่ 3

จากการนำสารละลายมาตรฐานไมทราไจนีน จำนวน 3 ความเข้มข้น ได้แก่ 1.00 1.50 และ 2.00 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบ limit of quantitation ด้วยวิธี Online-SPE-LC-MS/MS พบว่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่มีค่า S/N ratio มากกว่า 10 ทั้ง 5 ซ้ำ คือ 1.00 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยได้ค่า S/N ratio เท่ากับ 13.82, 14.89, 13.01, 13.01 และ 12.85 และเมื่อนำค่าความเข้มข้นของไมทราไจนีน ที่วัดได้มาคำนวณหา %recovery พบว่าได้ค่าอยู่ในช่วง 81.7-97.6% และเมื่อคำนวณหาค่า %RSD พบว่าได้ค่าเท่ากับ 7.47% ดังตารางที่ 4 และ 5

ตารางที่ 3 การหาค่า LOD ของวิธีวิเคราะห์ จาก Signal to Noise (S/N) ratio ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในตัวอย่างเลือด

ทำซ้ำครั้งที่	ความเข้มข้นไมทราไจนีน	ความเข้มข้นไมทราไจนีน	ความเข้มข้นไมทราไจนีน
	0.10 (ng/ml)	0.15 (ng/ml)	0.20 (ng/ml)
1	2.06	1.95	5.16
2	3.96	3.31	3.24
3	3.57	3.71	4.25
4	1.95	4.42	3.87
5	1.98	2.78	3.79

ตารางที่ 4 การหาค่า LOQ ของวิธีวิเคราะห์ จาก Signal to Noise (S/N) ratio ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในตัวอย่างเลือด

ทำซ้ำครั้งที่	ความเข้มข้นไมทราไจนีน	ความเข้มข้นไมทราไจนีน	ความเข้มข้นไมทราไจนีน
	1.00 (ng/ml)	1.50 (ng/ml)	2.00 (ng/ml)
1	13.82	17.61	18.13
2	14.89	22.36	31.86
3	13.01	22.54	22.54
4	13.01	17.78	24.30
5	12.85	20.95	21.31

ตารางที่ 5 การหา Accuracy และ Precision ของ LOQ ในตัวอย่างเลือด

ทำซ้ำครั้งที่	ความเข้มข้นของสารไมทราไจนีน 1.00 ng/ml		
	Signal to Noise (S/N) ratio	ค่าที่วัดได้ (ng/ml)	%Recovery
1	13.82	0.98	97.6
2	14.89	0.84	84.1
3	13.01	0.84	83.5
4	13.01	0.85	85.2
5	12.85	0.82	81.7
ค่าเฉลี่ย		0.87	
SD		0.06	
%RSD		7.47	

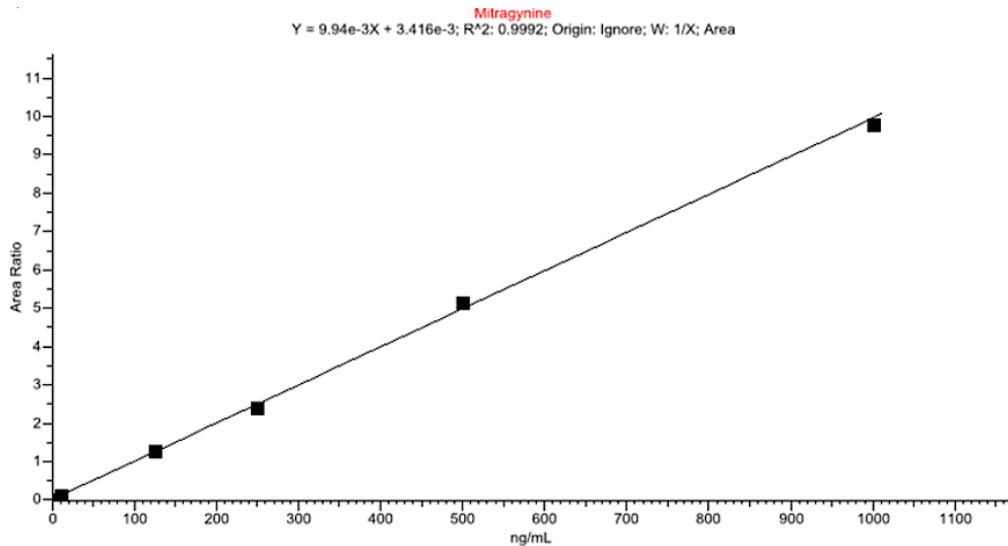
2. การทดสอบความถูกต้องของการวิเคราะห์ตัวอย่าง
ปัสสาวะ

จากการนำสารละลายมาตรฐานไมทราไจนีน
จำนวน 6 ความเข้มข้น ได้แก่ 1.00 10.00 125.00 250.00

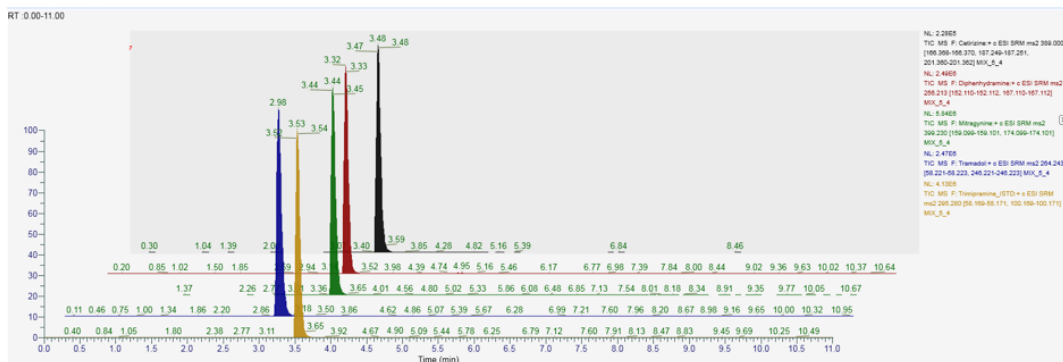
500.00 และ 1,000.00 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบ
ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงด้วยวิธี Online-SPE-LC-MS/MS
โดยการสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง
ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานไมทราไจนีน และ

อัตราส่วนพื้นที่ ที่วัดได้ พบว่าได้กราฟเส้นตรงดังรูปที่ 3 ซึ่งเมื่อคำนวณหาค่า r^2 พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.9992 จากการเติมสารมาตรฐานรวม (Mixed standard) ทั้ง 5 ชนิด คือ เซทริซีน ไดเฟนไฮดรามีน ไมทราไจนีน ไตรมิพรามิน และ ทรามาดอล ลงปัสสาวะเปล่า เพื่อทดสอบความจำเพาะ นั้น

ไม่พบพีคของสารอื่นรบกวนในโครมาโตแกรม ของสารไมทราไจนีน โดยเวลาที่สารใช้ในคอลัมน์ (Retention time; RT) เท่ากับ 3.48 3.33 3.45 3.54 และ 2.98 นาที ตามลำดับ ดังรูปที่ 4



รูปที่ 3 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานไมทราไจนีน ในปัสสาวะและ area ratio



รูปที่ 4 การทดสอบความจำเพาะ (Specificity) ของสารมาตรฐานในปัสสาวะ

เมื่อนำสารละลายมาตรฐานไมทราไจนีน จำนวน 3 ความเข้มข้น ได้แก่ 100.00 300.00 และ 750.00 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบความถูกต้องและความเที่ยงด้วยวิธี Online-SPE-LC-MS/MS พบว่าสารละลายมาตรฐานไมทราไจนีน 100 300 และ 750 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าความเข้มข้นของสารไมทราไจนีนเฉลี่ยเท่ากับ 101.55 296.68 และ 737.86 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ตามลำดับ ซึ่งเมื่อนำค่าเฉลี่ยที่ได้มาคำนวณหาค่า %recovery พบว่าค่าเฉลี่ยของความเข้มข้น 100.00 300.00 และ 750.00 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าอยู่ในช่วง 94.98-111.20 96.99-103.34 และ 95.82-102.96% ตามลำดับ ดังตารางที่ 6 และเมื่อนำมาทดสอบหาความแม่นยำ โดยคำนวณหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของความเข้มข้น 100.00 300.00 และ 750.00 นาโนกรัม

ต่อมิลลิลิตร พบว่าค่า Intraday-Precision มีค่าเท่ากับ 6.25 2.29 และ 2.94% ตามลำดับ สำหรับการวิเคราะห์ซ้ำระหว่างวันมีค่า Interday-Precision เท่ากับ 6.06 1.57 และ 1.29% ตามลำดับ ดังตารางที่ 7

จากการนำสารละลายมาตรฐานไมทราไจนีน จำนวน 3 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.10 0.15 0.25 นาโนกรัม

ต่อมิลลิลิตร มาทดสอบ limit of detection ด้วยวิธี Online-SPE-LC-MS/MS พบว่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่มีค่า S/N ratio มากกว่า 3 ทั้ง 5 ซ้ำ คือ 0.15 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยได้ค่า S/N ratio เท่ากับ 4.29 6.46 5.46 5.25 และ 3.44 ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 6 ค่าความเข้มข้นที่นำไปวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นที่คำนวณได้ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และ %Recovery ของสารไมทราไจนีน ในตัวอย่างปัสสาวะ

วันที่	ความเข้มข้น ไมทราไจนีน 100.00 (ng/ml)	%Recovery	ความเข้มข้น ไมทราไจนีน 300.00 (ng/ml)	%Recovery	ความเข้มข้น ไมทราไจนีน 750.00 (ng/ml)	%Recovery
1	107.15	107.15	310.01	103.34	756.39	100.85
2	100.36	100.36	293.72	97.91	722.56	96.34
3	99.19	99.19	296.66	98.89	772.17	102.96
4	96.39	96.39	290.99	96.99	734.52	97.94
5	94.98	94.98	295.23	98.41	722.90	96.39
6	111.20	111.20	293.48	97.83	718.62	95.82
ค่าเฉลี่ย	101.55	101.55	296.68	98.90	737.86	98.38

ตารางที่ 7 ค่าความเข้มข้นที่นำไปวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นที่คำนวณได้ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และค่า SD และ %RSD ของสารไมทราไจนีน ในตัวอย่างปัสสาวะ

ความเข้มข้น ไมทราไจนีน (ng/ml)	Intraday-Precision			Interday-Precision		
	ค่าเฉลี่ย	SD	%RSD	ค่าเฉลี่ย	SD	%RSD
100.00	101.55	6.34	6.25	103.51	6.27	6.06
300.00	296.68	6.80	2.29	293.05	4.60	1.57
750.00	737.86	21.72	2.94	748.36	9.69	1.29

จากการนำสารละลายมาตรฐานไมทราไจนีน จำนวน 3 ความเข้มข้น ได้แก่ 1.00 2.00 และ 2.50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบ limit of quantitation ด้วยวิธี Online-SPE-LC-MS/MS พบว่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่มีค่า S/N ratio มากกว่า 10 ทั้ง 5 ซ้ำ คือ 2.0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยได้ค่า S/N ratio เท่ากับ 17.82

19.86 19.91 19.36 และ 23.14 และเมื่อนำค่าความเข้มข้นของ ไมทราไจนีน ที่วัดได้มาคำนวณหา %recovery พบว่าได้ค่าอยู่ในช่วง 87.5-109.5% และเมื่อคำนวณหาค่า %RSD พบว่าได้ค่าเท่ากับ 8.63% ดังตารางที่ 9 และ 10

ตารางที่ 8 การหาค่า LOD ของวิธีวิเคราะห์ จาก Signal to Noise (S/N) ratio ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในตัวอย่างปัสสาวะ

ทำซ้ำครั้งที่	ความเข้มข้น	ความเข้มข้น	ความเข้มข้น
	ไมทราไจนีน	ไมทราไจนีน	ไมทราไจนีน
	0.10 (ng/ml)	0.15 (ng/ml)	0.25 (ng/ml)
1	6.55	4.29	12.99
2	6.07	6.46	26.63
3	4.26	5.46	27.86
4	2.44	5.25	17.17
5	2.10	3.44	12.39

ตารางที่ 9 การหาค่า LOQ ของวิธีวิเคราะห์ จาก Signal to Noise (S/N) ratio ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในตัวอย่างปัสสาวะ

ทำซ้ำครั้งที่	ความเข้มข้นไมทราไจนีน	ความเข้มข้นไมทราไจนีน	ความเข้มข้นไมทราไจนีน
	1.00 (ng/ml)	2.00 (ng/ml)	2.50 (ng/ml)
1	6.83	17.82	15.96
2	4.37	19.86	24.12
3	18.45	19.91	21.92
4	10.24	19.36	18.96
5	-	23.14	14.53

ตารางที่ 10 แสดงการหา accuracy และ precision ของ LOQ ในตัวอย่างปัสสาวะ

ทำซ้ำครั้งที่	ความเข้มข้นของสารไมทราไจนีน 2.00 ng/ml		
	Signal to Noise (S/N) ratio	ค่าที่วัดได้ (ng/ml)	%Recovery
1	17.82	1.75	87.5
2	19.86	2.19	109.5
3	19.91	2.12	106
4	19.36	2.05	102.5
5	23.14	1.93	96.5
ค่าเฉลี่ย		2.01	
SD		0.17	
%RSD		8.63	

สรุปผล

การทดสอบความถูกต้องของการวิเคราะห์ (Method Validation) ซึ่งอ้างอิงเกณฑ์จาก Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry 2018 (8) โดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาสหรัฐอเมริกา ทำการทดสอบ 6 หัวข้อ พบว่า หัวข้อที่ 1 ความเป็นเส้นตรง มีค่า r^2 (0.995 – 1.000) ในเลือดและปัสสาวะ เท่ากับ 0.9998 และ 0.9992 ตามลำดับ หัวข้อที่ 2 ความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ ไม่พบฟิคของสาร อื่นรบกวนในโครมาโตแกรม ของสารไมทราไจนีน ในเลือดและปัสสาวะ หัวข้อที่ 3 ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ มีค่า %recovery ($\pm 15\%$) ในเลือดและปัสสาวะ เท่ากับ 95.25-109.12% และ 94.98-111.20% ตามลำดับ หัวข้อที่ 4 ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ พบว่า ค่า Intraday-Precision และ Interday-Precision มีค่า %RSD ($< 15\%$) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ทั้งในเลือดและปัสสาวะ หัวข้อที่ 5 ขีดจำกัดของการตรวจพบ (S/N ratio > 3) ในเลือดและปัสสาวะมีค่า เท่ากับ 0.20 และ 0.15 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และหัวข้อที่ 6 ขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณ (S/N ratio > 10) ในเลือดและปัสสาวะมีค่า เท่ากับ 1.0 และ 2.0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยค่า LOQ ที่ได้นั้นมีความเที่ยงและความแม่นยำ อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ดังนั้นการหาปริมาณไมทราไจนีน ในเลือดและปัสสาวะด้วยวิธีวิเคราะห์นี้มีความเหมาะสม สามารถใช้วิเคราะห์ตัวอย่างได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ เชื่อถือได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ กลุ่มงานพิษวิทยา สถาบันนิติเวชวิทยา โรงพยาบาลตำรวจ ที่กรุณาให้ความสะดวกในการทำงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Narcotics Act (No. 7) B.E. 2562 (2019). Government Gazette Volume 136, Part 19 (dated 18 February 2019). Thai.
2. Kratom (*Mitragyna speciosa*) drug profile [Internet]. Portugal: The European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. [cited 2021 Jul 2]. Available from: <https://www.emcdda.europa.eu/publication/s/drug-profiles/kratom>.
3. Ya K, Tangamornsuksan W, Scholfield CN, Methaneethorn J, Lohitnavy M. Pharmacokinetics of mitragynine, a major analgesic alkaloid in kratom (*Mitragyna speciosa*): A systematic review. Asian J Psychiatr. 2019;43:73–82.
4. Suhaimi FW, Yusoff NHM, Hassan R, Mansor SM, Navaratnam V, Müller CP, et al. Neurobiology of Kratom and its main alkaloid mitragynine. Brain Res Bull. 2016;126(Pt 1):29–40.
5. Kamble SH, Sharma A, King TI, León F, McCurdy CR, Avery BA. Metabolite profiling and identification of enzymes responsible for the metabolism of mitragynine, the major alkaloid of *Mitragyna speciosa* (kratom). Xenobiotica. 2019;49(11):1279–88.
6. Wangsinthaveeku C. Kratom (Kratom) [Internet]. 2017 [accessed 25 Nov. 2019]. Accessed from: <http://ccpe.pharmacycouncil.org>. Thai.
7. Meireles V, Rosado T, Barroso M, Soares S, Gonçalves J, Luís Â, et al. *Mitragyna speciosa*:

Clinical, Toxicological Aspects and Analysis in Biological and Non-Biological Samples. Med (Basel, Switzerland). 2019;6(1):35.

8. Guidance for industry-Bioanalytical method validation [Internet]. United States: U.S. Department of Health and Human Services,

Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine. 2018 [cited 2019 Nov 10]. Available from: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>