

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ยาและสารเสพติดในเส้นผม 11

ชนิด แบบรวดเร็ว (Rapid analysis) โดยเทคนิค LC-MS/MS

ดร. ธนสิริ ยกเชื้อ

กลุ่มตรวจพิสูจน์ทางเคมี สถาบันนิติวิทยาศาสตร์

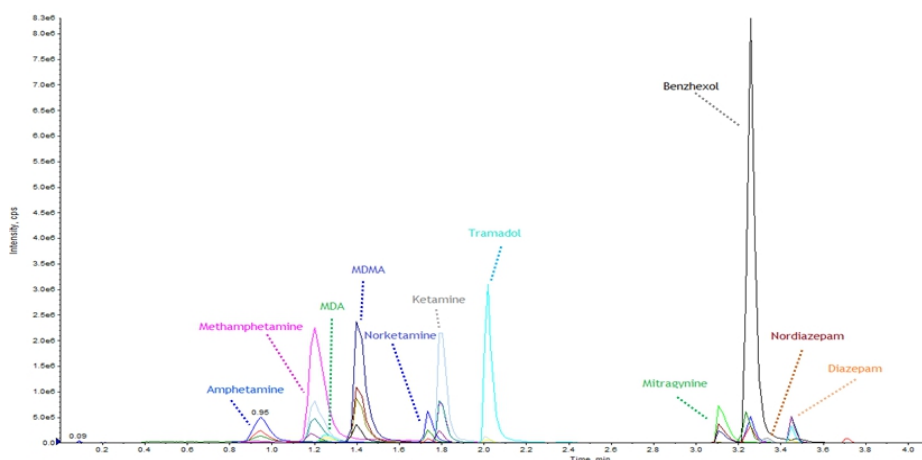
นอกจากการให้บริการตรวจพิสูจน์ทางนิติพิษวิทยาการ เช่น ตรวจวิเคราะห์เพื่อระบุชนิดและหาปริมาณของยา สารพิษและสารเสพติดในสิ่งส่งตรวจชีววัตถุ เช่น เลือด ปัสสาวะ และเส้นผม เพื่อสนับสนุนกระบวนการยุติธรรมในการหาสาเหตุของการเสียชีวิต หรือใช้เพื่อเป็นหลักฐานประกอบการกระทำผิดในคดีต่างๆ แล้วนั้น ภารกิจสำคัญอย่างหนึ่งของสถาบันนิติวิทยาศาสตร์คือการให้บริการด้านนิติวิทยาศาสตร์เพื่อประโยชน์ในการคุ้มครองหรืออำนวยความสะดวกแก่เด็กและเยาวชนตามที่หน่วยงานที่เกี่ยวข้องร้องขอ เช่น การติดตามเฝ้าระวังการใช้ยาเสพติดของเด็กและเยาวชนที่อยู่ระหว่างกระบวนการบำบัด ปรับเปลี่ยนพฤติกรรม ภายใต้การดูแลของศูนย์ฝึกและอบรมเด็กและเยาวชน กรมพินิจและคุ้มครองเด็กและเยาวชน โดยการตรวจพิสูจน์สารเสพติดในเส้นผม

สถาบันนิติวิทยาศาสตร์ เริ่มบูรณาการงานร่วมกับกรมพินิจและคุ้มครองเด็กและเยาวชน ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2558 โดยริเริ่มนำร่องนำการตรวจพิสูจน์สารเสพติดในเส้นผม มาประยุกต์ใช้ในการติดตามเฝ้าระวังการใช้ยาเสพติดของเด็กและเยาวชน ภายใต้การดูแลของกรมพินิจและคุ้มครองเด็กและเยาวชน และดำเนินงานดังกล่าวต่อเนื่องมาจนปัจจุบัน ผลจากการบูรณาการงานร่วมอย่างต่อเนื่อง พบว่า เด็กและเยาวชนมีการใช้ยาเสพติดในภาพรวมลดลง อย่างไรก็ตาม การตรวจพิสูจน์สารเสพติดในเส้นผมนั้นเป็นการตรวจหาสารในปริมาณน้อยมากระดับนาโนกรัมถึงพิโคกรัม จึงจำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีความไวสูง ด้วยเทคนิค LC-MS/MS (Triple quadrupole mass spectrometer หรือ Tandem Mass spectrometry) ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความถูกต้องแม่นยำสูงและเป็นที่ยอมรับในระดับสากล มาใช้ในการตรวจระบุชนิดและปริมาณของยาและสารเสพติดในเส้นผม และจำเป็นต้องใช้สารมาตรฐานอ้างอิง (certified reference materials, CRMs) ส่งผลให้งบประมาณในการตรวจวิเคราะห์ยาและสารเสพติดในเส้นผมนั้นอยู่ที่ประมาณ 1,800 บาท/ครั้ง การพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ยาและสารเสพติดในเส้นผม 11 ชนิด แบบรวดเร็วภายในเวลา 5 นาที (rapid analysis) ในครั้งนี้ เป็นการพัฒนาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจพิสูจน์ มีเป้าหมายเพื่อลดงบประมาณที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ยาและสารเสพติดในเส้นผมต่อครั้งและพัฒนาให้การตรวจพิสูจน์ทำได้เร็วขึ้น ตอบสนองต่อความต้องการของกรมพินิจและคุ้มครองเด็กและเยาวชนในการนำผลการวิเคราะห์ไปใช้ในการบำบัด และปรับเปลี่ยนพฤติกรรมของเด็กและเยาวชน

สมาคมนิติพิษวิทยาระดับสากล เช่น Society of Forensic Toxicologists (SOFT) และ The International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT) ได้มีข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการทดสอบโดยระบุไว้ใน SOFT/AAFS Forensic Toxicology Laboratory Guidelines ว่า ทุกวิธีการทดสอบที่นำมาใช้ในห้องปฏิบัติการนั้นต้องผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (method validation) ก่อนที่จะนำมาใช้วิเคราะห์ตัวอย่างจริงและออกรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ โดยพารามิเตอร์ที่ใช้ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีเช่น ซีตจำกัดของการตรวจวัด, ซีตจำกัดของการตรวจเชิงปริมาณ, ความแม่นยำ หรือ ค่าความเป็นเส้นตรง เป็นต้นนั้น จะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ (SOFT, 2006 และ TIAFT, 2014) วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณด้วย LC-MS/MS นั้นต้องมีการตรวจสอบพารามิเตอร์สำหรับการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีอย่างน้อยคือ selectivity, linearity, accuracy, precision และ lower limit of quantification (LLOQ) (Peters, 2006)

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ยาและสารเสพติดในเส้นผม 11 ชนิด แบบรวดเร็ว (Rapid analysis) โดยเทคนิค LC-MS/MS ในครั้งนี้ ได้ทำการพัฒนาและทดสอบตามพารามิเตอร์ ดังต่อไปนี้

1. การพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ (Method Development) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์ยาและสารเสพติดในเส้นผม 11 ชนิด ได้แก่ amphetamine, benzhexol, diazepam, ketamine, MDA, MDMA, methamphetamine, mitragynine, nordiazepam, norketamine และ tramadol แบบรวดเร็วภายในเวลา 5 นาที โดยเทคนิค LC-MS/MS จนได้วิธีการวิเคราะห์แบบ scheduled multiple reaction monitoring (Scheduled MRM™) โดยสารที่ถูกชะออกจากคอลัมน์เป็นชนิดแรกคือ amphetamine ที่ 0.95 นาที และสารสารที่ถูกชะออกจากคอลัมน์เป็นชนิดสุดท้ายคือ diazepam ที่ 3.46 นาที โดยสามารถแยกสารทั้ง 11 ชนิด ออกจากกันได้ตามเวลาที่ถูกระบายออกจากคอลัมน์ที่ต่างกัน ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดง Chromatogram รวม ในการแยกสารทั้ง 11 ชนิด

2. ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Method Validation) การตรวจวิเคราะห์หา ยาและสารเสพติด ในเส้นผม 11 ชนิด แบบรวดเร็วโดยเทคนิค LC-MS/MS โดยทดสอบพารามิเตอร์ต่างๆตามแนวทาง ของ Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX, 2013) ประกอบด้วย

2.1 ความจำเพาะของวิธี (Selectivity and Specificity) เพื่อทดสอบว่าวิธีวิเคราะห์มีความสามารถในการวัดสารที่ต้องการตรวจวัดในตัวอย่างเส้นผม โดยปราศจากสิ่งรบกวน (Interference) เช่น ยาอื่นๆที่ไม่ได้ต้องการวัด ผลการทดสอบพบว่า ไม่พบสารที่รบกวนการวิเคราะห์ ยาทั้ง 11 ชนิด ในตัวอย่างเส้นผม

2.2 ความเป็นเส้นตรง (Linearity) คือค่าความสัมพันธ์ระหว่าง corresponding response กับปริมาณของสารที่ต้องการตรวจวัด โดยใช้ calibration curves ที่ 6 ความเข้มข้น คือ 0.05, 0.25, 0.5, 1, 1.5 และ 2 ng/mg เส้นผม และความเข้มข้นของ internal standard ที่ 0.25 ng/mg โดยค่า correlation coefficient (r^2) ต้องอยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้ ที่ค่า $r^2 \geq 0.99$ จากการทดสอบพบว่าค่า correlation coefficient (r^2) ของยาและสารเสพติดทุกชนิดนั้น มีค่า $r^2 \geq 0.99$ ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้

2.3 ขีดจำกัดของการตรวจวัด (Limit of Detection) คือค่าปริมาณยาในเส้นผมที่ระดับต่ำสุดที่วิธีวิเคราะห์นั้นสามารถตรวจพบได้ โดยผลการทดสอบพบว่า ค่า LOD ของสารทั้ง 11 ชนิด อยู่ในช่วง 0.01-0.02 ng/mg

2.4 ขีดจำกัดของการตรวจเชิงปริมาณ (Lower Limit of Quantitation) คือค่าปริมาณยาในเส้นผมที่ระดับต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์และรายงานปริมาณได้ ในการทดสอบนี้ได้ใช้ความเข้มข้นต่ำสุดของกราฟมาตรฐานเป็นค่า LOQ ที่ 0.05 ng/mg จากผลการทดสอบพบว่า ค่า accuracy และ precision ที่ LOQ ของยาและสารเสพติด จำนวน 11 ชนิด อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้คือ $\pm 20\%$ โดยมี %Bias ระหว่าง -6.00 ถึง 7.00 ค่า %RSD อยู่ระหว่าง 4.91 ถึง 13.98

2.5 การทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงของวิธี (Accuracy และ Precision) คือการตรวจสอบค่า random error และ systematic error ของวิธีการวิเคราะห์ จากการทดสอบค่า accuracy และ precision ของยาทั้ง 11 ชนิด ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.20, 1.00 และ 1.5 ng/mg เส้นผม พบว่า ค่าที่ได้อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้คือ $\pm 20\%$ โดยมีค่า %bias อยู่ระหว่าง -3.89 ถึง 6.67 ค่า %RSD อยู่ระหว่าง 1.99 ถึง 16.72 รายละเอียดดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ความแม่นยำและความเที่ยง (accuracy and precision) ของวิธีการตรวจวิเคราะห์สารเสพติดในเส้นผม 11 ชนิด โดยเทคนิค LC-MS/MS

Analyte	QC Level	Expected Conc. (ng/mg)	Observed Conc. (ng/mg)	Accuracy (%Bias)	Precision (%RSD)
Amphetamine	Low	0.2	0.21	6.67	4.84
	Med	1	0.99	-1.33	2.98
	High	1.5	1.48	-1.22	3.40
Methamphetamine	Low	0.2	0.20	1.67	9.16
	Med	1	1.01	1.33	4.57
	High	1.5	1.53	1.67	2.95
MDA	Low	0.2	0.21	4.17	3.61
	Med	1	1.00	0.17	4.78
	High	1.5	1.47	-1.78	6.20
MDMA	Low	0.2	0.21	5.83	8.14
	Med	1	0.98	-1.83	6.52
	High	1.5	1.49	-1.00	2.91
Norketamine	Low	0.2	0.21	5.83	6.95
	Med	1	1.00	-0.33	4.90
	High	1.5	1.56	3.78	10.51
Ketamine	Low	0.2	0.21	4.17	3.61
	Med	1	1.00	0.17	4.21
	High	1.5	1.50	0.11	1.99
Tramadol	Low	0.2	0.21	4.17	5.61
	Med	1	0.98	-1.83	3.12
	High	1.5	1.49	-0.78	4.15
Mitragnine	Low	0.2	0.21	4.17	6.38
	Med	1	1.00	-0.33	4.86
	High	1.5	1.51	0.56	3.12
Benzhexol	Low	0.2	0.21	6.67	7.06
	Med	1	0.98	-2.17	6.08
	High	1.5	1.44	-3.89	5.07
Nordiazepam	Low	0.2	0.20	0.83	16.72
	Med	1	1.00	0.17	6.26
	High	1.5	1.46	-2.56	11.39
Diazepam	Low	0.2	0.20	0.00	12.25
	Med	1	0.96	-3.83	12.01
	High	1.5	1.53	2.22	8.51

2.6 ผลกระทบจากเมทริกซ์ (Matrix Effect) คือการตรวจสอบผลกระทบของเมทริกซ์ (ในวิธีการวิเคราะห์นี้คือเส้นผม) ต่อการวิเคราะห์ปริมาณ ผลการศึกษาพบว่า matrix effect ที่ระดับความเข้มข้นต่ำคือ 0.2 ng/mg พบว่า การเกิด ion suppression/ion enhancement ของยาเสพติด 11 ชนิด ส่วนใหญ่อยู่ในช่วงค่าที่ยอมรับได้คือ $\pm 25\%$ ยกเว้น diazepam ที่เกิด ion suppression เกินกว่า $\pm 25\%$ กล่าวคือ องค์ประกอบในเส้นผมไปรบกวนการตรวจวิเคราะห์สาร diazepam ให้ตรวจวัดได้น้อยลง และ amphetamine และ nordiazepam ที่เกิด ion enhancement เกินกว่า $\pm 25\%$ กล่าวคือ องค์ประกอบในเส้นผมไปรบกวนการตรวจวิเคราะห์สาร amphetamine และ nordiazepam ให้ตรวจวัดได้มากขึ้น

สรุปและอภิปรายผล

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ยาและสารเสพติดในเส้นผม 11 ชนิด ได้แก่ amphetamine, methamphetamine, MDMA, MDA, ketamine, norketamine, mitragynine, benzhexol, diazepam, nordiazepam และ tramadol แบบรวดเร็วภายในเวลา 5 นาที (rapid analysis) ด้วยเทคนิค LC-MS/MS (Triple-quadrupole MS) เพื่อนำมาใช้ในการตรวจหาปริมาณยาและสารเสพติดในเส้นผมของห้องปฏิบัติการนิติเคมี สถาบันนิติวิทยาศาสตร์ โดยวิธีตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมานี้สามารถนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ยาและสารเสพติดในเส้นผมได้ และสามารถลดงบประมาณที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ยาและสารเสพติดในเส้นผมต่อครั้ง และทำให้การตรวจพิสูจน์ทำได้เร็วขึ้น โดยวิธีการตรวจพิสูจน์แบบเดิมใช้เวลาในการวิเคราะห์ 10 นาที/ตัวอย่างแต่วิธีที่พัฒนาขึ้นมาใหม่นี้ใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC/MS/MS เพียง 5 นาที ตอบสนองต่อความต้องการของกรมพินิจและคุ้มครองเด็กและเยาวชนในการนำผลการวิเคราะห์ไปใช้ในการบำบัดและปรับเปลี่ยนพฤติกรรมของเด็กและเยาวชนได้รวดเร็วขึ้น ตอบสนองประชาชนผู้ให้บริการได้ดียิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- Peters, F. T. (2006). Method Validation using LC/MS. In Poletti, A. (Ed.), **Application of LC-MS in Toxicology** (pp 71-96). London: Pharmaceutical Press.
- SOFT. (2006). **SOFT/AAFS Forensic Toxicology Laboratory Guidelines**, Retrieved March 13, 2018, from http://www.soft-tox.org/files/Guidelines_2006_Final.pdf
- SWGTOX. (2013). Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX): Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. **Journal of Analytical Toxicology**, 37(7), pp 452–474.
- TIAFT (2014). **Laboratory Guidelines**, Retrieved March 12, 2018, from <http://www.tiaft.org/data/uploads/documents/tiaft-sta-laboratory-guidelines.pdf>