

การตรวจเมทแอมเฟตามีนจากตัวอย่างปัสสาวะ น้ำดี และอาหารในกระเพาะ
โดยไม่สกัดด้วยวิธีเพเพอร์สเปรย์แมส สเปคโตรเมตรี
Methamphetamine Analysis from Non-Extract Urine, Bile and Gastric
Contents Using Paper Spray Mass Spectrometry

วชิรวิชญ์ ตั้งธนานุวัฒน์¹

Wachirawit Tungtanuwat¹

¹บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

¹Graduate School, Silpakorn University

Received: June 29, 2020

Revised: September 11, 2020

Accepted: September 18, 2020

บทคัดย่อ

การตรวจเมทแอมเฟตามีนจากตัวอย่างชีววัตถุในห้องปฏิบัติการพิษวิทยาจะใช้กระบวนการตรวจสอบ 2 ขั้นตอน คือ การตรวจเบื้องต้น เช่น วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา เมื่อตัวอย่างได้ผลบวกสารกลุ่มแอมเฟตามีนจะถูกตรวจในระดับยืนยันด้วยวิธีลิควิดโครมาโตกราฟี (LC-MS/MS) ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมมากที่สุดเนื่องจากมีความไวและความจำเพาะในการตรวจยืนยันยาและสารเสพติดได้หลายชนิด และสามารถตรวจแบบปริมาณวิเคราะห์ได้ดี แต่ใช้เวลาในการวิเคราะห์ต่อตัวอย่างนาน สำหรับเพเพอร์สเปรย์แมสสเปคโตรเมตรี ชนิดออบิแทรพ (Paper Spray Mass Spectrometry--PS-MS, orbitrap) เป็นวิธีการใหม่ในการตรวจยาและสารต่าง ๆ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการตรวจเมทแอมเฟตามีนจากตัวอย่างปัสสาวะ น้ำดีและอาหารในกระเพาะโดยไม่สกัดด้วยวิธี PS-MS (orbitrap) เพื่อเป็นแนวทางในการพิจารณาเลือกใช้วิธีตรวจพิสูจน์ที่เหมาะสม ผลการศึกษาพบว่า ปัสสาวะเหมาะกับการตรวจเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณด้วยวิธี PS-MS (orbitrap) เนื่องจากให้ค่า limit of detection และ limit of detection confirmed ต่ำ คือ 1 และ 250 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ส่วนการตรวจชีววัตถุประเภทน้ำดีและอาหารในกระเพาะในเชิงคุณภาพพบว่ายังไม่เหมาะสม และให้ค่าผลลบสูง โดย %true positive rate 3 พารามิเตอร์เท่ากับ 58.82 และ 52.94 ตามลำดับ ซึ่ง อาจแก้ไขได้โดยปรับเปลี่ยนสูตรสารละลายเพเพอร์สเปรย์ (paper spray solvent) ที่สามารถสกัดเมทแอมเฟตามีนออกจากตัวอย่างน้ำดีและอาหารในกระเพาะได้ดีกว่านี้

คำสำคัญ: เพเพอร์ สเปรย์ แมส สเปคโตรเมตรี ออบิแทรพ เมทแอมเฟตามีน ปัสสาวะ น้ำดี อาหารในกระเพาะ

Abstract

Forensic toxicology laboratories typically use a two-step process to detect methamphetamine in specimen, the first step is screening such as Immunoassays method. Positive identifications during the initial amphetamines screening step are confirmed by Liquid Chromatography Mass Spectrometry –LC–MS/MS method that is the most widely used method for drug confirmation and quantitation due to its excellent sensitivity and selectivity but take a lot of time to analysis per sample. Paper Spray Mass Spectrometry (orbitrap)–PS-MS (orbitrap) is a novel method for identify drugs and substances. The aim of this study was to study the possibility of detecting methamphetamines from urine, bile and gastric contents (non-extract) using PS-MS (orbitrap) method, as a guideline for the selection of the appropriate method for identification and determination of methamphetamine. The results indicated that urine specimens are suitable for qualitative and quantitative tests due to low limit of detection and limit of detection confirmed, 1 and 250 nanograms per milliliter, respectively. This qualitative methamphetamine test in bile and gastric content samples is not suitable and has a high false negative, percent true positive rate with 3 passed parameters equal to 58.82 and 52.94, respectively. This could be solved by searching for a paper spray solvent formula that can better extract methamphetamine from the sample.

Keywords: paper spray mass spectrometry, orbitrap, methamphetamine, urine, bile, gastric contents



บทนำ

การตรวจทางนิติพิษวิทยาในห้องปฏิบัติการนั้น ส่วนใหญ่สิ่งส่งตรวจหรือชีววัตถุที่นำส่งโดยปกติ คือ เลือด และปัสสาวะ ซึ่งจะต้องมีการเก็บตามปริมาณที่เพียงพอต่อการตรวจพิสูจน์ โดยเฉพาะการตรวจพิสูจน์ยาเสพติดในร่างกายมนุษย์จากปัสสาวะก็มีการกำหนดปริมาณขั้นต่ำไว้ด้วย เช่น อย่างน้อย 30 มิลลิลิตร (Cabinet and Royal Gazette Publishing Office, 2017) แต่พบว่า มีบางกรณีที่ไม่สามารถเก็บตัวอย่างเลือดหรือปัสสาวะในปริมาณและคุณภาพที่เพียงพอต่อการตรวจพิสูจน์เนื่องจากหลักฐานมีปริมาณจำกัด หรือกรณีผู้เสียชีวิตที่ถูกส่งมาชันสูตรเสียชีวิตจากการตายผิดธรรมชาติตามมาตรา 148 ตามประมวลกฎหมายวิธีพิจารณาความอาญา (Office of the Council of State, 1934) อาจเก็บตัวอย่างเลือดหรือปัสสาวะไม่ได้ เช่น ผู้เสียชีวิตเสียชีวิตมานานจนไม่สามารถเก็บเลือดได้ หรือตัวอย่างเลือดเสียสภาพจากการเน่า หรือปนเปื้อนจนนำไป

ตรวจพิสูจน์ไม่ได้ หรือตัวอย่างปัสสาวะที่มีเลือดปะปนอยู่จากการฉีกขาดของหลอดเลือดในกระเพาะปัสสาวะจากการกระทบกระแทกก่อนเสียชีวิต เป็นต้น ซึ่งกรณีเหล่านี้ถือเป็นปัจจัยที่ควบคุมไม่ได้เนื่องจากขึ้นกับสภาพของศพผู้เสียชีวิตที่ส่งมาตรวจพิสูจน์

เมื่อไม่มีตัวอย่างเลือดหรือปัสสาวะในปริมาณและคุณภาพที่เพียงพอ การเลือกชีววัตถุอื่นมาตรวจทดแทนจึงเป็นสิ่งที่จำเป็น ชีววัตถุหนึ่งที่สามารถนำมาตรวจทดแทนได้ คือ น้ำดี (Bévalot, Cartiser, Bottinelli, Guillon & Fanton, 2016) น้ำดีเป็นของเหลวในร่างกาย (body fluid) ที่สร้างจากตับ มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการย่อยไขมัน โดยสะสมอยู่ในถุงน้ำดีและถูกหลั่งออกที่ลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัม (Duodenum) น้ำดีมีลักษณะมันหนืดข้น มีเม็ดสีเหลืองเขียว (yellow-greenish pigment) เป็นส่วนประกอบ มีค่า pH เป็นด่างเล็กน้อย (Rhoades & Tanner, 1995) เหตุผลที่น้ำดีเป็นชีววัตถุที่เหมาะสมในการนำมา

ตรวจทดแทน คือ (1) สามารถเก็บตัวอย่างได้ง่าย (ในศพผู้เสียชีวิต) โดยใช้เข็มฉีดยากระบอกใหญ่ดูดออกจากถุงน้ำดีโดยตรง น้ำดีในถุงน้ำดีมีปริมาณมากเพียงพอประมาณ 50 มิลลิลิตร ซึ่งเพียงพอที่จะนำไปวิเคราะห์ (2) สามารถนำมาตรวจยาและเมแทบอลิต์ได้ ค่าความเข้มข้นของเมแทมเฟตามีน หรือยาที่ตรวจจากน้ำดีมีความสัมพันธ์กับค่าความเข้มข้นในเลือด (Bierly & Labay, 2018; Ferner & Aronson, 2018) (3) เมแทมเฟตามีนที่สะสมอยู่ในน้ำดีมีปริมาณสูงและคงอยู่ในน้ำดีได้นาน เนื่องจากเมแทมเฟตามีนและสารเมแทบอลิต์ เมื่อถูกดูดซึมเข้าตับจะถูกขับออกจากตับส่วนหนึ่งผสมกับน้ำดีและถูกเก็บไว้ในถุงน้ำดี จากนั้นจะเข้าสู่กระบวนการ enterohepatic circulation คือ เมแทมเฟตามีนและเมแทบอลิต์ที่อยู่ในน้ำดีจะไหลเข้าสู่ลำไส้เล็ก เมื่ออยู่ในลำไส้เล็กเมแทมเฟตามีนจะถูกดูดซึมกลับผ่านทางเส้นเลือดดำเลี้ยงตับ (hepatic vein) และบางส่วนก็ไหลลงสู่ลำไส้อีกครั้ง และทำให้ความเข้มข้นของเมแทมเฟตามีนในน้ำดีเพิ่มขึ้น รวมถึงเพิ่มระยะเวลาการคงอยู่ของเมแทมเฟตามีนในน้ำดีให้นานขึ้น ทำให้ระยะเวลาที่ตรวจพบในน้ำดีเพิ่มขึ้น (Roberts, Magnusson, Burczynski & Weiss, 2002) (4) ไม่จำเป็นต้องหมักน้ำดีด้วยเอนไซม์เบตากลูคูโรนิเดส (Beta-Glucuronidase enzyme) เพื่อทำลายพันธะของสารที่จับกับกลูคูโรนในขั้นตอน phase II metabolism ในขั้นตอนการสกัดหรือเตรียมตัวอย่าง (sample preparation) เนื่องจากเมแทมเฟตามีนนั้นไม่มีการจับกับน้ำตาลกลูคูโรนในขั้นตอนการขับออกจากร่างกาย (5) นอกจากเมแทมเฟตามีนแล้ว ยาเสพติดรวมถึงยานอนหลับหลายชนิดสามารถตรวจจากน้ำดีได้ เช่น โคคาอีน เฮโรอีน เฟนทานิล จีเอชบี คีตามีน เอ็กซีตาซี เบนโซไดอะซีปีนส์ และโซลพิเดม (Zolpidem) เป็นต้น (Agarwal & Lemos, 1996; Bévalot et al., 2016; Roberts et al., 2002)

วิธีการสกัดเมแทมเฟตามีนหรือยาเสพติดจากน้ำดีมีทั้งวิธีสกัดแบบลิควิดลิควิด (Liquid-Liquid Extraction--LLE) และการสกัดแบบ Solid-Phase Extraction--SPE (Amplatz et al., 2017) การตรวจยืนยัน (confirmation) อาจทำในเชิงคุณภาพวิเคราะห์ (qualitative analysis) คือ ทดสอบว่าใช้เมแทมเฟตามีนหรือไม่ หรือในเชิงปริมาณ (quantitative analysis) นั้นขึ้นกับวัตถุประสงค์ในการ

ตรวจโดยวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจ คือ วิธีลิควิดโครมาโตกราฟีแมสสเปคโตรเมตรี (Liquid Chromatography Mass Spectrometry--LC-MS) หรือกรณีที่ตัวตรวจวัดเป็นชนิดแตกมวลสองครั้งจะเรียกว่า LC-MS/MS การตรวจเมแทมเฟตามีนจากน้ำดีจะต้องเตรียมตัวอย่างโดยการสกัดและตรวจด้วยวิธีโครมาโตกราฟีซึ่งมีกระบวนการแยกสารผ่านคอลัมน์ (Column) ซึ่งเป็นส่วนแยกสาร ขั้นตอนทั้งหมดใช้เวลาประมาณ 30 นาทีต่อตัวอย่างหรือมากกว่านั้น หากมีการตรวจตัวอย่างน้ำดีเป็นจำนวนมากก็จะต้องใช้เวลานานในการตรวจและอาจเกิดปัญหาทางกลิ่นจนเครื่องมือรองรับงานไม่ทัน

อาหารในกระเพาะ (gastric contents or stomach contents) เป็นสิ่งส่งตรวจอีกชนิดหนึ่งที่นิยมตรวจหาสารพิษและยาเสพติด ผู้เสพเมแทมเฟตามีนโดยวิธีรับประทานจะตรวจพบเมแทมเฟตามีนในอาหารในกระเพาะด้วย หรือกรณีผู้ที่ลักลอบกลืนยาเสพติดหรือเมแทมเฟตามีน เพื่อนำเข้าหรือส่งออก เมื่อบรรจุภัณฑ์ที่หุ้มยาเสพติดแตก หรือรั่วจะทำให้ผู้กลืนเสียชีวิตได้เรียกว่า body packer syndrome กรณีนี้สามารถตรวจพบยาเสพติดหรือเมแทมเฟตามีนได้ง่ายกว่ากรณีการเสพโดยการกลืนปกติ เนื่องจากเมแทมเฟตามีนที่รั่วไหลออกมา มีปริมาณมากกว่าหลายเท่า (Takekawa, Ohmori, Kido & Oya, 2007)

วิธีเพอร์สปเรย์ แมสสเปคโตรเมตรี (Paper Spray Mass Spectrometry--PS-MS) เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์สารได้อย่างรวดเร็ว โดยวิเคราะห์สารในครั้งเดียวได้สูงถึง 90 ตัวอย่างและใช้เวลา 2 นาที เป็นวิธีตรวจสารจากชีววัตถุโดยไม่จำเป็นต้องเตรียมตัวอย่างก่อน หลักการ คือ หยดตัวอย่างของเหลวหรือกึ่งเหลว เช่น เลือด ปัสสาวะ ลงบนกระดาษกรองปลายแหลม (paper) ซึ่งอยู่บนภาชนะรองรับที่เรียกรวมว่า paper cartridge จากนั้นใช้สารละลายชะ/สกัดสารร่วมกับการให้ประจุไฟฟ้าหลักให้สารที่ต้องการตรวจ เช่น ยาเสพติดเมแทมเฟตามีนถูกผลักจากศักย์ไฟฟ้าไปยังปลายแหลมสุดของแผ่นกระดาษและถูกดูดจากแรงดูดสุญญากาศจากเครื่องแมสสเปคโตรมิเตอร์ (MS) ผ่านเข้าสู่ตัวแยกและวัดมวลต่อประจุ (m/z) ของสารเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารนั้น ๆ (Chiang, Zhang & Ouyang, 2018) โดยประสิทธิภาพในการพิสูจน์เอกลักษณ์

ขึ้นกับคุณภาพของ MS ที่ใช้เป็นหน่วยตรวจวัด (detection unit) ดังนั้นเครื่อง PS-MS จึงจำเป็นต้องต่อเชื่อมกับเครื่อง MS ระดับ High Resolution Mass Spectrometry--HRMS เช่น orbitrap จึงจะสามารถลดข้อจำกัดจากการปราศจากส่วนแยกสารโครมาโตกราฟฟีล

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการตรวจเมทแอมเฟตามีนจากตัวอย่างปัสสาวะ น้ำดีและอาหารในกระเพาะโดยไม่สกัดด้วยวิธี PS-MS (orbitrap) ซึ่งหากให้ผลถูกต้องสูงก็จะเป็นทางเลือกหนึ่งในการลดเวลาการตรวจเมทแอมเฟตามีนจากปัสสาวะ น้ำดีและอาหารในกระเพาะ

วัตถุประสงค์การวิจัย

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการตรวจเมทแอมเฟตามีนจากตัวอย่างปัสสาวะ น้ำดี และอาหารในกระเพาะโดยไม่สกัดด้วยวิธี PS-MS (orbitrap) เพื่อเป็นแนวทางในการพิจารณาเลือกใช้วิธีตรวจพิสูจน์ที่เหมาะสม

แนวคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มีการศึกษาเกี่ยวกับการใช้เพเพอร์สเปรย์ในลักษณะต่าง ๆ และเพเพอร์สเปรย์ที่เชื่อมต่อกับ MS ที่แตกต่างกันโดยตรวจจากตัวอย่างเลือดหรือปัสสาวะที่เติมสารที่ต้องการตรวจลงไป ซึ่งสามารถสรุปได้ ดังนี้

Liu et al. (2010) ทำการศึกษาเรื่อง การพัฒนาเอกลักษณ์และการประยุกต์ใช้ Paper spray Ionization โดยทดลองใช้กระดาษ Whatman 6 ชนิดที่มีขนาดรูพรุนและเนื้อกระดาษต่างกัน ทดสอบกับเฮโรอินและโคเคนที่ผสม (spiked) ในเลือดวัว (bovine whole blood) โดยใช้ยาน้ำสูตร Methanol/water (1:1, v/v) สำหรับการวิเคราะห์แบบ positive mode ใช้ voltage 4.5 kV และ -3 kV สำหรับการวิเคราะห์แบบ negative mode. ผลการศึกษาสรุปได้ว่า กระดาษแบบ glass fiber paper ไม่เหมาะสมกับการตรวจด้วย Paper spray-MS และพบว่า เทคนิค PS-MS สามารถตรวจเฮโรอินและโคเคนได้

Espy et al. (2014) ทำการศึกษาการใช้เพเพอร์สเปรย์แมสสเปคโตรเมตรีเป็นเครื่องมือสำหรับการวิเคราะห์วัตถุเสพติด 8 ชนิดในครั้งเดียวจากตัวอย่างเลือด วัตถุเสพติด ทั้ง 8 ได้แก่ แอมเฟตามีน (Amphetamine) เมทแอมเฟตามีน (Methamphetamine) โคเคน (Cocaine) ยาเลิฟ (3,4-methylenedioxyamphetamine--MDA) เอ็กซ์ตาซี (3,4-methylenedioxy-N-methyl amphetamine--MDMA), ยาอี (3,4-methylene-dioxy-N-ethylamphetamine--MDEA), มอร์ฟิน (Morphine) และเดลตา 9-เตตระไฮโดรแคนนาบินอยด์จากกัญชา (Δ^9 -tetrahydrocannabinol--THC) โดยการทำให้ spiked blood ตามวิธีของ Espy RD คือ เตรียม working drug solutions ตามความเข้มข้นที่ต้องการแล้ว spiked ในเลือดในอัตราส่วน 1:20 (10 μ L into 190 μ L blood) และปั่น 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที ผลการศึกษาพบว่า เครื่อง Paper spray-MS สามารถตรวจสารทั้ง 8 ชนิดนี้ได้จากตัวอย่างเลือดเพียง 10 ไมโครลิตรที่ spiked สารมาตรฐานวัตถุเสพติดทั้ง 8 ลงไป ภายในเวลาเพียง 2 นาที นักวิจัยกลุ่มนี้สรุปว่าวิธีการตรวจด้วยเพเพอร์สเปรย์ แมสสเปคโตรเมตรีใช้เวลาอย่างมากในการวิเคราะห์ (rapid and high-throughput assays) ซึ่งมีความเป็นไปได้หากต้องการนำไปใช้ตรวจแบบ on-site multi-compound quantitative screening of illicit drugs

Manicke and Belford (2015) ทำการศึกษาเรื่องการใช้เพเพอร์สเปรย์ แมสสเปคโตรเมตรีแบบ High-Field Asymmetric Waveform Ion Mobility Spectrometry--FAIMS ในการแยกไอโซเมอร์ของโอปิเอท 3 ชนิด คือ มอร์ฟิน (Morphine), ไฮโดรมอร์ฟิน (Hydromorphone) และนอร์โคเดอิน (Norcodeine) ผลการศึกษาสรุปได้ว่าเพเพอร์สเปรย์ แมสสเปคโตรเมตรีสามารถใช้วิเคราะห์ได้จริง

Zhang, Ju, Huang and Wysocki (2014) ศึกษาเรื่อง Paper Spray Ionization of Noncovalent Protein Complexes ได้ข้อสรุปว่าเพเพอร์สเปรย์ แมสสเปคโตรเมตรีสามารถใช้ตรวจฮีโมโกลบินเตตระเมอร์ (Hemoglobin Tetramer) ซึ่งเป็น noncovalent protein complexes ที่มีความยุ่งยากในการตรวจได้

Yang et al. (2012) ทำการศึกษาการใช้ Paper spray ionization devices ในงาน biomedical analysis ผลการศึกษาพบว่า การหยดตัวอย่างลงบนกระดาษควรทำให้สมดุล สมมาตร และปลายกระดาษยิ่งแหลมยิ่งดี ทำให้เก็บประจุได้มาก

McKenna, Jett, Shanks and Manicke (2018) ทำการศึกษาการใช้ PS-MS (orbitrap) ในการทดสอบการตรวจยาและสารเสพติดจากเลือด 130 ชนิด โดยมีเกณฑ์กำหนดค่า Limit of Detection --LOD คือ ค่าความเข้มข้นของสารที่ต้องการทดสอบต่ำสุดที่เครื่อง PS-MS (orbitrap) สามารถตรวจพบ โดยพิจารณาจากค่าความเข้มข้นของสารทดสอบที่ตรวจพบ Chronogram สมบูรณ์ (Parameter I. Chronogram Mass error: NMT ± 5 ppm) ส่วนเกณฑ์กำหนดค่า Limit of Detection Confirmed--LODc ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นของสารทดสอบต่ำสุดที่เครื่อง PS-MS (orbitrap) สามารถตรวจในระดับยืนยันได้ว่ามีสารนั้น ๆ อยู่จริง โดยพิจารณาจากเกณฑ์ความเข้มข้นที่ตรวจพบ Chronogram สมบูรณ์ และตรวจพบพารามิเตอร์อย่างใดอย่างหนึ่งต่อไปนี้เพิ่มอีก 1 พารามิเตอร์ ได้แก่ ตรวจพบ Fragment ions (Parameter II. fragment ions matching mass error: NMT ± 5 ppm, minimum of fragments needed: ≥ 2) หรือ ตรวจพบ Isotopic pattern (Parameter III. isotopic pattern comparison mass error: NMT ± 5 ppm, matching score: $> 80\%$)

วิธีดำเนินการวิจัย

เก็บตัวอย่างปัสสาวะ น้ำดี และอาหารในกระเพาะ ที่ตรวจพบเมทแอมเฟตามีนจากผู้เสียชีวิตในช่วงปี 2562 (ม.ค.-ธ.ค.) ที่ผ่านการตรวจพิสูจน์เชิงคุณภาพด้วยวิธี LC-MS/MS และรายงานผลคดีเรียบร้อยแล้ว อย่างน้อยชนิดละ 16 ตัวอย่าง โดยคำนวณขนาดตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเชิงปริมาณด้วยสถิติ paired t test (Rosner, 1995) ได้ขนาดตัวอย่างเท่ากับ 16 ตัวอย่าง โดยใช้เกณฑ์ α type I error=0.05 β type II error=0.50 Effect size=0.50 $s(\Delta)$ =1.010 r_{within} =0.950 โดยสุ่มตัวอย่างแบบง่าย (simple random sampling) เกณฑ์คัดออก (exclusion criteria) คือ ปริมาณตัวอย่างที่มีน้อย

กว่า 10 มิลลิกรัม จะถูกคัดออกเนื่องจากเป็นปริมาณขั้นต่ำที่ต้องเก็บไว้เป็นหลักฐานสำหรับการวิเคราะห์ในอนาคต ทำการศึกษา ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานพิษวิทยา สถาบันนิติเวชวิทยา โรงพยาบาลตำรวจ นำมาศึกษาเชิงคุณภาพและ/หรือเชิงปริมาณด้วยวิธี PS-MS (orbitrap) โดยใช้เครื่อง PS รุ่น Prosolia Velox 360 และ MS รุ่น Orbitrap Q Exactive Focus ผลิตภัณฑ์ของ Thermo Fisher Scientific CA USA เปรียบเทียบกับวิธี LC-MS/MS โดยใช้ LC รุ่น Ultimate3000 และ MS/MS รุ่น TSQ Quantiva ผลิตภัณฑ์ของ Thermo Fisher Scientific CA USA. โดยติดตั้งคอลัมน์ชนิด Hypersil Gold PFP 1.9 μm 2.1x100 mm ตั้งอุณหภูมิทดสอบที่ 55 °C Injection volume=20 μL Runtime 11 นาที

ทำการศึกษา LOD และ LODc จากสารละลายมาตรฐานเมทแอมเฟตามีนใน blank urine รวม 14 ความเข้มข้น คือ 1 5 10 25, 50 100 250 500 750 1000 1250 1500 1750 และ 2000 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัม (นก./มล.) โดยกำหนดให้ Sample volume=10 μL กำหนดค่า Methamphetamine Precursor m/z =150.15 Targeted m/z =91.11 Confirming m/z =119.11 กำหนดค่า Full MS Resolution (FWHM)=70,000 Scan range=50 to 500 m/z ทดสอบเชิงคุณภาพและปริมาณของเมทแอมเฟตามีนในตัวอย่างปัสสาวะและทดสอบเชิงคุณภาพในตัวอย่างน้ำดี และอาหารในกระเพาะ

ผลการวิจัย

1. การศึกษา LOD LODc

1.1 ผลการศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะที่สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธี PS-MS (orbitrap) หรือค่า LOD ตามวิธีของ McKenna et al., 2018 คือ ตรวจพบพารามิเตอร์ที่ 1 เท่ากับ 1 นก./มล.

1.2 ผลการศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยืนยันว่าพบเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะด้วยวิธี PS-MS (orbitrap) หรือค่า LODc ตามวิธีของ McKenna et al., 2018 คือ โดยตรวจพบพารามิเตอร์ที่ 1 และ 2 หรือ 1 และ 3 พบว่า ค่า LODc เท่ากับ 250 นก./มล.

1.3 ผลการศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยืนยัน (เข้มงวด) ว่าพบเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะด้วยวิธี PS-MS (orbitrap) ซึ่งผู้วิจัยให้ชื่อว่า LOD_{exactly confirmed}; LOD_{exact_c} โดยตรวจพบพารามิเตอร์ครบทั้ง 3 พารามิเตอร์ เท่ากับ 500 นก./มล.

2. ผลการศึกษาเชิงปริมาณความเข้มข้นเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะ ด้วยวิธี PS-MS (orbitrap) เปรียบเทียบกับวิธี LC-MS/MS (ตาราง 1)

ผลการเปรียบเทียบความเข้มข้นเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะทั้งสองวิธี โดยใช้สถิติ paired t test แสดงในตาราง 1 พบว่า ความเข้มข้นเมทแอมเฟตามีนเฉลี่ยเมื่อตรวจด้วยวิธี PS-MS (orbitrap) มีค่าสูงกว่าที่ตรวจพบด้วยวิธี LC-MS/MS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

3. ผลการศึกษาเชิงคุณภาพ ในการตรวจเมท-

แอมเฟตามีนจากปัสสาวะ น้ำดีและอาหารในกระเพาะ โดยวิธี PS-MS (orbitrap) (ตาราง 2)

ผลการศึกษาเชิงคุณภาพเมื่อทดลองตรวจเมทแอมเฟตามีนในชีววัตถุที่เป็นปัสสาวะ 21 ตัวอย่าง น้ำดี 17 ตัวอย่าง และอาหารในกระเพาะ 17 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ไม่ผ่านกระบวนการสกัดมา

ก่อน โดยตัวอย่างเหล่านี้ผ่านการตรวจพิสูจน์เชิงคุณภาพด้วยวิธี LC-MS/MS แล้วว่าตรวจพบเมทแอมเฟตามีนและรายงานผลคดีเรียบร้อยแล้ว พบว่าตัวอย่างชีววัตถุประเภทปัสสาวะเหมาะกับการตรวจด้วย PS-MS (orbitrap) มากที่สุด ส่วนชีววัตถุที่เป็นน้ำดีให้ผลถูกต้องในระดับยืนยัน 58.82-82.35% และอาหารในกระเพาะให้ผลทดสอบถูกต้องในระดับยืนยัน 52.94-76.47%

ตาราง 1

ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยความเข้มข้นเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะ จำนวน 21 ตัวอย่างเมื่อทดสอบการวัดด้วยวิธี PS-MS (orbitrap) เปรียบเทียบกับวิธี LC-MS/MS

วิธี	จำนวน (n)	ค่าเฉลี่ย (นก./มล.)	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน	ค่าแตกต่างรายคู่		t	P-value
				ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน		
PS-MS (orbitrap)	21	30517.60	23571.09	17685.39	16363.59	4.953	.000
LC-MS/MS	21	12832.22	7844.23				

Pearson Correlation (r^2)=0.994, p=.000

ตาราง 2

ข้อมูลผลการตรวจเชิงคุณภาพ เมทแอมเฟตามีนในชีววัตถุ

ชีววัตถุ	จำนวน (n)	ผลตรวจ ด้วยวิธี LC-MS/MS	พารามิเตอร์ที่ตรวจพบโดยวิธีตรวจ PS-MS (orbitrap)			% true positive rate	
			1	1,2 or 1,3	1, 2, 3	1,2 or 1,3 or 1,2,3	1, 2, 3
ปัสสาวะ	21	ตรวจพบ	-	-	21	-	100.00
น้ำดี	17	ตรวจพบ	3	4	10	82.35	58.82
อาหารใน กระเพาะ	17	ตรวจพบ	4	4	9	76.47	52.94

การอภิปรายผล

จากผลศึกษาตอนที่ 1 ความไวในการตรวจเมทแอมเฟตามีนจากปัสสาวะด้วยวิธี PS-MS (orbitrap) พบว่า ได้ค่า LOD เท่ากับ 1 นก./มล. ซึ่งเป็นค่าที่ต่ำมาก แต่ยังเป็นระดับที่ยังไม่สามารถยืนยันได้ และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดได้ในระดับยืนยัน (LODc) ตามวิธีของ McKenna et al., 2018 เท่ากับ 250 นก./มล. ส่วนค่า LODexact_c เท่ากับ 500 นก./มล. จะเห็นได้ว่าค่า LODc และ LODexact_c ล้วนเป็นค่าที่ต่ำกว่าเกณฑ์ cut-off ตามวิธีการตรวจเบื้องต้นเมทแอมเฟตามีนในร่างกายมนุษย์ที่กฎหมายกำหนดไว้ที่ 1,000 นก./มล. ในปัสสาวะ (Cabinet and Royal Gazette Publishing Office, 2017) ดังนั้นวิธี PS-MS (orbitrap) มีความไวสูงในระดับที่สามารถนำมาใช้ตรวจ screening เมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะในระดับยืนยันได้

เมื่อเปรียบเทียบเชิงปริมาณพบว่าความเข้มข้นเมทแอมเฟตามีนที่ตรวจโดยวิธี PS-MS (orbitrap) สูงกว่าวิธี LC-MS/MS อย่างมีนัยสำคัญ (ตาราง 1) กรณีนี้อาจอธิบายได้ว่าการตรวจด้วยวิธี PS-MS (orbitrap) ซึ่งไม่มีการเตรียมและสกัดตัวอย่าง แต่ใช้ประสิทธิภาพของ paper spray solvent ในการชะสารออกจากกระดาษที่หยดปัสสาวะลงไป แสดงว่า paper spray solvent สูตรที่ใช้ในการศึกษานี้คือ สูตร Acetonitrile: water: 10 M Acetic acid อัตราส่วน 90:10:0.01 สามารถชะเมทแอมเฟตามีนออกจาก paper cartridge ได้ดี หรือนัยกลับกัน วิธีการสกัดเมทแอมเฟตามีนก่อนการวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS ทำให้สูญเสีย yield ของเมทแอมเฟตามีนจากกระบวนการสกัดไปจึงทำให้ yield รวมของเมทแอมเฟตามีนลดลง

ผลการตรวจเชิงคุณภาพในตัวอย่างชีววัตถุจริงที่ผ่านการตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพด้วยวิธี LC-MS/MS มาแล้วว่าพบเมทแอมเฟตามีน (ตาราง 2) พบว่า ชีววัตถุที่เป็นปัสสาวะให้ค่า true positive rate เท่ากับ 100% แสดงให้เห็นว่าปัสสาวะเป็นชีววัตถุที่เหมาะสมที่จะนำมาตรวจด้วยวิธี PS-MS (orbitrap) ในเชิงคุณภาพ

ส่วนผลตรวจเมทแอมเฟตามีนเชิงคุณภาพจากชีววัตถุประเภทน้ำดีและอาหารในกระเพาะพบว่า ได้ค่าให้ค่า true positive rate ตามวิธีของ McKenna et al., 2018

เท่ากับ 82.35% และ 76.47% ตามลำดับ ซึ่งพิจารณาแล้วอยู่ในเกณฑ์ค่อนข้างสูง แต่ให้ประโยชน์น้อยสำหรับการตรวจเชิงคุณภาพในระดับยืนยันเพราะเมื่อคำนวณกลับจะได้ค่าผลลบลง (false negative) จากการตรวจตัวอย่างน้ำดีเท่ากับ 17.65% และผลลบลงจากการตรวจตัวอย่างอาหารในกระเพาะเท่ากับ 23.53%

และเมื่อใช้เกณฑ์เข้มงวด โดยต้องตรวจพบทั้งสามพารามิเตอร์ พบว่า ค่า true positive rate เมื่อตรวจตัวอย่างน้ำดีและอาหารในกระเพาะลดลงเท่ากับ 58.82% และ 52.94% ตามลำดับ หรือแปลผลกลับได้ว่าการตรวจเมทแอมเฟตามีนในตัวอย่างน้ำดีให้ผลลบลงเท่ากับ 41.18 % และการตรวจในตัวอย่างอาหารในกระเพาะให้ผลลบลงเท่ากับ 47.06% แสดงให้เห็นว่าน้ำดีแบบไม่สกัดไม่เหมาะที่จะนำมาตรวจด้วย PS-MS (orbitrap)

เหตุที่น้ำดีไม่เหมาะสมที่จะนำมาตรวจโดยไม่สกัดด้วยวิธี PS-MS (orbitrap) ในการศึกษาครั้งนี้ น่าจะมีสาเหตุจากลักษณะทางกายภาพของน้ำดีที่มีเป็นของเหลวหนืดสูงและมีสัดส่วนของไขมันสูง เมื่อเคลือบติดบนกระดาษกรองของ paper cartridge แล้ว สารละลาย paper spray solvent ชะเมทแอมเฟตามีนออกจากพื้นผิวกระดาษได้ยากเมื่อเทียบกับชีววัตถุที่เป็นปัสสาวะหรือเลือด แนวทางแก้ไข คือ ควรต้องปรับเปลี่ยนสูตรน้ำยา paper spray solvent ให้เหมาะสมกับชีววัตถุประเภทน้ำดีที่มีไขมันสูง โดยปรับเพิ่มตัวทำละลายที่ไม่มีไขมันในส่วนที่สูงกว่าสูตรที่ใช้ในการศึกษานี้

สาเหตุที่อาหารในกระเพาะไม่เหมาะสมที่จะนำมาตรวจโดยไม่สกัดด้วยวิธี PS-MS (orbitrap) ในการศึกษาครั้งนี้สามารถอธิบายได้ว่าเกิดจากความหลากหลายของเนื้อ (matrix) อาหารในกระเพาะในแต่ละตัวอย่าง ซึ่งมีคุณสมบัติทางกายภาพแตกต่างกัน ทำให้ยากที่จะหาสูตร paper spray solvent ที่เหมาะสม ดังนั้นหากต้องการตรวจตัวอย่างอาหารในกระเพาะด้วยวิธี PS-MS (orbitrap) ควรต้องมีการเตรียมตัวอย่าง (specimen preparation) เช่น การสกัดหรือเตรียมให้อยู่ในรูปแบบอื่นที่ paper spray solvent สามารถชะเมทแอมเฟตามีนออกจากตัวอย่างได้ดีกว่านี้

สรุป

การตรวจเมทแอมเฟตามีนในตัวอย่างชีววัตถุด้วยวิธี PS-MS (orbitrap) พบว่า ตัวอย่างชีววัตถุประเภทปัสสาวะเหมาะกับการตรวจเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณเนื่องจากให้ค่า LOD และ LODc ต่ำ ส่วนการตรวจชีววัตถุประเภทน้ำดีและอาหารในกระเพาะในเชิงคุณภาพพบว่ายังไม่เหมาะสม และให้ค่าผลลบสูง ซึ่งอาจแก้ไขได้โดยการปรับเปลี่ยนสูตร paper spray solvent ให้มี polarity ลดลง หรือควรต้องมีการสกัดหรือเตรียมให้อยู่ในรูปแบบอื่นที่ paper spray solvent สามารถชะเมทแอมเฟตามีนออกจากตัวอย่างได้ดีกว่านี้

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากการศึกษาวิจัยนี้เป็นการศึกษาเชิงทดลองซึ่งต้องใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีใหม่ คือ PS-MS (orbitrap) ซึ่งมีการศึกษาน้อยมาก รวมถึงมีต้นทุนค่าใช้จ่ายและค่าบำรุงรักษาในการวิเคราะห์สูง ดังนั้นจึงต้องวางแผนการใช้ทรัพยากรการวิจัยให้ประหยัดและเหมาะสมในการศึกษาครั้งต่อไปผู้วิจัยอาจทำการวิเคราะห์สารในจำนวนที่มากขึ้นต่อการวิเคราะห์ 1 ครั้ง ซึ่งจะช่วยลดต้นทุนการวิจัย รวมถึงอาจทำวิจัยการตรวจสอบสารกลุ่มใหม่ ๆ เช่น New Psychoactive Substances--NPS ซึ่งกำลังเป็นที่สนใจในแวดวงนิติวิทยาศาสตร์สากลในขณะนี้ เนื่องจากมีแนวโน้มการนำมาใช้ในทางที่ผิดเพิ่มมากขึ้น และยังมีการนำเทคนิค PS-MS (orbitrap) มาประยุกต์ใช้เพื่อตรวจสอบสารกลุ่มดังกล่าวน้อยมาก ดังนั้นหากมีการทำวิจัยการตรวจสอบสารกลุ่มนี้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณพันตำรวจเอกหญิง ดร. อีรินทร์ สิ้นไชย หัวหน้าห้องปฏิบัติการพิษวิทยา สถาบันนิติเวชวิทยาที่สนับสนุนตัวอย่างและเครื่องมือในการวิจัยในการศึกษานี้



References

- Agarwal, A., & Lemos, N. (1996). Significance of bile analysis in drug-induced deaths. *Journal of Analytical toxicology*, 20(1), 61–63. <https://doi.org/10.1093/jat/20.1.61>
- Amplatz, B., Zöhrer, E., Haas, C., Schäffer, M., Stojakovic, T., Jahnel, J., & Fauler, G. (2017). Bile acid preparation and comprehensive analysis by high performance liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 464, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2016.11.014>
- Bévalot, F., Cartiser, N., Bottinelli, C., Guitton, J., & Fanton, L. (2016). State of the art in bile analysis in forensic toxicology. *Forensic science international*, 259, 133–154. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2015.10.034>
- Bierly, J., & Labay, L. M. (2018). The utility of bile in Postmortem Forensic Toxicology. *Academic forensic pathology*, 8(2), 324–327. <https://doi.org/10.1177/1925362118782073>

- Cabinet and Royal Gazette Publishing Office. (2017). *Notification of the Ministry of Justice Regarding rules, procedures, and conditions for inspection or testing of the examination or testing are there drugs in the body*, B.E. 2560. Retrieved from <http://www.oic.go.th/fileweb/cabinfocenter2/drawer051/general/data0000/00000738.pdf>. (in Thai)
- Chiang, S., Zhang, W., & Ouyang, Z. (2018). Paper spray ionization mass spectrometry: Recent advances and clinical applications. *Expert Review of Proteomics*, 15(10), 781–789. <https://doi.org/10.1080/14789450.2018.1525295>
- Espy, R. D., Teunissen, S. F., Manicke, N. E., Ren, Y., Ouyang, Z., van Asten, A., & Cooks, R. G. (2014). Paper spray and extraction spray mass spectrometry for the direct and simultaneous quantification of eight drugs of abuse in whole blood. *Analytical Chemistry*, 86(15), 7712–7718. <https://doi.org/10.1021/ac5016408>
- Ferner, R. E., & Aronson, J. K. (2018). The toxicological significance of post-mortem drug concentrations in bile. *Clinical toxicology (Philadelphia, Pa.)*, 56(1), 7–14. <https://doi.org/10.1080/15563650.2017.1339886>
- Karch, S. B. (2007). *Postmortem toxicology of abused drugs*. Boca Raton: CRC Press.
- Levine, B. (2013). *Principles of forensic toxicology* (4th ed.). Washington: AACC Press.
- Liu, J., Wang, H., Manicke, N. E., Lin, J. M., Cooks, R. G., & Ouyang, Z. (2010). Development, characterization, and application of paper spray ionization. *Analytical Chemistry*, 82(6), 2463–2471. <https://doi.org/10.1021/ac902854g>
- Manicke, N. E., & Belford, M. (2015). Separation of opiate isomers using electrospray ionization and paper spray coupled to high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 26(5), 701–705. <https://doi.org/10.1007/s13361-015-1096-z>
- McKenna, J., Jett, R., Shanks, K., & Manicke, N. E. (2018). Toxicological Drug Screening using Paper Spray High-Resolution Tandem Mass Spectrometry (HR-MS/MS). *Journal of analytical toxicology*, 42(5), 300–310. <https://doi.org/10.1093/jat/bky001>
- Office of the Council of State. (1934). *Act promulgating the Criminal Procedure Code* B.E. 2477. Retrieved from <http://web.krisdika.go.th/data/law/law4/%BB05/%BB05-20-9999-update.pdf>
- Rhoades, R. A., & Tanner, G. A. (1995). *Medical physiology*. Boston: Little Brown.
- Roberts, M. S., Magnusson, B. M., Burczynski, F. J., & Weiss, M. (2002). Enterohepatic circulation: Physiological, pharmacokinetic and clinical implications. *Clinical Pharmacokinetics*, 41(10), 751–790. <https://doi.org/10.2165/00003088-200241100-00005>

- Rosner, B. (1995). *Fundamentals of Biostatistics* (4th ed). Boston: Duxbury Press.
- Takekawa, K., Ohmori, T., Kido, A., & Oya, M. (2007). Methamphetamine body packer: Acute poisoning death due to massive leaking of methamphetamine. *Journal of Forensic Sciences*, 52(5), 1219–1222. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2007.00518.x>
- Yang, Q., Wang, H., Maas, J. D., Chappell, W. J., Manicke, N. E., Cooks, R. G., & Ouyang, Z. (2012). Paper spray ionization devices for direct, biomedical analysis using mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 312, 201–207. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2011.05.013>
- Zhang, Y., Ju, Y., Huang, C., & Wysocki, V. H. (2014). Paper spray ionization of noncovalent protein complexes. *Analytical Chemistry*, 86(3), 1342–1346. <https://doi.org/10.1021/ac403383d>

