

การประยุกต์ใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณคีตามีนและนอร์คีตามีนในเลือดและปัสสาวะโดยเทคนิค Online SPE LC-MS/MS (Triple Quadrupole)

Application of the Analytical Method for Ketamine and Norketamine in Blood and Urine Using Online SPE LC-MS/MS (Triple Quadrupole)

พงศธร กอนตะวัน^{1,2*}

Pongsathorn Kontawan^{1,2*}

¹สาขานิติวิทยาศาสตร์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

¹Division of Forensic Science, Faculty of Allied Health Science, Thammasat University

²กลุ่มงานพิษวิทยา สถาบันนิติเวชวิทยา โรงพยาบาลตำรวจ

²Department of Forensic Toxicology, Institute of Forensic Medicine, Police General Hospital

*Corresponding author: pongsathorn.k56@rsu.ac.th

Received: November 11, 2022

Revised: December 22, 2022

Accepted: December 27, 2022

บทคัดย่อ

คีตามีนเป็นยาที่ถูกคิดค้นขึ้นใช้ในทางการแพทย์เพื่อเป็นยากล่อมประสาทหรือยาสลบ เป็นสารออกฤทธิ์ต่อจิตประสาทที่อาจมีความเกี่ยวข้องกับพฤติกรรมการตาย สารคีตามีนจะถูกเปลี่ยนแปลงเป็นเมแทบอไลต์นอร์คีตามีนที่ตรวจพบได้ในปัสสาวะของผู้ที่ใช้น้ำ โดยงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยเชิงทดลองมีจุดประสงค์เพื่อประยุกต์ใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณคีตามีน และนอร์คีตามีน ในเลือดและปัสสาวะโดยเทคนิค Online SPE LC-MS/MS (Triple Quadrupole) โดยตัวอย่างเลือด และปัสสาวะในงานวิจัยนี้ได้จากกลุ่มงานพิษวิทยา สถาบันนิติเวชวิทยา ผลการวิจัยพบว่าเทคนิค Online SPE LC-MS/MS มีความแม่นยำ และความเที่ยงตรงอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ คือ มีค่า %RSD น้อยกว่า 15% และมีค่าการกลับคืนอยู่ในช่วง 80%-120% วิธีการเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ง่าย ใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์สั้นเพียง 11 นาทีต่อ 1 ตัวอย่าง สำหรับผลการวิเคราะห์ปริมาณคีตามีนและนอร์คีตามีนในตัวอย่างปัสสาวะและตัวอย่างเลือดของผู้ต้องสงสัย พบว่า ปริมาณคีตามีนและนอร์คีตามีนในปัสสาวะของตัวอย่างทั้งหมด 31 รายมีจำนวนตัวอย่าง 19 รายที่มีผลรวมของสารคีตามีนและนอร์คีตามีนในปัสสาวะมากกว่าค่า Cut-off ส่วนปริมาณในเลือดแต่ละรายมีปริมาณคีตามีนและนอร์คีตามีนค่อนข้างต่ำ มีเพียง 8 รายที่มีค่าความเข้มข้นของคีตามีนและนอร์คีตามีนสูงถึงระดับที่ทำให้เกิดผลกระทบต่อจิตประสาท ส่วนผลการวิเคราะห์ปริมาณคีตามีนและนอร์คีตามีนในตัวอย่างเลือด และปัสสาวะของผู้เสียชีวิตพบว่า ปริมาณคีตามีนและนอร์คีตามีนในเลือดของทั้ง 9 รายมี 3 รายที่สรุปได้ว่าเสียชีวิตจากพิษของสารคีตามีนเกินขนาด โดยสรุปเทคนิค Online SPE LC-MS/MS (Triple Quadrupole) มีความไว รวดเร็ว และถูกต้องน่าเชื่อถือ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานตรวจวิเคราะห์สิ่งส่งตรวจในงานประจำวันต่อไป

คำสำคัญ: คีตามีน นอร์คีตามีน Online SPE LC-MS/MS

Abstract

Ketamine is a drug that was developed medically as a sedative or anesthetic. Ketamine could be a psychoactive substance and is associated with the manner of death. Ketamine is converted into the metabolite norketamine, which can be detected in the urine of people taking the drug. This research is an experimental study aiming to develop the analytical method and apply it for the determination of ketamine and norketamine levels in blood and urine using the Online SPE LC-MS/MS (Triple Quadrupole). The blood and urine samples were collected from the Subdivision of Toxicology, Institute of Forensic Medicine. The results showed that the online SPE LC-MS/MS method's precision and accuracy were within an acceptable range of %RSD less than 15% and %recovery range of 80%-120%. The sample preparation process is simple and rapid, taking 11 minutes per sample. Ketamine and norketamine levels were detected at levels higher than the cutoff level in 19 of the 31 suspected people's urine samples, but only 8 blood samples reached the psychedelic stage. The results of three of the nine deceased blood and urine samples indicated death from ketamine and norketamine overdose. In conclusion, online SPE LC-MS/MS is one of the robust, rapid, accurate, and reliable techniques that are advantageously used in forensic examination.

Keywords: Ketamine, Norketamine, Online SPE, LC-MS/MS



บทนำ

Ketamine (คีตามีน) เป็นยาที่ถูกคิดค้นขึ้นใช้ในทางการแพทย์เพื่อเป็นยากล่อมประสาทหรือยาสลบที่สามารถออกฤทธิ์ได้อย่างรวดเร็วและยาวนานในผู้ป่วย (Satat et al., 2015) คีตามีน ถูกจัดเป็นวัตถุออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาทในประเภท 2 ลำดับที่ 16 ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่องระบุชื่อวัตถุออกฤทธิ์ พ.ศ. 2561 และเนื่องด้วยฤทธิ์และผลข้างเคียงของคีตามีน ที่ส่งผลต่อระบบประสาทโดยตรงทำให้เกิดอาการประสาทหลอนอย่างแรง (psychedelic) เคลิบเคลิ้ม (euphoria) คิดว่าตนเองมีอำนาจพิเศษ (mystical) ความคิดสับสน การรับรู้ และตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมทั้งภาพ แสง สี เสียงจะเปลี่ยนแปลงไป (Gahlinger, 2004) จึงถูกนำไปใช้ในทางที่ผิดเพื่อวัตถุประสงค์ให้เกิดความสนุกสนาน เคลิบเคลิ้ม รื่นเริง

คีตามีนจัดเป็นยาที่รู้จักกันในกลุ่ม Club drugs หมายถึงสารเสพติดที่ใช้ในเวลากลางคืนตามไนท์คลับสถานบันเทิง เมื่อคีตามีน เข้าสู่ร่างกายจะถูกเมตาบอไลต์ที่ตับโดยการทำงานของ enzyme Cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) และ Cytochrome P2B6 (CYP2B6) ได้

เป็นนอร์คีตามีน (Norketamine) ประมาณร้อยละ 80 ซึ่งเป็นเมตาบอไลต์หลักของคีตามีน (Zanos et al., 2018) การเสพคีตามีน ปริมาณมากหรือการเสพร่วมกับยาหรือสารเสพติดอื่น ๆ หรือผสมกับเครื่องดื่มแอลกอฮอล์เพิ่มความเสียหายที่อาจทำให้เกิดผลรุนแรงถึงชีวิตได้ ในกรณีที่ปริมาณของคีตามีนในเลือดสูงถึงระดับที่ทำให้เกิดอันตรายได้ (lethal dose) หรือในกรณีที่เสพ คีตามีนร่วมการดื่มแอลกอฮอล์ ยาหรือสารเสพติดชนิดอื่นเกิดการเสริมฤทธิ์และเพิ่มโอกาสที่จะทำให้เสียชีวิตได้ (Krystal et al., 1998) การตรวจวิเคราะห์คีตามีน และนอร์คีตามีน จึงมีความสำคัญในการพิสูจน์ว่าผู้ต้องสงสัยได้รับหรือสัมผัสกับคีตามีนหรือไม่ นอกจากนี้คีตามีน และนอร์คีตามีน ถูกขับออกมาทางปัสสาวะปริมาณมากถึงร้อยละ 90 ของปริมาณที่ได้รับ (Moffat, Osselton, Widdop & Watts, 2004) และยังมีช่วงเวลาที่สามารถตรวจพบ (detection window) ยาวนาน (Adamowicz & Kala, 2005) อีกทั้งปัสสาวะสามารถเก็บจากผู้ต้องสงสัย และผู้เสียชีวิตได้อย่างง่ายดายมากกว่าการเก็บชีววัตถุชนิดอื่น ๆ

เทคนิคที่ได้รับความนิยมในการตรวจยืนยันคีตามีน และนอร์คีตามีน รวมถึงยาและสารเสพติดชนิดอื่น ๆ

ทั้งในเลือด ปัสสาวะ และชีววัตถุชนิดอื่น ๆ ได้แก่เทคนิค Gas Chromatography-Mass Spectrometry--GC-MS และเทคนิค Liquid Chromatography-Mass Spectrometry--LC-MS แต่ทั้ง 2 เทคนิคที่กล่าวมาข้างต้นยังมีข้อจำกัด เนื่องจากต้องใช้ตัวอย่างปริมาณมาก มีกระบวนการสกัดสารส่งตรวจ (sample extraction) และกระบวนการเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ที่ซับซ้อน ต้องสัมผัสกับสารทำลายอินทรีย์ มีโอกาสเกิดความผิดพลาดจากผู้ปฏิบัติงานสูง (human errors) และใช้เวลานานในการตรวจวิเคราะห์ต่อหนึ่งตัวอย่าง (Wang et al., 2020)

จากปัญหาข้างต้น จึงเป็นที่มาของงานวิจัยนี้ โดยพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณคีตามีนและนอร์คีตามีนในเลือดและปัสสาวะโดยเทคนิค Online SPE LC-MS/MS ซึ่งเป็นเทคนิควิธีการวิเคราะห์ที่นำเอากระบวนการสกัดมาควบรวมกับวิธีการวิเคราะห์ นั่นคือ นำเอาการสกัดแบบ Solid Phase Extraction--SPE เข้ามาต่อพ่วงกับระบบปั๊มของเครื่อง Liquid chromatography กล่าวคือ ปั๊มจะทำการดูดตัวอย่างปริมาณเพียง 20 µl แล้วนำไปสกัดในส่วนของ SPE Column โดยอัตโนมัติ สามารถลดการสัมผัสสารเคมีและลดเวลาในการตรวจวิเคราะห์ลงได้ นอกจากนี้ยังลดโอกาสเกิดความผิดพลาดจากผู้ปฏิบัติงานเนื่องจากทุก ๆ ตัวอย่างจะถูกกำหนดให้อยู่ในสภาวะเงื่อนไขเดียวกันทั้งอุณหภูมิ ความดัน และ Flow rate จากนั้นสารที่ต้องการวิเคราะห์จะถูก Mobile phase นำพาไปสู่ Analytical Column เพื่อทำการแยกสาร และสารที่ถูกแยกจะถูกส่งไปยังส่วน Mass spectrometry เพื่อทำการวิเคราะห์มวลโมเลกุลของสารต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อทดสอบหาสภาวะ (condition) ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณคีตามีนและนอร์คีตามีนในเลือดและปัสสาวะโดยเทคนิค Online SPE LC-MS/MS (triple quadrupole)
2. ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณคีตามีนและนอร์คีตามีนในตัวอย่างเลือดและปัสสาวะของผู้เสียชีวิต และผู้ต้องสงสัย โดยเทคนิค Online SPE LC-MS/MS (triple quadrupole)

แนวคิดทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

1) คีตามีน (Ketamine)

คีตามีนหรือยาเคถูกนำมาใช้ครั้งแรกปี พ.ศ. 2505

โดยกองทัพทหารอเมริกันในสงครามเวียดนาม ต่อมาในปี พ.ศ. 2513 จึงมีการนำมาใช้กับพลเรือน คีตามีนเป็นสารอนุพันธ์ของ phencyclidine ออกฤทธิ์ที่ N-Methyl-D-Aspartate receptor--NMDA receptor ยับยั้งการส่งกระแสประสาทระหว่าง thalamus และ limbic system ยาละลายในไขมันได้ดี สามารถผ่าน blood brain barrier อย่างรวดเร็ว (Lertkovit, Noitasaeng, Kimura & Vichitvejpaisal, 2021)

ความเข้มข้นของคีตามีน ในเลือดจะสามารถบ่งบอกถึงพฤติกรรมหรือจุดประสงค์ในการทำงานและผลข้างเคียง (Zanos et al., 2018) หรืออาจบ่งบอกถึงสาเหตุการตายในกรณีที่ตรวจพบความเข้มข้นของคีตามีนในระดับที่ทำให้เกิดอันตรายได้ หรือในกรณีที่ตรวจพบร่วมกับยาหรือสารเสพติดชนิดอื่น ๆ ทำให้เกิดการเสริมฤทธิ์และทำให้เกิดพิษรุนแรงขึ้น (Niquet et al., 2017)

คีตามีนเมื่อเข้าสู่ร่างกายจะถูกเมตาบอลิซึมที่ตับ โดยการทำงานของ Enzyme Cytochrome P450 และ Cytochrome P2B6--CYP2B6 ได้เป็นนอร์คีตามีนซึ่งเป็นตัว Metabolite หลักของคีตามีนจากนั้นจะถูกเปลี่ยนต่อโดยการทำงานของ Enzyme CYP2B6 ได้เป็นไฮดรอกซีนอร์คีตามีน (Hydroxynorketamine) และดีไฮโดรนอร์คีตามีน (Dehydronorketamine) (Zanos et al., 2018)

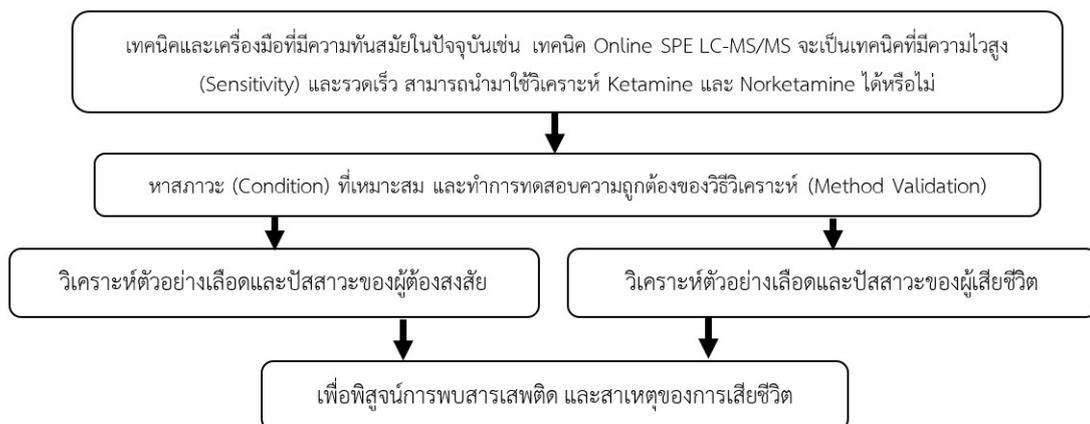
2) การตรวจวิเคราะห์ระดับ Ketamine และนอร์ Noretamine ในเลือดและปัสสาวะ

Legrand et al. (2008) ได้ใช้เทคนิค micro-liquid chromatography/mass spectrometry ในการทดลองทางคลินิกเพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์คีตามีนและนอร์คีตามีนในพลาสมา โดยใช้วิธีการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง (solid-phase extraction) ในการสกัดพลาสมาสำหรับเครื่องมือวิเคราะห์ใช้ C18 micro-column และ Mobile phase ใช้ 0.1% formic acid ต่อ Acetonitrile (90/10 v/v) จากการทดสอบความถูกต้องของวิธีการนี้ภายใต้สภาวะเหล่านี้พบว่า ไม่มีการสูญเสียไอออนของสารที่ต้องการวิเคราะห์ จากการวิเคราะห์ matrix effect สามารถวิเคราะห์ภายในเวลา 10 นาที การทดสอบความเป็นเส้นตรงของ calibration curves ที่ช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 5 ng/ml ถึง 500 ng/ml ได้ค่า correlation coefficients มากกว่า 0.999 ค่า recovery เฉลี่ยอยู่ใน

ช่วงระหว่าง 98.1 ถึง 101.7 % และค่า R.S.D. ที่ 1.9 % ค่า LOD ที่ 4 ng/ml เมื่อนำเทคนิคดังกล่าวมาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณคีตามีน และนอร์คีตามีนในพลาสมา จำนวนทั้งสิ้น 177 ราย พบว่า ความเข้มข้นของคีตามีน และนอร์คีตามีนอยู่ในช่วง 8 ถึงมากกว่า 5,000 ng/ml และ 5 ถึง 350 ng/ml ตามลำดับ

Kim, Lee, Choi, Lim and Chung (2008) ได้ใช้เทคนิค Positive ion Chemical Ionization–Gas Chromatography–Mass Spectrometry--PCI–GC–MS ในการวิเคราะห์หาปริมาณคีตามีน และนอร์คีตามีนในปัสสาวะ เทคนิคดังกล่าวมีความเป็นเส้นตรงของ calibration curves ที่ช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 50 ng/ml ถึง 1,000 ng/ml มีค่า correlation coefficients มากกว่า 0.99 ค่า LOD และ LOQ มีค่าเท่ากับ 25 และ 50 ng/ml ตามลำดับ ค่า recovery ของคีตามีน และนอร์คีตามีนของทั้ง 3 ความเข้มข้น (86 430 and 860 ng/ml) อยู่ที่ 53.1 ถึง 79.7% สำหรับคีตามีน และ 45.7 ถึง 83.0% สำหรับนอร์คีตามีน ค่า precisions (CV) ต่ำกว่า 15.0% และค่า accuracies (bias) 15% เช่นกัน จากการนำเทคนิคดังกล่าวมาประยุกต์ใช้เพื่อวิเคราะห์ปัสสาวะของผู้ต้องสงสัยที่ใช้คีตามีนจำนวน 6 ราย พบว่า ความเข้มข้นของคีตามีน และนอร์คีตามีนของผู้ต้องสงสัยทั้ง 6 รายอยู่ในช่วง 0.03 ถึง 56.16 ug/ml สำหรับคีตามีน และ 0.42 ถึง 29.31 ug/ml สำหรับนอร์คีตามีน อัตราส่วนของคีตามีนต่อนอร์คีตามีนอยู่ในช่วง 0.28 ถึง 2.04

กรอบแนวคิดการวิจัย



ภาพ 1 กรอบแนวคิดการวิจัย

วิธีดำเนินการวิจัย

1) แบบแผนการวิจัย

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เป็นการศึกษาแบบ Experimental study โดยทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์การตรวจหาสารคีตามีนและนอร์คีตามีน และประยุกต์ใช้ในตัวอย่างเลือดและปัสสาวะได้จากของผู้เสียชีวิต และผู้ต้องสงสัย

2) ตัวอย่างเลือดปัสสาวะและสารมาตรฐาน

1. สารมาตรฐานคีตามีนและนอร์คีตามีนความเข้มข้น 1 mg/ml ที่ใช้ในการวิจัยจากบริษัท Cerilliant Corporation (Texas USA) และสารมาตรฐาน Trimipramime (10mg) เป็น Internal Standard--IS จากบริษัท LGC Company (Teddington UK)

2. Blank blood และ Blank urine ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่ได้จากการนำตัวอย่างเลือดและปัสสาวะปกติที่หลีกเลี่ยงจากงานตรวจวิเคราะห์ในงานประจำของกลุ่มงานพิษวิทยา สถาบันนิติเวชวิทยา ที่ผ่านการตรวจยืนยันแล้วว่า ไม่พบคีตามีนและนอร์คีตามีนหรือสารอื่น ๆ ได้แก่ Methamphetamine Mitragynine Opiates THC Cocaine โดยวิธี LC-MS/MS นำมาผสมกัน

3) การเตรียมตัวอย่างเลือด และปัสสาวะ

1. เตรียมตัวอย่างเลือดโดยปิเปตตัวอย่างเลือด 300 μ l ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 2 ml จากนั้นปิเปต Trimipramine 5 μ g/ml 20 μ l ลงในตัวอย่างเลือดเพื่อเป็น internal standard และ Vortex ให้เข้ากัน ปิเปต Acetonitrile 600 μ l ลงในตัวอย่างเลือดเพื่อตกตะกอนโปรตีน Vortex ให้เข้ากันอีกรอบหนึ่ง จากนั้นนำไป Centrifuge ที่ 13,000 รอบต่อนาที (rpm/min) นาน 5 นาที ดูดส่วน Supernatant ลงใน Vial ขนาด 1.5 ml

2. เตรียมตัวอย่างปัสสาวะโดยปิเปตตัวอย่างปัสสาวะ 1,000 μ l ลงใน Vial ขนาด 1.5 ml จากนั้นปิเปต Trimipramine 5 μ g/ml 20 μ l ลงในตัวอย่างปัสสาวะเพื่อเป็น internal standard และผสมให้เข้ากัน

4) การหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง Mass spectrometry

เตรียม Working standard solution (คีตามีน และนอร์คีตามีน 500 ng/ml) ปริมาตร 1 ml ในเมทานอล จากนั้นนำ Working standard solution ฉีดเข้าเครื่อง Mass spectrometer TSQ Quantitative โดยตรง (ไม่ผ่านเครื่อง Liquid chromatography) เปิดการทำงานของเครื่อง Mass spectrometry โดยตั้งค่าเป็นโหมด Full scan เพื่อหา Precursor ion ที่ m/z 238 และ 224 ซึ่งเป็น m/z ของสารคีตามีนและนอร์คีตามีนตามลำดับ ทำการ Optimization เพื่อหา Product ion ที่ได้จาก Precursor ion m/z 238 224 และศึกษาพลังงานที่ใช้ในการแตกไอออน (collision energy) รวมถึงค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่มีความสำคัญในการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Mass spectrometry จากนั้นทำการปรับตั้งค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ เพื่อให้ได้ค่า Response ของทั้ง Precursor ion และ Product ion ของสารคีตามีนและนอร์คีตามีนที่ดีที่สุด

5) การหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง Online SPE-liquid chromatography

เตรียมตัวอย่างเลือดและปัสสาวะ โดยการ Spike standard (คีตามีนและนอร์คีตามีน 500 ng/ml) ปริมาตร 1 ml จากนั้นนำไปเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ตามวิธีการในข้อ 3 ทำการฉีดตัวอย่างเข้าเครื่อง Online SPE

LC-MS/MS จากนั้นทำการปรับตั้งค่าพารามิเตอร์ที่มีความสำคัญในการตรวจวิเคราะห์ เช่น Injection volume Run time Flow rate ชนิดของ Mobile phase รวมถึงสัดส่วนและ Gradient ของ Mobile phase อุณหภูมิของ Analytical column เพื่อหาค่าพารามิเตอร์ และสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์เพื่อให้ได้ Chromatogram ของสารตัวอย่างเลือดและปัสสาวะที่ดีที่สุด และให้ค่าพื้นที่ใต้กราฟ (Area Under Curve--AUC) สูงที่สุดโดยใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์น้อยที่สุด

6) การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)

1.ความเป็นเส้นตรง (linearity)

เตรียมสารมาตรฐานลงใน matrix blank เลือด และปัสสาวะที่ระดับความเข้มข้น 25 50 250 500 1,000 และ 1,500 ng/ml สำหรับตัวอย่างปัสสาวะ และที่ระดับความเข้มข้น 4 10 50 150 250 และ 500 ng/ml สำหรับตัวอย่างเลือด เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) และพิจารณาความเป็นเส้นตรงจากค่า R-squared (R^2) ต้องไม่น้อยกว่า 0.995

2. ความเที่ยงตรง (precision)

เตรียมสารมาตรฐานตัวอย่างเลือดและปัสสาวะ 3 ระดับความเข้มข้นได้แก่ Low Quality Control--LQC Medium Quality Control--MQC และ High Quality Control--HQC ลงใน matrix blank วิเคราะห์ระดับละ 5 ซ้ำทำการทดสอบ 3 วัน ค่าความเที่ยงตรงพิจารณาจากการคำนวณค่า %RSD ไม่เกินร้อยละ 15

3. ความแม่นยำ (accuracy)

เตรียมสารมาตรฐานตัวอย่างเลือดและปัสสาวะ 3 ระดับความเข้มข้นลงใน matrix blank วิเคราะห์ระดับละ 5 ซ้ำทำการทดสอบ 3 วัน ค่าความแม่นยำแสดงด้วยค่า %recovery อยู่ในช่วง 80%-120%

4. ขีดจำกัดของการตรวจพบ (detection limit)

เปรียบเทียบ signal ที่วัดได้จากตัวอย่างที่รู้ความเข้มข้นต่ำของสารที่วิเคราะห์ กับตัวอย่างที่เป็น blank เรียกว่า signal-to-noise ratio โดยทั่วไปสำหรับ LOD ค่าที่ยอมรับ คือ 3 ต่อ 1

5. ขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณ (quantitation limit)

เปรียบเทียบ signal ที่วัดได้จากตัวอย่างที่รู้ความเข้มข้นต่ำของสารที่วิเคราะห์กับตัวอย่างที่เป็น blank เรียกว่า signal-to-noise ratio โดยทั่วไปสำหรับ LOQ ค่าที่ยอมรับคือ 10 ต่อ

6. ความจำเพาะ (specificity)

วิเคราะห์ตัวอย่าง Spiked sample ที่เติมสารมาตรฐานรวม (mixed standard) และพิจารณาค่า response ที่ตำแหน่ง retention time เดียวกันกับ คีตามีน และนอร์คีตามีนต้องไม่มี response ของสารอื่นเกิดขึ้น

7. ผลกระทบจากเมทริกซ์ (matrix effect)

ทำการทดสอบ Ionization Suppression/Enhancement โดยเตรียมตัวอย่าง 2 ชุดได้แก่ ชุด A คือ ตัวอย่างปัสสาวะ และตัวอย่างเลือดจากแหล่งที่ต่างกันจำนวน 6 แหล่งนำมาผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ แล้วจึงเติมสารมาตรฐาน คีตามีนและนอร์คีตามีน ความเข้มข้น 40 และ 900 ng/ml สำหรับตัวอย่างปัสสาวะ และความเข้มข้น 30 และ 300 ng/ml สำหรับตัวอย่างเลือด ชุด B คือ สารมาตรฐานที่ถูกเตรียมให้มีความเข้มข้น 40 และ 900 ng/ml ปริมาตร 1 ml ใน Deionized water สำหรับใช้เปรียบเทียบกับ ชุด A ที่เป็นตัวอย่างปัสสาวะ และความเข้มข้น 30 และ 300 ng/ml สำหรับใช้เปรียบเทียบกับ ชุด A ที่เป็นตัวอย่างเลือด จากนั้นคำนวณหาค่า % Ionization suppression/enhancement

% Ionization suppression/enhancement

$$= \left(\frac{\text{พื้นที่ใต้กราฟเฉลี่ย ชุด A}}{\text{พื้นที่ใต้กราฟเฉลี่ย ชุด B}} \right) \times 100 \quad (1)$$

โดย ถ้ามีค่าบวก หมายถึง เกิด ionization enhancement แต่ถ้ามีค่าลบ หมายถึง เกิด ionization suppression และเกณฑ์การยอมรับ คือ % Ionization suppression/enhancement ต้องน้อยกว่า $\pm 25\%$ และค่าที่ได้จากตัวอย่างปัสสาวะ และตัวอย่างเลือดจากแหล่งที่ต่างกันจำนวน 6 แหล่งจะต้องมีค่า % RSD $\pm 15\%$

8. Carry over effect

วิเคราะห์ matrix blank ก่อนและหลังการฉีด HQC โดยพิจารณาค่า response ที่ตำแหน่ง retention time เดียวกันกับ คีตามีนและนอร์คีตามีนต้องไม่มากกว่าร้อยละ 20 ของ response ที่ระดับ LOQ

7) วิเคราะห์ตัวอย่างเลือดและปัสสาวะของผู้เสียชีวิต และผู้ต้องสงสัย

รวบรวมตัวอย่างเลือด และปัสสาวะของผู้เสียชีวิต รวมถึงตัวอย่างเลือด และปัสสาวะของผู้ต้องสงสัยทั้งหมด ทำการเตรียมตัวอย่างตามวิธีการตามขั้นตอนในข้อที่ 3 จากนั้นนำตัวอย่างฉีดเข้าเครื่อง Online SPE LC-MS/MS และทำการวิเคราะห์ประเมินผลการตรวจวิเคราะห์ และสรุปผลการทดลองต่อไป

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ตัวอย่างเลือดและปัสสาวะได้จากของผู้เสียชีวิต และผู้ต้องสงสัยที่ถูกส่งมาตรวจยังกลุ่มงานพิษวิทยา สถาบันนิติเวชวิทยา ตั้งแต่วันที่ 1 พฤษภาคม พ.ศ.2564 ถึง วันที่ 31 พฤษภาคม พ.ศ. 2565 โดยมีเกณฑ์การคัดเลือก คือ ต้องเป็นตัวอย่างเลือดและปัสสาวะรายเดียวกัน พร้อมทั้งตรวจยืนยันแล้วว่าพบคีตามีนและนอร์คีตามีนจริงด้วยวิธี LC-MS/MS

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่อง Ultra-High Performance Liquid Chromatography--UHPLC รุ่น Ultimate 3000 จากบริษัท Thermo Fisher Scientific (Massachusetts USA)
2. เครื่อง Mass spectrometry ชนิด Triple Quadrupole รุ่น TSQ Quantiva จากบริษัท Thermo Fisher Scientific (Massachusetts USA)
3. ระบบ Automated SPE column จากบริษัท Thermo Fisher Scientific (Massachusetts USA)

การเก็บรวบรวมข้อมูล

การเก็บรวบรวมข้อมูลในงานวิจัยนี้ได้มาจากการวิเคราะห์หาปริมาณ Ketamine และ Norketamine ในตัวอย่างเลือด และปัสสาวะของผู้ต้องสงสัย รวมถึงผู้เสียชีวิตโดยใช้เครื่องมือวิเคราะห์ Online SPE LC-MS/MS (triple quadrupole)

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS for Windows version 18 ข้อมูลทั่วไปวิเคราะห์โดยใช้สถิติเชิงพรรณนาได้แก่ ร้อยละ ค่าเฉลี่ย และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ผลการวิจัย

1) ผลการศึกษาการหาสถานะที่เหมาะสมในการตรวจ

สถานะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณคีตามีนและนอร์คีตามีนในเลือดและปัสสาวะโดยเทคนิค Online SPE LC-MS/MS โดย Injection volume เท่ากับ 20 μ l และ Run time 11 นาที คอลัมน์ที่ใช้ คือ Hypersil GOLD aQ ความยาวคอลัมน์ 20x2.1 mm อุณหภูมิคอลัมน์ 55 $^{\circ}$ C ร่วมกับ Online SPE system (SPE column HyperSep Retain PEP) โดย Mobile phase A ใช้ 0.5% Formic acid ใน Deionized water และ Mobile phase B ใช้ 0.5% Formic acid ใน Acetonitrile สำหรับ Left pump และ Mobile phase CC ใช้ 2 nM Ammonium acetate ใน Deionized water และ Methanol อัตราส่วน 85 ต่อ 15 สำหรับ Right pump อัตราส่วนการไหลใช้ระบบ Gradient ดังแสดงในตาราง 1 และ 2 และสถานะที่เหมาะสมในส่วนของ Dynamic MRM Parameter ดังแสดงในตาราง 3

2) ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

1. ความเป็นเส้นตรง (linearity) จากการทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) ของพบว่า ค่า Correlation Coefficient (R^2) ของสาร Ketamine และ Norketamine ทั้งในตัวอย่างปัสสาวะ และเลือดมีค่ามากกว่า 0.995 ดังแสดงในภาพ 3 และ 4

2. ความเที่ยงตรง (precision) และความแม่นยำ (accuracy)

จากการทดลองพบว่า มีค่า %RSD น้อยกว่า 15% และมีค่า %recovery อยู่ในช่วง 80%-120% ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (Scientific Working Group for Forensic Toxicology, 2013) ของทั้งสาร คีตามีนและนอร์คีตามีนทั้งในตัวอย่างปัสสาวะ และตัวอย่างเลือด ดังแสดงในตาราง 5 สำหรับตัวอย่างปัสสาวะ และตาราง 6 สำหรับตัวอย่างเลือด

3. ขีดจำกัดของการตรวจพบ (detection limit) ขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณ (quantitation limit)

ค่า LOD ของสารคีตามีนและนอร์คีตามีนเท่ากับ 1.00 และ 2.00 ng/ml และมีค่า LOQ ของสารคีตามีนและนอร์คีตามีน เท่ากับ 4.00 และ 10.00 ng/ml ตามลำดับ และในตัวอย่างเลือดมีค่า LOD ของสารคีตามีนและนอร์คีตามีนเท่ากับ 1.5 ng/ml และมีค่า LOQ ของสารคีตามีนและนอร์คีตามีนเท่ากับ 4.00 ng/ml ดังแสดงในตาราง 4

4. ความจำเพาะ (specificity)

วิเคราะห์ตัวอย่าง Spiked sample ที่เติมสารมาตรฐานรวม (mixed standard) ที่อยู่นอกขอบข่ายในงานวิจัยชิ้นนี้ แต่เป็นยาเสพติดที่พบได้บ่อยได้แก่ Morphine Codeine Amphetamine MDA, Methamphetamine MDMA และ Benzoylcegonine เมื่อพิจารณา ค่า response ที่ตำแหน่ง Retention time ของคีตามีนและนอร์คีตามีน คือ 2.69 และ 2.60 นาที ตามลำดับ พบว่า ไม่มี response ของสารอื่นเกิดขึ้น ดังแสดงในภาพ 2

ตาราง 1

แสดง Gradient ของ Left pump

No.	Run Time	Flow rate (mL/min)	Mobile phase A	Mobile phase B
1	0.00	0.90	90.0	10.0
2	1.30	0.90	90.0	10.0
3	3.10	0.90	0.0	100.0
4	5.50	0.90	0.0	100.0
5	5.60	0.90	90.0	10.0
6	11.00	0.90	90.0	10.0

ตาราง 2

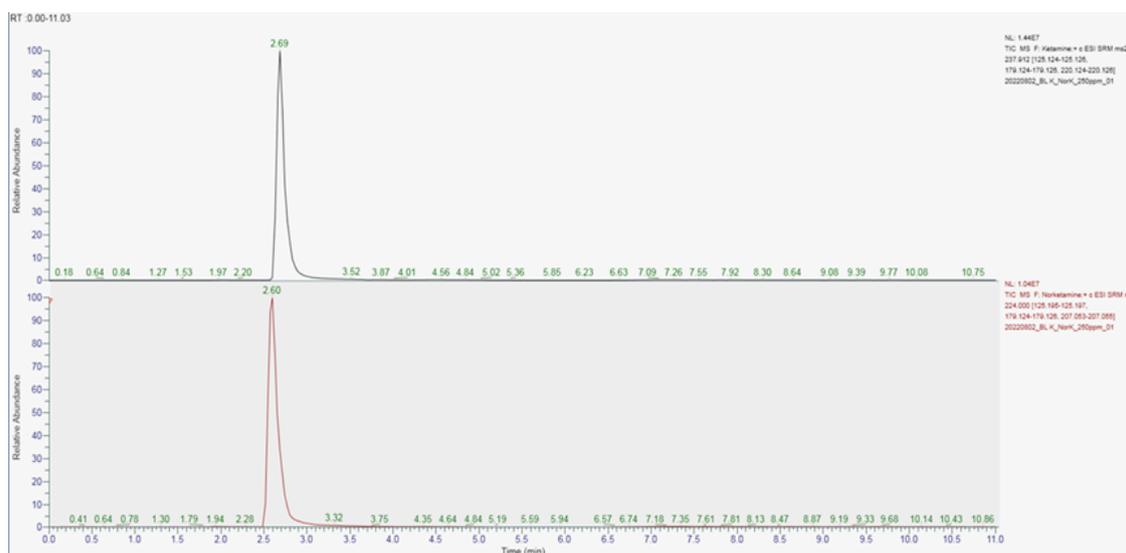
แสดง Gradient ของ Right pump

No.	Run Time	Flow rate (ml/min)	Mobile phase BB	Mobile phase CC
1	0.00	3.00	0.0	100.0
2	1.50	3.00	0.0	100.0
3	2.50	0.30	0.0	100.0
4	5.00	0.30	0.0	100.0
5	6.00	3.00	0.0	100.0
6	11.00	3.00	0.0	100.0

ตาราง 3

Dynamic MRM Parameter

Compound	Precursor (m/z)	Produce (m/z)	Collision energy (V)	Ret Time	Polarity
Ketamine	237.912	125.125	27.03	2.69	Positive
		179.125	17.97		
		220.125	14.73		
Norketamine	224.00	125.196	24.80	2.60	Positive
		179.125	15.91		
		207.054	11.02		
Trimipramine (IS)	295.28	58.17	30.68	3.44	Positive
		100.17	18.34		

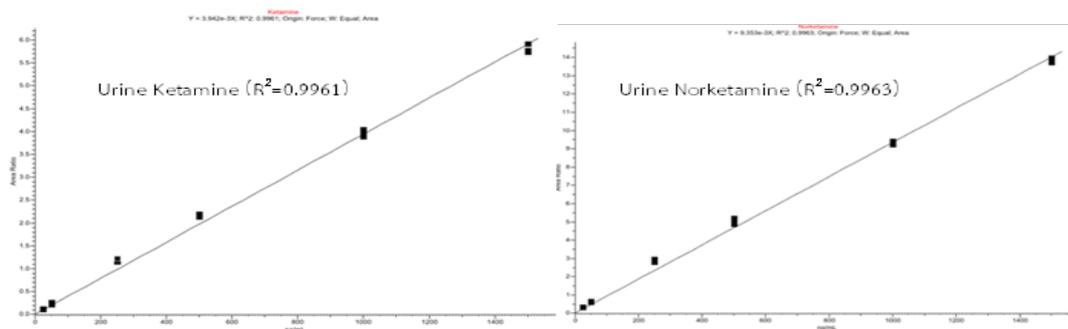


ภาพ 2 โครมาโตแกรมของ Spiked sample ที่เติมสารมาตรฐาน แสดงตามระยะเวลาที่พบสารในการวิเคราะห์

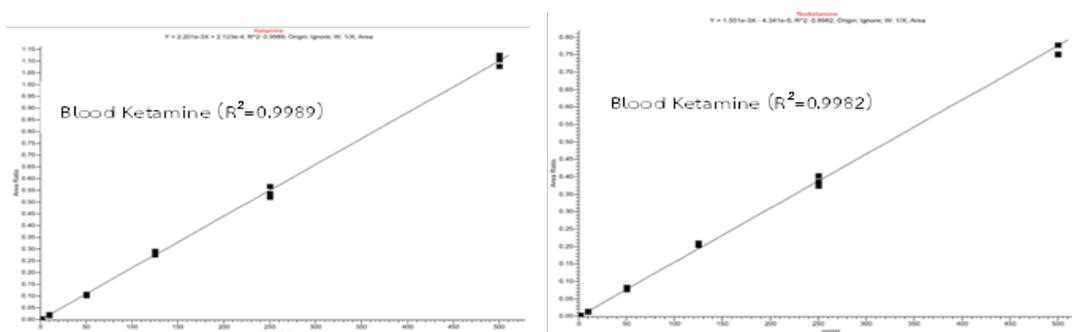
ตาราง 4

ผลการวิเคราะห์ขีดจำกัดของการตรวจพบ (detection limit) และขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณ (quantitation limit)

Compound	Urine sample				Blood sample			
	LOD (ng/mL)	S/N	LOQ (ng/mL)	S/N	LOD (ng/mL)	S/N	LOQ (ng/mL)	S/N
Ketamine	1.00	4.32	4.00	11.25	1.50	5.62	4.00	11.25
	1.00	4.99	4.00	12.94	1.50	4.87	4.00	12.94
	1.00	3.82	4.00	10.55	1.50	5.80	4.00	10.55
	1.00	4.16	4.00	11.27	1.50	5.22	4.00	11.27
	1.00	3.23	4.00	12.92	1.50	5.41	4.00	12.92
Norketamine	2.00	3.17	10.00	11.53	1.50	4.89	4.00	15.21
	2.00	3.16	10.00	11.59	1.50	4.32	4.00	15.29
	2.00	3.56	10.00	11.12	1.50	5.21	4.00	14.22
	2.00	3.62	10.00	11.87	1.50	4.22	4.00	15.81
	2.00	3.03	10.00	12.29	1.50	4.96	4.00	14.30



ภาพ 3 กราฟมาตรฐาน (calibration curve) ของสาร Ketamine และ Norketamine ในตัวอย่างปัสสาวะ



ภาพ 4 กราฟมาตรฐาน (calibration curve) ของสาร Ketamine และ Norketamine ในตัวอย่างเลือด

ตาราง 5

ผลการทดสอบ ความเที่ยงตรง (precision) และ ความแม่นยำ (accuracy) ในตัวอย่างปัสสาวะ

Compound	Spike concentration (ng/mL)	Intra-day			Inter-day		
		Mean±SD	Recovery (%)	R.S.D. (%)	Mean±SD	Recovery (%)	R.S.D. (%)
Ketamine	40	39.03±2.66	97.57	6.81	37.96±4.28	94.91	7.49
	300	293.14±24.23	97.71	8.27	311.25±16.97	103.75	5.48
	900	854.03±28.34	94.89	3.32	870.16±26.86	94.87	3.14
Norketamine	40	40.07±1.86	100.18	4.65	40.26±2.49	4.89	4.00
	300	290.65±11.26	96.88	3.87	297.21±8.69	4.32	4.00
	900	870.27±31.54	96.7	3.62	873.18±26.86	5.21	4.00

*n = 5 replicates × 3 days

ตาราง 6

ผลการทดสอบความเที่ยงตรง (precision) และ ความแม่นยำ (accuracy) ในตัวอย่างเลือด

Compound	Spike concentration (ng/mL)	Intra-day			Inter-day		
		Mean±SD	Recovery (%)	R.S.D. (%)	Mean±SD	Recovery (%)	R.S.D. (%)
Ketamine	30	32.73±0.38	109.09	1.16	31.80±1.55	106.00	4.87
	100	107.07±1.17	107.07	1.09	104.09±3.74	104.09	3.59
	300	313.51±7.46	104.50	2.38	305.97±10.20	101.99	3.34
Norketamine	30	33.05±0.81	110.16	2.45	32.11±1.47	106.00	4.59
	100	103.92±4.08	103.92	3.93	108.95±2.78	104.09	2.55
	300	313.50±8.50	104.50	2.71	309.71±7.20	101.99	2.32

*n = 5 replicates × 3 days

5. ผลกระทบจากเมทริกซ์ (matrix Effect)

จากการทดสอบ % Ionization suppression/enhancement โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้กราฟของ 2 ชุดได้แก่ ชุด A และชุด B และนำมาคำนวณหาค่า % Ionization suppression/enhancement พบว่า ในตัวอย่างปัสสาวะ และตัวอย่างเลือดมีค่าไม่เกินช่วง±25 % และค่าจากตัวอย่างปัสสาวะ และตัวอย่างเลือดจากแหล่งที่ต่างกันจำนวน 6 แหล่งมีค่า % RSD ไม่เกิน±15 % อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่ยอมรับได้

6. Carry over effect

จากการวิเคราะห์ matrix blank หลังการวิเคราะห์ HQC โดยพิจารณาค่า response ที่ตำแหน่ง retention time เดียวกันกับคีตามีนและนอร์คีตามีนของทั้งตัวอย่างปัสสาวะ และตัวอย่างเลือด พบว่า ค่า response ของ matrix blank หลังฉีด HQC น้อยกว่า 20 % ของ response ที่ระดับ LOQ แสดงให้เห็นว่าไม่มีการตกค้างในระบบหลังจากการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีสารคีตามีนและนอร์คีตามีนความเข้มข้นสูง

3) ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดและปัสสาวะ

3.1) ผลการวิเคราะห์ปริมาณ Ketamine และ Norketamine ในตัวอย่างเลือด และปัสสาวะของผู้ต้องสงสัย

การวิเคราะห์หาปริมาณคีตามีนและนอร์คีตามีนของผู้ต้องสงสัยนั้นจะมุ่งเน้นไปที่การหาปริมาณคีตามีนและนอร์คีตามีนในตัวอย่างปัสสาวะ เนื่องจากจุดประสงค์ในการตรวจพิสูจน์ในกรณีดังกล่าว คือ ต้องการทราบว่าบุคคลดังกล่าวได้มีการรับสารหรือมีการใช้สารคีตามีนหรือไม่ เพื่อเป็นหลักฐานในการดำเนินคดีหรือพิสูจน์ความบริสุทธิ์ของบุคคลดังกล่าวได้โดยอิงจากค่า Cut-off ที่ 1,000 ng/ml หรือเกณฑ์การตัดสินว่าเป็นผู้มีส่วนเกี่ยวข้องอยู่ในร่างกายหรือไม่

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณคีตามีนและนอร์คีตามีนในตัวอย่างเลือด และปัสสาวะของผู้ต้องสงสัย ดังแสดงในตาราง 7 พบว่า ตัวอย่างปัสสาวะมีปริมาณ Ketamine อยู่ในช่วงระหว่าง 26.00 ถึง 15,592.35 ng/ml และมีปริมาณ Norketamine อยู่ในช่วงระหว่าง 31.87 ถึง 14,599.35 ng/ml ในส่วนของตัวอย่างเลือดมีปริมาณ Ketamine อยู่ในช่วงระหว่าง 4.04 ถึง 637.16 ng/ml และมีปริมาณ Norketamine อยู่ในช่วงระหว่าง 4.14 ถึง 361.05 ng/ml

จากการพิจารณาผลการวิเคราะห์ปริมาณ Ketamine และ Norketamine ในตัวอย่างปัสสาวะพบว่า ปริมาณในปัสสาวะของผู้ต้องสงสัย ซึ่งทั้งหมดจัดเป็นผู้เสพหรือผู้ใช้สารคีตามีน เพื่อสันนิษฐานการ พบว่าจากจำนวนตัวอย่างทั้งสิ้น 31 ราย มี 19 รายที่มีผลรวมของสาร Ketamine และ Norketamine ในปัสสาวะมากกว่า 1,000 ng/ml ซึ่งเกิน Cut-off ตามเกณฑ์การตัดสินผลการตรวจพิสูจน์ว่าเป็นผู้มีส่วนเกี่ยวข้องอยู่ในร่างกาย คือ มีคีตามีนเมื่อตรวจพบว่ามีสารและเมตาบอไลต์ของคีตามีนรวมกัน อยู่ในปัสสาวะตั้งแต่ 1,000 ng/ml ขึ้นไป แต่อย่างไรก็ตามยังมีตัวอย่างถึง 12 ราย ที่ยังมีผลรวมของสาร Ketamine และ Norketamine ในปัสสาวะต่ำกว่าค่า Cut-off ที่ 1,000 ng/ml

ในส่วนของผลการวิเคราะห์ปริมาณคีตามีนและนอร์คีตามีนในตัวอย่างเลือดพบว่า ปริมาณคีตามีนและนอร์คีตามีน ในเลือดของผู้ต้องสงสัย 23 ราย จากทั้งสิ้น 31 ราย มีปริมาณคีตามีนและนอร์คีตามีน ค่อนข้างต่ำ ซึ่งคีตามีน

และนอร์คีตามีนนั้นมีผลในการระงับปวดโดยไม่ทำให้เกิดความบกพร่องทางสติปัญญาที่ความเข้มข้นของคีตามีนและนอร์คีตามีน 100 ng/ml และ 50 ng/ml ตามลำดับ และมี 8 ราย คือ รายที่ 1 19 20 21 23 25 26 และรายที่ 27 ที่มีค่าความเข้มข้นของคีตามีนและนอร์คีตามีนสูงทำให้เกิดผลกระทบต่อจิตประสาท และความบกพร่องทางสติปัญญา ความจำเสื่อม ความเร็วในการตอบสนองลดลง ความเข้าใจต่าง ๆ ลดลง (Olofsen et al., 2012) แต่อย่างไรก็ตามปริมาณ คีตามีนและนอร์คีตามีน ของทั้ง 8 ราย ก็ยังไม่สูงที่จะแสดงอาการทางคลินิก พอที่จะทำให้ทั้ง 8 ราย มีอาการสับสน โคม่า หรือเสียชีวิตได้

3.2) ผลการวิเคราะห์ปริมาณคีตามีนและนอร์คีตามีนในตัวอย่างเลือด และปัสสาวะของผู้เสียชีวิต

การวิเคราะห์หาปริมาณคีตามีนและนอร์คีตามีนของผู้เสียชีวิตจะมุ่งเน้นไปที่การตรวจหาปริมาณคีตามีนและนอร์คีตามีนในตัวอย่างเลือด เนื่องจากมีจุดประสงค์เพื่อทราบถึงเหตุแห่งการเสียชีวิตว่ามีความเกี่ยวข้องกับสารคีตามีนหรือไม่ หากมีปริมาณคีตามีนและนอร์คีตามีนปริมาณมากในกระแสเลือด หรือมีการใช้ร่วมกับยาหรือสารเสพติดชนิดอื่น ๆ รวมถึงการตรวจพบแอลกอฮอล์ในกระแสเลือดจะสามารถบอกถึงเหตุแห่งการเสียชีวิตได้

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณคีตามีนและนอร์คีตามีนในตัวอย่างเลือด และปัสสาวะของผู้เสียชีวิต ดังแสดงในตาราง 8 พบว่า ตัวอย่างปัสสาวะมีปริมาณคีตามีนอยู่ในช่วงระหว่าง 131.35 ถึง 7,099.85 ng/ml ซึ่งมีค่าเฉลี่ยคือ 2,945.95 ng/ml และมีปริมาณนอร์คีตามีนอยู่ในช่วงระหว่าง 187.35 ถึง 6,618.45 ng/ml ซึ่งมีค่าเฉลี่ยคือ 2,772.02 ng/ml ในส่วนของตัวอย่างเลือดมีปริมาณคีตามีนอยู่ในช่วงระหว่าง 4.07 ถึง 2,913.40 ng/ml ซึ่งมีค่าเฉลี่ยคือ 681.88 ng/ml และมีปริมาณนอร์คีตามีนอยู่ในช่วงระหว่าง 4.71 ถึง 1,649.45 ng/ml ซึ่งมีค่าเฉลี่ยคือ 384.86 ng/ml

ตาราง 7

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณคีตามีนและนอร์คีตามีนในตัวอย่างเลือด และปัสสาวะของผู้ต้องสงสัย

Sample No.	Urine Concentration of		ผลรวม Ketamine และ Norketamine	Urine Concentration of		ผลรวม Ketamine และ Norketamine
	Ketamine (K)	Norketamine (NK)		Ketamine(K)	Norketamine (NK)	
	K(ng/ml)	NK(ng/ml)	K(ng/ml)	NK(ng/ml)		
1	3,798.45	3,448.90	7,247.35	148.03	201.64	349.67
2	263.95	733.45	997.40	16.44	50.48	66.92
3	81.61	112.23	193.84	4.04	9.22	13.26
4	26.00	45.19	71.19	4.11	4.14	8.25
5	136.55	244.85	381.40	10.22	30.61	40.83
6	77.73	353.25	430.98	5.83	54.10	59.93
7	312.15	1,329.55	1,641.70	12.93	51.22	64.15
8	130.60	298.05	428.65	9.51	32.86	42.37
9	115.92	297.55	413.47	7.93	44.66	52.59
10	395.55	1,391.45	1,787.00	4.65	11.92	16.57
11	490.00	574.15	1,064.15	12.46	30.97	43.43
12	82.08	152.95	235.03	4.85	11.52	16.37
13	236.25	387.50	623.75	6.89	26.69	33.58
14	14.59	31.87	46.46	6.59	19.00	25.59
15	566.15	854.05	1,420.20	49.67	119.35	169.02
16	53.75	111.47	165.22	4.85	6.27	11.12
17	2,129.35	3,217.00	5,346.35	9.09	20.47	29.56
18	835.95	3,786.15	4,622.10	55.18	133.97	189.15
19	3,945.00	6,412.05	10,357.05	137.58	274.56	412.14
20	15,592.35	6,444.45	22,036.80	637.16	182.13	819.29
21	3,093.35	2,149.00	5,242.35	167.67	125.06	292.73
22	87.22	156.20	243.42	4.06	18.25	22.31
23	1,935.90	14,599.35	16,535.25	234.46	361.05	595.51
24	1,343.05	4,808.10	6,151.15	43.10	168.47	211.57
25	1,417.15	3,132.25	4,549.40	262.58	374.46	637.04
26	2,774.90	3,418.90	6,193.80	147.41	195.10	342.51
27	975.80	684.75	1,660.55	106.84	111.51	218.35
28	229.04	436.95	665.99	26.27	42.82	69.09
29	304.05	835.05	1,139.10	19.52	94.92	114.44
30	465.50	596.70	1,062.20	38.11	53.27	91.38
31	566.10	895.20	1,461.30	29.64	57.40	87.04

*n = 2 replicates

ตาราง 8

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณคีตามีนและนอร์คีตามีนในตัวอย่างเลือด และปัสสาวะของผู้เสียชีวิต

Sample No.	Urine Concentration of		ผลรวม Ketamine และ Norketamine	Urine Concentration of		ผลรวม Ketamine และ Norketamine	เหตุตาย
	Ketamine (K) Norketamine (NK)			Ketamine(K) Norketamine (NK)			
	K(ng/ml)	NK(ng/ml)	K(ng/ml)	NK(ng/ml)			
1	2,862.05	3,289.75	6,151.80	559.63	536.12	1,095.75	อุบัติเหตุ
2	150.55	423.30	573.85	14.43	7.02	21.45	ตกที่สูง
3	357.05	952.95	1,310.00	447.84	195.59	643.43	ถูกยิง
4	744.35	1,034.65	1,779.00	26.24	48.67	74.91	***
5	131.35	187.35	318.70	4.71	16.40	21.11	ผูกคอต
6	4,896.85	1,491.60	6,388.45	198.44	52.76	251.20	ถูกยิง
7	4,085.00	5,056.10	9,141.10	1,527.85	301.26	1,829.11	***
8	7,099.85	5,894.05	12,993.90	2,913.40	1,649.45	4,562.85	***
9	6,186.50	6,618.45	12,804.95	444.37	656.43	1,100.80	***

*** คือ เสียชีวิตจากระบบไหลเวียนโลหิตและระบบหายใจล้มเหลว / *n = 2 replicates

การอภิปรายผล

ผลการวิเคราะห์ปริมาณคีตามีนและนอร์คีตามีนในตัวอย่างปัสสาวะและตัวอย่างเลือดของผู้ต้องสงสัยพบว่า ปริมาณคีตามีนและนอร์คีตามีนในปัสสาวะของตัวอย่างทั้งหมด 31 ราย มีจำนวนตัวอย่าง 19 ราย ที่มีผลรวมของสารคีตามีนและนอร์คีตามีนในปัสสาวะมากกว่าค่า Cut-off และมี 12 รายที่มีปริมาณคีตามีนและนอร์คีตามีนในปัสสาวะต่ำกว่า Cut-off ในส่วนของปริมาณ คีตามีนและนอร์คีตามีน ในเลือดของแต่ละรายค่อนข้างต่ำ มีเพียง 8 ราย ที่มีค่าความเข้มข้นของ คีตามีนและนอร์คีตามีน สูงถึงระดับที่ทำให้เกิดผลกระทบต่อจิตประสาท แต่ยังไม่สูงพอที่จะทำให้สลบหรือเสียชีวิตได้ เนื่องจากปริมาณคีตามีนและนอร์คีตามีนยังต่ำกว่า 1,800 ng/ml ซึ่งเป็นปริมาณที่ทำให้เกิดพิษจนเป็นเหตุแห่งการตายที่เคยมีการรายงานว่า ผู้เสียชีวิต เสียชีวิตจากพิษของคีตามีนเกินขนาด (Lalonde & Wallage, 2004) และยังต่ำกว่า 1,000 ng/ml ซึ่งเป็นปริมาณที่ทำให้สลบ (Kintz, 2014) และผลตรวจอื่น ๆ ของทั้ง 8 ราย ไม่พบว่า มีแอลกอฮอล์ในกระแสเลือด รวมถึงยาหรือสารเสพติดอื่น ๆ

จากการพิจารณาผลการวิเคราะห์ปริมาณคีตามีนและนอร์คีตามีนในตัวอย่างปัสสาวะพบว่า ปริมาณคีตามีนและนอร์คีตามีนในปัสสาวะของผู้เสียชีวิตทั้ง 9 ราย พบว่า ผู้เสียชีวิต 7 ราย มีปริมาณคีตามีนและนอร์คีตามีนสูงกว่า Cut-off ที่ 1,000 ng/ml และมีเพียง 2 ราย คือ รายที่ 2 และรายที่ 5 ที่มีปริมาณคีตามีนและนอร์คีตามีนในปัสสาวะต่ำกว่า Cut-off แต่ตัวอย่างปัสสาวะก็ยังคงมีความจำเป็นในการใช้เพื่อตรวจการใช้น้ำยา Ketamine เบื้องต้นโดยวิธี Immunoassay Strip Test ที่มี Cut-off ของวิธีวิเคราะห์ที่ 1,000 ng/ml และนำไปสู่การตรวจยืนยัน และการวิเคราะห์หาปริมาณคีตามีนและนอร์คีตามีนในกระแสเลือดเพื่อหาสาเหตุแห่งการเสียชีวิตต่อไป

ผลการวิเคราะห์ปริมาณคีตามีนและนอร์คีตามีนในตัวอย่างเลือดของผู้เสียชีวิตพบว่า ปริมาณคีตามีนและนอร์คีตามีนในเลือดของทั้ง 9 ราย มี 3 ราย ที่สรุปได้ว่าเสียชีวิตจากพิษของสารคีตามีนเกินขนาด โดยมีปริมาณมากกว่า 1,000 ng/ml ในกระแสเลือดซึ่งเป็นปริมาณที่ทำให้สลบได้ และในบางรายมีปริมาณมากกว่า 1,800 ng/ml ซึ่งเป็นปริมาณที่ทำให้เกิดพิษจนเป็นเหตุแห่งการเสียชีวิต ประกอบกับการตรวจพบยานอนหลับ Diazepam ในเลือด

ของทั้ง 3 ราย ซึ่งจะทำงานเสริมฤทธิ์กับสารคีตามีนมีผลทำให้เพิ่มการกดการหายใจ เป็นเหตุให้เกิดการเสียชีวิตได้ แต่ในผู้เสียชีวิตรายอื่น ๆ นั้น ไม่สามารถสรุปได้ว่าเสียชีวิตจากสารคีตามีน เนื่องจากมีปริมาณคีตามีนและนอร์คีตามีนในเลือดต่ำ และบางรายสาเหตุแห่งการเสียชีวิตเป็นที่ทราบชัดเจนว่าเสียชีวิตจากเหตุอื่น ๆ คือ ตกจากที่สูง ผูกคอ และถูกยิง ในส่วนของผลการวิเคราะห์ปริมาณ คีตามีนและนอร์คีตามีน

จากการพิจารณาผลการวิเคราะห์ปริมาณคีตามีนและนอร์คีตามีนในตัวอย่างเลือดพบว่า ปริมาณคีตามีนและนอร์คีตามีนในเลือดของผู้เสียชีวิตทั้ง 9 ราย มี 3 รายที่เสียชีวิตโดยมีสาร Ketamine เป็นสาเหตุแห่งการเสียชีวิตได้แก่รายที่ 7 8 และรายที่ 9 โดยผู้เสียชีวิตทั้ง 3 ราย ถูกชันสูตรพลิกศพโดยแพทย์นิติเวชผู้เชี่ยวชาญ และลงความเห็นว่าสาเหตุการเสียชีวิตว่า ระบบไหลเวียนโลหิตและระบบหายใจล้มเหลว ซึ่งเมื่อดูผลการวิเคราะห์ปริมาณคีตามีนและนอร์คีตามีนในเลือดมีปริมาณสูงมากกว่า 1,000 ng/ml ซึ่งเป็นปริมาณที่มากพอจะทำให้สลบได้ ประกอบกับการตรวจพบยานอนหลับ Diazepam ซึ่งเป็นยานอนหลับในกลุ่ม Benzodiazepines โดยสาร Ketamine และยานอนหลับ Diazepam นั้นจะทำงานเสริมฤทธิ์กัน (synergies) มีผลทำให้เพิ่มการกดการหายใจ หลอดลมขยายตัวจากการหลั่งสาร Catecholamines อาจทำให้กล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด ความดันโลหิตเพิ่มขึ้น รวมถึงอาจทำให้เกิดภาวะความดันในกะโหลกศีรษะสูง (Saiphoklang, 2021) ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดการเสียชีวิตได้ และผู้เสียชีวิตรายที่ 1 นั้นไม่ได้เสียชีวิตจากสาร Ketamine โดยตรงเนื่องจากผู้เสียชีวิตรายนี้เสียชีวิตจากอุบัติเหตุจากรถ แต่อย่างไรก็ตามผู้เสียชีวิตรายนี้ก็ยังมีปริมาณคีตามีนและนอร์คีตามีนในตัวอย่าง

เลือดค่อนข้างสูงในระดับที่สามารถทำให้สลบได้ ประกอบกับการตรวจพบสาร MDMA หรือที่รู้จักกันในชื่อ Ecstasy หรือยาอี ซึ่งสารทั้งสองชนิดนี้ส่งผลต่อระบบประสาท การรับรู้ทำให้ประสิทธิภาพในการขับชี่ยานพาหนะลดลงอย่างมาก อันเป็นสาเหตุให้เกิดอุบัติเหตุจากรถได้

ในส่วนของผู้เสียชีวิตรายอื่น ๆ นั้น ไม่สามารถสรุปได้ว่าเสียชีวิตจากสาร Ketamine เนื่องจากปริมาณคีตามีนและนอร์คีตามีนในเลือดมีปริมาณต่ำ และบางรายสาเหตุแห่งการเสียชีวิตเป็นที่ทราบชัดเจนว่าเสียชีวิตจากเหตุอื่น ๆ คือ ตกจากที่สูง ผูกคอ และถูกยิง

ข้อเสนอแนะ

1. เนื่องจากเทคนิค Online SPE LC-MS/MS มีคุณสมบัติต่าง ๆ ที่ดีไม่ว่าจะเป็นความถูกต้อง แม่นยำ นำเชื่อถือ ใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้นเพียง 11 นาที วิธีการเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ง่าย และรวดเร็ว ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค GC-MS หรือ LC-MS/MS จะใช้เวลาในการวิเคราะห์โดยไม่รวมเวลาในการสกัดตัวอย่างประมาณ 15-30 นาที จึงควรที่จะนำเทคนิค Online SPE LC-MS/MS และสภาวะ (condition) ต่าง ๆ ในงานวิจัยชิ้นนี้ไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารอื่น ๆ ไม่ว่าจะเป็นยา หรือยาเสพติดชนิดต่าง ๆ รวมถึงนำไปประยุกต์เพื่อวิเคราะห์ในตัวอย่างอื่น ๆ นอกเหนือจากตัวอย่างเลือดและปัสสาวะ เช่น เส้นผม น้ำในลูกตา และน้ำจากเยื่อหุ้มหัวใจ เป็นต้น

2. เนื่องจากในงานวิจัยชิ้นนี้มีจำนวนตัวอย่างจากผู้เสียชีวิตค่อนข้างน้อยเพียง 9 ราย ควรเพิ่มจำนวนกลุ่มตัวอย่างของผู้เสียชีวิตให้มากขึ้นสำหรับงานวิจัยในอนาคต



References

Adamowicz, P., & Kala, M. (2005). Urinary excretion rates of ketamine and norketamine following therapeutic ketamine administration: Method and detection window considerations. *Journal of Analytical Toxicology*, 29(5), 376-382. <https://doi.org/10.1093/jat/29.5.376>

Gahlinger, P. M. (2004). Club drugs: MDMA, gamma-hydroxybutyrate (GHB), Rohypnol, and Ketamine. *American Family Physician*, 69(11), 2619-2626. <https://www.aafp.org/pubs/afp/issues/2004/0601/p2619.html>

- Kim, E.-m., Lee, J.-s., Choi, S.-k., Lim, M.-a., & Chung, H.-s. (2008). Analysis of Ketamine and Norketamine in Urine by automatic Solid-Phase Extraction (SPE) and Positive ion Chemical Ionization–Gas Chromatography–Mass Spectrometry (PCI–GC–MS). *Forensic Science International*, 174(2-3), 197-202. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2007.04.217>
- Kintz, P. (2014). *Toxicological aspects of drug-facilitated crimes*. Amsterdam: Elsevier.
- Krystal, J. H., Petrakis, I. L., Webb, E., Cooney, N. L., Karper, L. P., Namanworth, S., Stetson, P., Trevisan, L. A., & Charney, D. S. (1998). Dose-related ethanol-like effects of the NMDA antagonist, Ketamine, in recently detoxified alcoholics. *Archives of General Psychiatry*, 55(4), 354–360. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.55.4.354>
- Lalonde, B. R., & Wallage, H. R. (2004). Postmortem blood Ketamine distribution in two fatalities. *Journal of Analytical Toxicology*, 28(1), 71-74. <https://doi.org/10.1093/jat/28.1.71>
- Legrand, T., Roy, S., Monchaud, C., Grondin, C., Duval, M., & Jacqz-Aigrain, E. (2008). Determination of Ketamine and Norketamine in plasma by micro-liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48(1), 171-176. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.05.008>
- Lertkovit, S., Noitasaeng, P., Kimura, R., & Vichitvejpaisal, P. (2021). Distorted anesthetics of medical practice. *Thai Journal of Anesthesiology*, 47(1), 71-78. (in Thai)
- Moffat, A. C., Osselton, M. D., Widdop, B. & Watts, J. (2004). *Clarke’s analysis of drugs and poisons: In pharmaceuticals body fluids and postmortem material* (4th ed.). London: Pharmaceutical Press. <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&db=nlabk&AN=367935>.
- Niquet, J., Baldwin, R., Suchomelova, L., Lumley, L., Eavey, R., & Wasterlain, C. G. (2017). Treatment of experimental status epilepticus with synergistic drug combinations. *Epilepsia*, 58(4), e49-e53. <https://doi.org/10.1111/epi.13695>
- Olofsen, E., Noppers, I., Niesters, M., Kharasch, E., Aarts, L., Sarton, E., & Dahan, A. (2012). Estimation of the contribution of Norketamine to Ketamine-induced acute pain relief and neurocognitive impairment in healthy volunteers. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, 117(2), 353-364. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e31825b6c91>
- Sałat, K., Siwek, A., Starowicz, G., Librowski, T., Nowak, G., Drabik, U., & Popik, P. (2015). Antidepressant-like effects of Ketamine, Norketamine and Dehydronorketamine in forced swim test: Role of activity at NMDA receptor. *Neuropharmacology*, 99, 301-307. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.07.037>
- Saiphoklang, N. (2021). *Doctor of Thammasat University pointed out that “K powdered milk” the center of medicine that “stopping breathing”*. Retrieved from <https://tu.ac.th/thammasat-180164-med-expert-talk-k-nom-pong>. (in Thai)

- Scientific Working Group for Forensic Toxicology. (2013). Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) standard practices for method validation in forensic toxicology. *Journal of Analytical Toxicology*, 37(7), 452–474. <https://doi.org/10.1093/jat/bkt054>
- Wang, L., Ni, C., Shen, H., Sheng, Z., Liang, C., Wang, R., & Zhang, Y. (2020). Comparison of the detection windows of heroin metabolites in human urine using online SPE and LC–MS/MS: Importance of morphine-3-glucuronide. *Journal of Analytical Toxicology*, 44(1), 22-28. <https://doi.org/10.1093/jat/bkz040>
- Zanos, P., Moaddel, R., Morris, P. J., Riggs, L. M., Highland, J. N., Georgiou, P., Pereira, E. F. R., Albuquerque, E. X., Thomas, C. J., Zarate, C. A., Jr, & Gould, T. D. (2018). Ketamine and Ketamine metabolite pharmacology: Insights into therapeutic mechanisms. *Pharmacological Reviews*, 70(3), 621–660. <https://doi.org/10.1124/pr.117.015198>

