

การตรวจวิเคราะห์การปนปลอมยาแผนปัจจุบันในยาสมุนไพร และผลิตภัณฑ์เสริมอาหารโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงต่อการวิเคราะห์ชนิดมวลโมเลกุลของสาร

Determination of Illegal Adulterant in Herbal Medicines and Dietary Supplements by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

นิทรา เนื่องจ้านงค์^{*}¹, นิภา สุวรรณกิจ¹, วฐุ พรหมพิทยารัตน์¹

¹ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์พิษณุโลก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

Nitra Nuengchamnong^{*}¹, Nipa Suwannakij¹, Watoo Phrompittayarat¹

¹ Regional Medical Sciences Center Phitsanulok, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health 65000, Thailand

Received: 1 October 2008 Accepted: 17 October 2008

Abstract

Adulterations with synthetic drugs are common problems with herbal medicines and this can potentially cause serious adverse effects. In this paper, a robust LC-MS/MS method for the sensitive and reliable determination of 33 illegal adulterations from herbal medicines and dietary supplements was established. The drugs were isolated from herbal sample using 70% (v/v) methanol. Chromatographic separation was done using C18 column (150x4.6 mm id., 5 μ M) with gradient elution of 0.1% (v/v) formic acid and methanol at flow rate of 0.6 ml/min. For most drugs, two transitions were monitored (multiple reaction monitoring; MRM) using protonated or deprotonated as precursor ions under their respective optimal collision energy for each compound. The detection limit was in the level of picogram and the separation of at least 30 compounds can be done in 30 min. The application of this method was used in the sample of herbal medicines, dietary food supplements, coffee for weight controlling and cola drink, totally 49 samples. The adulterate found was dexamethasone in a sample of herbal medicines used for muscle ache, sibutramine was found in 2 samples of dietary food supplements and caffeine was found in 3 samples of dietary food supplements that did not claim on product. With this developed method for analysis of adulterants in herbal medicine, the product quality can be better controlled and regulated to ensure consumers' safety.

Keywords: Illegal adulterant; herbal medicine; Dietary supplement; LC-MS/MS

^{*}

ผู้เขียนที่สามารถติดต่อได้ : นิทรา เนื่องจ้านงค์ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์พิษณุโลก โทรศัพท์ 055247581-2 ต่อ 168,105
โทรสาร 055247581-2 ต่อ 121 e-mail : nitra_nuengchamnong@yahoo.com

บทคัดย่อ

การใช้ยาแผนปัจจุบันผสมในสมุนไพรและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อหวังผลในการรักษา จะทำให้ผู้บริโภคได้รับอันตรายจากการใช้ผลิตภัณฑ์นั้นได้ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ยาแผนปัจจุบันในกลุ่มต่างๆ โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงต่อการวิเคราะห์ชนิดมวลโมเลกุลของสาร (High performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) ในการตรวจหา ยาแผนปัจจุบันจำนวน 33 ชนิดตัวยา ที่มักพบปนปลอมในสมุนไพรและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ใช้สารละลาย 70% (v/v) เมทานอลในการสกัดตัวอย่าง การแยกตัวยาแต่ละชนิดใช้คอลัมน์ชนิด C18 ขนาด (150x4.6 mm i.d., 5μM) สารละลายเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย 0.1% (v/v) กรดฟอร์มิก:เมทานอล แบบปรับสัดส่วนตามระยะเวลา มีอัตราการไหล 0.6 มิลลิลิตร/นาที การทำให้สารเกิดประจุในสถานะเพิ่มโปรตอน (protonated) และ ลดโปรตอน (deprotonated) ขึ้นกับชนิดตัวยา การตรวจวัดใช้ มวลโมเลกุล และแบบการแตกตัวเป็นไอออนของโมเลกุล จำนวน 2 คู่ (Multiple Reaction Monitoring, MRM) วิธีนี้สามารถตรวจวัดตัวยาในระดับต่ำถึงพิโคกรัม สามารถตรวจวิเคราะห์ยาพร้อมกันอย่างน้อย 30 ชนิดในเวลา 30 นาที ได้นำวิธีที่พัฒนานี้ไปตรวจหาการปนปลอมตัวยาแผนปัจจุบันในตัวอย่างยาสมุนไพร ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร กาแฟสำหรับควบคุมน้ำหนัก และ เครื่องดื่มโคล่า (สีน้ำตาล) จำนวนรวม 49 ตัวอย่าง ตรวจพบเดกซาเมทาโซน (dexamethasone) 1 ตัวอย่างในสมุนไพรแก้ปวดเมื่อย ไซบูตามีน (sibutramine) 2 ตัวอย่าง ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร และคาเฟอีน (caffeine) 3 ตัวอย่างในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่ไม่ระบุที่มาของสารคาเฟอีน วิธีนี้มีความเหมาะสมในการนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์การปนปลอมของยาแผนปัจจุบันในสมุนไพร และผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร เพื่อประโยชน์ในการคุ้มครองผู้บริโภคให้มีความปลอดภัย

คำสำคัญ: การปนปลอมยาแผนปัจจุบัน สมุนไพร ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร LC-MS/MS

บทนำ

สมุนไพรที่ใช้เป็นยาต้องผ่านการตรวจสอบและมีเลขทะเบียน ตามที่สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยากำหนด แต่โดยทั่วไปมีสมุนไพรจำนวนมากที่ไม่ผ่านการตรวจสอบ และมักพบการปนเปื้อนของยาแผนปัจจุบัน ดังรายงานของ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ขอนแก่น ซึ่งตรวจวิเคราะห์ยาแผนปัจจุบันที่ปนปลอมอยู่ในยาแผนโบราณ โดยความร่วมมือกับสำนักงานสาธารณสุขจังหวัดขอนแก่น อุดรธานี เลย และ สกลนคร ในการเก็บตัวอย่าง ระหว่างเดือน ตุลาคม 2541 – กันยายน 2545 ซึ่งเป็นทั้งยาแผนโบราณที่ได้ขึ้นและไม่ได้ขึ้นทะเบียนตำรับยา ทำการตรวจหา ยาแผนปัจจุบันด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography เทียบกับสารมาตรฐาน ผลการตรวจวิเคราะห์จำนวนตัวอย่างทั้งสิ้น 415 ตัวอย่าง เป็นยาที่ได้ขึ้นทะเบียนตำรับ 224 ตัวอย่าง ตรวจไม่พบยาแผนปัจจุบัน และไม่ได้ขึ้นทะเบียนตำรับ 191 ตัวอย่าง ตรวจพบยาแผนปัจจุบันจำนวน 55 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 28.8 จากผลการตรวจวิเคราะห์พบว่า ยาแผนปัจจุบันที่ปนเปื้อน

ได้แก่ dexamethasone, prednisolone, diazepam, phenylbutazone และ chlorpheniramine (ศุภลักษณ์ พริ้งเพระ และคณะ, 2546) จากรายงานของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์สงขลา เมื่อปีพ.ศ. 2541 พบว่ายาแผนโบราณยังมีการปนปลอมยาแผนปัจจุบันชนิด dexamethasone และ prednisolone ในจำนวนที่สูงคือพบร้อยละ 10.0 ของตัวอย่างที่ตรวจทั้งหมด 180 ตัวอย่าง และพบการปนปลอมสาร dexamethasone มากกว่า prednisolone นอกจากนี้พบว่าทั้ง 18 ตัวอย่างที่พบสารสเตียรอยด์ เป็นตัวอย่างยาที่ไม่มีการแจ้งเลขทะเบียนยา และแหล่งผลิตบนภาชนะบรรจุแสดงว่าตัวอย่างยาดังกล่าวมีการผลิตและจำหน่ายโดยไม่ถูกต้องตามพระราชบัญญัติยา (รายงานประจำปีศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์สงขลา, 2541) ในปี พ.ศ.2548 มีการตรวจพบ sildenafil ในยาน้ำแผนโบราณ (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2548) ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์สมุทรสงคราม รายงานว่า จาก 212 ตัวอย่างที่ส่งตรวจในเขตสาธารณสุข 6, 7 ระหว่างปี 2548 ถึง

2550 เป็นตัวอย่างจากสำนักงานสาธารณสุขจังหวัด โรงพยาบาล และประชาชนในพื้นที่ พบยาแผนปัจจุบันปนปลอม จำนวน 80 ตัวอย่าง (ร้อยละ 37.7) ซึ่งส่วนใหญ่ เป็นตัวอย่างที่ไม่มีเลขทะเบียนยา โดยตรวจพบสารสเตียรอยด์ ทั้ง 2 ชนิด คือ dexamethasone และ prednisolone ปนปลอมมากที่สุด จำนวน 33 ตัวอย่าง (ร้อยละ 41.2) ของตัวอย่างที่ตรวจพบ ซึ่งพบมากในตัวอย่าง ที่มีลักษณะเป็นเม็ดลูกกลอน รองลงมาได้แก่ dexamethasone 13 ตัวอย่าง (ร้อยละ 16.2) และ prednisolone 9 ตัวอย่าง (ร้อยละ 11.2) นอกจากนั้นยังตรวจพบตัวยาแผนปัจจุบันชนิดอื่นปนปลอม ได้แก่ diclofenac, phenylbutazone และ paracetamol หรือพบทั้ง สเตียรอยด์และยาแผนปัจจุบันชนิดอื่นเช่น พบทั้ง dexamethasone, prednisolone และ diazepam จำนวน 4 ตัวอย่าง ซึ่งสถานการณ์การตรวจพบสารสเตียรอยด์ผสมยาแผนปัจจุบันชนิดอื่น มีแนวโน้มสูงขึ้น (นันทนา กลิ่นสุนทร, 2550) ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ นครราชสีมา ได้รายงาน ว่า จากการเก็บตัวอย่างยาแผนโบราณจำนวน 96 ตัวอย่าง ตั้งแต่ปี 2548-2550 พบการปลอมปนร้อยละ 50 โดยแนวโน้มการปลอมปนมีจำนวนมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง คือร้อยละ 40 ในปี 2548 ร้อยละ 48 ปี 2549 และ ร้อยละ 61 ปี 2550 การปนปลอมที่พบมากที่สุดคือ ยากลุ่มออกฤทธิ์แก้ไอและเสมหะ เช่น สารสเตียรอยด์ dexamethasone และ prednisolone รองมาเป็นยากลุ่มออกฤทธิ์ต่อจิตประสาท เช่น diazepam ที่ใช้รักษาอาการวิตกกังวล ทำให้หลับง่าย (เพียงใจ วงศ์สุวรรณ และบรรจง กิตติรัตน์ตระกูล, 2551)

ในปี พ.ศ. 2548 มีรายงานการปนปลอมยาแผนปัจจุบันในผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร โดยศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์พิษณุโลกตรวจพบ ephedrine ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารประเภทชาลดหรือควบคุมน้ำหนัก จึงเกิดเป็นโครงการสำรวจยาแผนปัจจุบันปนปลอมในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารในปี 2549 ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ อุบลราชธานี และศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์เชียงใหม่ ตรวจพบ fenfluramine และศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ นครราชสีมา ตรวจพบ phenolphthalein (สำนักยาและวัตถุเสพติด, 2550) นอกจากนี้มีรายงานตรวจพบ sildenafil ในกาแฟ (นิรัตน์ เตียสุวรรณ, 2551)

ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจัดเป็นอาหารตามพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 โดยเป็นอาหารที่

กำหนดคุณภาพหรือมาตรฐาน ต้องมีคุณภาพเป็นไปตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 293 พ.ศ. 2548 (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข, 2548) ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่ใช้สำหรับลดน้ำหนัก มีส่วนประกอบหลักได้แก่ใยอาหารใช้ป้องกันอาการท้องผูก สารสกัดจากเปลือกหอยหรือกระดองปู (chitosan) ใช้ในการดูดซับไขมัน และพาไขมันออกไปกับอุจจาระ ถ้าหากรับประทานในขนาดที่มากพอ สารที่เชื่อว่าช่วยเพิ่มการเผาผลาญพลังงาน ช่วยเสริมสร้างกล้ามเนื้อ ลดการสะสมไขมัน เช่น คอลลาเจนไฮโดรไลเซต (collagen hydrolysate) สารสกัดจากผลส้มแขก (hydroxy citric acid, HCA) สารสกัดจากน้ำมันดอกคำฝอย หรือเมล็ดทานตะวันที่มี conjugate linoleic acid (CLA) ธาตุโครเมียม (chromium) สารเลซิติน (lecithin) น้ำส้มสายชูจากผลแอปเปิ้ล (cider vinegar) (เกษนภา เตการญจนวิษ, 2549) สารสกัดจากชาเขียว (มีสารคาเฟอีน) และที่มีฤทธิ์เป็นยาระบาย เช่น ชาสมุนไพรมะขามแขก

วิธีที่นิยมใช้วิเคราะห์การปนปลอมของยาแผนปัจจุบันในสมุนไพร หรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหารคือใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแผ่นผิวบาง (Thin Layer Chromatography, TLC) เทียบกับสารมาตรฐาน หรือสกัดด้วยตัวทำละลายแล้วตรวจสอบการดูดกลืนแสงยูวีวิธีเหล่านี้ถ้าหากมีการสกัด หรือระบบการแยกไม่ดีจะทำให้ผลผิดพลาดได้ ในปัจจุบันมีการนำเทคนิคทาง Gas chromatography Mass spectrometer (GC-MS) (Liu et al., 2001) หรือ High Performance Liquid Chromatography Diode Array Detector (HPLC-DAD) (Snyman et al., 2005) และ LC-MS/MS มาตรวจการปนปลอมของยาแผนปัจจุบันในสมุนไพรและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร เช่น ยาในกลุ่มเพิ่มสมรรถนะทางเพศ (Zou et al., 2006) ยาแก้ปวด (Lau et al., 2003) และยาอื่นๆ (Bogusz et al., 2006; Liang et al., 2006)

เนื่องจากสมุนไพรมีสารต่างๆเป็นองค์ประกอบอยู่จำนวนมาก ทำให้การวิเคราะห์โดยทั่วไปยุ่งยากและใช้เวลาในการเตรียมสารสกัดให้บริสุทธิ์ การมีวิธีตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพ และครอบคลุมตัวยาที่ใช้ปนปลอม จะช่วยเพิ่มความปลอดภัยในการใช้ผลิตภัณฑ์เหล่านี้ ในที่นี้จะนำเสนอวิธีการตรวจวิเคราะห์หาการปนปลอมของยาแผนปัจจุบันในยาแผนโบราณ และผลิตภัณฑ์เสริมอาหารโดยใช้เทคนิค LC-MS/MS ชนิด MRM mode

วิธีการทดลอง

1.วัตถุดิบและสารเคมี

1.1ตัวอย่าง

1.1.1 ยาสมุนไพร ซึ่งจากตลาดแม่สอด อ.แม่สอด จ.ตาก จำนวน 8 ตัวอย่าง สรรพคุณรักษาความดันโลหิต เบาหวาน บำรุงโลหิต ยากระษัยเส้น ยาบำรุงเลือด แก้ปวดข้อ ปวดเมื่อย แก้ปวดท้อง (โรคกระเพาะ) แก้เลือดน้อย

1.1.2 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร จำนวน 27 ตัวอย่าง ซึ่งจากร้านขายยาใน จ.พิษณุโลก และนำส่งจากสำนักงานสาธารณสุขจังหวัดอุตรดิตถ์ 2 ตัวอย่าง

1.1.3 กาแฟสำเร็จรูป จำนวน 11 ตัวอย่าง นำส่งจากสำนักงานสาธารณสุขจังหวัดตาก

1.1.4 เครื่องดื่มโคล่า (สีน้ำตาล) จำนวน 1 ตัวอย่าง นำส่งจากวิทยาลัยแห่งหนึ่ง

1.2 สารมาตรฐาน

สารมาตรฐาน streptomycin, sulphamethoxazole, tetracycline, trimetoprim, amoxycilin, chloramphenicol, caffeine, dexamethasone, prednisone, prednisolone, dextromethorphan, phenylpropanolamine, promethazine, famotidine, fenfluramine, phentermine, oxyphenbutazone, phenylbutazone, ibuprofen, phenolphthalein, sildenafil, nifedipine, alprazolam, diazepam, nitrazepam, triazolam, ephedrine, pseudoephedrine ผลิตจากสำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (DMSc Reference Standard) gliclazide (Servier; Gidy, France) glimepiride (Hoechst; Frankfurt, Germany) glipizide (Sigma; St.Louis, MO., USA), pioglitazone (Takeda; Osaka, Japan) sibutramine HCl monohydrate (reductil; Abbott, USA) เมทานอล (JT Baker; USA) กรดฟอรั่มิก (Merck, Germany). น้ำปราศจากไอออนจากเครื่องทำน้ำ Elga USF system (Bucks, England).

2.วิธีทดลอง

2.1 วิธีเตรียมตัวอย่าง

1. ตัวอย่างที่เป็นแคปซูล และยาเม็ด นำผงยา 1-2 กรัม มาสกัดด้วย 70% methanol จำนวน 5 มล. ใส่ในอ่างอุลตราโซนิกนาน 1 นาที นำสารละลายปริมาตร 1 มิลลิลิตร กรองผ่านเมมเบรนแบบไซริงซ์ (syringe filter, Nylon ขนาด 0.45 μm) นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์

2. ตัวอย่างกาแฟ นำกาแฟ 1 ชง ผสมน้ำร้อน อุณหภูมิประมาณ 85°C ปริมาตร 100 มล. คนให้ละลาย นำสารละลายปริมาตร 1 มิลลิลิตร กรองผ่านเมมเบรนแบบไซริงซ์ นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์

3. ตัวอย่างเครื่องดื่ม นำสารละลายปริมาตร 1 มิลลิลิตร กรองผ่านเมมเบรนแบบไซริงซ์ นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์

2.2 วิธีเตรียมสารมาตรฐาน

เตรียมสารมาตรฐานยาแต่ละชนิดให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ละลายด้วย 70% เมทานอล เก็บไว้ใช้เป็นสารมาตรฐานตั้งต้น (stock solution)

2.3 เครื่องมือ และสภาวะที่ใช้

เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Agilent 1100 series, USA) ต่อคู่กับเครื่องวิเคราะห์ชนิดมวลโมเลกุลของสาร (PE SCIEX API 4000 triple quadrupole tandem mass spectrometer, Applied Biosystem, CA) โดยมีสภาวะของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ดังนี้

สภาวะที่ใช้ในการ

แยกสาร

คอลัมน์	C18 Gemini 150x4.6 mm i.d., 5 μm (Phenomenex, USA)
สารละลายเฟสเคลื่อนที่ (เปลี่ยนสัดส่วนตามเวลาการแยก)	A: 0.1% กรดฟอรั่มิก B: เมทานอล
ปริมาตรที่ฉีด	5 ไมโครลิตร
อุณหภูมิคอลัมน์	25°C

สัดส่วนของสารละลายเฟสเคลื่อนที่ตามตารางที่ 1

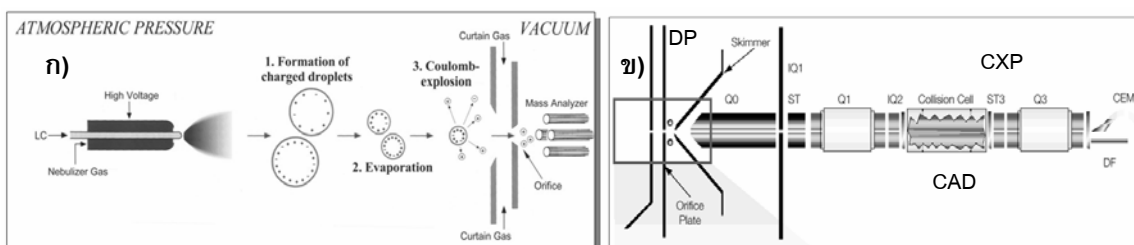
ตารางที่ 1 อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ ที่ใช้ในการแยกตัวยาชนิดต่างๆ 33 ชนิด

เวลา (นาที)	%A (0.1% กรดฟอร์มิก)	%B (เมทานอล)
0	95	5
5	95	5
20	20	80
23	20	80
24	5	95
26	5	95
26.1	95	5
30	95	5

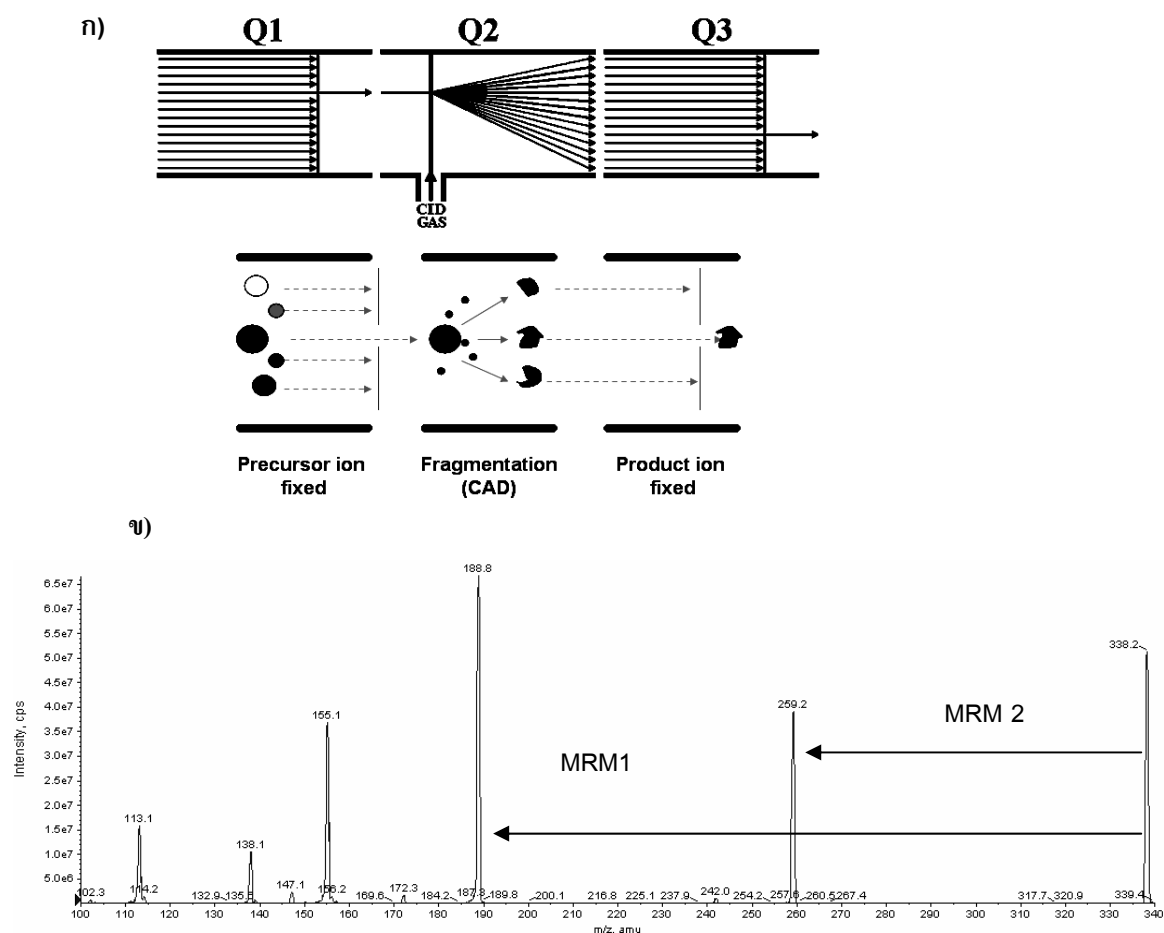
หมายเหตุ : อัตราการไหล 0.6 มิลลิลิตร/นาที

ส่วนประกอบของเครื่องวัดมวลโมเลกุล ประกอบด้วยส่วนที่ทำให้โมเลกุลเกิดประจุ และ ส่วนวัดมวลโมเลกุล รูปที่ 1 การตรวจวัดสารใช้การตรวจวัดมวลโมเลกุล และแบบการแตกตัวเป็นไอออนของโมเลกุล จำนวน 2 คู่ (Multiple reaction monitoring, MRM) (รูปที่ 2) การหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจยาแต่ละชนิดทำโดยนำสารมาตรฐานตัวยาจากสารมาตรฐานตั้งต้น หรือสารละลายจากเม็ดยา เตรียมให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บรรจุในกระบอกฉีดขนาด 1 มิลลิลิตร และติดตั้งในปั๊ม (syringe pump, Harvard apparatus, Hollison, USA) ปรับอัตราการไหล 5 ไมโครลิตร/นาที ต่อเข้ากับระบบของ เครื่องตรวจวัดมวลโมเลกุล ปรับค่าพลังงานและความต่างศักย์ที่ใช้ใน

การแตกเป็นไอออน สำหรับสารแต่ละตัวเพื่อให้มีความเข้มของสัญญาณสูงสุด เมื่อได้ค่าที่เหมาะสมของการตรวจวัดตัวยาแต่ละชนิดนำค่าที่ได้มาสร้างวิธีวิเคราะห์ให้เชื่อมกับระบบการแยกตัวยาแต่ละชนิด สภาวะที่เหมาะสมของเครื่องวัดมวลโมเลกุล (ตารางที่ 2) ซึ่งเครื่องแต่ละรุ่นจะมีความแตกต่างกัน และค่าที่เหมาะสมในการแยก และตรวจวัดของสารมาตรฐานยาแต่ละตัวแสดงตามตารางที่ 3



รูปที่ 1 ส่วนประกอบของเครื่องวัดมวลโมเลกุล ก) ส่วนที่ทำให้โมเลกุลเกิดประจุชนิด electrospray และ ข) ส่วนวัดมวลโมเลกุลชนิด triple quadrupole tandem mass spectrometer (ภาพจากเอกสารการอบรม Basic Operation Training to LC-MS-MS API 4000; Applied Biosystems/MDS SCIEX,CA)



รูปที่ 2 การวิเคราะห์มวลโมเลกุลแบบ multiple reaction monitoring (MRM) ก) รูปแบบการแตกตัวของสารแบบ MRM ข) แสดงการแตกตัวของสารตั้งต้นเป็นไอออน และการทำเลือกไอออนมาทำ MRM ตัวอย่างยา famotidine m/z 338.3, MRM1 338.3 $\rightarrow$ 188.8, MRM2 338.3 $\rightarrow$ 259.2 amu (รูปที่ 2 ก ภาพจากเอกสาร การอบรม Basic Operation Training to LC-MS-MS API 4000; Applied Biosystems/MDS SCIEX,CA)

ตารางที่ 2 สภาวะที่ใช้ของเครื่องวิเคราะห์ชนิดมวลโมเลกุลของสาร รุ่น API4000

Tune Parameter	Negative mode	Positive mode
Ionization Type	Electrospray (ESI)	Electrospray (ESI)
Collision gas (CAD) psi	4	4
Curtain gas (CUR) psi	10	10
Temperature ($^{\circ}$ C)	400	400
Ion source gas 1 (Air) psi	55	55
Ion source gas 2 (Air) psi	45	45
Ion spray (V)	-4500	5500
Dwell time (msec)	100	300
Declustering potential (V)	30-230	-75 to -100

ตารางที่ 3 ตัวอย่างที่ทดสอบ มวลโมเลกุล และการแตกตัวเป็นไอออน ค่าพลังงานที่ใช้ และขีดจำกัดการตรวจวัด

Compound	Parent ion(<i>m/z</i>)	Product ions (<i>m/z</i>)	CE (V)	CXP (V)	t _r (min)	LOD (μg/ml)
Tranquilizer						
alprazolam	309.2	281.1	36	12	19.13	0.01
		205.2	60	7		
diazepam	285.2	193.0	45	30	21.57	0.05
		154.1	40	25		
nitrazepam	282.3	236.0	30	10	19.49	*
		180.1	50	27		
triazolam	343.3	308.2	40	13	19.42	*
		315.2	40	15		
Antihistamines						
ephedine	166.5	148.1	15	12	5.88	5
		91.2	40	15		
phenylpropanolamine	152.2	133.9	12	9	5.82	*
		117.2	24	20		
psuedoephedine	166.5	148.1	15	12	4.96	*
		91.2	40	15		
promethazine	285.7	199.1	28	10	15.26	0.01
		240.9	18	15		
Antibiotics & antimicrobial						
amoxycillin	366.0	348.9	13	22	7.48	0.1
		114.0	30	20		
streptomycin	582.3	246.0	60	12	1.79	5
sulphamethoxazole	254.1	156.0	22	27	17.39	5
		107.8	33	18		
tetracycline	444.9	410.2	29	23	12.34	0.1
		427.1	20	25		
trimetoprim	291.1	230.2	32	15	12.09	0.05
		123.2	35	20		
chloramphenicol	321	257	-16	-15	17.28	0.001
		152	-24	-9		
Corticosteroids						
dexamethasone	393.1	373.1	10	9	18.88	0.01
		237.1	31	13		
prednisone	359.4	147.1	30	27	17.72	*
		341.1	13	20		
prednisolone	361.3	343.1	10	8	17.81	0.003
		147.1	30	8		

Anti-ulcerants

famotidine	338.3	188.8	27	9	11.59	10
		259.0	17	20		

Antihypertensive

nifedepine	345.1	122.1	-23	-20	22.11	0.5
		222.2	-22	-22		

Analgesic-antipyretic & anti-inflammatory

oxyphenbutazone	325.3	160.0	29	27	21.04	0.1
		204.1	22	10		
phenylbutazone	309.1	160.0	27	27	23.81	0.05
		120.2	27	20		
ibuprofen	204.7	161	-10	-13	23.37	0.01

Antitussive

dextromethorphan	271.9	171.1	55	8	14.5	0.05
		147.2	45	25		

Antidiabetic

gliclazide	324.4	127.2	24	8	21.78	0.05
		109.9	25	8		
glimepiride	491.4	126.1	36	8	23.1	0.05
		351.9	16	8		
glipizide	446.3	321.0	18	12	19.94	0.05
pioglitazone	357.2	134.0	40	12	14.99	0.001
		119.3	60	20		

Weight reducers

fenfluramine	231.9	159.0	30	26	14.4	0.05
		186.9	20	30		
phentermine	150.4	91.2	22	14	12.77	0.01
		132.8	13	7		
sibutramine	280.0	125.1	35	20	15.65	*
		138.9	4	7		

Aphrodisiacs

sildenafil	474.6	283.2	57	17	14.97	5
		100.1	40	17		

Laxative

phenolphthalein	319.1	225.1	30	12	19.54	0.01
		141.1	60	16		

Xanthine stimulant

caffeine	195.2	137.9	26	22	13.79	0.5
		110	37	18		

* สารมาตรฐานไม่ทราบความเข้มข้นแน่นอนของตัวยา

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ยาแผนปัจจุบันในกลุ่มต่างๆ ที่ใช้ในการรักษาโรค จำนวน 13 กลุ่ม 33 ชนิด โดยใช้เทคนิค LC-MS/MS สามารถตรวจวัดตัวยาในแบบ protonated (positive ionization) ได้ 30 ชนิด ภายใน 30 นาที ในแบบ deprotonated (negative ionization) ใช้ได้ ตีกับยา nifedepine, ibuprofen และ chloramphenicol ตารางที่ 3 ข้อดีของเทคนิคนี้คือ สารที่มีมวลโมเลกุลเท่ากัน เช่น alprazolam และ phenylbutazone มีมวลโมเลกุล 308 ในสภาวะเพิ่มโปรตอนจะเห็นมวลโมเลกุล/ประจุที่ 309 ($[M-H]^+$ m/z 309) จะมีการแตกตัวเป็นไอออนต่างกัน alprazolam แตกตัวให้อิออนที่ m/z 281.1 และ 205.2 amu ขณะที่ phenylbutazone แตกตัวให้อิออนที่ m/z 160.0 และ 120.0 amu ยาทั้งสองแยกออกจากกันด้วยเวลาที่ต่างกัน (retention time, t_R เท่ากับ 19.13 และ 23.81 นาที ตามลำดับ) วิธีนี้ยังใช้ได้กรณีที่สารไม่แยกจากกัน เพราะสารแต่ละชนิดจะมีมวลโมเลกุลเฉพาะตัว ซึ่งเป็นข้อดีของเทคนิค LC-MS การเตรียมและสกัดตัวอย่างไม่ยุ่งยาก ใช้สารเคมีน้อย มีความปลอดภัยต่อผู้วิเคราะห์ ปริมาณต่ำสุดที่วิเคราะห์ของยาบางชนิดอยู่ในระดับพิโคกรัม เช่น ยา pioglitazone และ chloramphenicol มีขีดจำกัดการตรวจวัดที่ 0.001 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 5 พิโคกรัม/การฉีด 1 ครั้ง ตารางที่ 3 วิธีนี้สามารถวิเคราะห์ตัวยาอื่นๆ ได้อีกหลายชนิดถ้ามีสารมาตรฐานหรือตัวยาที่สนใจ นำมาปรับตั้งค่าให้เครื่องตรวจสอบได้

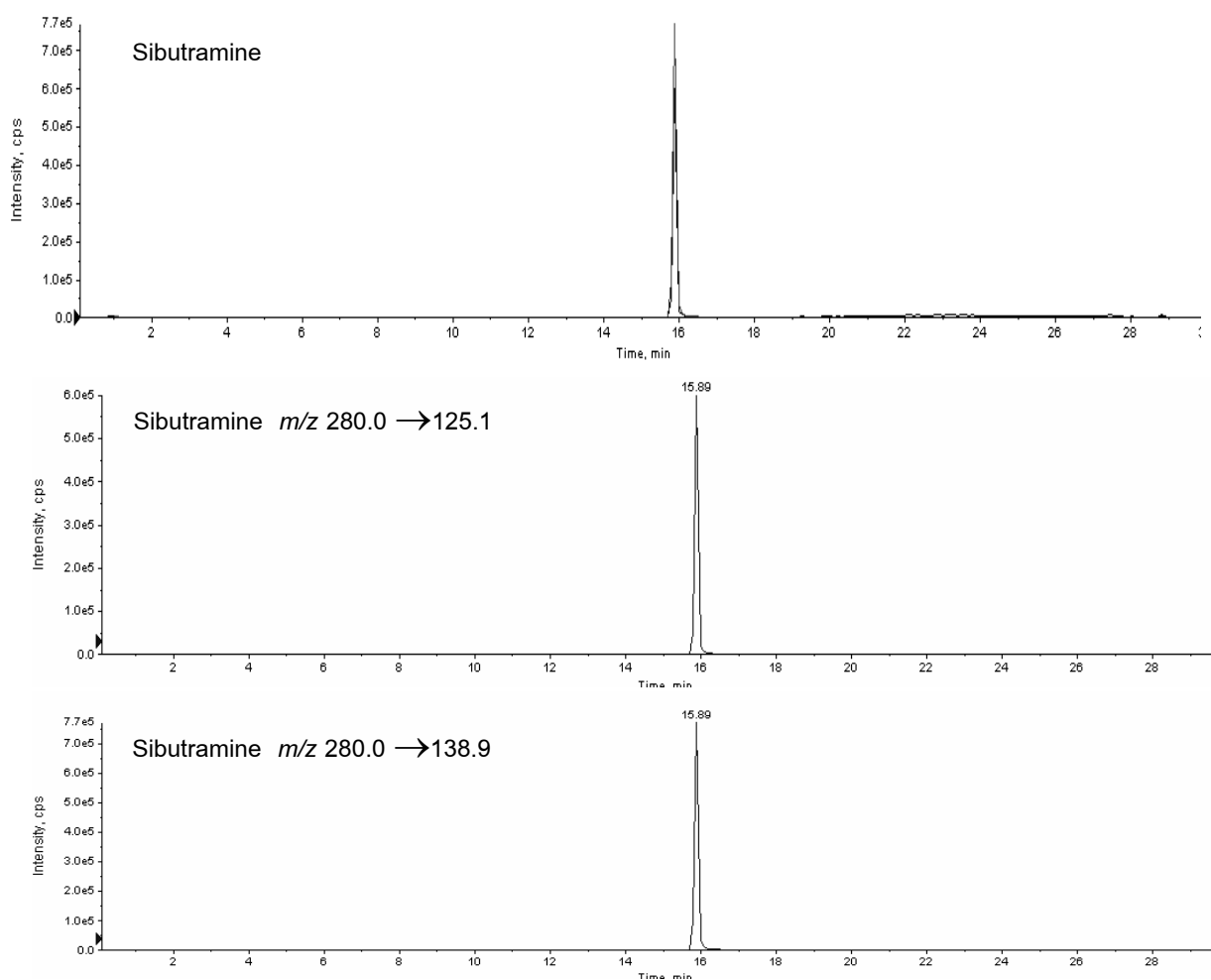
ได้นำวิธีที่พัฒนานี้ไปตรวจหาตัวยาแผนปัจจุบันในตัวอย่างจำนวน 49 ตัวอย่าง แบ่งเป็น สมุนไพรจำนวน 8 ตัวอย่าง ตรวจพบ dexamethasone 1 ตัวอย่าง ในสมุนไพรแก้ปวดเมื่อย ตรวจสอบผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่จำหน่ายในร้านขายยา จำนวน 29 ตัวอย่าง ตรวจพบ sibutramine 2 ตัวอย่าง (2 ยี่ห้อการค้า) ตรวจพบคาเฟอีน จำนวน 10 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างที่มีส่วนผสมของชาเขียว 7 ตัวอย่าง ไม่มีแหล่งที่มาของสารคาเฟอีน 3 ตัวอย่าง นอกจากนี้ตรวจหาการปนปลอมของยาเพิ่มสมรรถนะทางเพศ sildenafil ในกาแฟที่บริโภคเพื่อควบคุมน้ำหนัก 11 ตัวอย่าง ตรวจไม่พบตัวยา sildenafil ตรวจพบคาเฟอีนทุกตัวอย่าง และตรวจหาตัวยาในเครื่องดื่มโคล่า (สีน้ำตาล) จำนวน 1 ตัวอย่าง ตรวจไม่พบยา alprazolam และยาแก้ไอ dextromethophan ตาราง

ที่ 4 ลักษณะโครมาโทแกรมของยา sibutramine ที่ตรวจพบในผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร และ MRM ของยานี้จำนวน 2 คู่ รูปที่ 3 วิธีนี้สามารถตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณได้ถ้ามีตัวยามาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นสำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน วิธีที่พัฒนานี้จะใช้สำหรับการตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพ เพราะการปนปลอมของยาแผนปัจจุบันในผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ถือว่าเป็นอาหารที่ไม่บริสุทธิ์ตามมาตรา 25 (1) และ 26 (1) แห่งพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 มาตรา 4 สำหรับการปนปลอมของยาแผนปัจจุบันในสมุนไพรที่ใช้เป็นยา จัดเป็นยาปลอมตามมาตรา 73(1) และ (4) แห่งพระราชบัญญัติยา พ.ศ. 2510 ผู้ผลิตและจำหน่ายมีความผิดตามกฎหมายประเภ่นั้น

วิธีการตรวจวิเคราะห์หาการปนปลอมของยาแผนปัจจุบันในยาสมุนไพร และผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร โดยใช้ เทคนิค LC-MS/MS ชนิด MRM mode เป็นวิธีที่วิเคราะห์สารได้ในระดับต่ำ มีความจำเพาะเพราะสารแต่ละตัวมีมวลโมเลกุลและแบบการแตกตัวเป็นไอออนเฉพาะตัว และมีความไวในการตรวจหา สามารถวิเคราะห์ตัวยาได้หลายชนิดในเวลาเดียวกัน ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการคุ้มครองผู้บริโภค

ตารางที่ 4 ผลการตรวจสอบการปนปลอมของยาแผนโบราณในตัวอย่างสมุนไพรและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

ชนิดตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง		ประเภทยาที่พบ
	ตรวจ	ตรวจพบ	
สมุนไพรรักษาเบาหวาน	1	-	
สมุนไพรรักษาความดันโลหิต	1	-	
สมุนไพรบำรุงเลือด บำรุงหัวใจ	1	-	
สมุนไพรแก้ปวดเมื่อย แก้ปวดข้อ	1	1	พบ dexamethasone
สมุนไพรรักษาโรคปวดท้องกระเพาะ	1	-	
สมุนไพรรักษากระษัยเส้น	1	-	
สมุนไพรบำรุงเลือด แก้โลหิตจาง	2	-	
ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร	29	5	พบ sibutramine 2 ตัวอย่าง พบ คาเฟอีน 10 ตัวอย่างมาจากชาเขียว 7 ตัวอย่าง ไม่พบที่มา 3 ตัวอย่าง
กาแฟสำเร็จรูปสรรพคุณลดน้ำหนัก	11	-	พบ คาเฟอีนทุกตัวอย่าง ไม่พบ sildenafil
เครื่องดื่มโคล่า(สีน้ำตาล)	1	-	ไม่พบ alprazolam และ dextromethopan
รวม	49	6	



รูปที่ 3 โครมาโทแกรมของ sibutramine ที่ตรวจพบในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร แสดงโครมาโทแกรมของ MRM แต่ละคู่

เอกสารอ้างอิง

- เกษณา เตกาญจนวนิช. 2549. โรคอ้วน *วิชัยยุทธจุลสาร* 33: 27-33.
- ธีรธร มโนธรรม. 2551. กัยร้ายใหม่สี่คูณร้อย *วารสารอาหารและยา* 15(1): 24-27.
- นันทนา กลิ่นสุนทร. 2550. สถานการณ์การปนปลอมยาแผนปัจจุบันในยาแผนโบราณและสมุนไพร เขตสาธารณสุข 6,7 ข้อมูลแจ้งเตือนภัยปี 2550 ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์สมุทรสงคราม www.dmsc.moph.go.th/webroot/SamutSongkhram/alarm/new2.htm เข้าถึงข้อมูล 22 กันยายน 2551.
- นิรัตน์ เตียสุวรรณ. 2551. หมุนไปกับโลกผลิตภัณฑ์สุขภาพ *วารสารอาหารและยา* 15(2): 21.
- ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 293 พ.ศ. 2548 เรื่อง ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ราชกิจจานุเบกษาฉบับประกาศและงานทั่วไป เล่มที่ 122 ตอนพิเศษ 150 ลงวันที่ 28 ธันวาคม 2548.
- เพ็ญใจ วงศ์สุวรรณ บรรจง กิตติรัตน์ตระกูล. 2551. สถานการณ์การปนปลอมยาแผนโบราณในพื้นที่เขต 13 ศูนย์การแพทย์นครราชสีมา การประชุมวิชาการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ครั้งที่ 16 12-13 มิถุนายน 2551 ณ อาคารชาเลนเจอร์ อิมแพค เมืองทองธานี จ.นนทบุรี.
- สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. 2548. ยาแผนโบราณที่มีการปนปลอมด้วยยาแผนปัจจุบัน Sildenafil www.app1.fda.moph.go.th/drug/zone_counterfeit/ เข้าถึงข้อมูล 22 กันยายน 2551.
- ศุภลักษณ์ พริ้งเพระ, อมรพรรณ อุ่นชัย, กฤษฎา บุราณ และบรรลือ สังข์ทอง. 2546. การปนปลอมยาแผนปัจจุบันในยาแผนโบราณ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ขอนแก่น กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ประชุมวิชาการร่วมระหว่างหน่วยงานภายใต้กลุ่มภารกิจด้านสนับสนุนงานบริการสุขภาพ ครั้งที่ 1 วันที่ 1-2 พฤษภาคม 2546.
- รายงานประจำปีศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์สงขลา สเตอรอยด์ปนปลอมในยาแผนโบราณจากพื้นที่ 6 จังหวัดภาคใต้ webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_toxic/ เข้าถึงข้อมูล 22 กันยายน 2551.
- สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. 2550. ยาและวัตถุออกฤทธิ์ปนปลอมในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสำหรับควบคุมน้ำหนัก www.dmsc.moph.go.th/webroot/drug/km/supplement.swf เข้าถึงข้อมูลวันที่ 2 กรกฎาคม 2551.
- Bogusz MJ, Hassan H, Al-Enazi E, Ibrahim Z, Al-Tufail M. 2006. Application of LC-ESI-MS-MS for detection of synthetic adulterants in herbal remedies. *J Pharm Biomed Anal* 41: 554-564.
- Lau A-J, Holmes MJ, Woo S-O, Koh H-L. 2003. Analysis of adulterants in a traditional herbal medicinal product using liquid chromatography-mass spectrometry-mass spectrometry. *J pharm Biomed Anal* 31: 401-406.
- Liang Q, Qu J, Luo G, Wang Y. 2006. Rapid and reliable determination of illegal adulterant in herbal medicines and dietary supplement by LC/MS/MS. *J Pharm Biomed Anal* 40: 305-311.
- Liu SY, Woo SO, Koh HL. 2001. HPLC and GC-MS screening of Chinese proprietary medicine for undeclared therapeutic substances. *J Pharm Biomed Anal* 24: 983-992.
- Snyman T, Stewart MJ, Grove A, Steenkamp V. 2005. Adulteration of South African traditional herbal remedies. *Ther Drug Monit* 27: 86-89.
- Zou P, Oh SS-Y, Hou P, Low M-Y, Koh H-L. 2006. Simultaneous determination of synthetic phosphodiesterase-5 inhibitors found in a dietary supplement and pre-mixed bulk powders for dietary supplements using high-performance liquid chromatography with diode array detection and liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1104: 113-122.