

การพัฒนาวิธีและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจหาปริมาณยาในเลือดโดยเทคนิค Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) ตามแนวทางมาตรฐานสากล

Development and Validation of an LC-MS/MS Method for Drug Quantification in Blood in accordance with International Standards

ดร. ธนสิริ ยกเชื้อ

สถาบันนิติวิทยาศาสตร์

Dr. Tanasiri Yokchue

Central Institute of Forensic Science, Thailand

บทคัดย่อ

การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณของยาในเลือดเป็นเป้าหมายสำคัญในการตรวจวิเคราะห์ทางด้านนิติพิษวิทยาที่ใช้สนับสนุนการหาสาเหตุของการเสียชีวิตร่วมกับการตรวจทางพยาธิวิทยา เนื่องจากปริมาณยาและสารพิษที่ตรวจพบในเลือดนั้น เป็นปัจจัยสำคัญในการแปลผลการตรวจวิเคราะห์ทางนิติพิษวิทยา โดยการระบุสาเหตุของการเสียชีวิตที่เกี่ยวข้องกับการได้รับยาหรือสารพิษนั้น จำเป็นต้องทราบปริมาณของยาและสารพิษในเลือด ดังนั้น การตรวจหาปริมาณยาในเลือดจึงมีความจำเป็นอย่างมากสำหรับงานทางด้านนิติพิษวิทยา ซึ่งเทคนิคที่นิยมใช้ในการปริมาณยาในเลือดนั้น คือเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี-แทนเดมแมสสเปกโตรเมตรี เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะและความไวในการวัดสูง อย่างไรก็ตาม สมาคมนิติพิษวิทยาระดับสากล เช่น The International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT) ได้มีข้อแนะนำไว้ใน Laboratory Guidelines ว่าทุกวิธีการทดสอบที่นำมาใช้ในห้องปฏิบัติการนั้นต้องผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (validation) บทความนี้ได้เสนอแนวทางในการพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีตามแนวทางมาตรฐานสากล ในการตรวจหาปริมาณยาและเมแทบอไลต์ในเลือดโดยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีแทนเดมแมสสเปกโตรเมตรี (ทริปเปิลควอดรูโพล) ซึ่งสามารถตรวจหาปริมาณยา สารเสพติดและเมแทบอไลต์ในเลือดได้ 16 ชนิด

คำสำคัญ: การทดสอบความใช้ได้ของวิธี, การหาปริมาณยา, เลือด



Abstract

One of the most important objectives of forensic toxicological analysis is to assist in medico-legal death investigations. To determine the suspect's cause of death, forensic toxicologists need to quantitate the concentration of substance abuse in blood samples because the effects of drug abuse depend on the level of drug concentration in blood. The common technique used to quantitate abused drug and their metabolites in blood is liquid chromatography/tandem-mass spectrometry (LC/MS/MS) due to the high selectivity and sensitivity. However, The International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT) has a recommendation on "Laboratory Guidelines" that all methods must be validated before being employed as a routine method. These articles present the method development and validation in accordance with international standards for drug and metabolite quantitation in blood by liquid chromatography - tandem mass spectrometry (LC-Triple-quadrupole MS) which can quantitate 16 drugs and metabolites in one injection.

Keywords: Method validation, Quantitation, Blood

บทนำ

นิติพิษวิทยา (Forensic Toxicology) เป็นหนึ่งในหลายสาขาของนิติวิทยาศาสตร์ที่ใช้สนับสนุนกระบวนการยุติธรรม โดยการนำผลการตรวจพิสูจน์ที่ได้มาเป็นหนึ่งในพยานหลักฐานประกอบการพิจารณาคดีในชั้นศาลเพื่อหาตัวผู้กระทำความผิด เป้าหมายสำคัญในการตรวจวิเคราะห์ทางด้านนิติพิษวิทยาคือการตรวจพิสูจน์หาสารเสพติดในร่างกายของบุคคลที่ยังมีชีวิต และการตรวจพิสูจน์หายาและสารพิษในร่างกายของผู้เสียชีวิตเพื่อหาสาเหตุของการเสียชีวิตร่วมกับการตรวจทางนิติพยาธิวิทยา ตัวอย่างที่ใช้ตรวจพิสูจน์ทางนิติพิษวิทยาคือตัวอย่างชีววัตถุ เช่น เลือด ปัสสาวะ อาหารในกระเพาะ น้ำวุ้นลูกตา (Vitreous Humor) เนื้อตับ เนื้อไต เป็นต้น อย่างไรก็ตาม การตรวจที่มีความสำคัญที่สุดคือการตรวจหาปริมาณยาและสารพิษในเลือด ซึ่งมีความสำคัญในการแปลผลการตรวจวิเคราะห์ทางนิติพิษวิทยา

ยาและสารพิษที่ตรวจพบในเลือดนั้นสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ระดับคือ ระดับที่ใช้ในการรักษา (Therapeutic Level) ระดับที่ทำให้เกิดพิษ (Toxic Level) หรือระดับที่ทำให้เสียชีวิต (Lethal Dose)

การระบุสาเหตุของการเสียชีวิตที่เกี่ยวข้องกับการได้รับยาหรือสารพิษ เช่น การได้รับยาหรือสารพิษเกินขนาด หรือการเสียชีวิตจากผลของการได้รับยานั้น จำเป็นต้องทราบปริมาณยาและสารพิษในเลือดเนื่องจากผลของยา (Effect) ที่มีต่อร่างกายนั้นจะขึ้นอยู่กับปริมาณยาในกระแสเลือด การตรวจพบยาหรือสารพิษในระดับที่ทำให้เกิดพิษ หรือระดับที่ทำให้เสียชีวิตนั้น อาจเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เสียชีวิตได้ อย่างไรก็ตาม ปริมาณยาและสารพิษที่พบในเลือดในระดับที่ใช้รักษา ก็อาจจะเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตได้เช่นกัน ในกรณีที่มีการใช้ยาที่เสริมฤทธิ์กัน (Synergistic Interaction) ร่วมกัน เช่น การใช้ยาที่มีฤทธิ์กดระบบประสาทร่วมกับแอลกอฮอล์ ดังนั้นการตรวจหาปริมาณยาในเลือดจึงมีความจำเป็นอย่างมากสำหรับงานทางด้านนิติพิษวิทยา (Drummer, 2010)

สมาคมนิติพิษวิทยาระดับสากล (The International Association of Forensic Toxicologists; TIAFT) ได้มีข้อแนะนำไว้ใน Laboratory Guidelines และ The Society of Forensic Toxicologists (SOFT) ได้มีข้อแนะนำไว้ใน SOFT/AAFS Forensic Toxicology Laboratory Guidelines ว่าทุกวิธีการทดสอบที่นำมาใช้ในห้องปฏิบัติการนั้นต้องผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Method Validation) ก่อนที่จะนำมาใช้วิเคราะห์ตัวอย่างจริงและออกรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ โดยพารามิเตอร์ที่ใช้ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี เช่น ขีดจำกัดของการตรวจวัด ขีดจำกัดของการตรวจเชิงปริมาณ ความแม่นยำ หรือ ค่าความเป็นเส้นตรง เป็นต้นนั้น จะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ (TIAFT, 2014 และ SOFT, 2006)

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Method Validation)

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Method Validation) เป็นกระบวนการเพื่อพิสูจน์/ทดสอบความเหมาะสมของวิธีการวิเคราะห์ที่ศึกษา ก่อนนำไปใช้งานเพื่อให้เกิดความมั่นใจว่าวิธีการนั้นเชื่อถือได้ และสามารถใช้งานได้ตามวัตถุประสงค์ ถ้าวิธีการวิเคราะห์ที่ศึกษาเป็นวิธีที่ทำตามวิธีอ้างอิง (Reference Method) หรือวิธีมาตรฐาน (Standard Method) ซึ่งเป็นวิธีที่ผ่านการตรวจสอบความใช้ได้แล้วโดยไม่มี การเปลี่ยนแปลง การทดสอบจะทำการทวนสอบ (Method Verification) ตามพารามิเตอร์ที่กำหนด แต่ถ้าหากวิธีการวิเคราะห์ที่ศึกษาเป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นมาใหม่หรือดัดแปลงมาจากวิธีอ้างอิงจะต้องทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Validation) ก่อนนำไปใช้งาน เพื่อเป็นการยืนยันว่าวิธีการวิเคราะห์นั้น ให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความแม่นยำและยอมรับได้ วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณส่วนใหญ่ที่นิยมใช้ทางนิติพิษวิทยานั้นคือ LC-MS/MS ซึ่งต้องมีการตรวจสอบพารามิเตอร์สำหรับการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี อย่างน้อยคือ Selectivity, Linearity, Accuracy, Precision และ Lower Limit of Quantification (LLOQ) (Peters, 2006)

วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวิธีและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจหาปริมาณยาและเมแทบอไลต์ในเลือด 16 ชนิด ได้แก่ 7-Aminoflunitrazepam, 7-Aminonitrazepam, Alprazolam, Amphetamine, Clonazepam, Diazepam, Flunitrazepam, Ketamine, MDA, MDMA, Methadone, Methamphetamine, Nitrazepam, Nordiazepam, Oxazepam และ Temazepam ด้วยเทคนิค LC-MS/MS (Triple-quadrupole MS) เพื่อนำมาใช้ในการตรวจหาปริมาณยาในเลือดของห้องปฏิบัติการนิติเคมี สถาบันนิติวิทยาศาสตร์

ระเบียบวิธีวิจัย

1. พัฒนารูปแบบการตรวจวิเคราะห์ (Method Development) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณยาและเมแทบอไลต์ในเลือดของยาเสพติด เช่น Methamphetamine (ยาบ้า) และ Amphetamine (เมแทบอไลต์ของยาบ้า), MDMA (ยาอี) และ MDA (เมแทบอไลต์ของยาอี) และยานอนหลับกลุ่ม Benzodiazepines เช่น Diazepam และเมแทบอไลต์ (Nordiazepam และ Oxazepam) เป็นต้น

2. ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Method Validation) การตรวจหาปริมาณยาในเลือด โดยเทคนิค LC-MS/MS (Triple-Quadrupole MS) ตามแนวทางมาตรฐานสากล โดยทดสอบลักษณะต่างๆตามแนวทางของ The Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX, 2013) ประกอบด้วย

2.1 ความจำเพาะของวิธี (Selectivity and Specificity) เพื่อทดสอบว่าวิธีวิเคราะห์มีความสามารถในการตรวจวัดสารที่ต้องการตรวจวัดในตัวอย่างเลือด โดยปราศจากสิ่งรบกวน (Interference)

2.2 ขีดจำกัดของการตรวจวัด (Limit of Detection) เพื่อตรวจสอบปริมาณยาต่ำสุดที่วิธีวิเคราะห์นั้นสามารถตรวจพบได้

2.3 ขีดจำกัดของการตรวจเชิงปริมาณ (Lower Limit of Quantitation) เพื่อตรวจสอบปริมาณต่ำสุดของยาในเลือดที่สามารถวิเคราะห์และรายงานปริมาณได้

2.4 ความเป็นเส้นตรง (Linearity) เพื่อดูความสัมพันธ์ระหว่าง Corresponding Response กับปริมาณของสารที่ต้องการตรวจวัด

2.5 การทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงของวิธี (Accuracy และ Precision) เพื่อตรวจสอบค่า Random Error และ Systematic Error ของวิธีการวิเคราะห์

2.6 ผลกระทบจากเมทริกซ์ (Matrix Effect) เพื่อตรวจสอบผลกระทบของเมทริกซ์ (ในวิธีการวิเคราะห์นี้ คือ เลือด) ต่อการวิเคราะห์ปริมาณยา เช่น การลดหรือเพิ่มสัญญาณที่ได้จากเครื่องมืออันเนื่องมาจากขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างหรือชนิดของตัวอย่าง

ผลการวิจัย

1. การพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณยาและเมแทบอไลต์ในเลือด

จากการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณยาและเมแทบอไลต์ในเลือด 16 ชนิด โดยเทคนิค LC/MS/MS นั้น ทำให้ได้สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณยาและเมแทบอไลต์ในเลือด 16 ชนิดในครั้งเดียว โดยมีรายละเอียดสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ในส่วนของ Liquid Chromatograph ดังตารางที่ 1 และสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ในส่วนของ Dynamic MRM Parameter ดังตารางที่ 2 มีวิธีเตรียมตัวอย่างเลือดโดย นำเลือด 200 ไมโครลิตรเติม 2M Tris buffer (pH 9.0) 200 ไมโครลิตรแล้ว สกัดด้วย Butyl chloride 1 มิลลิลิตร แล้วละลายกลับด้วย 10% acetonitrile 1 มิลลิลิตร ใช้ Diazepam-d5, Methamphetamine-d5 และ MDMA-d5 เป็น Internal Standard

ตารางที่ 1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ในส่วนของ Liquid Chromatograph

การตั้งค่า	รายละเอียด																
Column	Poroshell 120 EC-18 (2.1x150 mm, 2.7 µm particle size)																
Guard column	Poroshell 120 EC-18 (2.1x5 mm, 2.7 µm particle size)																
Mobile phase	A: 10mM ammonium formate with 0.1% formic acid in water B: 0.1% formic acid in Acetonitrile																
Gradient program																	
	<table><tr><th>Time (min)</th><th>B (%)</th></tr><tr><td>0</td><td>5</td></tr><tr><td>1</td><td>5</td></tr><tr><td>8</td><td>95</td></tr><tr><td>10</td><td>95</td></tr><tr><td>10.05</td><td>5</td></tr><tr><td>Stop time</td><td>10.10 min</td></tr><tr><td>Post Run</td><td>2 min</td></tr></table>	Time (min)	B (%)	0	5	1	5	8	95	10	95	10.05	5	Stop time	10.10 min	Post Run	2 min
Time (min)	B (%)																
0	5																
1	5																
8	95																
10	95																
10.05	5																
Stop time	10.10 min																
Post Run	2 min																
Flow rate	0.4 mL/min																
Injection volume	10 µl																
Temperature	45 °C																



ตารางที่ 2 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ในส่วนของ Dynamic MRM Parameter

Compound Name	Precursor Ion	Product Ion	Fragment (V)	CE (V)	Ret Time (min)	Polarity
7-Aminoflunitrazepam	284	227	380	25	4.46	Positive
		148	380	30		
		135	380	33		
7-Amino-Nitrazepam	252	121	380	25	3.52	Positive
		94	380	50		
Alprazolam	309.7	282	380	25	5.7	Positive
		275	380	29		
		206	380	49		
Amphetamine	136	119	380	5	3.29	Positive
		91	380	17		
Clonazepam	316	270	380	25	5.7	Positive
		241	380	30		
		176	380	25		
Diazepam	285	223	380	30	6.53	Positive
		193	380	30		
		154	380	25		
Diazepam-d3	288	225	380	30	6.53	Positive
		157	380	30		
Flunitrazepam	314	268	380	29	5.96	Positive
		239	380	37		
		183	380	49		
Ketamine	238	207	380	15	3.71	Positive
		125	380	25		
		67	380	25		
MDA	180	163	380	9	3.37	Positive
		105	380	25		

*ตัวหนา คือ quantitative ion

ตารางที่ 2 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ในส่วนของ Dynamic MRM Parameter (ต่อ)

Compound Name	Precursor Ion	Product Ion	Fragment (V)	CE (V)	Ret Time (min)	Polarity
MDMA	194.2	163	380	9	3.48	Positive
		133	380	20		
		105	380	25		
MDMA-d5	199	165	380	10	3.48	Positive
		107	380	30		
Methadone	310	265	380	13	5.48	Positive
		105	380	29		
		57	380	20		
Methamphetamine	150	119	380	9	3.44	Positive
		91	380	17		
Methamphetamine-d5	155	121	380	17	3.44	Positive
		91	380	9		
Nitrazepam	282	236	380	30	5.58	Positive
		207	380	30		
		180	380	30		
Nordiazepam	271	208	380	30	5.98	Positive
		165	380	32		
		140	380	30		
Oxazepam	287	269	380	18	5.56	Positive
		241	380	35		
		127.9	380	20		
Temazepam	301	283	380	10	6.05	Positive
		255	380	17		

*ตัวหนา คือ quantitative ion

2. ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Method Validation)

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี จะทำการทดสอบค่าต่างๆ ได้แก่ Selectivity and Specificity, Linearity, LOD, LLOQ, Accuracy, Precision และ Matrix Effect โดยใช้ตัวอย่างเลือดเป็น Blank Matrix Samples มีรายละเอียดผลการทดสอบดังนี้

2.1 Selectivity and Specificity

Specificity ทำได้โดยการทดสอบเลือด (Blank Blood) ที่เติมด้วยยาที่ย่อยนอกขอบข่าย การทดสอบนี้ที่พบได้ทั่วไปทางนิติพิษวิทยา (Mixed Drugs) ที่ความเข้มข้น 10 µg/mL จำนวน 32 ชนิด เช่น Acetaminophen, Amitriptyline, Cathine, Codeine, Fentanyl, Lorazepam, JWH-1503-1 เป็นต้น ส่วนการทดสอบ Selectivity จากสารที่พบได้ในร่างกาย (Endogenous Compounds) นั้น ทำได้โดยการทดสอบวิเคราะห์เลือดจาก 10 แหล่ง ผลการทดสอบพบว่า ไม่พบสารที่รบกวนการวิเคราะห์ยา (Interference Peaks) ในตัวอย่างข้างต้น

2.2 Linearity

ช่วงของความเข้มข้นของ calibration curves นั้น ถูกกำหนดจากค่าความเข้มข้นที่ใช้ในการรักษา (Therapeutic Level) และค่าระดับที่ก่อให้เกิดพิษ (Toxic Level) ของยาแต่ละชนิด โดยได้แบ่งยาทั้ง 16 ชนิดออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่กลุ่ม A, B และ C โดยใช้ Calibration Curves ที่ 7 ความเข้มข้น และทำซ้ำทั้งหมด 8 ครั้งเพื่อทดสอบ Calibration Model รายละเอียดดังตารางที่ 3

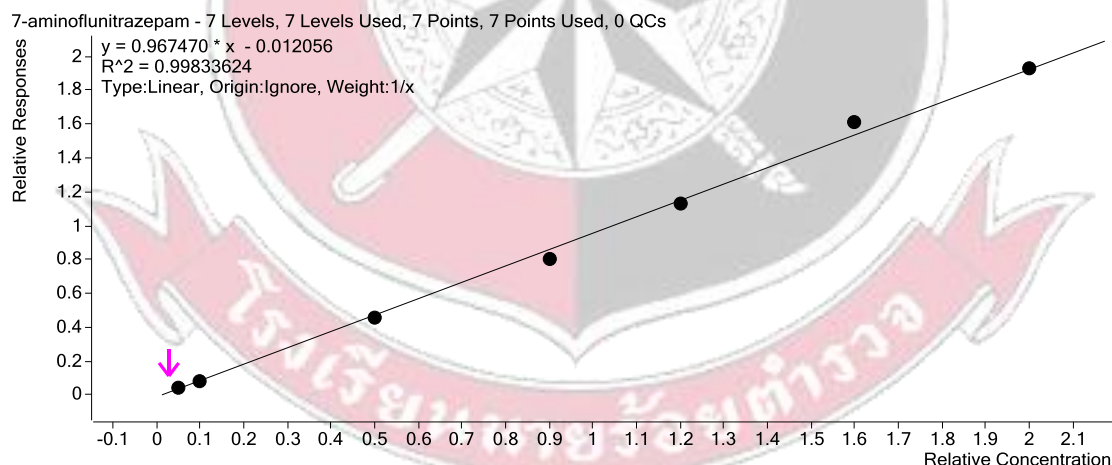
ตารางที่ 3 รายชื่อยา Therapeutic Concentration Range และค่าความเข้มข้นของ Calibration Curves และ QC แต่ละระดับ

Group	Reference standard	Therapeutic Conc. range (µg/ml)	Cal.1 µg/ml	Cal.2 µg/ml	Cal.3 µg/ml	Cal.4 µg/ml	Cal.5 µg/ml	Cal.6 µg/ml	Cal.7 µg/ml	QC-L µg/ml	QC-M µg/ml	QC-H µg/ml
A	Methamphetamine	0.01-0.05	0.005	0.01	0.05	0.09	0.12	0.16	0.2	0.015	0.1	0.18
	MDMA	0.1-0.35										
	Nitrazepam	0.03-0.07										
	7-Aminoflunitrazepam	0.005-0.015										
	Alprazolam	0.005-0.05										
	Flunitrazepam	0.005-0.015										
B	Amphetamine	0.02-0.15	0.01	0.1	0.25	0.5	0.6	0.8	1	0.065	0.5	0.9
	MDA	0-0.4										
	7-Aminonitrazepam	0.03-0.07										
	Methadone	0.07-0.1										
	Clonazepam	0.02-0.07										

ตารางที่ 3 รายชื่อยา Therapeutic Concentration Range และค่าความเข้มข้นของ Calibration Curves และ QC แต่ละระดับ (ต่อ)

Group	Reference standard	Therapeutic Conc. range (µg/ml)	Cal.1 µg/ml	Cal.2 µg/ml	Cal.3 µg/ml	Cal.4 µg/ml	Cal.5 µg/ml	Cal.6 µg/ml	Cal.7 µg/ml	QC-L µg/ml	QC-M µg/ml	QC-H µg/ml
C	Nordiazepam	0.2-1.8	0.025	0.25	0.5	1	2	3	4	0.2	2	4
	Diazepam	0.125-1.5										
	Oxazepam	0.15-2										
	Temazepam	0.3-0.9										
	Ketamine	0.5-6.5										

1/x และ 1/x² Calibration Model ถูกใช้ในการดูค่าความสัมพันธ์ จากการศึกษพบว่า ค่า Correlation Coefficient (R^2) ของยาทุกชนิดใน 8 ขั้วนั้น มีค่ามากกว่า 0.990 ยกเว้น Ketamine ในขั้วที่ 7 ที่มีค่า R^2 เท่ากับ 0.989 แต่อย่างไรก็ตาม ค่าดังกล่าวอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้



ภาพที่ 1 ตัวอย่าง Calibration curves group A ที่ความเข้มข้น 0.005-0.20 µg/mL ของการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ 7-Aminoflunitrazepam ด้วยเทคนิค LC/MS/MS

ตารางที่ 4 Regression Models, Correlation Coefficients (R^2) and LLOQs ของการตรวจวิเคราะห์ปริมาณยาในเลือดด้วยเทคนิค LC/MS/MS (วันที่ 2)

Analytes	Model	R^2	LLOQ*(ng/ml)
7-Aminoflunitrazepam	Linear	0.998	5
Alprazolam	Linear	0.996	5
Flunitrazepam	Linear	0.997	5
Methamphetamine	Linear	0.998	5
MDMA	Linear	0.997	5
Nitrazepam	Linear	0.996	5
7-Aminonitrazepam	Linear	0.998	10
Amphetamine	Quadratic	0.996	10
Clonazepam	Linear	0.997	10
MDA	Quadratic	0.995	10
Methadone	Linear	0.997	10
Diazepam	Quadratic	0.999	25
Ketamine	Linear	0.992	25
Nordiazepam	Linear	0.997	25
Oxazepam	Quadratic	0.999	25
Temazepam	Quadratic	0.998	25

2.3 Limit of Detection (LOD)

การทดสอบหาค่า LOD ทำโดยใช้ blank blood แล้วเติมด้วยสารมาตรฐานยาที่มีความเข้มข้นต่างๆ คือ ที่ 1, 2 และ 5 ng/mL แล้วทำการวิเคราะห์ซ้ำ 10 ครั้งโดยเทคนิค LC-MS/MS (dMRM) โดยที่ LOD ต้องมีค่า Signal-to-Noise Ratio (S/N) อย่างน้อยเท่ากับหรือมากกว่า 3 ($S/N \geq 3$) โดยมีผลการทดสอบดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 สรุปค่า LOD ของการตรวจวิเคราะห์ปริมาณยาในเลือดด้วยเทคนิค LC/MS/MS

Group	Compound Name	Calibration Range	LOD
A	7-aminoflunitrazepam	5 - 200 ng/mL	1 ng/mL
A	Alprazolam		1 ng/mL
A	Flunitrazepam		1 ng/mL
A	Methamphetamine		1 ng/mL
A	MDMA		1 ng/mL
A	Nitrazepam		1 ng/mL
B	7-Aminonitrazepam	10 - 1,000 ng/mL	1 ng/mL
B	Amphetamine		5 ng/mL
B	Clonazepam		2 ng/mL
B	MDA		1 ng/mL
B	Methadone		1 ng/mL
C	Diazepam	25 ng/mL - 4 ug/mL	5 ng/mL
C	Ketamine		1 ng/mL
C	Nordiazepam		1 ng/mL
C	Oxazepam		5 ng/mL
C	Temazepam		2 ng/mL

2.4 Lower Limit of Quantitation (LLOQ)

Lower Limit of Quantitation (LLOQ) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาในเลือดที่สามารถหาปริมาณได้โดยต้องมีค่า Accuracy และ Precision อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้คือ $\pm 20\%$ ซึ่งในการทดสอบนี้ ได้ใช้ความเข้มข้นต่ำสุดของ Calibration Curves เป็นค่า LLOQ ซึ่งค่าดังกล่าวนี้เพียงพอสำหรับการตรวจหาปริมาณยาในเลือดในระดับที่ใช้ในการรักษา ค่า Accuracy และ Precision ของ LLOQ จะแสดงในหัวข้อต่อไป

2.5 Accuracy และ Precision

จากการทดสอบค่า Accuracy และ Precision ของยาทั้ง 16 ชนิด 3 ความเข้มข้น พบว่าค่าที่ได้อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้คือน้อยกว่า $\pm 20\%$ โดยมีค่า %Bias อยู่ระหว่าง -13.75 ถึง 9.12 และค่า %RSD อยู่ระหว่าง 1.98 ถึง 7.54

สำหรับค่า Accuracy และ Precision ที่ LLOQ นั้นพบว่า ค่าที่ได้อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้คือน้อยกว่า $\pm 20\%$ โดยมีค่า %bias อยู่ระหว่าง -5.53 ถึง 5.81 และค่า %RSD อยู่ระหว่าง 0.19 ถึง 7.27 รายละเอียดดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผล Inter-day assay precision and accuracy ที่ LLOQ ของการตรวจวิเคราะห์ปริมาณยาในเลือดด้วยเทคนิค LC/MS/MS (n = 8)

Analyte	Expected Concentration, ng/ml	Observed Concentration, ng/ml	Accuracy (%Bias)	Precision (%RSD)
7-amino-flunitrazepam	5	5.24	4.71	2.94
Alprazolam	5	5.10	1.91	2.72
Flunitrazepam	5	5.29	5.81	5.03
MDMA	5	5.17	3.37	2.22
Methamphetamine	5	5.25	4.99	5.11
Nitrazepam	5	5.26	5.26	4.73
7-amino-nitrazepam	10	9.96	-0.38	0.48
Amphetamine	10	9.96	-0.45	0.28
Clonazepam	10	9.47	-5.35	6.35
MDA	10	9.96	-0.45	0.19
Methadone	10	10.34	3.41	7.27
Diazepam	25	25.00	-0.01	0.23
Ketamine	25	24.85	-0.62	0.20
Nordiazepam	25	25.56	2.26	5.77
Oxazepam	25	24.99	-0.05	0.22
Temazepam	25	25.08	0.31	0.20

2.6 Matrix Effect

Matrix effect ที่ให้ค่าน้อยกว่า 100% จะแสดงถึงการเกิด Ion Suppression ในขณะที่ค่ามากกว่า 100% จะบ่งชี้ถึงการเกิด Ion Enhancement ผลจากการทดสอบพบว่า Matrix ส่งผลเล็กน้อยต่อการกำเนิดประจุ (Ionization) โดยมีค่าระหว่าง 98.70% – 105.08% ที่ความเข้มข้นต่ำ (50 ng/mL) และมีค่าระหว่าง 97.55% – 105.53% ที่ความเข้มข้นสูง (500 ng/mL) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ คือ %Ionization Suppression/Enhancement ต้องมีค่าน้อยกว่า $\pm 25\%$

สรุปและอภิปรายผล

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจพิสูจน์และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจหาปริมาณยาและเมแทบอไลต์ในเลือด 16 ชนิด ได้แก่ 7-Aminoflunitrazepam, 7-Amino-Nitrazepam, Alprazolam, Amphetamine, Clonazepam, Diazepam, Flunitrazepam, Ketamine, DA, MDMA, Methadone, Methamphetamine, Nitrazepam, Nordiazepam, Oxazepam และ Temazepam โดยเทคนิค LC/MS/MS (Triple-Quadrupole MS) เพื่อให้สามารถตรวจหาปริมาณยาและเมแทบอไลต์ในเลือดที่ระดับที่ใช้ในการรักษาได้ โดยสามารถสรุปภาพรวมของผลการวิจัยดังนี้

1. วิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมานี้ สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการตรวจหาสาเหตุของการเสียชีวิตที่เกิดจากการใช้ยาเกินขนาดหรือการใช้ยาผิดประเภท เพื่อใช้เป็นหลักฐานประกอบในการพิจารณาคดี เนื่องจากการตรวจวิเคราะห์จะสามารถบอกปริมาณยาที่พบในเลือดได้ต่ำถึงระดับที่ใช้ในการรักษา ทำให้สามารถระบุได้ว่าปริมาณยาที่ตรวจพบในเลือดนั้นอยู่ในระดับที่ใช้ในการรักษาหรืออยู่ในระดับที่ก่อให้เกิดพิษแก่ร่างกาย และเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตได้หรือไม่

2. วิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมานี้สามารถนำมาใช้ในการตรวจหาปริมาณยาและเมแทบอไลต์ในเลือดได้ โดยวิธีตรวจที่พัฒนาขึ้นมานี้สามารถแก้ปัญหาในกรณีที่ตัวอย่างมีปริมาณจำกัดได้เนื่องจากวิธีนี้ใช้เลือดเพียง 200 ไมโครลิตร ซึ่งจะช่วยแก้ปัญหากรณีที่ตัวอย่างที่ส่งตรวจพิสูจน์มีปริมาณจำกัด นอกจากนี้ปัจจุบันห้องปฏิบัติการทางนิติพิษวิทยาส่วนใหญ่ในประเทศไทยยังไม่สามารถตรวจหาปริมาณยาและสารพิษในเลือดได้ พบว่ามีเพียงห้องปฏิบัติการไม่กี่แห่งที่มีความสามารถในการตรวจเชิงปริมาณเนื่องจากข้อจำกัดด้านเครื่องมือ สารมาตรฐาน และองค์ความรู้ของบุคลากร การวิจัยนี้จึงเป็นการเพิ่มขีดความสามารถในการตรวจวิเคราะห์ทางนิติพิษวิทยาของสถาบันนิติวิทยาศาสตร์ให้มีมาตรฐานเทียบเท่าในระดับสากล



3. จากผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Method Validation) นั้นพบว่าวิธีการทดสอบนี้มีความถูกต้องและแม่นยำในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณยาในเลือดทั้ง 16 ชนิด โดยวิธีการที่พัฒนาขึ้นมาี้มีความจำเพาะ (Selectivity) ในการตรวจแยกสารที่ต้องการวิเคราะห์ มีค่า Linearity, Accuracy, Precision และ Matrix Effect อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ มีค่า LOD อยู่ในช่วง 1-5 ng/mL และมีค่า LLOQ อยู่ในช่วง 5-25 ng/mL ซึ่งครอบคลุมระดับที่ใช้ในการรักษา ดังนั้น วิธีการทดสอบนี้มีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณยาในเลือดและรายงานผลการวิเคราะห์ได้

เอกสารอ้างอิง

- Drummer, O. (2010). Forensic toxicology. In Luch, A. (Ed.). **Molecular, Clinical and Environmental Toxicology**.100: 579-603.
- Peters, F. T. (2006). Method Validation using LC/MS. In Polettini, A. (Ed.), **Application of LC-MS in Toxicology**.71-96.
- 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): 452-474.
- TIAFT (2014). **Laboratory Guidelines**. Retrieved March 12, 2018. from <http://www.tiaft.org/data/uploads/documents/tiaft-sta-laboratory-guidelines.pdf>.

ผู้เขียน

คำนำหน้า ชื่อ-สกุล

หน่วยงาน/สังกัด

ที่อยู่ของหน่วยงาน

E-mail:

ดร.ธนสิริ ยกเชื้อ

กลุ่มตรวจพิสูจน์ทางเคมี กองตรวจพิสูจน์ทางวิทยาศาสตร์

สถาบันนิติวิทยาศาสตร์ กระทรวงยุติธรรม

499 อาคารสุขประพฤติ (ชั้น 16) ถ.ประชาชื่น

แขวง/เขตบางซื่อ กรุงเทพฯ 10800

eevy15@yahoo.com