# การพัฒนาวิธีการตรวจหาสารไมตราไจนีนในปัสสาวะของมนุษย์โดยใช้เทคนิคโครมาโทรกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

(Determination of mitragynine in human urine
by High performance Liquid Chromatographic Method (HPLC))

โดย

นางสาวธิดารัตน์ ประทุมวรรณ
นางสาวมุทิตา ไชยธาดา
นายราชนรินทร์ รุ่งกระจ่าง

กลุ่มงานเวชศาสตร์สารเสพติด
ภารกิจด้านวิชาการและการแพทย์

โรงพยาบาลธัญญารักษ์สงขลา กรมการแพทย์

**ชื่อวิจัย** **การพัฒนาวิธีการตรวจหาสารไมทราไจนีนในปัสสาวะของมนุษย์โดยใช้เทคนิคโครมาโทรกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง**

**ชื่อผู้วิจัย** **นางสาวธิดารัตน์ ประทุมวรรณ, นางสาวมุทิตา ไชยธาดา, นายราชนรินทร์ รุ่งกระจ่าง**

**อาจารย์ที่ปรึกษา** **รองศาสตราจารย์ ดร. จุไรทิพย์ หวังสินทวีกุล**

## บทคัดย่อ

กระท่อม เป็นพืชที่พบได้ในเขตร้อนและกึ่งร้อนของภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะภาคใต้ของประเทศไทยและมาเลเซีย มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Mitragyna speciosa*.อยู่ในวงศ์เข็มและกาแฟ (Rubiaceae) สารออกฤทธิ์ที่สำคัญของใบกระท่อม คือ ไมทราไจนีน (Mitragynine) ซึ่งอยู่ในกลุ่มอัลคาลอยด์ งานวิจัยนี้ทำการศึกษาหาปริมาณสารไมทราไจนีนในปัสสาวะของผู้ใช้กระท่อมด้วยเทคนิค ultra-high performance Liquid Chromatography - tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) โดยใช้คอลัมน์ชนิด Shimadzu Shim-pack GIST-HP C18 ขนาด 150×3.0×3 มิลลิเมตร สารละลายตัวพาประกอบด้วย เมทานอลและสารละลายผสมระหว่างแอมโมเนียม อะซิเตตและกรดฟอร์มิก อัตราการไหลของสารละลายตัวพา 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ค่า Retention time เท่ากับ 2.98 นาที การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์พบว่าค่า Linearity ระหว่างความเข้มข้นของสารไมทราไจนีนกับพื้นที่ใต้ peak เป็นเส้นตรง ในช่วงความเข้มข้น 0.078-25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ($R^2$) เท่ากับ 0.9998 Recovery อยู่ในช่วง 92.4 -101.3 ค่าความเที่ยงของเครื่องมือที่ใช้และของวิธีวิเคราะห์ในการวิเคราะห์วันเดียวกัน (intra-day) อยู่ในช่วง 1.11-1.84% และในการวิเคราะห์ต่างวันกัน (inter-day) อยู่ในช่วง 1.71-2.36% และมีค่าร้อยละการกลับคืนมาของสารไมทราไจนีนอยู่ในช่วง 92.4-101.3 % ขีดจำกัดของการตรวจพบของเครื่อง (Limit of detection, LOD) เท่ากับ 0.395 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ขีดจำกัดของการตรวจวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ) เท่ากับ 1.196 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีอยู่ในเกณฑ์ยอมรับสามารถนำไปใช้วิเคราะห์หาปริมาณของสารไมทราไจนีนในปัสสาวะของผู้ใช้กระท่อมได้

**คำสำคัญ** ไมทราไจนีน, กระท่อม, โครมาโทรกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง, ปัสสาวะ

**Research Title** Determination of mitragynine in human urine by High performance Liquid Chromatographic Method (HPLC)

**Researchers** Thidarat Prathumwan, Muthita Chaitada, Rachnarin Rungkrachang

**Advisor** Assoc. Prof. Dr. Juraithip Wungsintaweekul

**Abstract**

Mitragynine is an indole alkaloid extracted from the leaves of *Mitragyna speciosa* Korth (Rubiaceae).It is a native tree indigenous to Southeast Asia, especially in Thailand and Malaysia (also known as “Kratom” in Thailand, as “ketum” or “biak-biak” in Malaysia). The aim of this study was to determine the quantitative of mitragynine in human urine by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). HPLC separation was achieved in 2.98 min with a Shimadzu Shim-pack GIST-HP C18 column heatded to 40°C (150 mm × 3.0 mm.; D 3 µm.) using gradient program. It used mobile phase A, consisting of methanol, and mobile phase B, consisting of 10mM ammonium acetate containing 10% formic acid, at a flow rate of 0.5 mL/min. The method was found linear in the range of 0.078-25 ng/mL. In the linearity study, good regression equation and correlation coeffient of 99.98 %. The intra- and inter-day precision of method were 1.11-1.84%CV and 1.71-2.36%CV, respectively. The limit of detection was 0.395 ng/mL. and lower limit of qualification was 1.196 ng/mL. This method was successfully applied to determine the quantitative of mitragynine in the abusers’urine

**Keywords** Mitragynine, Kratom, High performance liquid chromatography, Urine

# สารบัญ


| | หน้า |
|---|---|
| สารบัญ | 4 |
| สารบัญตาราง | 5 |
| สารบัญรูปภาพ | 6 |
| บทที่ 1 บทนำ | |
| ความสำคัญและที่มาของโครงการ | 7 |
| วัตถุประสงค์การวิจัย | 8 |
| สมมุติฐาน | 8 |
| ปัจจัยและตัวแปรที่ศึกษา | 8 |
| ขอบเขตการศึกษา | 8 |
| ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ | 8 |
| บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง | |
| พืชกระท่อม (Kratom) | 9 |
| เทคนิคโครมาโทกราฟี่ของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) | 13 |
| การตรวจวิเคราะห์พืชกระท่อมและสารไมทราไจนีน | 23 |
| การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ | 24 |
| งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง | 27 |
| บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย | 30 |
| บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล | 36 |
| บทที่ 5 สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ | 42 |
| บรรณานุกรม | 44 |

# สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 คุณสมบัติของตัวตรวจวัดชนิดต่าง ๆ 16

ตารางที่ 2 ผลการศึกษากราฟมาตรฐานในช่วงความเข้มข้น 36
ของสารไมทราไจนีน 0.0781 – 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 3 ค่าความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ภายในวันและระหว่างวัน 37

ตารางที่ 4 ค่าความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ภายในวันและระหว่างวัน 38

ตารางที่ 5 ค่า %Recovery ของการสกัดสารไมทราไจนีน 39
ที่ความเข้มข้น 0.391, 1.0, 1.5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 6 ปริมาณสารไมทราไจนีนในปัสสาวะ 40
ของกลุ่มตัวอย่าง Chronic Kratom Abuse

# สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 ลักษณะของพืชกระท่อม 10
รูปที่ 2 ตัวอย่างโรงสร้าง Alkaloid ที่พบในพืชกระท่อม 11
รูปที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของ Mitragynine 11
รูปที่ 4 การทำงานของเครื่อง HPLC 14
รูปที่ 5 ไดอะแกรมของ Quadrupole analyzer 19
รูปที่ 6 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐาน 21
เปรียบเทียบกับสารละลายตัวอย่าง
รูปที่ 7 กราฟมาตรฐานสำหรับการหาปริมาณสารเมื่อใช้สารมาตรฐานภายนอก 22
รูปที่ 8 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐาน 22
เปรียบเทียบกับสารละลายตัวอย่าง
รูปที่ 9 กราฟมาตรฐานสำหรับการหาปริมาณสารเมื่อใช้สารมาตรฐานภายนใน 23
รูปที่ 10 ช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานเฉลี่ย (n=10) ที่ความ 37
เข้มข้นของสารไมทราไจนีน 0.0781 – 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร
รูปที่ 11 กราฟ spike urine sample blank ที่ 10 ระดับความเข้มข้น 39
รูปที่ 12 การแบ่งกลุ่มของปริมาณสารไมทราไจนีนที่ 41
ตรวจพบในกลุ่มตัวอย่าง Chronic Kratom Abuse

# บทที่ 1

# บทนำ

**ความสำคัญและที่มาของโครงการ**

ปัญหายาเสพติดถือว่าปัญหาที่รุนแรงและเป็นภัยต่อประเทศเป็นอย่างมาก ก่อให้เกิดปัญหาทางสังคมขึ้นมากมาย เช่น ปัญหาอาชญากรรม ปัญหาเยาวชนติดยาเสพติด เป็นต้น นอกจากนี้ยาเสพติดยังเป็นภัยร้ายแรงต่อสุขภาพจิตและสุขภาพกาย ทำให้สุขภาพทรุดโทรมอ่อนแอ ความจำเสื่อมเสีย บุคลิกภาพ และส่งผลกระทบต่อสังคม เศรษฐกิจ บั่นทอนความเจริญของประเทศชาติ ถึงแม้ว่ารัฐบาลได้ให้ความสำคัญกับการแก้ไขปัญหายาเสพติดแต่ปัญหาก็ยังคงมีอยู่อย่างต่อเนื่อง

โดยเฉพาะภาคใต้ของประเทศไทย แม้ว่ากระท่อมจะถูกยกเลิกจากบัญชียาเสพติดให้โทษประเภทที่ 5 แล้วก็ตามที แต่การนำกระท่อมไปใช้เชิงสารเสพติด เช่น การนำใบกระท่อมมาเป็นสารตั้งต้นสำคัญของยาเสพติด “สี่คูณร้อย”ก็ยังคงมีโทษอยู่ จากข้อมูลการเข้ารับบำบัดกระท่อมในโรงพยาบาลธัญญารักษ์สงขลา ช่วงปี 2555-2559 พบร้อยละ 5.60, 6.86, 7.15, 11.92 และ 9.57 ตามลำดับ (ข้อมูลสถิติผู้ป่วยยาเสพติดแยกตามประเภทสารเสพติด โรงพยาบาลธัญญารักษ์สงขลา. 2560) มีแนวโน้มการใช้กระท่อมเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับในหลายประเทศทั่วโลก เฉพาะอย่างยิ่งในยุโรปและสหรัฐอเมริกาที่มีแนวโน้มการใช้กระท่อมเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน โดยสำนักงานความร่วมมือด้านยาเสพติดและอาชญากรรมแห่งสหประชาชาติ (UNODC) และศูนย์เฝ้าระวังยาและยาเสพติดแห่งยุโรป (EMCDDA) จัดให้กระท่อมเป็น New psychoactive substances (NPSs) คือ กลุ่มของสารประกอบที่ถูกนำมาใช้ให้มีผลคล้ายสารเสพติด แต่ยังไม่ได้รับการควบคุมทางกฎหมาย จึงต้องมีเฝ้าระวังการใช้เพิ่มมากขึ้น

การตรวจทดสอบสารเสพติดในปัสสาวะ แบ่งได้เป็น 2 วิธี คือ การทดสอบสารเสพติดเบื้องต้น หรือการตรวจคัดกรอง (Screening test) และการทดสอบยืนยัน (Confirmation test) ซึ่งการตรวจทดสอบเบื้องต้นในสารเสพติดมักใช้เทคนิค Immunoassay method เป็นการคัดแยกตัวอย่างปัสสาวะที่ให้ผลบวก คือมีความเป็นไปได้ว่ามีสารเสพติดชนิดนั้น ๆ ผสมอยู่ออกจากตัวอย่างที่ไม่มีสารเสพติด ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกสามารถคัดแยกตัวอย่างจำนวนมาก ได้ในระยะเวลาสั้นๆ และราคาถูก แต่จะไม่สามารถยืนยันความถูกต้องมีการใช้ยาเสพติดในบุคคลนั้น ๆ ได้หรือไม่จนกว่าจะมีการตรวจยืนยันความถูกต้องจากการตรวจทดสอบยืนยัน สำหรับการตรวจทดสอบพืชกระท่อมในปัสสาวะในประเทศไทยนั้น ยังไม่มีการนำชุดตรวจเบื้องต้นมาใช้งานในห้องปฏิบัติการ เทคนิค-การแพทย์ การตรวจวิเคราะห์ยังคงใช้วิธีการทดสอบแบบยืนยันด้วยเทคนิคโทรมาโทกราฟีชนิดต่าง ๆ เช่น แก๊สโครมาโตกราฟี (GC) หรือ โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) และส่วนใหญ่ยังเป็นการใช้งานเชิงวิจัยเพื่อศึกษาในด้าน Pharmacokinetics Pharmacology Toxicology หรือการตรวจเอกลักษณ์ สารสำคัญในใบกระท่อม ส่วนการศึกษาเพื่อหาหรือตรวจวัดปริมาณสารเมตาบอไลท์ในปัสสาวะของผู้ใช้กระท่อมนั้นยังคงมีน้อยอยู่

ด้วยเหตุผลข้างต้นผู้วิจัยจึงสนในนำเทคนิค HPLC มาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารไมทราไจนีนในปัสสาวะของมนุษย์ในผู้ใช้กระท่อมเรื้อรัง โดยการศึกษามีวัตถุประสงค์ คือ พัฒนาวิธี

วิเคราะห์หาปริมาณสารไมทราไจนีนในปัสสาวะของมนุษย์ รวมทั้งตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีในพารามิเตอร์ต่างๆ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจยืนยันการเสพกระท่อมในผู้ป่วยที่เข้ารับการบำบัดในสถานพยาบาล หรือเป็นแนวทางการตรวจหาปริมาณสารไมทราไจนีนในสารชีวภาพ รวมทั้งนำไปใช้ในประโยชน์ทางการแพทย์ ด้านนิติวิทยาศาสตร์หรือประโยชน์ทางด้านงานวิจัยอื่นๆ

**วัตถุประสงค์การวิจัย**

1) เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารไมทราไจนีนในปัสสาวะของมนุษย์ในผู้ใช้กระท่อมเรื้อรังโดยวิธี HPLC
2) เพื่อตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์สำหรับหาปริมาณสารไมทราไจนีนในปัสสาวะของผู้ใช้กระท่อมเรื้อรัง โดยเทคนิค HPLC

**สมมุติฐาน**

วิธีที่นำมาใช้สามารถวิเคราะห์หาปริมาณสารไมทราไจนีนในปัสสาวะของผู้ใช้กระท่อมเรื้อรังได้ และเป็นไปตามมาตรฐาน AOAC guideline

**ปัจจัยและตัวแปรที่ศึกษา**

ตัวแปรอิสระ : วิธีการวิเคราะห์สารไมทราไจนีน
ตัวแปรตาม : ปริมาณสารไมทราไจนีน และ Method validation parameter

**ขอบเขตของโครงการวิจัย**

การวิจัยครั้งนี้เป็นงานวิจัยเชิงทดลองมุ่งศึกษาการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารไมทราไจนีนในปัสสาวะของผู้ใช้กระท่อมเรื้อรัง จำนวน 30 คน ด้วยเทคนิคโครมาโทรกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ใช้ ไมทราไจนีนเป็นสารมาตรฐานควบคุมภายใน ตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นตามเกณฑ์การยอมรับของ AOAC guideline

**ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ**

1) ได้วิธีวิเคราะห์ระดับสารไมทราไจนีนในปัสสาวะของผู้ใช้กระท่อมเรื้อรังที่เป็นไปตามเกณฑ์ยอมรับของ AOAC guideline

2) ได้องค์ความรู้เกี่ยวกับการตรวจหาปริมาณสารไมทราไจนีนในปัสสาวะของคนที่ใช้กระท่อมเรื้อรัง

3) เป็นแนวทางการตรวจหาปริมาณสารไมทราไจนีนในสารชีวภาพ รวมทั้งนำไปใช้ในประโยชน์ทางการแพทย์ หรือประโยชน์ทางด้านงานวิจัยอื่นๆ

# บทที่ 2

# เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

## 1. พืชกระท่อม

### 1.1. ความเป็นมาการใช้พืชกระท่อม

กระท่อม (Kratom) เป็นไม้ผลัดใบเขตร้อนซึ่งจัดอยู่ในตระกูล Rubiaceae (ตระกูลเดียวกับกาแฟ) พืชกระท่อมถูกใช้เพื่อวัตถุประสงค์ในการรักษาโรคและความบันเทิงมาเป็นเวลานาน ในประเทศไทยมีหลักฐานการใช้ประโยชน์มาตั้งแต่สมัยอยุธยา ดังที่บันทึกไว้ในเสภาขุนข้างขุนแผนตอนที่ 27 กล่าวถึงการกินกระท่อม ทำให้มีแรง สู้งาน ออกศึกได้นัก [2,5,6,7,9]

ส่วนการใช้กระท่อมในวิถีพื้นบ้านนั้น นิยมเคี้ยวกระท่อมเป็นยาชูกำลัง ทำให้ทนต่องานกลางแจ้ง ทนร้อน ทนแดดและทำให้หลับสบาย ในภาคใต้พืชกระท่อมนับว่าเป็นส่วนหนึ่งของวิถีชีวิตของคนในภาค ซึ่งฝังรากลึกลงในขนบธรรมเนียมประเพณีต่าง ๆ ได้แก่ พิธีกรรมท้องถิ่น ศิลปะการแสดงทางวัฒนธรรม ร้านน้ำชา และรวมถึงการทำการเกษตรและการใช้แรงงาน เช่น การทำสวนยางพาราและการออกหาปลาในทะเล

กระท่อมจัดเป็นยารสฝาด มีฤทธิ์จำพวกสมาน คุมธาตุ แก้ท้องร่วง ท้องเสีย แก้บิด มูกเลือด ตำรับยาไทยหลายขนานก็มีกระท่อมเป็นส่วนประกอบ การใช้กระท่อมปรากฏในตำราการแพทย์แผนไทยในรูปแบบยาตำรับที่แก้อาการบิด แก้ท้องเสีย รักษาเบาหวาน ใช้แก้โรคผิวหนัง เริม งูสวัด แก้ปวดเมื่อย แม้บางครั้งการใช้กระท่อมมีโอกาสติด ไม่ได้กินจะไม่มีแรงทำงาน ปวดกระดูก กระวนกระวาย หาวนอน แต่ชาวบ้านยืนยันว่าเลิกกระท่อมนั้นเลิกง่ายกว่าเลิกเหล้าเลิกบุหรี่หลายเท่านัก [2,5,6,7,9]

ปกติชาวบ้านจะใช้ใบกระท่อมในรูปแบบดั้งเดิม คือ ใช้ใบพืชกระท่อมแห้ง/บดเป็นผงต้มเป็นชา หรือเคี้ยวใบสด แต่หลายปีที่ผ่านมาได้มีการนำกระท่อมมาใช้เป็นสารเสพติดโดยวิธีการนำใบกระท่อมไปผสมกับยา หรือสารเสพติดอื่น ๆ เช่น 4*100 [2,5,6,7,9]

### 1.2. <u>ลักษณะทางพฤกษศาสตร์</u>

กระท่อม มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Mitragyna speciosa (Korth.) Havil. เป็นพืชในวงศ์เข็มและกาแฟ (Rubiaceae)* พืชเขตร้อน พบมากในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะประเทศมาเลเซียและในประเทศไทย [1,2,3,4,7] ลักษณะเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง ประมาณ 15–30 ม. มีใบเดี่ยว เรียงตรงกันข้าม รูปไข่แกมขอบขนาน กว้าง 6–9 ซม. ยาว 10–15 ซม. หูใบรูปใบหอกอยู่ระหว่างก้านใบ (interpetiolar stipule) ดอกเป็นชนิดสมบูรณ์เพศ สีขาวอมเหลือง ดอกช่อออกที่ปลายกิ่ง ช่อย่อยรูปทรงกลมคล้ายดอกกระถิน ดอกย่อยเมื่อแรกบานสีขาวนวลแล้วเปลี่ยนเป็นสีเหลืองแกมน้ำตาล ผลสดรูปทรงกลมภายในผลย่อยมีเมล็ดอัดแน่น เมล็ดมีลักษณะแบน (flat seed) เติบโตได้ดีในที่ชุ่มชื้น

ดินอุดมสมบูรณ์ และมีแสงแดดปานกลาง ที่พบในประเทศไทยมีอยู่ 3 พันธุ์ คือ แตงกวา (ก้านเขียว)ยักษาใหญ่ (รูปใบใหญ่) และก้านแดง [1,3,7,8]

**ชื่ออื่น** อีถ่าง ภาคใต้เรียกว่า ท่อม ภาคอีสานเรียกว่า กระทุ่มโคก ประเทศมาเลเซียเรียกว่า เบี๊ยะ (Biak) หรือ เคอตุ่ม (Ketum) [1,2,4,7,8]

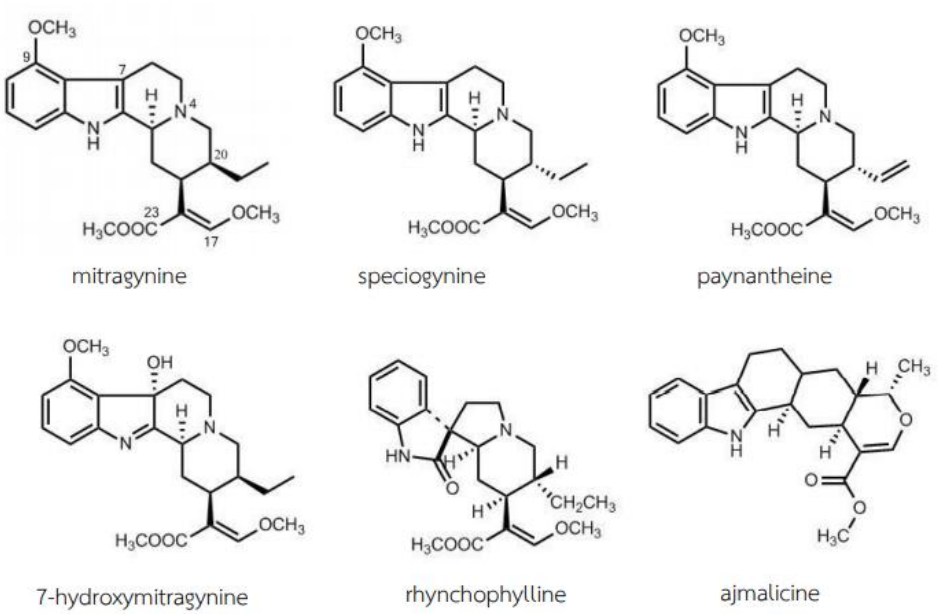
รูปที่ 1 แสดงลักษณะของพืชกระท่อม

## 1.3 สารสำคัญที่พบในพืชกระท่อม

สารที่พบในใบกระท่อมเป็นสารพวกอัลคาลอยด์ ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ต่อจิตประสาท ในใบกระท่อมประกอบด้วยอัลคาลอยด์ทั้งหมดประมาณร้อยละ 0.5 ในจำนวนนี้ส่วนใหญ่เป็นไมทราไจนีน (Mitragynine) ที่เหลือเป็น Speciogynine, Paynanthine, Speciociliatin ตามลำดับ ซึ่งชนิดและปริมาณอัลคาลอยด์ที่พบแตกต่างกัน ตามสถานที่ และเวลาที่เก็บเกี่ยว และอายุของต้น ซึ่งอายุแก่กว่าจะพบในปริมาณที่มากกว่า แบ่งตามสูตรโครงสร้างได้สารประกอบ 4 ประเภท คือ [1,2,4,6,7,24]

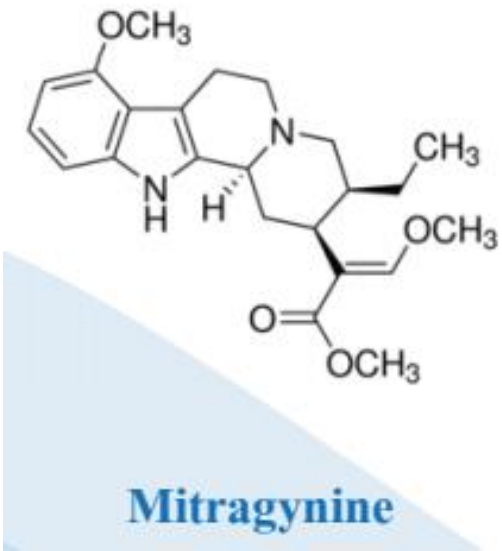
1) อินโดลแอลคะลอยด์ (Indole Alkaloids)
2) ออกอินโดลแอลคะลอยด์ (Oxindole Alkaloids)
3) ฟลาวานอยด์ (Elavanoids)
4) กลุ่มอื่น ๆ เช่น ไฟโตสเตอรอล (Phytosterol), แทนนิน (Tannins)

สารเคมีออกฤทธิ์ในพืชกระท่อมที่สำคัญ ได้แกสารเคมี ในกลุ่ม indole 2 ชนิดได้แก่ mitragynine และ 7-hydroxymitragynine โดยที่ mitragynine พบเปนปริมาณมากที่สุดในใบกระทอมพบร่อยละ 66.2 ซึ่งออกฤทธิ์กระตุ้นประสาทและพบ7-hydroxymitragynine ซึ่งมีปริมาณเพียงร่อยละ 2 ในใบกระทอม เปนสารประกอบที่มีผลต่ออาการและการเกิดพิษต่าง ๆ โดย ออกฤทธิ์ตอระบบประสาทสวนกลางบริเวณตัวรับโอพิออยด (opioid receptor) ซึ่งเป็นการออกฤทธิ์กดประสาท โดยออกฤทธิ์รุนแรงกวาmitragynine และ มอรฟน 13 และ 46 เทา ตามลำดับ [4,6,7,9]




รูปที่ 2 ตัวอย่างโครงสร้าง Alkaloid ที่พบในพืชกระท่อม

## 1.4 Mitragynine (ไมทราไจนีน)[8]




รูปที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของ Mitragynine

ไมทราไจนีนจัดเป็นอัลคาลอยด์ชนิด corynanthe มีสูตรโมเลกุล $C_{23}H_{30}O_4N_2$ (มวลโมเลกุล 398.503 กรัมต่อโมล) อาจเรียกชื่อ mitragynine ตามลักษณะโครงสร้างว่า 9-methoxy-corynantheidine ลักษณะโครงสร้างจัดอยู่ประเภทเดียวกับอัลคาลอยด์ที่พบในสกุล Yohimbe และสกุล Uncaria สาร mitragynine มีลักษณะเป็นผงสีขาว (white amorphous powder) มีคุณสมบัติละลายในตัวทำละลายชนิดแอลกฮอล์ คลอโรฟอร์ม และกรดอะซิติก [8]

สารไมทราไจนีนเป็นสารสำคัญที่สกัดได้เฉพาะจากพืชกระท่อมเท่านั้น ไม่พบใน*Mitragyna spp.* อื่น ๆ จึงใช้เป็นสารที่พิสูจน์เอกลักาณ์ของพืชกระท่อมได้ [10] เป็นสารหลักในการออกฤทธิ์บรรเทาอาการปวด โดยกระตุ้นผ่าน opioid receptors พบสารไมทราไจนีนมากถึง 66% ของ สารสกัดใบกระท่อมจากประเทศไทย แต่พบเพียง 12 % จากการสกัดใบกระท่อมจากประเทศมาเลเซีย นอกจากนี้ ยังออกฤทธิ์ต้านอักเสบโดยกดการหลั่งสาร prostaglandin E2 (PGE-2) ในวิถี cyclooxygenase 2 (COX-2) อีกด้วย [8].

**ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (Pharmacology)**

มีรายงานผลการศึกษาวิจัยสารสกัดจากใบกระท่อมและ mitragynine ทั้งในหลอดทดลอง (in vitro) และสัตว์ทดลอง (in vivo) พบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่สำคัญ ดังนี้

1. ฤทธิ์ลดการบีบตัวของกล้ามเนื้อเรียบ จึงมีฤทธิ์ทำให้เกิดการชาเฉพาะที่ได้และยังมีฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลางคล้ายโคเคน

2. ฤทธิ์ระงับปวดในลักษณะเดียวกับมอร์ฟีนในฝิ่นโดยออกฤทธิ์ที่ mu-opioid receptor และ delta-opioid receptor และฤทธิ์ระงับปวดยังเกี่ยวพันกับฤทธิ์กดการทำงานของ 5-HT2A receptor จึงเป็นสารแก้ปวดที่แตกต่างจากมอร์ฟีนฝิ่น

3. ฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งของกรดในกระเพาะอาหารได้เช่นเดียวกับมอร์ฟีนโดยผ่านกลไกการออกฤทธิ์ที่ opioid receptors ทั้งนี้เชื่อว่า มีความเกี่ยวข้องกับอาการข้างเคียง เช่น เบื่ออาหาร น้ำหนักลดและอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ผู้เสพใบกระท่อมไม่รู้สึกหิว (ไม่อยากอาหาร) จึงทำงานได้นานขึ้น

4. ฤทธิ์ลดการบีบตัวลำไส้ โดยออกฤทธิ์ที่ mu-opioidreceptor และ delta-opioid receptor จึงแตกต่างจากสารกลุ่ม opioid อื่นๆ

5. ฤทธิ์ในการลดไข้ โดยทดสอบเปรียบเทียบกับ aminopyrin จะเห็นได้ว่าใบกระท่อมให้ผลการออกฤทธิ์ที่อาจมีประโยชน์ทางยาได้ แต่ทำให้เสพติดได้และยังมีผลเสียต่อสุขภาพ หากใช้ติดต่อกันนานๆ

**เภสัชจลนศาสตร์ (pharmacokinetics) และเภสัชพลศาสตร์ (pharmacodynamics) ของพืชกระท่อม** [8]

สารไมทราไจนีนถูกเปลี่ยนแปลงในร่างกายผ่านกลไก phase I และ phase II โดยเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลสิส ตรงหมู่ methyl ester ที่ตำแหน่ง 16 เกิด *O*-demethylation ตรงหมู่ methoxy ตำแหน่งที่ 9 และ 17 เกิดปฏิกิริยา oxidation และ reduction เปลี่ยนหมู่ aldehyde เป็น carboxylic acid และ alcohol ตามลำดับ จากนั้นเชื่อมต่อกับหมู่ glucuronide และ sulfate แล้วขับออกทางปัสสาวะ

ผู้ที่กินใบกระท่อม ฤทธิ์ของไมทราไจนีนจะออกภายใน 30 นาที ค่า half-life ของไมทราไจนีนประมาณ 3.5 ชั่วโมง ในขณะที่ 7-hydroxymitragynine มีค่า half-life ที่ 2.5 ชั่วโมง การกำจัดสารออกจากร่างกายส่วนใหญ่ผ่านทางปัสสาวะ การทดลองทางคลินิกในอาสาสมัครชายสุขภาพดีจำนวน 10 คน ทำนายรูปแบบเภสัชจลนศาสตร์ ผ่านการกินไมทราไจนีนเป็นแบบ two-compartment model สารจากใบกระท่อมจะออกฤทธิ์สูงสุดใน 2-4 ชั่วโมงแรก และจะหมดฤทธิ์ไปภายใน 5-7 ชั่วโมง การศึกษาค่าทางเภสัชจลนศาสตร์ของสารไมทราไจนีนในมนุษย์จะแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับค่าที่ศึกษาได้ในหนูทดลอง การกินกระท่อมในปริมาณมาก (heavy user) พบอาการไม่พึงประสงค์ ได้แก่ คลื่นไส้ อาเจียน เมื่อยล้า ท้องผูก นอนไม่หลับ ปากแห้ง ปัสสาวะบ่อย และผิวหน้าคล้ำ [32]

สารสกัดเมทานอลจากใบกระท่อม มีผลต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมผ่านเอนไซม์ cytochrome P450 โดยยับยั้ง CYP2C9, CYP2D6 และ CYP3A4 [30] สารไมทราไจนีนความเข้มข้น 250 mM มีผลเหนี่ยวนำ (inducer) การทำงานของเอนไซม์ *N*-demethylase แต่ยับยั้ง (inhibitor)การทำงานของเอนไซม์ glutathione S-transferase ผลการศึกษานี้สรุปว่าไมทราไจนีนมีโอกาสทำให้เกิดอันตรกิริยากับยาอื่น (drug interaction) เช่น glibenclamide ที่เป็น *N*-demethylase inducer เป็นต้น

## 2. เทคนิคโครมาโทรากราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) [11,12]

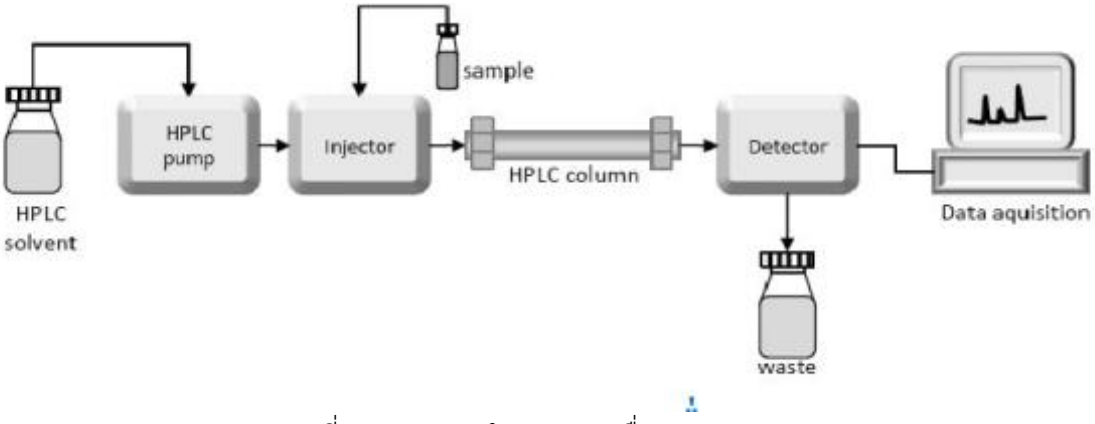
เทคนิค HPLC สามารถใช้ในการวิเคราะห์สารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ ทั้งในรูปโมเลกุลและไอออน สามารถวิเคราะห์สารโมเลกุลขนาดใหญ่ โดยสารที่วิเคราะห์ต้องสามารถละลายได้ในสารละลายตัวชะ นอกจากนี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานทางด้านต่างๆ เช่น ผลิตภัณฑ์ยา ด้านชีวเคมี ผลิตภัณฑ์อาหาร เคมีภัณฑ์ ด้านสิ่งแวดล้อม สารพิษตกค้าง สารเสพติด และด้านการตรวจทางคลินิก เป็นต้น

### 2.1. <u>หลักการของเทคนิค HPLC</u> [11,13]

โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) เป็นเครื่องมือใช้สำหรับแยกสารประกอบที่สนใจที่ผสมอยู่ในตัวอย่าง โดยกระบวนการแยกสารประกอบที่สนใจจะเกิดขึ้นระหว่างเฟส 2 เฟส คือ เฟสคงที่ (Stationary phase) กับเฟส

เคลื่อนที่ (Moblie phase) สารจะถูกแยกออกมาในเวลาที่ต่างกัน ซึ่งสารผสมที่อยู่ในตัวอย่างสามารถถูกแยกออกจากกันได้นั้นขึ้นอยู่กับความสามารถในการเข้ากันได้ดีของสารนั้นกับเฟสเคลื่อนที่ หรือเฟสคงที่ สารที่สามารถเข้ากันได้ดีกับเฟสเคลื่อนที่จะถูกแยกออกมาก่อน ส่วนสารที่เข้ากันได้ไม่ดีกับเฟสเคลื่อนที่ หรือเข้ากันได้ดีกับเฟสคงที่ก็จะถูกแยกออกมาทีหลัง โดยสารที่ถูกแยกออกมาได้นี้จะถูกตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดสัญญาณ แสดงผลในลักษณะเป็นพีค (Peak) ซึ่งเรียกว่า โครมาโทแกรม (Chromatogram) ระยะเวลาที่สารแต่ละชนิดถูกหน่วงเหนี่ยวไว้กับเฟสคงที่ (Retention time) หรือตำแหน่งของพีคที่ปรากฏบนโครมาโทแกรมสามารถนำมาใช้ประโยชน์ด้านการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ และพื้นที่ใต้พีค หรือความสูงของพีคใช้ประโยชน์ด้านการวิเคราะห์เชิงปริมาณ

## 2.2. <u>องค์ประกอบของเครื่อง HPLC</u>




รูปที่ 4 แสดงการทำงานของเครื่อง HPLC

**<u>ส่วนประกอบที่สำคัญดังแสดงในภาพ ได้แก่</u>**

- แหล่งเก็บตัวทำละลาย (Solvent Reseroir/Mobile phase)
- ปั๊ม (Pumping system)
- ระบบฉีดสารตัวอย่าง (Injection System)
- คอลัมน์ (Column)
- หน่วยตรวจวัดสัญญาณ (Detector)
- เครื่องบันทึกสัญญาณ (Recorder/data)
-

<u>1) แหล่งเก็บตัวทำละลาย (Solvent Reseroir/Mobile phase)</u> : เป็นตัวแปรสำคัญมากในการแยกสารตัวอย่างออกเป็นองค์ประกอบย่อย ใช้เป็นที่เก็บตัวทำละลายซึ่งทำหน้าที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ เพื่อเป็นตัวพาสารตัวอย่างผ่านคอลัมน์ มีลักษณะเป็นของเหลว ตัวทำละลายที่ใช้ต้องมีความบริสุทธิ์สูง สามารถละลายตัวอย่างได้ดี มีความเหมาะสมกับหน่วยตรวจวัดสัญญาณที่ใช้และต้องปราศจากฝุ่นและแก๊ส เพื่อป้องกันอนุภาคแปลกปลอม

เข้าสู่ตัวปั๊ม ซึ่งจะมีผลกระทบต่อการทำงานของปั๊มได้ Solvent ที่ใช้ใน HPLC ได้แก่ Organic solvent รวมทั้ง Aqueous Solution ของเกลือชนิดต่าง ๆ ควรเลือกใช้ Solvent ที่เป็น HPLC grade ผ่านเมมเบรนขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน

2) ปั๊ม (Pumping system) : ทำหน้าที่สูบ Mobile phase เพื่อส่งเข้าสู่ Colum ในอัตราเร็วที่ตั้งค่าไว้ ความดันของระบบจะขึ้นอยู่กับอัตราการเคลื่อนที่ ความหนืดของ Mobile phase ขนาดของ Packing material และความยาวของ Column โดยความดันที่ใช้ต้องไม่เกินขีดจำกัดของเครื่อง สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 แบบ

- Isocratic pump ใช้อัตราส่วนของ mobile phase ได้คงที่ตลอดเวลา
- Gradient pump เป็น pump ททที่สามารถควบคุมการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของ mobile phase ได้ตามเวลาที่กำหนด

โดยปกติความดันที่ใช้จะประมาณ 100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (pound per Square inch : psi) และมีอัตราการไหลของตัวทำละลายผ่านคอลัมน์ในช่วง 0.5 – 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที การพัฒนาการปั๊มให้มีประสิทธิภาพถือเป็นปัจจัยที่สำคัญมากต่อการพัฒนาระบบ HPLC

ลักษณะของปั๊มที่ดี ต้องควบคุมอัตราการไหลหรือความดันของตัวทำละลายให้คงที่ เพื่อป้องกันการเกิดพัลส์ (Pulse) มีความเฉื่อยต่อสารเคมีเพื่อให้ใช้ได้กับตัวทำละลายที่เป็นทั้งสารอินทรีย์ และสารอนินทรีย์ ทำให้สามารถวิเคราะห์สารตัวอย่างได้หลายชนิด

3) ระบบฉีดสารตัวอย่าง (Injection System) : ทำหน้าที่ในการฉีดสารตัวอย่างเข้าระบบ HPLC ในปัจจุบันจะฉีดสารตัวอย่างด้วยระบบอัตโนมัติที่มีปริมาตรเท่ากัน สารตัวอย่างเข้าสู่กระแสของเฟสเคลื่อนที่แล้วเกิดการแยกในคอลัมน์ มี 2 แบบคือ manual injector และ auto samples injector

4) คอลัมน์ (Column) : หรือจะเรียกว่า stationary phase มีลักษณะเป็นของแข็งหรือเจล เป็นเฟสอยู่กับที่ ทำหน้าที่ให้เกิดกระบวนการแยกของสารที่สนใจซึ่งเกิดขึ้นระหว่าง mobile phase กับ stationary phase

ส่วนมากทำด้วยเหล็กกล้าไร้สนิมบรรจุด้วยอนุภาคชนิดต่าง ๆ ที่เฉพาะสำหรับการวิเคราะห์ HPLC มีความยาวในการใช้งานตั้งแต่ 10 – 150 ซม. มีเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่น้อยกว่า 1 มม. จนถึงหลาย มม. สามารถทนแรงดันได้สูงถึง 6,000 ปอนด์ต่อตารางนิ้วขึ้นอยู่กับชนิดของวัสดุที่ใช้ทำคอลัมน์และเส้นผ่านศูนย์กลางของคอลัมน์

5) หน่วยตรวจวัดสัญญาณ (Detector) : ทำหน้าที่ในการตรวจวัดสัญญาณของสารที่สนใจที่ได้จากกระบวนการแยกเพื่อส่งให้เครื่องบันทึกผลทำการบันทึกค่าและแสดงกราฟของสารชนิดต่าง ๆ เป็นตัวตรวจวัดสัญญาณสำหรับ HPLC มีหลายประเภท เช่น ตัวไวแสง (Photo detector) การเลือกใช้หน่วยตรวจวัดชนิดใดขึ้นอยู่กับชนิดของสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์

| ชนิด | ความไว (ก./มล.) | ผลของอุณหภูมิ | ผลของอัตราการไหล | หมายเหตุ |
|---|---|---|---|---|
| UV absorption | $5 \times 10^{-5}$ | น้อย | ไม่มีผล | นิยมใช้ในช่วง 254 – 280 nm. |
| IR absorption | $10^{-6}$ | น้อย | ไม่มีผล | - |
| Fluorometry | $10^{-10}$ | น้อย | ไม่มีผล | - |
| Refractive index | $5X10^{-7}$ | - | ไม่มีผล | วัดความแตกต่างดัชนีหักเหของสารตัวอย่างและเฟสเคลื่อนที่ |
| Conductivity | $10^{-8}$ | $\pm 1^{\circ}$ซ. | มีผล | - |
| Flame ionization | $10^{-8}$ | ไม่มีผล | มีผล | สารตัวอย่างถูกเผาให้เป็นไอออนและถูกจับโดยแอโนดเพลท |
| Mass spectrometry | $10^{-10}$ | ไม่มีผล | ไม่มีผล | วิเคราะห์สารได้ถึง 0.2-1.0 ng. |

ตารางที่ 1 แสดงคุณสมบัติของตัวตรวจวัดชนิดต่าง ๆ [11]

6) เครื่องบันทึกสัญญาณ (Recorder/data) : เป็นหน่วยหนึ่งซึ่งทำหน้าที่แปลสัญญาณจากหน่วยตรวจวัดให้ออกมาเป็นโครมาโทแกรม เพื่อสามารถหาพื้นที่ และระยะเวลาที่สารแต่ละชนิดถูกหน่วงเหนี่ยวไว้กับเฟสคงที่ (Retention time)

## 2.3 องค์ประกอบของเครื่อง Liquid Chromatography/Mass Spectrometry (LC-MS/MS) [13,14,15]

เป็นเทคนิคที่นิยมใช้อย่างแพร่หลาย เนื่องจากสามารถใช้กับการแยกสารที่ต้องการวิเคราะห์ (analytes)ได้กว้างขวางและไม่ต้องการขั้นตอนการเปลี่ยนรูปสา(derivatization) เทคนิคนี้ใช้ตัวทำละลายที่มีน้ำและตัวทาละลายอินทรีย์ผสมกันในเฟสเคลื่อนที่ โดยปรับอัตราส่วนให้เหมาะสมกับการแยกสารที่ต้องการวิเคราะห์ (analytes) เทคนิคนี้มักใช้ระบบปั๊มที่มีความดันสูงเพื่อทำให้เกิดการแยกสารได้รวดเร็วและมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

**<u>ส่วนผลิตไอออน (Ion Sources)</u>**

ส่วนผลิตไอออนที่ทำให้สารเกิดเป็นไอออนภายใต้ภาวะความดันบรรยากาศ (atmospheric pressure ionization, API) ที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการทางคลินิกแบ่งเป็น 2 ประเภท ได้แก่

1. Electrospray Ionization Source, ESI เป็นส่วนผลิตไอออนที่เหมาะสำหรับเชื่อมต่อกับเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี และสามารถประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์ตัวอย่างกลุ่มโมเลกุลของสารทางชีววิทยาที่สำคัญได้อย่างหลากหลาย เช่น การวิเคราะห์ตัวอย่างกลุ่มเมแทบอไลต์ ซีโนไบโอทิก และเปปไทด์ เนื่องจากส่วนผลิตไอออนชนิดนี้เหมาะสำหรับการวิเคราะห์สารตัวอย่างที่อยู่ในรูปไอออนในตัวทำละลาย กระบวนการเริ่มจากสารตัวอย่างที่เป็นของเหลวจะถูกปั๊มผ่านแคปพิลลารีที่มีสนามไฟฟ้าแรงสูง (3-5 kV) และถูกทำให้เป็นละอองพ่นออกจากปลายแคปพิลลารี เพื่อสร้างสเปรย์ของหยดประจุ (charged droplets) โดยแคปพิลลารีจะตั้งฉากกับทางเข้าสู่ แมสสเปกโตรมิเทอร์เพื่อลดไม่ให้สิ่งแปลกปลอมเข้าไปหยดประจุที่เป็นของเหลวจะถูกทำให้เป็นไออย่างรวดเร็วโดยก๊าซไนโตรเจนร้อน และประจุทางไฟฟ้าที่เหลือบนหยดประจุจะถูกส่งต่อไปยังสารที่วิเคราะห์ (analytes) จากนั้นสารที่วิเคราะห์ที่มีประจุจะถูกส่งต่อไปในระบบสุญญากาศของแมสสเปกโทรมิเทอร์ ส่วนผลิตไอออนชนิดนี้สามารถเปลี่ยนโหมดไปมาได้ระหว่างไอออนชนิดบวกและลบภายใต้สภาวะปกติและเป็นเทคนิคไอออไนเซชันแบบอ่อนโยน (soft ionization) หมายความว่าจะให้พลังงานแก่สารที่วิเคราะห์เพียงเล็กน้อย และทำให้เกิดการแตกตัวเพียงเล็กน้อย (fragmentation) ซึ่งจะแตกต่างจากส่วนผลิตไอออนประเภทที่ 2 คือ atmospheric pressure chemical ionization source

แม้ว่าส่วนผลิตไอออนชนิดนี้จะใช้กันอย่างแพร่หลายในการวิเคราะห์ตัวอย่างกลุ่มโมเลกุลของสารทางชีววิทยา แต่ไม่สามารถทำให้สารตัวอย่างประเภทที่เป็นกลางหรือมีสภาพขั้วน้อย เช่น ไขมัน แตกตัวให้เกิดประจุได้อย่างมีประสิทธิภาพเนื่องจากเป็นเทคนิคไอออไนเซชันแบบอ่อนโยน จึงมีการพัฒนาส่วนผลิตไอออนภายใต้ความดันบรรยากาศโดยกระบวนการ chemical ionization ต่อไป

2.Atmospheric Pressure Chemical Ionization Source, APCI เป็นส่วนผลิตไอออนที่เหมาะสำหรับการวิเคราะห์สารตัวอย่างที่มีโมเลกุลเล็กและมีความคงทนต่อความร้อน ซึ่งแตกประจุได้ไม่ดีด้วยวิธีการเกิดละอองด้วยไฟฟ้า เช่น ตัวอย่าง กลุ่มสเตอรอยด์ สารกลุ่มไขมัน และกลุ่มวิตามินที่ละลายในไขมัน กระบวนการเริ่มจากการให้สารละลายของสารตัวอย่างไหลผ่านโพรบนำสารเข้ามา และมีการให้ความร้อนกับสารละลายที่ปลายโพรบทำให้สารละลายระเหยกลายเป็นละออง โดยมีแรงพ่นของแก๊สซึ่งเรียกว่า nebulizing gas (โดยทั่วไปเป็นแก๊สเฉื่อย) ช่วยทำให้ละอองของสารกระจายเข้าสู่ส่วนไอออไนเซชัน การเกิดไอออไนเซชันนี้มาจากไฟฟ้าแรงสูงที่ส่งผ่านปลายเข็มเล็ก ๆ ซึ่งเรียกว่า corona discharge pin ซึ่งอาจต่อกับศักย์ไฟฟ้าที่เป็นบวกหรือต่อกับศักย์ไฟฟ้าที่เป็นลบ ไอของตัวทำละลายซึ่งเป็นสารหลักและมีอยู่มากจะถูกเปลี่ยนเป็น reagent gas และ reagent ion ซึ่งจะเป็นไอออนบวกหรือไอออนลบได้ ขึ้นกับโหมดที่เลือกใช้โดยเมื่อ reagent ion เหล่านี้ ไปชนกับ

ไอของสารตัวอย่าง จะทำให้เกิดการไอออไนเซชันของสารตัวอย่างอีกครั้งหนึ่งโดยผ่านกระบวนการ chemical ionization กระบวนการทั้งหมดนี้เกิดขึ้นที่ความดันบรรยากาศและเกิดในขณะที่การไหลของไอเป็นไปอย่างรวดเร็ว โดยไอออนเพียงส่วนหนึ่งจะถูกดึงดูดให้เคลื่อนที่ผ่านช่องเล็กๆ (skimmer) ด้วยแรงทางไฟฟ้าเข้าสู่ส่วนวิเคราะห์มวล และส่วนอื่นๆ ที่เหลือจะถูกปั๊มดูดออกไป

**ส่วนวิเคราะห์มวล (Mass Analyzer)**

หน้าที่ของส่วนวิเคราะห์มวล คือ การวิเคราะห์ค่ามวลต่อประจุ (m/z) ของอนุภาคที่ส่งมาจากส่วนไอออไนเซชัน โดยแยกไอออนตามค่า (m/z) ของไอออนนั้นๆ

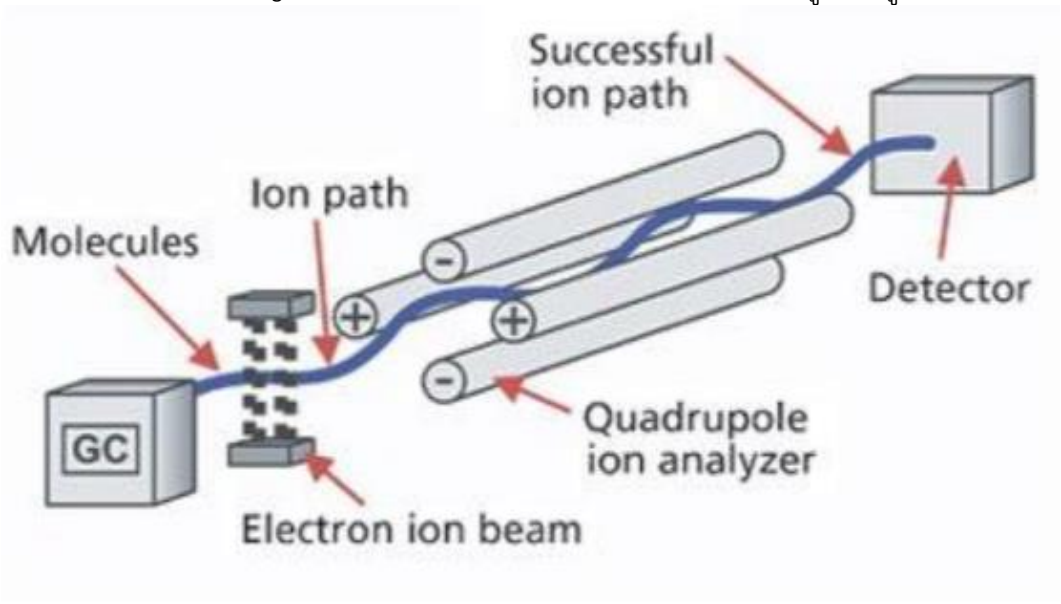
ส่วนวิเคราะห์มวลที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในงานวิจัยทางเคมีคลินิก

1. Quadrupole Mass Analyzer ประกอบด้วยแท่งโลหะกลม 4 แท่งซึ่งเชื่อมต่อกันทางไฟฟ้าและมีการจัดวางตัวขนานกันเป็น 2 คู่ หลักการทำงานคือ ประจุจากส่วนผลิตไอออนจะถูกโฟกัสด้วย ion optic ให้เคลื่อนที่เข้าในบริเวณช่องว่างตรงกลางระหว่างแท่งทั้งสี่ ซึ่งจะมีกลไกการแยกแยะประจุออกไปสู่ส่วนตรวจวัดต่อไป โดยการแยกแยะประจุทำโดยการปรับค่าสนามไฟฟ้าภายในช่องว่างระหว่างแท่งทั้งสี่ ซึ่งจะทำให้ประจุที่มีค่ามวลต่อประจุเฉพาะค่าหนึ่ง ๆ สามารถเคลื่อนที่ผ่านออกไปสู่ส่วนตรวจวัดได้ ในขณะที่ประจุอื่นๆ ที่มีค่ามวลต่อประจุไม่สอดคล้องกับสนามไฟฟ้านั้นๆ จะเคลื่อนที่ไปชนผนังและไปได้ไม่ถึงส่วนตรวจวัด การสแกนค่ามวลต่อประจุสำหรับการวิเคราะห์แต่ละครั้งทำโดยการปรับค่าสนามไฟฟ้าในช่วงที่ครอบคลุมสำหรับการผ่านของค่ามวลต่อประจุที่ต้องการวิเคราะห์แท่งโลหะทั้งสี่ต่อเชื่อมกันทางไฟฟ้า โดยแท่งที่อยู่ตรงข้ามกันจะเชื่อมต่อกันด้วยศักย์ไฟฟ้าจากทั้งไฟกระแสตรงและไฟกระแสสลับที่ระดับความถี่คลื่นวิทยุสามารถตั้ง (set) quadrupoles ให้สามารถตรวจสอบ (monitor) ค่ามวลต่อประจุที่เฉพาะเจาะจงทีละค่าได้ โดยการปรับค่าศักย์ไฟฟ้า

เทคนิคนี้มีประโยชน์มากสำหรับการวิเคราะห์สารตัวอย่างที่มีเป้าหมาย (targeted analytes) เพราะเวลาในการตรวจวัดทั้งหมดถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์ประจุที่เจาะจงแทนที่จะไปใช้ในการสแกนประจุทุกประจุ อีกทั้ง quadrupoles ใช้ได้กับไอออนที่มีพลังงานไม่สูง และมีข้อดีคือความทนทานและความเร็วในการวิเคราะห์สูงสามารถสแกนไอออนตลอดช่วงมวลที่ต้องการวิเคราะห์ของแมสสเปกตรัมหนึ่ง (m/z) ในช่วง millisecond เท่านั้น จึงเหมาะสมสำหรับเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบต่าง ๆ ที่ต้องตรวจจัดแบบรวดเร็วและต่อเนื่อง เช่น gas chromatography และ liquid chromatography

Triple quadrupole คือหนึ่งในตัวอย่างของการต่ออนุกรมของส่วนวิเคราะห์มวล (tandem mass spectrometry) ประกอบด้วย collision cell อยู่ตรงกลางระหว่างส่วนวิเคราะห์มวล 2 quadrupoles โดยการต่ออนุกรมแบบนี้มีข้อดี คือสามารถเพิ่มความจำเพาะ (specificity) ของการวิเคราะห์ได้อย่างมาก โดย quadrupole ที่หนึ่งมีการปรับค่าให้เฉพาะ m/z ของไอออนแม่ (precursor ion) ของสารที่ต้องการวิเคราะห์ผ่านไปและเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาหรือแตกตัว จากนั้นตั้ง quadrupole ที่สามให้ตรวจวัด

เฉพาะไอออนลูก (product ion) ที่เกิดจากการแตกตัวของไอออนแม่นั้น ๆ วิธีนี้เรียกว่า multiple reaction monitoring (MRM) ซึ่งเป็นวิธีที่ให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องสูง




รูปที่ 5 แสดงไดอะแกรมของ Quadrupole analyzer

2. Time of Flight (TOF) Mass Analyzer เป็นเครื่องวิเคราะห์มวลที่แยกไอออนโดยอาศัยความแตกต่างของความเร็วในการเคลื่อนที่ของไอออนที่มีมวลต่างกันเมื่อถูกเร่งด้วยสนามไฟฟ้า โดยไอออนที่มีมวลน้อยจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าและไปถึง detector ได้ก่อนไอออนที่มีมวลมาก ทำให้ไอออนที่มีมวลต่างๆ กันจะถึง detector ในช่วงเวลาที่ต่าง ๆ กัน การแยกไอออนใน TOF เป็นการตรวจวัดเวลาที่ไอออนใช้ในการเคลื่อนที่ไม่มีการสแกนค่าความต่างศักย์หรือตัวแปรอื่น ๆ ซึ่งต่างจาก quadrupole การใช้งานและการวิเคราะห์ด้วย TOF จึงมีข้อดีคือทำได้ง่ายและรวดเร็ว และมีความไว (sensitivity) สูงเนื่องจากการโฟกัสไอออนในตอนต้น flight tube ไม่จำเป็นต้องใช้ช่องเล็กๆ กั้นเพื่อโฟกัส ลำไอออนเหมือนกับใน quadrupole จึงทำให้ปริมาณไอออนเข้าสู่ส่วนวิเคราะห์มวลได้มาก อีกทั้งการแยกไอออนใน TOF ไม่ได้เป็นการเบี่ยงเบนไอออนไปจากการวิ่งเข้าสู่ detector จึงไม่มีการสูญเสียไอออนเหมือน quadrupole ที่เป็นระบบส่งผ่านไอออน (ion transmission) และ TOF สามารถตรวจวัดไอออนที่มีค่า m/z สูงมากกว่า 500,000 amu

ข้อจำกัดของ TOF คือให้ resolution ที่ไม่สูง เนื่องจากหลายสาเหตุ เช่น การที่ไอออนที่มีมวลเท่ากันอาจได้รับความต่างศักย์จากสนามไฟฟ้าที่ใช้ในการเร่งให้ไอออนเคลื่อนที่ต่างกัน ทำให้มีพลังงานจลน์ต่างกัน คือมีการกระจายของพลังงานจลน์ ซึ่งส่งผลให้ไอออนมีความเร็วในการเคลื่อนที่ต่างกัน หรือปัจจัยของช่วงเวลาที่ใช้ในแต่ละห้วงของการ ปล่อยไอออนที่แตกต่างกัน สาเหตุเหล่านี้อาจทำให้ ไอออนที่มีมวลเท่ากัน ใช้เวลาในการเคลื่อนที่และถูกตรวจวัดได้ในเวลาที่ต่างกัน ทำให้พีคของสัญญาณที่เกิดขึ้นมีลักษณะกว้าง (broad) และทำ ให้มีความจำแนก (resolution) ต่ำ

**<u>วิธีการวิเคราะห์มวล (Methods of Analysis)</u>** (linear quadrupoles)

โดยวิธีการวิเคราะห์มวลจะแตกต่างกันตามความสามารถในการคัดเลือก (selectivity) ต่อประจุที่ผ่านเข้ามาในส่วนวิเคราะห์มวลก่อนถูกส่งไปส่วนตรวจวัดวิธีการวิเคราะห์มวลแบ่งเป็น 4 ประเภทได้แก่

<u>1) Mass Spectrometry mode (MS)</u>

single quadrupole จะสแกนช่วง m/z ของตัวอย่างที่สนใจตั้งแต่จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีจนถึงแมสสเปกโทรเมทรีอย่างสม่ำเสมอ โดยโมเลกุลของ m/z ทุกตัวในช่วง m/z ที่สแกน ถูกส่งไปถึง detector และผลิต complex chromatogram และ mass spectra ออกมา

การวิเคราะห์มวลประเภทนี้เป็นวิธีที่มี specificity และ selectivity ต่ำ และตรวจวัดไอออนประเภท precursor เหมาะกับงานด้าน comprehensive drug screening

<u>2. Tandem Mass Spectrometry mode (MS/MS)</u>

quadrupole ที่ 1 ถูกตั้งค่าให้เหมาะสมกับไอออนที่มีค่า m/z ตรงกับค่าสารตัวอย่างที่สนใจเท่านั้น และส่งผ่านไอออนนั้นๆ ไปยัง quadrupole ที่ 2 หรือที่เรียกว่า collision cell เพื่อผลิต fragment ของไอออนนั้นๆ และส่งต่อไปยัง quadrupole ที่ 3 ซึ่งจะสแกนช่วง m/z ของ fragment ทั้งหมดจาก quadrupole ที่ 2 เพื่อส่งต่อไป detector การวิเคราะห์

มวลประเภทนี้เป็นวิธีที่มี specificity สูง แต่ selectivity ต่ำ และตรวจวัดไอออนประเภท fragment เหมาะกับงานด้าน metabolomics

<u>3. Selected Ion Monitoring (SIM)</u>

คือการตรวจวัดเฉพาะมวลที่สนใจโดยต้องการเฉพาะ single quadrupole และค่ามวลต่อประจุของ precursor ion เท่านั้น เนื่องจากไม่มีการแตกตัวของประจุ (fragmentation) โดยการปรับหาค่าความต่างศักย์และความถี่ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับค่ามวลต่อประจุ (m/z) ของสารเป้าหมายที่ทราบแล้ว เพื่อลดปริมาณประจุที่ไม่ต้องการก่อนเข้าสู่แมสสเปกโทรมิเทอร์และส่วนตรวจวัดต่อไป

การวิเคราะห์มวลประเภทนี้เป็นวิธีที่มี specificity และ selectivity สูง และตรวจวัดไอออนประเภท precursor เหมาะกับงานด้านการวิเคราะห์กรดไขมันที่มีสายโซ่ยาวมากๆ

<u>4. Multiple Reaction Monitoring (MRM)</u>

วิธีนี้ทำการปรับหาค่าที่เหมาะสมสำหรับประจุแม่ (precursor ion) และประจุลูก (product ion) ที่ได้จากการแตกตัวของประจุแม่ ซึ่งเป็นค่าที่เฉพาะเจาะจงของประจุแม่กับประจุลูกคู่นั้นๆ โดย quadrupole ที่ 1 จะถูกตั้งค่าความต่างศักย์และความถี่ที่เหมาะสมเพื่อส่งประจุแม่ผ่านไปยัง quadrupole ที่ 2 หรือที่เรียกว่า collision cell เพื่อแตกตัวให้

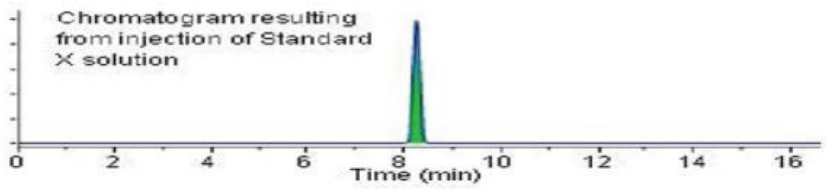
ประจุลูกที่เสถียรและเป็นเอกลักษณ์เฉพาะของประจุแม่นั้นๆ จากนั้นส่งไป quadrupole ที่ 3 ซึ่งถูกตั้งค่าความต่างศักย์และความถี่สำหรับประจุลูกแต่ละตัว (product ions) ส่วนใหญ่ประจุแม่ 1 ตัว จะแตกตัวให้ประจุลูกได้มากกว่า 1 ตัว

การวิเคราะห์มวลประเภทนี้เป็นวิธีที่มี specificity และ selectivity สูง และตรวจวัดไอออน ประเภท fragment เหมาะกับงานด้าน drug confirmation testing

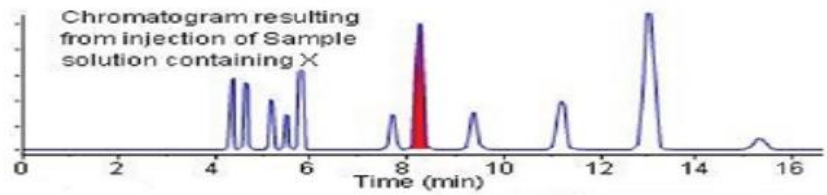
## 2.4 การตรวจปริมาณวิเคราะห์ [13]

การหาปริมาณยาเสพติดมักใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีเช่น Gas Chromatography (GC) หรือ High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) โดยการใช้สารละลายมาตรฐานเป็นตัวเปรียบเทียบหาปริมาณสารในสารตัวอย่าง สารมาตรฐานที่เลือกใช้ควรมีความบริสุทธิ์สูงและต้องมีใบรับรอง (Certificate of Analysis: COA) แจ้งความบริสุทธิ์ของสารมาด้วยเสมอ การเลือกใช้สารละลายมาตรฐานในการใช้งานมี 2 ลักษณะคือ

1) สารมาตรฐานภายนอก (external standard)

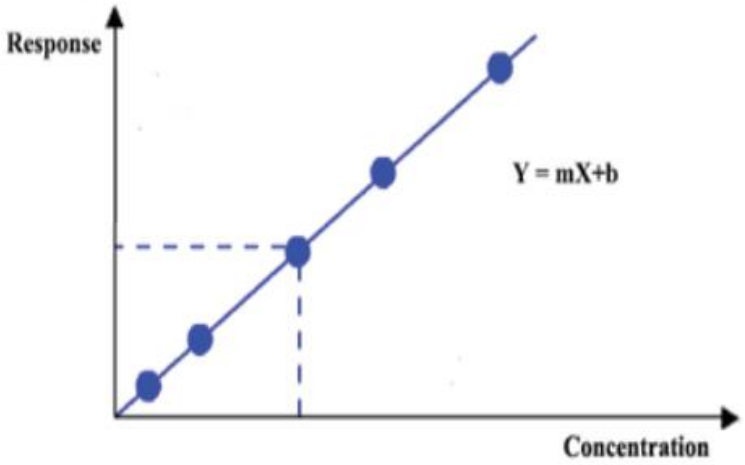



โครมาโตแกรมสารละลายมาตรฐาน




โครมาโตแกรมสารละลายตัวอย่าง

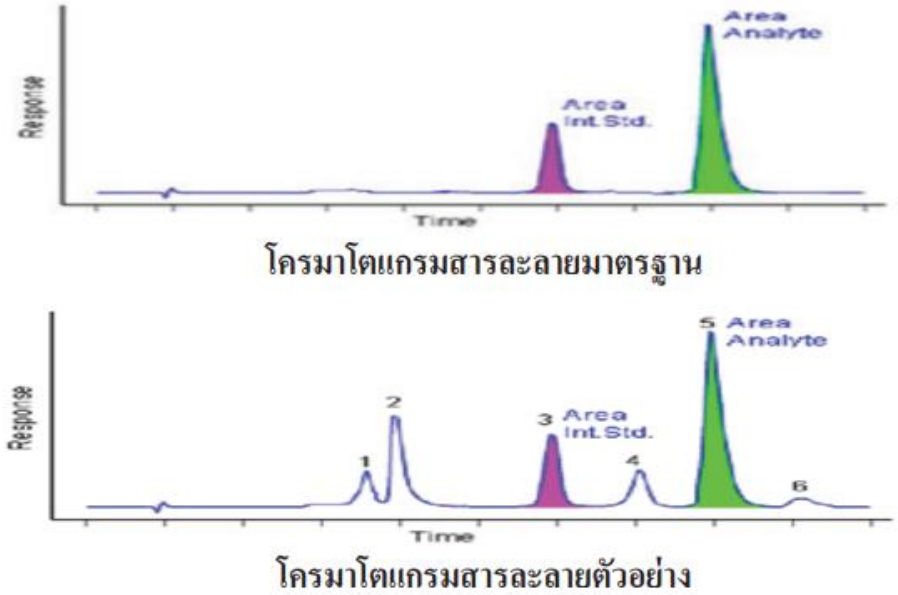
รูปที่ 6 แสดงโครมาโทแกรมสารละลายมาตรฐานเปรียบเทียบสารละลายตัวอย่าง



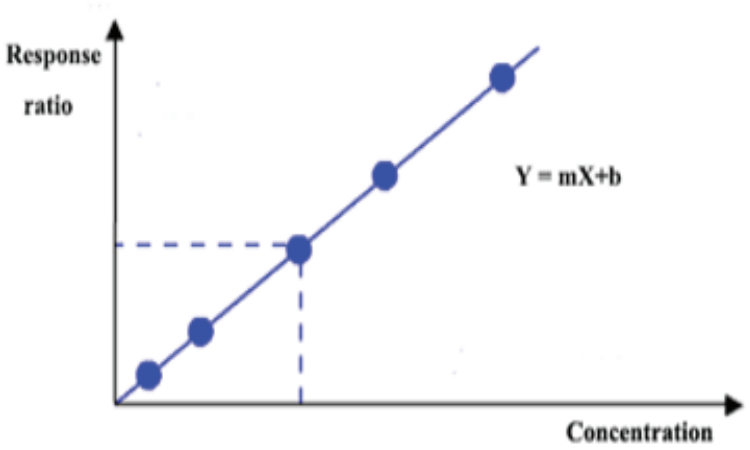

รูปที่ 7 แสดงกราฟมาตรฐานสำหรับการหาปริมาณสารเมื่อใช้สารมาตรฐานภายนอก

นิยมใช้สารบริสุทธิ์ชนิดเดียวกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน ซึ่งเมื่อฉีดเข้าไปในคอลัมน์จะทำให้สามารถหาปริมาณของสารตัวอย่างได้โดยอ่านค่าจากกราฟมาตรฐาน หรือการคำนวณเปรียบเทียบหาปริมาณของสารจากความสูงของพีค หรือพื้นที่ของพีคเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ซึ่งวิธีนี้อาจจะอ่านค่าได้คลาดเคลื่อนไปจากความจริงมากถ้าสภาพของคอลัมน์หรือเครื่องมือในขณะทำกราฟมาตรฐานและการวิเคราะห์สารตัวอย่างแตกต่างกันมาก

2) สารมาตรฐานภายใน (internal standard)




รูปที่ 8 แสดงโครมาโทแกรมสารละลายมาตรฐานเปรียบเทียบสารละลายตัวอย่าง




รูปที่ 9 แสดงกราฟมาตรฐานสำหรับการหาปริมาณสารเมื่อใช้สารมาตรฐานภายใน

เติมสารมาตรฐานภายในลงในสารมาตรฐานของสารที่ทดสอบ และสารตัวอย่างในปริมาณที่คงที่ก่อนทำการวิเคราะห์ ซึ่งเมื่อฉีดเข้าไปในคอลัมน์จะสามารถคำนวณหาปริมาณของสารตัวอย่างได้โดย

- การสร้างกราฟมาตรฐาน โดยให้แกน Y เป็นสัดส่วนระหว่างความสูงหรือพื้นที่ของพีคของสารมาตรฐานของสารที่ทดสอบกับความสูงหรือพื้นที่ของพีคของสารมาตรฐานภายในส่วนแกน X เป็นค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่ทดสอบ แล้วจึงนำค่าอัตราส่วนระหว่างความสูงหรือพื้นที่ของพีคของสารตัวอย่างและความสูงหรือพื้นที่ของพีคของสารมาตรฐานภายใน มาอ่านค่าความเข้มข้นจากกราฟดังกล่าว

- ใช้วิธีการคำนวณเปรียบเทียบหาปริมาณของสารจากอัตราส่วนระหว่างความสูงหรือพื้นที่ของพีคของสารมาตรฐานที่ทดสอบกับความสูงหรือพื้นที่ของพีคของพีคของสารมาตรฐานภายใน

สารมาตรฐานภายในที่เลือกใช้ควรเป็นสารที่มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายสารที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ควรเป็นสารที่ไม่เป็นองค์ประกอบ หรือมีอยู่ในสารตัวอย่าง สามารถแยกออกจากสารตัวอย่างได้อย่างชัดเจน และไม่ทำปฏิกิริยากบสารต่าง ๆ ที่เป็นองค์ประกอบของสารตัวอย่างนั้น

วิธีนี้มีข้อดีตรงที่ สามารถคำนวณหาปริมาณของสารตัวอย่างได้อย่างถูกต้องเพราะการเปรียบเทียบเป็นสัดส่วน ถ้าหากพื้นที่ใต้กราฟของสารที่เราทดสอบลดลง พื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐานภายในก็จะลดลงด้วย ซึ่งจะช่วยลดความผิดพลาดที่เกิดขึ้นในกระบวนการเตรียม และการทดสอบเพิ่มความน่าเชื่อถือของการทดสอบ

**3.การตรวจวิเคราะห์พืชกระท่อมและวิธีการวิเคราะห์สาร mitragynine**

ในขณะนี้ยังไม่มีวิธีมาตรฐานสำหรับหารตรวจวิเคราะห์สารไมทราไจนีนและเมตาบอไลท์ [48] มีรายงานสามารถตรวจพืชกระท่อมได้หลายวิธี ได้แก่ การตรวจลักษณะภายนอก (macroscopic examination) ดูรูปร่างของใบ หูใบ แต่ถ้าอยู่ในรูปผงยาสามารถตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (microscopic examination) โดยจะพบองค์ประกอบที่เป็นส่วนของใบเช่น palisade parenchyma, spongy parenchyma, epidermis, paracytic stomata, non-glandular

trichome, prism crystal เป็นต้น[17] นอกจากนี้สามารถสกัดสารจากผงยาดังกล่าวเพื่อนำมาพิสูจน์หาสารไมทราไจนีนด้วยวิธีโครมาโตกราฟี ได้แก่ วิธีรงคเลขผิวบาง หรือ thin layer chromatography, high-performance liquid chromatography เป็นต้น นอกจากนี้อาจใช้เทคนิคทางโมเลกุล ใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (PCR-RFLP) มาแยกแยะกระท่อมออกจากพืชสกุล *Mitragyna* spp. อื่นๆ[8,18]

มีรายงานการพัฒนาวิธีวิเคราะห์พืชกระท่อมทั้งในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพวิธีโครมาโตกราฟีเป็นเทคนิคที่มีการใช้อย่างแพร่หลาย โดยการใช้สาร mitragynine เป็น marker การวิเคราะห์ทำได้ในตัวอย่างหลายชนิด เช่น ตัวอย่างพืชกระท่อม ผลิตภัณฑ์ที่มีพืชกระท่อมเป็นส่วนประกอบ รวมถึงการวิเคราะห์หาสาร mitragynine และสารเมตาบอไลท์ในเลือดและปัสสาวะ เทคนิคที่มีการรายงาน เช่น high performance liquid chromatography (HPLC) เป็นวิธีที่นิยมตรวจมากที่สุดร่วมกับเครื่องตรวจวัดชนิดต่างๆ เช่น UV, diode array detector (DAD) และ MS[19,37,39,40,42,48] นอกจากนี้ยังมีการใช้ gas chromatography (GC) ร่วมกับเครื่องตรวจวัดมวลโมเลกุล (MS detector)[35] การใช้ supercritical fluid chromatography ร่วมกับ DAD[20] และเทคนิค direct analysis in real time ร่วมกับ MS spectrometry (DART-MS) สำหรับตรวจสอบพืชกระท่อมในเชิงคุณภาพ วิธีการเหล่านี้เป็นวิธีที่มีความไวสูงสามารถวิเคราะห์ได้ในระดับไมโครกรัม (µg) จนถึงนาโนกรัม (ng)

นอกจากวิธีโครมาโตกราฟีแล้ว มีรายงานการวิเคราะห์สาร mitragynine ในพืชกระท่อมด้วยเทคนิค enzyme linked-immunosorbent assay (ELISA) ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้ในระดับไมโครกรัม (µg)[8]

**4.การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)[14,26,27]**

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation) หมายถึง กระบวนทางห้องปฏิบัติการเพื่อยืนยันคุณลักษณะเฉพาะของวิธีวิเคราะห์ (Method performance characteristics) และประเมินด้วยวิธีการทางสถิติว่าวิธีวิเคราะห์มีความถูกต้อง เหมาะสมตามวัตถุประสงค์ของการใช้งาน

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์(Method Validation) จำเป็นอย่างยิ่งในกรณีต่อไปนี้

- วิธีทดสอบที่ไม่ใช่วิธีมาตรฐาน เป็นวิธีที่ยังไม่ได้รับการยอมรับทั่วไปในวงการที่เกี่ยวข้อง เช่น วิธีที่ห้องปฏิบัติการพัฒนาเอง วิธีที่ห้องปฏิบัติการปรับเปลี่ยนหรือดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน
- วิธีทดสอบที่ใช้นอกขอบเขตวิธีมาตรฐาน
- เมื่อผลการควบคุมคุณภาพภายในห้องปฏิบัติการแสดงให้เห็นว่าวิธีทดสอบมีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม
- การนำไปใช้ต่างห้องปฏิบัติการหรือต่างเครื่องมือ
- เมื่อต้องการแสดงให้เห็นว่าวิธีสองวิธีไม่แตกต่างกัน เช่น วิธีใหม่กับวิธีมาตรฐาน

สถิติขั้นพื้นฐานที่ใช้ในการทดสอบความใช้ได้ของวิธี ได้แก่

-Mean (ค่าเฉลี่ย)

-Standard deviation (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

-Variance (ค่าความแปรปรวน)

Relative standard deviation (RSD) or Coefficient of variance (CV)

**พารามิเตอร์ที่มักจะศึกษาใน Method Validation**

1) Specificity/Selectivity

Specificity ของวิธีสามารถทดสอบได้โดยใช้ blank matrix ที่เติมสารนอกเหนือจากการวิเคราะห์ลงในตัวอย่าง เพื่อตรวจสอบว่าสารอื่นๆสามารถถูกตรวจวัดได้ด้วยวิธีที่ทดสอบหรือไม่ การตรวจไม่พบสัญญาณรบกวนจาก blank matrix หรือสารอื่นๆแสดงให้เห็นว่าวิธีที่ทดสอบมีความจำเพาะ (selective and specific) อย่างไรก็ตามการมีสัญญาณรบกวนเล็กน้อย เป็นสิ่งที่ยอมรับได้ถ้าค่าความเที่ยงและความแม่นยำที่ lower limit of quantitation (LLOQ) อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ ได้ (±20%)

2) Range คือ ช่วงความเข้มข้นระหว่างค่าสูง และค่าต่ำของสารที่ต้องการทดสอบที่เป็นเส้นตรงและสามารถวิเคราะห์ปริมาณของสารในช่วงดังกล่าวได้อย่างถูกต้องและ แม่นยำ สำหรับเกณฑ์ที่ยอมรับ ประเมินค่าจาก correlation coefficient ของ regression line ค่าที่ได้ควรมากกว่า 0.995

3) ความสัมพันธ์อย่างเป็นเส้นตรง (Linearity) คือ ความสามารถของวิธีทดสอบที่ให้ผลทดสอบเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารที่มีอยู่จริงภายในช่วงความเข้มข้นที่กำหนด วิธีการคือ เตรียมอย่างน้อย 5 ความเข้มข้น ในช่วง 25-120 %

4) LOD (Limit of Detection) หรือขีดจำกัดในการตรวจพบ เป็นปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดที่เครื่องสามารถตรวจพบได้ แต่ไม่สามารถแสดงปริมาณได้อย่างมีAccuracy หรือ Precision เป็นค่าที่ต่างจากค่าศูนย์ และมากกว่าค่าความไม่แน่นอนของวิธีทดสอบ จำเป็นสำหรับวิธีวัดสารที่มีปริมาณน้อยมาก มีความสำคัญทั้งการทดสอบเชิงคุณภาพ (Qualitative test) และเชิงปริมาณ (Quantitative test) ตัวอย่างสำหรับทดสอบ LOD อาจเป็นสารมาตรฐาน วัสดุควบคุมคุณภาพภายในห้องปฏิบัติการ วัสดุควบคุมคุณภาพการทดสอบความชำนาญทางห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างส่งตรวจที่อยู่ในสภาพดีหรือ spiked sample

โดยทั่วไปจะเป็นระดับความเข้มข้นของสารที่ให้สัญญาณเป็น 3 เท่าของ SD ของ blank เหนือค่าเฉลี่ยสัญญาณของ blank

5) LOQ (Limit of Quantitation) หรือขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ เป็นปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดที่ของสารที่ทดสอบ ซึ่งสามารถหาปริมาณได้ โดยที่มี Accuracy และ Precision เป็นที่ยอมรับ สามารถแสดงค่าความไม่แน่นอนของการทดสอบได้

โดยทั่วไปจะเป็นระดับความเข้มข้นของ สารที่ให้ สัญญาณเป็น 10 เท่าของ SD ของ blank เหนือค่าเฉลี่ยสัญญาณของ blank

6) Accuracy เป็นคุณสมบัติที่บ่งบอกความใกล้เคียงระหว่างค่าเฉลี่ยผลการทดสอบที่ได้กับค่าอ้างอิงที่ยอมรับ โดยทั่วไปจะมีความสัมพันธ์กับค่าความเบี่ยงเบน (Bias) คือจะแปรผกผันกับค่าความเบี่ยงเบน (Bias)

การทดสอบ Accuracy ทำโดยทดสอบเปรียบเทียบกับวัสดุอ้างอิง ทดสอบเปรียบเทียบวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธีอ้างอิง หรือทำ Recovery Test

- ทดสอบเปรียบเทียบกับวัสดุอ้างอิง (Reference Material; RM) ที่ทราบค่าความเข้มข้นของสารที่กำลังศึกษา ซึ่งวัสดุอ้างอิงควรจะสอบกลับ (traceable) ไปยังระบบมาตรฐานสากล หากเป็นไปได้ควรสอบกลับได้ถึง SI unit วัสดุที่สอบกลับได้ถึง SI unit จัดเป็นวัสดุอ้างอิงรับรอง (Certified Reference Material; CRM)
- ทดสอบเปรียบเทียบวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธีอ้างอิง เช่น Reference method หรือ Standard method และวิเคราะห์ข้อมูลผลการทดสอบโดยใช้สถิติที่เหมาะสม
    - <u>กรณีการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์</u> ตัวอย่างทดสอบจำนวนไม่น้อยกว่า 20 ตัวอย่าง โดยทั่วไปทดสอบมากกว่า 40 ตัวอย่าง การวิเคราะห์ผล อาศัยการสร้าง Scatter Diagram และการสร้าง Difference
    - <u>กรณีการทวนสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์</u> ทำการทดสอบในลักษณะเดียวกันกับการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ แต่ใช้ตัวอย่างประมาณ 20 ตัวอย่างก็เพียงพอ
- Recovery Test (ตรวจสอบค่ากลับคืน) เป็นคุณสมบัติที่บ่งบอกประสิทธิภาพของวิธีทดสอบในการวัดปริมาณสารที่ต้องการตรวจที่มีอยู่ในตัวอย่างทั้งหมด ทำโดยการเติมสารที่ต้องการตรวจที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ ใน Working range อย่างน้อย 3 ระดับลงใน Sample blank (Unspiked) แล้วทดสอบ จากนั้นคำนวณหา % recovery ของสารที่เติมลงไป โดยมีเกณฑ์การยอมรับ %Recovery ที่ 70 - 120% และ %CV ไม่เกิน 20% การหาค่า Recovery เป็นวิธีที่ยอมรับได้ระดับหนึ่งในการศึกษา Accuracy ในกรณีที่ไม่สามารถหา RM หรือ CRM ที่เหมาะสมได้

7) Precision เป็นคุณลักษณะเฉพาะของวิธีที่แสดงความใกล้เคียงกันของผลการวิเคราะห์ซ้ำภายใต้สภาวะที่กำหนด โดยทั่วไปทำการทดสอบ 3 สภาวะ

- Repeatability (Within run precision) หมายถึง การทดสอบซ้ำ ๆ ภายใต้สภาวะคงที่ ทำโดยห้องปฏิบัติการเดียวกัน ตัวอย่างเดียวกัน ภาวะแวดล้อมเดียวกัน ผู้ทดสอบคนเดียวกัน และภายใต้เวลาใกล้เคียงกัน

- Intermediate Precision (Between run precision) เป็นการทดสอบโดยใช้ตัวอย่างเดิม ทำในสถานที่เดิม แต่มีการเปลี่ยนแปลงสภาวะบางประการ เช่น เปลี่ยนผู้ทดสอบ เครื่องมือ หรือเปลี่ยน รอบการทดสอบ
- Reproducibility (Inter-laboratory precision) เป็นการทดสอบตัวอย่างเดิม แต่ต่างห้องปฏิบัติการ

**5.งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**

Hooper พบอัลคาลอยด์ Mitragynine ในใบพืช Mitragyna Speciosa จากนั้น Field ได้ค้นพบวิธีสกัดและแยกอัลคาลลอยด์ดังกล่าว และตั้งชื่อว่า Mitragynine [8,21] ต่อมา Grewel ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ Mitragynine ต่อเนื้อเยื่อสัตว์ทดลอง และพบว่า Mitragynine ลดแรงบีบ (Tone) และเพิ่มความแรง (Amplitude) ของกล้ามเนื้อเรียบ จึงมีฤทธิ์ทำให้เกิดการชาเฉพาะที่ได้ และยังมีฤทธิ์ฆ่าโปรโตซัวทั่วไปได้ แต่ไม่ฆ่าแบคทีเรียและโปรโตซัวที่ทำให้เกิดโรคในมนุษย์ และยังมีฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลางคล้ายโคเคน [22,23]

และในปีค.ศ. 1934 Marcan ทำการวิจัยกับกลุ่มอาสาสมัครชาย 6 คน โดยให้ mitraynine acetate 50-100 mg. เปรียบเทียบกับผงบดใบกระท่อมแห้ง 650-1,300 mg. ผลการศึกษาพบว่าการให้ทั้งสองรูปแบบให้ผลเหมือนกัน คือ ลดเวลาการเกิดปฏิกิริยาต่อสิ่งเร้า เพิ่มความอดทนต่อสิ่งเร้า เพิ่มสมรรถภาพในการทำงาน ผิวหนังเป็นสีแดงเนื่องจากเกิดการขยายหลอดเลือดบริเวณผิวหนัง [8] ซึ่งสอดคล้องกับ นพ.ประยูร นรการผดุง ที่ทำการศึกษาในผู้ติดใบกระท่อมจำนวน 3 ราย ที่เข้ารับการรักษาบำบัดในโรงพยาบาลธัญญารักษ์ การศึกษาพบว่า ผู้เสพใบกระท่อมจนติดจะรู้สึกประสาทมึนชา จิตใจหนักแน่น อารมณ์รื่นเริงแจ่มใส หายปวดเมื่อย มีแรง และเพลิดเพลินกับการทำงานโดยไม่รู้สึกเหนื่อยหรือหิว สามารถทนความร้อนจากแสงแดดได้ดี กลัวฝนแต่ไม่กลัวน้ำ [8]

Amttayakul พบว่าโดยประมาณเฉลี่ยใบกระท่อม 1.7 มก. จะมีสาร Mitragynine ประมาณ 0.85 มก.หรือร้อยละ 0.5 Joshi และคณะ ได้รายงานสูตรโครงสร้างของ Mittragynine ว่าเป็น Indolealkaloid ที่มีกลุ่ม Methoxy ในตำแหน่ง C-19 และ E ring เป็นวงเปิด [8]

ค.ศ. 1966 นพ.ประยูร นรการผดุง ได้รายงานการใช้กระท่อมเพื่อทดแทนมอร์ฟีนในการรักษาผู้ติดยาเสพติดในประเทศไทย โดยกระท่อมมีฤทธิ์อ่อนและสั้นกว่ามอร์ฟีน และยังอันตรายน้อยกว่าโคเคน อาการขาดยาเกิดน้อยกว่ายาจำพวกฝิ่น โดยกล่าวกันว่า กระท่อมมีฤทธิ์กระตุ้นประสาทเหมือนการเคี้ยวใบโคคา และมีฤทธิ์การกดประสาทเหมือนฝิ่นและกัญชา เมื่อบริโภคนานๆ ทำให้ผิวหนังเกรียมคล้ำ หน้าซีดเขียว ท้องผูกเป็นประจำอุจจาระเป็นสีดำเป็นเม็ดคล้ายมูลแพะ เมื่อไม่ได้เสพจะหงุดหงิด ฟุ้งซ่าน ฉุนเฉียว กระวนกระวาย ซึมเศร้า มึนงง อ่อนเพลียนอนไม่หลับ เบื่ออาหาร [8] เช่นเดียวกับ Macko และคณะ[29] ได้รายงานฤทธิ์ระงับปวดและแก้ไอได้ดีพอๆกับโคเดอีนในขนาดเท่ากัน แต่ไม่ทำให้อาเจียนหรือหายใจขัด และไม่ทำให้เกิดอาการติดเหมือนฝิ่น การทดสอบในสุนัข พบว่าไม่มีผลต่อความดันโลหิต แต่ในแมวทำให้ความดันโลหิตลดลง เมื่อให้ไมทราไจนีนในขนาดสูงจะกดระบบทางเดินหายใจน้อยกว่าโคเดอีน การทดสอบใน Miceพบว่าการฉีด Mitragynine ตรงเนื้อเยื่อใต้ผิวหนัง ผลคือให้ผลการแก้ปวดได้น้อยกว่าการให้ทางปากซึ่งแสดงให้เห็นว่า เมตตาบอไลท์ของสารไมทราไจนีนน่าจะออกฤทธิ์แก้ปวดได้ดีกว่าตัวไมทราไจนีนเอง และต่อมา Raffauf [50] ได้ทำการทดสอบในอาสามาสมัครชาย 5 คน พบว่าผลของใบกระท่อมมีฤทธิ์คล้ายโคเคนเช่นเดียวกัน

Shellard รวบรวมข้อมูลที่มีการตรวจพิสูจน์หาสารอัลคาลอยด์ในใบกระท่อมพบอัลคาลอยด์ในใบกระท่อมถึง 40 ชนิด จากข้อมูล 30 แหล่ง จากนั้น นิวัติ แก้วประดับ (1974) ได้สกัดสารอัลคาอยด์จากใบกระท่อมสดโดยใช้ตัวสกัดเป็นแอลกอฮอล์ พบสารอัลคาลอยด์ในใบกระท่อมสดถึง 9 ชนิด ได้แก่ Mitragynine, Paynantheine, Speiogynine, mitracilliatine, Ajmalicine, Isopteropodine, Isomitraphyline, Mitaphyline และ Tetrahydroalitonine ซึ่งไม่เคยมีรายงานการพบมาก่อน เนื่องจากมีวามคงตัวไม่ดี จึงพบได้เฉพาะในใบสดเท่านั้น [31]

วิเชียร ทดสอบพิสูจน์หากลไลในการออกฤทธิ์แก้ปวดของสาร Mitragynine ที่สกัดจากใบกระท่อมในหนู พบว่า กลไลการออกฤทธิ์เกิดขึ้นในระบบประสาทส่วนกลางโดยี่อาจมีการจับกับตัวรับใน 2 ตำแหน่ง คือ 5-$HT_2$ Recepter, $\alpha_2$- Recepter [8]

Chan c และคณะ ได้ทำการตรวจพิสูจน์สาร Mitragynine จากใบกระท่อมหรือผงกระท่อมสกัดด้วย CHCl3/methanol โดยใช้เทคนิค Gas Chromatography–Mass Spectrometry [33] ต่อมา Philipp และคณะ ได้ใช้เทคนิคเช่นเดียวกับ Chan พิสูจน์หาสารอัลคาลอยด์ในเลือดและปัสสาวะของหนู พบสาร Mitragynine, Paynantheine, Speciogynine, Speciociliatine มีค่า LOD เท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร [34]

Janchawee และคณะ ทำการวิเคราะห์หาสาร Mitragynine ในเลือดของหนู โดยใช้เทคนิค High Performance Liquid Chromatography-UV มีค่า LOD เท่ากับ 0.03 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่า LOQ เท่ากับ 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร [35] และในปี 2010 Parthasarathy และคณะ ได้นำเทคนิคเดียวกันมาศึกษา แต่มีค่า LOD และ LOQ ต่ำลง คือ LOD เท่ากับ 0.025 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่า LOQ เท่ากับ 0.050 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร [36]

Chittrakra และคณะ ใช้เทคนิค High Performance Liquid Chromatography-Diode array detector (DAD) มาตรวจสาร Mitragynine ในน้ำต้มกระท่อม มีค่า LOD เท่ากับ 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่า LOQ เท่ากับ 3.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และตรวจสาร Mitragynine ในใบกระท่อม มีค่า LOD เท่ากับ 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่า LOQ เท่ากับ 0.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร [37,38] เช่นเดียวกับ Ranggasamy R และคณะ[49] ที่ได้นำวิธีการตรวจ HPLC-DAD-UV มาใช้ในการศึกษา pharmacognostic และ physicochemical เช่นกัน

Kikura-Hanajiri และคณะ[39] ได้นำเทคนิค High Performance Liquid Chromatography-Mass spectrometry (HPLC-MS) ตรวจพิสูจน์สาร Mitragynine และ 7-hydroxymitragynine ในใบกระท่อมและสารสกัดกระท่อมสำเร็จรูป พบว่าเทคนิค HPLC-MS สามารถตรวจ Mitragynine และ 7-hydroxymitragynine โดยมีค่า Linearity เท่ากับ 1.0-10.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ0.01-1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วน Sudheedibu และคณะ [43] ก็ได้นำเทคนิค ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) มาใช้ในการวิเคราะห์กระท่อม ซึ่งพบว่าวิธีนี้เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์ไมทราไจนีนและ 7-hydroxymitragynine มีค่า Linerity อยู่ในช่วงความเข้มข้น 10 - 100 ng/mL

Lu และคณะ ใช้เทคนิค HPLC-MS/MS วิเคราะห์หา Mitragynine ในปัสสาวะของมนุษย์ ได้ค่า LOD เท่ากับ 0.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า LOQ เท่ากับ 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร [40] สอดคล้องกับ Arndt และคณะ แต่ผลการทดลองมีค่า LOD เท่ากับ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า LOQ เท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร[41] ส่วน Moraes.D และคณะ ได้นำเทคนิคนี้วิเคราะห์ใน

เลือดของหนู ผลการทดลองมีค่า LOD เท่ากับ 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร [42] ส่วนผลการทดลองของ Hanzhuo Fu ได้ค่าlinearity of >0.99 และค่า LOD เท่ากับ 0.002581 ng/mL [46]

LImsuwanchote และคณะนำเทคนิค ELISA มาตรวจสาร Mitragynine ในใบกระท่อม มีค่า LOD เท่ากับ 32.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า LOQ เท่ากับ 32.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร [28]

Scott T.M. และคณะ. ทดสอบหาปริมาณสารอัลคาลอยด์ในกระท่อม โดยใช้วิธี Thin layer chromatography โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ chloroform/methanol (9:1) พบมีค่า Rf เฉลี่ยอยู่ที่ 0.79 และตรวจยืนยันโดยใช้วิธี Gas chromatography–mass spectrometry พบว่าใบกระท่อมแห้งมีปริมาณสาร mitragynine ต่ำ ในขณะที่ตัวอย่างที่เป็นผงมีปริมาณมากกว่าถึง 10 เท่า [44]

วราพงษ์ และคณะ ได้ทำการตรวจพิสูจน์ mitragynine เชิงคุณภาพในน้ำต้มกระท่อมด้วยเทคนิค thin layer chromatography โดยเปรียบเทียบการใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ 3 ชนิด ซึ่งพบว่าใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ hexane : ethyl acetate ในสัดส่วน 6:4เหมาะสมที่สุด และการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ของ gas chromatography ชนิด FID detector ด้วยวิธีดัดแปลงสามารถใช้แทนการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง gas chromatography ชนิด mass detector ได้ [45]

Hanzhuo Fu และคณะ ได้นำวิธีการตรวจแบบ Direct Infusion Electrospray Ionization Triple Quadrupole Mass Spectrom มาเพื่อทดสอบ Pharmacokinetic และสารเมตาบอไลน์ของกระท่อมด้วยพบว่า สามารถนำวิธีนี้มาใช้ได้และเป็นวิธีที่รวดเร็วและให้ผลแม่นยำเช่นกัน [47]

# บทที่ 3
# วิธีดำเนินการวิจัย

## 1. อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมี(Material, Instrument and Reagent)

### 1.1. สารเคมี

- **สารมาตรฐาน**

| | |
|---|---|
| Mitragynine | โครงการจัดตั้งสถาบันวิจัยและนวัตกรรมทางการแพทย์ สำนักวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ |

- **สารเคมีอื่น ๆ ที่ใช้**

| | |
|---|---|
| 100 % methanol (HPLC grade) | Merck, Germany |

### 1.2. อุปกรณ์ และเครื่องมือ

เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง (HPLC) ยี่ห้อ Agilent Technologies รุ่น 1260 บริษัท Agilent Technologies, Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งประกอบด้วย

- Detector : AB SciX API 3200 triple quadrupole ESI/MS/MS
- Column : Shimadzu Shim-pack GIST-HP C18 (150mm. x 3.0 mm.,D 3 µm.)
- Software : analyst software,version 1.4.2

เครื่องหมุนเหวี่ยง ความเร็วรอบที่ 15,000 rpm. 10°C, 20 min

<u>สภาวะของเครื่อง HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์</u>

- Moblie phase A : Methanol
- Moblie phase B : 10 mM ammonium acetate containing 0.1 % formic acid
- Injection : 5 µL,
- Column Temperature : 40 °C
- Flow rate : 0.5 mL/min
- Retention time : 2.98 min

- Gradient program : 0-3 min, 95% B to 100% B, 3.1, 95%B until 6 min.

| Time (min) | A (%) | B (%) |
|---|---|---|
| **0** | 5 | 95 |
| **3** | 0 | 100 |
| **3.1** | 5 | 95 |
| **6** | 5 | 95 |

Vortex

ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลลเซียส

Nylon membrane filter (ขนาด 0.22 µm) : Whatman Limited Maidstone, England

**LC MS/MS condition:**

| **MS/MS parameters** | **mitragynine** | **Abbreviations** |
|---|---|---|
| **Polarity** | Positive | MG |
| **MS mode** | Multiple Reaction Monitoring (MRM) | |
| **Precursor ion (m/z)** | 399.3 | |
| **Product ion (m/z)** | 174.4*, 238.2, 159.0 | R1, R2, R3 |
| **Ion spray voltage (V)** | 5500 | |
| **Ion source temperature (°C)** | 550 | |
| **Collision energy (eV)** | (R1=38.9, R2=36.8, R3=67) | CE |
| **CxP** | (R1=3.19, R2=3.95.8, R3=3.48) | CxP |
| **Decluttering potential (V)** | 76 | DP |
| **EP** | 7 | EP |
| **CEP** | 16.3 | CEP |
| **Collision gas** | 6 | |
| **Ion source gas 1** | 40 | GS1 |
| **Ion source gas 2** | 50 | GS2 |

***Quantitation ion (399.3>174.4)**

**2. การเตรียมสารละลายเพื่อใช้ในงานวิจัย**

2.1. <u>การเตรียมสารมาตรฐาน</u>

- Stock Solution 100 µg/mL : เตรียม Stock solution จากสารมาตรฐานไมทราไจนีน (Mitragynine) แล้วปรับปริมาตรด้วย methanol ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- Working standard : ปิเปต stock solution โดยเจือจางและปรับปริมาตรด้วย 100% methanol ให้ได้สารละลายผสมที่ความเข้มข้น 0.0781, 0.156, 0.195, 0.391, 0.781, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5 และ 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

สารละลายมาตรฐานที่เตรียมจะถูกเก็บรักษาไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สารละลายมาตรฐานทุกความเข้มข้นถูกนำไปกรองผ่าน Nylon filter ขนาด 0.22 ไมครอน ก่อนนำไปวิเคราะห์

2.2. <u>การเตรียมตัวอย่างปัสสาวะ</u>

1) แบ่งตัวอย่างปัสสาวะ 1 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ 15,000 rpm อุณหภูมิ 10°C เป็นเวลา 20 นาที
2) เก็บ supernatant จำนวน 800 ไมโครลิตร นำไปกรองผ่าน Nylon filter ขนาด 0.22 ไมครอน
3) นำตัวอย่างปัสสาวะที่กรองแล้ว 20 ไมโครลิตร ไปปรับปริมาตรด้วย 100%methanol จำนวน 980 ไมโครลิตร
4) นำไปกรองผ่าน Nylon filter ขนาด 0.22 ไมครอน อีกครั้งก่อนนำไปวิเคราะห์

2.3. <u>การเตรียมสารละลาย Spiked sample</u>

เติมสารละลายมาตรฐานไมทราไจนีนลงในปัสสาวะปกติที่ไม่มีสารที่ต้องการทดสอบผสมอยู่ โดยเติมในระดับความเข้มข้น 1.5, 15, 150 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (เตรียมเช่นเดียวกับการเตรียมตัวอย่างปัสสาวะ)

**3. วิธีการทดลอง**

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณสารไมทราไจนีนในปัสสาวะของผู้ใช้กระท่อมเรื้อรัง แบ่งออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่

- การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นโดยประเมินผลตามเกณฑ์การยอมรับของ AOAC guideline
- การหาวิเคราะห์หาปริมาณสารไมทราไจนีนในปัสสาวะของผู้ใช้กระท่อมเรื้อรัง

3.1. <u>การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์</u>

1) การทดสอบความเป็นเส้นตรงละช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity) และการหาช่วงการวิเคราะห์ (Working Range)

นำ Working standard ที่เตรียมไว้ที่จำนวน 10 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.0781, 0.156, 0.195, 0.391, 0.781, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5 และ 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเตรียมความเข้มข้นละ 8 ซ้ำ นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้พีค สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีค คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r) ซึ่งต้องไม่น้อยกว่า 0.995

2) การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) และการทดสอบความเที่ยง (Precision)

- ความทำซ้ำได้ (Repeatability)
  วิเคราะห์ปริมาณสารไมทราไจนีนในปัสสาวะที่ 3 ระดับความเข้มข้น คือ 1.5, 15 และ 150 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดสอบ 9 ซ้ำ คำนวณปริมาณสารไมทราไจนีน ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) โดย %CV ต้องไม่เกิน ± 2%
- Intermediate Precision
  วิเคราะห์ปริมาณสารไมทราไจนีนในปัสสาวะที่ 3 ระดับความเข้มข้น คือ 1.5, 15 และ 150 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดสอบ 9 ซ้ำ คำนวณปริมาณสารไมทราไจนีน ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) โดย %CV ต้องไม่เกิน ± 2%

3) การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit od detection; LOD) และการหาขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation; LOQ) โดยการตรวจสอบจากกราฟมาตรฐานของสารไมทราไจนีน standard ที่ระดับความเข้มข้น 0.0781, 0.156, 0.195, 0.391, 0.781, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5 และ 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, $SD_{Yint}$) แล้ว

$$\text{คำนวณค่า LOD จากสมการ LOD} = \frac{\mathbf{3.3SDYint}}{\boldsymbol{means}}$$

$$\text{คำนวณค่า LOQ จากสมการ LOQ} = \frac{\mathbf{10\ SDYint}}{\boldsymbol{means}}$$

4) การทดสอบร้อยละของการคืนกลับ (Percent recovery) คำนวณค่า % recovery โดยการเติมสารมาตรฐานไมทราไจนีนในตัวอย่างปัสสาวะ (blank urine) ที่ 3 ระดับความเข้มข้น คือ 0.391, 1 และ 1.5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดสอบ 8 ซ้ำ คำนวณค่าเฉลี่ยของ peak areas ด้วยโปรแกรม เกณฑ์การยอมรับอยู่ในช่วงร้อยละ 90 – 108%

3.2. <u>การหาวิเคราะห์หาปริมาณสารไมทราไจนีนในปัสสาวะของผู้ใช้กระท่อมเรื้อรัง</u>

1) การศึกษาการตรวจสารไมทราไจนีนในปัสสาวะของมนุษย์โดยใช้เทคนิค HPLC

การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาการตรวจหาสารไมตราไจนีนในปัสสาวะของมนุษย์โดยใช้เทคนิคโครมาโทรกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงในผู้ใช้กระท่อมแบบเรื้อรัง (Chronic Kratom Abuse) ในภาคใต้ ระหว่างเดือน มีนาคม ถึงมิถุนายน พ.ศ. 2562

2) กลุ่มประชากรที่ศึกษา

<u>ตัวอย่างของปัสสาวะ</u>ในผู้ใช้กระท่อมแบบเรื้อรัง (Chronic Kratom Abuse) ในภาคใต้ จำนวน 30 ราย เวลาทั้งหมดประมาณ 4 เดือน โดยเริ่มเก็บข้อมูลในเดือนมีนาคม ถึงมิถุนายน 2562

การเลือกกลุ่มประชากรตัวอย่างเป็นการเลือกแบบเฉพาะเจาะจง (Purposive samling) จำนวน 30 ราย โดยมีมีเกณฑ์คัดเลือกอาสาสมัครที่เข้าเกณฑ์เข้าร่วมโครงการ ตามเกณฑ์ที่ระบุไว้ดังนี้

- เป็นผู้ที่สมัครใจเข้าร่วมโครงการวิจัย
- เป็นผู้ป่วยเสพกระท่อมก่อนเข้าร่วมโครงการไม่น้อยกว่า 6 เดือนและเสพกระท่อมครั้งสุดท้ายไม่เกิน 2-3 ชั่วโมงก่อนการเก็บตัวอย่างปัสสาวะ
- มีสติสัมปชัญญะสมบูรณ์ สามารถติดต่อสื่อสารภาษาไทยได้

3) การเก็บตัวอย่างปัสสาวะของผู้ใช้กระท่อมเรื้อรัง

การเก็บข้อมูลใช้เวลาทั้งหมดประมาณ 4 เดือน โดยเริ่มเก็บข้อมูลในเดือนมีนาคม ถึงมิถุนายน 2562 ขั้นตอนในการเก็บตัวอย่างวิจัย ดังนี้

1.1) คณะผู้วิจัย คัดเลือกกลุ่มตัวอย่างโดยใช้แบบสอบถามทั่วไป เพื่อคัดเลือกอาสาสมัครที่เข้าเกณฑ์เข้าร่วมโครงการ ตามเกณฑ์ที่ระบุไว้ดังนี้

- เป็นผู้ที่สมัครใจเข้าร่วมโครงการวิจัย
- เป็นผู้ป่วยเสพกระท่อมก่อนเข้าร่วมโครงการไม่น้อยกว่า 6 เดือนและเสพกระท่อมครั้งสุดท้ายไม่เกิน 2-3 ชั่วโมงก่อนการเก็บตัวอย่างปัสสาวะ
- มีสติสัมปชัญญะสมบูรณ์ สามารถติดต่อสื่อสารภาษาไทยได้

1.2) อาสาสมัครที่เข้าเกณฑ์ ทำการเก็บตัวอย่างปัสสาวะจำนวน 50 มิลลิลิตร โดยผู้เข้าร่วมการวิจัยจะต้องเก็บปัสสาวะจำนวน 50 มิลลิลิตร โดยการเก็บปัสสาวะช่วงกลาง คือความสะอาดบริเวณอวัยวะขับถ่ายปัสสาวะ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนที่อาจมีผลต่อการตรวจ จากนั้นเลือกเก็บเฉพาะน้ำปัสสาวะเฉพาะช่วงกลาง โดยให้ปัสสาวะในช่วงแรกและช่วงท้ายทิ้งไป ปริมาณการเก็บประมาณ 50 มิลลิลิตร ขณะการเก็บปัสสาวะไม่ควรนำภาชนะไปสัมผัสโดนกับอวัยวะเพศหรือผิวหนังบริเวณนั้นโดยตรง เพื่อหลีกเลี่ยงเชื้อต่าง ๆ ที่อาจพบได้จากบริเวณนั้น ทำให้ผลการวิเคราะห์คลาดเคลื่อน ปิดฝาให้สนิท นำส่งคณะผู้วิจัย

1.3) จากนั้นคณะผู้วิจัยจำนำปัสสาวะของท่านไปตรวจวิเคราะห์ทันที หากไม่ได้ทำการตรวจวิเคราะห์ทันทีคณะผู้วิจัยจะเก็บรักษาตัวอย่างปัสสาวะไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ -20 $^{O}$C

1.4) และเมื่อดำเนินการวิเคราะห์เสร็จปัสสาวะจะถูกเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ -20 $^{O}$C นาน 30 วัน เพื่อใช้สำหรับทวนสอบผล เมื่อครบกำหนด 30 วันจะดำเนินการทำลายตัวอย่างปัสสาวะโดยการเทปัสสาวะทิ้งผ่านระบบท่อน้ำทิ้งของโรงพยาบาล ส่วนขวดปัสสาวะที่มีการระบุหมายเลขตัวอย่างจะมีการขีดฆ่าหมายเลขก่อน และทิ้งผ่านระบบการกำจัดขยะติดเชื้อของโรงพยาบาล

4) การเตรียมตัวอย่างปัสสาวะ

2.1) แบ่งตัวอย่างปัสสาวะ 1 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ 15,000 rpm อุณหภูมิ 10$^{\circ}$C เป็นเวลา 20 นาที

2.2) เก็บ supernatant จำนวน 800 ไมโครลิตร นำไปกรองผ่าน Nylon filter ขนาด 0.22 ไมครอน

2.3) นำตัวอย่างปัสสาวะที่กรองแล้ว 20 ไมโครลิตร ไปปรับปริมาตรด้วย 100% methanol จำนวน 980 ไมโครลิตร

2.4) นำไปกรองผ่าน Nylon filter ขนาด 0.22 ไมครอน อีกครั้งก่อนนำไปวิเคราะห์

5) การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลผลการตรวจสารไมทราไจนีนในปัสสาวะของผู้ใช้กระท่อมเรื้อรัง (Chronic Kratom Abuse) โดยวิธีการตรวจที่เลือกมาใช้ โดยทำการตรวจวิเคราะห์ปัสสาวะจากกลุ่มอาสาสมัคร จำนวน 30 คน

# บทที่ 4
# ผลการทดลอง

## 1. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นโดยประเมินผลตามเกณฑ์การยอมรับของ AOAC guideline

จากการศึกษาค่าพารามิเตอร์ที่สำคัญในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์แสดงผลดังนี้

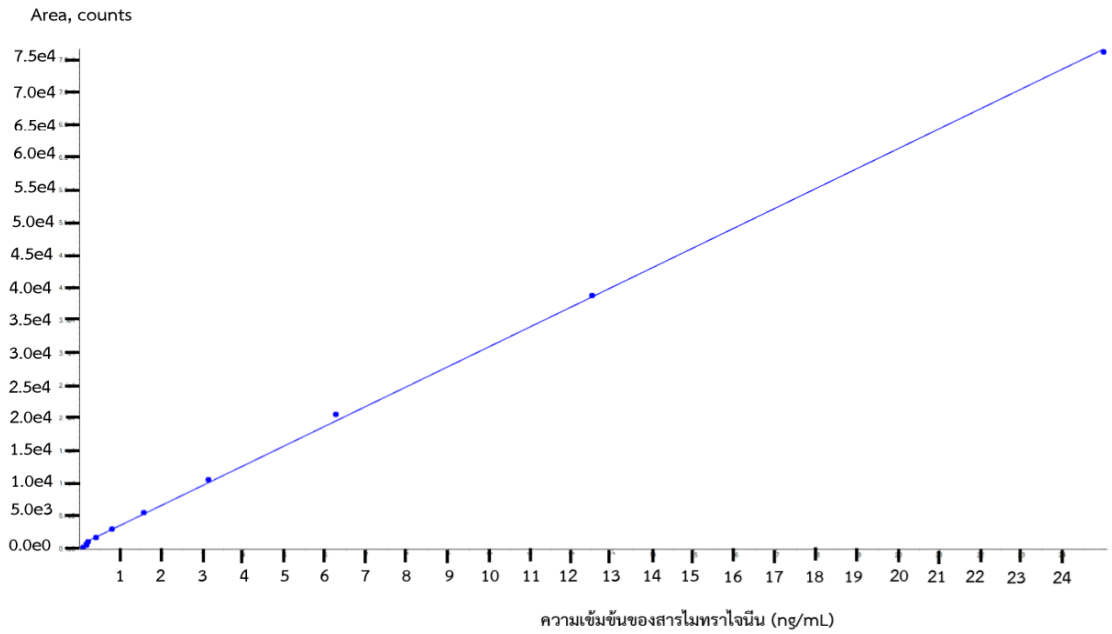
### 1.1. การทดสอบความเป็นเส้นตรงละช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity) และช่วงของการวิเคราะห์ (Working Range)

ความเป็นเส้นตรงจะแสดงด้วยกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่าง Peak area กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานไมทราไจนีน ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ขึ้นอยู่กับความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน ซึ่งแสดงโดยค่าถดถอยเชิงเส้น ($R^2$) และสามมารถหาความเข้มข้นของตัวอย่างโดยการคำนวณจากสมการ Y = mX + c ที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

ผลการศึกษากราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณสารไมทราไจนีนแสดงได้ดังแสดงในตาราง 2 และรูปที่ 10 จากการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานในช่วงความเข้มข้น 0.0781 – 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรของสารไมทราไจนีน พบว่าช่วงดังกล่าวมีสมการเชิงเส้นเฉลี่ย คือ y = 3.04e+003 x + 614 มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ R เท่ากับ 0.9998

| Spiked concentration (ng/mL) | Calculated concentration (ng/mL) | % Recovery | SD | %CV |
|---|---|---|---|---|
| **0.0781** | N/A | N/A | N/A | N/A |
| **0.156** | 0.123 | 94.07 | 11.77 | 12.51 |
| **0.195** | 0.166 | 92.20 | 6.06 | 6.58 |
| **0.391** | 0.4 | 102.03 | 0.29 | 0.28 |
| **0.781** | 0.74 | 98.43 | 1.73 | 1.77 |
| **1.56** | 1.64 | 102.40 | 1.42 | 1.34 |
| **3.13** | 3.27 | 105.37 | 1.33 | 1.26 |
| **6.25** | 6.4 | 104.73 | 2.14 | 2.04 |
| **12.5** | 12.71 | 100.63 | 1.10 | 1.09 |
| **25** | 24.84 | 99.73 | 0.67 | 0.67 |

ตารางที่ 2 แสดงผลการศึกษากราฟมาตรฐานในช่วงความเข้มข้นของสารไมทราไจนีน 0.0781- 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (n=10)




รูปที่ 10 แสดงช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานเฉลี่ย (n=10) ที่ความเข้มข้นของไมทราไจนีน 0.0781- 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

### 1.2. การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) และการทดสอบความเที่ยง (Precision)

ความแม่นยำของการวิเคราะห์สารไมทราไจนีนในปัสสาวะแสดงด้วยค่าร้อยละการกลับคืน (%Recovery) พบว่าร้อยละของการกลับคืนของวิธีวิเคราะห์สารไมทราไจนีนในปัสสาวะสำหรับการวิเคราะห์ในวันเดียวกันจำนวน 9 ซ้ำ (Intraday) ที่ 3 ระดับความเข้มข้น คือ 1.5, 15 และ 150 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า %Recovery อยู่ในช่วง 99.8-100.2 % และผลการวิเคราะห์ระหว่างวัน (Inter-day) ที่ความเข้มข้นของสารไมทราไจนีนเท่ากับ 1.5, 15 และ 150 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า %Recovery อยู่ในช่วง 97.3-98.9 % ซึ่งผ่านตามเกณฑ์การยอมรับของ AOAC (เกณฑ์กำหนดว่าค่า %Recovery Intraday และ Inter-day ต้องอยู่ในช่วง 98-102 % และ 95-105 % ตามลำดับ) ดังแสดงผลในตารางที่ 3

| Expected Conc. (ng/mL) | % Recovery | |
|---|---|---|
| | Intra-day accuracy | Inter-day accuracy |
| 1.5 | 100.25 | 98.96 |
| 15 | 99.83 | 98.80 |
| 150 | 99.78 | 97.38 |

ตาราง 3 แสดงค่าความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ภายในวัน (Intra-day accuracy) และระหว่างวัน (Inter-day accuracy) (n=9)

ความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์สารไมทราไจนีนในปัสสาวะ แสดงด้วยค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of variation; CV) พบว่า %CV ของสารไมทราไจนีนในปัสสาวะสำหรับ การวิเคราะห์ในวันเดียวกัน (Intraday precision) เป็นจำนวน 3 วัน ที่ 3 ระดับความเข้มข้น คือ 1.5, 15 และ 150นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า %CV อยู่ในช่วง 1.11-1.84% และผลการวิเคราะห์ระว่างวัน (Inter-day precision) ) เป็นจำนวน 3 วัน ที่ 3 ระดับความเข้มข้น คือ 1.5, 15 และ 150นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า %CV อยู่ในช่วง 1.71-2.36% ซึ่งผ่านตามเกณฑ์การยอมรับของ AOAC (เกณฑ์กำหนดว่าค่า %Recovery Intraday และ Inter-day ต้องอยู่ใน ± 2 %) ดังแสดงผลในตารางที่ 4

| Expected Conc. (ng/mL) | % CV | |
|---|---|---|
| | Intra-day precision | Inter-day precision |
| 1.5 | 1.84 | 2.06 |
| 15 | 1.74 | 1.71 |
| 150 | 1.11 | 2.36 |

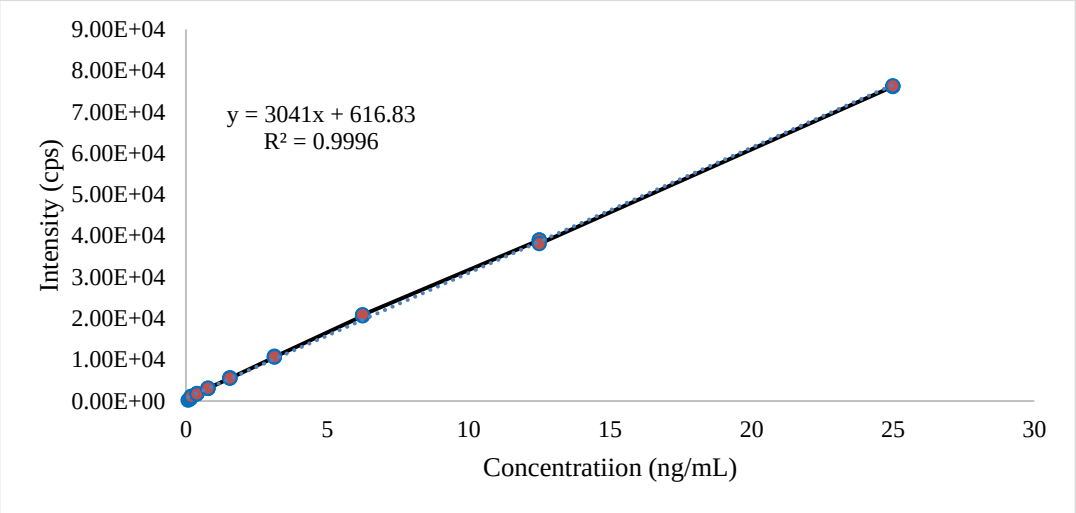
ตาราง 4 แสดงค่าความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ภายในวัน (Intra-day precision) และระหว่างวัน (Inter-day precision) (n=9)

### 1.3. การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit od detection; LOD) และการหาขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation; LOQ)

ค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) ได้จากการคำนวณ

จากสมการ LOD = $\frac{\mathbf{3.3\ SD\ Y-intercept}}{\boldsymbol{means\ slope}}$

จากการคำนวณจุดตัดของกราฟมาตรฐานที่เตรียมโดยใช้ urine blank โดยสร้างกราฟมาตรฐานที่ 10 ระดับความเข้มข้น 0.0781, 0.156, 0.195, 0.391, 0.781, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5 และ 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ระดับละ 3 ซ้ำ ได้ Y-intercept = 616.83, Slope = 3041และ $R^2$ = 0.9996 ดังแสดงผลในรูปที่ 11




รูปที่ 11 แสดงกราฟ spiked urine sample blank ที่ 10 ระดับความเข้มข้น

คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ $y_{intercept}$ จะได้ $SD_{Y\text{-}intercept}$ = 363.68 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วคำนวณค่า LOD จากสมการข้างต้น ได้ LOD = 0.395 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) = 1.196 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งได้จากการคำนวณจากสมการ LOQ = $\frac{\mathbf{10\ SD\ Y-intercept}}{\boldsymbol{means\ slpoe}}$

### 1.4. การทดสอบร้อยละของการคืนกลับ (Percent recovery)

ประสิทธิภาพของการสกัดสารไมทราไจนีนในปัสสาวะแสดงด้วยค่าร้อยละการกลับคืน (%recovery) พบว่า %recovery ของการสกัดสารไมทราไจนีนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มีค่าอยู่ในช่วง 92.4-101.3 % ซึ่งผ่านตามเกณฑ์การยอมรับของ AOAC (เกณฑ์กำหนดว่าค่า %Recovery ต้องอยู่ในช่วง 90-108 %)

| Spiked concentration (ng/mL) | Calculated concentration (ng/mL) | Retention time (RT) (min) | % recovery | SD | %CV |
|---|---|---|---|---|---|
| **0.391** | 0.361 | 3.03 | 92.36 | 8.61 | 9.33 |
| **1.0** | 1.01 | 3.03 | 101.28 | 4.21 | 4.15 |
| **1.5** | 1.52 | 3.04 | 101.17 | 8.88 | 8.78 |

ตาราง 5 แสดงค่า %recovery ของการสกัดสารไมทราไจนีนที่ความเข้มข้น 0.391, 1.0, 1.5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในปัสสาวะ (n=8)

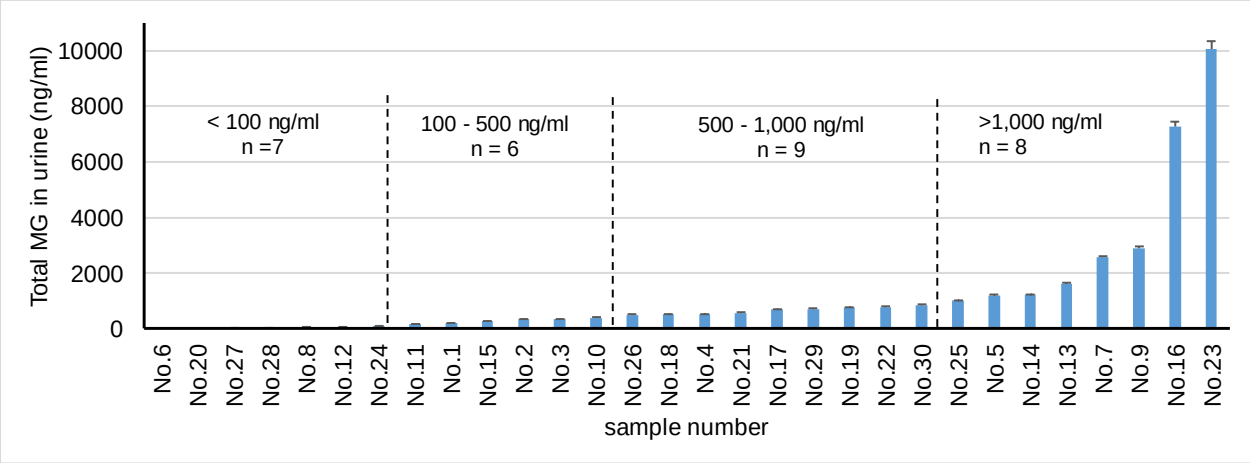
**2. การหาวิเคราะห์หาปริมาณสารไมทราไจนีนในปัสสาวะของผู้ใช้กระท่อมเรื้อรัง (Chronic Kratom Abuse)**

ศึกษาการวิเคราะห์หาปริมาณสารไมทราไจนีนในปัสสาวะของผู้ใช้กระท่อมเรื้อรังโดยการเก็บตัวอย่างปัสสาวะจำนวน 50 มิลลิลิตร ในผู้ที่ใช้กระท่อมต่อเนื่องอย่างน้อย 6 เดือน เก็บปัสสาวะหลังใช้กระท่อมมาแล้ว 2 - 3 ชั่วโมง และเก็บปัสสาวะไว้ที่อุณหภูมิ -20 $^{O}$C สกัดตัวอย่างในปัสสาวะตามขั้นตอนการเตรียมปัสสาวะ โดยวิเคราะห์ตัวอย่างปัสสาวะจำนวน 3 ซ้ำ ผลการทดลองในตารางที่ 6 พบว่า วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจหาปริมาณไมทราไจนีนในปัสสาวะของใช้กระท่อมเรื้อรังได้

| Sample Name | Total MG concentration in urine ± SD (ng/mL) | %CV |
|---|---|---|
| ตัวอย่างที่ 1 | 206.06 ± 3.21 | 1.56 |
| ตัวอย่างที่ 2 | 346.31 ± 2.34 | 0.68 |
| ตัวอย่างที่ 3 | 360.19 ± 8.62 | 2.40 |
| ตัวอย่างที่ 4 | 529.37 ± 13.23 | 2.50 |
| ตัวอย่างที่ 5 | 1206.88 ± 33.16 | 2.75 |
| ตัวอย่างที่ 6 | 11.18 ± 0.16 | 1.43 |
| ตัวอย่างที่ 7 | 2562.50 ± 40.36 | 1.57 |
| ตัวอย่างที่ 8 | 56.13 ± 1.46 | 2.60 |
| ตัวอย่างที่ 9 | 2901.25 ± 59.75 | 2.06 |
| ตัวอย่างที่ 10 | 401.81 ± 15.11 | 3.76 |
| ตัวอย่างที่ 11 | 170.69 ± 6.78 | 3.97 |
| ตัวอย่างที่ 12 | 56.64 ± 1.66 | 2.93 |
| ตัวอย่างที่ 13 | 1608.75 ± 46.89 | 2.91 |
| ตัวอย่างที่ 14 | 1221.25 ± 18.08 | 1.48 |
| ตัวอย่างที่ 15 | 291.06 ± 6.82 | 2.34 |
| ตัวอย่างที่ 16 | 7287.50 ± 162.02 | 2.22 |
| ตัวอย่างที่ 17 | 701.25 ± 12.17 | 1.74 |
| ตัวอย่างที่ 18 | 512.50 ± 5.98 | 1.17 |
| ตัวอย่างที่ 19 | 775.00 ± 17.32 | 2.23 |
| ตัวอย่างที่ 20 | 11.23 ± 0.23 | 2.01 |
| ตัวอย่างที่ 21 | 577.50 ± 11.95 | 2.07 |
| ตัวอย่างที่ 22 | 778.13 ± 19.07 | 2.45 |
| ตัวอย่างที่ 23 | 10043.75 ± 302.89 | 3.02 |
| ตัวอย่างที่ 24 | 87.54 ± 0.75 | 0.85 |
| ตัวอย่างที่ 25 | 1014.38 ± 22.75 | 2.24 |
| ตัวอย่างที่ 26 | 508.23 ± 13.47 | 2.65 |
| ตัวอย่างที่ 27 | 23.54 ± 0.37 | 1.56 |
| ตัวอย่างที่ 28 | 35.97 ± 0.75 | 2.08 |
| ตัวอย่างที่ 29 | 720.00 ± 15.35 | 2.13 |
| ตัวอย่างที่ 30 | 845.63 ± 20.26 | 2.40 |

ตารางที่ 6 ปริมาณสารไมทราไจนีนในปัสสาวะของกลุ่มตัวอย่าง Chronic Kratom Abuse

ผลการทดลองในกลุ่มอาสาสมัครจำนวน 30 คน สามารถแบ่งผลการวิเคราะห์ออกได้เป็น 4 กลุ่ม คือกลุ่มที่มีปริมาณสารไมทราไจนีนในช่วงน้อยกว่า 100 มิลลิลิกรัมต่อมิลลิลิตร, กลุ่มที่มีปริมาณสารไมทราไจนีนในช่วง 100 - 500 มิลลิลิกรัมต่อมิลลิลิตร, กลุ่มที่มีปริมาณสารไมทราไจนีนในช่วง 500 - 1,000 มิลลิลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสุดท้ายกลุ่มที่มีปริมาณสารไมทราไจนีนมากกว่า 1,000 มิลลิลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า %CV อยู่ในช่วง 0.68-3.97 ซึ่งความเข้มข้นของสารไมทราไจนีนที่ตรวจพบในกลุ่มอาสาสมัครนั้นแตกต่างกันไปขึ้นอยู่ขึ้นอยู่กับลักษณะของแต่ละบุคคลเอง ดังแสดงในรูปที่ 12




รูปที่ 12 แสดงการแบ่งกลุ่มของปริมาณสารไมทราไจนีนที่ตรวจพบ
ในกลุ่มตัวอย่าง Chronic Kratom Abuse

# บทที่ 5
# สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

โครงการวิจัยเรื่อง การพัฒนาวิธีการตรวจหาสารไมทราไจนีนในปัสสาวะของมนุษย์โดยใช้เทคนิคโครมาโทรกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารไมทราไจนีนในปัสสาวะของมนุษย์ในผู้ใช้กระท่อมเรื้อรังโดยวิธี HPLC ตรวจวัดด้วย AB SciX API 3200 triple quadrupole ESI/MS/MS และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation)

ในงานวิจัยนี้ได้นำวิธีวิเคราะห์และวิธีการสกัดสารไมทราไจนีนที่ถูกพัฒนาจากโครงการจัดตั้งสถาบันวิจัยและนวัตกรรมทางการแพทย์สำนักวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ มาใช้เป็นวิธีหลักในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารไมทราไจนีนในปัสสาวะของผู้ใช้กระท่อมเรื้อรัง (Chronic Kratom Abuse)ได้ ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างทำโดยนำตัวอย่างปัสสาวะไปหมุนเหวี่ยงแล้วนำไปกรองผ่าน Nylon filter เพื่อขจัดสิ่งปนเปื้อนต่าง ๆ ปรับปริมาตร methanol แล้วกรองอีกครั้งก่อนเข้าสู่กระบวนการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

นอกจากนี้คณะผู้วิจัย ได้ดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation) สารไมทราไจนีนในปัสสาวะ โดยการทดสอบพารามิเตอร์ในด้านต่าง ๆ ผลการทดสอบได้ผลดังนี้

การศึกษาความเป็นเส้นตรงของสารไมทราไจนีนในปัสสาวะในช่วงความเข้มข้น 0781- 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีค่า coefficient ($R^2$) = 0.9998 เฉลี่ยเท่ากับ 1 ซึ่งแสดงถึงความเป็นเส้นตรง ๆ ได้ดี สามารถนำมาเทียบเพื่อหาความเข้มข้นของตัวอย่างได้อย่างถูกต้อง

การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารไมทราไจนีนที่เครื่องสามารถตรวจพบได้ (LOD) เป็น 0.395 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นต่ำสุดของสารไมทราไจนีนที่สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณได้ (LOQ) คือ 1.196 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ความเที่ยง (Precision) และความแม่นยำ (Accuracy) ของวิธีวิเคราะห์ แสดงด้วยค่า %CV และร้อยละการกลับคืน (%Recovery) ตามลำดับ จากการทดสอบความเที่ยงและความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ไมทราไจนีนที่ความเข้มข้น 1.5, 15 และ 150 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน พบว่าการวิเคราะห์ซ้ำ ๆ กันหลาย ๆ ครั้ง แสดงค่าความแตกต่างของข้อมูลไม่เกิน 2% และแสดงค่าความแม่นยำของการวิเคราะห์อยู่ในช่วง 99.8-100.1% ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ที่นำมาใช้มีความเที่ยงและความแม่นยำสูง อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ตามเกณฑ์การยอมรับของ AOAC guideline

การศึกษาประสิทธิภาพของสกัดพบว่าวิธีการสกัดที่ใช้สามารถสกัดสารไมทราไจนีนออกมาจากปัสสาวะได้ดีมากโดยมีค่า %Recovery อยู่ในช่วง 92.4-101.3 %

และจากการประยุกต์ใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นกับตัวอย่างปัสสาวะของผู้ใช้กระท่อมแบบเรื้อรัง (Chronic kratom Abuse) ในกลุ่มอาสาสมัครจำนวน 30 คน พบว่าสามารถตรวจพบไมทราไจนีนในปัสสาวะของกลุ่มอาสาสมัครได้ทั้ง 30 ตัวอย่าง แต่มีระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันมากตั้งแต่ปริมาณ 11.18 - 10043.75 ng/mL

สามารถสรุปได้ว่า วิธีที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารไมไทราไจนีนในปัสสาวะของผู้ใช้กระท่อมแบบเรื้อรัง (Chronic Kratom Abuse) ด้วยเทคนิค HPLC เป็นวิธีที่ง่าย มีความจำเพาะและความไวในการวิเคราะห์ดี ถูกต้อง เที่ยงตรง มีประสิทธิภาพในการสกัด ไม่พบสารรบกวนที่มีอยู่ในปัสสาวะ ซึ่งวิธีที่นำมาใช้ได้ผ่านการทดสอบความน่าเชื่อถือตามมาตรฐาน AOAC guideline ดังนั้น วิธีการวิเคราะห์นี้จึงมีความเหมาะสมและน่าเชื่อถือได้สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์สารไมไทราไจนีนในปัสสาวะได้ เพื่อใช้เป็นแนวทางการตรวจหาปริมาณสารไมทราไจนีนในปัสสาวะ รวมทั้งนำไปใช้ในประโยชน์ทางการแพทย์ นิติวิทยาศาสตร์ หรือประโยชน์ทางด้านงานวิจัยอื่น ๆ และเพิ่มองค์ความรู้เกี่ยวกับการตรวจหาปริมาณสารไมทราไจนีน

**ข้อเสนอแนะ**

สำหรับผู้สนใจพัฒนาหรือศึกษาองค์ความรู้ในพืชกระท่อม ผู้ทำงานวิจัยมีข้อเสนอ ดังนี้

1) ในการวิจัยนี้เบื้องต้นผู้วิจัยได้กำหนดเกณฑ์กลุ่มอาสาสมัครโดยต้องเป็น ผู้ที่สุขภาพดี แต่เนื่องจากกลุ่มอาสาสมัครเป็นกลุ่มที่เปราะบาง และขณะนั้นการเสพกระท่อมผิดกฎหมายอยู่ จึงทำให้เก็บตัวอย่างได้ยาก จึงตัดเกณฑ์ข้อนี้ไป ผลของความเข้มข้นของสารไมทราไจนีนที่มีระดับแตกต่างกันมากนั้น อาจมีผลมาจาก ปริมาณที่ใช้ ชนิดของกระท่อมที่ใช้ ระยะเวลาที่ใช้สาร หรืออาจรวมไปถึงยาที่รับประทาน หรือ การสูบบุหรี่ ได้เช่นกัน ควรทำการศึกษาต่อในประเด็นดังนี้ ปัจจัยที่ส่งผลให้ค่าความเข้มข้นของสารไมทราไจนีนมีระดับที่แตกต่างกัน
2) ในการศึกษาสารไมทราไจนีนในปัสสาวะของผู้ใช้กระท่อมแบบเรื้อรัง (Chronic kratom Abuse) ซึ่งเป็นการใช้แบบวิธีดั้งเดิม คือการเคี้ยวใบสดหรือต้มใบแบบชา ไม่ได้ศึกษาในผู้เสพกระท่อมแบบยาเสพติด เช่น สี่คูณร้อย ควรศึกษาเพิ่มเติมกลุ่มผู้ใช้กระท่อมแบบสี่คูณร้อย เพื่อให้งานวิจัยมีความครอบคลุมและเป็นประโยชน์ต่อ เจ้าหน้าที่ในการสืบสวนสอบสวนคดีที่เกี่ยวข้องกับสารเสพติดในปัสสาวะ และเพื่อเป็นประโยชน์ต่อ’งานทางการแพทย์ หรืองานด้านนิติวิทยาศาสตร์ต่อไป

# บรรณานุกรม

1. หน่วยระบาดวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. บทสรุปของพืชกระท่อม. ครั้งที่พิมพ์ 3. สงขลา: หน่วยผลิตตำรา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ 2559.

2. Drug Enforcement Administration U.S. Department of Justice. Drugs of abuse A DEA RESOURCE GUIDE. [Internet]. 2017 [cited 2019 Nov 26]. Available from: https://www.dea.gov/sites/default/files/2018-06/drug_of_abuse.pdf

3.เต็ม สมิตินันทน์. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม. กรมป่าไม้ 2557:383.
4.ณัฐ ตันศรีสวัสดิ์. กระท่อม. วารสารนิติเวชศาสตร์ 2553;3(2):102-6
5.วัจนา ตั้งความเพียร. แผนงานศูนย์วิชาการเฝ้าระวังและพัฒนาระบบยา (กพย.) คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ยาวิพากษ์ 2561;9(36):3-31.

6.กลุ่มงานตรวจยาเสพติดกองพิสูจน์หลักฐานกลาง. โครงการเพิ่มประสิทธิภาพตรวจพิสูจน์พืชกระท่อมและการเตรียมสารมาตรฐานที่สำคัญที่ไบในพืชกระท่อม คือ ไมทราไจนีน (Mitragynine) 2558.

7. นิวัติ แก้วประดับ. ใบกระท่อม สรรพคุณทางยา ประโยชน์และโทษ. [อินเตอร์เน็ต]. [เข้าถึงเมื่อ 26 พฤศจิกายน 2562]. เข้าถึงได้จาก: https://shorturl.asia/IgrOL

8. จุไรทิพย์ หวังสินทวีกุล. พืชกระท่อม (Kratom). [อินเตอร์เน็ต]. [เข้าถึงเมื่อ 26 พฤศจิกายน 2562]. เข้าถึงได้จาก: https://shorturl.asia/ZWjId

9. พาสคาล ทังเก. พืชกระท่อมในประเทศไทย. [อินเตอร์เน็ต]. [เข้าถึงเมื่อ 26 พฤศจิกายน 2562]. เข้าถึงได้จาก: https://www.tni.org/files/download/kratom-briefing-dlr13.pdf

10. สุจิตรา ทองประดาฐิโชติ. ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ Mitragynine สาระสำคัญในใบกระท่อม. จุลสารข้อมูลสมุนไพร 2549; 24(1):6-16
11. รศ.ชูชาติ อารีจิตรานุสรณ์. บทที่ 16 โครมาโทกราฟีเหลวความดันสูง (High pressure Liquid Chromatography) [อินเตอร์เน็ต].[เข้าถึงเมื่อ 26 พฤศจิกายน 2562]; เข้าถึงได้จาก: http://home.kku.ac.th/chuare/12/HPLC.pdf
12. มหาวิทยาลัยรามคำแหง. บทที่ 2 โครมาโทกราฟีเหลวความดันสูง (High pressure Liquid Chromatography) [อินเตอร์เน็ต].[เข้าถึงเมื่อ 26 พฤศจิกายน 2562]; เข้าถึงได้จาก: //old-book.ru.ac.th/e-book/c/CM437/CM437-2.pdf

13. สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. คู่มือการตรวจพิสูจน์ยาเสพติดในของกลางเบื้องต้น.พิมพ์ครั้งที่ 1 : กระทรวงสาธารณสุข 2560.

14.กรรณิกาญจน์ ศิขิวัฒน์. การตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารเสพติดกลุ่มแอมเฟตามีน เคตามีน และเมตาบอไลท์ต่างๆ ใน ปัสสาวะโดยเทคนิคลิควิดโครมาโทรกราฟฟี/ แมสสเปคโตรเมตรี/ แมสสเปคโตรเมตร. [อินเตอร์เน็ต]. [เข้าถึงเมื่อ 26 พฤศจิกายน 2562]; เข้าถึงได้จาก: https://shorturl.asia/xZ3Ms

15. ณัฐธิดา ศรีบุญวรกุล. การประยุกต์ใช้แมสสเปกโทรเมทรีในห้องปฏิบัติการวิจัยทางคลินิก. ว.เทคนิคการแพทย์ 2560;45(3):6125-39

16. จันทร์เพ็ญ ใจธีรภาพกุล. แมสสเปคโทรมิเตอร์ [อินเตอร์เน็ต]. [เข้าถึงเมื่อ 26 พฤศจิกายน 2562]; เข้าถึงได้จาก: https://shorturl.asia/nci7v

17. Kowalczuk AP, Lozak A, Zjawiony JK. Comprehensive methodology for identification of kratom in police laboratories. Forensic Sci. Int 2013;233(1-3):238-43.

18. Sukrong S, Zhu S, Runngrungsi N, Phadungcharoen T, Palanuvej C, Komatsu K. Molecular analysis of the genus Mitragyna existing in Thailand based on rDNA ITS sequences and its application to identify a narcotic species: Mitragyna speciosa. Biol.Pharm.Bull 2007;30(7):1284-88.

19.Janchawee B, Keawprdub N, Chittrakarn S, Prasettho S, Wararatananurak P, Sawangjareon K. A high-performance liquid chromatographic method for determination of mitragynine in serum and its application to a pharmacokinetic study in rats. Biomed. Chromatograph 2007;21(2):176-83.

20.Wang M, Carrell EJ, Ali Z, Avula B, Avonto C, Parcher JF, et al. Comparison of three chromatographic techniques for the detection of mitragynine and other indole and oxindole alkaloids in Mitragyna speciosa (kratom) plants. J. Sep. Sci2014; 37:1411-18.

21. Field E, Mitragynine and mitraversine, two new alkaloids from species of Mitragyne. J. Chem. Soc., Trans.1921;119:887–91.

22. Grewal KS. Observations on the pharmacology of mitragynine. American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics. J. Pharmacol. Exp.Ther. 1934;46(3):251-71.

23.Grewal KS. The effect of mitragynine on man. British J. Med. Psychol.1932;12(1): 41-58.

24. Takayama H, Kurihara M, Kitajima, M, Said IM, Aimi N. New indole alkaloids from the leaves of Malaysian Mitragyna speciosa. Tetrahedron 1998;54(29):8433–40

25. Suhaimi FW, Yusoff NHM, Hassan R, Mansor SM, Navaratnam V, Christian P Müller CP, et al. Neurobiology of Kratom and its main alkaloid mitragynine. Brain Res Bull 2016;126(Pt 1):29-40.

26. นันทนา กันยานุวัฒน์, นุชนาท นาคำ. แนวทางการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบทางเคมี. พิมพ์ครั้งที่ 1: กรุงทพฯ สำนักอุตสาหกรรมพื้นฐาน กรมอุตสาหกรรมพื้นฐานและการเหมืองแร่ 2555.

27.จุไรรัตน์ มหาเทียน. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (method validation). [อินเตอร์เน็ต]. [เข้าถึงเมื่อ 26 พฤศจิกายน 2562]; เข้าถึงได้จาก: http://reo06.mnre.go.th/home/images/upload/file/report/Jurairut070509.pdf

28.Limsuwanchote S, Wungsintaweekul J, Keawpradub N, Putalun W, Morimoto S, Tanaka H. Development of indirect competitive ELISA for quantification of mitragynine in kratom (Mitragyna speciosa (Roxb.)Korth. Forensic Sci. Int 2014;244:70-7.

29.Macko E, Weisbach JA, Douglas B, Some observations on the pharmacology of mitragynine. Arch. Int. Pharmacodyn Ther 1972;198(1):145–61

30. Hanapi NA, Azizi J, Ismail S, Mansor SM. Evaluation of selected Malaysian medicinal plants on phase I drug metabolizing enzymes, CYP2C9, CYP2D6 and CYP3A4 activities in vitro. International Journal of Pharmacology 2010;6: 494-99.

31. Shellard EJ. The alkaloids of Mitragyna with special reference to those of Mitragyna speciosa, Korth. Bull Narc 1974;26(2):41-55.

32. Warner ML, Kaufman NC, Grundmann O. The pharmacology and toxicology of kratom: from traditional herb to drug of abuse. Int.J. Legal Med 2016; 130(1):127-38.

33.Chan KB, Pakiam C, Rahim RA. Psychoactive plant abuse: the identification of mitragynine in ketum and in ketum preparations. Bull Narc 2005; 57(1–2):249–56.

34. Philipp AA, Wissenbach DK, Weber AA, Zapp J, Maurer HH. Phase I and II metabolites of speciogynine, a diastereomer of the main Kratom alkaloid mitragynine, identified in rat and human urine by liquid chromatography coupled to low- and high-resolution linear ion trap mass spectrometry. J. Mass Spectrom 2010;45(11):1344–57

35. Janchawee B, Keawprdub N, Chittrakarn S, Prasettho S, Wararatananurak P, Sawangjareon K. A high-performance liquid chromatographic method for determination of mitragynine in serum and its application to a pharmacokinetic study in rats. *Biomed. Chromatograph.* 2007;21(2):176-83.

36. Parthasarathy S, Azizi JB, Ramanathan S, Ismail S, Sasidharan S, Mohd Said MI, et al. Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of aqueous, methanolic and alkaloid extracts from Mitragyna speciosa (Rubiaceae Family) leaves. Molecules. Mol. Divers. Preserv. Int. 2009;14(10):3964-74.

37. Chittrakarn S, Penjamras P, Keawpradub N. Quantitative analysis of mitragynine, codeine, caffeine, chlorpheniramine and phenylephrine in a kratom (*Mitragyna speciosa* Korth.). *Forensic Sci. Int.* 2012;217(1-3):81-6.

38. Chittrakarn S, Sawangjaroen K, Prasettho S, Janchawee B, Keawpradub N. Inhibitory effects of kratom leaf extract (Mitragyna speciosa Korth.) on the rat gastrointestinal tract. J. Ethnopharmacol 2008;116(1):173–8.

39. Kikura-Hanajiri R, Kawamura M, Maruyama T, Kitajima M, Hiromitsu Takayama H, Goda Y. Simultaneous analysis of mitragynine, 7-hydroxymitragynine, and other alkaloids in the psychotropic plant 'kratom' (*Mitragyna speciosa*) by LC-ESI-MS. *Forensic. Toxicol. 2009;*27(2):67-74.

40. Lu S, Tran BN, Nelsen JL, Aldous KM. Quantitative analysis of mitragynine in human urine by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. B 2009;877:2499-505.

41. Arndt T, Claussen U, Gussregen B, Schrofel S, Sturzer B, Werle A, et al. Kratom alkaloids and O-desmethyltramadol in urine of a Krypton herbal mixture consumer. Forensic Sci. Int. 2011;208:47–52,

42. de Mores NV, Moretti RAC, Fur III EB, McCurdy CR, Lanchote VL. Determination of mitragynine in rat plasma by LC-MS/MS: application to pharmacokinetics. *J. Chromatograph. B* 2009; 877(24):2593-97.

43. Sudheedibu SK, Jangher RL, Kaive AH, Naickereebu NJ. Qualification and Quantitation of Kratom Compounds in Human Urine by High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. American Journal of Chemistry 2016, 6(2): 60-4.

44. Scott TM, Yeakel JK,and B. Logan BK. Identification of mitragynine and Odesmethyltramadol in Kratom and legal high products sold online. Drug Test and Analysis 2014;6:959–63

45. Saenawerakul W, Kongpatnitiroj K, Urarak J, Boonyapitak S, Chalermkit W, Kingkhoyao W, et al. Qualitative Analysis of Mitragynine in Kratom Drink by Chromatographic Technique.[อินเตอร์เน็ต].[เข้าถึงเมื่อ 26 พฤศจิกายน 2562]; เข้าถึงได้จาก: http://annualconference.ku.ac.th/cd53/01_066_P188.pdf

46. Fu H, Cid FX, Dworkin N, Cocores J, Shore G. Screening and Identification of Mitragynine and 7- Hydroxymitragynine in Human Urine by LC-MS/MS. Chromatography 2015;2:253-64.

47. Fu H. A Mass Spectrometric Study of Kratom Compounds by Direct Infusion Electrospray Ionization Triple Quadrupole Mass Spectrometry. Detection 2016;4: 66-72

48. Fluyau D, Revadigar N. Biochemical Benefits, Diagnosis, and Clinical Risks Evaluation of Kratom. Frontiers in Psychiatry 2017;8(62).

49. Ranggasamy R, Ghafar ZA, Jean SW, Hussain NH, Japri N, Badron UH, et al . Herbal monograph methodology for identification of Mitragyna speciosa (Korth.) Havil. Leaves. f Pharmacognosy and Phytochemistry 2015: 4(4): 256-62

50. Rueffer M, Naotaka N, Zenk MH. 1978. Strictosidine, the common precursor for monoterpenoid indole alkaloids with 3$\alpha$ and 2$\beta$ configuration. Tetrahedron Lett 1978;19(18):1593-96.