

## นิพนธ์ต้นฉบับ

## Original article

# การพัฒนาประสิทธิภาพและทดสอบความถูกต้อง ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณเมทแอมเฟตามีนในผู้เสพ โดยเทคนิค Headspace-GC/MS

รัชนิกร บุญธรรม วท.ม. (วิทยาศาสตร์การแพทย์)

พสนพรรณ นิคมหัวร้อง วท.ม. (เคมีวิเคราะห์)

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 2 พิษณุโลก

วันรับ: 9 ม.ค. 2563

วันแก้ไข: 6 พ.ค. 2564

วันตอบรับ: 18 พ.ค. 2564

**บทคัดย่อ**

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ methamphetamine (ยาบ้า) และ amphetamine (เมทาบอโลइटของ methamphetamine) ในปัสสาวะด้วยเครื่องมือ headspace - gas chromatograph mass spectrophotometer (HS-GC/MS) โดยสาร methamphetamine ถูกสกัดออกจากตัวอย่างโดยวิธีการทำให้เป็นไอด้วย potassium carbonate ใช้ phentermine เป็น internal standard และ derivitized ด้วย ethyl chloroformate จากนั้นตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณด้วยเทคนิค HS-GC/MS วิธีดังกล่าวมีขีดจำกัดในการตรวจพบ methamphetamine และ amphetamine (limit of detection, LOD) เท่ากับ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ methamphetamine และ amphetamine (lower limit of quantitation, LLOQ) เท่ากับ 250 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ช่วงการวิเคราะห์ที่ให้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง (linear working range) เท่ากับ 250-3,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า correlation coefficient (r) ของ methamphetamine และ amphetamine อยู่ในช่วง 0.9979-0.9994 และ 0.9982 - 0.9990 ตามลำดับ และตลอดช่วงการวิเคราะห์มีความแม่นยำ (accuracy) แสดงด้วยค่าเฉลี่ยของ % recovery โดยการเติมสารมาตรฐาน 4 ระดับความเข้มข้นอยู่ในช่วง 89.42-111.07 ความเที่ยง (precision) แสดงด้วยค่า %CV เท่ากับ 1.91-10.86 และเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีดังกล่าวนี้กับวิธีเดิม (TLC) พบว่าลดขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์จาก 15 เหลือ 8 ขั้นตอน ทำให้ลดระยะเวลาให้บริการจาก 7 วันทำการ เป็น 4 วันทำการ ลดการใช้สารเคมีทั้งชนิดและปริมาณ ทำให้ลดการปนเปื้อนของสารเคมีสู่สิ่งแวดล้อม ส่งผลให้ผู้ปฏิบัติงานมีความปลอดภัยมากขึ้นและจากการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีพบว่ามีควมไวและความจำเพาะเป็นไปตามที่กฎหมายประเทศไทยกำหนด

**คำสำคัญ:** เมทแอมเฟตามีน; แอมเฟตามีน; เทคนิค Headspace-GC/MS**บทนำ**

การแพร่ระบาดของยาเสพติดเป็นปัญหาใหญ่และมีความสำคัญที่ส่งผลต่อความมั่นคงของประเทศ เนื่องจากผู้เสพ/ผู้ติดยาเสพติด ส่วนใหญ่เป็นเด็กและเยาวชน<sup>(1)</sup> หน่วยงานที่เกี่ยวข้องต้องร่วมมือกันดำเนินการแก้ไข

ในแต่ละปีมีตัวอย่างปัสสาวะของผู้ต้องสงสัยส่งให้ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 2 พิษณุโลก ตรวจพิสูจน์เพื่อนำผลไปใช้ประกอบการดำเนินคดีในชั้นศาลเป็นจำนวนมาก และชนิดของสารเสพติดที่ตรวจพบว่าการนำมาเสพมากที่สุดคือ เมทแอมเฟตามีน (ยาบ้า)<sup>(2)</sup>

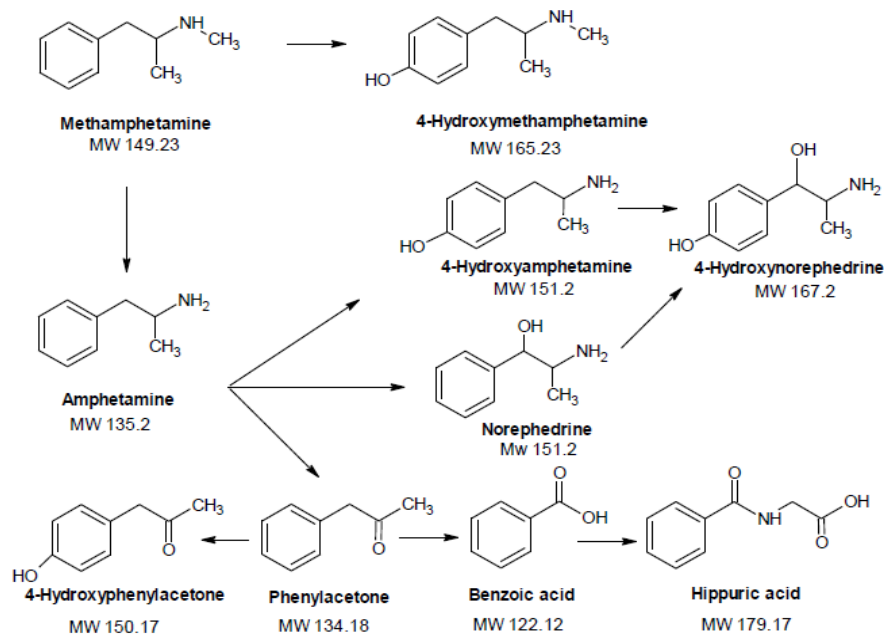
ซึ่งเป็นสารเคมีในกลุ่ม phenethylamine มีโครงสร้างเป็น aromatic ring สูตรทางเคมี คือ  $C_{10}H_{15}N$  น้ำหนักโมเลกุล 149.24 g/mol ลักษณะทางกายภาพของเมทแอมเฟตามีนอยู่ในรูป hydrochloride salt มีสีขาวจนถึงเป็นผลึกใส ไม่มีสี มีลักษณะค่อนข้างบริสุทธิ์ ส่วนในรูป free base เป็นของเหลวสีเข้ม เมทแอมเฟตามีนเป็นสารสังเคราะห์ที่มีฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลาง (CNS stimulant) ระบบประสาทอัตโนมัติซิมพาเทติก (sympathomimetic) และมีฤทธิ์กดความอยากอาหาร (appetite suppressant) การเสพยาบ้ามีหลายวิธี เช่น ฉีดเข้าสู่หลอดเลือด กิน สูดผงหรือไอระเหยเข้าทางจมูก เมื่อมีการเสพยาบ้าเมทแอมเฟตามีนเข้าสู่ร่างกาย จะกระจายไปทั่วทุกส่วนของร่างกาย เนื่องจากสารดังกล่าว มีคุณสมบัติ high lipophilicity จึงผ่าน blood-brain-barrier เข้าสู่สมองและผ่านไปยัง breast milk ภายในไม่กี่นาที ส่วนใหญ่มีการเปลี่ยนรูปที่ตับโดย cytochrome iso enzyme, CYP2D6 มี major pathways คือ aromatic hydroxylation เปลี่ยนเป็น 4-hydroxymethamphetamine และ N-demethylation เปลี่ยนเป็น amphetamine มีบางส่วนเปลี่ยนรูปผ่าน minor path-

ways ได้ norephedrine, 4-hydroxyamphetamine, 4-hydroxynorephedrine, phenylacetone และ benzoic acid<sup>(3)</sup> แสดงดังภาพที่ 1

ส่วนใหญ่เมทแอมเฟตามีนถูกขับออกทางปัสสาวะ มีเพียงส่วนน้อยที่ถูกขับออกทางเหงื่อ และทางอุจจาระ การศึกษาพบว่าประมาณร้อยละ 70 ถูกขับออกทางปัสสาวะภายใน 48 ชั่วโมง<sup>(5)</sup> และจะตรวจพบภายใน 1-3 วันแรกหลังการกิน<sup>(4)</sup> ค่าเฉลี่ยของ Half-life อยู่ระหว่าง 9 -12 ชั่วโมง<sup>(3)</sup> การตรวจหาสารเมทแอมเฟตามีนในคน สามารถใช้ตัวอย่างชีววัตถุหลายชนิด เช่น ปัสสาวะ ชีรุ่ม เส้นผม เป็นต้น ปัสสาวะเป็นตัวอย่างที่นิยมใช้แพร่หลายเนื่องจากเก็บตัวอย่างง่ายและได้ปริมาณมาก ที่สำคัญ ระยะเวลาที่สามารถตรวจพบสารเสพติดในปัสสาวะค่อนข้างนานและเป็นที่ยอมรับในกระบวนการยุติธรรมระดับสากล

การตรวจ มี 2 ขั้นตอน คือ การตรวจเบื้องต้น เป็นการคัดกรองด้วยชุดทดสอบชนิด immunoassay test kit และการตรวจยืนยันโดยใช้วิธีทางห้องปฏิบัติการซึ่งมีหลายวิธี เช่น Thin layer chromatography (TLC), HPLC, GC, GC-MS และ LC-MS เป็นต้น<sup>(4)</sup>

ภาพที่ 1 เมตาบอลิต์ของเมทแอมเฟตามีน<sup>(3,4)</sup>



วิธีการตรวจยืนยันเมทแอมเฟตามีนหรือยาบ้าในปัสสาวะเดิมห้องปฏิบัติการของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 2 พิษณุโลก ใช้วิธี TLC ซึ่งขั้นตอนการทำงานมีหลายขั้นตอนแต่ละขั้นตอนต้องใช้เวลาาน ใช้กำลังคนมาก และใช้สารเคมีหลายชนิดในปริมาณมาก แต่ละชนิดเป็นสารอันตราย ตามหลักการเทคนิค TLC เป็น semi quantitation จึงไม่สามารถรายงานผลเป็นปริมาณตัวเลขตามที่กฎหมายกำหนดตามประกาศคณะกรรมการป้องกันและปราบปรามยาเสพติด เรื่องกำหนดหลักเกณฑ์วิธีการและเงื่อนไขการตรวจหรือทดสอบว่าบุคคลหรือกลุ่มบุคคลใดมีสารเสพติดอยู่ในร่างกายหรือไม่ในข้อ (10) กำหนดว่ากลุ่มแอมเฟตามีน (Amphetamines) และกลุ่ม MDMA (ยาอี) เมื่อตรวจพบว่ามีสารดังกล่าวอยู่ในปัสสาวะตั้งแต่ 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรหรือ 1,000 นาโนกรัม/มิลลิลิตรขึ้นไป ถือว่าเป็นผู้มีสารเสพติดในร่างกาย<sup>(6)</sup>

ดังนั้นเพื่อลดปัญหาความล่าช้าในการให้บริการและผลกระทบจากการถูกฝากขังนานทำให้ผู้ต้องหาสิ้นศรัทธาเสียสุขภาพและเสียเวลาประกอบอาชีพ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 2 พิษณุโลก มีแนวคิด ในการเพิ่มศักยภาพวิธีวิเคราะห์ปริมาณการตรวจเมทแอมเฟตามีนและแอมเฟตามีนในปัสสาวะ จึงริเริ่มพัฒนาเทคนิคการเตรียมตัวอย่างแบบ Headspace ตรวจวัดหาปริมาณด้วยเครื่อง GC-MS และทดสอบความใช้ได้ของวิธีแล้วได้นำมาใช้ในงานประจำ ตั้งแต่ปี 2558 และรายงานผลเป็นปริมาณตัวเลข ตามกฎหมายกำหนด ซึ่งในเวลานั้นยังไม่มีหน่วยงานใดใช้เทคนิคการเตรียมตัวอย่างแบบ Headspace เพื่อหาปริมาณเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะมาก่อน

## วิธีการศึกษา

### 1. สารมาตรฐานและสารเคมี

- สารมาตรฐาน: amphetamine sulfate (99.95 %), methamphetamine hydrochloride (99.99 %), phentermine hydrochloride (98.50 %) ทั้งหมดเป็นผลิตภัณฑ์ของ Lipomed ประเทศสหรัฐอเมริกา

- สารเคมี: Potassium carbonate (AR grade; Qrex),

Ethyl chloroformate (AR grade; Merck), Methanol (HPLC grade), DI water

### 2. เครื่องมือและอุปกรณ์

- เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Satorius), vial head space ขนาด 20 มิลลิลิตร พร้อมฝาปิด, crimper, Micropipette ขนาด 10-100 ไมโครลิตร และขนาด 100 - 1,000 ไมโครลิตร, microcentrifuge tube ขนาด 1.50 มิลลิลิตร, volumetric flask ขนาด 5, 10 และ 25 มิลลิลิตร

- เครื่อง GC/MS (Agilent) ประกอบด้วย headspace: รุ่น 7697A, autosampler:7693, GC7890B, MS 7000 GC/MS Triple Quad

โดยมีสภาวะของเครื่องมือ ดังนี้

GC condition

- Inject Temp: 200 °C, Split ratio: 100:1
- Analytical column: HP-5 ms; 30 m, 0.25 mm DI, Df 0.25 mm
- Column temperature: เริ่มต้นไม่สูงกว่า 100 °C จนถึงไม่ต่ำกว่า 300 °C
- Flow rate: 2.00 มิลลิลิตร/นาที He gas

Headspace conditions

- Incubation: 80 °C, Vial equilibration: 5 นาที, GC cycle: 15 นาที

MS conditions ดังตารางที่ 1

### 3. การเตรียมสารมาตรฐาน

ตารางที่ 1 แสดง RT และ m/z ของสาร

Compound	RT (min) (±0.3 min)	Mass spectrum (m/z) ECF-derivatives		
		Q	Q1	Q2
Amphetamine-ECF	8.10	116	44	65
Phentermine-ECF	8.20	84	130	91
Methamphetamine-ECF	8.30	102	130	58

หมายเหตุ: ECF = Ethyl chloroformate, Q = Quantitation ion, Q1 และ Q2 = Qualifier ion - 1 และ 2

เตรียม stock สารมาตรฐาน amphetamine และ methamphetamine ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายใน methanol ปรับปริมาตร ให้เป็น 10 มิลลิลิตร นำ stock standard ที่เตรียมได้ ไปเตรียม calibration curve ผสมระหว่างสารละลายมาตรฐาน amphetamine และ methamphetamine ในปัสสาวะ ให้มีความเข้มข้น 250, 400, 600, 800, 1,000, 2,000 และ 3,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2 – 8 °C

#### 4. ตัวอย่างปัสสาวะ (matrix blank) ที่ใช้ในการทดสอบความใช้ได้ของวิธี

ปัสสาวะขอบริจาคจากผู้ที่ไม่ม่ประวัติใช้สารเสพติด และไม่ใช้ยารักษาโรค ภายใน 7 วัน จำนวนอย่างน้อย 6 แห่ง เพื่อใช้ทดสอบ selectivity, linearity, accuracy, precision, limit of detection (LOD) and lower limit of quantitation (LLOQ)

นำปัสสาวะที่ได้แต่ละแห่งมาตรวจวิเคราะห์ด้วย Headspace - GC/MS หากไม่มีสารใดขึ้นบริเวณ retention time (RT) ตรงกับสารที่สนใจ จึงนำมาใช้เป็น matrix blank เก็บปัสสาวะไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

#### วิธีวิเคราะห์

##### 1. การเตรียมตัวอย่าง

ปิเปตตัวอย่างปัสสาวะ 300 ไมโครลิตร และ Internal standard (phentermine) ความเข้มข้น 1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ใน headspace vial ขนาด 20 มิลลิลิตร ตามด้วย ปิเปต derivatives ethyl chloroformate 15 ไมโครลิตร จากนั้นใส่ potassium carbonate 0.50 กรัม ปิดด้วย crimper ทันที นำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Headspace - GC/MS

##### 2. เตรียมตัวอย่าง spiked matrix sample

เตรียม QC ผสมระหว่าง amphetamine และ methamphetamine ในปัสสาวะ จำนวน 4 ระดับความเข้มข้น คือ ความเข้มข้นที่ 250 (LLOQ), 350, 1,500 และ 2,500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

##### 3. การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation)<sup>(7-9)</sup>

#### 3.1 ทดสอบความเฉพาะเจาะจงของวิธี (Selectivity)

- นำ method blank และ matrix blank ฉีดเข้าเครื่อง GC/MS เพื่อดูว่ามี mass หรือ peak ตรงกับสารมาตรฐานหรือไม่
- Method blank: เตรียมตัวอย่างตามวิธี โดยใช้สารเคมีทั้งหมด แต่ไม่ใส่ตัวอย่างปัสสาวะ
- Matrix blank: เตรียมตัวอย่างปัสสาวะที่ได้จาก 6 คน ตามวิธีวิเคราะห์โดยการฉีด urine blank จำนวน 6 แห่ง เทียบกับสารละลายมาตรฐาน amphetamine และ methamphetamine ความเข้มข้นที่ Lower Limit of Quantitative (LLOQ: ความเข้มข้น 250 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)

#### เกณฑ์การยอมรับ<sup>(8)</sup>

ค่า response ที่ RT เดียวกันกับสารมาตรฐาน amphetamine และ methamphetamine ต้องไม่มากกว่าร้อยละ 20 ของ response ที่ระดับ LLOQ และค่า response ที่ RT เดียวกันกับ phentermine (internal standard) ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ต้องไม่มากกว่าร้อยละ 5

#### 3.2 ทดสอบ Carryover

ฉีด urine blank หลังจากนั้นฉีดสารมาตรฐานความเข้มข้นที่ LLOQ และฉีดสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้นสูงสุดของ Calibration curve: Upper limit of Quantification (ULOQ): ความเข้มข้นที่ 3,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นฉีด urine blank อีกครั้ง

#### เกณฑ์การยอมรับ<sup>(8)</sup>

ค่า response ของ urine blank หลังจากฉีด ULOQ ที่ตำแหน่ง RT เดียวกันกับสารมาตรฐาน amphetamine และ methamphetamine ต้องไม่มากกว่าร้อยละ 20 ของ response ของ LLOQ และ ค่า response ที่ RT เดียวกันกับ phentermine (internal standard) ต้องไม่มากกว่าร้อยละ 5 ของ response ของ LLOQ

3.3 การหาค่าต่ำสุดที่ตรวจพบ (limit of detection, LOD) และค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ปริมาณได้ (lower limit of quantitation, LLOQ)

หาค่า LOD ของ amphetamine และ methamphetamine โดยคำนวณค่าจากสัญญาณของ spiked sample blank โดยการเติมสารมาตรฐาน amphetamine และ methamphetamine ลงใน pooled urine blank ที่ระดับ LLOQ เตรียมจำนวน 5 ซ้ำ นำไปตรวจวิเคราะห์เพื่อหาความเข้มข้นโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน หลังจากนั้นคำนวณหาค่า SD เพื่อนำมาคำนวณหาค่า LOD จากสูตร  $3 \times SD$  และค่า LLOQ จากสูตร  $10 \times SD$  เตรียมความเข้มข้นที่คำนวณได้ เติมนลงใน matrix blank ตรวจวิเคราะห์จำนวน 3 ซ้ำ และพิจารณาค่า signal to noise ratio ของ response ที่ตำแหน่ง RT เดียวกับสารมาตรฐาน amphetamine และ methamphetamine ค่า signal to noise ratio (S/N) มากกว่า 3 และ 10 เท่า จะได้ค่าความเข้มข้นที่ LOD และ LLOQ ตามลำดับ

#### เกณฑ์การยอมรับ<sup>(8)</sup>

หลังจากได้ค่า LLOQ จากการคำนวณแล้วทำการพิสูจน์ค่า LLOQ โดยการเติมสารมาตรฐาน ใน matrix blank ที่ความเข้มข้นเท่ากับค่าที่ LLOQ และนำไปตรวจวิเคราะห์ จำนวน 5 ซ้ำ คำนวณค่า % bias ให้เบี่ยงเบนไม่เกินร้อยละ 20

3.4 ทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (linearity and range)

เตรียม matrix-matched calibration ของสารละลายมาตรฐาน amphetamine และ methamphetamine 7 ระดับ ความเข้มข้น คือ 250, 400, 600, 800, 1,000, 2,000 และ 3,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (แกน x) กับอัตราส่วนระหว่างค่า response ของสารมาตรฐานและค่า response ของ Internal standard (response ratio) (แกน y) และคำนวณสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r)

#### เกณฑ์การยอมรับ<sup>(8)</sup>

ค่า r ต้องไม่น้อยกว่า 0.9900 และคำนวณค่า % bias ของแต่ละความเข้มข้น เบี่ยงเบนไม่เกินร้อยละ 15 ยกเว้นที่ระดับ LLOQ ให้เบี่ยงเบนได้ไม่เกินร้อยละ 20

3.5 ทดสอบความแม่นยำของวิธี (Accuracy)

ทดสอบความแม่นยำโดยการเติมสารมาตรฐาน amphetamine และ methamphetamine ลงใน matrix blank ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน 4 ระดับ คือ ความเข้มข้นที่ 250 (LLOQ), 350, 1,500 และ 2,500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ amphetamine และ methamphetamine ในปัสสาวะ ความเข้มข้นละ 5 ครั้ง เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

#### เกณฑ์การยอมรับ<sup>(8)</sup>

คำนวณค่า % bias ของแต่ละความเข้มข้นให้เบี่ยงเบนไม่เกินร้อยละ 15 ยกเว้นที่ระดับ LLOQ ให้เบี่ยงเบนได้ไม่เกินร้อยละ 20

3.6 การทดสอบความเที่ยงของวิธี (precision)

3.6.1 การทดสอบความเที่ยงภายในวัน (intra-day)

โดยการเติมสารมาตรฐาน amphetamine และ methamphetamine ลงใน matrix blank ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน 4 ระดับ คือ ความเข้มข้นที่ LLOQ (250), 350, 1,500 และ 2,500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ amphetamine และ methamphetamine ในปัสสาวะ ความเข้มข้นละ 5 ครั้ง เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน คำนวณปริมาณ amphetamine และ methamphetamine ในปัสสาวะ หาค่าเฉลี่ยและ %CV

#### เกณฑ์การยอมรับ<sup>(8)</sup>

ค่า %CV เฉลี่ยของแต่ละระดับความเข้มข้นให้เบี่ยงเบนไม่เกินร้อยละ 15 ยกเว้นที่ระดับ LLOQ ให้เบี่ยงเบนได้ไม่เกินร้อยละ 20

3.6.2 Intermediate precision การทดสอบ ความเที่ยงต่างวัน (Inter-day)

เติมสารมาตรฐาน amphetamine และ methamphetamine ลงใน matrix blank ที่ระดับ ความเข้มข้นต่างกัน 4 ระดับ คือ ความเข้มข้นที่ 250 (LLOQ), 350, 1,500 และ 2,500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ amphetamine และ methamphetamine ในปัสสาวะ ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ทดสอบจำนวน 3 วัน

เกณฑ์การยอมรับ<sup>(8)</sup>

%CV เฉลี่ยของแต่ละระดับความเข้มข้น จำนวน 3 วัน ให้เบี่ยงเบนไม่เกินร้อยละ 15 ยกเว้น ที่ระดับ LLOQ เบี่ยงเบนได้ไม่เกินร้อยละ 20 และคำนวณค่า p-value จากสถิติ one-way ANOVA ค่า p-value ที่ได้มากกว่า 0.05 แสดงว่าผลที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95

3.7 ทดสอบความคงสภาพของสารละลายตัวอย่าง

3.7.1 Short term stability (Bench top stability)

เตรียม QC ความเข้มข้นต่ำ (QCL) และ QC ความเข้มข้นสูง (QCH) จำนวน 3 ซ้ำ และวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 8 ชั่วโมง คือเวลาที่นานที่สุดในการนำตัวอย่าง ปัสสาวะออกจากตู้เย็นเพื่อวิเคราะห์ ทำการเตรียม ตัวอย่างและตรวจวิเคราะห์ คำนวณค่าความเข้มข้นเทียบกับกราฟมาตรฐาน นำตัวอย่างดังกล่าวมาฉีดและเทียบผลการวิเคราะห์กับ QCL และ QCH ที่เตรียมใหม่

เกณฑ์การยอมรับ<sup>(8)</sup>

คำนวณหาค่า % bias และ %CV ของแต่ละความเข้มข้น เบี่ยงเบนไม่เกินร้อยละ 15 และ ค่า p-value จากสถิติ paired t-test เปรียบเทียบระหว่างการเตรียมตัวอย่างตั้งไว้ เป็นเวลา 8 ชั่วโมง กับการเตรียมตัวอย่างใหม่ ค่า p-value ที่ได้มากกว่า 0.05 แสดงว่าผลที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

3.7.2 Auto sampler stability

เตรียมสารมาตรฐาน amphetamine และ methamphetamine ในปัสสาวะที่ 2 ความเข้มข้น คือ ความเข้มข้นต่ำ (QCL) และความเข้มข้นสูง (QCH) ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ เตรียมตัวอย่างและวางตัวอย่าง ที่พร้อมที่จะฉีดไว้ใน Auto sampler เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเวลาที่วางตัวอย่างเพื่อรอตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC/MS ที่นานที่สุดของการปฏิบัติงาน นำตัวอย่างดังกล่าวมาฉีดและเทียบผลการวิเคราะห์กับ QCL และ QCH ที่เตรียมใหม่

เกณฑ์การยอมรับ<sup>(8)</sup>

คำนวณหาค่า % bias และ %CV ของแต่ละความเข้มข้น

เบี่ยงเบนไม่เกินร้อยละ 15 และ ค่า p-value จากสถิติ paired t-test เปรียบเทียบระหว่างการเตรียมตัวอย่างตั้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมงกับการเตรียมตัวอย่างใหม่ ค่า p-value ที่ได้มากกว่า 0.05 แสดงว่า ผลที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

3.8 การทดสอบ dilution integrity

เตรียมสารมาตรฐาน amphetamine และ methamphetamine ใน matrix blank ที่ความเข้มข้นสูงกว่าสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 3,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สูงที่สุดของ Calibration curve ความเข้มข้นที่เตรียมเท่ากับ 10,000, 25,000, 50,000, 100,000 และ 250,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการ dilute ตัวอย่างด้วย urine blank อัตราส่วน 1:9, 1:24, 1:49, 1:99 และ 1:249 ตามลำดับ นำไปตรวจวิเคราะห์ด้วย GC/MS ได้ค่าความเข้มข้นเมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐานและนำค่าความเข้มข้นที่เครื่องวัดได้มาคูณกับจำนวนเท่าที่ทำการ dilute จะได้ปริมาณความเข้มข้นของตัวอย่าง

เกณฑ์การยอมรับ<sup>(8)</sup>

คำนวณค่า % bias และ %CV ของแต่ละความเข้มข้นให้เบี่ยงเบนได้ไม่เกินร้อยละ 15

3.9 Matrix effect

นำ urine blank จำนวน 6 แห่ง มาเติมสารมาตรฐาน amphetamine และ methamphetamine ที่ระดับความเข้มข้น QCL และ QCH หลังจากนั้นนำไปตรวจวิเคราะห์และเทียบกับกราฟมาตรฐาน

เกณฑ์การยอมรับ<sup>(8)</sup>

%CV ของแต่ละความเข้มข้นเบี่ยงเบนไม่เกินร้อยละ 15

4. การเข้าร่วมการทดสอบความชำนาญ (Proficiency testing)

เข้าร่วมทดสอบความชำนาญ (proficiency testing, PT) กับสำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ผลที่ได้อยู่ในเกณฑ์การยอมรับค่า z-score  $\leq 2$

**ผลการศึกษา**

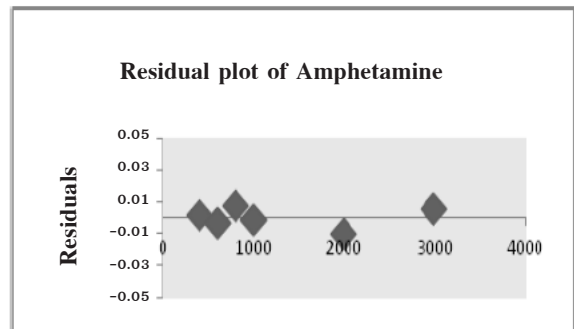
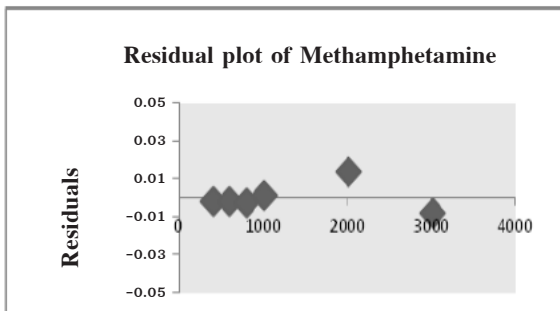
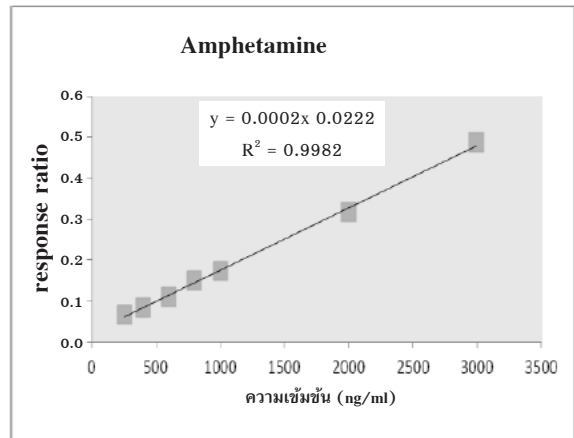
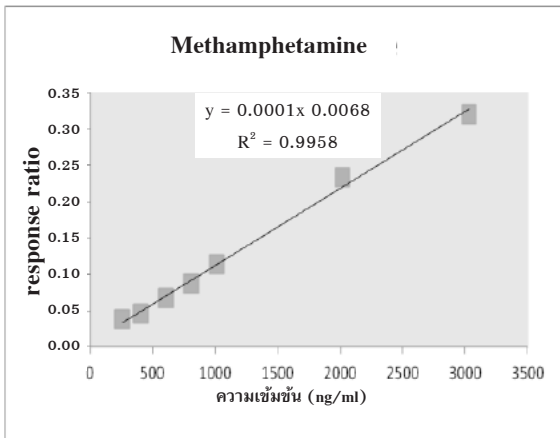
จากผลการทดสอบความถูกต้องของวิธี พบว่า วิธีนี้มี ความจำเพาะเจาะจงและไม่พบว่ามี carry over ข้อมูลดัง ตารางที่ 2 ปริมาณ methamphetamine และ amphetamine ต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (LLOQ) เท่ากับ 250 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าต่ำสุดที่ตรวจพบ (LOD) เท่ากับ

50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และการทดสอบความเป็น เส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (linearity and range) อยู่ในช่วง 250–3,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ดังภาพที่ 2 โดยค่า correlation coefficient (r) ของ methamphetamine และ amphetamine เท่ากับ 0.9979–0.9994 และ 0.9982–0.9990 ตามลำดับ ดังตารางที่ 3 มีความแม่นยำ

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความเฉพาะเจาะจงและ carry over

พารามิเตอร์	ร้อยละของค่า response ที่ RT เดียวกันกับ สารมาตรฐานเทียบกับ LLOQ		ร้อยละของค่า response ที่ RT เดียวกันกับ internal standard เทียบกับ LLOQ
	Amphetamine	Methamphetamine	
ความเฉพาะเจาะจง	6.77	13.91	0.42
Carry over	0.20	10.72	1.60
Acceptance criteria:	ร้อยละของค่า response ที่ RT เดียวกันกับสารมาตรฐาน ต้องไม่มากกว่า ร้อยละ 20 และ ร้อยละของค่า response ที่ RT เดียวกันกับ internal standard ต้องไม่มากกว่าร้อยละ 5		

ภาพที่ 2 แสดงความเป็นเส้นตรงช่วงความเข้มข้น 250 – 3,000 นาโนกรัม/มิลลิลิตร



ตารางที่ 3 ข้อมูลการทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์

ชนิดสาร	ช่วงความเป็นเส้นตรง (ng/ml)	ช่วง Correlation coefficient (r)	Back-calculated value (% bias)
Amphetamine	250-3,000	0.9982-0.9990	14.29-5.26
Methamphetamine	250-3,000	0.9979-0.9994	16.02-7.74

(accuracy) แสดงด้วยค่าเฉลี่ย %recovery อยู่ในช่วง 89.42-111.07 ดังตารางที่ 4 และความเที่ยง (precision) แสดงด้วยค่า %CV อยู่ในช่วง 1.91-10.86 และไม่พบความแตกต่างของการวิเคราะห์ซ้ำระหว่างวัน ( $p > 0.05$ ) ดังตารางที่ 5 จากการทดสอบ Bench top stability พบว่าสารละลายตัวอย่างสามารถคงสภาพที่เวลา 8 ชั่วโมงและจากการทดสอบ auto sampler stability พบว่าสารละลายตัวอย่างสามารถคงสภาพที่เวลา 24 ชั่วโมง ดังตารางที่ 6 จากโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน ทั้ง 3 ชนิด ดังภาพที่ 3 นำไปหาค่าการแยก (resolution) ระหว่าง amphetamine และ phentermine เท่ากับ 2.80

และระหว่าง phentermine และmethamphetamine เท่ากับ 3.50 ดังตารางที่ 7 และแสดง mass spectrum ของสารแต่ละชนิด ดังภาพที่ 4

การเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิค Headspace และตรวจวิเคราะห์ด้วย GC/MS ได้พัฒนาและนำมาใช้ในการตรวจหาปริมาณ methamphetamine ในงานประจำ ตั้งแต่ปี 2558 ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างไปแล้วประมาณ 50,000 ตัวอย่าง สามารถลดความสูญเปล่าได้มาก เช่น ลดระยะเวลาการตรวจวิเคราะห์ ลดการใช้ชนิดและปริมาณสารเคมี ลดปริมาณตัวอย่างที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ ลดขั้นตอนและความยุ่งยาก ดังตารางที่ 8 เมื่อเปลี่ยนวิธีการตรวจ

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีความแม่นยำ (Accuracy)

พารามิเตอร์	Intra-day		Inter-day	
	%bias (%recovery)		%bias (%recovery)	
Accuracy	Amphetamine	Methamphetamine	Amphetamine	Methamphetamine
LLOQ (250 ng/ml)	-9.40 (90.60)	4.83 (104.83)	4.61 (104.61)	-3.30 (96.70)
QCL (350 ng/ml)	-10.53 (89.47)	-10.55 (89.45)	-7.64 (92.36)	-2.37 (97.63)
QCM (1,500 ng/ml)	6.81 (106.81)	-10.00 (90.00)	-2.01 (97.99)	-9.39 (90.61)
QCH (2,500 ng/ml)	-10.58 (89.42)	11.07 (111.07)	-8.03 (91.97)	11.07 (111.07)

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีความเที่ยง (precision)

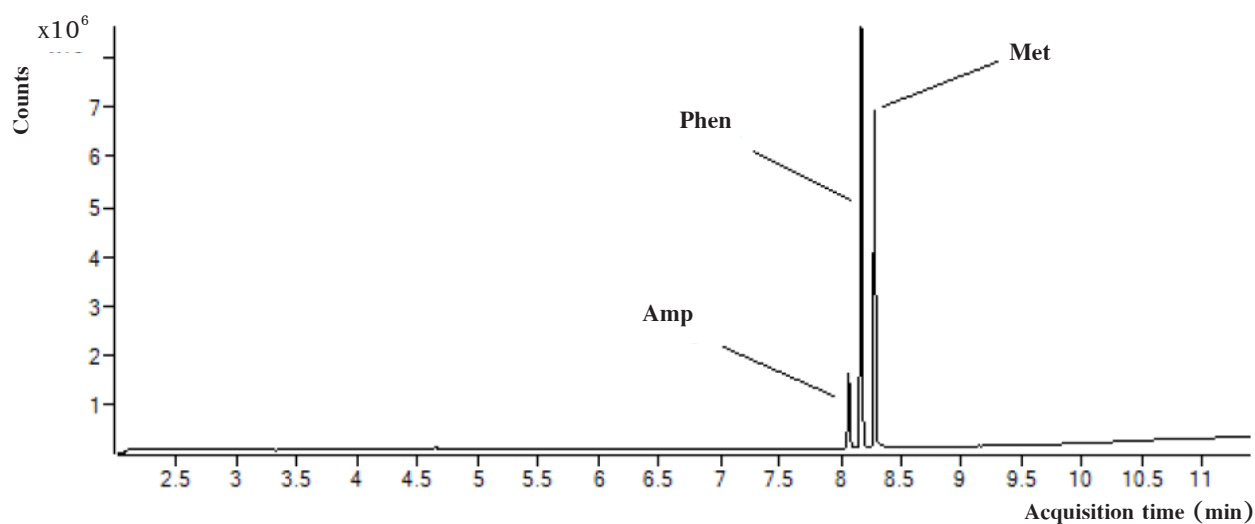
พารามิเตอร์	Intra-day (%CV)		Inter-day (p-value)	
	%bias (%recovery)		%bias (%recovery)	
Precision	Amphetamine	Methamphetamine	Amphetamine	Methamphetamine
LLOQ (250 ng/ml)	10.86	5.23	0.08	0.08
QCL (350 ng/ml)	8.67	8.04	0.29	0.06
QCM (1,500 ng/ml)	6.49	4.56	0.20	0.44
QCH (2,500 ng/ml)	5.33	1.91	0.46	0.06



ตารางที่ 6 ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีพารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้

พารามิเตอร์	%bias	% CV	paired t-test (p-value)
Short term stability (8 hr) (bench top stability)	(QCL/QCH)	(QCL/QCH)	(QCL/QCH)
- Amphetamine	-6.05/-5.37	6.78/3.02	0.82/0.46
- Methamphetamine	0.49/12.48	6.42/1.80	0.76/0.62
Auto sampler stability (24 hr)			
- Amphetamine	1.484536082	11.26/3.17	0.86/0.98
- Methamphetamine	7.53/13.09	2.65/1.44	0.25/0.41
Dilution Integrity			
- Amphetamine	10.46	10.05	-
- Methamphetamine	11.68	3.38	-
Matrix effect			
- Amphetamine	-	1.25/8.64	-
- Methamphetamine	-	10.31/2.43	-

ภาพที่ 3 chromatogram ของ amphetamine (Amp), phentermine (Phen) และ methamphetamine (Met)

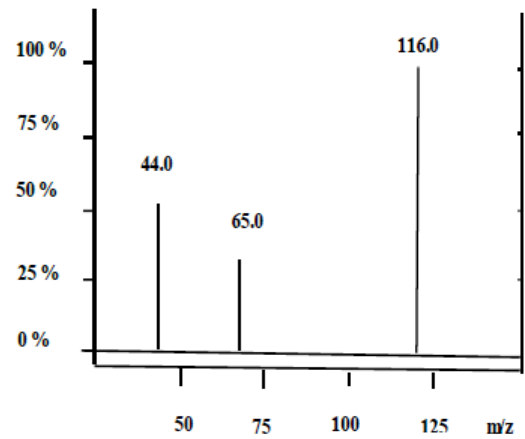
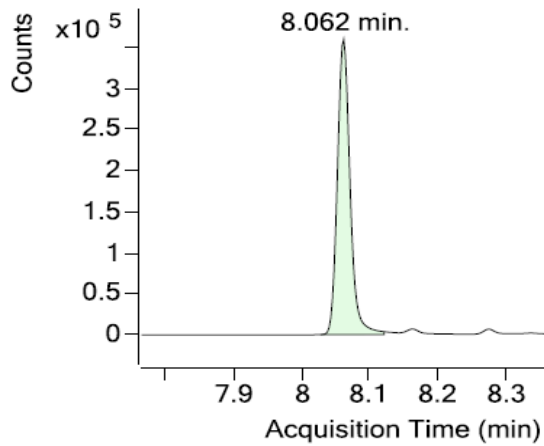


ตารางที่ 7 แสดงค่าการแยก (resolution) ของสารทั้ง 3 ชนิด

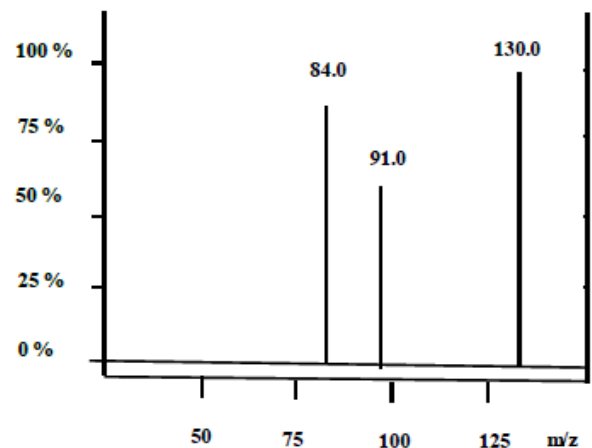
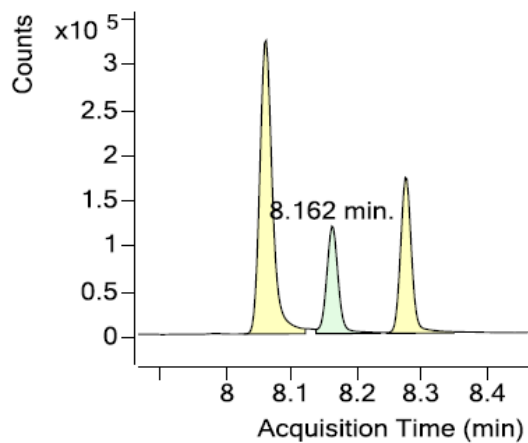
ชนิดสาร	RT (นาที)	Resolution (R)	Acceptance criteria <sup>(4)</sup>
Amphetamine	8.06	} 2.80	R <sub>≥</sub> 1.50
Phentermine	8.16		
Methamphetamine	8.28	} 3.50	

ภาพที่ 4 Chromatogram และ mass spectrum (m/z) ของ amphetamine, phentermine และ methamphetamine

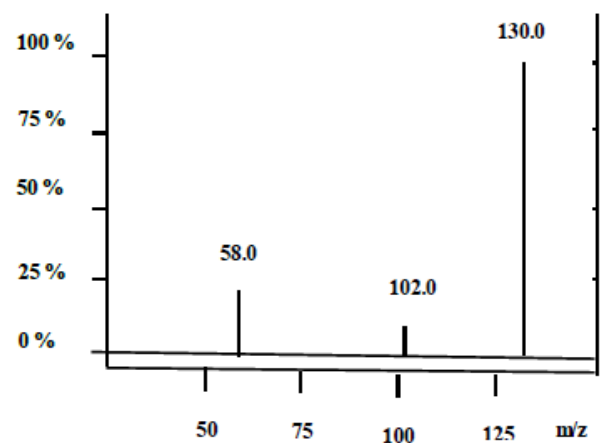
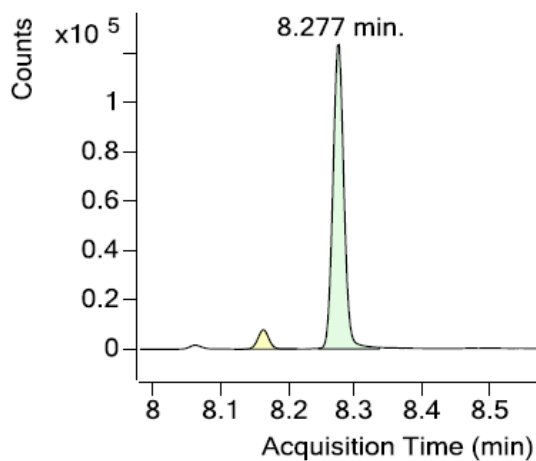
Target compound: amphetamine



ISTD compound: phentermine



Target compound: methamphetamine



ตารางที่ 8 ข้อมูลเปรียบเทียบระหว่างวิธีเดิม (TLC) และวิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่ (Headspace-GC/MS)

ความสูญเปล่า (waste)	ข้อมูลเปรียบเทียบระหว่าง 2 วิธี	
	วิธีเดิม (TLC)	วิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่ Headspace-GC/MS
1. turn around time (กรณีตัวอย่างไม่เกิน 200 ตัวอย่าง/เดือน)	7 วันทำการ	4 วันทำการ
2. ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง	15 ขั้นตอน	8 ขั้นตอน
3. ความยุ่งยากของการเตรียมตัวอย่าง	มาก	น้อย
4. ระยะเวลาของการสัมผัสสารเคมี	25 นาที/ตัวอย่าง	3 นาที/ตัวอย่าง
5. ชนิดของสารเคมีที่ใช้	13 ชนิด	2 ชนิด
6. ปริมาณสารเคมีที่ใช้	มาก (200 ml)	น้อย (15 µl)
7. ปริมาณตัวอย่างที่ใช้ตรวจวิเคราะห์	3 มิลลิลิตร	0.3 มิลลิลิตร
8. เครื่องมือและวัสดุวิทยาศาสตร์ที่ใช้	23 ชนิด	16 ชนิด
9. ความไวของวิธี (LOD)	300 ng	50 ng
10. สามารถรายงานผลเป็นปริมาณ	ไม่ได้	ได้
11. ความสามารถในการเป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิง	ไม่ได้	ได้

วิเคราะห์ได้สอบถามความพึงพอใจของผู้รับบริการ ได้แก่ เจ้าหน้าที่ตำรวจในเขตรับผิดชอบ จำนวน 5 จังหวัด คือ พิษณุโลก อุตรดิตถ์ สุโขทัย ตาก เพชรบูรณ์ ینگประมาณ 2560 จำนวน 22 แห่ง ซึ่งได้สอบถามความพึงพอใจ ประเด็นเกี่ยวกับการเปลี่ยนวิธีจากวิธีเดิมคือ TLC เป็น Headspace-GC/MS พบว่า มีความพึงพอใจมากขึ้นจากร้อยละ 76.14 เป็นร้อยละ 87.50

### วิจารณ์

การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ methamphetamine และ amphetamine ในปัสสาวะด้วย GC/MS สามารถเตรียมตัวอย่างได้หลายเทคนิค เช่น Solid Phase Extraction (SPE), Solid Phase Micro Extraction (SPME) และ Headspace ซึ่งงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้การเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิค Headspace ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์หาและแยกสารอินทรีย์ที่ระเหยง่ายหรือสารอินทรีย์กึ่งระเหยได้ ปัจจุบันเป็นเทคนิคที่เป็นที่นิยมอย่างมาก Headspace คือ ช่องว่างเหนือสารตัวอย่างภายในขวดบรรจุ ซึ่งไอของสารตัวอย่างที่ระเหยจากสารตัวอย่างจะเก็บสะสมอยู่ในช่องว่างนี้ และไอของสารตัวอย่างจะถูกนำไปวิเคราะห์หา

สารที่สนใจด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี (GC) และตรวจวัดด้วย Mass Spectrometer (MS) การเตรียมตัวอย่างด้วย Headspace สามารถลดขั้นตอนและเวลาการเตรียมตัวอย่างและไม่ต้องใช้วัสดุสิ้นเปลือง เช่น SPE หรือ SPME ที่มีราคาค่อนข้างสูง ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสั้นและไม่ยุ่งยาก มีการปนเปื้อนในระบบเครื่องมือ น้อย ช่วยยืดอายุการใช้งานลดค่าใช้จ่ายในการบำรุงรักษาและการซ่อมแซมของเครื่องมือได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของศิริรัตน์ ชูสกุลเกรียง และคณะ<sup>(10)</sup> ได้ศึกษาการวิเคราะห์ methamphetamine ในตัวอย่างปัสสาวะด้วย GC-FID โดยการเตรียมอนุพันธ์ร่วมกับ SPE และวิธี Headspace พบว่าการเตรียมตัวอย่างด้วย SPE และ Headspace ให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่ไม่แตกต่างกัน โดยเฉพาะเทคนิคการเตรียมตัวอย่างด้วย Headspace ยังเป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็วใช้สารเคมีน้อย เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม<sup>(10)</sup> ส่วน SPE มีข้อจำกัดคือ ต้องใช้เวลาในการสกัดเนื่องจากมีหลายขั้นตอน เครื่องเตรียมตัวอย่างแบบอัตโนมัติมีราคาสูง ใช้สารเคมีและตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความเป็นพิษหลายชนิด<sup>(11)</sup> และจากหลายงานวิจัยพบว่าในการหาปริมาณ methamphetamine ด้วย Head-

space-GC/MS ส่วนใหญ่จะนิยมเตรียมตัวอย่างโดยการ ใช้เทคนิค SPME เช่น งานวิจัยของ Jurado C. และคณะ<sup>(12)</sup> และ Namera A และคณะ<sup>(13)</sup> ใช้พอลิเมอร์เคลือบบน ไฟเบอร์ขนาดเล็ก (SPME) หลังจากนั้นสารที่ต้องการจะ ดูดซับบนพอลิเมอร์จากไอของสาร ข้อดีของวิธีนี้คือ มีขั้นตอนการวิเคราะห์ที่สั้น ง่าย ไม่ต้องใช้สารละลายอินทรีย์ และเป็นวิธีที่มีสภาพไวสูงเหมาะกับการวิเคราะห์ตัวอย่าง ที่มีความเข้มข้นต่ำๆ อย่างไรก็ตามยังพบข้อจำกัด เช่น ความไม่เสถียรและไม่ทนทานต่อตัวทำละลายอินทรีย์ การ หักง่ายของไฟเบอร์การหลุดออกของพอลิเมอร์ที่เคลือบ อยู่บนไฟเบอร์ตลอดจนไฟเบอร์มีราคาสูง<sup>(11)</sup> และจากการ ศึกษาวิจัยของอรพิน ทนันชิต และคณะ<sup>(14)</sup> ได้ศึกษาทาง เลือกใหม่ในการตรวจวิเคราะห์ยาในกลุ่ม amphetamines ไว้ หลายเทคนิค เช่น GC-MS เตรียมตัวอย่างด้วย SPE และ เทคนิค LC-MS เตรียมด้วย online SPE ข้อมูลพบว่าการ ตรวจยาในกลุ่ม amphetamines สามารถใช้เทคนิคการตรวจ วิเคราะห์และเตรียมตัวอย่างได้หลายเทคนิคซึ่งมี ประสิทธิภาพไม่ต่างกันมากนัก หน่วยงานที่ตรวจพิสูจน์ ยาในกลุ่มนี้สามารถเลือกใช้วิธีต่างๆได้ตามความเหมาะสม และตามความพร้อมของแต่ละหน่วยงาน เมื่อพิจารณา ต้นทุนต่อหน่วยเฉพาะค่าวัสดุ (material cost) ของการเตรียมตัวอย่างด้วย SPE เทคนิคการตรวจวิเคราะห์ด้วย GC-MS ต้นทุนประมาณ 628 บาท และ LC-MS มี ต้นทุน ราคา 438 บาท<sup>(14)</sup> ส่วนเทคนิคการเตรียมตัวอย่าง ด้วย Headspace GC/MS ต้นทุนต่อหน่วย 250 บาท ส่วน วิธี TLC 77 บาท แม้ว่าวิธี TLC มีต้นทุนถูกที่สุด แต่เป็น วิธีที่ไม่สามารถรายงานผลเป็นตัวเลขที่แน่นอนได้และใช้ เวลาในการตรวจวิเคราะห์นาน มีการใช้สารเคมีหลายชนิด ในปริมาณมากกว่า อาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้ ปฏิบัติงานและเป็นมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม การวิจัยครั้งนี้ ได้เลือกวิธีการตรวจหาปริมาณ methamphetamine และ amphetamines ด้วยเทคนิค GC-MS เตรียมตัวอย่างด้วย Headspace ด้วยเหตุผลหลายประการดังที่ได้กล่าวไว้ใน ข้างต้น

## สรุป

จากการพัฒนาวิธีตรวจหาปริมาณ methamphetamine และ amphetamine ในปัสสาวะด้วย GC/MS เทคนิค การเตรียมตัวอย่างแบบ Headspace เป็นวิธีที่ความจำเพาะ เจาะจง มีขีดจำกัดในการตรวจพบ (limit of detection, LOD) เท่ากับ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าขีดจำกัดของ การวัดเชิงปริมาณ (lower limit of quantitation, LLOQ) เท่ากับ 250 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ช่วงการวิเคราะห์ที่ให้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงของ methamphetamine และ amphetamine (linear working range) เท่ากับ 250 - 3,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า correlation coefficient ในช่วง 0.9979-0.9994 และ 0.9982 - 0.9990 ตามลำดับ มีความแม่นยำ (accuracy) แสดงด้วย ค่าเฉลี่ย % recovery อยู่ในช่วง 89.42-111.07 และ ความเที่ยง (precision) แสดงด้วยค่า %CV ในช่วง 1.91- 10.86 ตัวอย่างที่นำออกจากตู้เย็นเพื่อรอวิเคราะห์ทางไว้ ที่อุณหภูมิห้อง (bench top stability) สามารถคงสภาพ อยู่ได้เป็นเวลา 8 ชั่วโมง และมีความคงสภาพของสารละลาย ที่เตรียมและวางไว้ที่ auto sampler stability เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การพัฒนาวิธีนี้เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการ ตรวจยืนยันให้สามารถสนับสนุนข้อมูลผลการตรวจได้ รวดเร็วขึ้นทันต่อสถานการณ์เพื่อช่วยในการเฝ้าระวัง ป้องกันการแพร่ระบาดของสารเสพติด สามารถหา ปริมาณและรายงานผลเป็นปริมาณตัวเลขตามที่กฎหมาย กำหนดได้ ผลการตรวจมีความน่าเชื่อถือ และเป็นวิธีที่ทันสมัย มีความไวสูง เตรียมตัวอย่างง่าย รวดเร็วกว่าวิธี TLC ซึ่งเป็นวิธีเดิม เป็นการเตรียมความพร้อมเพื่อก้าวไปสู่การ เป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงในภูมิภาค การพัฒนาวิธี ดังกล่าว ง่ายและสะดวกต่อการปฏิบัติงาน ลดการสัมผัส สารเคมีส่งผลให้ผู้ปฏิบัติงานปลอดภัยและลดการปน เปื้อนสารเคมีสู่สิ่งแวดล้อม วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้เหมาะสำหรับ นำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ งานประจำที่มีตัวอย่าง ปริมาณมาก รวดเร็วและเป็นประโยชน์สำหรับผู้ที่ต้องการ นำผลไปใช้ในกระบวนการยุติธรรมต่อไป

## กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณผู้อำนวยการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 2 พิษณุโลก ที่ให้การสนับสนุนทรัพยากร ขอขอบคุณสำนักยาและวัตถุเสพติด ที่ได้ถ่ายทอดความรู้ต่างๆ ขอขอบคุณนางสาวจิราภรณ์ อ่ำพันธ์ุ และนางสาวพรรณทิพย์ ตียพันธ์ุ ที่ให้คำแนะนำและความรู้ทางวิชาการทำให้งานวิจัยสำเร็จไปได้ด้วยดี

## เอกสารอ้างอิง

1. สุวพันธ์ุ คะโยธา, วุฒิพงศ์ ภักดีกุล. ปัจจัยเสี่ยงต่อการใช้สารเสพติดและปัจจัยที่มีผลต่อการป้องกันยาเสพติดของเยาวชนในโรงเรียนมัธยมศึกษา เขตเทศบาลนครสกลนคร. วารสารโรงพยาบาลสกลนคร 2018;21(3):84-95.
2. รัชนิกร บุญธรรม, พสนพรรณ ฉิมหัวร้อง, พรพิมล ป้อมอุ้น เรือน, กัญญา เต็ดดอกฟ้า, สุมาลี ฤทธิอุตม. ธุรกิจยาบ้าออนไลน์ส่งผลการแพร่ระบาดในเขตพื้นที่ภาคเหนือตอนล่าง ปี 2561. ใน: ฌัฐพัชร์ รัตนเดชานาคินทร์, บรรณาธิการ. รายงานประจำปี 2561. พิษณุโลก: ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 2; 2561. หน้า 80-1.
3. ปรียาพรรณ เพชรปรานี. Methamphetamine. วารสาร-นิติเวชศาสตร์ 2554;4(1):66-72.
4. สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. วิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจพิสูจน์เสพติดในปัสสาวะ เล่มที่ 1. กรุงเทพมหานคร: คณะกรรมการพิมพ์; 2558.
5. Moffat AC, Osselton MD, Widdop B, editors. Clarke's analysis of drugs and poison. 4<sup>th</sup> ed. London: Pharmaceutical Press; 2011.
6. คณะกรรมการป้องกันและปราบปรามยาเสพติด. ประกาศคณะกรรมการป้องกันและปราบปรามยาเสพติด เรื่องกำหนดหลักเกณฑ์วิธีการและเงื่อนไขการตรวจหรือทดสอบว่าบุคคลหรือกลุ่มบุคคลใดมีสารเสพติดในร่างกายหรือไม่. ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 137, ตอนพิเศษ 16ก ง. (ลงวันที่ 17 กรกฎาคม 2563).
7. สุเมธ เทียงธรรม, อรพิน หนันขัติ. รายงานการตรวจสอบความถูกต้องวิธี (bioanalytical method validation report). นนทบุรี: สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2556.
8. Committee for Medicinal products for Human Use (CHMP). Guideline on bioanalytical method validation; London: European Medicines Agency Science Medicines Health; 2011.
9. ทิพวรรณ นิ่งน้อย. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดี่ยว. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2549.
10. ศิรรัตน์ ชูสกุลเกรียง, วิบูลวรรณ สร้อยเพชร, ศุภชัย ศุภลักษณ์นารี. การวิเคราะห์เมทแอมเฟตามีนในตัวอย่างปัสสาวะด้วยแก๊สโครมาโตกราฟีที่มีเฟลมไอออนเซชันเป็นตัวตรวจวัดโดยใช้วิธีการเตรียมอนุพันธ์ร่วมกับโซลิดเฟส-เอ็กซ์แทรกชันและวิธีเฮดสเปซ. Viridian E-Journal, Science and Technology Sillapakorn University 2561;5(5): 19-31.
11. อภิญญา นวคุณ. วิธีการเตรียมตัวอย่างที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมด้วยการสกัดระดับจุลภาค. วารสารวิทยาศาสตร์-บูรพา 2558;20(1):227-35.
12. Jarado C, Gimenez MP, Soriano T, Menendez M, Repetto M. Rapid analysis of amphetamine, methamphetamine, MDA, and MDMA in urine using solid-phase microextraction, direct on-fiber derivatization, and analysis by GC-MS. J Anal Toxicol 2000;24(1):11-6.
13. Namera A, Yashiki M, Kojima T. Automated headspace solid-phase microextraction and in-matrix derivatization for the determination of amphetamine-related drugs in human urine by gas chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr Sci 2002;40(1):19-25.
14. อรพิน หนันขัติ, สุเมธ เทียงธรรม, รุ่งทิพย์ เจือตี. ทางเลือกใหม่ในการตรวจวิเคราะห์ยาในกลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะ. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2558;ฉบับพิเศษ 2: 223-43.

**Abstract: Efficiency Development and Validate Method in Quantitation of Methamphetamine in Drug Addict by Headspace - GC/MS**

**Ratchaneekorn Boonthum, M.Sc. (Medical Sciences); Pasanapun Chimhuarong, M.Sc. (Analytical Chemistry)**

*Regional Medical Sciences Center 2, Phitsanulok,, Thailand*

*Journal of Health Science 2021;30(6):1134-47.*

The objective of this study was to develop and validate a method for the quantitation of methamphetamine and amphetamine (metabolite) in urine by using Headspace - Gas Chromatograph Mass Spectrophotometer (Headspace - GC/MS). In the process, methamphetamine was extracted from urine sample by vaporization with potassium carbonate. Phentermine was used for internal standard and derivatized with ethyl chloroformate. The result of validation method shown that, both of the limit of detection (LOD) and the lower limit of quantification (LLOQ) for methamphetamine and amphetamine were 50 ng/ml and 250 ng/ml, respectively. Linearity and range were 250 - 3,000 ng/ml; and correlation coefficients (r) of methamphetamine and amphetamine were 0.9979 - 0.9994 and 0.9982 - 0.9990 respectively. The accuracy was at 89.42-111.07%. The precision shown by %CV was 1.91-10.86. Comparison between this method and conventional method (TLC) revealed that the analytical process reduced from 15 to 8 steps and reduced the time of service from 7 days to 4 days. Reduced type and quantitation of chemicals substance and reduced chemicals substance contaminate to environment, therefore, increase safety for workers. The validation of this method found sensitivity and specificity were in line with the legal requirement of Thailand.

**Keywords:** methamphetamine; amphetamine; headspace-GC/MS