การบ่งชี้ที่มาของมอร์ฟีนในปัสสาวะโดยใช้ตัวดูดซับของแข็งแบบออนไลน์ ลิควิดโครมาโทกราฟี-แทนเดมแมสสเปกโทรเมทรี

รุ่งทิพย์ เจือตี่* ภรณ์ทิพย์ ท้วมทอง และ อรพิณ ทนันชัติ

สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ Department of Medical Sciences

บทคัดย่อ

ตามพระราชบัญญัติป้องกันและปราบปรามยาเสพติด พ.ศ. 2519 เมื่อพบมอร์ฟีนในปัสสาวะตั้งแต่ 300 นาโนกรัม/มิลลิลิตรขึ้นไป ถือว่าเป็นผู้มีสารเสพติดในร่างกาย อย่างไรก็ตามผู้เสพฝิ่น โคเดอีน เฮโรอีน รวมถึงการเสพมอร์ฟีน ก็สามารถพบมอร์ฟีนในปัสสาวะได้ หากพบ 6MAM จะบ่งชี้การใช้เฮโรอีน อัตราส่วนระหว่างโคเดอีนต่อมอร์ฟีน หากมากกว่า 1 บ่งชี้การใช้โคเดอีน ดังนั้นการตรวจสารเหล่านั้นจะช่วยบ่งชี้ที่มาของมอร์ฟีนได้ วัตถุประสงค์ของการวิจัยเพื่อระบุที่มาของมอร์ฟีนที่ตรวจพบในร่างกาย รวมทั้งปริมาณที่ตรวจพบได้อย่างถูกต้อง ด้วยเทคนิคตัวดูดซับของแข็งแบบออนไลน์ ลิควิดโครมาโทกราฟี แทนเดมแมสสเปกโทรเมทรี โดยใช้ Morphine-d3 และ 6-MAM-d3 เป็น internal standard สกัดสารด้วย ตัวดูดซับของแข็งแบบออนไลน์ แยกสารด้วยคอลัมน์ชนิด ion-exchange ตรวจวัดด้วยแทนเดมแมสสเปกโทรเมทรี เทคนิค ESI positive mode ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีอ้างอิงตาม FDA guidance ปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ของ 6-MAM เท่ากับ 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ช่วงความเป็นเส้นตรงของโคเดอีนและมอร์ฟีนเท่ากับ 100 – 2000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร วิธีวิเคราะห์ มีความสำเร็จในการใช้ระบุที่มาและปริมาณของมอร์ฟีนในปัสสาวะ สามารถใช้ในการคัดแยกผู้เสพยาเสพติดในงานประจำของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์การแพทย์

Abstract

According to the Narcotics Control Act of 2519 B.E., anybody who is detected morphine in urine at the 300 ng/ml cutoff threshold, they will be reported as the drugs user. However, morphine in urine can be detected in opium, codeine, heroin, or morphine users. Therefore, 6MAM can be used to identify persons using heroin, while the ratio of codeine: morphine above 1 is useful to identify persons taking codeine. Thus, these substances can be indicated the sources of morphine. The aim of the present work was to derive the sources of morphine in body fluids and quantification of morphine correctly using on-line solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Morphine-d3 and 6MAM-d3 were used as internal standard. Samples were prepared by online SPE extraction. The separation was performed using ion-exchange column and detected by tandem mass spectrometry with electron spray ionization at positive mode. The method was validated according to the FDA guidance. Limit of detection of 6MAM was 1 ng /ml. The linear range of codeine and morphine was obtained from 100-2000 ng/mL. This developed method was successfully used for quantification of morphine in human urine and its source. The method can be applied for classification of drugs users in routine job of Department of Medical Sciences.

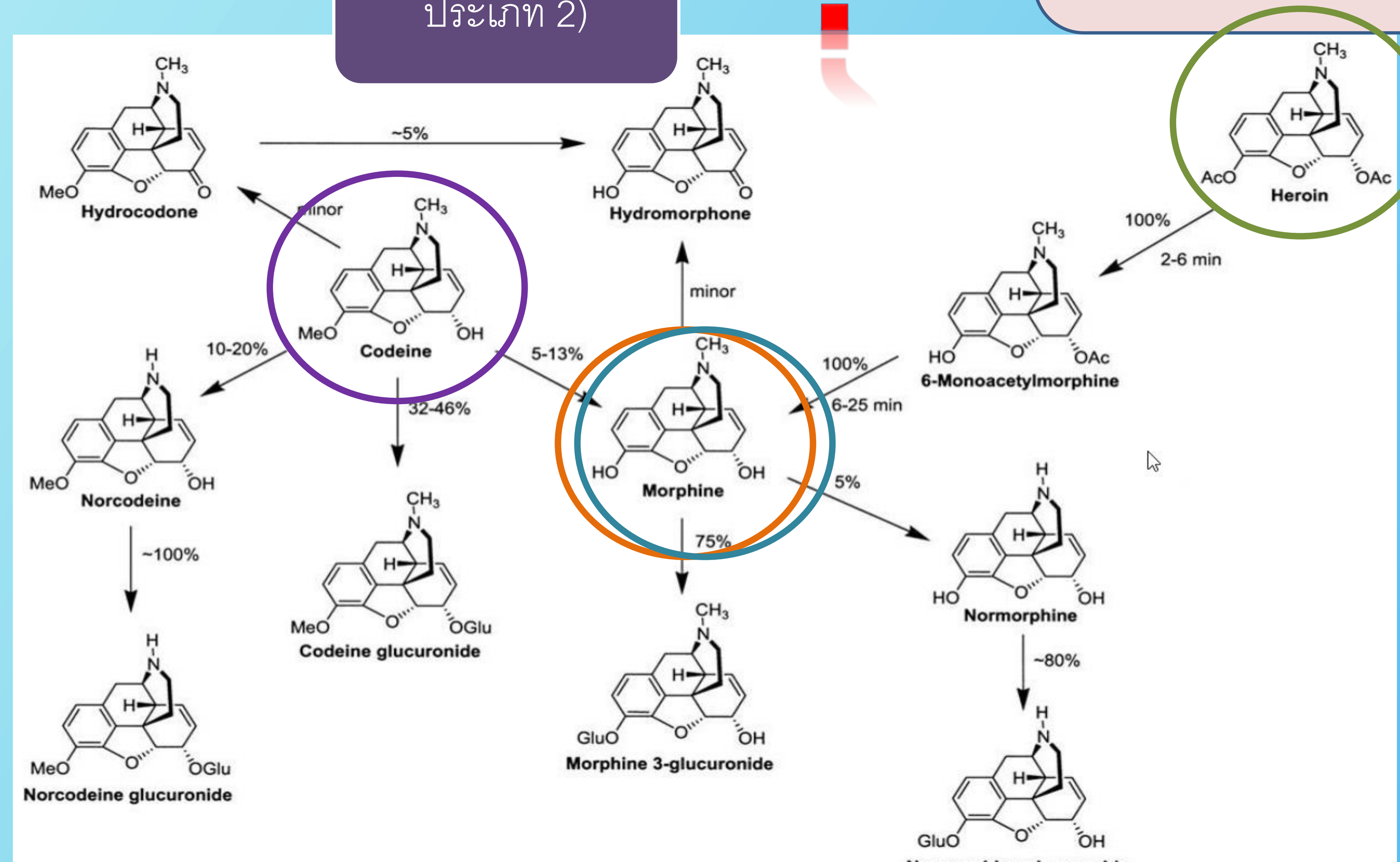
ความเป็นมา

พบมอร์ฟีนในปัสสาวะ > 300 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (ng/mL) ผิดกฎหมาย (1)

- เสพเฮโรอีน (สารเสพติดให้โทษประเภท 1)
- เสพโคเดอีน (สารเสพติดให้โทษประเภท 2)
- เสพมอร์ฟีน (สารเสพติดให้โทษประเภท 2)

?

วัตถุประสงค์ของการวิจัย เพื่อพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีระบุที่มาของมอร์ฟีนที่ตรวจพบในร่างกาย รวมทั้งปริมาณที่ตรวจพบได้อย่างถูกต้อง ด้วยเทคนิคตัวดูดซับของแข็งแบบออนไลน์ ลิควิดโครมาโทกราฟี แทนเดมแมสสเปกโทรเมทรี



รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างโมเลกุล และความสัมพันธ์ของมอร์ฟีน โคเดอีน และ เฮโรอีน จาก http://jwhitesell.ucsd.edu/documents/Alkaloids.pdf

วัสดุและวิธีการ

- สารมาตรฐาน จาก Lipomed Purity > 98%
- Mophine-d3
- Morphine
- Codeine
- 6-Monoacetyl morphine (6-MAM)
- 6-Monoacetylmorphine-d3 (6-MAM-d3)

วิเคราะห์ด้วย online-SPE LC-MS/MS

ตรวจสอบความถูกต้องของวิธีอ้างอิงตาม FDA Guidance

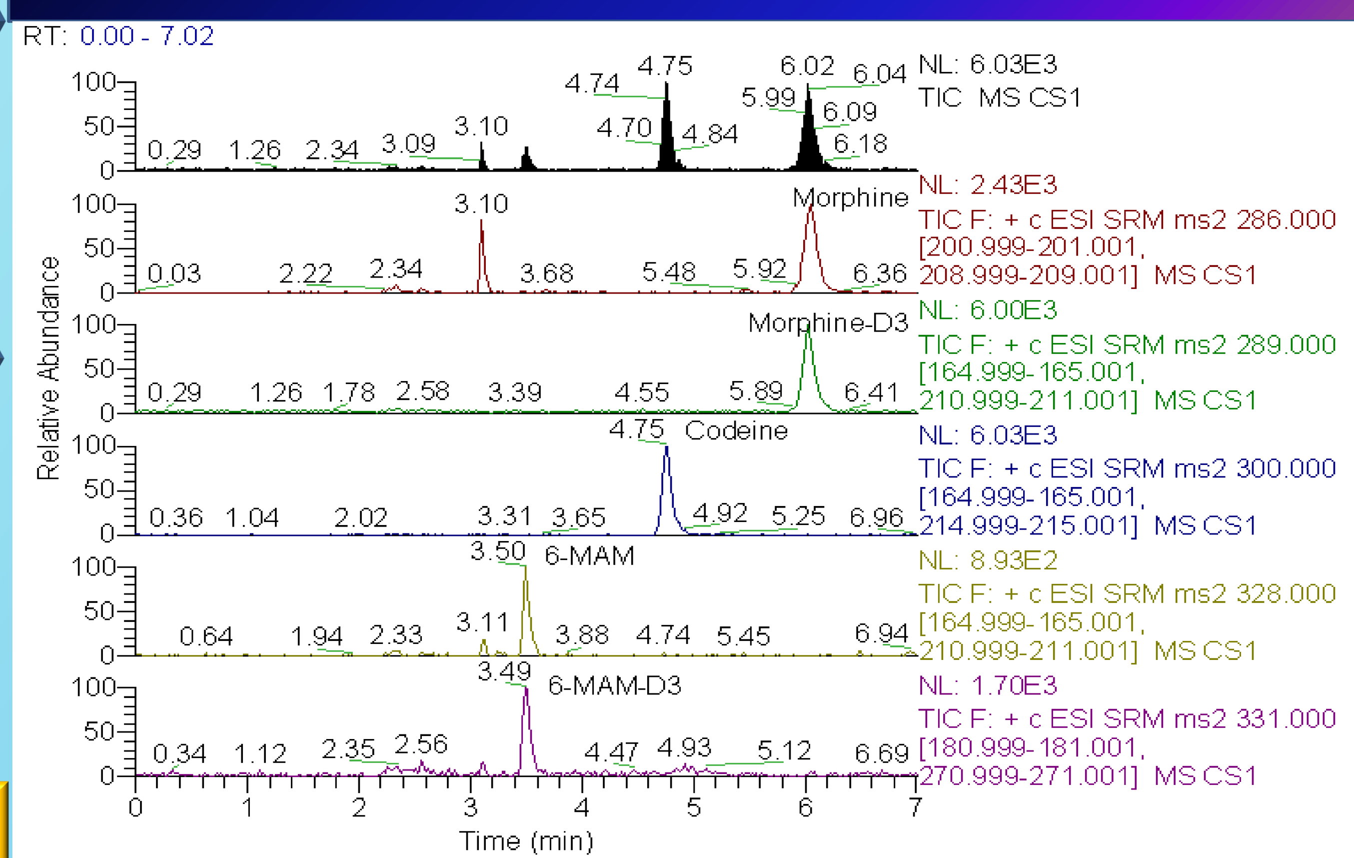
ตัวอย่างส่งตรวจปี 2562 -63 จำนวน 39 ตัวอย่าง

Sample 1 mL + I.S. 5 uL
- เขย่า
- ปั่นเหวี่ยง 14,000 rpm 5 นาที

Online SPE-extraction
- SPE Online: HyperSep retain PEP 2.1 x 20 mm
- Loading solvent: 0.02 % HFBA in water

LC-MS/MS Analysis
- Column: Acclaim Trinity P1,3 µm 3.0 x 100 mm
- Mobile Phase: 0.2%FA in 10mM NH4 formate/ MeOH/ACN (35/5/60),Gradient
- Detection: Positive H-ESI SRM
- Morphine at m/z 286>201, 286>209
- Morphone-d3 at m/z 289>165, 289>211
- Codeine at m/z 300>165, 300>215
- 6-MAM at m/z 328>165, 328>211
- 6-MAM-d3 at m/z 331>181, 331>271

ผลการดำเนินงาน



รูปที่ 2 แสดง Mass Chromatogram ของ Morphine Morphine-d3 Codeine 6-MAM และ 6-MAM-d3

Calibration Range Morphine, Codeine: 100-2000 ng/mL

Limit of Detection of 6-MAM: 1 ng/mL

ตัวอย่างทั้งหมด 39 ตัวอย่าง

Codeine	Morphine	6-MAM
14 ตัวอย่าง >300ng/mL	18 ตัวอย่าง >300ng/mL	1 ตัวอย่าง พบ
4 ตัวอย่าง <100ng/mL	4 ตัวอย่าง <100ng/mL	
21 ตัวอย่าง ไม่พบ	17 ตัวอย่าง ไม่พบ	

สรุปและวิจารณ์

เสพเฮโรอีน
- **พบ 6-MAM (เมทาบอไลต์ของเฮโรอีน)**

เสพโคเดอีน
- **ไม่พบ 6-MAM**
- **พบ Codeine/Morphine > 1**

เสพมอร์ฟีน
- **ไม่พบ 6-MAM**
- **พบ Morphine/Codeine > 1**

- วิธีวิเคราะห์มีประสิทธิภาพในการหาปริมาณมอร์ฟีนในปัสสาวะ และระบุได้ว่าเสพโคเดอีน มอร์ฟีนหรือเฮโรอีน
- 6-MAM ตรวจพบในปัสสาวะหลังใช้เฮโรอีน 2-8 ชั่วโมง(3) ขึ้นกับปริมาณความถี่ และวิธีใช้

เอกสารอ้างอิง

1. สำนักงานคณะกรรมการป้องกันและปราบปรามยาเสพติด กระทรวงยุติธรรม.รวมกฎหมายยาเสพติด พร้อมด้วย กฎกระทรวง ระเบียบ ข้อบังคับ. พิมพ์ครั้งที่ 13. กรุงเทพฯ: ห้างหุ้นส่วนจำกัดบางกอกบล็อก;2556.
2. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER) and Center for Veterinary Medicine (CVM) [Internet]. Guidance for industry: Bioanalytical method validation [updated 2013 Sep; cited 2017 Mar 16]. Available from: https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm368107.pdf
3. Jones AW. Heroin use by motorists in Sweden confirmed by analysis of 6-acetylmorphine in urine [Letter]. J Anal Toxicol 2001; 25:353–5.