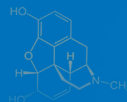
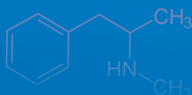
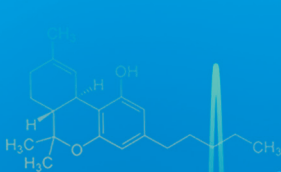


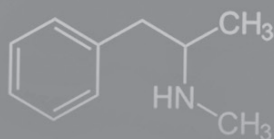
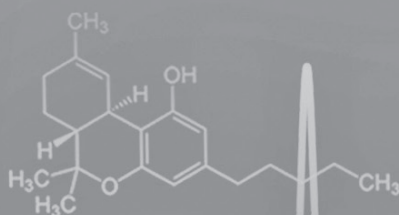
วิธีมาตรฐานสำหรับ การตรวจพิสูจน์สารเสพติดในปัสสาวะ เล่มที่ 1

Standard Methods for Analysis of Narcotics in Urine (Volume I)



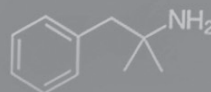
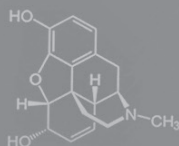
สำนักยาและวัตถุเสพติด
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences

วิธีมาตรฐานสำหรับ
การตรวจพิสูจน์สารเสพติดในปัสสาวะ เล่มที่ 1
Standard Methods for
Analysis of Narcotics in Urine (Volume I)



สำนักยาและวัตถุเสพติด

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences



ที่ปรึกษา

นายอภิชัย มงคล

นางวารุณี จินารัตน์

นางจุรีภรณ์ บุญยวงศ์โรจน์

นายธงชัย เลิศวิไลรัตนพงศ์

นายสมชาย แสงกิจพร

นางสาวสุรัชณี เสวตศิลา

อธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

รองอธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

รองอธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

รองอธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ผู้ช่วยอธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ผู้อำนวยการสำนักยาและวัตถุเสพติด

ผู้จัดทำ

นางอรพิน ทนन्छิ

นางสาวรุ่งทิพย์ เจือตี

นางสาวอังคณา กริชพิทักษ์เงิน

นายสุเมธ เทียงธรรม

นางสาวสรลันนท์ เผ่าพิชพันธุ์

นายภวิชัย ดำเกลี้ยง

สำนักยาและวัตถุเสพติด

สำนักยาและวัตถุเสพติด

สำนักยาและวัตถุเสพติด

สำนักยาและวัตถุเสพติด

สำนักยาและวัตถุเสพติด

สำนักยาและวัตถุเสพติด

เจ้าของ

สำนักยาและวัตถุเสพติด

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จ.นนทบุรี

โทร 0 2951 0000 ต่อ 99162, 99015 โทรสาร 0 2580 5733

รหัสหนังสือ : DMScBDN – 20150803

พิมพ์ที่

โรงพิมพ์คงเกียรติการพิมพ์

เล่มที่ 1 จำนวน 1000 เล่ม

ปีที่พิมพ์ พ.ศ.2558

ISBN : 978-616-11-2721-3

คำนำ

บทบาทหน้าที่และภารกิจหนึ่งของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์คือ การสนับสนุนการแก้ไขปัญหาเสพติดของประเทศ ในด้านการตรวจพิสูจน์ของกลางวัตถุเสพติด การตรวจพิสูจน์สารเสพติดในปัสสาวะและการตรวจวิเคราะห์คุณภาพวัตถุเสพติดที่ใช้ในทางการแพทย์ ตามพระราชบัญญัติวัตถุที่ออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาท พ.ศ. 2518 พระราชบัญญัติป้องกันและปราบปรามยาเสพติด พ.ศ.2519 พระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ พ.ศ. 2522 พระราชกำหนดการป้องกันการใช้สารระเหย พ.ศ. 2533 และพระราชบัญญัติฟื้นฟูสมรรถภาพผู้ติดยาเสพติด พ.ศ. 2545 ผลการตรวจพิสูจน์จากห้องปฏิบัติการเป็นข้อมูลประกอบการบำบัดฟื้นฟูและเป็นหลักฐานสำคัญในทางอรรถคดี กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีห้องปฏิบัติการด้านการตรวจพิสูจน์สารเสพติดในส่วนกลางคือสำนักยาและวัตถุเสพติดและศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ 14 แห่ง กระจายอยู่ทุกภูมิภาคของประเทศ จึงจำเป็นต้องมีวิธีการตรวจพิสูจน์ที่มีประสิทธิภาพและเป็นมาตรฐานเดียวกันทั้งกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

สำนักยาและวัตถุเสพติดร่วมกับ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ 14 แห่ง ดำเนินการจัดทำเอกสารวิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจพิสูจน์สารเสพติดในปัสสาวะขึ้น เพื่อใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจพิสูจน์สารเสพติดในปัสสาวะของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

หวังว่าเอกสารวิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจพิสูจน์สารเสพติดในปัสสาวะ เล่มที่ 1 จะมีประโยชน์อย่างยิ่งต่องานตรวจพิสูจน์สารเสพติดในปัสสาวะ ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์และต่อหน่วยงานอื่นที่เกี่ยวข้อง ที่จะนำไปใช้ในทางปฏิบัติและอ้างอิงต่อไป



(นายแพทย์อภิชัย มงคล)

อธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้จัดทำขอขอบคุณ ท่านที่ให้ข้อคิดเห็นและทบทวนเอกสารฉบับร่างดังต่อไปนี้

- | | |
|-----------------------------------|---|
| 1. นางสาวสุจิตใจ นันทารัตน์ | ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ 1 เชียงใหม่ |
| 2. นางสาวจิราภรณ์ อ่ำพันธ์ | ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ 2 พิษณุโลก |
| 3. นายราเมศ กรณีย์ | ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ |
| 4. นายณัฐพล ไชยศรีหา | ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 6 ชลบุรี |
| 5. นางสาวประทุมวรรณ กิตติอภิบุลย์ | ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 7 ขอนแก่น |
| 6. นางสาวอัจฉิมา ทองบ่อ | ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ 8 อุตรธานี |
| 7. นายวรศักดิ์ อินทร์ชัย | ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ 9 นครราชสีมา |
| 8. นางโชติกา งามอาจณรงค์ | ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ 10 อุบลราชธานี |
| 9. นางแฉล้ม ชนะเดช | ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ 11 สุราษฎร์ธานี |
| 10. นางสาวจตุพร เชื้อช่วยชู | ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ 12 สงขลา |
| 11. นายอุดมศักดิ์ สุตมาตร | ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ 12/1 ตรัง |

สารบัญ

บทที่

หน้า

1. ความรู้ทั่วไป

1.1 ประเภทของยาเสพติดให้โทษ.....	1
1.2 การตรวจหาสารเสพติดในปัสสาวะ.....	3
1.3 เกณฑ์ตัดสินผลบวกว่าเป็นผู้มีสารเสพติดในร่างกาย.....	6
1.4 เมตาบอไลต์ของสารเสพติด สูตรโครงสร้างและมวลโมเลกุล.....	7
1.5 หลักการทางโครมาโทกราฟี.....	10
1.6 การปรับสภาพการทำงานทางเทคนิคโครมาโทกราฟี.....	18
1.7 เกณฑ์การคัดเลือกวิธีมาตรฐานการตรวจพิสูจน์สารเสพติด.....	20

2. วิธีการตรวจพิสูจน์สารเสพติดในปัสสาวะ

2.1 การตรวจเบื้องต้นสารเสพติดในปัสสาวะด้วยหลักการภูมิคุ้มกันวิทยา.....	21
โดยใช้ Rapid Test Kit	
2.2 การตรวจยืนยันเมแทมเฟตามีนในปัสสาวะด้วยเทคนิค.....	24
Thin Layer Chromatography (TLC)	
2.3 การตรวจปริมาณแอมเฟตามีนและเมแทมเฟตามีนในปัสสาวะ.....	35
ด้วยเทคนิค Gas Chromatography – Massspectrometry (GC-MS)	
2.4 การตรวจปริมาณยาบ้าและยาไอในปัสสาวะ.....	49
ด้วยเทคนิค Gas Chromatography – Massspectrometry (GC-MS)	
2.5 การตรวจปริมาณสารกลุ่มแอมเฟตามีนส์และเฮ็คซ์ตาซีในปัสสาวะ.....	62
ด้วยเทคนิค Liquid Chromatography – Massspectrometry (LC-MS)	
2.6 การตรวจปริมาณกัญชาในปัสสาวะ.....	79
ด้วยเทคนิค Gas Chromatography – Massspectrometry (GC-MS)	
2.7 การตรวจปริมาณมอร์ฟินในปัสสาวะ.....	92
ด้วยเทคนิค Gas Chromatography – Massspectrometry (GC-MS)	

บรรณานุกรม.....	105
-----------------	-----

บทที่ 1 ความรู้ทั่วไป

1.1 ประเภทของยาเสพติดให้โทษ⁽¹⁾

ยาเสพติดให้โทษในความหมายตามพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ พ.ศ.2522 หมายถึง สารเคมีหรือวัตถุนิตใด ๆ ซึ่งเมื่อเสพเข้าสู่ร่างกายไม่ว่าจะโดยรับประทาน ดม สูบ ฉีด หรือด้วยประการใด ๆ แล้วทำให้เกิดผลต่อร่างกายและจิตใจในลักษณะสำคัญ เช่น ต้องเพิ่มขนาดการเสพเรื่อยๆ มีอาการถอนยาเมื่อขาดยา มีความต้องการเสพทั้งร่างกายและจิตใจอย่างรุนแรงอยู่ตลอดเวลา และสุขภาพโดยทั่วไปจะทรุดโทรมลงให้รวมตลอดถึงพืชหรือส่วนของพืชที่เป็นหรือให้ผลผลิตเป็นยาเสพติดให้โทษหรืออาจใช้ผลิตเป็นยาเสพติดให้โทษและสารเคมีที่ใช้ในการผลิตยาเสพติดให้โทษดังกล่าว ทั้งนี้ตามที่รัฐมนตรีประกาศในราชกิจจานุเบกษา แต่ไม่หมายความถึงยาสามัญประจำบ้าน บางตำรับตามกฎหมายว่าด้วยยาที่มียาเสพติดให้โทษผสมอยู่ซึ่งสามารถแบ่งได้ดังนี้ตามพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ พ.ศ.2522 แบ่งออกเป็น 5 ประเภท คือ

- 1 ยาเสพติดให้โทษ ประเภทที่ 1 ได้แก่ เฮโรอีน แอลเอสดี แอมเฟตามีน หรือยาบ้า ยาอี หรือยาเลิฟ
- 2 ยาเสพติดให้โทษ ประเภทที่ 2 ยาเสพติดประเภทนี้ สามารถนำมาใช้เพื่อประโยชน์ทางการแพทย์ได้ แต่ต้องใช้ภายใต้การควบคุมของแพทย์ และใช้เฉพาะกรณีจำเป็นเท่านั้น ได้แก่ ผีน มอร์ฟิน โคเคน หรือ โคคาอิน โคเคอิน และเมทาโดน
- 3 ยาเสพติดให้โทษ ประเภทที่ 3 ยาเสพติดประเภทนี้เป็นยาเสพติดให้โทษที่มียาเสพติดประเภทที่ 2 ผสมอยู่ด้วย มีประโยชน์ทางการแพทย์ การนำไปใช้เพื่อจุดประสงค์อื่นหรือเพื่อเสพติด จะมีบทลงโทษกำกับไว้ ยาเสพติดประเภทนี้ ได้แก่ ยาแก้ไอ ที่มีตัวยาคโคเคอิน ยาแก้ท้องเสียที่มีฝิ่นผสมอยู่ด้วย ยาฉีดระงับปวดต่าง ๆ เช่น มอร์ฟิน เพทิดีน ซึ่งสกัดมาจากฝิ่น
- 4 ยาเสพติดให้โทษ ประเภทที่ 4 คือ สารเคมีที่ใช้ในการผลิตยาเสพติดให้โทษประเภทที่ 1 หรือประเภทที่ 2 ยาเสพติดประเภทนี้ ไม่มีการนำมาใช้ประโยชน์ในการบำบัดโรคแต่อย่างใด และมีบทลงโทษกำกับไว้ด้วย ได้แก่ น้ำยาอะเซติคแอนไฮไดรด์ และ อะเซติลคลอไรด์ ซึ่งใช้ในการเปลี่ยน มอร์ฟิน เป็นเฮโรอีน สารคลอซูโดอีเฟดรีน สามารถใช้ในการผลิตยาบ้าได้ และวัตถุออกฤทธิ์ต่อจิตประสาทอีก 12 ชนิด ที่สามารถนำมาผลิต ยาอีและยาบ้าได้
- 5 ยาเสพติดให้โทษ ประเภทที่ 5 เป็นยาเสพติดให้โทษที่มีได้เข้าขายอยู่ในยาเสพติดประเภทที่ 1 ถึง 4 ได้แก่ ทุกส่วนของพืช กัญชา ทุกส่วนของพืช กระต่อม เห็ดขี้ควาย เป็นต้น



นอกจากนี้ยาเสพติดสามารถจำแนกประเภทตามเกณฑ์อื่นๆได้ดังนี้

- จำแนกตามการออกฤทธิ์ต่อระบบประสาท แบ่งเป็น 4 ประเภท⁽²⁾
 1. ประเภทกดประสาท ได้แก่ ฝิ่น มอร์ฟีน เฮโรอีน ยานอนหลับ ยาระงับประสาท ยากล่อมประสาท เครื่องดื่มมึนเมา ทุกชนิด รวมทั้งสารระเหย เช่น ทินเนอร์ เล็กเกอร์ น้ำมันเบนซิน กาว เป็นต้น มักพบว่าผู้เสพยาเสพติดมีร่างกายซูบซีด ผอม เหลือง อ่อนเพลีย ฟุ้งซ่าน อารมณ์เปลี่ยนแปลงง่าย
 2. ประเภทกระตุ้นประสาท ได้แก่ ยาบ้า ยาอี กระเทียม โคเคน มักพบว่าผู้เสพยาเสพติดจะมีอาการหงุดหงิด กระวนกระวาย จิตสับสนหวาดระแวง บางครั้งมีอาการคลุ้มคลั่ง หรือทำในสิ่งที่คนปกติไม่กล้าทำ เช่น ทำร้ายตนเอง หรือฆ่าผู้อื่น เป็นต้น
 3. ประเภทหลอนประสาท ได้แก่ แอลเอสดี และ เห็ดขี้ควาย เป็นต้น ผู้เสพยาเสพติดมีอาการประสาทหลอน ฝันเพื่องเห็นแสงสีวิจิตรพิสดาร หูแว่ว ได้ยินเสียงประหลาด หรือเห็นภาพหลอนที่น่าเกลียดน่ากลัว ควบคุมตนเองไม่ได้ ในที่สุดมักป่วยเป็นโรคจิต
 4. ประเภทออกฤทธิ์ผสมผสาน คือทั้งกระตุ้นกดและหลอนประสาทร่วมกัน ผู้เสพยาเสพติดมักมีอาการหวาดระแวง ความคิดสับสนเห็นภาพลวงตา หูแว่ว ควบคุมตนเองไม่ได้ และป่วยเป็นโรคจิตได้
- จำแนกตามแหล่งที่มาโดยแบ่งตามแหล่งที่เกิด ซึ่งจะแบ่งออกเป็น 2 ประเภท⁽²⁾ คือ
 1. ยาเสพติดธรรมชาติ (natural drugs) คือ ยาเสพติดที่ผลิตมาจากพืช เช่น ฝิ่น มอร์ฟีน กระเทียม กัญชา เป็นต้น
 2. ยาเสพติดสังเคราะห์ (synthetic drugs) คือ ยาเสพติดที่ผลิตขึ้นด้วยกรรมวิธีทางเคมี เช่น เฮโรอีน แอมเฟตามีน ยาอี เอ็กซ์ตาซี เป็นต้น

1.2 การตรวจหาสารเสพติดในปัสสาวะ⁽³⁾

การตรวจหาสารเสพติดในร่างกายของผู้เสพ สามารถใช้ตัวอย่างชีววัตถุหลายชนิด เช่น ปัสสาวะ ชีรุ่ม เส้นผม เป็นต้น ปัสสาวะเป็นตัวอย่างชีววัตถุที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายและเป็นที่ยอมรับในกระบวนการยุติธรรมในระดับสากล

ข้อดีของการใช้ตัวอย่างปัสสาวะคือเป็นตัวอย่างที่สามารถเก็บได้ง่ายเมื่อเทียบกับสารชีววัตถุอื่นๆ และสามารถเก็บตัวอย่างในปริมาณมากได้ ทำให้มีตัวอย่างเพียงพอที่จะใช้ในการตรวจ และระยะเวลาที่สามารถตรวจพบสารเสพติดในปัสสาวะ ค่อนข้างนานหลายวันแต่อย่างไรก็ตาม การใช้ตัวอย่างปัสสาวะก็มีข้อเสียหลายประการ เช่น อาจมีการสับเปลี่ยน หรือปลอมปนตัวอย่าง และรูปแบบของการขับสารเสพติด หรือเมตาบอไลต์ของสารเสพติดทางปัสสาวะ ขึ้นกับค่าความเป็น กรด หรือด่างของปัสสาวะ

การตรวจสารเสพติดในปัสสาวะ 2 ขั้นตอน คือ

1. การตรวจสารเสพติดเบื้องต้น
2. การตรวจสารเสพติดยืนยันผล

1. การตรวจสารเสพติดเบื้องต้น มีวัตถุประสงค์ เพื่อคัดแยกตัวอย่างที่คาดว่าจะมีสารเสพติด ออกจากตัวอย่างที่ไม่มีสารเสพติด โดยทั่วไปมีวิธีการตรวจ 2 วิธี คือ

- 1.1 การใช้ชุดทดสอบสารเสพติดเบื้องต้นที่ใช้หลักการภูมิคุ้มกันวิทยา
- 1.2 การใช้เครื่องมือที่ใช้หลักการภูมิคุ้มกันวิทยาต่างๆ เช่น เครื่อง AxSYM เครื่อง cobas integra และเครื่อง evidence เป็นต้น

ตัวอย่างที่ให้ผลบวกในขั้นตอนนี้ถือว่า อาจมีสารเสพติดผสมอยู่ และหากต้องการตรวจยืนยันผล ให้ส่งตัวอย่างปัสสาวะที่เหลือไปยังห้องปฏิบัติการตรวจยืนยันผล ปัจจุบันการใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูปที่ใช้หลักการภูมิคุ้มกันวิทยา เป็นวิธีการตรวจสารเสพติดเบื้องต้นที่นิยมใช้ทั่วไป ซึ่งมีข้อดีคือ ขั้นตอนการตรวจไม่ยุ่งยาก อ่านผลได้รวดเร็ว ราคาไม่สูงเกินไป สามารถใช้ตรวจคัดแยกตัวอย่างจำนวนมาก ได้ในระยะเวลาอันสั้น และสามารถนำไปใช้ในสถานที่ต่างๆ นอกห้องปฏิบัติการ (on-site) ได้อย่างสะดวก โดยไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือพิเศษ หรือใช้บุคลากรที่มีความรู้ หรือมีทักษะสูง

2. การตรวจยืนยันผล มีจุดประสงค์เพื่อเป็นการนำตัวอย่างปัสสาวะที่ให้ผลบวกในขั้นตอนการตรวจเบื้องต้นมาตรวจยืนยันอีกครั้งในห้องปฏิบัติการ ว่ามีสารเสพติดหรือไม่ โดยการตรวจด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟี (chromatography) เช่น โครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (TLC) ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (HPLC) แก๊สโครมาโตกราฟี (GC) แก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี (GC-MS) ลิควิดโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี (LC-MS) เป็นต้น



วิธีการตรวจหาสารเสพติดด้วย TLC เป็นวิธีการที่มีความถูกต้อง สะดวก ค่าใช้จ่ายน้อย ห้องปฏิบัติการทั่วไปสามารถทำได้ ส่วนวิธี GC GC-MS HPLC และ LC-MS เป็นวิธีการที่มีความถูกต้องสูง และมีค่าใช้จ่ายสูงเนื่องจากเครื่องมือ มีราคาแพง และผู้ปฏิบัติงานต้องมีความรู้ความชำนาญสูงในการใช้เครื่องมือ และการแปลผล

โอกาสที่จะตรวจพบสารเสพติดในปัสสาวะมีความสัมพันธ์กับช่วงเวลาที่ยกตัวอย่างและช่วงเวลาที่ยกตัวอย่างในตารางที่ 1 ถ้าช่วงเวลาที่ยกตัวอย่างใกล้เคียงกับเวลาที่ยกตัวอย่างครั้งสุดท้ายเกินไป มีโอกาสสูงที่จะตรวจไม่พบสารเสพติดในปัสสาวะเนื่องจากสารเสพติดยังไม่ถูกขับออกจากร่างกาย นอกจากนั้นจะต้องทราบชนิดของสารเสพติดและสารเมตาบอไลต์ของสารเสพติดนั้นๆ ซึ่งเกิดขึ้นในกระบวนการเผาผลาญสารเสพติดของร่างกายทำให้สารเสพติดเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไป และถูกขับออกจากร่างกายทางปัสสาวะ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 ช่วงเวลาที่มีโอกาสตรวจพบสารเสพติดในปัสสาวะ แบ่งตามชนิดของสารเสพติด และลักษณะการเสพ ⁽⁴⁾

ชนิดสารเสพติด	ผู้เสพไม่ประจำ	ผู้เสพประจำ	ผู้เสพเรื้อรัง
แอมเฟตามีน	1-3 วัน	2-6 วัน	2-3 สัปดาห์
เมทแอมเฟตามีน	1-3 วัน	2-6 วัน	2-3 สัปดาห์
ยาอี	1-3 วัน	2-6 วัน	2-3 สัปดาห์
กัญชา	2-5 วัน	4-14 วัน	อาจนานถึง 2-3 เดือน
โคคาอีน	12-48 ชม.	1-4 วัน	อาจนานถึง 2-3 สัปดาห์
มอร์ฟีน	12-48 ชม.	2-6 วัน	อาจนานถึง 2-3 สัปดาห์
โคเดอีน	1-3 วัน	2-5 วัน	อาจนานถึง 2-3 สัปดาห์
เบนโซไดอาซิปีนส์	2-5 วัน	4-14 วัน	อาจนานถึง 1 เดือน



ตารางที่ 2 ชนิดสารเสพติด สารสำคัญ สารเมตาบอไลต์ และสารที่ตรวจพบได้ในปัสสาวะ ⁽³⁾

ชนิดสารเสพติด	สารสำคัญ	สารเมตาบอไลต์	สารที่ตรวจพบได้ในปัสสาวะ
ยาบ้า/ยาไอซ์	เมทแอมเฟตามีน	แอมเฟตามีน	เมทแอมเฟตามีน แอมเฟตามีน
ยาอี	3,4 เมทิลลีนไดออกซีเมท- แอมเฟตามีน(MDMA)	3,4 เมทิลลีนไดออกซี แอม-เฟตามีน (MDA)	MDMA MDA
ยาเลิฟ	3,4 เมทิลลีนไดออกซี แอม-เฟตามีน (MDA)	3,4 เมทิลลีนไดออกซี แอม-เฟตามีน (MDA)	MDA
กัญชา	สารกลุ่มแคนนาบินอยด์ เตตราไฮโดรแคนนาบินอล (THC)	11-นอร์-เดลต้า-9- เตตราไฮโดรแคนนา บินอล คาร์บอกซิลิก แอซิด (11-Nor- Δ^9 -THC- COOH)	11-นอร์-เดลต้า-9-เตตรา- ไฮโดรแคนนาบินอล คาร์บอกซิลิกแอซิด (11-Nor- Δ^9 -THC-COOH)
เฮโรอีน	เฮโรอีน	มอร์ฟีน 6-โมนอะเซทิล มอร์ฟีน (6MAM)	มอร์ฟีน 6-โมนอะเซทิลมอร์ฟีน (6MAM)
มอร์ฟีน	มอร์ฟีน	มอร์ฟีน-3-กลูคิวโรไนด์ (M3G)	มอร์ฟีน มอร์ฟีน-3-กลูคิวโรไนด์ (M3G)
โคเดอีน	โคเดอีน	มอร์ฟีน โคเดอีน โคเดอีน-6-กลูคิวโร ไนด์ (C6G)	มอร์ฟีน โคเดอีน โคเดอีน-6-กลูคิวโรไนด์ (C6G)
โคคาอีน	โคคาอีน	เบนโซอิลเอกโกนีน	เบนโซอิลเอกโกนีน
สารกลุ่มเบนโซ ไดอาซิปีนส์	สารกลุ่มเบนโซไดอาซิปีนส์	สารกลุ่มเบนโซไดอา ซิปีนส์	สารกลุ่มเบนโซไดอาซิปีนส์



1.3 เกณฑ์ตัดสินผลบวกว่าเป็นผู้มีสารเสพติดในร่างกาย⁽¹⁾

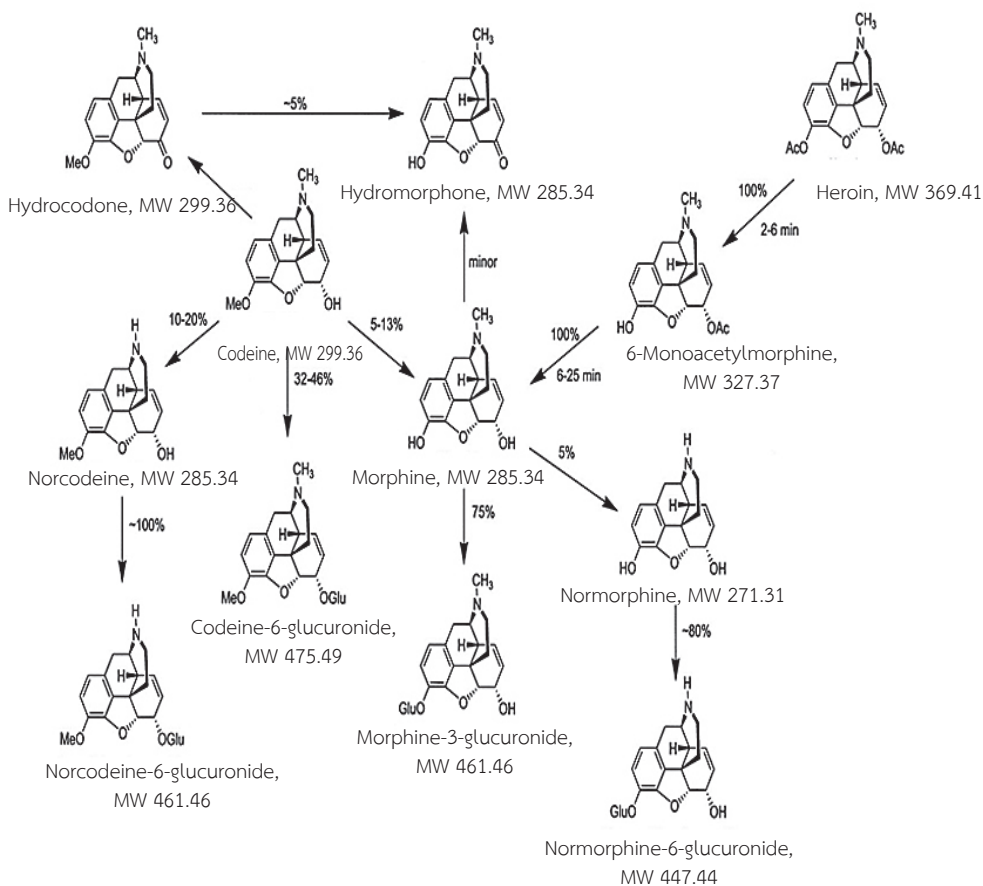
ค่าเกณฑ์ตัดสินผลบวก (cut-off) ซึ่งหมายถึงปริมาณต่ำสุดของสารเสพติดในปัสสาวะที่กฎหมายกำหนดและใช้เป็นเกณฑ์ตัดสินว่ามีสารเสพติดอยู่ในปัสสาวะหรือไม่ เกณฑ์ตัดสินว่ามีสารเสพติดอยู่ในปัสสาวะตามประกาศคณะกรรมการป้องกันและปราบปรามยาเสพติด เรื่องกำหนดหลักเกณฑ์ วิธีการ และเงื่อนไขการตรวจหรือทดสอบว่าบุคคล หรือกลุ่มบุคคลใดมีสารเสพติดอยู่ในร่างกายหรือไม่ พ.ศ. 2543 ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ชนิดสารเสพติด ประเภทยาเสพติดให้โทษ และเกณฑ์ตัดสิน

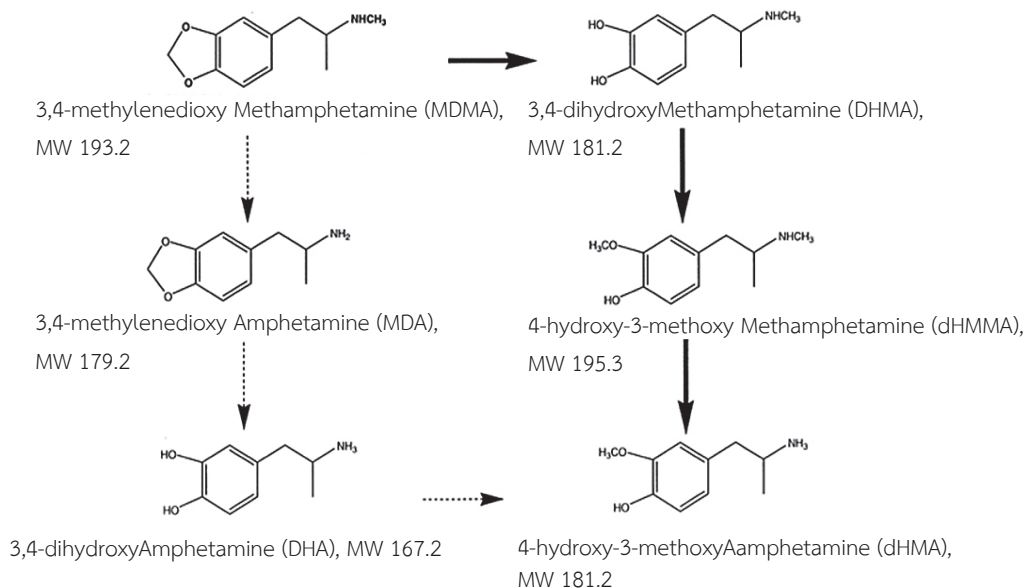
สารเสพติด/วัตถุออกฤทธิ์	ประเภทยาเสพติดให้โทษ	เกณฑ์ตัดสิน (นาโนกรัม/มิลลิลิตร)
กลุ่มแอมเฟตามีน (Amphetamines)	ยาเสพติดให้โทษประเภท 1	1000
กลุ่มยาอี(MDA, MDMA และ MDE)	ยาเสพติดให้โทษประเภท 1	1000
กลุ่มโคเคน (Cocaine)	ยาเสพติดให้โทษประเภท 2	300
กลุ่มโอปิเอตส์ (Opiates)	ยาเสพติดให้โทษประเภท 2	300
กลุ่มกัญชา (Cannabinoid)	ยาเสพติดให้โทษประเภท 5	50

1.4 เมตาบอไลต์ของสารเสพติด สูตรโครงสร้างและมวลโมเลกุล

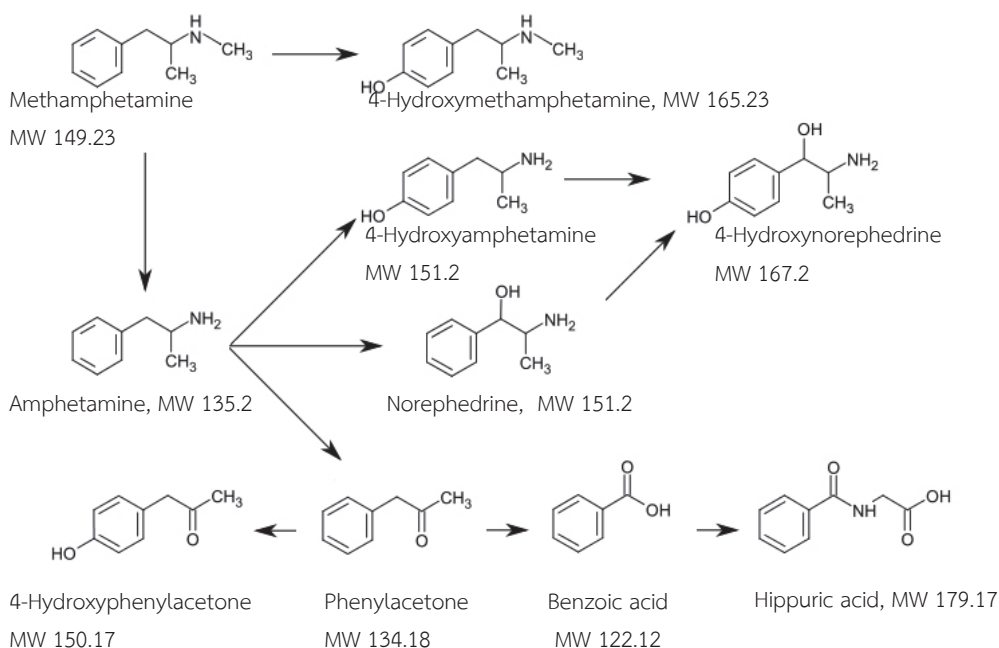
กระบวนการเมตาบอลิซึม คือกระบวนการเปลี่ยนแปลงสารทางเคมี ที่เกิดขึ้นในเซลล์สิ่งมีชีวิต สารที่เกิดขึ้นเรียกเมตาบอไลต์ เมตาบอไลต์ของสารแบ่งตามกลุ่มของสารเสพติด แสดงดังรูปที่ 1 ถึงรูปที่ 5



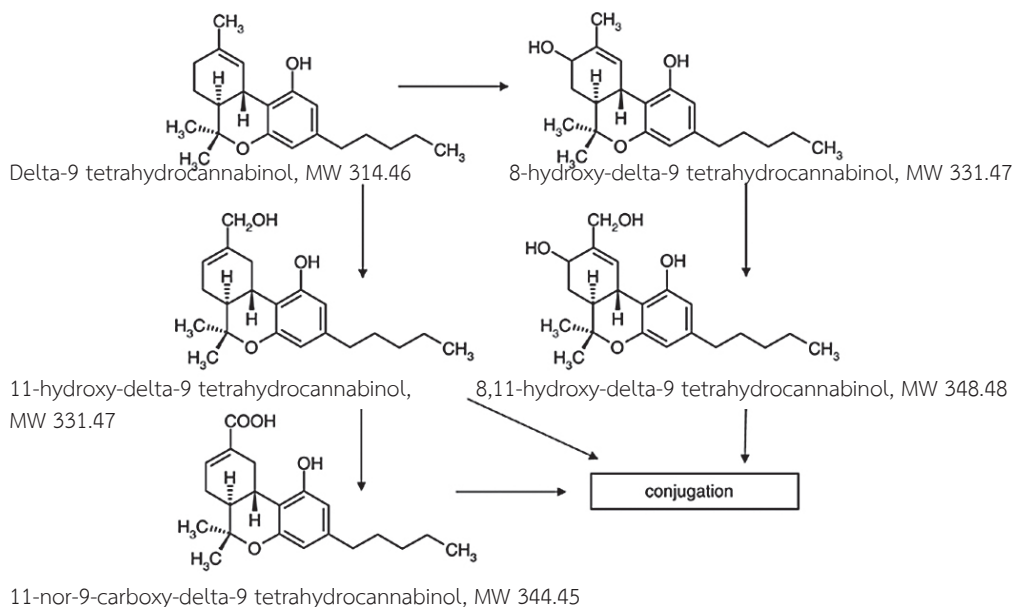
รูปที่ 1 เมตาบอไลต์ของกลุ่มฝิ่น⁽⁵⁾



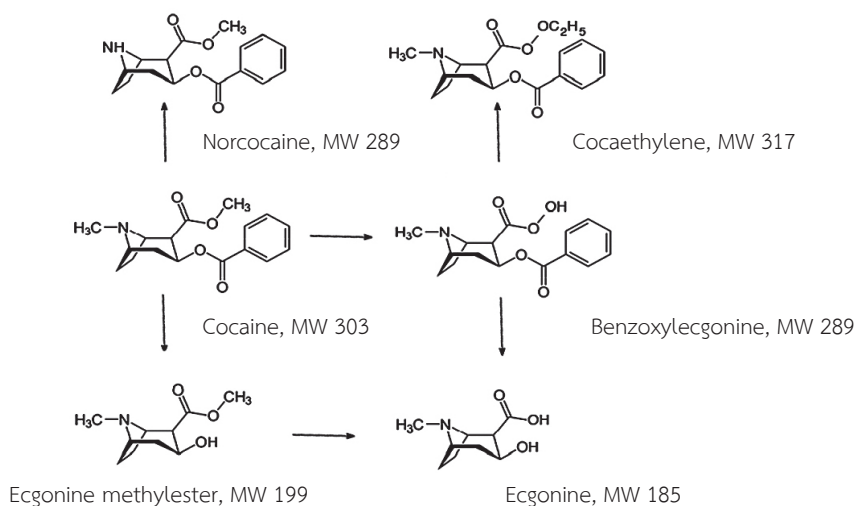
รูปที่ 2 เมตาบอไลต์ของ MDMA ⁽⁶⁾



รูปที่ 3 เมตาบอไลต์ของเมทแอมเฟตามีน ⁽⁷⁾



รูปที่ 4 เมตาบอไลต์ของ Delta-9 tetrahydrocannabinol ⁽⁸⁾



รูปที่ 5 เมตาบอไลต์ของกลุ่มโคเคน ⁽⁹⁾



1.5 หลักการทางโครมาโทกราฟี ⁽¹⁰⁾

โครมาโทกราฟีเป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้แยกสารผสม โดยอาศัยความแตกต่างในการกระจายตัวของสารแต่ละชนิดในวัฏภาคนิ่ง (stationary phase) หรือตัวดูดซับ (adsorbent) และวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) หรือตัวทำละลาย หรือตัวชะ (eluent) สารต่างชนิดกันมีความสามารถในการแยกที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความสามารถในการดูดซับ (adsorption) ที่แตกต่างกัน โดยพบว่าประสิทธิภาพของการแยกสารขึ้นอยู่กับชนิดของตัวดูดซับ และตัวชะ ตัวดูดซับแต่ละชนิดมีความสามารถในการดูดซับสารไว้บนพื้นผิวได้ต่างกัน ตัวดูดซับมีขั้วสามารถดูดซับสารมีขั้วได้ดีกว่าสารไม่มีขั้ว ดังนั้นสารไม่มีขั้วจึงถูกชะออกมาก่อนสารมีขั้ว ตัวดูดซับที่นิยมใช้คือ alumina ใช้แยกสารที่เป็นเบส silica gel ใช้แยกสารได้เกือบทุกชนิดโดยเฉพาะสารที่เป็นกรด เป็นกลาง หรือเป็นเบสอ่อน และยังมีตัวดูดซับอื่นๆ เช่น Calcium carbonate, Activated carbon, Florisil, Sucrose, Starch, และ Icing sugar

ตัวชะทำหน้าที่ละลายสารออกจากวัฏภาคนิ่ง ตัวชะมีความสามารถในการชะสารด้วยความเร็วที่ต่างกัน ตัวชะที่มีขั้วสูงจะพาสารเกือบทุกชนิดเคลื่อนที่ไปได้เร็ว ในขณะที่ตัวชะที่มีขั้วต่ำจะพาสารที่ถูกดูดซับน้อยออกมาก่อน ดังนั้นในการเลือกตัวชะที่เหมาะสมกับชนิดของตัวดูดซับและประเภทของสารที่ต้องการแยก จะทำให้ความสามารถในการแยกสารบริสุทธิ์มีประสิทธิภาพสูงสุด โดยพบว่าในการเพิ่มขั้วของตัวชะนั้น จะต้องค่อยๆเพิ่มหรือมีการเปลี่ยนแปลงขั้วอย่างระมัดระวังเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการแยกของวัฏภาคนิ่ง ในคอลัมน์เกิดขึ้น

1.5.1 โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin-layer chromatography; TLC)

เป็นเทคนิคแยกสาร แบบของแข็ง - ของเหลว โดยใช้ alumina หรือ silica gel เป็นวัฏภาคนิ่งเคลือบเป็นแผ่นบางๆ หนาประมาณ 0.25 - 1.00 mm บนกระจกหรือบนแผ่น Aluminum และใช้ตัวทำละลายเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ในโครมาโทกราฟี แบบแผ่นบางนี้ ของเหลวเคลื่อนตัวผ่านวัฏภาคนิ่งขึ้นในแนวตั้ง โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบางนี้มีประโยชน์อย่างมากในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพแบบง่ายและใช้สารในการวิเคราะห์ปริมาณน้อย แต่ก็มีข้อเสียคือใช้ในการแยกสารปริมาณ มากๆ ไม่ได้

การตรวจวัด แสงอัลตราไวโอเลต (UV) เหมาะสมต่อการสังเกตตำแหน่งสารโดยใช้ความยาวคลื่นสั้นที่ 254 nm และความยาวคลื่นยาวที่ 365 nm (อันตราย แสง UV เป็นอันตรายต่อดวงตาและผิวหนัง จึงควรใช้เวลาสัมผัสกับแสง UV ให้สั้นที่สุด) และพ่นด้วยน้ำยาเพื่อให้จุดสารมองเห็นได้

1.5.2 แก๊สโครมาโทกราฟี (Gas chromatography; GC)^(11,12)

เป็นเทคนิคการแยกสาร ที่มีขั้วต่ำ สารตัวอย่างต้องระเหยเป็นแก๊สหรือไอ ณ จุดฉีดสาร carrier gas เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่พาสารเข้าสู่คอลัมน์ซึ่งมีวัฏภาคนิ่งชนิดของเหลว หรือของแข็ง ทำหน้าที่แยกสารและถูกตรวจวัดในส่วนของตัวตรวจวัด แบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ

Gas liquid chromatography (GLC) ใช้หลักการ การแบ่งส่วน (partition) คือสารผสมที่ต้องการแยกอยู่ในสภาพที่เป็น แก๊ส หรือไอ เมื่อสารผสมผ่านเข้าสู่คอลัมน์ สารผสมจะแยกออกจากกันด้วยความแตกต่างในการกระจายตัวในวัฏภาคเคลื่อนที่ และวัฏภาคนิ่ง วัฏภาคนิ่งเป็นของเหลวที่เคลือบอยู่บนผิวของ inert solid support

Gas solid chromatography (GSC) ใช้หลักการ การดูดซับ โดยวัฏภาคนิ่งเป็นของแข็ง สามารถดูดซับสารโมเลกุลเล็กๆ ที่สามารถเปลี่ยนเป็นแก๊สหรือไอ โดยมี active solids (adsorptive particles) บรรจุอยู่ในคอลัมน์เป็น molecular sieves หรือ porous polymers, silica gel, alumina และ activated carbon

การตรวจวัด ชนิดของตัวตรวจวัดขึ้นกับชนิดของสารประกอบที่จะวิเคราะห์ บันทึกผลการตรวจวัดในรูปแบบความสัมพันธ์ของเวลาและการตอบสนองของเครื่องมือ การหาค่าพื้นที่ของพีคหรือความสูงของพีคสามารถบ่งบอกปริมาณของสารได้

ตารางที่ 4 คุณสมบัติของตัวตรวจวัดโดยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี⁽¹⁰⁾

ตัวตรวจวัด	ความจำเพาะ	ความไว
Flame ionization (FID)	สารประกอบอินทรีย์ที่สามารถถูกออกซิไดส์.	10^{-12}
Thermal conductivity (TCD)	สารประกอบอินทรีย์.	10^{-10}
Electron capture (ECD)	Halides, Nitrates, Nitriles, Peroxides, Anhydrides, Organometallics	10^{-14}
Nitrogen-phosphorus	Nitrogen, Phosphorus	10^{-8}
Flame photometric (FPD)	Sulphur, Phosphorus, Tin, Boron, Arsenic, Germanium, Selenium, Chromium	10^{-9}
Photo-ionization (PID)	Aliphatics, Aromatics, Ketones, Esters, Aldehydes, Amines, Heterocyclics, Organosulphurs, Some organometallics	10^{-11} - 10^{-12}
Hall electrolytic conductivity	Halide, Nitrogen, Nitrosamine, Sulphur	10^{-8}



1.5.3 ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี

(Hyperperformance liquid chromatography, HPLC)

เป็นเทคนิคแยกสารประกอบ ที่ผสมอยู่ในตัวอย่าง โดยกระบวนการแยกเกิดขึ้นระหว่าง 2 วัฏภาค คือ วัฏภาคนิ่ง หรือคอลัมน์ (column) กับวัฏภาคเคลื่อนที่ ซึ่งจะถูกแยกออกมาในเวลาที่แตกต่างกัน สารผสมที่อยู่ในตัวอย่าง สามารถถูกแยกออกจากกันได้นั้น จะขึ้นอยู่กับความสามารถในการเข้ากันได้ดีของสารนั้น กับวัฏภาคเคลื่อนที่ โดยสารประกอบที่สามารถเข้ากันได้ดีกับวัฏภาคเคลื่อนที่ จะถูกแยกออกมาก่อน ส่วนสารที่เข้ากันได้ไม่ดีกับวัฏภาคเคลื่อนที่หรือเข้ากันได้ดีกับวัฏภาคนิ่งก็จะถูกแยกออกมาทีหลัง

การตรวจวัด ชนิดของตัวตรวจวัดที่ใช้ขึ้นกับชนิดของสารประกอบที่จะวิเคราะห์ และตามที่เหมาะสมไว้ในเอกสาร

ตารางที่ 5 คุณสมบัติของตัวตรวจวัดโดยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี⁽¹³⁾

ชนิด	ความจำเพาะ	ความไว (ก/มล)	ผลต่ออุณหภูมิ	ผลต่ออัตราการไหล
UV-VIS	สำหรับสารที่มีหมู่ chromophore ⁵	5×10^{-10}	น้อย	ไม่มีผล
Fluorescence	สำหรับสารที่สามารถเปล่งแสงฟลูออเรสเซนต์	10^{-10}	น้อย	ไม่มีผล
Mass Spectrometry	วัดมวลโมเลกุลของสารต่อประจุ โดยเปลี่ยนสารตัวอย่างให้เป็นไอออน	10^{-10}	ไม่มีผล	ไม่มีผล
Refractive Index	วัดค่าความแตกต่างดัชนีหักเหของสารตัวอย่างและวัฏภาคเคลื่อนที่	5×10^{-7}	$\pm 10^{-4}^{\circ}\text{C}$	ไม่มีผล
Electro chemical	วัดปฏิกิริยาออกซิเดชัน รีดักชันทางเคมีไฟฟ้า ความไวสูงและเฉพาะ	10^{-8}	$\pm 1^{\circ}\text{C}$	มีผล

1.5.4 การเลือกเทคนิคโครมาโทกราฟีให้เหมาะกับงาน

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบคุณสมบัติและประสิทธิภาพของเทคนิค TLC HPLC และ GC ^(10,11)

หัวข้อ	TLC	HPLC	GC
ชนิดของวัสดุภาคนิ่ง	silica, alumina, polymer	silica, alumina, polymer	a film of a polymer or a wax
ชนิดของวัสดุภาคลื่นที่	ของเหลว	ของเหลว	แก๊ส
ความจำเพาะเจาะจง	ต่ำ	สูง	สูง
ความไว	ต่ำ	สูง	สูงกว่า HPLC
ประสิทธิภาพการแยก	ต่ำ	สูง	สูงกว่า HPLC
ประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ จำนวนตัวอย่างต่อ หน่วยเวลา จำนวนสารที่ตรวจ วิเคราะห์ต่อการ วิเคราะห์	น้อย น้อย	มาก มาก	มาก มากกว่า HPLC
คุณสมบัติของตัวอย่าง สถานะ ความเป็นขั้ว มวลโมเลกุล ความคงสภาพ	ของเหลว สารมีขั้ว แคบกว่า GC ได้ทุกชนิด	ของเหลว สารมีขั้วและไม่มีขั้ว กว้างกว่า GC ได้ทุกชนิด	ของแข็ง, ของเหลวที่ ระเหยได้ และแก๊ส สารมีขั้วและไม่มีขั้ว 2 - 800 ไม่สลายตัวที่ความร้อนสูง
การเตรียมตัวอย่างก่อน ตรวจวิเคราะห์	ไม่ยุ่งยาก	มีวิธีเตรียมหลากหลาย	ยุ่งยากกว่า HPLC
ความเข้มข้นในการ ตรวจวิเคราะห์	g/mL ถึง $\mu\text{g/mL}$	mg/mL ถึง pg/mL	ต่ำกว่า $\mu\text{g/mL}$
ประเภทของงานตรวจ วิเคราะห์	เชิงคุณภาพและกึ่ง ปริมาณ	เชิงคุณภาพและปริมาณ	เชิงคุณภาพและปริมาณ
Waste Solvent	น้อยกว่า HPLC	มาก	ไม่มี



ตารางที่ 6 เปรียบเทียบคุณสมบัติและประสิทธิภาพของเทคนิค TLC HPLC และ GC ^(10,11) (ต่อ)

หัวข้อ	TLC	HPLC	GC
ความอันตรายจากสารเคมี	มาก	น้อยกว่า TLC	น้อย
ความซับซ้อนของเครื่องมือ	ไม่ซับซ้อน เข้าใจง่าย	มีความซับซ้อนกว่า GC	มีความซับซ้อน
ราคาเครื่องมือและการบำรุงรักษา	สูง	สูง	สูง

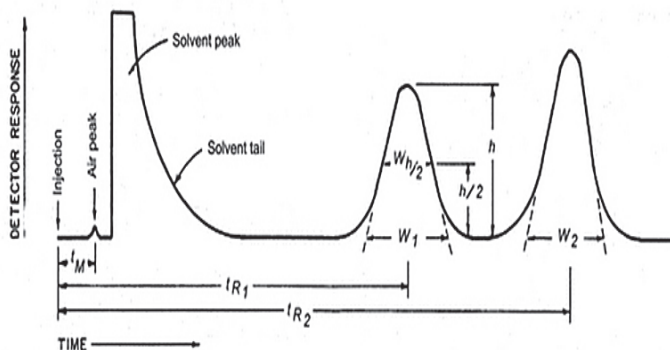
1.5.5 นิยามศัพท์

ตารางที่ 7 นิยามศัพท์ทางโครมาโทกราฟี ⁽¹⁴⁾

คำศัพท์	สัญลักษณ์	ความหมาย และสูตรคำนวณ
Number of theoretical plates หรือ Column efficiency	N	ความสามารถในการแยกสาร แสดงถึงประสิทธิภาพของคอลัมน์ ควรมีค่ามากกว่า 2,000 ต่อ คอลัมน์ $N = 16 (t_R/W)^2$ (รายละเอียดแสดงดังรูปที่ 6)
Capacity factor	k'	ค่าที่บอกความสามารถในการจับสารที่จะวิเคราะห์ไว้ในคอลัมน์
Hold-up time หรือ Dead time	t _M	เวลาที่วัฏภาคเคลื่อนที่ใช้ในการเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ หรือหมายถึง เวลาของ unretain solvent peak
Hold-up volume	V _m	ปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ของ unretain component
Dwell volume หรือ gradient delay volume	D	ปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่ภายในท่อ ระหว่างปั๊มถึงคอลัมน์
Retention factor	R _f	อัตราส่วนของระยะทางที่สารเคลื่อนที่ไป ต่อระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ไป
Retention time	t _R	เวลาที่สารใช้ในการเคลื่อนที่ตั้งแต่ ฉีดสาร (inject) ถึงจุดสูงสุดของพีค สำหรับการตรวจเอกลักษณ์ : สารที่สนใจในตัวอย่าง และ ในสารอ้างอิง ไม่มากกว่า 2 เปอร์เซ็น หรือ ±0.1 นาที ⁽¹⁵⁾

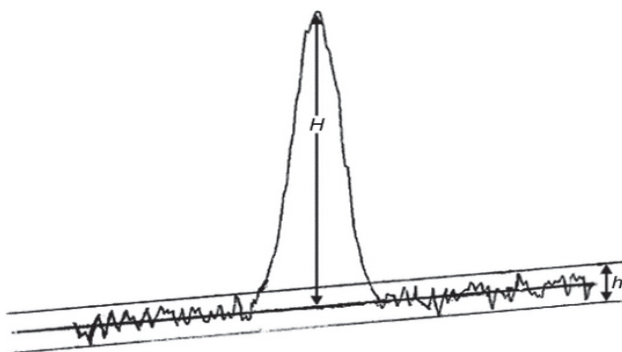
ตารางที่ 7 นิยามศัพท์ทางโครมาโทกราฟี ⁽¹⁴⁾ (ต่อ)

คำศัพท์	สัญลักษณ์	ความหมาย และสูตรคำนวณ
Retention volume	V_R	ปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ใช้สำหรับการชะสารออกจากวัฏภาคนิ่ง
Relative retention time	RRT	เวลาที่สารใช้ในการเคลื่อนที่ ตั้งแต่ฉีดสารถึงจุดสูงสุดของพีค สำหรับการตรวจเอกลักษณ์ : สารที่สนใจเทียบกับสารประกอบอ้างอิงวัสดุอ้างอิง ควรอยู่ในช่วง ± 0.1 เปอร์เซ็นต์
Resolution	R_s	เป็นค่าพารามิเตอร์ที่ใช้บอกความสามารถในการแยกพีคออกจากกัน ควรมีค่าเท่ากับหรือมากกว่า 1.5 $R_s = 2 \times (t_{R2} - t_{R1}) / (W_1 + W_2)$ (รายละเอียดแสดงดังรูปที่ 6)
Separation factor หรือ selectivity	a	ความสามารถของวัฏภาคนิ่งในการดูดซับหรือละลายตัวอย่างสองชนิด ปกติมีค่ามากกว่า 1
Signal-to-noise ratio	S/N	อัตราส่วนสัญญาณระหว่างสัญญาณที่ต้องการกับสัญญาณรบกวน $S/N = 2H/h$ (รายละเอียดแสดงดังรูปที่ 7)
System suitability		พิจารณาจาก - เปอร์เซ็นต์ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของ ความสูงของพีค หรือ พื้นที่ของพีค หรือ เวลาที่สารใช้เคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ - Resolution - Tailing factor - Number of theoretical plates
Symmetry factor	A_s	ค่าที่แสดงความสมมาตรฐานของพีค หรือ Tailing factor (T) $A_s = W_{0.05} / 2f$ (รายละเอียดแสดงดังรูปที่ 8)



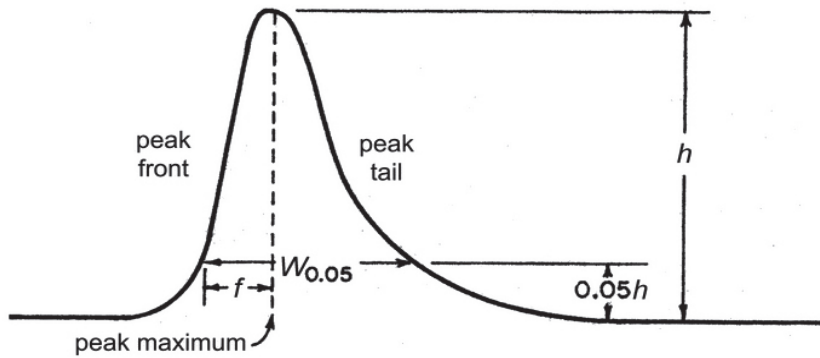
รูปที่ 6 โครมาโทแกรมของการแยกสาร 2 ชนิด

t_{R1} และ t_{R2}	คือ retention time ของพีคที่ 1 และ 2 ตามลำดับ
h	คือ ความสูงของพีค
$h/2$	คือ ความสูงครึ่งหนึ่งของความสูงทั้งหมด
$Wh/2$	คือ ความกว้างที่ความสูงครึ่งหนึ่งของความสูงทั้งหมด
W_1 และ W_2	คือ ความกว้างของพีคที่ 1 และ 2 ที่เส้นฐาน



รูปที่ 7 โครมาโทแกรมของ noise และ พีค

H คือความสูงของพีค



h คือความสูงของ noise

รูปที่ 8 Asymmetrical chromatography peak

- f คือความกว้างของพีคส่วนหน้าที่ความสูง $0.05h$
- $W_{0.05}$ คือความกว้างของพีคส่วนหลังที่ความสูง $0.05h$
- h คือความสูงของพีค
- $0.05h$ คือ 0.05 ของความสูงของพีค



1.6 การปรับสภาวะการทำงานทางเทคนิคโครมาโทกราฟี ⁽¹⁴⁾

1.6.1 การปรับสภาวะการทำงานทางเทคนิค HPLC ตามข้อกำหนดของ USP37-NF-32

ในการวิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC สามารถปรับระบบการทำงานจากวิธีมาตรฐาน โดยไม่ต้องทำการตรวจสอบความถูกต้อง (method validation) รายละเอียดดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 การปรับสภาวะการทำงานทางเทคนิค HPLC ตามข้อกำหนดของ USP 37-NF-32⁽¹⁴⁾

หัวข้อ	เกณฑ์กำหนด	
	Isocratic	Gradient
ขนาดอนุภาคของวัฏภาคนิ่ง	L / dp Ratio Constant or N: -25 to + 50%	ไม่สามารถปรับเปลี่ยนได้
ความยาวคอลัมน์		ไม่สามารถปรับเปลี่ยนได้
อัตราการไหล	$F_2 - F_1 \times [(dc_2 \times dp_1) / (dc_1 \times dp_2)]$ และ $\pm 50\%$	ไม่สามารถปรับเปลี่ยนได้
ชนิดของคอลัมน์ column ID	สามารถปรับเปลี่ยนได้แต่ต้องให้ค่าที่เป็นเส้นตรงที่คงที่	ไม่สามารถปรับเปลี่ยนได้
ปริมาณการฉีด	สามารถปรับเปลี่ยนได้แต่ต้องให้ค่าที่เป็นเส้นตรงและอยู่ในขอบเขตของ limit of detection	สามารถปรับเปลี่ยนได้แต่ต้องให้ค่าที่เป็นเส้นตรงและอยู่ในขอบเขตของ limit of detection
อุณหภูมิคอลัมน์	$\pm 10\%$	$\pm 10\%$
ค่า pH ของวัฏภาคเคลื่อนที่	± 0.2 หน่วย	± 0.2 หน่วย
ความเข้มข้นของเกลือใน Buffer	สามารถปรับได้ $\pm 10\%$ ของค่าที่กำหนด	สามารถปรับได้ $\pm 10\%$ ของค่าที่กำหนด
อัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่	A : B โดยที่ A > B ปรับได้สูงสุด 30% relative แต่ไม่เกิน 10% absolute	ไม่สามารถปรับเปลี่ยนได้
ความยาวคลื่น UV-Visible Detector	ไม่สามารถปรับเปลี่ยนได้ (ผลจากการตรวจสอบเครื่องยอมให้ต่างได้ ± 3 nm)	ไม่สามารถปรับเปลี่ยนได้ (ผลจากการตรวจสอบเครื่องยอมให้ต่างได้ ± 3 nm)

หมายเหตุ F_1 คือ อัตราการไหลที่ระบุ (mL/min)
 dp_1 คือ ความยาวคอลัมน์ที่ระบุ
 dc_1 คือ เส้นผ่านศูนย์กลางคอลัมน์ที่ระบุ

F_2 คือ อัตราการไหลที่เปลี่ยน (mL/min)
 dp_2 คือ ความยาวคอลัมน์ที่จะใช้
 dc_2 คือ เส้นผ่านศูนย์กลางคอลัมน์ที่จะใช้



1.6.2 การปรับสภาวะการทำงานทางเทคนิค GC ตามข้อกำหนดของ USP 37-NF-32⁽¹⁴⁾

ในการวิเคราะห์โดยเทคนิค GC สามารถปรับระบบการทำงานจากวิธีมาตรฐาน โดยไม่ต้องทำการตรวจสอบความถูกต้อง (method validation) รายละเอียดดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 การปรับสภาวะการทำงานทางเทคนิค GC ตามข้อกำหนดของ USP 37-NF-32

หัวข้อ	เกณฑ์กำหนด
ความยาวคอลัมน์	ปรับได้ในช่วง ± 70 % ของค่าที่กำหนด
เส้นผ่านศูนย์กลางในคอลัมน์	ปรับได้ในช่วง ± 50 %. ของค่าที่กำหนด
ความหนาของฟิล์ม (capillary GC)	ปรับได้ในช่วง -50 % to 100 %. ของค่าที่กำหนด
ขนาดอนุภาคของวัฏภาคนิ่ง	เปลี่ยนจากขนาด ใหญ่ไปเล็ก หรือขนาดเล็กไปใหญ่ หากอยู่ในเกณฑ์ยอมรับของ system suitability
อัตราการไหล	ปรับได้ในช่วง ± 50 %.ของค่าที่กำหนด
ปริมาณการฉีด/การทิ้ง	สามารถปรับได้หากค่าฉีดซ้ำยังอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด
อุณหภูมิของ oven	ปรับได้ในช่วง ± 10 %.ของค่าที่กำหนด
โปรแกรมอุณหภูมิของ oven	สามารถปรับได้ ต่างจากจุดที่กำหนด ± 20 %



1.7 เกณฑ์การคัดเลือกวิธีมาตรฐานการตรวจพิสูจน์สารเสพติด

หนังสือเล่มนี้ได้รวบรวมวิธีตรวจพิสูจน์สารเสพติดปัสสาวะโดยพิจารณาจากหลักเกณฑ์ที่น่าเชื่อถือแบ่งเป็น 2 แบบ ดังนี้

1. วิธีที่ผ่านการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตามเกณฑ์มาตรฐานสากล

กระบวนการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation) ถูกนำมาใช้เพื่อให้เกิดความมั่นใจว่าวิธีวิเคราะห์มีความถูกต้อง แม่นยำ โดยทั่วไป guideline ในการใช้ทำ method validation ตามมาตรฐานสากลที่ได้รับการยอมรับจากทั่วโลก ได้แก่ “ guideline on bioanalytical method validation ” ของ european medicines agency (EMA) ⁽¹⁶⁾ และ “ guidance for industry: bioanalytical method validation ” ขององค์การอาหารและยา ประเทศสหรัฐอเมริกา (US FDA) ⁽¹⁷⁾

2. วิธีที่ผ่านการรับรองตามระบบสากล ISO / IEC 17025 : 2005



2.1 การตรวจเบื้องต้นสารเสพติดในปัสสาวะด้วยหลักการภูมิคุ้มกันวิทยาโดยใช้ Rapid Test Kit

1. ขอบข่าย (Scope)

เป็นวิธีมาตรฐานในการปฏิบัติงานตรวจหาสารเสพติดในปัสสาวะ ใช้เป็นมาตรฐานในการตรวจพิสูจน์เบื้องต้นเพื่อเป็นวิธีที่ใช้ตรวจเบื้องต้นเพื่อหาสารเสพติดชนิดต่างๆ ในปัสสาวะ เช่น Methamphetamine MDMA Morphine Opiates THC Cocaine Benzodiazepines หรือสารเสพติดอื่นๆ ด้วยหลักการภูมิคุ้มกันวิทยา

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

- 2.1 รวมกฎหมายยาเสพติด พร้อมด้วยกฎกระทรวง ระเบียบ ข้อบังคับที่เกี่ยวข้อง, สำนักงาน ป.ป.ส. กระทรวงยุติธรรม พ.ศ.2552 หมายเลขเอกสารเผยแพร่ 1-09-2552.
- 2.2 United Nation. Recommended Method for the Detection and Assay of Heroin Cannabinoids Cocaine Amphetamine and Ring substituted Amphetamine Derivatives in Biological Specimens, Manual for Use by Nation Laboratories, ST/NAR/27. New York : United Nation, 1995.

3. หลักการ (Principle)

ชุดทดสอบสารเสพติดในปัสสาวะที่มีจำหน่ายในท้องตลาดใช้หลักการ lateral flow test หรือ Immunochromatographic strip test ซึ่งอาศัยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารแอนติเจนและสารแอนติบอดีบนแผ่นทดสอบที่ทำด้วยไนโตรเซลลูโลส

4. เครื่องมือ และอุปกรณ์ (Apparatus)

- 4.1 ชุดทดสอบหลักการภูมิคุ้มกันวิทยา ชนิดบรรจุตลับ เช่น Methamphetamine MDMA Morphine Opiates THC Cocaine และ Benzodiazepines เป็นต้น
- 4.2 ถังมือยาง
- 4.3 ปากกาชนิดกันน้ำ



5. วิธีดำเนินการ (Procedure)

- 5.1 นำตัวอย่างปัสสาวะ ออกจากตู้เย็น วางให้ตัวอย่างมีอุณหภูมิใกล้เคียงอุณหภูมิห้อง
- 5.2 บันทึกรายละเอียดชุดทดสอบที่ใช้ เช่น ยี่ห้อ / ชื่อผลิตภัณฑ์ วันหมดอายุ รุ่นที่ผลิต เป็นต้น
- 5.3 เตรียมชุดทดสอบ โดยฉีกซองหรือใช้กรรไกรตัดออกจากซองบรรจุ เขียนรหัสตัวอย่างปัสสาวะไว้บนฉลากทดสอบ
- 5.4 หยดตัวอย่างปัสสาวะลงบนหลุมทดสอบ ให้ตรงกับเลขรหัสตัวอย่างปัสสาวะ โดยใช้ปริมาณปัสสาวะตามที่กำหนดในคู่มือของชุดทดสอบของแต่ละบริษัทผู้ผลิต
- 5.5 รอให้ปัสสาวะเคลื่อนที่ผ่าน membrane แล้วอ่านผลในเวลาที่กำหนดในคู่มือของชุดทดสอบของแต่ละบริษัทผู้ผลิต
- 5.6 การอ่านผล การอ่านผลบวก หรือผลลบ ของชุดทดสอบที่ใช้หลักการภูมิคุ้มกันวิทยา โดยดูแถบสีที่เกิดขึ้น ณ ตำแหน่งทดสอบ (T) และตำแหน่งควบคุม (C) ดังนี้

การอ่านผลบวก

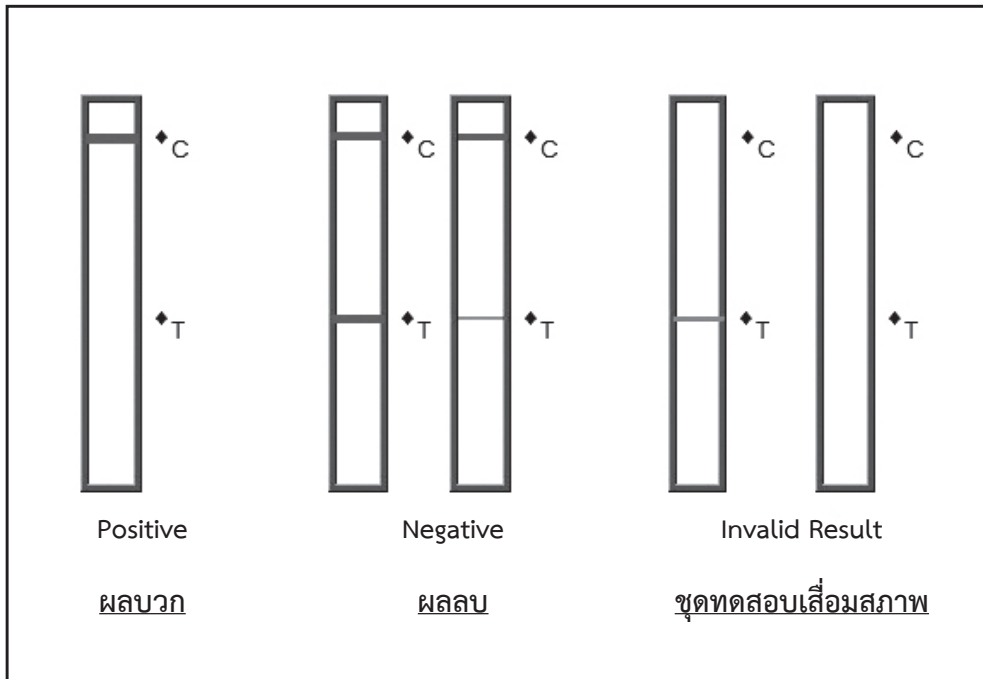
มีแถบสีม่วงแดงเกิดขึ้นเพียงเส้นเดียว ณ ตำแหน่งควบคุมคุณภาพ (C) และไม่มีแถบสีเกิดขึ้น ณ ตำแหน่งทดสอบ (T)

การอ่านผลลบ

มีแถบสีม่วงแดงเกิดขึ้น 2 เส้น ณ ตำแหน่งทดสอบ (T) และ ตำแหน่งควบคุมคุณภาพ (C)

แปลผลไม่ได้ มี 2 กรณี คือ

- ไม่มีแถบสีม่วงแดง ทั้งตำแหน่งทดสอบ (T) และตำแหน่งควบคุมคุณภาพ (C)
- เกิดแถบสีม่วงแดงเฉพาะตำแหน่งทดสอบ (T) แต่ไม่มีแถบสี ณ ตำแหน่งควบคุม (C) แสดงว่าชุดทดสอบนั้นเสื่อมคุณภาพ หรือผลิตไม่ได้มาตรฐาน



5.7 บันทึกผลลงในตารางแบบบันทึกผลการตรวจสารเสพติดในปัสสาวะ ดังนี้

P หมายถึง ผลบวก

N หมายถึง ผลลบ

PN หรือ NP หมายถึงผลบวก / ลบไม่ชัดเจน

5.8 การแปลผล

- กรณีให้ผลลบ รายงานผลตรวจไม่พบสารเสพติดนั้นๆ หรือทำการตรวจยืนยัน
- กรณีให้ผลบวกหรือให้ผลลบไม่ชัดเจน ต้องทำการตรวจยืนยันผลทุกตัวอย่าง

6. การควบคุมคุณภาพและผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

- ต้องศึกษาคู่มือของชุดทดสอบก่อนการใช้งานเสมอ และปฏิบัติตามคำแนะนำอย่างเคร่งครัด เช่น การใช้งาน ปริมาณปัสสาวะที่ใช้ เวลาการอ่านผล การเก็บรักษาชุดทดสอบ
- ไม่ใช่ชุดทดสอบที่หมดอายุ ไม่เปิดชุดทดสอบออกจากซองเป็นเวลานานก่อนการใช้
- ใช้หลอดดูด ดูดปัสสาวะ 1 อัน ต่อ ตัวอย่างปัสสาวะ 1 ตัวอย่าง เท่านั้น
- ชุดทดสอบต้องประเมินคุณภาพทุก 3 เดือน หรือก่อนการใช้งาน กับ QC sample ที่มีความเข้มข้น -50 % และ +50 % ของค่า cut off



2.2 การตรวจยืนยันเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC)

1. ขอบข่าย (Scope)

เป็นวิธีมาตรฐานในการปฏิบัติงานตรวจยืนยัน Methamphetamine ในปัสสาวะ ที่ระดับความเข้มข้น 500 ng/ml ขึ้นไปโดยใช้ตัวอย่างปัสสาวะ 3 ml

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

- 1.1 นภาพร ปัญจะ การตรวจยืนยันหายาในปัสสาวะ (Confirmatory Test of “ YA Ma ” in Urine). นนทบุรี, กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, ตุลาคม 2538.
- 1.2 ดวงพร อภิกันต์กัญต์ การตรวจหายาในปัสสาวะ กองวิเคราะห์วัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, พฤษภาคม 2540.
- 1.3 พรชัย ตรีเลิศวัฒนา เอกสารวิชาการ การตรวจพิสูจน์ยาเสพติดและวัตถุออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาท ในกลุ่ม PHENETHYLAMINES. สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, สิงหาคม 2548.
- 1.4 Anthony C Moffat, M David Osselton and Brian Widdop, Clarke’s Analysis of Drugs and Poisons. Third edition, Volume 1, Pharmaceuticals Press London, 2004.
- 1.5 United Nation. Recommended Methods for the Detection and Assay of Heroin, Cannabinoids, Cocaine, Amphetamine, Methamphetamine and Ring-Substituted Amphetamine Derivatives in Biological Specimens, Manual for Use by Nation Laboratories, ST/NAR/27. New York: United Nation, 1995.

3. หลักการ (Principle)

Methamphetamine จัดเป็นสารเสพติดให้โทษประเภท 1 ตามพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ พ.ศ. 2522 เป็นสารออกฤทธิ์สำคัญในยาบ้า ไอซ์ สาร Methamphetamine เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะผ่านกระบวนการเมตาบอลิซึม 70 % จะถูกขับออกทางปัสสาวะภายใน 24 ชั่วโมง ในรูป Methamphetamine 43 %, 4-hydroxy-methamphetamine 15 % และ Amphetamine 5 %

การตรวจแยกสารด้วยเทคนิค TLC ซึ่งอาศัยหลักการละลายและการดูดซับที่แตกต่างกันของสารแต่ละชนิด สารที่ละลายได้ดีในสารละลายตัวพา (mobile phase) จะถูกพาเคลื่อนที่ออกมา ก่อน และเคลื่อนที่ผ่านตัวดูดซับ (stationary phase) ได้เร็วกว่าสารที่เคลื่อนที่ผ่านตัวดูดซับได้ช้ากว่า ทำให้สารแยกสารผสมออกจากกันได้

4. เครื่องมือ และอุปกรณ์ (Apparatus)

4.1 เครื่องมือ (Instruments)

- 4.1.1 เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) ชนิดทศนิยมไม่น้อยกว่า 3 ตำแหน่ง
- 4.1.2 เครื่องผสมน้ำยาแบบหมุนวน (vortex mixer) หรือ เครื่องเขย่า (shaker)
- 4.1.3 เครื่องสูบลูญากาศ (vacuum pump) สำหรับฉีดพ่น (spray) สารเคมี
- 4.1.4 เครื่องปั่นหมุนเหวี่ยงความเร็วไม่น้อยกว่า 2,000 รอบต่อนาที
- 4.1.5 ตู้อบ (hot air oven)
- 4.1.6 หัวฉีด spray

5. สารเคมี (Reagent)

5.1 สารเคมี (Chemicals) ชนิด AR Grade

- 5.1.1 Acetone
- 5.1.2 conc. Ammonia
- 5.1.3 Dichloromethane
- 5.1.4 Ethanol
- 5.1.5 Ethyl acetate





5.1.6 Fast black K salt

5.1.7 n-Hexane

5.1.8 Isopropanol

5.1.9 Methanol

5.1.10 Ninhydrin

5.1.11 Sodium tetraborate decahydrate

5.1.12 3', 3'', 5', 5'' -Tetrabromophenolphthaleine ethyl ester (TBPE)

5.2 สารมาตรฐาน (Standard) ความเข้มข้นในรูป base ดังต่อไปนี้

มีใบรับรองผลการตรวจวิเคราะห์ (certificate of analysis : COA)

มีความบริสุทธิ์มากกว่า 98 % as is หรือเทียบเท่า

5.2.1 Amphetamine sulfate 10 mg/ml in ethanol

5.2.2 Ephedrine hydrochloride 5 mg/ml in methanol

5.2.3 Methamphetamine hydrochloride 3 mg/ml in methanol

5.2.4 Methamphetamine hydrochloride 1 mg/ml in methanol

5.2.5 Pseudoephedrine hydrochloride 5 mg/ml in methanol

แบ่งสารมาตรฐานบรรจุ vial ฝาเกลียว ขนาด 2 ml เพื่อความสะดวกในการใช้งานและเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 2-8 °C อายุการใช้งาน 1 ปี หากใช้หลังจาก 1 ปี ต้องมีการตรวจสอบคุณภาพก่อนนำมาใช้

หมายเหตุ Amphetamine sulfate ละลายน้ำกลั่น 1 ใน 4 ของปริมาตร แล้วปรับปริมาตรด้วย Ethanol



6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

6.1 การเตรียมวัสดุ/อุปกรณ์

6.1.1 นำตัวอย่างปัสสาวะออกจากตู้เย็น วางไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

6.1.2 เขียนรหัสตัวอย่างปัสสาวะบน test tube ขนาด 16 x 100 mm
และ microcentrifuge tube ขนาด 2 ml

6.2 การเตรียมสารละลาย

6.2.1 0.01 % TBPE in Dichloromethane: ชั่ง TBPE 0.1 g. ละลายใน
Dichloromethane 1,000 ml เก็บในขวดแก้วสีชา ที่อุณหภูมิห้อง
ใช้ได้นาน 6 เดือน (สามารถแบ่งมาใช้ในขวดแก้วใสได้ โดยให้สังเกตสีก่อน
ใช้งานคือจะต้องเป็นสีเหลือง)

6.2.2 1 % Fast black K salt in distilled water : ชั่ง Fast black K salt
0.5 g. ละลายในน้ำกลั่น 50 ml กรองก่อนใช้งานทุกครั้ง สามารถใช้ได้
ภายใน 1 สัปดาห์

หมายเหตุ ถ้าสารละลายเปลี่ยนจากสีน้ำตาลเข้มเป็นสีน้ำตาลอ่อน
แสดงว่าสารละลายเปลี่ยนสภาพ ไม่ควรใช้งาน

6.2.3 2 % Ninhydrin in Ethanol: ชั่ง Ninhydrine 1 g ละลายใน Ethanol
50 ml ควรเตรียมใหม่ ๆ ก่อนใช้

6.2.4 developing solvent : เตรียมก่อนแช่ TLC plate ประมาณ 60 นาที

6.3 การเตรียม QC sample

6.3.1 Negative control (NC)

A. Certified drugs free urine

B. ปัสสาวะของผู้ที่ไม่ได้รับประทานยาใดๆ ต่อเนื่องกันอย่างน้อย 5 วัน



6.3.2 Positive control (PC)

- 1) เตรียม stock standard solution : Methamphetamine 100 mg/ml
 - ดูดสารละลายมาตรฐาน Methamphetamine 1 mg/ml (base) 1 ml ใส่ volumetric flask ขนาด 10 ml ปรับปริมาตรด้วย Methanol จะได้สารละลาย Methamphetamine 100 mg/ml
- 2) เตรียม spiked urine : Methamphetamine 1 mg/ml (P1)
 - ดูดสารละลาย Methamphetamine 100 mg/ml 1 ml ใส่ volumetric flask ขนาด 100 ml ปรับปริมาตรด้วย negative urine
- 3) เตรียม spiked urine: Methamphetamine 0.5 mg/ml (P0.5)
 - ดูดสารละลาย Methamphetamine 100 µg/ml 0.5 ml ใส่ volumetric flask ขนาด 100 ml ปรับปริมาตรด้วย negative urine

6.4 การเตรียมตัวอย่าง : Extraction & concentration

- 6.4.1 ดูดตัวอย่างปัสสาวะ ตัวอย่างละ 2 หลอดๆ ละ 3 ml ใส่ใน test tube ขนาด 16 x 100 mm
- 6.4.2 ดูด positive control และ negative control หลอดละ 3 ml ใส่ใน test tube ให้มีจำนวนหลอดเท่ากับจำนวน plate ที่จะ spot ตัวอย่าง เช่น 2 system จำนวน 2 plate ต้องเตรียม /positive control 4 หลอด
- 6.4.3 วัดค่า pH บันทึกลง
- 6.4.4 เติม Sodium tetraborate decahydrate ประมาณ 100 mg และ 0.01% TBPE ใน Dichloromethane ประมาณ 1 ml ลงในหลอด เขย่าประมาณ 1 นาที วางไว้สักครู่เพื่อให้แยกชั้น บันทึกสี
- 6.4.5 ดูด organic solvent (ชั้นล่าง) ใส่ใน microcentrifuge tube
- 6.4.6 นำไปปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว ไม่ต่ำกว่า 2,000 รอบต่อนาที ประมาณ 10 นาที (ถ้าใช้ความเร็วมากขึ้น สามารถใช้เวลาน้อยลงได้)
- 6.4.7 ดูด organic solvent (ชั้นล่าง) ใส่ใน microcentrifuge tube อันใหม่ ระเหยแห้ง

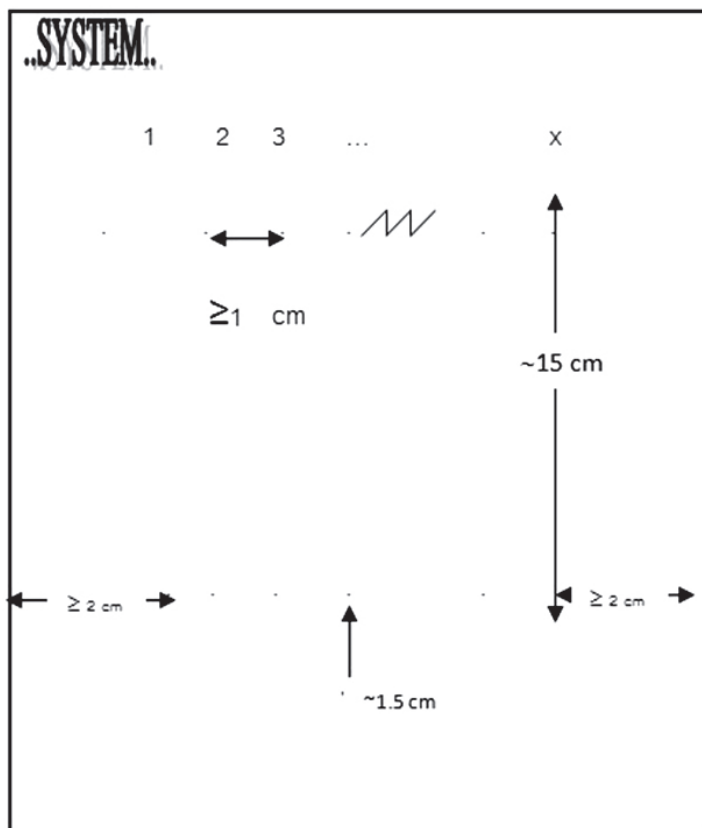
7. วิธีดำเนินการ (Procedure)

7.1 spot ตัวอย่างลงบน TLC plate

7.1.1 เตรียม TLC plate โดยใช้ spotting template ปิดครอบลงบน TLC plate ใช้ดินสอจุดเบาๆ ตำแหน่งที่จะ spot ตัวอย่าง/standard โดย

- ให้ห่างจากขอบด้านข้างอย่างน้อย 2 cm
- สูงจากขอบด้านล่างประมาณ 1.5 cm และ
- แต่ละ spot ห่างกันอย่างน้อย 1 cm

เขียนรหัสตัวอย่างปัสสาวะ ไว้ด้านบนตรงจุดที่จะ spot ประมาณ 15 cm เขียน solvent system ที่ต้องการใช้ไว้ที่ด้านบน ดังภาพ



ภาพแสดงตัวอย่างการเตรียม TLC plate



7.1.2 ละลาย residue จากข้อ 6.4.7 ด้วย Dichloromethane ประมาณ 100 μ l (ประมาณ 2 หยด) spot บน TLC plate จนหมด ละลายซ้ำอีกเล็กน้อย (ประมาณ 1 หยด) และ spot ซ้ำจนหมด

7.1.3 spot สารละลายมาตรฐาน ดังนี้

- Methamphetamine จำนวน 1 จุดๆ ละ 1 μ l ใน plate 1 แผ่นของแต่ละระบบ
- Amphetamine จำนวน 1 จุดๆ ละ 2 μ l Ephedrine และ Pseudoephedrine ชนิดละ 1 จุดๆ ละ 1 μ l ใน plate 1 แผ่นของแต่ละระบบ
- ในแผ่น plate ทุกแผ่นและทุกระบบ
- Spot P1 และ P 0.5 ในแผ่น plate ทุกแผ่นและทุกระบบ
- Spot negative control ใน plate แผ่นที่ 1 ของแต่ละระบบ
- เมื่อ spot เสร็จแล้วนำแผ่น plate ไปอบที่อุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำไปแช่ใน developing solvent

7.2 Development: การตรวจยืนยันผลด้วยวิธี TLC จะต้องเตรียมตัวอย่าง เพื่อแช่ใน developing solvent อย่างน้อย 2 system โดยเลือก system modified TE และ T2 เป็นหลัก

7.2.1 นำ TLC plate ที่ spot เสร็จแล้วไปแช่ใน developing solvent ที่ saturated ด้วย saturation pad (เตรียมก่อนแช่ ประมาณ 60 นาที)

		Organic solvent	อัตราส่วน แช่ 1 plate	อัตราส่วน แช่ 2 plate
System ที่ 1	Modified TE	Ethyl acetate	43	85
		Methanol	5	10
		conc. Ammonia	2	4
System ที่ 2	T2	Ethyl acetate	50	75
		Acetone	20	30
		conc. Ammonia	2	4
System ที่ 3	PT	n-Hexane	30	60
		iso-propanol	20	40
		conc. Ammonia	2.5	5

7.2.2 นำ TLC plate ออกจาก tank เมื่อ solvent เคลื่อนที่ได้ความสูงประมาณ 15 cm จากจุดเริ่ม spot ตั้งไว้ในตู้ดูดควันให้ solvent ระเหยออกหมด ใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง หรืออบในตู้อบ อุณหภูมิไม่เกิน 120 °C นาน 15 นาที

กรณี spray ด้วย Ninhydrin ต้องอบ plate ก่อนเสมอ เพื่อประสิทธิภาพในการติดสีที่ชัดเจนขึ้น

7.3 Detection :

- 7.3.1 นำ TLC plate วางในแนวตั้งในตู้ดูดควัน spray ด้วย
- 1% Fast black K salt in distilled water (ไม่ต้องอบซ้ำ)
 - 2% Ninhydrin in Ethanol อบซ้ำในตู้อบ อุณหภูมิ 120 °C นาน 15 นาที
- 7.3.2 ดูตำแหน่งการเคลื่อนที่และสีของตัวอย่างเทียบกับ positive control และสารมาตรฐาน ดังนี้

สาร	Color		R _f order		
	Fast black K Salt	Ninhydrin	Modi-fied TE	T2	PT
1. Amphetamine	ชมพู-ม่วง	ม่วง	4	3	4
2. Methamphetamine	ส้มแดง	ม่วง	3	2	3
3. Ephedrine	ส้มแดง	ม่วง	1	1 (เป็นแนวยาว; tail)	1
4. Pseudoephedrine	ส้มแดง	ม่วง	2	4	2

- ค่า R_f ของสารแต่ละชนิดใน TLC plate แต่ละแผ่นอาจมีค่าแตกต่างกันเล็กน้อย เนื่องจากการระเหยของสารละลายใน TLC tank ซึ่งมีปัจจัยมาจากอุณหภูมิของห้องปฏิบัติการ แต่ให้ถือลำดับการเคลื่อนที่ของสารแต่ละชนิดตามตารางข้างต้น
- Spot ของสารตัวอย่างในแต่ละ plate ควรมีค่า R_f คลาดเคลื่อนไม่เกินร้อยละ ± 10 เมื่อเทียบกับ positive control



7.4 การแปลผล (Evaluated)

7.4.1 ตัวอย่างที่ให้ผลบวก Methamphetamine หมายถึง กรณีใดๆ ดังต่อไปนี้

- 1 ตัวอย่างที่ให้ spot ที่มีสีและมีค่า R_f ตรงกับ positive control สารมาตรฐาน และ Methamphetamine ทั้ง 2 system
- 2 ขนาดของ spot และความเข้มของสี เทียบเท่าหรือใหญ่/เข้มกว่า P1

7.4.2 ตัวอย่างที่ให้ผลลบ Methamphetamine หมายถึง กรณีใดๆ ดังต่อไปนี้

- 1 ตัวอย่างที่ไม่ให้ spot ที่มีสีและ/หรือมีค่า R_f ไม่ตรงกับสารมาตรฐาน และ / หรือ positive control Methamphetamine ใน 1 หรือ ทั้ง 2 system
- 2 ขนาดของ spot และความเข้มของสี เล็กหรือจางกว่า P1

7.5 การบันทึกผลภาพ TLC

7.6 การเก็บภาพด้วยอุปกรณ์ถ่ายภาพ เช่น scanner

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and report)

8.1 การคำนวณค่า R_f

$$R_f = \frac{\text{ระยะจากจุดเริ่มต้นที่ spot ถึงจุดที่ spot ที่เคลื่อนที่ไป}}{\text{ระยะทางจากจุดเริ่มต้นที่ spot ถึงจุดที่ developing solvent เคลื่อนที่ไป}}$$

$$\% \text{ ความคลาดเคลื่อนของค่า } R_f = \frac{(R_f \text{ sample} - R_f \text{ standard}) \times 100}{R_f \text{ standard}}$$

8.2 การรายงานผล

8.2.1 ตัวอย่างที่รายงานตรวจพบ Methamphetamine ตามเงื่อนไขข้อ 7.4.1 ให้รายงานผล “ตรวจพบเมทแอมเฟตามีน”

8.2.2 ตัวอย่างที่รายงานตรวจไม่พบ Methamphetamine ตามเงื่อนไขข้อ 7.4.2 ให้รายงานผล “ตรวจไม่พบเมทแอมเฟตามีน”

9. การควบคุมคุณภาพและผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

- 9.1 ตัวอย่างที่ตรวจพิสูจน์ต้องทำ TLC ด้วย developing solvent อย่างน้อย 2 system
- 9.2 กรณีทำ TLC เพียง 1 system ต้องวิเคราะห์ด้วยเทคนิค chromatography อื่นๆ ร่วมด้วย
- 9.3 กรณีผล TLC ไม่ชัดเจน เช่น ปรากฏ spot ที่ใกล้เคียงหรือติดกับ Methamphetamine ต้องวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอื่นๆ ร่วมด้วย เช่น GC-MS
- 9.4 ต้องมีการตรวจสอบสารมาตรฐานที่ใช้เป็นระยะๆ สม่ำเสมอ

10. รายละเอียดอื่นๆ

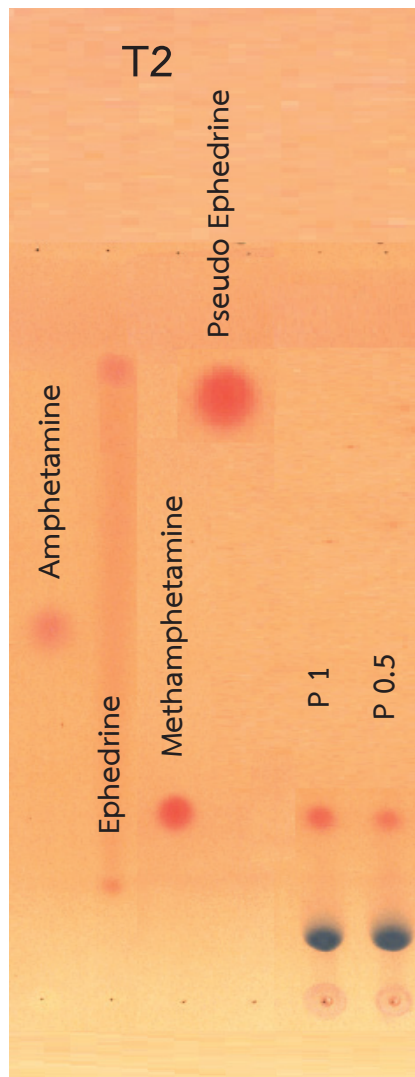
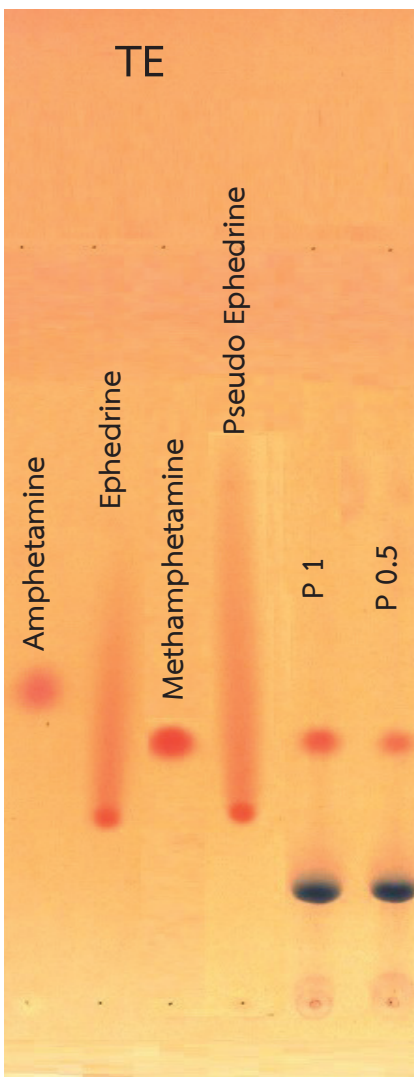
- 10.1 การตรวจยืนยันด้วยเทคนิค TLC และหรือเทคนิคอื่นๆ ตัวอย่างปัสสาวะควรทำการตรวจเบื้องต้น โดยใช้ชุดทดสอบหลักการภูมิคุ้มกันวิทยา (rapid test kit) หรือใช้เครื่องมือที่อาศัยหลักการภูมิคุ้มกันวิทยา โดยพิจารณา ดังนี้
 - กรณีให้ผลบวกหรือให้ผลบวก/ลบไม่ชัดเจน ต้องทำการตรวจยืนยันผลทุกตัวอย่าง
 - กรณีให้ผลลบ จะทำการตรวจยืนยันผลหรือไม่ก็ได้ ขึ้นอยู่กับดุลพินิจของหัวหน้าห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ เช่น กรณีร้องขอพิเศษ หรือ ต้องการทำให้ยืนยันผลลบ เป็นต้น
- 10.2 ความไวของวิธี (ค่า LOD) โดยใช้ปัสสาวะ 3 ml
 - 250 ng/ml (750 ng) เมื่อ spray ด้วย 1% Fast black K salt in DI H₂O
 - 500 ng/ml (1500 ng) เมื่อ spray ด้วย 2% Ninhydrin in Ethanol
- 10.3 สามารถใช้สารละลายมาตรฐาน มากกว่าที่ระบุใน SOP ได้ เช่น Fenfluramine MDMA MDA MDE Phenylpropanolamine Phentermine Ranitidine เป็นต้น กรณีตรวจพบ MDMA/MDA/MDE ใน system PT ต้องทำการตรวจยืนยันด้วยเทคนิคอื่นๆ เพิ่มเติม เช่น LC-MS หรือ GC-MS เป็นต้น
- 10.4 การวิเคราะห์ซ้ำด้วยวิธีเดิมกรณี spot ใหญ่ทำให้ค่า R_f คลาดเคลื่อน ให้เจือจางตัวอย่าง โดยใช้ตัวอย่างลดลง 1-3 เท่า ด้วย negative urine แล้วทำการสกัดตัวอย่างตามข้อ 6.4
- 10.5 การ saturated solvent ใน TLC tank ควรใช้คลิบนีบติด saturation pad กับแผ่นกระจกเพื่อป้องกันการโค้งงอ

- 10.6 การเตรียมสารละลายต่างๆ สามารถเตรียมตามปริมาณที่ต้องการได้ แต่ความเข้มข้นต้องเป็นไปตามที่กำหนด
- 10.7 โครมาโทแกรมการตรวจพิสูจน์หาเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC)

System : TE, T2

Spraying agent : 1% Fast Black K salt in water

Plate : Silica Gel GF 254



2.3 การตรวจปริมาณแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะ ด้วยเทคนิค Gas Chromatography – Massspectrometry (GC-MS)

1. ขอบข่าย (Scope)

เป็นวิธีมาตรฐานในการปฏิบัติงานตรวจพิสูจน์ยืนยันผลและหาปริมาณ Amphetamine และ Methamphetamine ในปัสสาวะด้วยเทคนิคการสกัดด้วยวัฏภาคของแข็งและแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี ที่ระดับความเข้มข้น 100 ng/ml ขึ้นไป

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

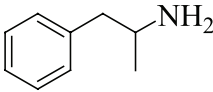
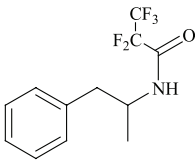
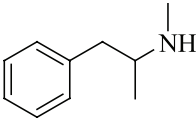
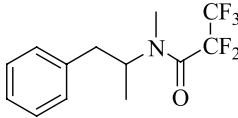
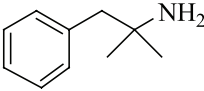
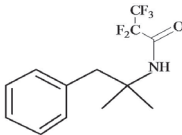
- 2.1 รวมกฎหมายยาเสพติด พร้อมด้วย กฎกระทรวง ระเบียบ ข้อบังคับ ที่เกี่ยวข้อง, สำนักงานป้องกันและปราบปรามยาเสพติด กระทรวงยุติธรรม พ.ศ. 2552, หมายเลขเอกสารเผยแพร่ 1-09-2552, 26-27.
- 2.2 ความผิดและโทษเกี่ยวกับกฎหมายยาเสพติด, กองนิติการ สำนักงานป้องกันและปราบปรามยาเสพติด สำนักงานกฤษฎีกา, หมายเลขเอกสารเผยแพร่ 02-07-2543; 12-16.
- 2.3 Recommended Method for the Detection and Assay of Heroin, Cannabinoids, Cocaine, Amphetamine, Methamphetamine and Ring - Substituted Amphetamine Derivative in Biological Specimens, UNITED NATIONS New York, 1995; 59-70.
- 2.4 Varian. Toxicology Manual Confirmation of Drugs of Abuse in Urine with Ion-Trap GC-MS, Varian, Inc, 2001; 5-18.

3. หลักการ (Principle)

Amphetamine และ Methamphetamine จัดอยู่ในกลุ่ม Phenethylamines ซึ่งมีสูตรโครงสร้างคล้ายกัน การตรวจแยกด้วย หลักการโครมาโทกราฟีแผ่นบาง ไม่สามารถแยกออกจากกันได้อย่างชัดเจน การตรวจด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี จะมีลักษณะการแยกสารด้วยหลักการแบบเดียวกัน แต่มีความจำเพาะเจาะจงและความไว (selectivity และ sensitivity) มากขึ้น ซึ่งจะทำให้สามารถตรวจวัดสารในปริมาณต่างๆ ได้ดี

การแยกสารดังกล่าวด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี - แมสสเปกโตรเมทรี อาศัยหลักการแยกสารผสมออกจากกัน โดยคุณสมบัติความสามารถในการกลายเป็นไอ การละลาย และการดูดซับที่แตกต่างกันของสารแต่ละชนิดในคอลัมน์ ในอุณหภูมิและเวลาที่ต่างกันด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี แล้วใช้ แมสสเปกโตรเมทรี เพื่อทำให้สารที่แยกได้แตกตัวเป็นไอออน (ion fragment) แล้วศึกษาแบบการแตกตัวของสารนั้นๆ เทียบกับสารมาตรฐานที่เตรียมขึ้นเอง หรือฐานข้อมูลใน software ของเครื่อง MS database เช่น Wiley07 หรือ NIST05 การหาปริมาณสารจะขึ้นกับความสูงของพีก (peak abundance) และพื้นที่ใต้พีก (peak area) เปรียบเทียบกับความสูงพีกหรือพื้นที่ใต้พีกของสารมาตรฐาน และเพื่อให้วิธีการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณของยาบ้าในปัสสาวะเป็นที่น่าเชื่อถือและมีความถูกต้องมากขึ้น การเตรียมตัวอย่างปัสสาวะก่อนการวิเคราะห์จึงมีความสำคัญ ในวิธีวิเคราะห์นี้ได้เลือกเทคนิคการสกัดด้วยวัฏภาคของแข็งมาใช้เป็นวิธีการเตรียมตัวอย่างซึ่งเป็นวิธีที่ยอมรับในระดับสากล

ตารางแสดงโครงสร้างและมวลโมเลกุลของสารที่วิเคราะห์

Compound	Structure Formula / MW	Compound -PFPA Formula / MW
1. Amphetamine	 $C_9H_{13}N$ / 135	 $C_{12}H_{12}F_3NO$ / 281
2. Methamphetamine	 $C_{10}H_{15}N$ / 149	 $C_{13}H_{14}F_3NO$ / 295
3. Phentermine	 $C_{10}H_{15}N$ / 149	 $C_{13}H_{14}F_3NO$ / 295



4. เครื่องมือ และอุปกรณ์ (Apparatus)

4.1 เครื่องมือ

- 4.1.1 เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์(GC-MS)
- 4.1.2 เครื่องเตรียมตัวอย่างอัตโนมัติ
- 4.1.3 เครื่องผสมสำหรับหลอดทดลอง (vortex mixer)
- 4.1.4 เครื่องระเหยแห้ง (evaporator with nitrogen)
- 4.1.5 เครื่อง heating block
- 4.1.6 solid phase extraction (SPE) ชนิด OASIS HLP cartridge
3 ml/60 mg

4.2 เครื่องแก้วและอุปกรณ์

- 4.2.1 micropipette และ micropipette tips ขนาด 50-200 μ l และ 1-5 ml
- 4.2.2 positive pipette และ pipette tips ขนาด 10, 50, 100, 250, 1000 μ l
- 4.2.3 ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 5,10 ml
- 4.2.4 กระดาษกรองชนิด nylon ขนาดรูพรุน 0.2 μ l
- 4.2.5 กระบอกตวงขนาด 1000 ml
- 4.2.6 บีกเกอร์ขนาด 1000 ml
- 4.5.7 micro centrifuge tube ขนาด 1.5 ml



5. สารเคมี (Reagent)

5.1 สารเคมีทั่วไป

- 5.1.1 Methanol (AR grade และ HPLC grade)
- 5.1.2 Phosphoric acid (AR grade)
- 5.1.3 Ethyl acetate (AR grade และ HPLC grade)
- 5.1.4 Ammonium hydroxide (AR grade)
- 5.1.5 Pentafluoropropionic acid anhydride (PFPA) (AR grade)
- 5.1.6 Purified water Type I (Milli-Q water)
- 5.1.7 Certified drugs free urine

5.2 สารมาตรฐาน

มีใบรับรองผลการตรวจวิเคราะห์ (certificate of analysis; COA)

มีความบริสุทธิ์มากกว่า 98% as is หรือเทียบเท่า

- 5.2.1 Amphetamine sulfate
- 5.2.2 Methamphetamine hydrochloride
- 5.2.3 Phentermine hydrochloride

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

6.1 การเตรียมสารเคมี

6.1.1 2 % Ammonium hydroxide

ตวง 40 ml 25% Ammonium hydroxide ด้วยกระบอกตวงขนาด 100 ml ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 500 ml ที่มีน้ำกรองอยู่ประมาณ 2 ใน 3 ของขวด เขย่าขวดเบาๆ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกรองเก็บไว้ในขวดแก้ว ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลาการเก็บรักษา 1 เดือน

6.1.2 4 % Phosphoric acid

ปิเปต 4.7 ml ของ 85% Phosphoric acid ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 ml ที่มีน้ำกรองอยู่ประมาณ 2 ใน 3 ของขวดเขย่าขวดเบาๆ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกรอง เก็บไว้ในขวดแก้ว ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลาการเก็บรักษา 1 เดือน

6.1.3 5 % Methanol in 2 % Ammonium hydroxide

ปิเปต 5 ml Methanol ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 ml ปรับปริมาตรด้วย 2 % Ammonium hydroxide เก็บไว้ในขวดแก้วที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลาการเก็บรักษา 1 เดือน

6.1.4 20 % Methanol in 2 % Ammonium hydroxide

ตวง 20 ml Methanol ด้วย กระบอกตวง ขนาด 25 ml ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 ml ปรับปริมาตรด้วย 2 % Ammonium hydroxide เก็บไว้ในขวดแก้วที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลาการเก็บรักษา 1 เดือน

6.2 การเตรียมสารมาตรฐาน

6.2.1 สารละลายมาตรฐาน Methamphetamine

- Stock solution (MS1000) : ชั่งสารมาตรฐาน Methamphetamine hydrochloride ให้มีน้ำหนัก 10 mg ของเมทแอมเฟตามีน ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 ml ปรับปริมาตรด้วย Methanol (HPLC grade)
- Intermediate stock solution (MS100) : ปิเปต 1 ml ของ MS 1000 ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 ml ปรับปริมาตรด้วย Methanol (HPLC grade)



6.2.2 สารละลายมาตรฐาน Amphetamine

- Stock solution (AS1000) : ชั่งสารมาตรฐาน Amphetamine sulfate ให้มีน้ำหนัก 10 mg ของ Amphetamine ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 ml ปรับปริมาตรด้วย Methanol (HPLC grade)
- Intermediate stock solution (AS100) : ปิเปต 1 ml ของ AS 1000 ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 ml ปรับปริมาตรด้วย Methanol (HPLC grade)

6.2.3 สารละลายมาตรฐาน Phentermine

- Stock solution (IS1000) : ชั่งสารมาตรฐาน Phentermine hydrochloride ให้มีน้ำหนัก 10 mg ของ Phentermine ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 ml ปรับปริมาตรด้วย Methanol (HPLC grade)
- Intermediate stock solution (IS100) : ปิเปต 1 ml ของ IS1000 ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 ml ปรับปริมาตรด้วย Methanol (HPLC grade)

6.2.4 Working standard solution (for spiked urine) (WS)

เตรียม 7 WS ใน Methanol (HPLC grade) สำหรับ spiked urine calibration curve ดังตาราง:

WS	WS Conc. (ng/ml)	AS100 taken (ml)	MS100 taken (ml)	final volume (ml)
WS ₁	1,000	100	100	10
WS ₂	3,000	300	300	10
WS ₃	5,000	500	500	10
WS ₄	10,000	1,000	1,000	10
WS ₅	15,000	150 (AS 1000)	150 (MS 1000)	10
WS ₆	30,000	300 (AS 1000)	300 (MS 1000)	10
WS ₇	40,000	400 (AS 1000)	400 (MS 1000)	10

* System suitability solution : ปิเปต 100 ml ของ WS₄ และ 10 ml ของ IS100 ใส่ในหลอดทดลอง แล้วนำไประเหยแห้ง จากนั้น นำไปทำ derivatization

6.2.5 spiked urine calibration curve (CS)

CS*	PC conc. (ng/ml)	WS taken (ml)	from solution	drug free urine taken (ml)
CS ₁	100	100	WS ₁	900
CS ₂	300	100	WS ₂	900
CS ₃	500	100	WS ₃	900
CS ₄	1,000	100	WS ₄	900
CS ₅	1,500	100	WS ₅	900
CS ₆	3,000	100	WS ₆	900
CS ₇	4,000	100	WS ₇	900

* เตรียม Certified drugs free urine 1 ml, zero sample
(Certified drugs free urine 1 ml+ IS 10 ml) และ CS อย่างละ 1 ซ้ำ

6.2.6 Working standard solution for QC samples (WSQC)

เตรียม 3 WSQC ใน Methanol (HPLC grade) สำหรับ spiked urine
QC sample ดังตาราง:

WSQC	WSQC Conc. (ng/ml)	AS100 taken (ml)	MS100 taken (ml)	Final volume (ml)
WSQCL	2500	250	250	10
WSQCM	25,000	250 (AS1000)	250 (MS1000)	10
WSQCH	40,000	400 (AS1000)	400 (MS1000)	10



6.2.7 QC samples (QC)

QC*	QC conc. (ng/ml)	WSQC taken (ml)	from solution	drug free urine taken(ml)
QCL	250	100	WSQCL	900
QCM	2,500	100	WSQCM	900
QCH	4,000	100	WSQCH	900

* เตรียม QC sample ความเข้มข้นละ 2 ขั้ว

6.3 เตรียมวัสดุ/อุปกรณ์

- 6.3.1 นำตัวอย่างปัสสาวะออกจากตู้เย็นวางไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องก่อนทำการวิเคราะห์
- 6.3.2 เขียนเลขลำดับตัวอย่างปัสสาวะหรือเลขที่ตัวอย่างและ QC sample บนวัสดุ อุปกรณ์ที่ต้องใช้ เช่น test tube, SPE column, vial ขนาด 2 ml เป็นต้น
- 6.3.3 เปิดเครื่อง heating box ตั้งอุณหภูมิประมาณ 65°C โดยใส่เทอร์โมมิเตอร์ไว้ช่องสำหรับใส่เทอร์โมมิเตอร์

6.4 การเตรียมตัวอย่าง (sample preparation)

6.4.1 Pretreatment

- ปิเปตตัวอย่างปัสสาวะ 1 ml ใส่ใน test tube
- เติม Phentermine (internal standard) 100 µg/ml 10 µl
(ยกเว้น certified drugs free urine sample)
- เติม 1 ml 4% Phosphoric acid เขย่าบน vortex mixer ประมาณ 1 นาที

6.4.2 Extraction

- condition column
 - เติม 2 ml Methanol (AR grade)
 - เติม 2 ml น้ำ Milli-Q water
- load sample
 - เทตัวอย่าง ทั้งหมดจาก pretreatment ลงใน SPE
- wash column
 - เติม 2 ml 5 % Methanol in 2 % Ammonium hydroxide
 - เติม 2 ml 20 % Methanol in 2 % Ammonium hydroxide
 - dry column ให้แห้ง โดยการเพิ่ม pressure ของ vacuum pump ให้อยู่ในช่วง 10 - 15 Hg เป็นเวลา 5 นาที
- elute Sample
 - เติม 3.0 ml Methanol (HPLC grade)
 - นำตัวอย่างที่ elute ไประเหยให้แห้งด้วย N_2 (Temp 50 °C)

6.4.3 Derivatization

เติม Ethyl acetate (HPLC grade) 150 μ l และ PFPA 50 μ l ปิดจุก test tube แล้วพันทับด้วย paraffin เพื่อป้องกันการระเหยตัวของสารจากความร้อน นำไป heat บน heating block ที่ 65 °C เป็นเวลา 25 นาที แล้วนำออกจาก heating block ตั้งไว้ให้เย็นระเหยแห้ง จากนั้นเติม Ethyl acetate (HPLC grade) 100 μ l vortex และถ่ายใส่ Vial ขนาด 2 ml ที่มี insert ขนาด 200 μ l



7. วิธีดำเนินการ (Procedure)

7.1 นำสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS ตามสถานะดังนี้

Column : HP-5ms 30Mx0.25mm ID DF = 0.25 หรือเทียบเท่า
Flow rate : 1.0 ml/minute He; Injection: 1 µl, split mode 1:10
MS mode : EI scan 50-300 amu.
Library : NIST, Wiley, MPW2007
Oven Temperature : เริ่มต้นไม่สูงกว่า 90 °C จนถึงไม่ต่ำกว่า 280 °C
Run time : 12 นาที

ดูค่า RT และ mass fragment ของสารมาตรฐานแต่ละชนิด ดังนี้

ตารางแสดงค่า retention Time (RT) และ mass spectrum ของสารมาตรฐาน 3 ชนิด

Compound	RT (min)	Mass spectrum (m/z)		
		PFPA-derivatives		
		Q	Q1	Q2
Amphetamine	4.55	190	118	91
Phentermine (IS)	4.67	204	132	91
Methamphetamine	5.71	204	160	118

Q = quantitation ion

Q1 และ Q2 = qualifier ion-1 และ 2

7.2 ลำดับการฉีดตัวอย่าง

7.2.1 ตัวทำละลาย 3 เข้ม เพื่อตรวจสอบ baseline และ noise

7.2.2 สารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นเท่ากับ CS4 จำนวน 5 เข้มสำหรับ system suitability test

- 7.2.3 Calibration solutions ประกอบด้วย Certified drugs free urine sample, zero sample และ CS1-7
- 7.2.4 ตัวอย่างและ QC samples (QCL1-2, QCM1-2, QCH1-2) แทรกสลับกันไป อย่างสม่ำเสมอจนครบชุดการตรวจวิเคราะห์
- 7.2.5 จำนวนตัวอย่างในแต่ละชุดการตรวจวิเคราะห์ไม่ควรเกิน 70 ตัวอย่าง (กำหนดตาม autosampler stability ที่ 18 ชั่วโมง)
- 7.2.6 กรณีมีตัวอย่างเกิน 70 ตัวอย่างจะต้องเตรียม calibration solution และ QC sample พร้อมฉีดตัวอย่างเป็นชุดการฉีดใหม่

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and Report)

- 8.1 Back-calculated value, %RD

$$\%RD = \frac{(\text{ความเข้มข้นที่คำนวณได้จาก Curve} - \text{ความเข้มข้นจริง}) \times 100}{\text{ความเข้มข้นจริง}}$$

- 8.2 %CV; $\%CV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100$

- 8.3 คำนวณค่าความเข้มข้นของ Amphetamine และ Methamphetamine ด้วยค่า response เทียบกับ calibration curve

- 8.4 การรายงานผล

- 8.4.1 ตัวอย่างที่รายงาน “ ตรวจพบเมทแอมเฟตามีน ” ในกรณีดังต่อไปนี้

- 8.4.1.1 มี RT และ มี mass spectrum ตรงกับ CS4 และสารมาตรฐาน Methamphetamine

- 8.4.1.2 มีพื้นที่ใต้พีค (peak area) ของ Methamphetamine ต้องเท่ากับ หรือมากกว่า CS4 ที่ความเข้มข้น 1000 ng/ml

- 8.4.1.3 คำนวณผลจาก calibration curve ในหน่วย ng/ml มีค่าเท่ากับ หรือมากกว่า 1000 ng/ml



8.4.2 ตัวอย่างที่รายงาน “ ตรวจไม่พบเมทแอมเฟตามีน ” ในกรณีดังต่อไปนี้

8.4.2.1 ตัวอย่างที่มีผลการวิเคราะห์ไม่เป็นไปตามข้อ 8.4.1.1

8.4.2.2 ตัวอย่างที่มีผลการวิเคราะห์เป็นไปตามข้อ 8.4.1.1 แต่ไม่เป็นไปตามข้อ 8.4.1.2 และ 8.4.1.3

8.4.3 กรณีตรวจพบ Amphetamine ไม่ต้องรายงานผลในใบสรุปผลการวิเคราะห์ แต่คำนวณผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ Amphetamine จาก calibration curve ในหน่วย ng/ml

9. การควบคุมคุณภาพและผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

9.1 กรณีของ system suitability test พิจารณาค่า retention time และ ค่า %CV ของ response ไม่เกิน 10.0 %

9.2 75 % ของระดับความเข้มข้นทั้งหมด (หรืออย่างน้อย 6 ระดับความเข้มข้น) บน calibration curve ต้องมีค่า back - calculated value ไม่เกิน 15 % ยกเว้นที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด ให้ไม่เกิน 20% สำหรับระดับความเข้มข้นที่ไม่ผ่านนั้นต้องไม่ใช่ระดับความเข้มข้นสูงสุดหรือต่ำสุดของ calibration curve จึงจะสามารถตัดทิ้ง และไม่นำไปใช้ในการคำนวณค่า correlation coefficient (r) และสมการเชิงเส้นได้

9.3 ค่า correlation coefficient (r) ของ calibration curve ไม่น้อยกว่า 0.95

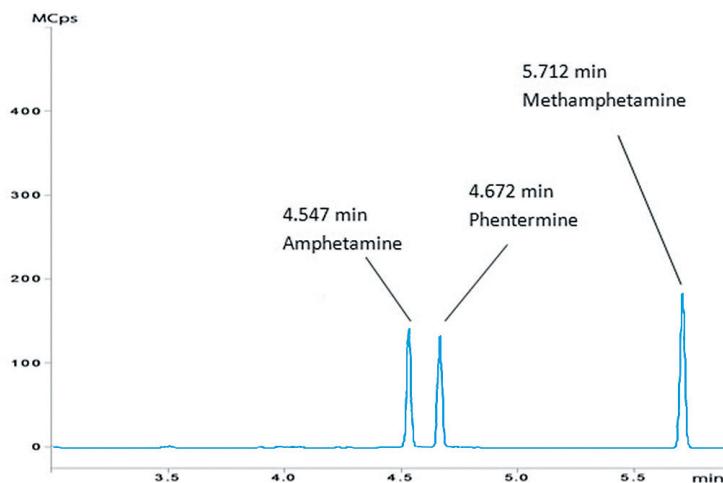
9.4 ค่า %RD ของ 4 ใน 6 (67 %) QC samples ทั้งหมด ควรมีค่าไม่เกิน 15 % และ 2 ใน 6 (33 %) QC samples ที่ไม่ผ่านต้องไม่ใช่ QC sample ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน

9.5 กรณีที่การวิเคราะห์ชุดนั้นๆไม่ผ่านเกณฑ์การควบคุมคุณภาพ นักวิเคราะห์จะต้องทำการวิเคราะห์ซ้ำทั้งชุด

9.6 กรณีตัวอย่างมีความเข้มข้นของ Amphetamine และ Methamphetamine เกิน 4,000 ng/ml นักวิเคราะห์จะต้องทำการวิเคราะห์ซ้ำ ด้วยการเจือจางตัวอย่างกับ Drug free urine ที่ระดับ 1 : 1 หรือ 1 : 9 หรือ 1 : 39 ตามเหมาะสม เพื่อให้ความเข้มข้นของสารอยู่ในช่วงของ calibration curve คือ 100 – 4,000 ng/ml

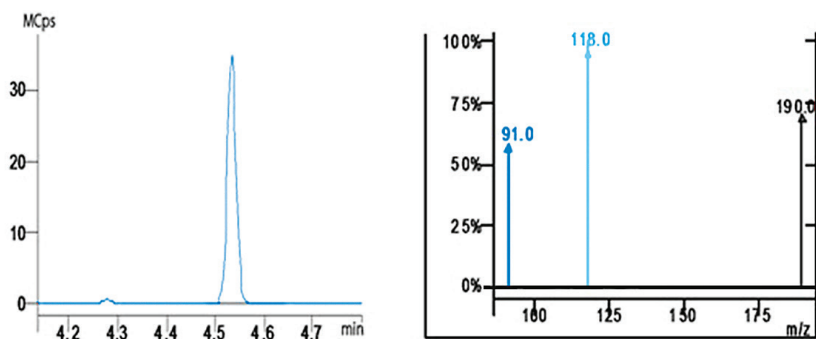
10. รายละเอียดอื่นๆ

- 10.1 วิธีนี้ใช้สำหรับตรวจหา Amphetamine และ Methamphetamine ในตัวอย่างปัสสาวะเท่านั้น หากนำไปประยุกต์สำหรับตรวจในตัวอย่างอื่นๆ ที่ไม่ใช่ปัสสาวะ จะต้องทำการทวนสอบ (verify) ก่อน
- 10.2 การตรวจยืนยันด้วยเทคนิค GC-MS ตัวอย่างปัสสาวะควรทำการตรวจเบื้องต้นโดยใช้หลักการภูมิคุ้มกันวิทยา โดยพิจารณา ดังนี้
 - กรณีให้ผลบวกหรือให้ผลบวกไม่ชัดเจน ต้องทำการตรวจยืนยันผลทุกตัวอย่าง
 - กรณีให้ผลลบ ไม่ทำการตรวจยืนยันผล ยกเว้น กรณีร้องขอพิเศษ หรือต้องการทำเพื่อยืนยันผลลบ เป็นต้น
- 10.3 ค่าความไวของวิธี : 100 ng/ml เมื่อใช้ปัสสาวะ 3 ml
- 10.4 การเตรียม reagent สามารถเตรียมตามปริมาณที่ต้องการได้ แต่ความเข้มข้นต้องเป็นไปตามที่กำหนด
- 10.5 การเตรียมตัวอย่างทุกขั้นตอน ตลอดจนถึงการทำ derivatize ควรทำในวันเดียวกัน หากจำเป็นต้องหยุดกระบวนการต้องเก็บตัวอย่างในรูป dry extract ก่อนการทำ derivatize ในตู้เย็น ที่อุณหภูมิ 2 - 8 °C ได้ไม่เกิน 1 วัน
- 10.6 ตัวอย่างเก็บในตู้เย็น ที่อุณหภูมิ 2 - 8 °C และต้องทำการวิเคราะห์ให้เสร็จสิ้นภายใน 3 เดือน
- 10.7 ควรเตรียมตัวอย่างให้เสร็จสิ้น ภายใน 8 ชั่วโมง หลังการนำตัวอย่างออกจากตู้เย็น
- 10.8 โครมาโทแกรม การตรวจปริมาณแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี - แมสสเปกโตรเมทรี

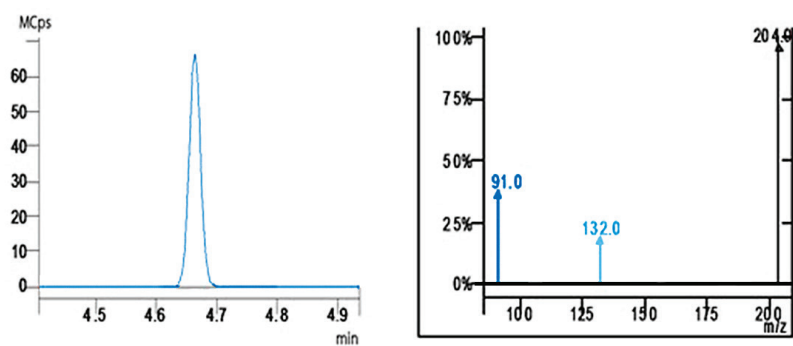




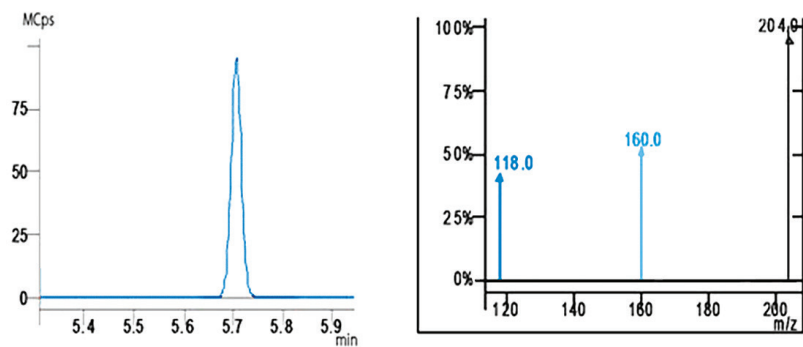
Amphetamine 190.0, 118.0, 91.0



Phentermine 204.0, 132.0, 91.0



Methamphetamine 204.0, 160.0, 118.0



2.4 การตรวจปริมาณยาบ้าและยาไอในปัสสาวะด้วยเทคนิค

Gas Chromatography - Mass Spectrometry (GC-MS)

1. ขอบข่าย (Scope)

เป็นวิธีมาตรฐานในการปฏิบัติงานตรวจพิสูจน์ยืนยันผลยาบ้า/ไอซ์ (Amphetamine และ Methamphetamine) และยาไอ (MDA, MDMA และ MDE) ในปัสสาวะ

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

- 2.1 รวมกฎหมายยาเสพติด พร้อมด้วย กฎกระทรวง ระเบียบ ข้อบังคับ ที่เกี่ยวข้อง, สำนักงานป้องกันและปราบปรามยาเสพติด กระทรวงยุติธรรม พ.ศ. ๒๕๕๒, หมายเลขเอกสารเผยแพร่ ๑-๐๙-๒๕๕๒, ๒๖-๒๗.
- 2.2 ความผิดและโทษเกี่ยวกับกฎหมายยาเสพติด, กองนิติการ สำนักงานป้องกันและปราบปรามยาเสพติด สำนักงานกฤษฎีกา, หมายเลขเอกสารเผยแพร่ 02-07-2543; 12-16.
- 2.3 Anthony C Moffat, M David Osselton and Brian Widdop, Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. Third edition, Volume 2, Pharmaceuticals Press London, 2004; 1228 - 1229, 1254 - 1258.
- 2.4 Recommended Method for the Detection and Assay of Heroin, Cannabinoids, Cocaine, Amphetamine, Methamphetamine and Ring - Substituted Amphetamine Derivative in Biological Specimens, UNITED NATIONS New York, 1995; 59 - 70.
- 2.5 Varian. Toxicology Manual Confirmation of Drugs of Abuse in Urine with Ion - Trap GC - MS, Varian, Inc, 2001; 5 - 18.



3. หลักการ (Principle)

ยาบ้า (Methamphetamine และ Amphetamine) และยาอี (MDA MDMA และ MDE) จัดอยู่ในกลุ่ม Phenethylamines ซึ่งมีสูตรโครงสร้างคล้ายกัน การตรวจแยกด้วย หลักการ TLC ในบาง system ไม่สามารถแยกออกจากกันได้อย่างชัดเจน นอกจากนี้เทคนิคนี้จะให้ผลไม่ชัดเจนกรณีที่มีสารในปริมาณต่ำๆ หรือใกล้ค่า cut off การตรวจด้วย GC-MS จะมีลักษณะการแยกสารในรูปแบบเดียวกัน ดังนั้นการทำให้ปฏิกิริยากับสารอนุพันธ์ TFA หรือ PFPA จะเข้าไปแทนที่ไฮโดรเจนของเอมีน (Amine) เพิ่มความจำเพาะเจาะจงและเพิ่มความไว (selectivity และ sensitivity) และการตรวจด้วย GC-MS ยังสามารถตรวจวัดสารในปริมาณต่ำๆ ได้ ดังนั้นจึงสามารถตรวจพบ Amphetamine และ MDA ซึ่งเป็น metabolite ของ Methamphetamine และ MDMA ตามลำดับ ได้ ซึ่งไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยเทคนิค TLC เพื่อเพิ่มความมั่นใจในการรายงานผล

การแยกสารดังกล่าวโดยอาศัยหลักการ GC-MS ซึ่งอาศัยหลักการแยกสารผสมออกจากกัน โดยอาศัยคุณสมบัติความสามารถในการกลายเป็นไอ การละลาย และการดูดซับที่แตกต่างกันของสารแต่ละชนิดในคอลัมน์ ในอุณหภูมิและเวลาที่ต่างกันโดยใช้เครื่อง gas chromatography แล้วใช้ mass spectrometry ในการทำให้สารที่แยกได้แตกตัวเป็นไอออน (ion fragment) แล้วศึกษา รูปแบบการแตกตัวของสารนั้นๆ เทียบกับสารมาตรฐานที่เตรียมขึ้นเอง หรือฐานข้อมูลใน software ของเครื่อง MS database เช่น Wiley07 หรือ NIST05 การหาปริมาณสารจะขึ้นกับความสูงของพีค (peak abundance) และพื้นที่ใต้พีค (peak area) เปรียบเทียบกับความสูงพีคหรือพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน

4. เครื่องมือ และอุปกรณ์ (Apparatus)

4.1 เครื่องมือ

- 4.1.1 เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) ชนิดทศนิยมไม่น้อยกว่า 4 ตำแหน่ง
- 4.1.2 เครื่องผสมน้ำยาแบบหมุนวน (vortex mixer) หรือ เครื่องเขย่า (shaker)
- 4.1.3 เครื่องปั่นหมุนเหวี่ยงความเร็วไม่น้อยกว่า 2,000 รอบต่อนาที
- 4.1.4 เครื่อง evaporator with nitrogen พร้อม needle
- 4.1.5 เครื่อง heating block พร้อม เทอร์โมมิเตอร์
- 4.1.6 เครื่อง vacuum manifold
- 4.1.7 เครื่อง vacuum pump

4.2 เครื่องแก้วและอุปกรณ์

- 4.2.1 micropipette และ micropipette tips ขนาด 50-200 μ l และ 1-5 ml
- 4.2.2 positive auto - pipette และ pipette tips ขนาด 10, 50, 100, 250, 1000 μ l
- 4.2.3 solid phase extraction (SPE) ชนิด OASIS HLP cartridge 3 ml / 60 mg หรือเทียบเท่า
- 4.2.4 pH paper rang 0 - 14





5. สารเคมี (Reagent)

5.1 ชนิด AR grade

- 5.1.1 Ammonium hydroxide
- 5.1.2 Ethyl acetate
- 5.1.3 Methanol
- 5.1.4 Pentafluoropropionic anhydride (PFPA)
- 5.1.5 Phosphoric acid
- 5.1.6 Trifluoroacetic acid anhydrous (TFA)
- 5.1.7 Distilled Water type II

5.2 ชนิด HPLC grade

- 5.2.1 Ethyl acetate
- 5.2.2 Methanol

5.3 สารมาตรฐาน (Standard)

มีใบรับรองผลการตรวจวิเคราะห์ (certificate of analysis; COA)
มีความบริสุทธิ์มากกว่า 98% as is หรือเทียบเท่า

- 5.3.1 Amphetamine Sulfate หรือ Amphetamine hydrochloride (A)
- 5.3.2 Methamphetamine hydrochloride (M)
- 5.3.3 MDA hydrochloride
- 5.3.4 MDMA hydrochloride
- 5.3.5 MDE hydrochloride
- 5.3.6 Phentermine hydrochloride
- 5.3.7 Ephedrine hydrochloride (EP) (กรณีที่จำเป็น)
- 5.3.8 Pseudoephedrine hydrochloride (PE) (กรณีที่จำเป็น)



6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

6.1 การเตรียมสารเคมี

6.1.1 2 % Ammonium hydroxide

- ตวง 40 ml 25 % Ammonium hydroxide ใส่ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 500 ml ที่มีน้ำกรองอยู่ประมาณ 2 ใน 3 ของขวด
- เขย่าขวดเบาๆ ปรับปริมาตรเป็นด้วยน้ำกรอง
- เก็บไว้ในขวดแก้ว ที่อุณหภูมิห้อง

6.1.2 4 % Phosphoric acid

- ตูต 4.7 ml 85 % Phosphoric acid ใส่ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 ml ที่มีน้ำกรองอยู่ประมาณ 2 ใน 3 ของขวด
- เขย่าขวดเบาๆ ปรับปริมาตรเป็นด้วยน้ำกรอง
- เก็บไว้ในขวดแก้ว ที่อุณหภูมิห้อง

6.1.3 5 % Methanol in 2 % Ammonia

- ตูต 5 ml 100% Methanol ใส่ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 ml ปรับปริมาตรด้วย 2 % Ammonium hydroxide
- เก็บไว้ในขวดแก้ว ที่อุณหภูมิห้อง

6.1.4 20% Methanol in 2% Ammonia

- ตูต 20 ml 100% Methanol ปรับปริมาตรด้วย 2% Ammonium hydroxide ปรับปริมาตรเป็น 500 ml ด้วยน้ำกรอง
- เก็บไว้ในขวดแก้ว ที่อุณหภูมิห้อง

หมายเหตุ สารละลายที่เตรียมขึ้นเอง มีอายุการใช้งาน ไม่เกิน 2 ปี หรือเมื่อพบว่า มีลักษณะทางกายภาพและทางเคมีเปลี่ยนแปลง



6.2 การเตรียมสารมาตรฐาน

6.2.1 Stock standard: เตรียมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นชนิดละ

1 mg/ml ใน Methanol HPLC grade ดังนี้

- 1) กลุ่มยาบ้า ได้แก่ Amphetamine Methamphetamine
- 2) กลุ่มยาอี ได้แก่ MDA, MDMA, MDE
- 3) Internal standard ได้แก่ Phentermine
- 4) กลุ่มสารรบกวน (interferences) (ในกรณีที่เป็น) เช่น Ephedrine Pseudoephedrine

6.2.2 Working standard Mix - 1 (WS1 - 100) : เตรียมสารละลายมาตรฐาน

เจือจาง จากข้อ 6.2.1 ความเข้มข้นชนิดละ 100 µg/ml ใน Methanol (HPLC grade)

- ดูดสารละลายมาตรฐาน 1 mg/ml (โดยเตรียมตามกลุ่มที่ต้องตรวจวิเคราะห์) ชนิดละ 1 ml ใส่ volumetric flask ขนาด 10 ml ปรับปริมาตรด้วย Methanol จะได้สารละลายมาตรฐาน 100 µg/ml

6.2.3 Working standard Mix - 2 (WS2 - 10) : เตรียมสารละลายมาตรฐาน

เจือจางจากข้อ 6.2.1 ความเข้มข้นชนิดละ 10 µg/ml ใน Methanol (HPLC grade)

- ดูดสารละลายมาตรฐาน 100 µg/ml (โดยเตรียมตามกลุ่มที่ต้องตรวจวิเคราะห์) ชนิดละ 1 ml ใส่ volumetric flask ขนาด 10 ml ปรับปริมาตรด้วย Methanol จะได้สารละลายมาตรฐาน 10 µg/ml

6.3 เตรียม QC sample และ positive control

6.3.1 เตรียม reference standard no urine (S) : สำหรับฉีดหาตำแหน่ง retention time และ reference spectra

- ดูดสารละลายมาตรฐาน working standard mix - 1 (high) 100 µg/ml 15 µl เป่าแห้งด้วย N₂ นำไปทำ derivatize ตามข้อ 6.6.7

6.3.2 Negative control (NC)

- a. Certified drugs free urine
- b. ปัสสาวะของผู้ที่ไม่ได้รับประทานยาใดๆ ต่อเนื่องกันอย่างน้อย 5 วัน ในวันที่เก็บปัสสาวะ

6.3.3 Positive control (PC)

เตรียม spiked urine ที่ความเข้มข้นในช่วง 0 ถึง 5000 ng/ml โดยให้ครอบคลุมค่าสูง กลาง ต่ำ ของค่า cut off เช่น 0, 100, 250, 500, 1000, 2000, 3000 ng/ml level ละ 1 ml โดยมี Phentermine เป็น internal standard ดังตารางต่อไปนี้

วิธีเตรียม QC sample

spiked 1 ml urine	WS2-10 volume taken (μl)	WS1-100 volume taken (μl)	IS (Phentermine) 100 ug/ml volume taken (μl)	final concentration Amphetamines (ng/ml urine)
S	100	0	10	-
NC	0	0	10	0
PC 1	10	0	10	100
PC 2	25	0	10	250
PC 3	50	0	10	500
PC 4	100	0	10	1000
PC 5	0	20	10	2000
PC 6	0	25	10	2500
PC 7	0	30	10	3000
Sample (s)	0	0	10	X

หมายเหตุ

1. reference standard no urine (S) มีค่าความเข้มข้นของสารเทียบเท่าสารเป้าหมายที่ cut off เมื่อใช้ปัสสาวะ 3 ml
2. PC 1 – PC 7 ความเข้มข้นอยู่ในช่วง -10 ถึง 500 % ของค่า cut off, และต้องมี level ที่ค่า cut off เสมอ





3. PC สำหรับทำ calibration curve ต้องมีที่ความเข้มข้นที่ค่า cut off เสมอ และมีความเข้มข้นอื่นๆ ครอบคลุมค่าสูง กลาง ต่ำ ของค่า cut off
4. PC สำหรับเป็น QC sample ต้องมีค่าที่แตกต่างจากตัวอย่างที่ทำ calibration curve

6.4 เตรียมวัสดุ/อุปกรณ์

- 6.4.1 นำตัวอย่างปัสสาวะออกจากตู้เย็นวางไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องก่อนทำการวิเคราะห์
- 6.4.2 เขียนรหัสตัวอย่างปัสสาวะหรือเลขที่ตัวอย่างและ QC sample บนวัสดุอุปกรณ์ที่ต้องใช้ เช่น test tube, SPE cartridge, vial ขนาด 2 ml เป็นต้น
- 6.4.3 เปิดเครื่อง heating block ตั้งอุณหภูมิประมาณ 65 °C โดยใส่เทอร์โมมิเตอร์ไว้ช่องสำหรับใส่เทอร์โมมิเตอร์

6.5 การเตรียมตัวอย่าง (pretreatment)

- 6.5.1 คูดตัวอย่างปัสสาวะ/negative control/positive control/QC sample 1 ml ใส่ใน test tube
- 6.5.2 เติม internal standard Phentermine 100 µg/ml 10 µl
- 6.5.3 เติม 1 ml 4 % H_3PO_4 เขย่าบน vortex mixer ประมาณ 1 นาที

6.6 การสกัดตัวอย่าง (extraction) ใช้สารเคมีชนิด AR grade มีขั้นตอนดังนี้

6.6.1 condition column

- เติม 2 ml 100% Methanol
- เติม 2 ml น้ำกรอง

6.6.2 load sample

เทตัวอย่าง / QC Sample / positive control และ negative control ปลอ่ยให้ไหลจนหมด หรือถ้าไม่ไหลให้เปิด vacuum pump โดยให้ไหลประมาณ 1 - 2 ml / 1 นาที

6.6.3 wash column

- เติม 2 ml 5 % Methanol
- เติม 2 ml 20 % Methanol in 2 % Ammonium hydroxide
- เติม 3 ml 100 % Methanol

6.6.4 dry column

- เป่า column ให้แห้งด้วย N_2 ประมาณ 5 นาที

6.6.5 elute sample

- เติม 1.5 ml 100% Methanol ปล่อยให้ไหลจนหมด
- Elute ซ้ำด้วย 0.5 ml 100% Methanol

6.6.6 dry column และ concentrate sample

- นำตัวอย่างที่ elute ไประเหยให้แห้งด้วย N_2

6.6.7 derivatization (เลือก 1 วิธี) นำตัวอย่างจากข้อ 6.6.6

1) TFA-Derivative

- เติม Ethyl acetate (HPLC grade) 50 μ l และ TFA 50 μ l ปิดจุก tube แล้วพันทับด้วย paraffin เพื่อป้องกันการขยายตัวของสารจากความร้อน นำไป heat บน heating block ที่ 65 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 25 นาที แล้วนำออกจาก heating block ตั้งไว้ให้เย็น ถ่ายใส่ vial ขนาด 2 ml ที่มีขนาด 200 μ l อยู่ภายใน

2) PFPA-Derivative

- เติม Ethyl acetate (HPLC grade) 50 μ l และ PFPA 50 μ l ปิดจุก Tube แล้วพันทับด้วย paraffin เพื่อป้องกันการขยายตัวของสารจากความร้อน นำไป heat บน heating block ที่ 65 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 25 นาที แล้วนำออกจาก heating block ตั้งไว้ให้เย็น ถ่ายใส่ vial ขนาด 2 ml ที่มี insert ขนาด 200 μ l อยู่ภายใน



7. วิธีดำเนินการ (Procedure)

7.1 นำตัวอย่างที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS โดยสภาวะของเครื่อง ดังนี้

Column : HP-5 ms 30 M x 0.25 mm ID DF = 0.25 หรือเทียบเท่า

Flow rate : 1.0 ml / minute He; Injection: 1 µl, split mode

MS mode : EI scan 50-300 amu หรือกว้างกว่า

Library : NIST, Wiley, MPW2007

Oven temperature : เริ่มต้นไม่สูงกว่า 90 °C จนถึงไม่ต่ำกว่า 280 °C

program oven temperature สามารถปรับเปลี่ยนได้ เพื่อความเหมาะสมในการแยก แต่ต้องให้ครอบคลุมอุณหภูมิที่สารออกจากคอลัมน์

7.2 Detection & identification

7.2.1 ดูค่า RT และ mass spectrum ของสารมาตรฐานแต่ละชนิด ดังนี้

ตารางแสดงค่า retention time (RT) และ mass spectrum ของสารมาตรฐาน 8 ชนิด

mass spectrum (m/z)			RT*	compound	RT*	mass spectrum (m/z)		
TFA-derivatives			Order		Order	PFPA-derivatives		
Q	Q1	Q2				Q	Q1	Q2
140	118	91	1	Amphetamine	1	190	118	91
154	132	91	2	Phentermine (IS)	2	204	132	91
154	110	69	3	Ephedrine	3	204	160	119
154	118	110	4	Methamphetamine	4	204	118	110
154	110	69	5	Pseudoephedrine	5	204	160	119
135	162	77	6	MDA	6	135	162	119
154	162	135	7	MDMA	7	204	162	160
168	162	140	8	MDE	8	218	190	162

Q = quantitation ion Q1 และ Q2 = qualifier ion-1 และ 2

* ค่า RT อาจมีการเปลี่ยนแปลง ขึ้นอยู่กับความยาวของคอลัมน์และ
oven temperature ที่ใช้ แต่ให้ถือลำดับ RT ตามตารางดังแสดงในตารางนี้

7.2.2 ดูค่า RT และ mass spectrum ของตัวอย่างเทียบกับ positive control
และสารมาตรฐาน ตามตารางในข้อ 7.2.1

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and report)

8.1 การรายงานผล

8.1.1 กรณียาบ้า

8.1.1.1 ตัวอย่างที่รายงาน “ ตรวจพบเมทแอมเฟตามีน ”
ต้องมีลักษณะดังนี้

8.1.1.1.1 มี RT และ มี mass spectrum ตรงกับ positive
control และสารมาตรฐาน Methamphetamine

8.1.1.1.2 มีพื้นที่ใต้พีค (peak area) Methamphetamine
ต้องเท่ากับหรือมากกว่า positive control ที่ความ
เข้มข้น 1000 ng/ml

8.1.1.1.3 คำนวณผลจาก calibration curve มีค่าเท่ากับหรือ
มากกว่า 1000 ng/ml

8.1.1.2 ตัวอย่างที่รายงาน “ ตรวจไม่พบเมทแอมเฟตามีน ”
ต้องมีลักษณะดังนี้

8.1.1.2.1 ตัวอย่างที่มีลักษณะไม่เป็นไปตามข้อ 8.1.1.1.1

8.1.1.2.2 ตัวอย่างที่มีลักษณะเป็นไปตามข้อ 8.1.1.1.1 แต่ไม่เป็น
ไปตามข้อ 8.1.1.1.2 และ 8.1.1.1.3



8.1.2 กรณียาอี

8.1.2.1 ตัวอย่างที่รายงาน “ ตรวจพบยาอี ” ให้รายงานตามชนิดของสารออกฤทธิ์สำคัญที่พบ ได้แก่

“ ตรวจพบ 3,4-เมทิลลีนไดออกซีแอมเฟตามีน
(เอ็มดีเอ็มเอ, MDMA) ”

“ ตรวจพบ เมทิลลีนไดออกซีแอมเฟตามีน (เอ็มดีเอ็ม, MDA) ”

“ ตรวจพบ เอ็น เอทิล เอ็มดีเอ หรือ เอ็มดีอี (เอ็มดีอี, MDE) ”
ต้องมีลักษณะ ดังนี้

8.1.2.1.1 มี RT และ มี mass spectrum ตรงกับ positive control และสารมาตรฐาน ยาอี

8.1.2.1.2 มีพื้นที่ใต้พีค (peak area) ของยาอี ต้องเท่ากับหรือมากกว่า positive control ที่ความเข้มข้น 1000 ng/ml

8.1.2.1.3 คำนวณผลจาก calibration curve มีค่าเท่ากับหรือมากกว่า 1000 ng/ml

8.1.2.2 ตัวอย่างที่รายงาน “ ตรวจไม่พบยาอี ”

3, 4-Methylenedioxymethampheta-mine,
3, 4-Methylenedioxeneamphetamine
และ 3, 4-Methylenedioxe-neethamphe
ต้องมีลักษณะ ดังนี้

8.1.2.2.1 ตัวอย่างที่มีลักษณะไม่เป็นไปตามข้อ 8.1.2.1.1

8.1.2.2.2 ตัวอย่างที่มีลักษณะเป็นไปตามข้อ 8.1.2.1.1 แต่ไม่เป็นไปตามข้อ 8.1.2.1.2 และ 8.1.2.1.3

9. การควบคุมคุณภาพและผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

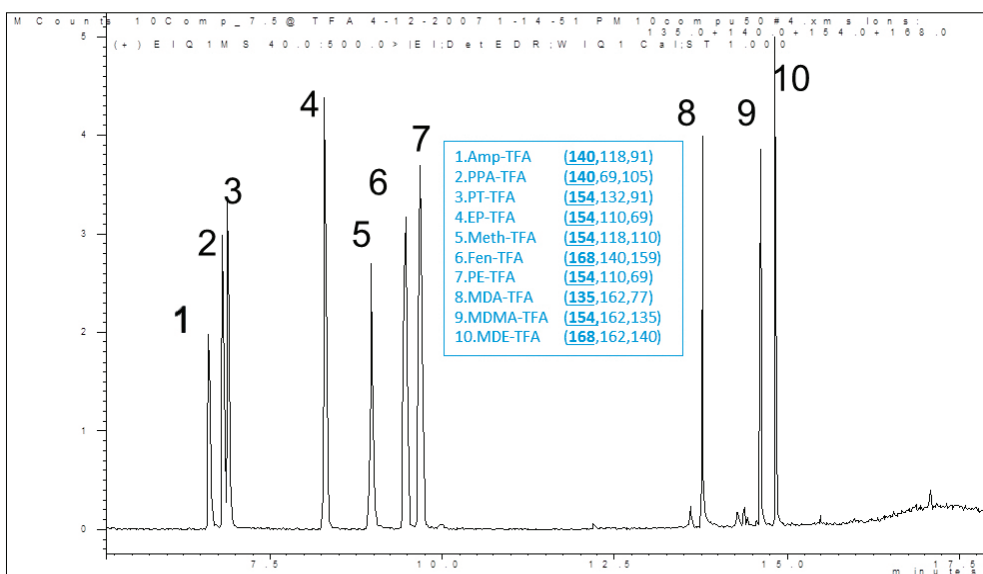
9.1 ต้องทำการตรวจวิเคราะห์ negative control และ positive control ด้วยทุกครั้ง

10. รายละเอียดอื่นๆ

- 10.1 การตรวจยืนยันด้วยเทคนิค GC-MS ตัวอย่างปัสสาวะควรทำการตรวจเบื้องต้นโดยใช้ชุดทดสอบหลักการภูมิคุ้มกันวิทยา (rapid test kit) โดยพิจารณา ดังนี้
- กรณีให้ผลบวกหรือให้ผลบวกไม่ชัดเจน ต้องทำการตรวจยืนยันผลทุกตัวอย่าง
 - กรณีให้ผลลบ จะทำการตรวจยืนยันผลหรือไม่ก็ได้ ขึ้นอยู่กับดุลพินิจของหัวหน้าห้องปฏิบัติการ เช่น กรณีร้องขอพิเศษ หรือ ต้องการทำให้ยืนยันผลลบ เป็นต้น

10.2 ปัจจุบันยาบ้า / ไอซ์ที่แพร่ระบาดในประเทศไทย คือ Methamphetamine ส่วนยาอี คือ MDMA, MDA, MDE ดังนั้น การรายงานผลการวิเคราะห์ในกรณีที่เป็นยาบ้า / ไอซ์ ให้เป็นไปตามข้อ 8.2.1 และ 8.2.2 สำหรับยาอี ให้เป็นไปตามข้อ 8.2.3 และ 8.2.4

10.3 ความไวของวิธี 250 µg/ml เมื่อใช้ปัสสาวะ 1 ml





2.5 การตรวจปริมาณสารกลุ่มแอมเฟตามีนส์และเอ็กซ์ตาซีในปัสสาวะ ด้วยเทคนิค Liquid Chromatography – Massspectrometry (LC-MS)

1. ขอบข่าย (Scope)

เป็นวิธีมาตรฐาน ในการปฏิบัติงานตรวจพิสูจน์ยืนยันผลหา Amphetamine, Methamphetamine, 3,4-Methylenedioxymethamphetamine 3,4- Methylenedioxeneamphetamine และ 3,4-Methylenedioxeneethamphetamine ในปัสสาวะด้วยเทคนิคการสกัดด้วยวัฏภาคของแข็งแบบออนไลน์และลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมตรี ที่ระดับความเข้มข้น 200 ng/ml ขึ้นไป

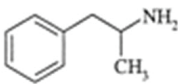
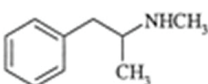
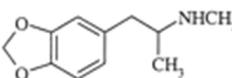
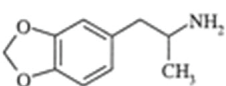
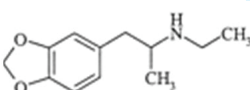
2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

- 2.1 รวมกฎหมายยาเสพติด พร้อมด้วย กฎกระทรวง ระเบียบ ข้อบังคับ ที่เกี่ยวข้อง
สำนักงาน ป.ป.ส กระทรวงยุติธรรม พ.ศ. 2552 หมายเลขเอกสารเผยแพร่
1-09-2552, 26-27
- 2.2 Anthony C Moffat, M David Osselton and Brian Widdop, Clarke's Analysis
of Drugs and Poisons. Third edition, Volume 1, Pharmaceuticals Press
London, 2004.
- 2.3 Recommended Method for Testing Amphetamine in Urine,
Recommended Method for Testing for Phenethylamine: Manual for
identification of Abuse Drugs 2nd Edition, March, 1998 Narcotics Division,
pharmaceutical and Medical Safety Bureau, Ministry of Health and
Welfare, Japan.

3. หลักการ (Principle)

สารเสพติดที่มีโครงสร้างโมเลกุลพื้นฐานเป็น Phenethylamine คือกลุ่มแอมเฟตามีน (Amphetamine type-stimulant: ATS) หมายรวมถึง Amphetamine Methamphetamine และ กลุ่ม Ecstasy ประกอบด้วย 3,4-Methylenedioxymethamphetamine 3,4-Methylenedioxeneamphetamine และ 3,4-Methylenedioxeneethamphetamine สารกลุ่มนี้ออกฤทธิ์ต่อร่างกายโดยกระตุ้นระบบประสาทส่วนกลางให้มีการหลั่ง หรือการดึงกลับของสารสื่อประสาท 3 ชนิดคือ serotonin dopamine และ norephedrine เป็นผลให้ผู้ใช้เกิดความรู้สึกเป็นสุข ความพอใจ อาจมาจนทำให้เคลิ้มฝัน และมีอาการประสาทหลอน หวาดระแวงได้ ผู้เสพยาสามารถเปลี่ยน

ตัวยาเสพติดในกรณีที่ไม่สามารถเข้าถึงตัวยาเสพติดประจำ หรือสารเสพติดรวมกันหลายชนิด ทำให้ยาเสพติดแพร่กระจายอย่างรวดเร็ว และยังเป็นสาเหตุของปัญหาทางสังคมอย่างต่อเนื่องในระดับโลก ตารางแสดงโครงสร้างโมเลกุล ชื่อทั่วไป และสารที่สามารถตรวจพบได้ในปัสสาวะ Amphetamine Methamphetamine 3,4-Methylenedioxymethamphetamine 3,4- Methylenedioxene-amphetamine และ 3,4- Methylenedioxeneethamphetamine

ชนิดของยา	โครงสร้างโมเลกุล	ชื่อทั่วไป	สารเป้าหมายที่ตรวจในปัสสาวะ
Amphetamine		Speed, whiz, goey, uppers, loue, dexies, pep pills	Amphetamine (20-30% of the dose)
Methamphetamine		Meth, speed, whiz, fast, uppers, goey, loue	Unchanged drug (MA 44 %) Its major metabolites Amphetamine(6-20%)
3,4-Methylenedioxy methamphetamine		XTC, X, ecstasy, Adam, M & M, eccy, E, go, Scooby	Unchanged drug (MDMA)
3,4-Methylenedioxeneamphetamine		Love bug, crystal, P, window pane	Unchanged drug (MDA)
3,4-Methylenedioxeneethamphetamine		Eve	Unchanged drug (MDEA)

การตรวจพิสูจน์หาปริมาณ Amphetamine, Methamphetamine, 3,4-Methylenedioxymethamphetamine, 3,4-Methylenedioxeneamphetamine และ 3,4-Methylenedioxeneethamphetamine ในปัสสาวะด้วยระบบ การสกัดด้วยวัฏภาคของแข็งแบบออนไลน์และลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมตรี ตัวอย่างจะถูกทำให้แยกออกจากกันด้วยคอลัมน์ โดยใช้ของเหลวเป็นตัวพาจากนั้นสารจะถูกตรวจวัดด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ เทียบกับสารมาตรฐานที่เตรียมขึ้น



4. เครื่องมือ และอุปกรณ์ (Apparatus)

4.1 เครื่องมือ

4.1.1 เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) ชนิดทศนิยมไม่น้อยกว่า 4 ตำแหน่ง

4.1.2 เครื่องปั่นหมุนเหวี่ยงความเร็วไม่ต่ำกว่า 2,000 รอบต่อนาที

4.1.3 เครื่องลิกวิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์

4.1.4 LC column - acclaim Trinity P1 3 μ m 3.0 x 100 mm

4.1.5 SPE Dionex SoLEX HRP Cartridge 2.1 x 20 mm

4.2 เครื่องแก้วและอุปกรณ์

4.2.1 micropipette และ micropipette tips ขนาด 100-1000 μ l

4.2.2 positive auto-pipette และ pipette tips ขนาด 50, 1000 μ l

4.2.3 ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 2, 1000 ml

4.2.4 กระดาษกรองชนิด nylon ขนาดรูพรุน 0.2 μ l

4.2.5 micro centrifuge tube ขนาด 1.5 ml

5. สารเคมี (Reagent)

5.1 สารเคมีทั่วไป

5.1.1 Acetonitrile (HPLC grade)

5.1.2 Ammonium formate

5.1.3 Formic acid 99 %

5.1.3 Methanol

5.1.4 Distilled water (type I)

5.2 สารมาตรฐาน

มีใบรับรองผลการตรวจวิเคราะห์ (Certificate of analysis; COA) มีความบริสุทธิ์
มากกว่า 98% as is หรือเทียบเท่า

- 5.2.1 Amphetamine sulfate
- 5.2.2 Methamphetamine hydrochloride
- 5.2.3 3,4-methylenedioxy Amphetamine hydrochloride
- 5.2.4 3,4-methylenedioxy Methamphetamine hydrochloride
- 5.2.5 3,4-methylenedioxy Ethylamphetamine hydrochloride
- 5.2.6 Phentermine hydrochloride

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

6.1 การเตรียมวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase)

- 6.1.1 Stock 1.0M Ammonium formate ระยะเวลากการเก็บรักษา 3 เดือน เก็บไว้ในตู้เย็น 2 - 8 °C
 - ชั่ง Ammonium formate 12.612 g ใส่ปิกเกอร์ขนาด 100 ml
 - ละลาย Ammonium formate ด้วยน้ำปริมาณ 30 ml เทใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 200 ml ทำซ้ำ 3 รอบ
 - ปรับปริมาตรด้วยน้ำกรองจนได้ 200 ml
- 6.1.2 50mM Ammonium formate pH 4.0 ระยะเวลากการเก็บรักษา 1 เดือน
 - บีบ 1.0M Ammonium formate ปริมาตร 10 ml ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 200 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกรอง
 - ปรับ pH เป็น 4.0 ด้วย Formic acid
 - กรองผ่านกระดาษกรองชนิด nylon ขนาดรูพรุน 0.2 μ m
- 6.1.3 0.15% Hetafluorobutyric acid in water ระยะเวลากการเก็บรักษา 1 เดือน
 - ตวงน้ำกรองปริมาตร 1000 ด้วยกระบอกตวง เทใส่ปิกเกอร์ขนาด 1000 ml ประมาณ 500 ml
 - บีบ Hetafluorobutyric acid 1.5 ml ลงในปิกเกอร์ที่บรรจุน้ำกรอง
 - เทน้ำที่เหลือทั้งหมดลงไปผสม คนด้วยแท่งแก้ว
 - กรองผ่านกระดาษกรองชนิด nylon ขนาดรูพรุน 0.2 μ m
- 6.1.4 Distilled water (type I) กรองผ่านกระดาษกรองชนิด nylon ขนาดรูพรุน 0.2 μ m
- 6.1.5 Acetonitrile กรองผ่านกระดาษกรองชนิด nylon ขนาดรูพรุน 0.2 μ m



6.2 การเตรียมสารมาตรฐาน (standard preparation)

6.2.1 Stock standard solution

- Methamphetamine (M) standard solution

Stock solution (M_S2000) : ชั่งสารมาตรฐาน Methamphetamine hydrochloride ให้มีน้ำหนัก 12.432 ± 0.050 mg (12.432 – 12.382 mg) ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 ml ปรับปริมาตรด้วย Methanol (HPLC grade)

- Amphetamine (Am) standard solution

Stock solution (A_S2000) : ชั่งสารมาตรฐาน Amphetamine sulfate ให้มีน้ำหนัก 13.656 ± 0.050 mg (13.706 – 13.606 mg) ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 ml ปรับปริมาตรด้วย Methanol (HPLC grade)

- Methylenedioxy-methamphetamine (MDMA) standard solution

Stock solution (MDMA_S2000) : ชั่งสารมาตรฐาน 3,4-methylenedioxy Methamphetamine hydrochloride ให้มีน้ำหนัก 12.010 ± 0.050 mg (12.060 - 11.960 mg) ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 ml ปรับปริมาตรด้วย Methanol (HPLC grade)

- Methylenedioxy-amphetamine (MDA) standard solution

Stock solution (MDA_S1000) : ชั่งสารมาตรฐาน 3,4-methylenedioxy amphetamine hydrochloride ให้มีน้ำหนัก 12.012 ± 0.050 mg (12.062 - 11.962 mg) ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 ml ปรับปริมาตรด้วย Methanol (HPLC grade)

- Methylenedioxy-ethylamphetamine (MDEA) standard solution

Stock solution (MDEA_S1000) : ชั่งสารมาตรฐาน 3,4-methylenedioxy ethylamphetamine hydrochloride ให้มีน้ำหนัก 11.756 ± 0.050 mg (11.806 – 11.706 mg) ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 ml ปรับปริมาตรด้วย Methanol (HPLC grade)

- Mixed Std-200 stock solution : ปิเปต 2 ml ของ A_S2000 M_S2000 MDMA_S2000 MDA_S2000 MDEA_S2000 ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 20 ml. ปรับปริมาตรด้วย Methanol (HPLC grade)

- Mixed Std-50 stock solution : ปิเปต 2.50 ml ของ Mixed Std-200 stock solution ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 ml ปรับปริมาตรด้วย Methanol (HPLC grade)
- Internal standard solution (IS)
Stock solution : ชั่งสารมาตรฐาน Phentermine hydrochloride ให้มีน้ำหนัก 10 mg ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 ml ปรับปริมาตรด้วย Methanol (HPLC grade)

6.2.2 Working standard (WS) solution for linearity range 1
เตรียม WS ใน Methanol สำหรับ spiked urine calibration curve และ QC sample ดังตาราง

WS	WS Conc. (ng/ml)	Mixed Std - 50 taken (ml)	final volume (ml)
1WS ₁	3,000	120	2
1WS ₂	7,000	280	2
1WS ₃	10,000	400	2
1WS ₄	13,000	520	2
1WS ₅	17,000	680	2
1WS ₆	20,000	800	2
1WSQCL	8,000	320	2
1WSQCM	10,000	400	2
1WSQCH	15,000	600	2



6.2.3 Spiked urine calibration curve และ QC sample ปิเปตสารละลาย
มาตรฐานจาก WS แต่ละระดับความเข้มข้น ปริมาตร 100 ml ลงใน
microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml. และผสมด้วย certified drugs
free urine 900 ml จะได้ความเข้มข้นดังตาราง

CS and QC	Conc. (ng/ml)	WS taken (ml)	from solution	urine taken (ml)
1CS ₁	300	100	1WS ₁	900
1CS ₂	700	100	1WS ₂	900
1CS ₃	1,000	100	1WS ₃	900
1CS ₄	1,300	100	1WS ₄	900
1CS ₅	1,700	100	1WS ₅	900
1CS ₆	2,000	100	1WS ₆	900
1QCL	800	100	1WSQCL	900
1QCM	1,000	100	1WSQCM	900
1QCH	1,500	100	1WSQCH	900



6.2.4 Working standard (WS) solution for linearity range 2

เตรียม WS ใน Methanol สำหรับ spiked urine calibration curve และ QC sample ดังตาราง

WS	WS Conc. (ng/ml)	Mixed Std-200 taken (ml)	final volume (ml)
2WS ₁	20,000	200	2
2WS ₂	40,000	400	2
2WS ₃	55,000	550	2
2WS ₄	70,000	700	2
2WS ₅	85,000	850	2
2WS ₆	100,000	1000	2
2WSQCL	45,000	450	2
2WSQCM	50,000	500	2
2WSQCH	80,000	800	2



6.2.5 Spiked urine calibration curve และ QC sample ปิเปตสารละลาย
มาตรฐานจาก WS แต่ละระดับความเข้มข้น ปริมาตร 100 ml ลงใน
microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml และผสมด้วย Certified drugs
free urine 900 ml จะได้ความเข้มข้นดังตาราง

CS and QC	Conc. (ng/ml)	WS taken (ml)	from solution	urine taken (ml)
2CS ₁	2,000	100	2WS ₁	900
2CS ₂	4,000	100	2WS ₂	900
2CS ₃	5,500	100	2WS ₃	900
2CS ₄	7,000	100	2WS ₄	900
2CS ₅	8,500	100	2WS ₅	900
2CS ₆	10,000	100	2WS ₆	900
2QCL	3,000	100	2WSQCL	900
2QCM	5,000	100	2WSQCM	900
2QCH	8,000	100	2WSQCH	900

- * หมายเหตุ เตรียม Certified drugs free urine 1 ml, zero sample
(Certified drugs free urine 1 ml + IS 10 μ l) และ CS อย่างละ 1 ขั้ว
standard for system suitability test (SST) ใช้ตัวอย่าง 1 CS₃
QCL, QCM, QCH เตรียมอย่างละ 2 ขั้ว

6.2.6 เติม internal standard ปริมาตร 10 ml ลงใน CS และ QC

6.2.7 สารจากข้อ 6.2.6 และ zero sample นำไปปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วไม่ต่ำกว่า 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

6.2.8 ดูดส่วนใส 200 ml ใส่ใน insert vial

6.3 เตรียมวัสดุ/อุปกรณ์

6.3.1 นำตัวอย่างปัสสาวะออกจากตู้เย็นวางไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องก่อนทำการวิเคราะห์

6.3.2 เขียนเลขลำดับตัวอย่างปัสสาวะหรือเลขที่ตัวอย่างบน micro centrifuge tube ขนาด 1.5 ml

6.4 การเตรียมตัวอย่าง

6.4.1 ปิเปตตัวอย่างปริมาตร 500 μ l ใส่ micro centrifuge tube ขนาด 1.5 ml ตัวอย่างละ 1 ซ้ำ

6.4.2 เติม IS ปริมาตร 5 μ l

6.4.3 นำไปปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว ไม่ต่ำกว่า 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

6.4.4 ดูดส่วนใส 200 μ l ใส่ใน insert vial

7. วิธีดำเนินการ (Procedure)

7.1 นำสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC - MS ตามสภาวะดังนี้

Analytical Column	: Acclaim Trinity P1 3 μ m 3.0 x 100 mm
SPE Online	: Acclaim Trinity P1 3 μ m 3.0 x 10 mm
Column Oven	: 35 °C
Injection	: 0.5 μ l
Flow Rate	: 0.40 ml/min for transferring and 0.50 ml/min. for loading



Mobile Phase for transferring : water/Acetonitrile/50 mM NH_4 Formate
pH 4.0 gradient

Mobile Phase for loading : 0,20% HFBA in water/Acetonitrile
(90 / 10), isocratic

MS Mode : positive ESI SIM

Probe Temperature : 600.00 (°C)

Cone (Volts) : 45.00

Programme loading

เวลา (นาที)	อัตราการไหล (flow rate) สำหรับปั๊ม ซ้าย	loading สัดส่วน (%)			เหตุการณ์
		น้ำกรอง	Acetonitrile	50 mM NH_4 Formate pH 4.0	
0.00	0.40	12	80	8	Inject sample
1.00	0.40	12	80	8	Valve_Switch1_2
1.50	0.40	16	80	4	
1.80	0.40	16	80	4	
2.30	0.40	12	80	8	
3.50	0.40	12	80	8	Valve_Switch6_1
10.00	0.40	12	80	8	end

ตั้งค่ามวลของสารตามตารางด้านล่าง

SIM No.	mass spectrum (m/z)	compounds
1	136.20 $\pm$ 0.3	A
2	150.20 $\pm$ 0.3	M, Phe
3	180.22 $\pm$ 0.3	MDA
4	194.20 $\pm$ 0.3	MDMA
5	208.27 $\pm$ 0.3	MDEA

7.2 ลำดับการฉีดตัวอย่าง

- 7.2.1 Certified drugs free urine 1 เข้ม เพื่อตรวจสอบ baseline และ noise
- 7.2.2 สารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นเท่ากับ CS2 จำนวน 5 เข้ม สำหรับ SST เพื่อดูความพร้อมของเครื่องมือ และระบบก่อนฉีดตัวอย่าง เมื่อพื้นที่ใต้พีคเฉลี่ยของการฉีด 5 ครั้งของทุกสารที่สนใจ $\leq 5\%$ ให้ทำข้อ 7.2.3
- 7.2.3 Calibration solutions ประกอบด้วย blank sample, zero sample และ 1CS1-6 ตัวอย่างละ 1 เข้ม
- 7.2.4 ตัวอย่างและ QC samples แทรกสลับกันทุกๆ 50 ตัวอย่างจนครบชุดการตรวจวิเคราะห์
- 7.2.5 จำนวนตัวอย่างในแต่ละชุดการตรวจวิเคราะห์ไม่ควรเกิน 104 ตัวอย่าง (กำหนดตาม autosampler stability ที่ 24 ชั่วโมง)
- 7.2.6 กรณีมีตัวอย่างเกิน 104 ตัวอย่าง จะต้องเตรียม calibration solution และ QC sample พร้อมฉีดตัวอย่างเป็นชุดการฉีดใหม่



7.3 Detection and identification

7.3.1 ดูค่า run time (RT) และ m/z ของสารมาตรฐานแต่ละชนิด ดังนี้

SIM No.	mass spectrum (m/z)	RT	compounds
1	136.20	6.46	Amphetamine(A)
2	150.20	4.94 5.72	Methamphetamine(M) Phentermine
3	180.22	6.49	MDA
4	194.20	4.93	MDMA
5	208.27	4.22	MDEA

7.3.2 ดูค่า RT และ m/z ของตัวอย่างเทียบกับสารมาตรฐาน



8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and report)

8.1 การคำนวณ

8.1.1 คำนวณสมการเส้นตรงเพื่อสร้าง calibration curve จากข้อมูล CS₁-CS₆
โดยใช้ Excel

$$Y = aX + b$$

โดย Slope, a: = SLOPE (known_y's, known_x's)

y-intercept, b: = INTERCEPT (known_y's, known_x's)

Correlation Coefficient, r: = CORREL (known_y's, known_x's)

R-squared, r²: = RSQ (known_y's, known_x's)

8.1.2 คำนวณส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation: S.D.)

$$S.D. = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

โดย x = ค่าของข้อมูล

$\bar{x}$ = ค่ากลางของข้อมูล

n = จำนวนข้อมูล

8.1.3 คำนวณสัมประสิทธิ์แห่งความแปรผัน (coefficient of Variation: C.V.)

$$C.V. = \frac{S.D.}{\bar{x}} \times 100$$

8.1.4 Back-calculated value, %RD

Back-calculated value,

$$\%RD = \frac{(\text{ความเข้มข้นที่คำนวณได้จาก curve} - \text{ความเข้มข้นจริง}) \times 100}{\text{ความเข้มข้นจริง}}$$

8.1.5 อัตราส่วนพื้นที่ใต้พีค

$$\text{อัตราส่วน} = \frac{\text{พื้นที่ใต้พีคสาร}}{\text{พื้นที่ใต้พีค IS}}$$



8.2 การรายงานผล

ตัวอย่างที่รายงาน “ตรวจพบเมทแอมเฟตามีน”

“ ตรวจพบ 3,4-เมทิลลีนไดออกซีเมทแอมเฟตามีน (เอ็มดีเอ็มเอ, MDMA) ”

“ ตรวจพบ เมทิลลีนไดออกซีเมทแอมเฟตามีน (เอ็มดีเอ็ม, MDA) ”

“ ตรวจพบ เอ็น เอทิล เอ็มดีเอ หรือ เอ็มดีอี (เอ็มดีอี, MDE) ”

8.2.1 ต้องมีลักษณะดังนี้

8.2.1.1 มี RT และ m/z ตรงกับสารมาตรฐานชนิดที่ต้องการตรวจวิเคราะห์

8.2.1.2 รายงานผลการตรวจวิเคราะห์ Amphetamine, Methamphetamine, 3,4 Methylene dioxymethamphetamine, 3,4-Methylene dioxeneamphetamine และ 3,4-Methylene dioxeneethamphetamine ในหน่วย ng/ml โดยคำนวณผลจาก calibration curve

8.2.1.3 ความเข้มข้นของ Amphetamine, Methamphetamine, 3,4 Methylene dioxymethamphetamine, 3,4-Methylene dioxeneamphetamine และ 3,4-Methylene dioxeneethamphetamine ต้องไม่ต่ำกว่า 1000 ng/ml

8.2.2 ตัวอย่างที่รายงานผลตรวจไม่พบ Amphetamine, Methamphetamine, 3, 4Methylene dioxymethamphetamine, 3, 4-Methylene dioxeneamphetamine และ 3, 4-Methylene dioxeneethamphetamine ต้องมีลักษณะดังนี้

8.2.2.1 ตัวอย่างที่ไม่พบ mass spectrum และ / หรือ RT ไม่ตรงกับสารมาตรฐานที่

8.2.2.2 ตัวอย่างที่มีลักษณะเป็นไปตามข้อ 8.2.1.1 แต่ไม่เป็นไปตามข้อ 8.2.1.2 และ 8.2.1.3

9. การควบคุมคุณภาพและผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

- 9.1 กรณีของ system suitability test พิจารณาค่า retention time และ ค่า %CV ของ response ไม่ควรเกิน 10.0 %
- 9.2 75 % ของระดับความเข้มข้นทั้งหมดบน calibration curve ต้องมีค่า back - calculated value ไม่เกิน 15 % ยกเว้นที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด ให้ไม่เกิน 20 % สำหรับระดับความเข้มข้นที่ไม่ผ่านนั้นต้องไม่ใช่ระดับความเข้มข้นสูงสุด หรือ ต่ำสุดของ calibration curve จึงจะสามารถตัดทิ้ง และไม่นำไปใช้ในการคำนวณค่า correlation coefficient (r) และสมการเส้นตรงได้
- 9.3 ค่า correlation coefficient (r) ของ calibration curve ควรไม่น้อยกว่า 0.95
- 9.4 ค่า %RD ของ 4 ใน 6 (67 %) QC samples ทั้งหมด ควรมีค่าไม่เกิน 15 % และ 2 ใน 6 (33 %) QC samples ที่ไม่ผ่านต้องไม่ใช่ QC sample ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน
- 9.5 กรณีที่การวิเคราะห์ชุดนั้นๆ ไม่ผ่านเกณฑ์การควบคุมคุณภาพนักวิเคราะห์จะต้องทำการวิเคราะห์ซ้ำทั้งชุด
- 9.6 กรณีตัวอย่างมีความเข้มข้นของ Amphetamine, Methamphetamine, 3,4-Methylenedioxymethamphetamine, 3,4-Methylenedioxeneamphetamine และ 3,4-Methylenedioxeneethamphetamine เกิน 1,500 ng/ml นักวิเคราะห์จะต้องทำการวิเคราะห์ซ้ำ ด้วยการเจือจางตัวอย่างกับ certified drugs free urine ที่ระดับ 1:1 หรือ 1:4 หรือ 1:9 หรือลดปริมาณการฉีดเป็น 1 หรือ 2.5 μ l ตามเหมาะสม เพื่อให้ความเข้มข้นของสารอยู่ในช่วงของ calibration curve คือ 300 - 2,500 ng/ml และ 300 - 1,500 ng/ml ตามลำดับ



10. รายละเอียดอื่นๆ

- 10.1 วิธีนี้ใช้สำหรับตรวจหา Amphetamine, Methamphetamine, 3,4 Methylene dioxy methamphetamine, 3,4-Methylene\dioxieneamphetamine และ 3,4-Methylene dioxieneethamphetamine ในปัสสาวะเท่านั้น หากนำไปประยุกต์ สำหรับตรวจในตัวอย่างอื่นๆ ไม่ใช่ปัสสาวะ จะต้องทำการ ทวนสอบ (verify) ก่อน
- 10.2 การตรวจยืนยันด้วยเทคนิค LC-MS ตัวอย่างปัสสาวะควรทำการตรวจเบื้องต้น โดยใช้หลักการภูมิคุ้มกันวิทยา โดยพิจารณา ดังนี้
 - กรณีให้ผลบวกหรือให้ผลบวกไม่ชัดเจน ต้องทำการตรวจยืนยันผลทุกตัวอย่าง
 - กรณีให้ผลลบ จะไม่ทำการตรวจยืนยันผล ยกเว้น กรณีร้องขอพิเศษ หรือ ต้องการทำเพื่อยืนยันผลลบ เป็นต้น
- 10.3 การเตรียมสารมาตรฐาน และสารเคมี สามารถเตรียมตามปริมาตรที่ต้องการได้ แต่ ความเข้มข้นต้องเป็นไปตามที่กำหนด
- 10.4 กรณีต้องการตรวจวิเคราะห์เฉพาะ Amphetamine และ Methamphetamine สามารถฉีดสารมาตรฐานแค่ 2 ตัวได้ เช่นเดียวกัน กรณีต้องการตรวจวิเคราะห์ เฉพาะ MDA, MDMA, MDE สามารถฉีดสารมาตรฐานแค่ 3 ตัว
- 10.5 กรณีใช้วิธีนี้เพื่อตรวจพิสูจน์สาร และพบว่าพื้นที่ใต้พีคของสารที่สนใจมากเกินกว่า พื้นที่ใต้พีคของความเข้มข้นสูงสุดของ calibration curve ไม่จำเป็นต้องทำการ เจือจางตัวอย่าง
- 10.6 กรณีตัวอย่างวิเคราะห์มีอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคต่อ IS ของ Am มากกว่า 40.4 M มากกว่า 12.7 MDA มากกว่า 8.3 MDMA มากกว่า 34.1 และ MDE มากกว่า 41.3 ตัวอย่างที่วิเคราะห์ถัดจากตัวอย่างวิเคราะห์ดังกล่าวต้องวิเคราะห์ซ้ำ

2.6 การตรวจปริมาณกัญชาในปัสสาวะโดย ด้วยเทคนิค Gas Chromatography – Massspectrometry (GC-MS)

1. ขอบข่าย (Scope)

เป็นวิธีมาตรฐานในการปฏิบัติงานตรวจพิสูจน์ยืนยันผลกัญชาในปัสสาวะ

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

- 2.1 รวมกฎหมายยาเสพติด พร้อมด้วย กฎกระทรวง ระเบียบ ข้อบังคับ ที่เกี่ยวข้อง, สำนักงานป้องกันและปราบปรามยาเสพติด กระทรวงยุติธรรม พ.ศ. ๒๕๕๒, หมายเลขเอกสารเผยแพร่ ๑-๐๙-๒๕๕๒, ๒๖-๒๗.
- 2.2 ความผิดและโทษเกี่ยวกับกฎหมายยาเสพติด, กองนิติการ สำนักงานป้องกันและปราบปรามยาเสพติด สำนักงานกฤษฎีกา, หมายเลขเอกสารเผยแพร่ 02-07-2543; 12-16.
- 2.3 Anthony C Moffat, M David Osselton and Brian Widdop, Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. Third edition, Volume 2, Pharmaceuticals Press London, 2004; 1228-1229, 1254-1258.
- 2.4 Recommended Method for the Detection and Assay of Heroin, Cannabinoids, Cocaine, Amphetamine, Methamphetamine and Ring-Substituted Amphetamine Derivative in Biological Specimens, UNITED NATIONS New York, 1995; 59-70.
- 2.5 Varian. Toxicology Manual Confirmation of Drugs of Abuse in Urine with Ion-Trap GC-MS, Varian, Inc, 2001; 5-18.

3. หลักการ (Principle)

พืชกัญชา (Marijuana) มีสารออกฤทธิ์ที่สำคัญอยู่หลายชนิด เช่น Tetrahydrocannabinol (THC), Cannabidiol (CBD), Cannabinol (CBN) แต่สารที่พบในปริมาณสูงและมีฤทธิ์ต่อสมองคือ THC ซึ่งพบมากในยางกัญชา (Hashish) สารนี้เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะถูกทำลายที่ตับ และเปลี่ยนเป็นสาร 11-Nor-delta 9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid (11-Nor-D⁹-THC-COOH หรือ 9-Carboxy-THC; THCA) ซึ่งจะถูกขับออกทางปัสสาวะจะอยู่ในรูป conjugate คือ THCA-glucuronide กรณีเสปเป็นประจำสามารถตรวจพบในปัสสาวะได้นานถึง 30 วัน



การแยกสารดังกล่าวโดยอาศัยหลักการ GC-MS ซึ่งอาศัยหลักการแยกสารผสมออกจากกัน โดยอาศัยคุณสมบัติความสามารถในการกลายเป็นไอ การละลาย และการดูดซับที่แตกต่างกันของสารแต่ละชนิดในคอลัมน์ ในอุณหภูมิและเวลาที่ต่างกันโดยใช้เครื่อง gas chromatography แล้วใช้ mass spectrometry ในการทำให้สารที่แยกได้แตกตัวเป็นไอออน (ion fragment) แล้วศึกษา รูปแบบการแตกตัวของสารนั้นๆ เทียบกับสารมาตรฐานที่เตรียมขึ้นเอง หรือฐานข้อมูลใน software ของเครื่อง MS database เช่น Wiley, NIST เป็นต้น การหาปริมาณสารจะขึ้นกับความสูงของพีค (peak abundance) และพื้นที่ใต้พีค (peak area) เปรียบเทียบกับความสูงพีคหรือพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน

4. เครื่องมือ และอุปกรณ์ (Apparatus)

4.1 เครื่องมือ

- 4.1.1 เครื่อง analytical balance ชนิดทศนิยมไม่น้อยกว่า 4 ตำแหน่ง
- 4.1.2 เครื่อง centrifuge high speed ความเร็วไม่ต่ำกว่า 2,000 รอบต่อนาที
- 4.1.3 เครื่อง evaporator with nitrogen พร้อม needle
- 4.1.4 เครื่อง heating block พร้อม เทอร์โมมิเตอร์
- 4.1.5 เครื่อง vacuum manifold พร้อม vacuum pump
- 4.1.6 เครื่อง vortex mixer

4.2 เครื่องแก้วและอุปกรณ์

- 4.2.1 micropipette และ micropipette tips ขนาด 50-200 μ l และ 1-5 ml
- 4.2.2 positive pipette ขนาด 10, 25, 50, 100, 250, 1000 μ l
- 4.2.3 solid phase extraction (SPE) ชนิด OASIS MAX cartridge 3 ml/60 mg หรือเทียบเท่า
- 4.2.4 vial ขนาด 2 ml พร้อม insert ขนาด 50-200 μ l



5. สารเคมี (Reagent)

5.1 สารเคมีทั่วไป

- 5.1.1 Acetic acid glacial (AR grade)
- 5.1.2 Acetonitrile (AR grade)
- 5.1.3 Bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide with 1 %
trimethylchlorosilane (AR grade)
- 5.1.4 Certified drugs free urine
- 5.1.5 Ethyl acetate (AR and HPLC grade)
- 5.1.6 Methanol (AR and HPLC grade)
- 5.1.7 Potassium dihydrogen phosphate (AR grade)
- 5.1.8 Potassium hydroxide (AR grade)
- 5.1.9 น้ำกรอง (Distilled Water type II)

5.2 สารมาตรฐาน

มีใบรับรองผลการตรวจวิเคราะห์ (certificate of analysis ; COA)

- 5.2.1 11-Nor- Δ^9 -THC -COOH หรือ 9-Carboxy-THC; THCA





6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

6.1 การเตรียมสารเคมี

6.1.1 10.0 N KOH

- ชั่ง KOH 56.106 g ละลายด้วยน้ำกรอง ในขวดปริมาตรขนาด 100 ml ปริมาตรด้วยน้ำกรอง
- เขย่าขวดเบาๆ เพื่อผสมให้เข้ากัน
- เก็บไว้ในขวดพลาสติก ที่อุณหภูมิห้อง อายุการใช้งาน 1 ปี

6.1.2 50% Acetic acid (V/V)

- ตวง Glacial acetic acid 50 ml และน้ำกรอง 250 ml เทผสมรวมกัน
- เขย่าขวดเบาๆ เพื่อผสมให้เข้ากัน
- เก็บไว้ในขวดแก้ว ที่อุณหภูมิห้อง อายุการใช้งาน 1 ปี

6.1.3 50% Methanol (V/V)

- ตวง Methanol (AR) 250 ml และน้ำกรอง 250 ml เทผสมรวมกัน
- เขย่าขวดเบาๆ เพื่อผสมให้เข้ากัน
- เก็บไว้ในขวดแก้ว ที่อุณหภูมิห้อง อายุการใช้งาน 1 ปี

6.1.4 0.1M KH_2PO_4

- ชั่ง KH_2PO_4 1.36 g ละลายด้วยน้ำกรองในขวดปริมาตร 100 ml
- เขย่าขวดเบาๆ เพื่อผสมให้เข้ากัน
- เก็บไว้ในขวดแก้ว ที่อุณหภูมิห้อง อายุการใช้งาน 1 ปี

6.1.5 Hexane : Ethyl acetate (AR) : Glacial acetic acid (49 : 49 : 2)

- ตวง Hexane 49 ml, Ethyl acetate 49 ml และ Glacial acetic acid 2 ml เทผสมรวมกัน
- เขย่าขวดเบาๆ เพื่อผสมให้เข้ากัน
- เก็บไว้ในขวดแก้ว ที่อุณหภูมิห้อง อายุการใช้งาน 1 ปี

หมายเหตุ ห้ามใช้สารละลาย เมื่อพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพและทางเคมี

6.2 การเตรียมสารมาตรฐาน

6.2.1 Stock standard-THCA100 : เตรียมมาตรฐานความเข้มข้น 100 µg/ml ใน Methanol (HPLC)

- ละลาย THCA 1 mg/ml in Methanol 1 ml ในขวดปริมาตรขนาด 10 ml ปรับปริมาตรด้วย Methanol (HPLC grade)

6.2.2 Working standard (WS) เตรียมสารละลายมาตรฐานเจือจาง จาก ข้อ 6.2.1 ความเข้มข้น 0.75, 1.00, 1.50, 2.00, 2.50, 5.00, 7.50, 10.00, 11.00, 15.00 µg/ml ใน Methanol (HPLC grade) ดังตาราง

WS for	Working standard	THCA 1000 ug/ml volume taken (ul)	THCA 100 ug/ml volume taken (ul)	final volume in methanol (HPLC) (ml)	final Conc. (ug/ml)
PC1	WS 0.75	0	75	10	0.75
PC2	WS 1.50	0	150	10	1.50
PC3	WS 2.50	0	250	10	2.50
PC4	WS 5.00	50	0	10	5.00
PC5	WS 7.50	75	0	10	7.50
PC6	WS 10.00	100	0	10	10.00
PC7	WS 15.00	150	0	10	15.00
QCL	WS 1.00	0	100	10	1.00
QCM	WS 2.00	0	200	10	2.00
QCH	WS 11.00	110	0	10	11.00





6.3 เตรียม QC และ PC Sample

6.3.1 เตรียม reference standard (SS): สำหรับฉีดหาตำแหน่ง retention time reference spectra และ system suitability

ดูดสารละลายมาตรฐาน Working standard (WS 2.50) 40 μ l เป่าแห้ง ด้วย N_2 นำไปทำ derivatize ตามข้อ 6.6.7

6.3.2 negative control (NC)

6.3.3 ใช้ certified drugs free urine

6.3.4 PC และ QC Sample

เตรียม spiked urine ที่ความเข้มข้นในต่างๆ ชนิดละ 2 ml ดังตาราง

วิธีเตรียม SS, NC, PC, QC sample

SS/NC/PC/QC/ sample (s)	Working standard	volume taken (ml)	certified drugs free urine (ml)	final conc. THC (ng/ml)
Reference standard (SS)	WS 2.50	40	0	-
NC	None	0	2000	0
PC1: PC 15	WS 0.75	40	1900	15
PC2: PC 30	WS 1.50	40	1900	30
PC3: PC 50	WS 2.50	40	1900	50
PC4: PC 100	WS 5.00	40	1900	100
PC5: PC 150	WS 7.50	40	1900	150
PC6: PC 200	WS 10.00	40	1900	200
PC7: PC 250	WS 15.00	40	1900	300
QCL 20	WS 1.00	40	1900	20
QCM 40	WS 2.00	40	1900	40
QCH 220	WS 11.00	40	1900	220
Sample(s)	-	-	2000	X

หมายเหตุ

1. reference standard (SS) มีค่าความเข้มข้นของสารเทียบเท่าสารเป้าหมายที่ cut off เมื่อใช้ปัสสาวะ 5 ml
2. PC1 – PC7 ต้องมีความเข้มข้นที่ค่า cut off เสมอ และมีความเข้มข้นอื่นๆ ครอบคลุมค่าสูง กลาง ต่ำ ของค่า cut off
3. QC sample มีค่าความเข้มข้นที่แตกต่างจากตัวอย่างที่ทำ calibration curve

6.4 เตรียมวัสดุ/อุปกรณ์

- 6.4.1 เบิกตัวอย่างปัสสาวะออกจากตู้เย็นวางไว้ให้มีอุณหภูมิห้องเท่าหรือใกล้เคียงอุณหภูมิห้องก่อนทำการวิเคราะห์
- 6.4.2 เขียนเลขลำดับตัวอย่างปัสสาวะหรือเลขที่ตัวอย่าง, NC, PC, QC sample บนวัสดุอุปกรณ์ที่ต้องใช้ เช่น test tube, SPE cartridge, vial เป็นต้น
- 6.4.3 เปิดเครื่อง heating block ตั้งอุณหภูมิประมาณ 60 °C โดยใส่เทอร์โมมิเตอร์ไว้ช่องสำหรับใส่เทอร์โมมิเตอร์

6.5 การเตรียมตัวอย่าง (pretreatment)

- 6.5.1 ดูดตัวอย่างปัสสาวะ/NC/ PC /QC sample 5 ml. ใส่ใน test tube
- 6.5.2 เติม 10.0 N KOH 50 μ l เขย่าด้วย vortex mixer ประมาณ 1 นาที นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 15 นาที นำออกมาวางที่อุณหภูมิห้อง
- 6.5.3 เติม 50% Acetic acid 50 μ l เติม 0.1M KH_2PO_4 200 μ l และเติม Aetonitrile 1 ml เขย่าด้วย vortex mixer ประมาณ 1 นาที

6.6 การสกัดตัวอย่าง (extraction) ใช้สารเคมีชนิด AR grade

มีขั้นตอนดังนี้

6.6.1 condition column

- เติม Methanol 2 ml
- เติม น้ำกรอง 2 ml

6.6.2 load sample

เทตัวอย่างจากข้อ 10.5 ลงใน SPE column ปล่อยให้ไหลจนหมด โดยให้อัตราการไหลประมาณ 1-2 ml/นาที



6.6.3 wash column

- เติม Water : Methanol (50 : 50) 3 ml
- เติม Hexane 3 ml.

6.6.4 dry column

- เป่า column ให้แห้งด้วย N_2 ประมาณ 5 นาที

6.6.5 elute sample

- เติม Methanol 1.5 ml ปล่อยให้ไหลจนหมด
- Elute เข้าด้วย Methanol 0.5 ml

6.6.6 dry และ concentrate sample

- นำตัวอย่างที่ elute ไประเหยให้แห้งด้วย N_2

6.6.7 derivatization

- เติม Ethyl acetate (HPLC grade) 50 μ l และ BSTFA with 1% TMCS 50 μ l ปิดจุก tube แล้วพันทับด้วย paraffin เพื่อป้องกันแรงดันจากการขยายตัวของสารจากความร้อน
- นำไปใส่ใน heating block ที่ 75 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 25 นาที

6.6.8 นำออกจาก heating block ตั้งไว้ให้เย็นเท่าหรือใกล้เคียงอุณหภูมิห้อง ถ่ายใส่ vial ขนาด 2 ml ที่มี insert ขนาด 50-200 μ l

7. วิธีดำเนินการ (Procedure)

7.1 นำสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS ตามสถานะดังนี้

Column : HP-5ms; 30M, 0.25mm ID, DF 0.25 หรือเทียบเท่า

Flow rate : He 2.0 ml/minute

Injection mode : 1 ml, splitless

MS mode : EI SCAN 50-500 amu หรือกว้างกว่า,
SIM 371, 473, 474, 488, 489

Library : NIST, Wiley, MPW2007 หรือมากกว่า

Oven Temperature: เริ่มต้นไม่สูงกว่า 150 $^{\circ}$ C จนถึงไม่ต่ำกว่า 310 $^{\circ}$ C

7.2 ลำดับการฉีดตัวอย่าง

- 7.2.1 ตัวทำละลาย 3 เข้ม เพื่อตรวจสอบ baseline และ noise
- 7.2.2 system suitability test โดยฉีดสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นเท่ากับ PC50 จำนวน 5 เข้ม
- 7.2.3 calibration solutions ประกอบด้วย blank sample, zero sample และ PC1-7
- 7.2.4 ตัวอย่างและ QC samples (QCL, QCM, QCH) แทรกสลับกันไปอย่างสม่ำเสมอจนครบชุดการตรวจวิเคราะห์
- 7.2.5 จำนวนตัวอย่างในแต่ละชุดการตรวจวิเคราะห์ไม่ควรเกิน 70 ตัวอย่าง (กำหนดตาม autosampler stability ที่ 18 ชั่วโมง)
- 7.2.6 กรณีมีตัวอย่างเกิน 70 ตัวอย่าง จะต้องเตรียม calibration solution และ QC sample พร้อมฉีดตัวอย่างเป็นชุดการฉีดใหม่

7.3 Detection & Identification

7.3.1 ดูค่า mass spectrum, RT, peak area ดังนี้

Mass spectrum (Q, Q1, Q2)*	371, 473, 488
RT**	8.35
Peak area ของ PC 50	>100,000

*Q = Quantitation ion, Q1 = Qualifier ion 1, Q2 = Qualifier ion 2

**ค่า RT อาจมีการเปลี่ยนแปลง ขึ้นอยู่กับความยาวของคอลัมน์และ oven temperature ที่ใช้ ทั้งนี้ให้เทียบกับ RT ของ standard ที่ฉีดหาค่า system suitability ในวันที่ทำการวิเคราะห์

7.3.2 ดูค่า mass spectrum และ RT ของตัวอย่างเทียบกับ positive control



8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and report)

- 8.1 คำนวณสมการเส้นตรงเพื่อสร้าง calibration curve จากข้อมูล PC 7 ความเข้มข้นโดยใช้ excel

$$Y = aX + b$$

โดย slope; a: = SLOPE (known_y's, known_x's)
y-intercept; b: = INTERCEPT (known_y's, known_x's)
Correlation coefficient; r: = CORREL (known_y's, known_x's)
R-squared; r²: = RSQ (known_y's, known_x's)

- 8.2 คำนวณส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation: SD)

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

โดย x = ค่าของข้อมูล
 $\bar{x}$ = ค่ากลางของข้อมูล
n = จำนวนข้อมูล

- 8.3 คำนวณสัมประสิทธิ์แห่งความแปรผัน (coefficient of variation: CV)

$$\%CV = \frac{SD \times 100}{\bar{x}}$$

- 8.4 Back-calculated value, %RD

$$\%RD = \frac{(\text{ความเข้มข้นที่คำนวณได้จาก curve} - \text{ความเข้มข้นจริง}) \times 100}{\text{ความเข้มข้นจริง}}$$

- 8.5 การรายงานผล

- 8.5.1 ตัวอย่างที่รายงาน “ตรวจพบแคนนาบินอยด์” ต้องมีลักษณะดังนี้

- 8.5.1.1 มี mass spectrum และ มี RT ตรงกับ PC ของ THCA
8.5.1.2 มีพื้นที่ใต้พีคของ THCA ต้องเท่ากับหรือมากกว่า PC ที่ความเข้มข้น 50 ng/ml
8.5.1.3 เมื่อคำนวณผลโดยใช้ calibration curve ได้ค่าเท่ากับหรือมากกว่า 50 ng/ml

8.5.2 ตัวอย่างที่รายงาน “ตรวจไม่พบแคนนาบินอยด์” ต้องมีลักษณะดังนี้

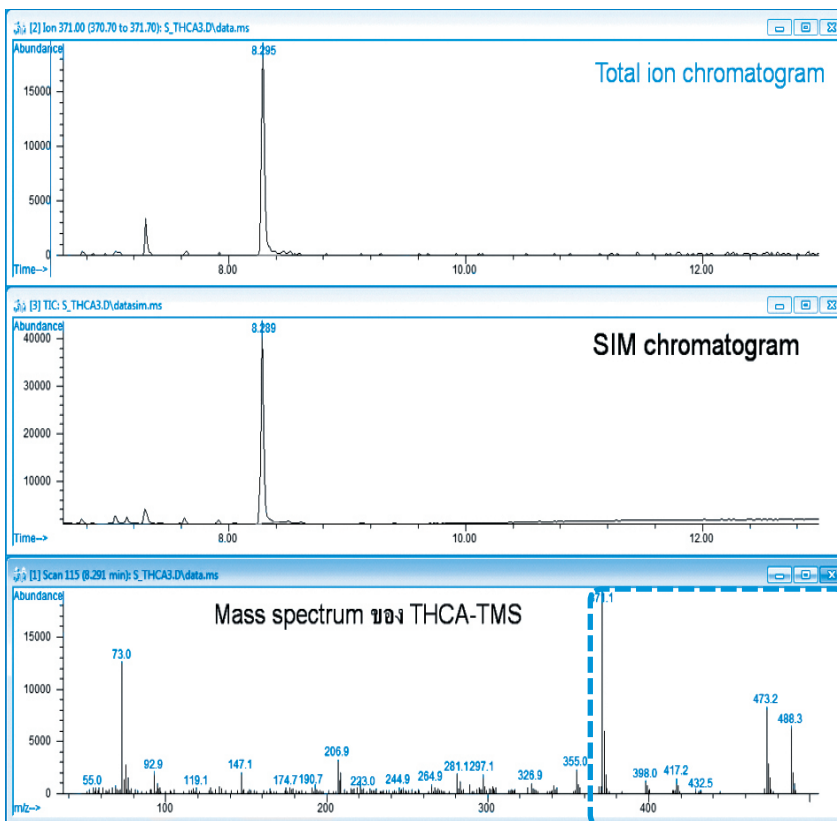
- 8.5.2.1 ตัวอย่างที่รายงานตรวจไม่พบ mass spectrum และ มี RT ตรงกับ PC ของ THCA
- 8.5.2.2 ตัวอย่างที่มีลักษณะเป็นไปตามข้อ 8.4.1.1 แต่ไม่เป็นไปตามข้อ 8.4.1.2 และ 8.4.1.3

9. การควบคุมคุณภาพและผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

- 9.1 การตรวจตรวจวิเคราะห์ ต้องทำ NC, PC และ QC ทุกครั้ง
- 9.2 system suitability test พิจารณาค่า %CV ของ response ไม่เกิน 15 และ RT คลาดเคลื่อนไม่เกิน 2 %
- 9.3 calibration curve พิจารณาค่า %RD โดย 75 % ของระดับความเข้มข้นทั้งหมด (หรืออย่างน้อย 6 ระดับความเข้มข้น) ต้องมีค่า %RD ไม่เกิน 15 ยกเว้นที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด %RD ไม่เกิน 20 สำหรับระดับความเข้มข้นที่ไม่ผ่านนั้นต้องไม่ใช่ระดับความเข้มข้นสูงสุดหรือต่ำสุดของ calibration curve จึงจะสามารถตัดทิ้ง และไม่นำไปใช้ในการคำนวณค่า r และสมการเชิงเส้นได้
- 9.4 ค่า r ของ calibration curve ไม่น้อยกว่า 0.950
- 9.5 QC sample พิจารณาค่า %RD โดย 4 ใน 6 (67 %) ของ QC samples ทั้งหมด ควรมีค่าไม่เกิน 15 และ 2 ใน 6 (33 %) ของ QC samples ที่ไม่ผ่านต้องไม่ใช่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน
- 9.6 ค่า RT ตลอดชุดการวิเคราะห์ (batch) ต้องคลาดเคลื่อนไม่เกิน 2 %
- 9.7 ion ratio ของ Q/Q1 และ Q/Q2 ต้องอยู่ในช่วง lower และ upper limit
- 9.8 กรณีที่การวิเคราะห์ชุดนั้นๆ ไม่ผ่านเกณฑ์การควบคุมคุณภาพ ต้องทำการวิเคราะห์ซ้ำทั้งชุด

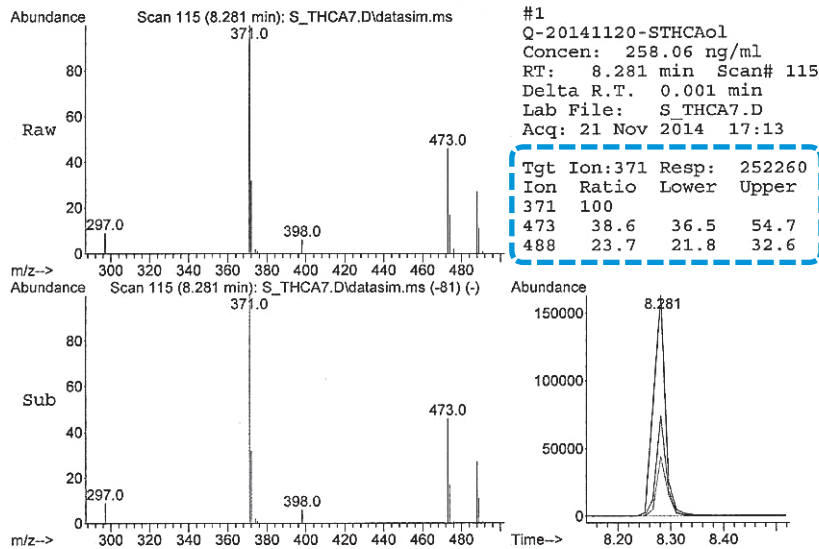
10. รายละเอียดอื่นๆ

- 10.1 ความไวของวิธี 15 ng/ml เมื่อใช้ปัสสาวะ 2 ml
- 10.2 วิธีทดสอบนี้ใช้สำหรับการตรวจหา THCA ในตัวอย่างปัสสาวะเท่านั้น หากใช้กับตัวอย่างชนิดอื่นๆ ต้องทำการทวนสอบวิธีก่อน
- 10.3 การเตรียมตัวอย่างหากจำเป็นต้องหยุดกระบวนการ ควรหยุดเมื่อกระบวนการสกัดตัวอย่างสิ้นสุดแล้ว คือช่วงก่อนการทำ derivatized
- 10.4 ตัวอย่างที่ derivatized แล้วสามารถเก็บในตู้เย็น โดยเก็บได้ไม่เกิน 1 สัปดาห์
- 10.5 การเตรียมสารละลายมาตรฐานและสารเคมี สามารถเตรียมตามปริมาตรที่ต้องการได้ แต่ความเข้มข้นต้องเป็นไปตามที่กำหนด
- 10.6 ตัวอย่างรูปภาพแสดง chromatogram และ mass spectrum ของ THCA



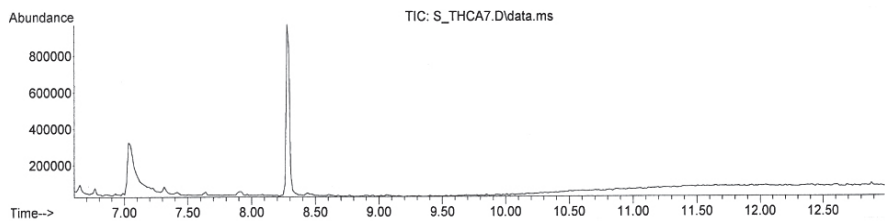


10.7 ตัวอย่างรูปภาพแสดงการดูค่า ion ratio ของ Q/Q1 และ Q/Q2

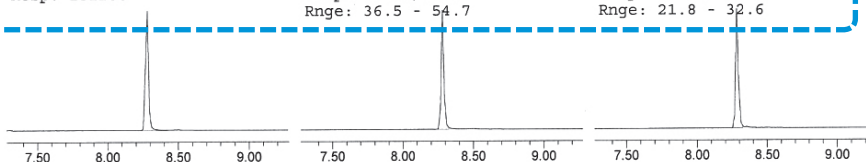


Quantitation Report (Not Reviewed)

Data Path : D:\DATA\DATA2014\MV_THCA\20141120\
Data File : S_THCA7.D
Acq On : 21 Nov 2014 17:13
Operator : angkana
Sample : S_THCA7
Misc :
ALS Vial : 63 Sample Multiplier: 1



Q-20141120-STHCAo1	Amount:	258.06 ng/ml
Ion: 371 (8.281)	Ion: 473 (8.281)	Ion: 488 (8.281)
Resp: 252260	Resp: 97436/38.6	Resp: 59868/23.7
	Rnge: 36.5 - 54.7	Rnge: 21.8 - 32.6





2.7 การตรวจปริมาณมอร์ฟินในปัสสาวะโดย ด้วยเทคนิค Gas Chromatography – Massspectrometry (GC-MS)

1. ขอบข่าย (Scope)

เป็นวิธีมาตรฐานในการปฏิบัติงานตรวจพิสูจน์ยืนยันผลมอร์ฟินในปัสสาวะ

2 เอกสารอ้างอิง (Reference)

- 2.1 รวมกฎหมายยาเสพติด พร้อมด้วย กฎกระทรวง ระเบียบ ข้อบังคับ ที่เกี่ยวข้อง, สำนักงาน ป.ป.ส. กระทรวงยุติธรรม พ.ศ. ๒๕๕๒, หมายเลขเอกสารเผยแพร่ ๑-๐๙-๒๕๕๒, ๒๖-๒๗.
- 2.2 Anthony C Moffat, M David Osselton and Brian Widdop. Clarke's Analysis of drugs and Poisons, Third edition, Volume 2, London : The Pharmaceuticals Press, 2004, 1302-1305.
- 2.3 MICHAEL D. COLEMAN, Human Drug Metabolism AN INTRODUCTION, WILEY, 2007, 225-230.
- 2.4 United Nation. Recommended Method for the Detection and Assay of Heroin Cannabinoids Cocaine Amphetamine and Ring substituted Amphetamine Derivatives in Biological Specimens, Manual for Use by Nation Laboratories, ST/NAR/27. New York : United Nation, 1995, 15-29.
- 2.5 Varian. Toxicology Manual Confirmation of Drugs of Abuse in Urine with Ion - Trap GC-MS, Varian, Inc, 2001, 28-40.

3. หลักการ (Principle)

มอร์ฟินและเฮโรอีน เป็นสารที่อยู่ในกลุ่ม Opiates ซึ่งหมายถึง กลุ่มยาที่ได้มาจากฝิ่นและอนุพันธ์ของฝิ่น รวมถึง Alkaloids ที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย มอร์ฟินเป็น Alkaloids ที่สำคัญที่สุดของฝิ่น และเป็นตัวยาหลักของกลุ่ม Opiates มีฤทธิ์แรงกว่าฝิ่น 8-10 เท่า เป็นผลึกสีขาว เป็นเม็ด เป็นผง หรือเป็นก้อนหรือละลายบรรจุหลอดสำหรับฉีด ไม่มีกลิ่น รสขม เสพติดได้ง่าย เฮโรอีนเป็นยาเสพติดที่ร้ายแรงที่สุด สังเคราะห์จากฝิ่นหรือจากมอร์ฟิน เฮโรอีนออกฤทธิ์แรงกว่ามอร์ฟินประมาณ 4-8 เท่า และออกฤทธิ์แรงกว่าฝิ่น ประมาณ 30-90 เท่า มีฤทธิ์ระงับปวดมากกว่ามอร์ฟินแต่ระยะเวลาในการออกฤทธิ์สั้นกว่า

เฮโรอีนเมื่อเข้าสู่ร่างกายแล้วจะทำปฏิกิริยากับกรดกลูโคโรนิก (Glucuronic acid) ได้เป็นกลูโคโรนไนด์ (Glucuronide) ซึ่งจะถูกขับออกทางปัสสาวะ กรณีที่เสฟเฮโรอีนเมื่อเข้าสู่กระแสโลหิตจะเมตาบอไลต์เปลี่ยนเป็น 6-O-Monoacetylmorphine (6-O-MAM) อย่างรวดเร็ว ภายใน 3-20 นาที หลังจากนั้นจะค่อยๆ เปลี่ยนเป็นมอร์ฟีนภายใน 1-3 ชั่วโมง และจะถูกขับออกทางปัสสาวะในรูปของ Morphine-3-O-Glucuronide 38.2%, Morphine 4.2%, 6-O-MAM 1.3% และ Heroin 0.1% ดังนั้นในทางปฏิบัติการตรวจปัสสาวะผู้เสฟเฮโรอีนจะตรวจในรูปมอร์ฟีนเช่นเดียวกับผู้เสฟมอร์ฟีน กรณีเสฟมอร์ฟีน จะถูกเมตาบอไลต์ให้อยู่ในรูป 3- และ 6-Glucuronides เป็นส่วนใหญ่ และน้อยกว่า 10% พบในรูปมอร์ฟีน และพบโคเดอีนน้อยกว่า 1%

การตรวจหาสารดังกล่าวโดยใช้ GC-MS เป็นการแยกสารผสมออกจากกัน โดยอาศัยคุณสมบัติความสามารถในการกลายเป็นไอ การละลาย และการดูดซับที่แตกต่างกันของสารแต่ละชนิดในคอลัมน์ ในเวลาและอุณหภูมิที่ต่างกันโดยใช้เครื่อง gas chromatography ใช้ mass spectrometry ในการทำให้สารที่แยกได้แตกตัวเป็นไอออน แล้วศึกษาารูปแบบการแตกตัว (mass spectrum) ของสารนั้นๆ เทียบกับ mass spectrum สารมาตรฐานที่เตรียมขึ้นเอง หรือ mass spectrum ของสารมาตรฐานที่เก็บอยู่ใน MS database เช่น Wiley หรือ NIST ความสูงของพีค (peak height) และพื้นที่ใต้พีค (peak area) ขึ้นอยู่กับปริมาณสารนั้นๆ ในตัวอย่าง

4. เครื่องมือ และอุปกรณ์ (Apparatus)

4.1 เครื่องมือ

4.1.1 เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์ (GC-MS)

4.1.2 GC Column HP-5MS 19091S-433 325 °C 30 m x 250 μ m x 0.25 μ m

4.1.3 เครื่องเตรียมตัวอย่างอัตโนมัติ

4.1.4 เครื่องผสมสำหรับหลอดทดลอง (vortex mixer)

4.1.5 เครื่องระเหยแห้ง (evaporator with nitrogen)

4.1.6 เครื่องให้ความร้อนแก่หลอดทดลอง (heating block)

4.1.7 ตู้อบ (hot air oven)

4.2 เครื่องแก้วและอุปกรณ์

4.2.1 solid phase extraction (SPE) ชนิด DSC-MCAX หรือเทียบเท่า

4.2.2 micropipette และ micropipette tips ขนาด 50-200 μ l และ 1-5 ml



- 4.2.3 positive pipette และ pipette tips ขนาด 10, 50, 100, 250, 1000 μ l
- 4.2.4 ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 5, 10 ml
- 4.2.5 กระดาษกรองชนิด nylon ขนาดรูพรุน 0.2 μ l
- 4.2.6 กระบอกตวงขนาด 1000 ml
- 4.2.7 ปีกเกอร์ขนาด 1000 ml
- 4.2.8 microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml
- 4.2.9 หลอดแก้วกันไค้งมนสำหรับทำ derivatization

5. สารเคมี (Reagent)

5.1 สารเคมีทั่วไป

AR grade

5.1.1 Ammonium hydroxide

5.1.2 Hydrochloric acid

5.1.3 Formic acid

5.1.4 TMS (N,O-bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide BSTFA with
1 % trimethylchlorosilane TMCS)

5.1.5 Distilled water type II; dH_2O

5.1.6 Certified drugs free urine

HPLC grade

5.1.7 Acetonitrile

5.1.8 Ethyl acetate

5.1.9 Methanol



5.2 สารมาตรฐาน

มีใบรับรองผลการตรวจวิเคราะห์ (certificate of analysis; COA)

มีความบริสุทธิ์มากกว่า % ที่กำหนด หรือเทียบเท่า

5.2.1 Codeine phosphate > 97 % as is

5.2.2 Morphine sulfate > 99 % as is

5.2.3 Deuterate morphine > 99 % as is

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

6.1 เตรียมสารเคมี

6.1.1 50 % Ammonium hydroxide

- ตวง 50 ml ของ Ammonium hydroxide (29.7 %) ใน volumetric flask ขนาด 100 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกรอง
- เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลาการเก็บรักษา 1 สัปดาห์

6.1.2 10 % Ammonium hydroxide

- ตวง 10 ml ของ ammonium hydroxide (29.7%) ใน volumetric flask ขนาด 100 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกรอง
- เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลาการเก็บรักษา 1 สัปดาห์

6.1.3 5% Methanol

- ปิเปต 5 ml ของ methanol ใน volumetric flask ขนาด 100 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกรอง
- เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลาการเก็บรักษา 3 เดือน

6.1.4 2 % Formic acid in 5 % Metanol

- ปิเปต 2 ml ของ Formic acid ใน volumetric flask ขนาด 100 ml ปรับปริมาตรด้วย 5 % Methanol
- เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลาการเก็บรักษา 1 เดือน

6.1.5 40 % Acetonitrile in Metanol

- ตวง 40 ml ของ acetonitrile ใน volumetric flask ขนาด 100 ml ปรับปริมาตรด้วย Metanol
- เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลาการเก็บรักษา 3 เดือน



6.1.6 5 % Ammonium hydroxide in 40% Acetonitrile in Metanol

- ปิเปต 5 ml ของ Ammonium hydroxide (29.7 %) ใน volumetric flask ขนาด 100 ml ปรับปริมาตรด้วย 40 % Acetonitrile in Metanol
- เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

6.2 เตรียมสารละลายมาตรฐาน

6.2.1 สารละลายมาตรฐาน Morphine (อายุการใช้ 1 ปี) เก็บไว้ในตู้เย็น 2- 8 °C

- stock standard (SM1000) : เตรียมสารละลายมาตรฐาน Morphine ความเข้มข้น 1 mg/ml ใน Methanol (HPLC grade) จำนวนในรูปเบส
- intermediate stock solution (SM100) : ปิเปต 1 ml. ของ SM1000 ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 ml. ปรับปริมาตรด้วย Methanol (HPLC grade)

6.2.2 สารละลายมาตรฐาน Codeine (อายุการใช้ 1 ปี) เก็บไว้ในตู้เย็น 2 - 8 °C

- stock standard (SC1000) : เตรียมสารละลายมาตรฐาน Codeine ความเข้มข้น 1 mg/ml ใน Methanol (HPLC grade) จำนวนในรูปเบส
- intermediate stock solution (SC100) : ปิเปต 1 ml ของ SC1000 ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 ml ปรับปริมาตรด้วย Methanol (HPLC grade)

6.2.3 สารละลายมาตรฐาน Deuterate morphine (อายุการใช้ 1 ปี) เก็บไว้ในตู้เย็น 2 - 8 °C

- stock standard (IS1000) : เตรียมสารละลายมาตรฐาน ดิวเทอเรต มอร์ฟีน ความเข้มข้น 1 mg/ml ใน Methanol (HPLC grade) จำนวนในรูปเบส
- intermediate stock solution (IS100) : ปิเปต 1 ml ของ IS1000 ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 ml ปรับปริมาตรด้วย Methanol (HPLC grade)

6.2.4 Working standard solution (for spiked urine) (WS) (อายุการใช้ 1 ปี) เก็บไว้ในตู้เย็น 2 - 8 °C



เตรียม 7 WS ใน Methanol (HPLC grade) สำหรับ spiked urine calibration curve ดังตาราง:

WS	WS Conc. (ng/ml)	SC100 taken (μ l)	SM100 taken (μ l)	final volume (μ l)
WS1	3,000	30	30	1,000
WS2	4,500	45	45	1,000
WS3	7,500	75	75	1,000
WS4	9,000	90	90	1,000
WS5	13,500	135	135	1,000
WS6	18,000	180	180	1,000
WS7	36,000	360	360	1,000

* system suitability solution : ปิเปต 100 μ l ของ WS4 ใส่ในหลอดทดลองแล้วนำไประเหยแห้ง จากนั้นนำไปทำ derivatization

6.2.5 spiked urine calibration (CS)

CS	Vol. taken (μ l)	from	certified drugs free urine (μ l)	final conc. (ng/ml)
CS1	100	WS1	2,900	100
CS2	100	WS2	2,900	150
CS3	100	WS3	2,900	250
CS4	100	WS4	2,900	300
CS5	100	WS5	2,900	450
CS6	100	WS6	2,900	600
CS7	100	WS7	2,900	1,200

* เตรียม certified drugs free urine 3 ml 2 ขวด และ CS อย่างละ 1 ขวด





6.2.6 working standard solution for QC sample (WSQC) (อายุการใช้ 1 ปี) เก็บไว้ในตู้เย็น 2 - 8 °C

เตรียม 3 WSQC ใน Methanol (HPLC grade) สำหรับ spiked urine calibration curve ดังตาราง :

WSQC	WSQC Conc. (ng/ml)	SC100 taken (µl)	SM100 taken (µl)	final volume (µl)
WSQCL	3,600	36	36	1,000
WSQCM	12,000	120	120	1,000
WSQCH	30,000	300	300	1,000

6.2.7 QC samples (QC)

QC	Vol. taken (µl)	from	certified drugs free urine taken (ml)	final conc. (ng/ml)
QCL	100	WSQCL	2,900	120
QCM	100	WSQCM	2,900	400
QCH	100	WSQCH	2,900	1,000

* เตรียม QC ละ 2 ข้ำ

6.3 การเตรียมวัสดุ/อุปกรณ์

- 6.3.1 เบิกตัวอย่างปัสสาวะออกจากตู้เย็น วางไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ก่อนทำการวิเคราะห์
- 6.3.2 เขียนเลขลำดับตัวอย่างปัสสาวะหรือเลขที่ตัวอย่าง และ QC samples บนอุปกรณ์ที่ต้องใช้ เช่น หลอดแก้วใส่ตัวอย่างขนาด 20 ml, SPE column, หลอดแก้วสำหรับทำ derivatize, vial ขนาด 2 ml เป็นต้น
- 6.3.3 เปิด Oven ตั้งอุณหภูมิประมาณ 90 °C และ heating box ตั้งอุณหภูมิประมาณ 70°C

6.4 การเตรียมตัวอย่าง

มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างดังนี้

6.4.1 Acid hydrolysis

- ตัวอย่างต้องผ่านกระบวนการ hydrolysis ก่อนเพื่อเปลี่ยน Morphine conjugate เป็น free Morphine โดยวิธี acid hydrolysis
- ปิเปตตัวอย่างปัสสาวะ 3 ml. เติม 50 μ l Internal standard (IS100) และ 400 μ l Hydrochloric acid (conc.) ผสมให้เข้ากันแล้วนำไป digest ในตู้อบอุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลา 40 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

6.4.2 การสกัดตัวอย่าง

- load sample
ใส่ตัวอย่างจากข้อ 10.4.1 เปิด vacuum pump ให้ตัวอย่างไหลผ่าน column ช้าๆ ประมาณ 2 ml/นาที
- wash column
ล้าง column ด้วยน้ำกรอง 5 ml 5%Formic acid in 5%Methanol 5 ml และ Methanol (HPLC) 5 ml
- dry column
เปิด vacuum pump เป็นเวลา 3 นาที
- elute
elute column ด้วย 5 % Ammonium hydroxide in 40 % Acetonitrile in Metanol 1.5 ml จำนวน 2 ครั้ง นำสารที่ elute ได้ไปเป่าแห้งด้วย N_2

6.4.3 Derivatization

เติม Ethyl acetate (HPLC) 50 μ l และ TMC 50 μ l ปิดฝา tube เขย่าด้วยเครื่อง vortex mixer แล้วพ่นทับด้วย paraffin เพื่อป้องกันแรงดันของสารจากความร้อน นำไป heat บน heating block ที่ 70 °C เป็นเวลา 25 นาที แล้วนำออกจาก heating block ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ดูดสาร ใส่ vial ที่มี insert



7. วิธีดำเนินการ (Procedure)

- 7.1 นำสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS ตามสภาวะดังนี้
- Column : HP-5MS 30m x 250 μ m x 0.25 μ m หรือเทียบเท่า
 - Oven temperature : เริ่มที่อุณหภูมิไม่เกิน 115 °C ถึง อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 300 °C
 - Flow rate : 1.0 ml/minute He;
 - Injection : 1 μ l (split mode 1 : 10)
 - MS mode : EI scan mass range 50-500 หรือกว้างกว่า
 - Run time : 15 นาที
- 7.2 ลำดับการฉีดตัวอย่าง
- 7.2.1 ตัวทำละลาย 3 เข้ม เพื่อตรวจสอบ baseline และ noise
- 7.2.2 สารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นเท่ากับ CS4 จำนวน 5 เข้ม สำหรับ system suitability test
- 7.2.3 calibration solutions ประกอบด้วย certified drugs free urine sample, zero sample และ CS1-7
- 7.2.4 ตัวอย่างและ QC samples (QCL1-2, QCM1-2, QCH1-2) แทรกสลับกันไปอย่างสม่ำเสมอจนครบชุดการตรวจวิเคราะห์
- 7.2.5 จำนวนตัวอย่างในแต่ละชุดการตรวจวิเคราะห์ไม่ควรเกิน 70 ตัวอย่าง (กำหนดตาม autosampler stability ที่ 18 ชั่วโมง)
- 7.2.6 กรณีมีตัวอย่างเกิน 70 ตัวอย่าง จะต้องเตรียม calibration solution และ QC sample พร้อมฉีดตัวอย่างเป็นชุดการฉีดใหม่

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and Report)

8.1 Back-calculated value, %RD

$$\%RD = \frac{(\text{ความเข้มข้นที่คำนวณได้จาก Curve} - \text{ความเข้มข้นจริง}) \times 100}{\text{ความเข้มข้นจริง}}$$

$$8.2 \quad \%CV = \frac{SD \times 100}{\bar{X}}$$

8.3 คำนวณค่าความเข้มข้นของ มอร์ฟินและโคเดอีน ด้วยค่า response เทียบกับ calibration curve

8.4 การรายงานผล

8.4.1 ตัวอย่างที่รายงาน “ตรวจพบมอร์ฟิน” ในกรณีดังต่อไปนี้

8.4.1.1 มี RT และมี mass spectrum ตรงกับ CS4 และสารมาตรฐาน Morphine

8.4.1.2 มีพื้นที่ใต้พีค (peak area) ของมอร์ฟิน ต้องเท่ากับหรือมากกว่า CS4 ที่ความเข้มข้น 300 ng/ml

8.4.1.3 คำนวณผลจาก calibration curve ในหน่วย ng/ml มีค่าเท่ากับ หรือ 300 ng/ml

8.4.2 ตัวอย่างที่รายงาน “ตรวจไม่พบเมทแอมเฟตามีน ” ในกรณีดังต่อไปนี้

8.4.2.1 ตัวอย่างที่มีผลการวิเคราะห์ไม่เป็นไปตามข้อ 8.4.1.1

8.4.2.2 ตัวอย่างที่มีผลการวิเคราะห์เป็นไปตามข้อ 8.4.1.1 แต่ไม่เป็นไปตาม ข้อ 8.4.1.2 และ 8.4.1.3

กรณีตรวจพบโคเดอีน ไม่ต้องรายงานผลในใบสรุปผลการวิเคราะห์ แต่คำนวณผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณโอเดอีนจาก calibration curve ในหน่วย ng/ml



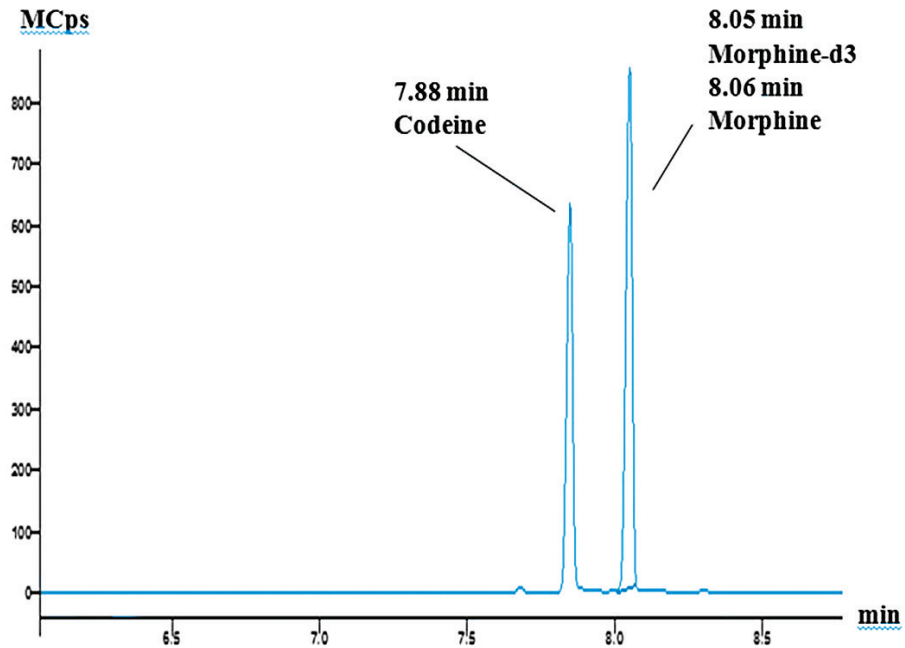
9. การควบคุมคุณภาพและผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

- 9.1 กรณีของ system suitability test พิจารณาค่า retention time และ ค่า %CV ของ response ไม่เกิน 10.0%
- 9.2 75 % ของระดับความเข้มข้นทั้งหมด (หรืออย่างน้อย 6 ระดับความเข้มข้น) บน calibration curve ต้องมีค่า back-calculated value ไม่เกิน 15 % ยกเว้นที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด ให้ไม่เกิน 20 % สำหรับระดับความเข้มข้นที่ไม่ผ่านนั้นต้องไม่ใช่ระดับความเข้มข้นสูงสุดหรือต่ำสุดของ calibration curve จึงจะสามารถตัดทิ้งและไม่นำไปใช้ในการคำนวณค่า correlation coefficient (r) และสมการเชิงเส้นได้
- 9.3 ค่า correlation coefficient (r) ของ calibration curve ไม่น้อยกว่า 0.950
- 9.4 ค่า %RD ของ 4 ใน 6 (67 %) QC samples ทั้งหมด ควรมีค่าไม่เกิน 15 % และ 2 ใน 6 (33 %) QC samples ที่ไม่ผ่านต้องไม่ใช่ QC sample ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน
- 9.5 กรณีที่การวิเคราะห์ชุดนั้นๆไม่ผ่านเกณฑ์การควบคุมคุณภาพ นักวิเคราะห์จะต้องทำการวิเคราะห์ซ้ำทั้งชุด
- 9.6 ดูค่า RT และ mass fragment ของสารมาตรฐานแต่ละชนิด ดังนี้

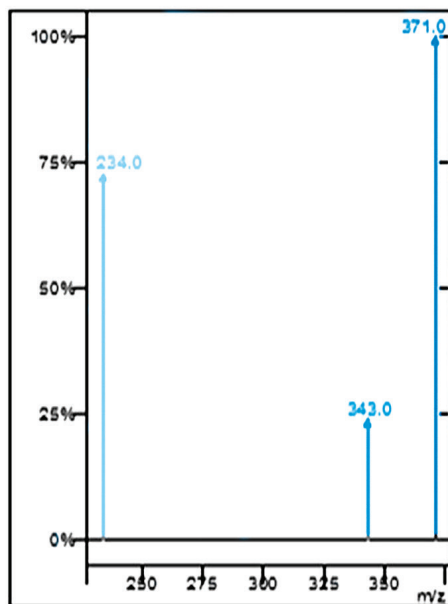
ตารางแสดงค่า retention time (RT) และ mass spectrum ของสารมาตรฐาน 3 ชนิด

Compound	RT (min)	mass spectrum (m/z)		
		Q	Q1	Q2
Codeine-TMS	7.88	<u>371</u>	234	343
Morphine-TMS	8.06	<u>429</u>	414	401
Morphine d3-TMS	8.05	<u>432</u>	417	290

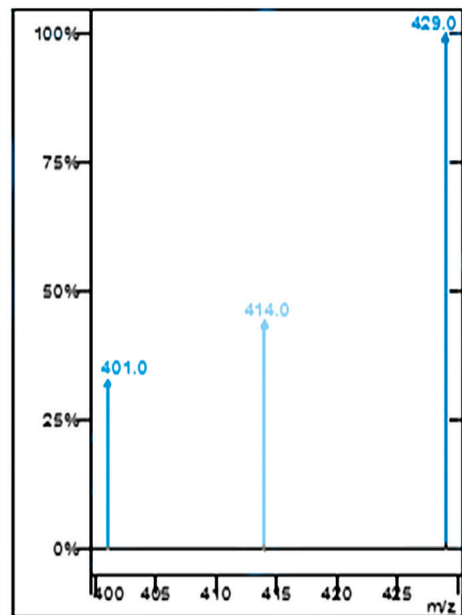
Q = quantitation ion Q1 และ Q2 = qualifier ion-1 และ 2



Codeine 371.0, 343.0, 234.0



Morphine 429.0, 414.0, 401.0





10. รายละเอียดอื่นๆ

- 10.1 วิธีนี้ใช้สำหรับตรวจหา morphine และ codeine ในตัวอย่างปัสสาวะเท่านั้น หากนำไปประยุกต์สำหรับตรวจในตัวอย่างอื่นๆ ที่ไม่ใช่ปัสสาวะ จะต้องทำการทวนสอบ (verify) ก่อน
- 10.2 การตรวจยืนยันด้วยเทคนิค GC - MS ตัวอย่างปัสสาวะควรทำการตรวจเบื้องต้นโดยใช้หลักการภูมิคุ้มกันวิทยา โดยพิจารณา ดังนี้
- 10.3 กรณีให้ผลบวกหรือให้ผลบวกไม่ชัดเจน ต้องทำการตรวจยืนยันผลทุกตัวอย่าง
- 10.4 กรณีให้ผลลบ ไม่ทำการตรวจยืนยันผล ยกเว้น กรณีร้องขอพิเศษ หรือต้องการทำเพื่อยืนยันผลลบ เป็นต้น
- 10.5 ค่าความไวของวิธี : 150 ng/ml เมื่อใช้ปัสสาวะ 5 ml
- 10.6 กรณีตรวจพบ Codeine ปริมาณสูงกว่า Morphine ในสัดส่วนระหว่าง Codeine ต่อ Morphine น้อยกว่า 0.5 ให้รายงานไม่พบ Morphine
- 10.7 การเตรียม Reagent สามารถเตรียมตามปริมาตรที่ต้องการได้ แต่ความเข้มข้นต้องเป็นไปตามที่กำหนด
- 10.8 การเตรียมตัวอย่างทุกขั้นตอน ตลอดจนถึงการทำ derivatize ควรทำในวันเดียวกัน หากจำเป็นต้องหยุดกระบวนการต้องเก็บตัวอย่างในรูป dry extract ก่อนการทำ derivatize ในตู้เย็น ที่อุณหภูมิ 2 - 8 °C ได้ไม่เกิน 1 วัน
- 10.9 ตัวอย่างเก็บในตู้เย็น ที่อุณหภูมิ 2 - 8 °C และจะต้องทำการวิเคราะห์ให้เสร็จสิ้นภายใน 3 เดือน
- 10.10 ควรเตรียมตัวอย่างให้เสร็จสิ้น ภายใน 8 ชั่วโมง หลังการนำตัวอย่างออกจากตู้เย็น
- 10.11 ค่า retention time และ response ของ Codeine และ Morphine ในแต่ละครั้งที่ทำการตรวจวิเคราะห์ อาจมีความแตกต่างกันมากกว่า 2 % เนื่องจากสภาวะเครื่องที่อาจมีความแตกต่างกันได้

บรรณานุกรม

- 1 สำนักงานคณะกรรมการป้องกันและปราบปรามยาเสพติด. รวมกฎหมายยาเสพติด. 11. กรุงเทพฯ ; 2556.
- 2 สุพัฒน์ ชีรเวชเจริญชัย. ยาและสิ่งเสพติดให้โทษ. 1. กรุงเทพมหานคร : ไทยวัฒนาพานิชย์ ; 2535.
- 3 สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. คู่มือและแนวทางการจัดซื้อชุดทดสอบสารเสพติดในปัสสาวะ. 2. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์สำนักงาน พระพุทธศาสนาแห่งชาติ ; 2554
- 4 United Nations International Drug Control Programme. Rapid on-site screening of drugs of abuse. Scientific and Technical notes SCITEC/18 December 2001.
- 5 Reisfield GM, Salazar E, Bertholf RL. Rational use and interpretation of urine drug testing in chronic opioid therapy. Ann Clin Lab Sci. 2007; 37 (4) : 301-14.
- 6 Teter CJ, Guthrie SK. A comprehensive review of MDMA and GHB : two common club drugs. Pharmacotherapy. 2001;21(12):1486-513.
- 7 Wikipedia. Methamphetamine [Internet]. 2015 [cited 2015 Jul 15]. Available from: <https://en.wikipedia.org/wiki/Methamphetamine>
- 8 Glaz-Sandberg A, Dietz L, Nguyen H, Oberwittler H, Aderjan R, Mikus G. Pharmacokinetics of 11-nor-9-carboxy-Delta(9)-tetrahydrocannabinol (CTHC) after intravenous administration of CTHC in healthy human subjects. Clin Pharmacol Ther. 2007; 82 (1) : 63-9.
- 9 Allen KR. Screening for drugs of abuse: which matrix, oral fluid or urine? Ann Clin Biochem. 2011; 48 (6) : 531-41.
- 10 การทดลองที่ 6 โครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง และโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ [อินเทอร์เน็ต], คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยนเรศวร [เข้าถึงเมื่อ 5 มี.ค. 2558]. เข้าถึงได้จาก : http://www.sci.nu.ac.th/chemistry/directionlab/media_doc/256221/Lab6.pdf
- 11 สุภาพร แสงศรีจันทร์, เอกสารประกอบการบรรยาย CH 210 Chromatography [อินเทอร์เน็ต], คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยแม่โจ้, 2558 [เข้าถึงเมื่อ 5 มี.ค. 2558]. เข้าถึงได้จาก : http://www.science.mju.ac.th/chemistry/download/s_sangsrichan/04Ch210%20Chromatography2557_2.pdf



- 12 รัชชัย ศรีวิบูลย์, บทที่ 6 ก๊าซโครมาโตกราฟี [อินเทอร์เน็ต], คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยรามคำแหง, 2551 [เข้าถึงเมื่อ 5 มี.ค. 2558]. เข้าถึงได้จาก :
<http://e-book.ram.edu/e-book/c/CM334/CM334-6.pdf>
- 13 Michael W.Dong. HPLC Instrumentation in Pharmaceutical Analysis: Status, Advances, and Trends [Internet]. 2005 [cited 2015 Jul 15]. Available from:
https://books.google.co.th/books?id=k_pD5hlj5DkC&pg=PA62&lpg=PA62&dq=lc+detector+uv+vis+mass+sensitivity&source=bl&ots=PGgquJQX4f&sig=RPTJRC7z7trXeSg_-na9OFL0xls&hl=th&sa=X&ved=0CE0Q6AEwCDgKahUKewi_gsqdlK_HAhVJkl4KHehYARU#v=onepage&q=lc%20detector%20uv%20vis%20mass%20sensitivity&f=false
- 14 The United States Pharmacopeia, the national formulary: USP , NF 32 / United States Pharmacopeial convention. Rockville (MD): The United States Pharmacopeial convention; 2014.
- 15 WADA Laboratory Committee. WADA Technical Document-TD2010IDCR [Internet]. 2010 [cited 2015 Jul 15]. Available from:
https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/WADA_TD2010IDCRv1.0_Identification%20Criteria%20for%20Qualitative%20Assays_May%2008%202010_EN.doc.pdf
- 16 European Medicines Agency [Internet]. London: EMA; c1995-2015 [updated 2015 Aug 03; cited 2015 Jul 15]. Guideline on Bioanalytical Method Validation. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf
- 17 US Food and drug Administration [Internet]. MD: FDA; [updated 2015 Aug 08; cited 2015 Jul 15]. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. Available from: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070107.pdf>

