

## ทางเลือกใหม่ในการตรวจวิเคราะห์ ยากลุ่ม Amphetamines ในปัสสาวะ

อรพิน ทนันทติ สุเมธ เทียงธรรม และรุ่งทิพย์ เจือดี

สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

**บทคัดย่อ** รายงานผลการตรวจวิเคราะห์ยาในกลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะ ใช้เป็นหลักฐานสำคัญทางอรรถคดี ดังนั้นวิธีการตรวจวิเคราะห์จึงต้องเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง และมีต้นทุนต่อหน่วยต่ำ สำนักยาและวัตถุเสพติดได้พัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจวิเคราะห์ที่มีความถูกต้อง แม่นยำ และรวดเร็ว สำหรับตรวจคุณภาพและหาปริมาณยาในกลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะโดยเทคนิค แก๊สโครมาโทกราฟี ตัวตรวจวัดชนิด แมส (GC-MS) เตรียมตัวอย่างโดยเทคนิคการสกัดด้วยวัฏภาคของแข็ง (SPE) และเทคนิค โครมาโทกราฟีชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูง ตัวตรวจวัดชนิดแมส (LC-MS) เตรียมตัวอย่างโดยเทคนิคการสกัดด้วยวัฏภาคของแข็งแบบออนไลน์ (online SPE) จากการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี พบว่าเทคนิค GC-MS ช่วงการใช้งาน amphetamine และ methamphetamine มีค่า 100-4,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ มากกว่า 0.99 เปอร์เซ็นต์ recovery เฉลี่ย ของ amphetamine และ methamphetamine มีค่า 75.40 และ 76.80 ตามลำดับ ค่าความแม่นยำระหว่างวัน มีค่า ในช่วง 0.34 -17.23 %RD ค่าความเที่ยงระหว่างวันมีค่าอยู่ในช่วง 3.84-12.57 % CV ค่าความไม่แน่นอนของการวัด ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 มีค่า  $2.00 \pm 0.35$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ  $2.00 \pm 0.39$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับเทคนิค LC-MS ช่วงการใช้งาน amphetamine และ methamphetamine มีค่า 300-2,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ มีค่ามากกว่า 0.99 ค่าความแม่นยำระหว่างวัน มีค่าในช่วง 2.22-16.11 %RD ค่าความเที่ยงมีค่าในช่วง 2.36-10.43 %CV ค่าความไม่แน่นอนของการวัด ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 มีค่า  $2.00 \pm 0.24$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า  $2.00 \pm 0.27$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ต้นทุนต่อหน่วยเฉพาะค่าวัสดุ (material cost) ของการตรวจวิเคราะห์โดย GC-MS และ LC-MS มีค่า 628 บาท และ 438 บาท วิธีการตรวจวิเคราะห์ยาในกลุ่ม amphetamines โดย GC-MS และ LC-MS เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง สามารถตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มดังกล่าวได้ครอบคลุมตามกฎหมายกำหนด ดังนั้นหน่วยงานที่เกี่ยวข้องสามารถนำวิธีการตรวจวิเคราะห์ทั้งสองเทคนิคไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ยาในกลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะ ตามความเหมาะสมและความพร้อมของแต่ละหน่วยงาน

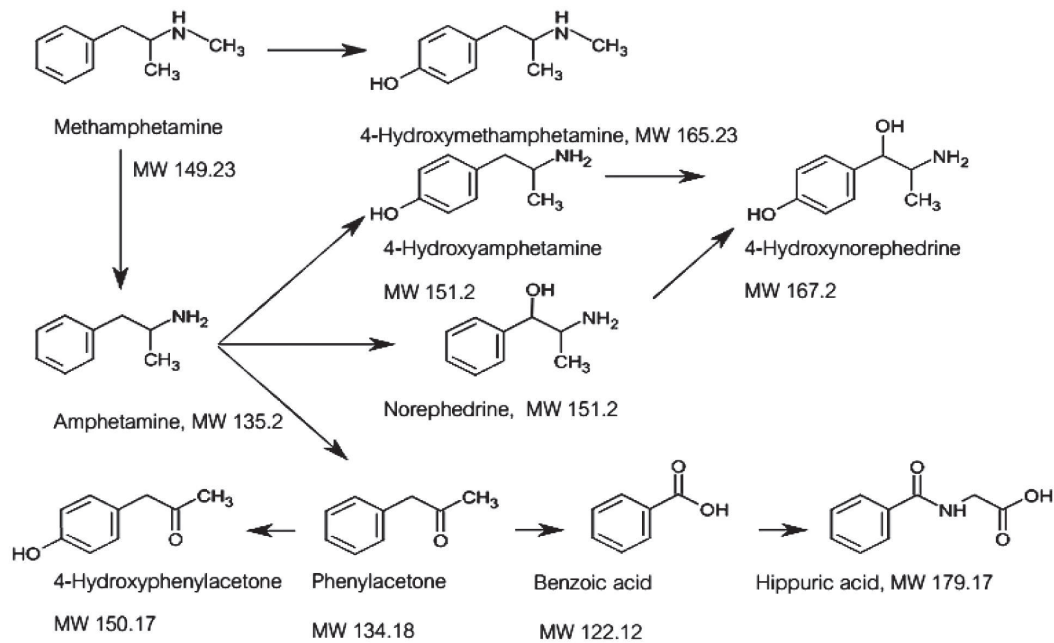
## บทนำ

ปัจจุบันสถานการณ์ยาเสพติดเป็นปัญหาสำคัญของประเทศ และมีแนวโน้มที่จะขยายตัวมีความรุนแรงมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะในกลุ่มเด็กและเยาวชน ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีโอกาสเข้าไปใช้ยาเสพติดได้ง่าย ยุทธศาสตร์การป้องกันกลุ่มผู้มีโอกาสเข้าไปเกี่ยวข้องกับยาเสพติด พ.ศ. 2558 - 2562 จึงมุ่งเน้นการสร้างภูมิคุ้มกันและป้องกันยาเสพติด<sup>(1)</sup> จากสถิติผลการปราบปรามยาเสพติดในปี 2556 พบว่า ชนิดยาเสพติดที่สำคัญยังเป็นกลุ่มเดิมคือ ยาบ้า ยาไอซ์ และเฮโรอีน<sup>(2)</sup> สอดคล้องกับผลการตรวจสารเสพติดในปัสสาวะของ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในตัวอย่างที่ตรวจพบสารเสพติด มากกว่าร้อยละ 90 คือ เมทแอมเฟตามีน (methamphetamine) ซึ่งเป็นสารสำคัญของยาบ้าและยาไอซ์

พระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ พ.ศ. 2522 จัดให้ สารกลุ่มแอมเฟตามีน (amphetamines) เป็นยาเสพติดให้โทษประเภท 1<sup>(3)</sup> พระราชบัญญัติป้องกันและปราบปรามยาเสพติด พ.ศ. 2519<sup>(4)</sup> และประกาศคณะกรรมการป้องกันและปราบปรามยาเสพติด เรื่องกำหนดหลักเกณฑ์ วิธีการและเงื่อนไขการตรวจหรือทดสอบว่าบุคคลหรือกลุ่มบุคคลใดมีสารเสพติดอยู่ในร่างกายหรือไม่ กำหนดวิธีการตรวจมี 2 ขั้นตอน คือ การตรวจเบื้องต้นด้วยชุดทดสอบเบื้องต้น เมื่อปรากฏว่าให้ผลบวก ให้ส่งตรวจยืนยันผล ณ สถานตรวจพิสูจน์ตามคำสั่งคณะกรรมการป้องกันและปราบปรามยาเสพติด เรื่องกำหนดสถานตรวจพิสูจน์ และให้ถือเกณฑ์ตัดสินผลการตรวจพิสูจน์ว่าเป็นผู้มีสารเสพติดอยู่ในร่างกาย เมื่อตรวจพบว่ามีสารดังกล่าวอยู่ในปัสสาวะตั้งแต่ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรขึ้นไป

Methamphetamine และ amphetamine เป็นสารกระตุ้นประสาทในกลุ่ม amphetamines ออกฤทธิ์ทำให้ร่างกายตื่นตัวอยู่ตลอดเวลา และลดความอยากอาหาร มีผลต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด คือเพิ่มความดันโลหิต และทำให้หัวใจเต้นไม่เป็นจังหวะ อาการผิดปกติที่เกิดจากการเสพ methamphetamine ผู้เสพจะมีอาการปวดมาก อารมณ์ดี ครื้นเครงกว่าปกติ น้ำหนักตัวลด มีเหงื่อออกมากกว่าเดิม ได้ยินและเห็นภาพหลอน นอนไม่หลับ ใจสั่น คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย ตื่นเต้น กระวนกระวาย มีพฤติกรรมก้าวร้าวและทำลาย ควบคุมสติไม่ได้ ในกรณีที่เสพเกินขนาดอาจมีอาการหัวใจเต้นผิดปกติ ความดันโลหิตสูง สับสน ชัก หรือหมดสติได้ อาการติดยา (addiction) พบในผู้ที่เสพในปริมาณมาก เป็นระยะเวลานานๆ จะมีความผิดปกติทางสมอง เกิดอาการทางจิตประสาทหลอน หูแว่ว มีอาการหวาดระแวงจนต้องทำร้ายตัวเองหรือผู้อื่น อาการเหล่านี้จะหายไปได้ต้องใช้เวลหลายสัปดาห์ หรือหลายเดือน โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่เสพมาอย่างเรื้อรัง การเสพ methamphetamine จะทำให้เกิดอาการติ้อย่างได้ ผู้เสพจะต้องเพิ่มปริมาณมากขึ้นเรื่อยๆ เพื่อให้เกิดผลที่พึงพอใจ อาการถอนยา (withdrawal symptoms) จะเกิดขึ้นเมื่อหยุดเสพในทันทีทันใด โดยจะมีอาการหงุดหงิด รู้สึกไม่สบาย ฝันร้าย ออยากอาหารมากขึ้น ซึม เบื่อ ชี้อ่อน ไม่มีเรี่ยวแรง จนอาจมีผลกระทบต่อนานที่การทำงานหรือไม่มีสมาธิในการเรียน อาการเหล่านี้จะมีมาน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับจำนวนครั้งและปริมาณที่เสพ การรักษา (treatment) โดยใช้ยาในกลุ่มต้านอาการซึมเศร้า (antidepressant) ได้แก่ imipramine, desipramine, amitriptyline, trazodone หรือ fluoxetine ซึ่งยาเหล่านี้จะเข้าจับกับสาร serotonin ในสมองเพื่อลดอาการซึมเศร้า และอาการอยากยา กลุ่มยาระงับประสาท (sedatives) ได้แก่ flurazepam, chloral hydrate, chlordiazepoxide, phenobarbital หรือ diazepam ถูกใช้รักษาอาการวิตกกังวล หรืออาการนอนไม่หลับ และกลุ่มรักษาอาการทางจิต (antipsychotic) ได้แก่ haloperidol, chlorpromazine ที่ช่วยปรับความสมดุลให้กับสาร dopamine เพื่อบรรเทาอาการทางจิต และรู้สึกพึงพอใจโดยให้การบำบัดรักษาทั้งทางร่างกาย และจิตใจควบคู่กันไปด้วย<sup>(5)</sup>

Methamphetamine เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะอยู่ในร่างกาย 1-4 วัน หรืออาจเป็นสัปดาห์ ขึ้นกับความถี่ของการเสพ เมื่อเสพโดยรับประทาน ถูกขับออกทางปัสสาวะในรูป methamphetamine ร้อยละ 30-54 และสาร metabolite ที่สำคัญคือ amphetamine ร้อยละ 10-23 หากเสพโดยการฉีดเข้าหลอดเลือดถูกขับออกทางปัสสาวะในรูป methamphetamine ร้อยละ 45 และ amphetamine ร้อยละ 7<sup>(6)</sup> การเกิด metabolite ของ methamphetamine (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 metabolite ของ methamphetamine

กระบวนการตรวจสารเสพติดในร่างกาย ต้องตรวจทั้งสารตั้งต้นและสาร metabolite ดังนั้นวิธีการตรวจที่ดีและมีประสิทธิภาพ ต้องสามารถแยกสารดังกล่าว ซึ่งมีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงกันมากออกจากกันได้ และต้องมีความไวสูงสามารถตรวจได้ในปริมาณต่ำ เนื่องจากผลการตรวจจากห้องปฏิบัติการนำไปใช้เป็นหลักฐานสำคัญในทางอรรถคดี กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยสำนักยาและวัตถุเสพติด ได้ให้ความสำคัญในประเด็นดังกล่าว จึงได้พัฒนาวิธีการสำหรับตรวจคุณภาพและหาปริมาณยากลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะโดยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี (GC-MS) และลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี (LC-MS) รวมทั้งประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด ประเมินค่าต้นทุนต่อหน่วย เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์จากตัวอย่างจริง และตัวอย่างที่ทราบค่าสรุปข้อดีข้อด้อยของทั้งสองเทคนิค เพื่อเป็นข้อมูลทางเลือกให้ผู้เกี่ยวข้องได้เลือกใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ยากลุ่ม amphetamines ในตัวอย่างปัสสาวะตามความเหมาะสมและความพร้อมของแต่ละหน่วยงาน

## วัสดุและวิธีการ

### 1. การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ยากลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะโดย GC-MS และ LC-MS

ทำการพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ยากลุ่ม amphetamines เพื่อให้ได้วิธีที่มีประสิทธิภาพสูง โดยปรับเปลี่ยนสภาวะการทดสอบในหัวข้อต่างๆ เช่น ชนิด column ชนิด SPE สภาวะการสกัดสาร ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ชนิดสารและสภาวะการ derivatize และสภาวะการทดสอบของเครื่องเป็นต้น

### 2. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจวิเคราะห์ ยากลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะโดย GC-MS และ LC-MS

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจวิเคราะห์ยากลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะ

ทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจวิเคราะห์ methamphetamine และ amphetamine โดยมี phentermine เป็น internal standard ตามแนวทางการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีสำหรับตัวอย่างชีววัตถุ<sup>(7, 8, 9)</sup>

หัวข้อการตรวจสอบประกอบด้วย ความเฉพาะเจาะจง (selectivity) ความแม่นยำและความเที่ยง (accuracy and precision) carry over การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (linearity and range) matrix effect ความคงสภาพของสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง (stability of standard solution and sample solution)

### สารมาตรฐานและสารเคมี (Standards and Reagents)

สารมาตรฐาน : methamphetamine HCl; DMSc reference standard; Control No. 04A54164; ความบริสุทธิ์ร้อยละ 100.08, amphetamine sulfate; DMSc reference standard; Control No. 01A55202; ความบริสุทธิ์ร้อยละ 99.78 และ phentermine HCl; DMSc reference standard; Control No. 01A53158; ความบริสุทธิ์ร้อยละ 99.90

สารเคมี : AR grade ประกอบด้วย methanol, phosphoric acid, ethyl acetate, ammonium hydroxide, pentafluoropropionic acid anhydride (PFPA), trifluoroacetic anhydride (TFAA) heptafluorobutyric acid (HFBA), ammonium formate, formic acid, certified drugs free urine, negative urine จาก 6 แหล่ง

HPLC grade ประกอบด้วย methanol, ethyl acetate, acetonitrile, purified water

Matrix blank (negative urine): ปัสสาวะจากผู้ที่มีสุขภาพดี ไม่รับประทานยาทุกชนิดเป็นเวลาอย่างน้อย 7 วัน และไม่เสฟสารเสพติด

### เครื่องมือและอุปกรณ์ (Equipment and Supplies)

เครื่องชั่ง 6 ตำแหน่ง ผลิตภัณท์ของ Mettler-Toledo ประเทศสหรัฐอเมริกา รุ่น MT5, เครื่อง GC-MS ผลิตภัณท์ของ Bruker Daltonics Inc ประเทศสหรัฐอเมริกา รุ่น scion SQ และ GC 436 เครื่อง LC-MS ระบบ 2 dimension (SPE online) ผลิตภัณท์ของ Thermo Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา รุ่น ultimate 3000 และ MSO plus เครื่องเตรียมตัวอย่างอัตโนมัติ (automate SPE) ผลิตภัณท์ของ Aurora Biomed Inc. ประเทศแคนาดา รุ่น Versa 1100 SPE, vertex mixer, evaporator, heating box, micropipette และ micropipette tips ขนาด 50-200 ไมโครลิตร และ 1-5 มิลลิลิตร, positive pipette และ pipette tips ขนาด 10, 50, 100, 250, 1000 ไมโครลิตร, solid phase extraction (SPE) ชนิด OASIS HLB cartridge 3 มิลลิลิตรต่อ 60 มิลลิกรัม และ ชนิด strong cation-exchange cartridge 3 มิลลิลิตรต่อ 60 มิลลิกรัม column GC ชนิด HP-5 ms ขนาด 30 m × 0.25 mm ID DF=0.25, analytical column ชนิด Acclaim trinity P1 ขนาด 3 µm 3.0 × 100 mm และ Acclaim polar advantage II ขนาด 3 µm 3.0 × 100 mm, guard column ชนิด Acclaim trinity P1 ขนาด 3 µm 3.0 × 10 mm, SPE Online ชนิด Dionex Solex HRP ขนาด 2.1 × 20 mm และ Acclaim trinity P1 ขนาด 2.1 × 20 mm

#### 2.1 การตรวจสอบความถูกต้องวิธีตรวจวิเคราะห์ยาในกลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะโดย GC-MS

2.1.1 การเตรียมสารมาตรฐาน : เติมสารมาตรฐานลงใน matrix blank 1 มิลลิลิตร เติม internal standard (phentermine) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 10 ไมโครลิตร และ 1 มิลลิลิตร ของ 4% phosphoric acid สกัดโดย solid phase extraction และ derivatize ด้วย PFPA

2.1.2 การเตรียมตัวอย่าง : ตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร เติม internal standard ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร จำนวน 10 ไมโครลิตร และ 1 มิลลิลิตร ของ 4%  $H_3PO_4$  สกัดโดย solid phase extraction และ derivatize ด้วย PFPA

2.1.3 สภาวะของเครื่อง : Column: HP-5ms 30 M  $\times$  0.25 mm ID DF = 0.25 หรือเทียบเท่า, Flow rate: 1.0 ml/minute He, Injection: 1  $\mu$ l, split mode 1:10, MS mode: EI scan 50–300 amu, Oven temperature: 90 °C – 280 °C

#### 2.1.4 การทดสอบความถูกต้องของวิธี (Method validation)

##### 2.1.4.1 การทดสอบความเฉพาะเจาะจง (Selectivity)

วิเคราะห์ตัวอย่าง matrix blank จำนวน 6 แหล่ง และ ตัวอย่าง matrix blank ที่เติมสารมาตรฐาน methamphetamine และ amphetamine ที่ระดับ lower limit of quantitation (LLOQ: 100 นาโนกรัม ต่อ มิลลิลิตร) โดยพิจารณาค่า response ที่ตำแหน่ง retention time เดียวกันกับ methamphetamine และ amphetamine ต้องไม่มากกว่าร้อยละ 20 ของ response ที่ระดับ LLOQ และ ค่า response ที่ตำแหน่ง retention time เดียวกันกับ phentermine ต้องไม่มากกว่าร้อยละ 5 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 นาโนกรัมต่อ มิลลิลิตร

##### 2.1.4.2 Carry over

วิเคราะห์ matrix blank ก่อนและหลัง การฉีด upper limit of quantitation (ULOQ: 4,000 นาโนกรัมต่อ มิลลิลิตร) โดยพิจารณาค่า response ที่ตำแหน่ง retention time เดียวกันกับ methamphetamine และ amphetamine ต้องไม่มากกว่าร้อยละ 20 ของ response ที่ระดับ LLOQ และ ค่า response ที่ตำแหน่ง retention time เดียวกันกับ phentermine ต้องไม่มากกว่าร้อยละ 5 ของ response ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 นาโนกรัมต่อ มิลลิลิตร

##### 2.1.4.3 การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and range)

เติมสารมาตรฐาน methamphetamine และ amphetamine ใน matrix blank ที่ระดับความเข้มข้น 100, 300, 500, 1,000, 1,500, 3,000 และ 4,000 นาโนกรัมต่อ มิลลิลิตร และ phentermine ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 นาโนกรัมต่อ มิลลิลิตร วิเคราะห์การถดถอยแบบกำลังสองน้อยที่สุด (least squares regression analysis) ของ calibration curve ที่ plot ระหว่าง peak area ratio ของ สารที่วิเคราะห์ และ internal standard กับความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ คำนวณค่า สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) สมการ linear regression และ back-calculated value ของแต่ละระดับความเข้มข้น โดยค่า r ต้องไม่น้อยกว่า 0.990 และ ค่า back-calculated value ของแต่ละระดับความเข้มข้น ต้องไม่เกินร้อยละ 15 ของค่าจริง ยกเว้นที่ระดับ LLOQ ไม่เกินร้อยละ 20 ของค่าจริง

2.1.4.4 การทดสอบความแม่นยำและความเที่ยง (Accuracy and precision) (intra-day และ inter-day)

ทดสอบความแม่นยำ และความเที่ยงในช่วงการวิเคราะห์ที่เป็นเส้นตรง โดยเติมสารมาตรฐาน methamphetamine และ amphetamine ที่ระดับความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อ มิลลิลิตร (LLOQ) 250 นาโนกรัมต่อ มิลลิลิตร (QCL) 2,500 นาโนกรัมต่อ มิลลิลิตร (QCM) 4,000 นาโนกรัมต่อ มิลลิลิตร (QCH) และ phentermine ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 นาโนกรัมต่อ มิลลิลิตร ลงใน matrix blank วิเคราะห์ระดับละ 5 ซ้ำ ทำการทดสอบ 3 วัน พิจารณาค่าความแม่นยำโดยคำนวณค่า %relative deviation (%RD) ไม่เกินร้อยละ  $\pm 15$  ในทุกระดับความเข้มข้น ยกเว้น ที่ระดับ LLOQ ไม่เกินร้อยละ  $\pm 20$  ส่วนค่าความเที่ยง แสดงด้วยค่า % coefficient of variation (%CV) ไม่เกินร้อยละ 15 ในทุกระดับความเข้มข้น ยกเว้น ที่ระดับ LLOQ ไม่เกินร้อยละ 20



#### 2.1.4.5 การคืนกลับ (Recovery)

เติมสารมาตรฐาน methamphetamine และ amphetamine ที่ระดับความเข้มข้น 250 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร, 2,500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร, 4,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ phentermine ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ลงใน matrix blank เปรียบเทียบ response ก่อนสกัด (response in standard) และหลังการสกัด (response in extract sample) ค่า % recovery ที่ได้อาจมีค่ามากกว่าร้อยละ 75

#### 2.1.4.6 ความคงสภาพของสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง (Stability of standard solution and sample solution)

วิเคราะห์ตัวอย่าง QCL และ QCH จำนวน 3 ขั้ว ภายใต้สภาวะในการเก็บรักษาต่าง ๆ ได้แก่ short term stability, autosampler stability, long term stability และ dry extract stability

Short term stability: เตรียมตัวอย่าง QCL และ QCH และตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 8 ชั่วโมง สกัดตัวอย่างและวิเคราะห์ตัวอย่างตามขั้นตอน คำนวณค่าความเข้มข้นของ QCL และ QCH เทียบกับ calibration curve โดยค่า % RD และ % CV ของความเข้มข้นที่คำนวณได้ ต้องไม่เกินร้อยละ 15

Autosampler stability: เตรียมตัวอย่าง QCL และ QCH ทำการสกัดจนได้สารละลายพร้อมฉีด ตั้งทิ้งไว้ใน autosampler เป็นเวลา 18 ชั่วโมง วิเคราะห์ตัวอย่างตามขั้นตอน คำนวณค่าความเข้มข้นของ QCL และ QCH เทียบกับ calibration curve โดยค่า % RD และ % CV ของความเข้มข้นที่คำนวณได้ ต้องไม่เกินร้อยละ 15

Long term stability: เตรียมตัวอย่าง ตัวอย่าง QCL และ QCH เก็บไว้ในตู้เย็น (อุณหภูมิระหว่าง 2-8 °C) เป็นเวลา 90 วัน สกัดตัวอย่างและวิเคราะห์ตัวอย่างตามขั้นตอน คำนวณค่าความเข้มข้นของ QCL และ QCH เทียบกับ calibration curve โดยค่า % RD และ % CV ของความเข้มข้นที่คำนวณได้ จะต้องไม่เกินร้อยละ 15

Dry extract stability: เตรียมตัวอย่าง QCL และ QCH ทำการสกัดและเก็บตัวอย่างในรูปแบบ dry extract ไว้ในตู้เย็น (อุณหภูมิ ระหว่าง 2-8 °C) เป็นระยะเวลา 1 วัน ทำการวิเคราะห์ตามขั้นตอน คำนวณค่าความเข้มข้นของ QCL และ QCH เทียบกับ calibration curve โดยค่า % RD และ % CV ของความเข้มข้นที่คำนวณได้ จะต้องไม่เกินร้อยละ 15

Stock solution stability: โดยการเปรียบเทียบค่า response ระหว่างสารละลายมาตรฐานที่เตรียมใหม่กับสารละลายมาตรฐานที่เก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง 12 ชั่วโมง และสารละลายมาตรฐานที่เก็บไว้ในตู้เย็น (อุณหภูมิ ระหว่าง 2-8 °C) ระยะเวลา 3 เดือน แตกต่างจากสารละลายมาตรฐานที่เตรียมใหม่ไม่เกินร้อยละ 20

#### 2.1.4.7 Dilution integrity

เติมสารมาตรฐาน methamphetamine และ amphetamine ใน matrix blank ที่ระดับความเข้มข้นที่ 10,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการเจือจาง ตัวอย่างดังกล่าวด้วย matrix blank ที่ระดับ 1:1, 1:9 และ 1:39 คำนวณค่าความเข้มข้นเทียบกับ calibration curve ค่า % RD และ % CV ของความเข้มข้นที่คำนวณได้ จะต้องไม่เกินร้อยละ 15

#### 2.1.4.8 Matrix effect

เตรียม matrix blank, QCL และ QCH จากแต่ละ matrix blank จำนวน 6 แหล่ง และเตรียม spiked extracted sample คำนวณหาค่า Matrix factor (MF) และค่า Absolute matrix factor จะต้อง มีค่า % CV ไม่เกินร้อยละ 15

## 2.2 การตรวจสอบความถูกต้องวิธีตรวจวิเคราะห์ยาในกลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะโดย LC-MS

2.2.1 การเตรียมสารมาตรฐาน : เติมสารมาตรฐานลงใน matrix blank 1 มิลลิลิตร เติม internal standard (phentermine) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 10 ไมโครลิตร ปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วไม่ต่ำกว่า 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใส 200 ไมโครลิตร ใส่ใน insert vial

2.2.2 การเตรียมตัวอย่าง : ตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร เติม internal standard ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 10 ไมโครลิตร ปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วไม่ต่ำกว่า 4,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใส 200 ไมโครลิตร ใส่ใน insert vial

2.2.3 สภาวะของเครื่อง LC-MS: Analytical column: Acclaim Trinity P1 3  $\mu$ m 3.0  $\times$  100 mm, Guard column: Acclaim Trinity P1 3  $\mu$ m 3.0  $\times$  10 mm, SPE Online: Dionex Solex HRP Cartridge 2.1  $\times$  20 mm, Column oven: 35  $^{\circ}$ C, Injection: 0.5  $\mu$ l, Flow rate: 0.40 ml/min for transferring and 0.50 ml/min. for loading, Mobile phase for transferring: water/acetonitrile/50 mM ammonium formate pH 4.0, gradient, Mobile phase for loading: 0.20% HFBA in water/acetonitrile (90/10), MS Mode: positive ESI SIM, Probe temperature ( $^{\circ}$ C): 600.00, Cone: 45.00 volts ตั้งค่ามวลของสาร sim no. 1 ที่มวลต่อประจุ (m/z)  $136.20 \pm 0.3$  สำหรับ amphetamine และ sim no. 2 ที่มวลต่อประจุ (m/z)  $150.20 \pm 0.3$  สำหรับ methamphetamine และ phentermine โดยตั้งโปรแกรมสำหรับ transferring programme (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 Transferring programme ของการตรวจวิเคราะห์ยาในกลุ่ม amphetamines โดย LC-MS

| time (min) | flow rate<br>(ml/min) | transferring ratio (%) |              |                                              | activity         |
|------------|-----------------------|------------------------|--------------|----------------------------------------------|------------------|
|            |                       | water                  | acetonitrile | 50 mM CH <sub>3</sub> NO <sub>2</sub> pH 4.0 |                  |
| 0.00       | 0.40                  | 12                     | 80           | 8                                            | inject sample    |
| 1.00       | 0.40                  | 12                     | 80           | 8                                            | valve switch 1_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 switch 6_1 |
| 10.00      | 0.40                  | 12                     | 80           | 8                                            | end              |

### 2.2.4 การทดสอบความถูกต้องของวิธี (Method validation)

#### 2.2.4.1 การทดสอบความเฉพาะเจาะจง (Selectivity)

วิเคราะห์ตัวอย่าง matrix blank จำนวน 6 แหล่ง และตัวอย่าง matrix blank ที่เติมสารมาตรฐาน methamphetamine และ amphetamine ที่ระดับ lower limit of quantitation (LLOQ: 300 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) ประเมินผลเช่นเดียวกับเทคนิค GC-MS

#### 2.2.4.2 Carryover

วิเคราะห์ matrix blank ก่อนและหลัง การฉีด upper limit of quantitation (ULOQ: 2,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) ประเมินผลเช่นเดียวกับเทคนิค GC-MS

#### 2.2.4.3 การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and range)

เติมสารมาตรฐาน methamphetamine และ amphetamine ใน matrix blank ที่ระดับความเข้มข้น 300, 700, 1,000, 1,300, 1,700 และ 2,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ phentermine ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ประเมินผลเช่นเดียวกับเทคนิค GC-MS

#### 2.2.4.4 การทดสอบความแม่นยำและความเที่ยง (Accuracy and precision) (intra-day และ inter-day)

ทดสอบความแม่นยำ และความเที่ยงในช่วงการวิเคราะห์ที่เป็นเส้นตรง โดยเติมสารมาตรฐาน methamphetamine และ amphetamine ที่ระดับความเข้มข้น 300 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (LLOQ) 800 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (QCL) 1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (QCM) 1,500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (QCH) และ phentermine ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ลงใน matrix blank ประเมินผลเช่นเดียวกับเทคนิค GC-MS

#### 2.2.4.5 ความคงสภาพ (Stability) และ Matrix effect

ดำเนินการ เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ด้วย GC-MS โดยการศึกษาความคงสภาพดำเนินการในหัวข้อ autosampler stability ที่ 35 ชั่วโมง

### 3. การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด

คำนวณค่าความไม่แน่นอนของการวัดตามแนวทางของ EURACHEM<sup>(10)</sup> แบบบนลงล่าง (top down approach) โดยคำนึงถึงแหล่งของความไม่แน่นอนทุกแหล่ง เช่น จากเครื่องมือ สารมาตรฐาน เครื่องแก้ว และ standard curve รวมค่าความไม่แน่นอนทั้งหมด และคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $k=2$ )

### 4. การเปรียบเทียบผลกับตัวอย่างจริง และตัวอย่างที่ทราบปริมาณ โดย GC-MS และ LC-MS

วิเคราะห์ตัวอย่างจริงที่สำนักงานและวัตถุเสพติดได้รับจากหน่วยงานราชการและเอกชน จำนวน 35 ตัวอย่าง และตัวอย่างทดสอบความชำนาญจาก United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC) ที่ทราบค่าจำนวน 2 ตัวอย่าง คือ 2014/2 sample BS-1 และ 2013/2 sample BS-3 ตรวจวิเคราะห์ตามวิธีและสภาวะการทดสอบ วิธีตรวจวิเคราะห์ยาในกลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะโดย GC-MS เปรียบเทียบผลที่ได้จากการทดสอบตัวอย่างเดียวกันโดยวิธีการและสภาวะการทดสอบตามวิธีตรวจวิเคราะห์ยาในกลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะโดย LC-MS

### 5. การคำนวณต้นทุนต่อหน่วย

เป็นการศึกษาเชิงพรรณนาแบบย้อนหลัง (retrospective descriptive study) ในมุมมองผู้ให้บริการ (provider perspective) เก็บข้อมูลในปีงบประมาณ 2557 (1 ตุลาคม 2556 – 30 กันยายน 2557) ซึ่งเป็นข้อมูลจากฐานข้อมูลอิเล็กทรอนิกส์และแบบฟอร์มเก็บข้อมูล และประมาณการเป้าหมายตัวอย่างในปี 2558 จำนวน 4,700 ตัวอย่าง ด้วยวิธีต้นทุนจุลภาค (micro-costing)<sup>(11)</sup>

ต้นทุนที่วิเคราะห์ประกอบด้วย 3 ส่วน ได้แก่

1. ต้นทุนค่าแรง (labor cost, LC) หมายถึงผลได้ในรูปตัวเงินทั้งหมดที่บุคลากรได้รับ เช่น เงินเดือน สวัสดิการ ค่ารักษาพยาบาล การใช้จ่ายในการอบรม ค่าปฏิบัติงานล่วงเวลา รวมถึงเงินเดือนลูกจ้างที่โรงพยาบาลจ่ายเอง
2. ต้นทุนค่าวัสดุ (material cost, MC) ประกอบด้วย ค่าวัสดุสำนักงาน ค่าใช้สอยทั่วไป วัสดุการแพทย์ ค่าสาธารณูปโภค (เช่น ค่าไฟฟ้า น้ำประปา โทรศัพท์)



3. ต้นทุนค่าลงทุน (capital cost, CC) ประกอบด้วยค่าเสื่อมราคาครุภัณฑ์ และค่าเสื่อมราคาสั่งก่อสร้าง คำนวณค่าเสื่อมราคาด้วยวิธีทางเศรษฐศาสตร์ (economic approach) ใช้อัตราดอกเบี้ยร้อยละ 3 อายุการใช้งานของ ครุภัณฑ์แต่ละชนิดมีความแตกต่างกันโดยยึดตามที่กำหนดไว้ในฐานข้อมูลครุภัณฑ์ของสำนักงานและวัตถุประสงค์

## 6. การเปรียบเทียบวิธีตรวจวิเคราะห์ยากลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะโดย GC-MS และ LC-MS

เปรียบเทียบข้อดีและข้อด้อยของวิธีตรวจวิเคราะห์ยากลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะโดย GC-MS และ LC-MS ในแง่มุมต่างๆ เช่น ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี ช่วงของการวิเคราะห์ ความยุ่งยากในการ เตรียมตัวอย่างค่าความไม่แน่นอนในการวัด และต้นทุนต่อหน่วย เป็นต้น

### ผล

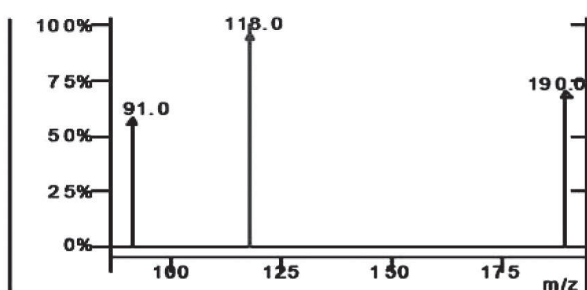
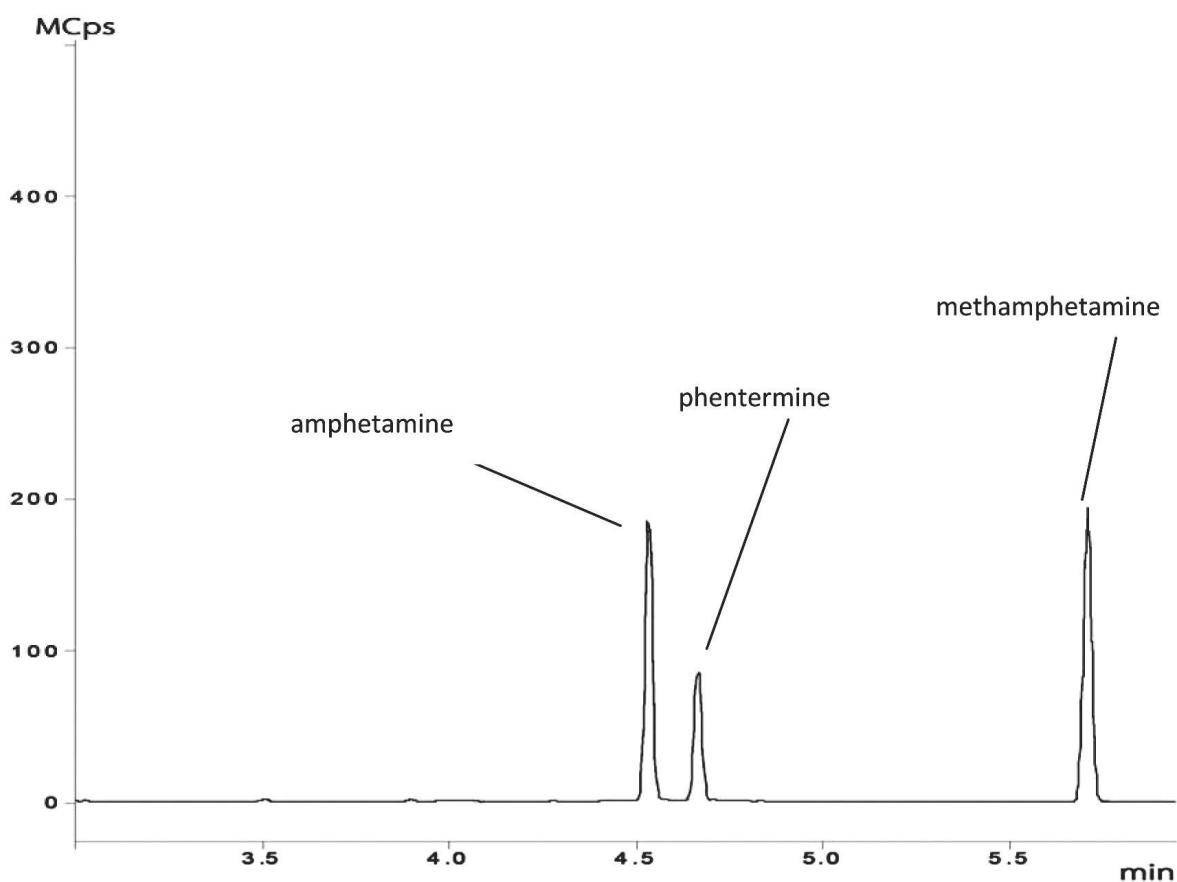
#### 1. การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ยากลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะโดย GC-MS และ LC-MS

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ตรวจยากลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะโดย GC-MS พบว่าสภาวะที่เหมาะสม ในการทดสอบ คือ ใช้ SPE ชนิด OASIS ขนาด 3 มิลลิกรัมต่อ 60 มิลลิกรัม กระบวนการ wash มี 2 ขั้นตอน ปริมาณสารสำหรับ elute คือ 3 มิลลิกรัม สภาวะการ derivatize คือ PFPA จำนวน 50 ไมโครลิตร diluent จำนวน 150 ไมโครลิตร อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที หลังจากนั้น ระเหยแห้ง และละลายกลับ ด้วย ethyl acetate ปริมาณ 100 ไมโครลิตร

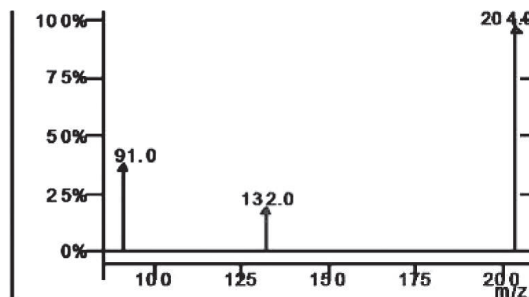
การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ยากลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะโดย LC-MS พบว่า สภาวะที่เหมาะสม ในการทดสอบ คือ ใช้ online SPE ชนิด Solex HRPcartridge ขนาด 2.1 × 20 มิลลิเมตร, guard column ชนิด acclaim trinity P1 อนุภาคขนาด 3 ไมโครเมตร 3.0 × 10 มิลลิเมตร และ analytical column ชนิด acclaim trinity P1 อนุภาคขนาด 3 ไมโครเมตร 3.0 × 100 มิลลิเมตร mobile phase สำหรับ elute คือ water ต่อ 50 mM ammonium formate pH 4.0 ด้วยระบบ gradient และ mobile phase สำหรับ loading คือ 0.02% HFBA ใน water ต่อ acetonitrile อัตราส่วน 90 ต่อ 10

#### 2. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจวิเคราะห์ยากลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะโดย GC-MS และ LC-MS

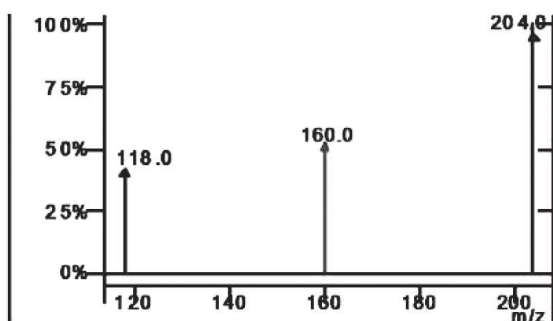
การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจวิเคราะห์ยากลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะโดย GC-MS ผลการตรวจสอบความเฉพาะเจาะจง พบว่า ไม่มีสารรบกวนจาก matrix blank ทั้ง 6 แหล่ง retention time (RT) ของ amphetamine phentermine และ methamphetamine ที่เวลา 4.54 4.67 และ 5.72 ตามลำดับ การแตก mass ครั้งที่ 1 ของ amphetamine มีค่า mass/charge (m/z) 190, 118 และ 91 phentermine มีค่า m/z 204, 132 และ 91 methamphetamine มีค่า m/z 204, 160 และ 118 (ภาพที่ 2) ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรง และช่วงของการวิเคราะห์ มีค่า 100-4,000 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัม สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของ methamphetamine และ amphetamine มีค่า 0.9972 และ 0.9961 accuracy และ precision ภายในวันเดียวกันและต่างวันมี ค่าเบี่ยงเบนน้อยกว่าร้อยละ 15 ทุกความเข้มข้น recovery มากกว่าร้อยละ 75 และ autosampler stability นาน 18 ชั่วโมง (ตารางที่ 2)



amphetamine 190.0, 118.0, 91.0



phentermine 204.0, 132.0, 91.0



ภาพที่ 2 chromatogram และ m/z ของ amphetamine, phentermine และ methamphetamine ของวิธีตรวจวิเคราะห์ยาในกลุ่ม amphetamine ในปัสสาวะ โดย GC-MS

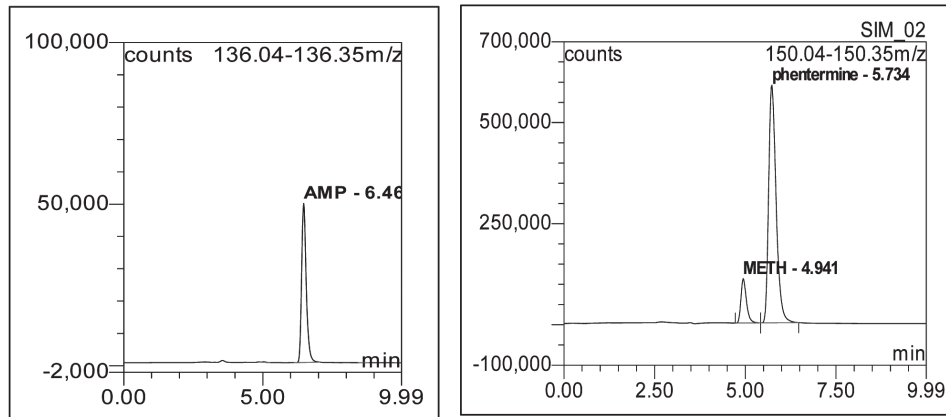
ตารางที่ 2 ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจวิเคราะห์ยาในกลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะโดย GC-MS

| รายการ                                                      | ผล                                                                                                                                                                                                                                                                          | เกณฑ์ตัดสิน                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|-------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ความเฉพาะเจาะจง Selectivity                                 | ไม่มี peak รบกวน จาก matrix blank ทั้ง 6 แหล่ง ที่ตำแหน่ง RT ของสารที่วิเคราะห์และ internal standard                                                                                                                                                                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>- ค่า response ที่ตำแหน่ง RT เดียวกัน กับ amphetamine และ methamphetamine ไม่มากกว่า 20% ของ area ที่ระดับ LLOQ</li> <li>- ค่า response ที่ตำแหน่ง RT เดียวกัน กับ phentermine ไม่มากกว่าร้อยละ 5 ของ area ของ phentermine ที่ระดับความเข้มข้น 1000 นาโนกรัม ต่อ มิลลิกรัม</li> </ul> |
| Carry over                                                  | ไม่มี peak รบกวนใน matrix blank หลังจาก การฉีด ULOQ                                                                                                                                                                                                                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>- ค่า response ที่ตำแหน่ง RT เดียวกัน กับ amphetamine และ methamphetamine ไม่มากกว่า 20% ของ area ที่ระดับ LLOQ</li> <li>- ค่า response ที่ตำแหน่ง RT เดียวกัน กับ phentermine ไม่มากกว่า 5% ของ area ของ phentermine ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัม</li> </ul>       |
| ความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and range) | <p>ช่วงของการวิเคราะห์ : 100-4,000 นาโนกรัม ต่อ มิลลิกรัม</p> <p>Correlation coefficient (r):</p> <p>Amphetamine: 0.9961</p> <p>Methamphetamine: 0.9972</p> <p>back-calculated value (%RD):</p> <p>Amphetamine: -4.96 ถึง 14.51</p> <p>Methamphetamine: - 5.76 ถึง 3.36</p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Correlation coefficient (r) <math>\geq 0.990</math></li> <li>- ค่า back-calculated value (%RD) ของแต่ละระดับความเข้มข้น ไม่เกิน 15% ของค่าจริง ยกเว้นที่ระดับ LLOQ ไม่เกิน 20% ของค่าจริง</li> </ul>                                                                                |
| ความแม่นยำ Accuracy (%RD)                                   | <p>Intra-day (Amp/Meth)</p> <p>Inter-day (Amp/Meth)</p>                                                                                                                                                                                                                     | ค่า %RD ของแต่ละระดับความเข้มข้น ไม่มากกว่า 15% ยกเว้นที่ระดับ LLOQ ไม่มากกว่า 20%                                                                                                                                                                                                                                           |
| LLOQ (100.0 ng/mL)                                          | 13.55/8.53                                                                                                                                                                                                                                                                  | 17.23/-6.82                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| QCL (250.0 ng/mL)                                           | -1.27/4.04                                                                                                                                                                                                                                                                  | 3.52/-6.16                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| QCM (2,500.0 ng/mL)                                         | -11.18/2.39                                                                                                                                                                                                                                                                 | -0.34/-1.57                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| QCH (4,000.0 ng/mL)                                         | 10.30/8.54                                                                                                                                                                                                                                                                  | 9.08/2.77                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| ความเที่ยง Precision (%CV)                                  | <p>Intra-day (Amp/Meth)</p> <p>Inter-day (Amp/Meth)</p>                                                                                                                                                                                                                     | ค่า %CV เฉลี่ยของแต่ละระดับความเข้มข้น ไม่เกิน 15% ยกเว้นที่ระดับ LLOQ ไม่มากกว่า 20%                                                                                                                                                                                                                                        |
| LLOQ (100.0 ng/mL)                                          | 2.48/0.87                                                                                                                                                                                                                                                                   | 3.84/12.57                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| QCL (250.0 ng/mL)                                           | 9.11/3.92                                                                                                                                                                                                                                                                   | 9.52/8.79                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| QCM (2,500.0 ng/mL)                                         | 2.45/1.54                                                                                                                                                                                                                                                                   | 10.04/6.79                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| QCH (4,000.0 ng/mL)                                         | 5.25/6.30                                                                                                                                                                                                                                                                   | 5.23/6.32                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |

ตารางที่ 2 ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจวิเคราะห์ยาในกลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะโดย GC-MS (ต่อ)

| รายการ                         | ผล                                                                            | เกณฑ์ตัดสิน                                                                                             |
|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| การกลับคืน<br>Recovery(%)      | Amphetamine: 75.40%<br>Methamphetamine: 76.89%<br>Phentermine: 91.88%         | ค่า %recovery ที่ต้องมีค่ามากกว่า 75%                                                                   |
| Short term stability (8h)      | Amphetamine: %RD: 1.01, %CV: 2.76<br>Methamphetamine: %RD: 4.68, %CV: 1.61    | ค่า %RD และ %CV ของความเข้มข้น<br>ที่คำนวณ ไม่เกิน 15%                                                  |
| Autosampler stability (18h)    | Amphetamine: %RD: -7.36, %CV: 5.51<br>Methamphetamine: %RD: -11.2, %CV: 2.8   | ค่า %RD และ %CV ของความเข้มข้น<br>ที่คำนวณ ไม่เกิน 15%                                                  |
| Long term stability (90d)      | Amphetamine: %RD: -6.79, %CV: 5.42<br>Methamphetamine: %RD: 10.55, %CV: 2.29  | ค่า %RD และ %CV ของความเข้มข้น<br>ที่คำนวณ ไม่เกิน 15%                                                  |
| Dry extract stability (24h)    | Amphetamine: %RD: -8.19, %CV: 4.49<br>Methamphetamine: %RD: -10.41, %CV: 4.90 | ค่า %RD และ %CV ของความเข้มข้น<br>ที่คำนวณ ไม่เกิน 15%                                                  |
| Stock solution stability (90d) | Amphetamine: -14.69%<br>Methamphetamine: -3.38%                               | เปรียบเทียบค่า response ระหว่าง RQC<br>ที่เตรียมใหม่และที่ระยะเวลาต่างๆ มีความ<br>แตกต่างกันไม่เกิน 20% |
| Dilution integrity             | amphetamine: %RD: 6.50, %CV: 5.22<br>methamphetamine: %RD: -0.73, %CV 2.66    | ค่า %RD และ %CV ของความเข้มข้น<br>ที่คำนวณ ไม่เกิน 15%                                                  |
| Matrix effect                  | Amphetamine: 13.56%<br>Methamphetamine: 12.51%                                | ค่า %CV ของ absolute matrix<br>factor จาก 6 แหล่งของ blank matrix<br>มีค่าไม่เกิน 15%                   |

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจวิเคราะห์ยาในกลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะโดย LC-MS ผลการตรวจสอบความเฉพาะเจาะจง พบว่า ไม่มีสารรบกวนจาก matrix blank ทั้ง 6 แหล่ง ตรวจวัด amphetamine ที่ RT 4.46 นาที m/z 136.04-136.35 methamphetamine ที่ RT 6.46 นาที m/z 150.04-150.35 และ phentermine ที่ RT 5.73 นาที m/z 150.04-150.35 (ภาพที่ 3) ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ มีค่า 300-2,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ของ methamphetamine และ amphetamine มีค่า 0.9928 และ 0.9971 accuracy และ precision ภายในวันเดียวกันและต่างวันมีค่าเบี่ยงเบนน้อยกว่าร้อยละ 15 ทุกความเข้มข้น และ autosampler stability นาน 35 ชั่วโมง (ตารางที่ 3)



ภาพที่ 3 chromatogram และ m/z ของ amphetamine, methamphetamine และ phentermine และของวิธีตรวจวิเคราะห์ยาในกลุ่ม amphetamine ในปัสสาวะ โดย LC-MS

ตารางที่ 3 ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจวิเคราะห์ยาในกลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะโดย LC-MS

| รายการ                                                      | ผล                                                                                                                                                                                                                                         | เกณฑ์ตัดสิน                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|-------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ความเฉพาะเจาะจง Selectivity                                 | ไม่มี peak รบกวน จาก matrix blank ทั้ง 6 แหล่ง ที่ตำแหน่ง RT ของสารที่วิเคราะห์และ internal standard                                                                                                                                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>- ค่า response ที่ตำแหน่ง RT เดียวกันกับ amphetamine และ methamphetamine ไม่มากกว่า 20% ของ area ที่ระดับ LLOQ</li> <li>- ค่า response ที่ตำแหน่ง RT เดียวกันกับ phentermine ไม่มากกว่าร้อยละ 5 ของ area ของ phentermine ที่ระดับความเข้มข้น 1000 นาโนกรัม ต่อ มิลลิกรัม</li> </ul> |
| Carry over                                                  | ไม่มี peak รบกวนใน matrix blank หลังจากการฉีด ULOQ                                                                                                                                                                                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>- ค่า response ที่ตำแหน่ง RT เดียวกันกับ amphetamine และ methamphetamine ไม่มากกว่า 20% ของ area ที่ระดับ LLOQ</li> <li>- ค่า response ที่ตำแหน่ง RT เดียวกันกับ phentermine ไม่มากกว่า 5% ของ area ของ phentermine ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 นาโนกรัม ต่อ มิลลิกรัม</li> </ul>     |
| ความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and range) | ช่วงของการวิเคราะห์: 300–2,000 นาโนกรัม ต่อ มิลลิกรัม<br>Correlation coefficient (r):<br>Amphetamine: 0.9971<br>Methamphetamine: 0.9928<br>back-calculated value (%RD):<br>Amphetamine: -3.92 ถึง 1.49<br>Methamphetamine: -10.35 ถึง 3.81 | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Correlation coefficient (r) <math>\geq 0.990</math></li> <li>- ค่า back-calculated value (%RD) ของแต่ละระดับความเข้มข้น ไม่เกิน 15% ของค่าจริง ยกเว้นที่ระดับ LLOQ ไม่เกิน 20% ของค่าจริง</li> </ul>                                                                              |
| ความแม่นยำ Accuracy (%RD)                                   | Intra-day (Amp/Meth)<br>Inter-day (Amp/Meth)                                                                                                                                                                                               | ค่า %RD ของแต่ละระดับความเข้มข้น ไม่มากกว่า 15% ยกเว้นที่ระดับ LLOQ ไม่มากกว่า 20%                                                                                                                                                                                                                                         |
| LLOQ (300.0 ng/mL)                                          | -12.90/-14.44                                                                                                                                                                                                                              | 16.11/-9.26                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| QCL (800.0 ng/mL)                                           | 2.26/3.59                                                                                                                                                                                                                                  | 3.75/4.93                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |

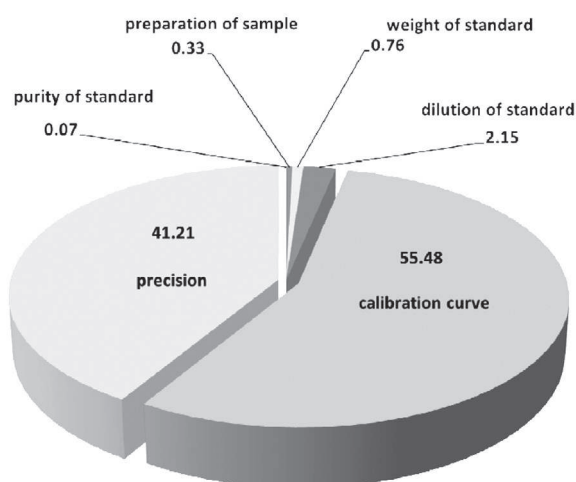


ตารางที่ 3 ผลการการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจวิเคราะห์ยาในกลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะโดย LC-MS (ต่อ)

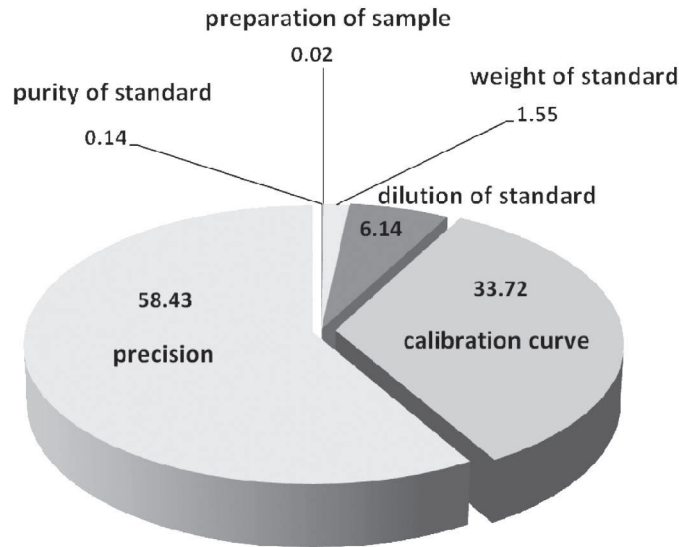
| รายการ                        | ผล                                                                         |                         | เกณฑ์ตัดสิน                                                                           |
|-------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| QCM (1,000.0 ng/mL)           | 9.01/7.43                                                                  | -2.22/6.17              |                                                                                       |
| QCH (1,500.0 ng/mL)           | 6.28/4.42                                                                  | 2.26/3.59               |                                                                                       |
| ความเที่ยง<br>Precision (%CV) | Intra-day<br>(Amp/Meth)                                                    | Inter-day<br>(Amp/Meth) | ค่า %CV เฉลี่ยของแต่ละระดับความเข้มข้น ไม่เกิน 15% ยกเว้นที่ระดับ LLOQ ไม่มากกว่า 20% |
| LLOQ (300.0 ng/mL)            | 2.26/3.59                                                                  | 10.42/6.37              |                                                                                       |
| QCL (800.0 ng/mL)             | 4.53/3.86                                                                  | 3.60/2.36               |                                                                                       |
| QCM (1,000.0 ng/mL)           | 4.29/3.13                                                                  | 10.43/3.12              |                                                                                       |
| QCH (1,500.0 ng/mL)           | 2.02/2.53                                                                  | 2.36/2.39               |                                                                                       |
| Autosampler stability (35h)   | Amphetamine: %RD: 4.14, %CV: 0.97<br>Methamphetamine: %RD: 4.44, %CV: 1.84 |                         | ค่า %RD และ %CV ของความเข้มข้นที่คำนวณ ไม่เกิน 15%                                    |
| Matrix effect                 | Amphetamine: 1.89%<br>Methamphetamine: 2.48%                               |                         | ค่า %CV ของ absolute matrix factor จาก 6 แหล่งของ blank matrix มีค่า ไม่เกิน 15%      |

### 3. การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด โดยคำนวณค่าความไม่แน่นอนที่เกิดจากแต่ละแหล่ง คำนวณความไม่แน่นอนรวม (combined standard uncertainty) และคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยาย (expanded uncertainty) ที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95 ( $k=2$ ) ค่าความไม่แน่นอนขยายในการวิเคราะห์โดย GC-MS ของการวิเคราะห์ methamphetamine มีค่า  $2.00 \pm 0.39$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร amphetamine มีค่า  $2.00 \pm 0.35$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าความไม่แน่นอนขยายในการวิเคราะห์โดย LC-MS ของการวิเคราะห์ methamphetamine มีค่า  $2.00 \pm 0.27$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร amphetamine มีค่า  $2.00 \pm 0.24$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อดำเนินการคำนวณสัดส่วนขององค์ประกอบแหล่งความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ methamphetamine ในปัสสาวะโดย GC-MS (ภาพที่ 4) และสัดส่วนขององค์ประกอบแหล่งความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ methamphetamine ในปัสสาวะโดย LC-MS (ภาพที่ 5)



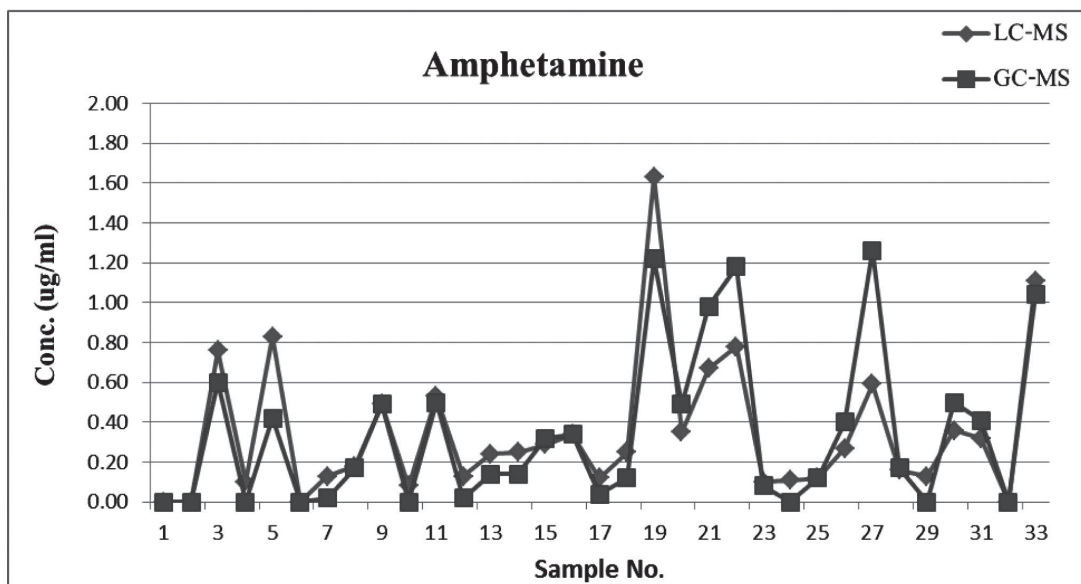
ภาพที่ 4 สัดส่วนขององค์ประกอบแหล่งความไม่แน่นอนของการตรวจวิเคราะห์ methamphetamine ในปัสสาวะโดย GC-MS



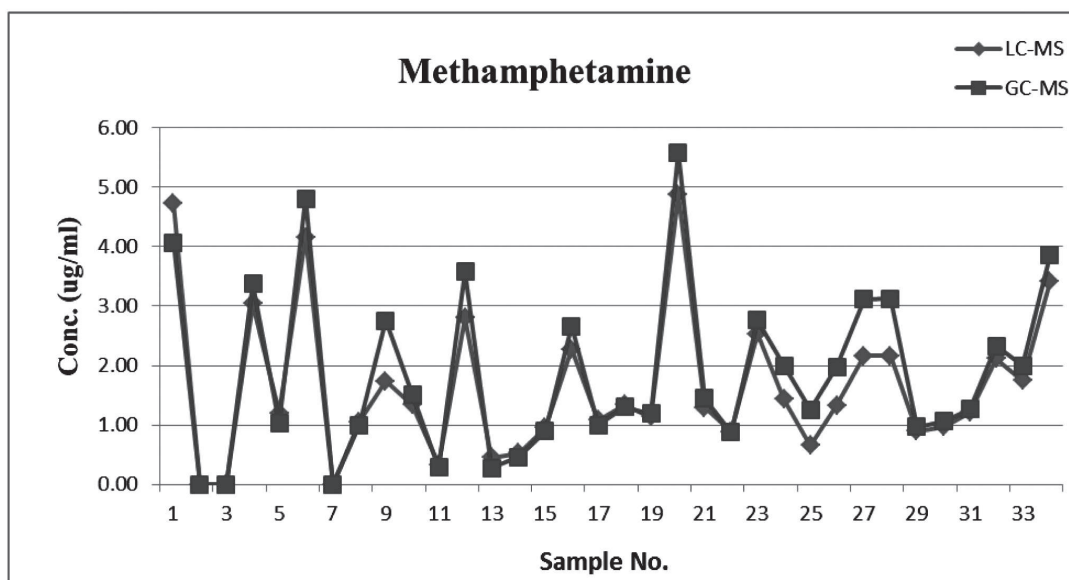
ภาพที่ 5 สัดส่วนขององค์ประกอบแหล่งความไม่แน่นอนของการตรวจวิเคราะห์ methamphetamine ในปัสสาวะ โดย LC-MS

#### 4. การเปรียบเทียบผลกับตัวอย่างจริง และตัวอย่างที่ทราบปริมาณ โดย GC-MS และ LC-MS

การตรวจตัวอย่างจริงที่สำคัญยาและวัตถุเสพติดได้รับ จำนวน 35 ตัวอย่าง (ภาพที่ 6 และ 7) ผลการตรวจตัวอย่างที่ทราบค่าจาก UNODC ซึ่งเป็นค่ากำหนดจากผู้ดำเนินการแผนทดสอบความชำนาญ (assigned value) จำนวน 2 ตัวอย่าง (ตารางที่ 4)



ภาพที่ 6 ผลการตรวจวิเคราะห์ amphetamine ในตัวอย่างปัสสาวะโดย GC-MS และ LC-MS



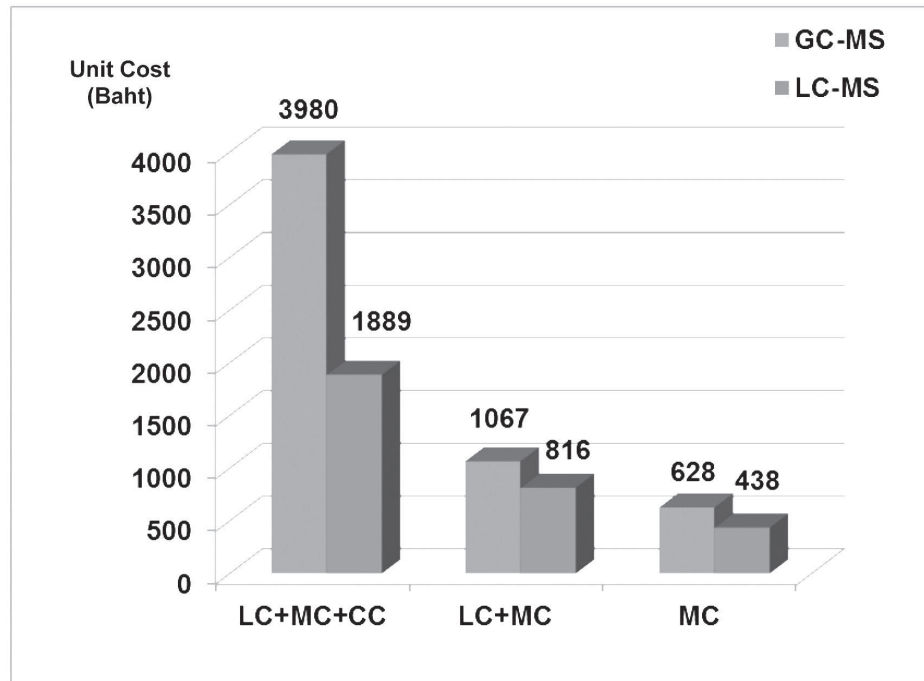
ภาพที่ 7 ผลการตรวจวิเคราะห์ methamphetamine ในตัวอย่างปัสสาวะโดย GC-MS และ LC-MS

ตารางที่ 4 ผลการตรวจตัวอย่างที่ทราบปริมาณ โดย GC-MS และ LC-MS

| ตัวอย่าง | GC-MS (ug/ml) |      | LC-MS (ug/ml) |      | ค่าจาก UNODC (ug/ml) |      |
|----------|---------------|------|---------------|------|----------------------|------|
|          | A             | M    | A             | M    | A                    | M    |
| 1        | -             | 2.00 | -             | 1.75 | -                    | 1.73 |
| 2        | 1.04          | 3.85 | 1.11          | 3.41 | 1.15                 | 3.45 |

## 5. การคำนวณต้นทุนต่อหน่วย

การคำนวณต้นทุนต่อหน่วยโดยใช้ข้อมูลพื้นฐานในปีงบประมาณ 2557 และประมาณ ตัวอย่าง 4,700 ตัวอย่าง ตามเป้าหมายในปี 2558 โดยคำนวณต้นทุนจาก 3 ส่วนคือ ค่าแรง ค่าวัสดุ และค่าลงทุน ทั้งทางตรงและทางอ้อม ด้วยวิธีการทางเศรษฐศาสตร์ (economic approach)<sup>(12)</sup> ประมาณอายุการใช้งานของครุภัณฑ์กำหนด 10 ปี ผลการคำนวณ ต้นทุนต่อหน่วยของการวิเคราะห์ยาในกลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะโดย GC-MS มีค่า 3,980 บาท การวิเคราะห์ยาในกลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะโดย LC-MS มีค่า 1,889 บาท แต่หากคิดเฉพาะต้นทุนค่าวัสดุ ต้นทุนต่อหน่วยของการวิเคราะห์ยาในกลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะโดย GC-MS และการวิเคราะห์ยาในกลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะโดย LC-MS มีค่า 628 บาท และ 438 บาท ตามลำดับ (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 ต้นทุนต่อหน่วยของการตรวจวิเคราะห์ยากลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะโดย GC-MS และ LC-MS

#### 6. การเปรียบเทียบวิธีตรวจวิเคราะห์ยากลุ่ม amphetamines โดย GC-MS และ LC-MS

การเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์ยากลุ่ม amphetamines โดย GC-MS และ LC-MS พบว่า ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทั้งสองเทคนิคผ่านเกณฑ์กำหนดทุกหัวข้อ ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างโดยเทคนิค GC-MS มีความยุ่งยากกว่าเทคนิค LC-MS ต้นทุนต่อหน่วยของเทคนิค LC-MS น้อยกว่า เทคนิค GC-MS รายละเอียด (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบวิธีตรวจวิเคราะห์ยากลุ่ม amphetamines โดย GC-MS และ LC-MS

| รายการ                                          | GC-MS                                                                        | LC-MS                                                                        |
|-------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| การตรวจสอบความถูกต้องของวิธี                    | ผ่านเกณฑ์กำหนดทุกหัวข้อ                                                      | ผ่านเกณฑ์กำหนดทุกหัวข้อ                                                      |
| ช่วงของการวิเคราะห์                             | 100–4,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร                                               | 300–2,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร                                               |
| ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง                        | ยุ่งยาก มีหลายขั้นตอน                                                        | ไม่ยุ่งยาก                                                                   |
| ความเฉพาะเจาะจง                                 | สูง                                                                          | สูง                                                                          |
| ผลการตรวจปริมาณตัวอย่างที่ทราบค่า (%difference) | น้อยกว่า ร้อยละ 13                                                           | น้อยกว่า ร้อยละ 3                                                            |
| ของเสียที่เกิดจากขั้นตอนการวิเคราะห์            | มีปริมาณน้อย                                                                 | มีปริมาณน้อย                                                                 |
| ค่าความไม่แน่นอนของการวัด                       | Amphetamine: $2.00 \pm 0.35$ ug/ml<br>Methamphetamine: $2.00 \pm 0.39$ ug/ml | Amphetamine: $2.00 \pm 0.27$ ug/ml<br>Methamphetamine: $2.00 \pm 0.24$ ug/ml |
| ต้นทุนต่อหน่วย                                  | LC+MC+CC = 3,980 บาท<br>LC+MC = 1,067 บาท<br>MC = 628 บาท                    | LC+MC+CC = 1,889 บาท<br>LC+MC = 816 บาท<br>MC = 438 บาท                      |

## วิจารณ์

ในการพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม amphetamines โดย GC-MS การเลือก SPE ที่เหมาะสมโดยเปรียบเทียบ SPE ชนิด strong cation-exchange cartridge ซึ่งมีความจำเพาะต่อสารกลุ่ม amines กับ Oasis cartridge ผลการทดสอบ ให้ค่า %recovery และ sensitivity ใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงเลือกใช้ Oasis cartridge เนื่องจากการใช้งานง่ายและสะดวก และราคาต่อหน่วยที่ถูกกว่า สำหรับการปรับปรุงกระบวนการ wash และ elute เพื่อให้ได้ recovery และ repeatability ที่ดีขึ้น โดยในขั้นตอนการ wash ไม่ใช้ methanol เนื่องจากสารกลุ่ม amphetamines ละลายได้ดีใน methanol ส่วนขั้นตอนการ elute ด้วย methanol การเพิ่มปริมาณ จาก 2 มิลลิลิตร เป็น 3 มิลลิลิตร ส่งผลให้ค่า recovery และ repeatability ดีขึ้นในการเลือกสาร derivatize ที่เหมาะสม ได้เลือกใช้ สารกลุ่ม perfluoroacylated acylation ซึ่งทำปฏิกิริยาได้ดีกับสารในกลุ่ม amphetamines จำนวน 2 ชนิดคือ TFAA และ PFPA โดยพิจารณาค่า repeatability และ sensitivity พบว่า PFPA ให้ค่า repeatability และ sensitivity ดีกว่า TFAA ด้วยเหตุผลที่ PFPA มีโครงสร้างที่โตกว่า และมีความจำเพาะเจาะจงสูงกว่า สำหรับ ขั้นตอนการ derivatize ปริมาณ PEPA ที่ใช้มีความเหมาะสมในการทำปฏิกิริยา การเพิ่มปริมาณ diluent เป็น 150 ไมโครลิตร ช่วยให้การละลายของสารที่สนใจได้ทั่วถึง ส่งผลให้ค่า repeatability และ sensitivity ดีขึ้นและการเพิ่มขั้นตอนการทำให้แห้งหลังจาก derivatize ก่อนการละลายกลับด้วย 100 ไมโครลิตร ทำให้ค่า repeatability ดีขึ้น

การพัฒนาวิธีการตรวจสารกลุ่ม amphetamines โดย LC-MS ขั้นตอนสำคัญคือการเลือกใช้ online SPE, guard column, analytical column สภาวะการ elute และ loading ที่เหมาะสม ในการทดสอบได้ปรับเปลี่ยน ชนิดของ SPE, guard column และ analytical column จาก packing material ชนิด C-18 เป็น SPE ชนิด hydrophobic reverse phase, guard column และ analytical column ชนิด anion exchange ซึ่งให้ค่า repeatability ที่ดี สำหรับการเลือกชนิดและอัตราส่วนของสารที่ใช้ในการ elute และ loading มีความสำคัญเป็นอย่างมาก ต้องใช้ความละเอียดรอบคอบในการดำเนินการ จึงจะได้สภาวะที่เหมาะสมที่สุด

เทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น เป็นเทคนิคที่มีความเฉพาะเจาะจงสูงทั้งสองเทคนิค ดังนั้นวิธีดังกล่าว สามารถตรวจได้ทั้งคุณภาพวิเคราะห์และปริมาณวิเคราะห์ คุณภาพวิเคราะห์ สำหรับเทคนิค LC-MS โดยการเปรียบเทียบค่า RT ของสารมาตรฐานและตัวอย่าง โดยค่า RT ต้องแตกต่างกันไม่น้อยกว่า 2<sup>(13)</sup> และค่า m/z ซึ่งเป็นค่าเฉพาะของสารแต่ละชนิด ส่วนเทคนิค GC-MS นอกจากจะเปรียบเทียบค่า RT ของสารมาตรฐานและตัวอย่างแล้ว สารจะแตกตัวครั้งที่ 1 ให้ค่า m/z และ m/z ratio ซึ่งเป็นค่าเฉพาะของสารแต่ละชนิด ช่วงของการทดสอบ โดย GC-MS คือ 300-4,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งกว้างกว่าช่วงการทดสอบของ LC-MS แต่อย่างไรก็ตาม สำหรับตัวอย่างที่มีค่ามากกว่าช่วงการทดสอบ สามารถตรวจวิเคราะห์ได้โดยการ dilute ด้วย certified drugs free urine ในอัตราส่วน 1:1 1:9 และ 1:39 การทดสอบความคงสภาพในบางหัวข้อไม่จำเป็นต้องทดสอบทั้งสองเทคนิค เนื่องจากความคงสภาพของสารที่ไม่มีความเชื่อมโยงกับวิธีการทดสอบจะมีค่าเช่นเดียวกัน เช่น long term stability และ stock standard stability ส่วนระยะเวลาของการทดสอบ autosampler stability คำนึงถึง ระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์ของงานประจำ การเตรียมตัวอย่างในการวิเคราะห์โดย LC-MS มีขั้นตอนที่ไม่ยุ่งยาก คือ นำตัวอย่างป่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูง และนำเข้าเครื่อง LC-MS ที่มีระบบการสกัดสารแบบ online ในแต่ละครั้งของการตรวจวิเคราะห์จึงสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างในปริมาณมาก การทดสอบความคงสภาพในหัวข้อนี้จึงทดสอบเป็นเวลา 35 ชั่วโมง แตกต่างจากการวิเคราะห์โดย GC-MS ที่มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่ค่อนข้างยุ่งยาก คือต้องสกัด SPE ระเหยแห้งและ derivatize ในแต่ละครั้งในการวิเคราะห์จึงไม่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างในปริมาณที่มากได้

ถึงแม้สำนักยาและวัตถุเสพติดจะใช้เครื่อง automate SPE ในการเตรียมตัวอย่าง แต่การเตรียมตัวอย่างยังคงต้องใช้เวลา จึงทำการศึกษา ความคงสภาพในหัวข้อนี้ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง สำหรับการตรวจวิเคราะห์โดย LC-MS ซึ่งสกัดตัวอย่างแบบ online อาจมีข้อสงสัยในเรื่องการปนเปื้อนของตัวอย่าง การทดสอบหัวข้อ carry over สามารถตอบคำถามในประเด็นนี้ได้

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดการตรวจวิเคราะห์โดย LC-MS มีค่าน้อยกว่า GC-MS ในการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดคำนึงถึงแหล่งข้อมูลของความไม่แน่นอนในแต่ละวิธี ในการวิเคราะห์โดย GC-MS แหล่งความไม่แน่นอนมากที่สุดคือ จากค่า calibration curve มีอัตราส่วนถึง 55.48 รองลงมาคือ จากค่า precision ซึ่งเป็นค่าที่ได้จากเปอร์เซ็นต์ของการเบี่ยงเบนที่มีค่ามากที่สุด ของการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน มีค่า 42.21 ค่าความไม่แน่นอนที่น้อยที่สุดคือ purity of standard มีค่า 0.07 แตกต่างจากการวิเคราะห์โดย LC-MS อัตราส่วนความไม่แน่นอนจาก precision มีค่ามากที่สุดคือ 58.43 รองลงมาคือจาก calibration curve 33.72 ค่าความไม่แน่นอนของ preparation of sampler มีค่าน้อยที่สุดคือ 0.02 เนื่องจากขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่ไม่ซับซ้อน การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดประมาณที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เนื่องจากปริมาณที่ตรวจพบมีผลกระทบค่าความไม่แน่นอนของการวัด ดังนั้นเพื่อให้สามารถเปรียบเทียบค่าความไม่แน่นอนของการวัดได้ จึงประมาณค่าที่ ตรวจพบที่ 2.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าค่าความไม่แน่นอนจากเทคนิค GC-MS มีค่าสูงกว่า LC-MS เล็กน้อย ค่าความไม่แน่นอนของการวัด methamphetamine โดย GC-MS มีค่าร้อยละ 19.5 ของค่าที่ตรวจวัด และ LC-MS มีค่าร้อยละ 13.5 ของค่าที่ตรวจวัด ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับเกณฑ์ยอมรับในหัวข้อทดสอบ precision เนื่องจากในการตรวจวิเคราะห์สามารถตรวจวิเคราะห์ทั้ง amphetamine และ methamphetamine ด้วยขั้นตอนเดียวกัน ดังนั้นปัจจัยที่มีผลกระทบต่อความไม่แน่นอนของการวัดของ amphetamine จึงเป็นไปในแนวทางเดียวกับ methamphetamine

การคำนวณต้นทุนต่อหน่วยในการศึกษาครั้งนี้วัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบต้นทุนต่อหน่วยของการตรวจวิเคราะห์ยาในกลุ่ม amphetamines โดย GC-MS และ LC-MS ดังนั้นจึงอาจไม่สะท้อนต้นทุนที่แท้จริงทั้งหมดของสำนักยาและวัตถุเสพติด แต่อย่างไรก็ตามในการคำนวณครั้งนี้ได้คิดทั้งค่าต้นทุนทางตรงและทางอ้อม คำนวณอายุการใช้งานของครุภัณฑ์เป็นเวลา 10 ปี และอายุการใช้งานของสิ่งก่อสร้างเป็นเวลา 25 ปี เมื่อคำนวณต้นทุนต่อหน่วยทั้ง 3 แหล่ง คือ ค่าแรง ค่าวัสดุวิทยาศาสตร์ และค่าลงทุน การตรวจวิเคราะห์โดย LC-MS มีค่าร้อยละ 48 ของการตรวจวิเคราะห์โดย GC-MS เมื่อคำนวณต้นทุนจาก 2 แหล่ง คือ ค่าแรงและค่าลงทุน การตรวจวิเคราะห์โดย LC-MS มีค่าร้อยละ 77 ของการตรวจวิเคราะห์โดย GC-MS และมีการตรวจวิเคราะห์โดย LC-MS มีค่าร้อยละ 70 ของการตรวจวิเคราะห์โดย GC-MS เมื่อคำนวณเฉพาะค่าวัสดุอย่างเดียว จะเห็นว่าค่าต้นทุนต่อหน่วยของการตรวจวิเคราะห์โดย GC-MS มีค่าสูงกว่า LC-MS เนื่องจากในการตรวจวิเคราะห์โดย GC-MS มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างหลายขั้นตอน และต้องใช้ SPE ซึ่งมีราคาค่อนข้างสูงในการ clean up ตัวอย่าง ในการเปรียบเทียบต้นทุนต่อหน่วยของการตรวจวิเคราะห์จึงอาจพิจารณาเฉพาะค่าวัสดุ เนื่องจากค่าใช้จ่ายอื่นๆ คำนวณในพื้นฐานต้นทุนเดียวกัน

เมื่อเปรียบเทียบการตรวจวิเคราะห์โดย GC-MS และ LC-MS ทั้งสองวิธีสามารถใช้ในการตรวจวิเคราะห์ยาในกลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ผลการตรวจวิเคราะห์ ตัวอย่างจริงจากผู้ต้องสงสัยที่ส่งตรวจที่สำนักยาและวัตถุเสพติด ทั้งสองวิธีมีค่าใกล้เคียงกัน การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่ทราบค่าซึ่งเป็นตัวอย่างที่เลือกจากการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญจาก UNODC ทั้งสองวิธีให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่มีค่าใกล้เคียงกับค่าจริง ค่าความแตกต่างของผลการตรวจวิเคราะห์โดย GC-MS มีค่าน้อยกว่า ร้อยละ 13 และความแตกต่างของผลการตรวจวิเคราะห์โดย LC-MS มีค่าน้อยกว่า ร้อยละ 3 ซึ่งน้อยกว่าค่าเกณฑ์กำหนดของการทดสอบในหัวข้อ precision



## สรุป

วิธีการตรวจวิเคราะห์ยาในกลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะ โดย GC-MS และ LC-MS ที่พัฒนาขึ้น สามารถตรวจคุณภาพวิเคราะห์และปริมาณวิเคราะห์ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสอดคล้องกับข้อกำหนดของกฎหมาย จึงเป็นทางเลือกให้หน่วยงานที่เกี่ยวข้องนำไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ยาในกลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะ ตามความเหมาะสมและความพร้อมของแต่ละหน่วยงาน

## กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้อำนวยการสำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่กรุณาให้การสนับสนุนทรัพยากรและให้คำแนะนำ ในการศึกษาวิจัย และขอบคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายปฏิบัติการวัตถุเสพติด 1 สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ช่วยจัดเตรียมอุปกรณ์และตัวอย่าง

## เอกสารอ้างอิง

1. สำนักงานคณะกรรมการป้องกันและปราบปรามยาเสพติด. แผนยุทธศาสตร์การป้องกันและแก้ไขปัญหายาเสพติด พ.ศ. 2558-2562. กรุงเทพฯ: สำนักยุทธศาสตร์; 2558.
2. สำนักงานคณะกรรมการป้องกันและปราบปรามยาเสพติด. ผลการปราบปรามยาเสพติดทั่วประเทศ ประจำปี 2556. กรุงเทพฯ: สำนักปราบปรามยาเสพติด; 2557.
3. พระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 135 (พ.ศ.2539) ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 113 ตอนพิเศษ 23 ง (ลงวันที่ 16 สิงหาคม 2539).
4. พระราชบัญญัติป้องกันและปราบปรามยาเสพติด พ.ศ. 2519 ประกาศคณะกรรมการป้องกันและปราบปรามยาเสพติด ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 117 ตอนพิเศษ 76 ง (ลงวันที่ 4 สิงหาคม 2543).
5. ยาบ้า (methamphetamine). [online]. 2012 [cited 2015 July 17]; [2 screens]. Available from: URL: <http://narcotic.fda.moph.go.th/welcome/?p=2527>
6. สำนักยาและวัตถุเสพติด. คู่มือและแนวทางการจัดซื้อชุดทดสอบสารเสพติดในปัสสาวะ. พิมพ์ครั้งที่ 2. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2554.
7. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Guidance for industry bioanalytical method validation. [online]. 2001 [cited 2014 Mar 20]; [25 screens]. Available from: URL: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070107.pdf>
8. Viswanathan CT, Bansal S, Booth B, DeStefano AJ, Rose MJ, Sailstad J, et.al. Workshop/conference report-quantitative bioanalytical methods validation and implementation: best practices for chromatographic and ligand binding assays. The AAPS J 2007; 9(1): E30-42.
9. Bansal S, DeStefano A. Key elements of bioanalytical method validation for small molecules. The AAPS J 2007; 9(1): E109-14.
10. EURACHEM/CITAC Guide CG 4: Quantifying uncertainty in analytical measurement. 3<sup>rd</sup> ed. Austria: EURACHEM; 2012.
11. อักษร ธีรวิบูลย์. การวิเคราะห์ต้นทุนในการดูแลสุขภาพ. กรุงเทพฯ: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล; 2544.
12. คณพศ ชินชนะโชค. การวิเคราะห์ต้นทุน-ปริมาณ-กำไรและจุดคุ้มทุน. [ออนไลน์]. [สืบค้น 1 ส.ค. 2557]; [9 หน้า]. เข้าถึงได้จาก : URL: [http://www.sdte.ac.th/subject\\_view\\_content.php?no=288](http://www.sdte.ac.th/subject_view_content.php?no=288)
13. WADA technical document-TD2010IDCR. [online]. 2010 [cited 2014 Mar 25]; [9 screens]. Available from: URL: [https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/WADA\\_TD2010IDCRv1.0\\_Identification%20Criteria%20for%20Qualitative%20Assays\\_May%2008%202010\\_EN.doc.pdf](https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/WADA_TD2010IDCRv1.0_Identification%20Criteria%20for%20Qualitative%20Assays_May%2008%202010_EN.doc.pdf)

# New Approach for Analysis of Amphetamines in Urine

**Orapin Tanunkat Sumate Thiangthum and Rungtip Jeotee**

*Bureau of Drug and Narcotic, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000 Thailand.*

**ABSTRACT** Analytical results of amphetamines in urine are significant evidence of the legal proceedings. The methods used in the analysis must be highly effective. Bureau of Drug and Narcotic developed two fast, accurate and precise gas chromatography-mass spectrophotometry (GC-MS) and liquid chromatography - mass spectrophotometry (LC-MS) methods for qualitative and quantitative determination of amphetamines in urine. Amphetamines were extracted from urine by solid phase extraction method. The proposed method proved to be specific and selective without interference from urine matrixes. For GC-MS method, the linearity and range were 100-4,000 nanograms per milliliter for amphetamine and methamphetamine with correlation coefficients greater than 0.99. Mean percentage recoveries for amphetamine and methamphetamine were 75.40 and 76.89, respectively. Inter-day accuracy for all drugs range from 0.34 to 17.23 % RD. Inter-day precision for all drugs range from 3.84 to 12.57 % CV. The uncertainties at a confidence level of 95 were  $2.00 \pm 0.39$  micrograms per milliliter and  $2.00 \pm 0.35$  micrograms per milliliter, respectively. For LC-MS techniques, the linearity and range were 300-2,000 nanograms per milliliter for amphetamine and methamphetamine with correlation coefficients greater than 0.99. Inter-day accuracy for all drugs range from 2.22 to 16.11 % RD. Inter-day precision for all drugs range from 2.36 to 10.43 % CV. The uncertainties at a confidence level of 95 were  $2.00 \pm 0.27$  micrograms per milliliter and  $2.00 \pm 0.24$  micrograms per milliliter, respectively. The unit cost of material cost for the analysis by GC-MS and LC-MS are 628 baht and 438 baht, respectively. Therefore, the developed methods are applicable for analysis of amphetamines in urine with in the assigned level of narcotic acts.

**Key words:** Method Validation, Amphetamines, Methamphetamine, GC-MS, LC-MS