บทที่ 4

อภิปรายผลและสรุปผลการวิจัย

4.1 อภิปรายผล

4.1.1 สภาวะของเฮดสเปสโซลิด-เฟสไมโครเอ็กซแทรกชัน (HS-SPME) และแก๊สโครมาโทกราฟี–แมสสเปกโทรเมตรี (GC-MS)

การตรวจวิเคราะห์หาสารแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนด้วยเครื่องมือแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโทรเมตรี (GC/MS) ในงานวิจัยนี้ได้ใช้โปรแกรมอุณหภูมิตามหัวข้อ 2.4.1 โดยได้ทำการปรับปรุงการตั้งค่าการเก็บข้อมูลแบบ (SIM mode) สำหรับไอออนเบสพีคและไอออนอ้างอิงของอนุพันธ์แอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีน และ MA-d5 จากผลการทดลองพบว่าสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ในครั้งนี้ สามารถแยกสารแอมเฟตามีนได้ที่เวลา 6.44 นาที มีการแตกตัวของไอออน คือ 44, 91 และ 65 m/z เมทแอมเฟตามีนที่เวลา 6.95 นาที มีการแตกตัวของไอออน คือ 58, 91 และ 65 m/z และ MA-d5 ที่เวลา 6.93 นาที มีการแตกตัวของไอออน คือ 62, 92 และ 63 m/z เมื่อเปรียบเทียบกับที่รายงานไว้ก่อนหน้านี้โดยมนต์นที (Monnatee *et al.*, 2008) ในการศึกษานี้จะแตกต่างกันคือ ใช้ MA-d5 เป็นสารมาตรฐานภายใน จึงต้องทดสอบสภาวะการตรวจวิเคราะห์ของ MA-d5 เพื่อเก็บข้อมูลการวิเคราะห์ของ RT และการเก็บข้อมูลไอออนแบบ SIM mode พร้อมทั้งทดสอบสภาวะสำหรับตรวจวิเคราะห์แอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนในเส้นผม และเมื่อเปรียบเทียบกับการรายงายของ Gentili และคณะ (Gentili *et al.*, 2004) พบว่าแอมเฟตามีนมีการแตกตัวของไอออน คือ 44, 91 และ 65 m/z และเมทแอมเฟตามีนมีการแตกตัวของไอออน คือ 58, 91 และ 77 ซึ่งโดยส่วนมากจะสอดคล้องกับผลการทดลองในครั้งนี้

4.1.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของขั้นตอนการสกัดเส้นผม

ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดด้วยสารละลายที่เป็นกรด (HCl) ในช่วงเวลา 20, 30, 40, 50 และ 60 นาที ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) โดยผู้วิจัยเลือกใช้ระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดเส้นผม คือ 60 นาที เนื่องจากให้ผลการตรวจเมทแอมเฟตามีนสูงกว่าระยะเวลาการสกัดอื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Gentili และคณะ (Gentili *et al.*, 2004) ที่รายงานว่าการใช้ระยะเวลาในการสกัด 60 นาที มีความเหมาะสมสำหรับการ

ตรวจวิเคราะห์แอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนมีค่า LOD เท่ากับ 1.29 และ 0.37 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม ตามลำดับ ซึ่งเป็นความไวที่ดีเหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารเสพติดในกลุ่มแอมเฟตามีน การเพิ่มระยะเวลาของการสกัดเส้นผม จะช่วยดึงสารที่สะสมอยู่ภายในเส้นผมออกมาได้มากขึ้นโดยไม่มี background peak (Nakahara, 1995; Nakahara, 1999) ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของอุณหภูมิที่ใช้สกัดเส้นผมด้วยสารละลายที่เป็นกรดในช่วงอุณหภูมิ 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส จากผลการทดสอบพบว่าปริมาณเมทแอมเฟตามีนที่ตรวจวัดได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) โดยผู้วิจัยเลือกใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดเส้นผม คือ 60 องศาเซลเซียส เนื่องจากการเพิ่มอุณหภูมิของการสกัดเส้นผม จะเพิ่มการย่อยสลายสารที่สะสมอยู่ภายในเส้นผมออกมาได้มากขึ้น จึงทำให้มีพีครบกวนมาก (Nakahara, 1995; Pragst *et al.*, 2006) ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายกรดสำหรับการสกัดเส้นผมในช่วงความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0 และ 1.5 โมลาร์ จากผลการทดสอบพบว่าปริมาณเมทแอมเฟตามีนที่ตรวจวัดได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) โดยผู้วิจัยเลือกใช้ความเข้มข้นของสารละลายกรดที่เหมาะสมในการสกัดเส้นผม คือ 1 โมลาร์ เนื่องจากให้ผลการตรวจเมทแอมเฟตามีนสูงกว่าความเข้มข้น 0.1 และ 1.5 โมลาร์ และมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ของการตรวจวัดเมทแอมเฟตามีนน้อยกว่าความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Gentili และคณะ (Gentili *et al.*, 2004) ที่รายงานว่าการสกัดเส้นผมผู้เสพโคเคนด้วยสารละลายกรดความเข้มข้น 1 โมลาร์ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับสารละลายกรดความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ทำให้ผลการตรวจวิเคราะห์โคเคนเพิ่มขึ้น 60% นอกจากนี้ความเข้มข้นของสารละลายกรดมีความสำคัญต่อค่าความเป็นกรด-เบส ทั้งหมดของตัวอย่าง (total pH) ก่อนนำไปตรวจวิเคราะห์ ผู้วิจัยได้วัดค่า total pH ของสารละลายกรดที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0 และ 1.5 โมลาร์ มีค่าเท่ากับ 12.5, 12, 12 และ 11.5 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของมนต์นที (Monnatee *et al.*, 2008) ที่รายงานว่าค่า total pH 12-12.5 ให้ผลการตรวจเมทแอมเฟตามีนที่สูง และมีความแตกต่างจากค่า total pH ที่ต่ำกว่า 12 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สำหรับผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดด้วยสารละลายที่เป็นด่าง (NaOH) ในช่วงเวลา 20, 30, 40, 50 และ 60 นาที จากผลการทดสอบพบว่าปริมาณเมทแอมเฟตามีนที่ตรวจวัดได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) โดยผู้วิจัยเลือกใช้ระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดเส้นผม คือ 30 นาที เนื่องจากให้ผลการตรวจเมทแอมเฟตามีนสูงกว่าระยะเวลาการสกัดอื่นๆ ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของอุณหภูมิที่ใช้สกัดเส้นผมด้วยสารละลายที่เป็นด่างในช่วงอุณหภูมิ 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส จากผลการทดสอบพบว่าปริมาณเมทแอมเฟตามีนที่ตรวจวัดได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

โดยผู้วิจัยเลือกใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดเส้นผม คือ 70 องศาเซลเซียส เนื่องจากให้ผลการตรวจเมทแอมเฟตามีนสูงกว่าอุณหภูมิการสกัด 60 องศาเซลเซียส และการเพิ่มอุณหภูมิของการสกัดเส้นผม จะทำให้การย่อยสลายสารที่สะสมอยู่ภายในเส้นผมออกมาได้มากขึ้น จึงทำให้มีพีครบกวนมาก (Nakahara, 1995; Pragst *et al.*, 2006; Nishida et al, 2006) ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายด่างสำหรับการสกัดเส้นผมในช่วงความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0 และ 1.5 โมลาร์ จากผลการทดสอบพบว่าปริมาณเมทแอมเฟตามีนที่ตรวจวัดได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) เนื่องจากการสกัดที่ความเข้นข้ม 0.5 โมลาร์ ให้ผลการตรวจเมทแอมเฟตามีนสูงกว่าความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ และมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการตรวจวัดเมทแอมเฟตามีนน้อยกว่าความเข้มข้น 0.1 และ 1.5 โมลาร์ ดังนั้นผู้วิจัยเลือกใช้ความเข้มข้นของสารละลายด่างที่เหมาะสมในการสกัดเส้นผม คือ 0.5 โมลาร์

ในการศึกษาสภาวะการสกัดที่เหมาะสมด้วยสารละลายกรดและด่างนี้ ได้ทำตามวิธีในหัวข้อ 2.4.1 โดยเลือกสภาวะการสกัดที่เหมาะสมด้วยสารละลายกรด คือ เลือกใช้ระยะเวลาในการสกัด 60 นาที อุณหภูมิในการสกัดเลือกใช้ 60 องศาเซลเซียส และความเข้มข้นของสารละลายกรดเลือก 1 โมลาร์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Gentili และคณะ (Gentili *et al.*, 2004) ได้ทำการเลือกสภาวะการสกัดที่เหมาะสมด้วยสารละลายกรดเพื่อใช้สกัดสารเสพติดในเส้นผมเช่นเดียวกัน และสภาวะการสกัดที่เหมาะสมด้วยสารละลายด่าง เลือกใช้ระยะเวลาในการสกัด 30 นาที อุณหภูมิในการสกัดเลือกใช้ 70 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Nishida และคณะ (Nishida *et al.*, 2006) ได้ทำการเลือกสภาวะอุณหภูมิการสกัดที่เหมาะสมด้วยสารละลายด่างสำหรับตรวจวิเคราะห์แอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนในเส้นผมเช่นเดียวกัน ส่วนความเข้มข้นของสารละลายด่างเลือก 0.5 โมลาร์

4.1.3 การศึกษาสารเตรียมอนุพันธ์ (derivatizing agents) ที่เหมาะสมในการตรวจหาแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนในเส้นผม

การศึกษาครั้งนี้เพื่อเปรียบเทียบสารเตรียมอนุพันธ์ 5 ชนิด ได้แก่ HFBA, HFBCl, TFAA และ MBTFA ร่วมกับ MSTFA+1%TMCS โดยจะคัดเลือกจากสารเตรียมอนุพันธ์ที่ให้ผลการตรวจวัดแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนที่สูงด้วยวิธี direct injection GC-MS ก่อนนำสารเตรียมอนุพันธ์ที่ได้มาคัดเลือกร่วมกับสภาวะการสกัดกรดและด่างที่เหมาะสมด้วยวิธี HS-SPME GC-MS เพื่อหาสภาวะการสกัดและสารเตรียมอนุพันธ์ที่เหมาะสมสำหรับพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์แอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนในเส้นผมต่อไป

1) ศึกษาเปรียบเทียบสารเตรียมอนุพันธ์ (Derivatizing Agents) ที่เหมาะสมในการตรวจหาแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนด้วยวิธี direct injection GC-MS

เมื่อนำผลการตรวจหาแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธีการตามข้อ 2.4.3.1 ที่ผ่านการเตรียมอนุพันธ์ทั้ง 5 ชนิด มาเปรียบเทียบกัน พบว่าปริมาณแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนที่เตรียมอนุพันธ์ด้วยสาร HFBA ให้ผลการวิเคราะห์มากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Thurman และคณะ (Thurman *et al.*, 1992) ที่รายงานว่าสาร HFBA เหมาะสมสำหรับการเตรียมอนุพันธ์สารกลุ่มแอมเฟตามีน รองลงมาคือสาร HFBCl เมื่อคำนวณค่าทางสถิติพบว่าปริมาณแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนที่ตรวจพบจากสาร HFBA มีค่ามากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสาร HFBCl ที่ค่า $p < 0.05$ ทั้งในแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีน อย่างไรก็ตามสาร TFAA และ MBTFA ร่วมกับ MSTFA+1%TMCS ไม่สามารถสามารถตรวจพบแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จึงได้เพิ่มระดับความเข้มข้นของแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนที่ใช้ทดสอบสารเป็น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าปริมาณแอมเฟตามีนที่เตรียมอนุพันธ์ด้วย MBTFA ร่วมกับ MSTFA+1%TMCS มีค่ามากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสาร TFAA ที่ค่า $p < 0.05$ ส่วนปริมาณ MA-TFA ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากผลการศึกษานี้ สารเตรียมอนุพันธ์ที่เหมาะสมสำหรับตรวจหาอนุพันธ์แอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนตามวิธีการในข้อ 2.4.3.1 โดยใช้วิธี direct injection GC-MS จึงคัดเลือกสารเตรียมอนุพันธ์ที่ให้ผลการตรวจหาปริมาณของสารอนุพันธ์แอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนที่สูง เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลทางสถิติด้วยการวิเคราะห์ทางสถิติชนิด One-way ANOVA ผู้วิจัยพบว่าสาร HFBA และ HFBCl มีความเหมาะสมสำหรับการประยุกต์ใช้ในเทคนิค SPME

2) ศึกษาเปรียบเทียบสาร HFBA, HFBCl และ HFBCl:HFBA (8:2 v/v) ร่วมกับสภาวะการสกัดด้วยสารละลายกรดและด่างที่เหมาะสมในการตรวจหาแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนด้วยวิธี HS-SPME GC-MS

ในการศึกษาผลการตรวจหาแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนที่ความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามวิธีการในข้อ 2.4.3.2 โดยใช้สารเตรียมอนุพันธ์ทั้ง 3 ชนิด มาเปรียบเทียบกัน โดยใช้สภาวะที่เหมะสมของสารละลายด่างในการสกัดซึ่งใช้ระยะเวลาในการสกัด 30 นาที อุณหภูมิในการสกัดเลือกใช้ 70 องศาเซลเซียส และความเข้มข้นของสารละลายด่างเลือก 0.5 โมลาร์ พบว่าภายใต้สภาวะการสกัดด้วยสารละลายด่างปริมาณแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนที่เตรียมอนุพันธ์ด้วย HFBCl:HFBA (8:2 v/v) ให้ผลการวิเคราะห์มากที่สุด รองลงมาคือสาร HFBCl และ HFBA ตามลำดับ เมื่อคำนวณค่าทางสถิติ พบว่าปริมาณแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนที่เตรียมอนุพันธ์

ด้วย HFBCl:HFBA (8:2 v/v) มีค่ามากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสาร HFBCl ที่ค่า $p < 0.05$ โดยทั้งแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนที่เตรียมอนุพันธ์ด้วย HFBCl:HFBA (8:2 v/v) และ HFBCl มีค่ามากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสาร HFBA ที่ค่า $p < 0.05$ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Huang และคณะ (Huang et al., 2002) ที่รายงานผลการตรวจวิเคราะห์แอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะ ด้วยการใช้สารผสม HFBCl:HFBA (8:2 v/v) ให้ผลการตรวจที่ดีกว่าการใช้ HFBA เพียงอย่างเดียว

สำหรับการเปรียบเทียบกันโดยใช้สภาวะที่เหมะสมของสารละลายกรดในการสกัดซึ่งใช้ระยะเวลาในการสกัด 60 นาที อุณหภูมิในการสกัดเลือกใช้ 60 องศาเซลเซียส และความเข้มข้นของสารละลายกรดเลือก 1.0 โมลาร์ พบว่าภายใต้สภาวะการสกัดด้วยสารละลายกรดระดับของแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนที่เตรียมอนุพันธ์ด้วย HFBCl ให้ผลการวิเคราะห์มากที่สุด รองลงมาคือสารผสม HFBCl:HFBA (8:2 v/v) ตามลำดับ เมื่อคำนวณค่าทางสถิติพบแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนที่เตรียมอนุพันธ์ด้วย HFBCl ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสาร HFBCl:HFBA (8:2 v/v) ที่ค่า $p > 0.05$ อย่างไรก็ตามภายใต้สภาวะการสกัดด้วยสารละลายกรดไม่สามารถตรวจพบปริมาณแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนที่เตรียมอนุพันธ์ด้วย HFBA

จากการศึกษานี้สารเตรียมอนุพันธ์ที่เหมาะสมสำหรับตรวจหาแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนตามภายใต้สภาวะการสกัดด้วยสารละลายด่าง คือ สารผสม HFBCl:HFBA (8:2 v/v) จากรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ โดย Huang และคณะ (Huang *et al.*, 2002) รายงานการตรวจวิเคราะห์เมทแอมเฟตามีนและแอมเฟตามีนในปัสสาวะด้วยสาร HFBCl:HFBA (8:2 v/v) โดยใช้วิธี HS-SPME GCMS และในปี 2005 โดย Chia และคณะ (Chia *et al.*, 2005) รายงานการการตรวจวิเคราะห์กลุ่มแอมเฟตามีนในปัสสาวะด้วยสาร HFBCl:HFBA (8:2 v/v) โดยใช้วิธี HS-SPME GC-MS แต่ยังไม่เคยมีการรายงานการตรวจวิเคราะห์ในเส้นผมมาก่อน สำหรับสารเตรียมอนุพันธ์ที่เหมาะสมภายใต้สภาวะการสกัดด้วยสารละลายกรด คือ สาร HFBCl การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับ HFBCl ก่อนหน้านี้ มีเพียง Liu และคณะ (Liu *et al.*, 2001) ที่รายงานผลการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มแอมเฟตามีนในเส้นผมภายใต้สภาวะการสกัดด้วยสารละลายด่างร่วมกับการเตรียมอนุพันธ์ด้วย HFBCl โดยใช้วิธี HS-SPME GCMS เท่านั้น

3) เปรียบเทียบสภาวะของสาร HFBCl ภายใต้สภาวะการสกัดด้วยสารละลายกรด และสารผสม HFBCl:HFBA (8:2 v/v) ภายใต้สภาวะการสกัดด้วยสารละลายด่างในการตรวจหาแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนในเส้นผม

ศึกษาผลการตรวจหาแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนในเส้นผม ตามวิธีการในข้อ 2.4.3.3 โดยใช้สาร HFBCl ภายใต้สภาวะการสกัดด้วยสารละลายกรดที่ระยะเวลาในการสกัด

60 นาที อุณหภูมิในการสกัดเลือกใช้ 60 องศาเซลเซียส และความเข้มข้นของสารละลายกรดเลือก 1.0 โมลาร์ เปรียบเทียบกับสารผสม HFBCl:HFBA (8:2 v/v) ภายใต้สภาวะการสกัดด้วยสารละลายด่างที่เวลาในการสกัด 30 นาที อุณหภูมิในการสกัดเลือกใช้ 70 องศาเซลเซียส และความเข้มข้นของสารละลายด่างเลือก 0.5 โมลาร์ โดยตรวจวิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้นเทียบเท่า 0.2 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม ซึ่งอ้างอิงตามเกณฑ์ที่ยอบรับในการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มแอมเฟตามีนของ SoHT ที่ระดับความเข้มข้น 0.2 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม พบว่าแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนที่เตรียมอนุพันธ์ด้วย HFBCl:HFBA (8:2 v/v) ภายใต้สภาวะการสกัดด้วยสารละลายด่าง มีปริมาณมากกว่าแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนที่เตรียมอนุพันธ์ด้วย HFBCl ภายใต้สภาวะการสกัดด้วยสารละลายกรด เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบโดยใช้สถิติการวิเคราะห์ พบว่าแอมเฟตามีนที่เตรียมอนุพันธ์ด้วย HFBCl:HFBA (8:2 v/v) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ HFB-AP ที่เตรียมอนุพันธ์ด้วย HFBCl ที่ค่า $p > 0.05$ แต่การตรวจวัดเมทแอมเฟตามีนที่เตรียมอนุพันธ์ด้วย HFBCl:HFBA (8:2 v/v) พบว่ามีค่ามากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเมทแอมเฟตามีนที่เตรียมอนุพันธ์ด้วย HFBCl ที่ค่า $p < 0.05$

ดังนั้นผู้วิจัยได้เลือกวิธีการตรวจวิเคราะห์แอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนในเส้นผม โดยใช้การสกัดด้วยสารละลายด่างที่ระยะเวลาในการสกัด 30 นาที อุณหภูมิในการสกัดเลือกใช้ 70 องศาเซลเซียส และความเข้มข้นของสารละลายด่างเลือก 0.5 โมลาร์ และเตรียมอนุพันธ์ด้วยสารผสม HFBCl:HFBA (8:2 v/v) เป็นวิธีการสำหรับพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์แอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนในเส้นผม โดยนำวิธีการวิเคราะห์นี้ไปทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ก่อนที่จะตรวจวิเคราะห์เส้นผมผู้เสพยาบ้าทั้ง 45 ราย

4.1.4 การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation)

1) การหาค่าความเป็นเส้นตรง (linearity) และช่วงของการวัด (working range)

ในการทดสอบนี้ สร้างกราฟมาตรฐานร่วมของแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนจากการทดลองเบื้องต้นพบว่าสามารถนำกราฟมาตรฐานไปทดสอบโดยคำนวณระดับของแอมเฟตามีนและ เมทแอมเฟตามีนในตัวอย่างเส้นผมผู้เสพยาบ้าได้อย่างถูกต้อง โดยไม่มีรบกวนจากการสร้างกราฟร่วมกัน

จากการศึกษากราฟมาตรฐานของแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟาตมีนในเส้นผม พบว่ามีช่วงของการวัดที่ระดับความเข้มข้น 0.2-10 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมของเส้นผม จากช่วงของการวัดมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แอมเฟตามีน เท่ากับ 0.9971 และเมทแอมเฟตามีน เท่ากับ 0.9992 ซึ่งวิธีนี้มีค่าความเป็นเส้นตรงและค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ไม่แตกต่างกับวิธีการวิเคราะห์

แอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนในเส้นผมที่เตรียมอนุพันธ์ด้วย HFBCl ของ Liu และคณะ (Liu *et al.*, 2001) ที่พบว่ากราฟมาตรฐานของแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีน มีช่วงของการวัดที่ความเข้มข้น 0.1-100 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมของเส้นผม และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีน เท่ากับ 0.9997 และ 0.9993 ตามลำดับ

2) การหาค่าความแม่น (accuracy) และความเที่ยง (precision) ของการวิเคราะห์

ผลการทดสอบความแม่นและความเที่ยงของแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนในเส้นผม ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง ของกราฟมาตรฐานเท่ากับความเข้มข้นที่ 0.5, 2.5 และ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม สำหรับแอมเฟตามีนมีค่าความแม่นในการวิเคราะห์ของการทดสอบภายในวันเดียวกันเท่ากับ 6.79-12.12% และการทดสอบระหว่างวันเท่ากับ 6.37-14.93% มีค่าความเที่ยงในการทดสอบภายในวันเดียวกันเท่ากับ 96.50-110.36% และการทดสอบระหว่างวันเท่ากับ 93.82-100.68% ส่วนเมทแอมเฟตามีนมีค่าความแม่นในการวิเคราะห์ของการทดสอบภายในวันเดียวกันเท่ากับ 2.19-2.63% และการทดสอบระหว่างวันเท่ากับ 1.76-4.00% มีค่าความเที่ยงในการทดสอบภายในวันเดียวกันเท่ากับ 96.16-109.55% และการทดสอบระหว่างวันเท่ากับ 96.89-109.32% ซึ่งค่าความแม่นและความเที่ยงของแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนในการศึกษาอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ตามเกณฑ์ขององค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (US FDA, 2001) ที่กำหนดไว้สำหรับการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ตัวอย่างชีววัตถุ ให้มีค่าไม่เกิน ±15% ทั้งการทดสอบภายในวันเดียวกันและการทดสอบระหว่างวัน

3) การหาค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection; LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation; LOQ)

ในการทดสอบนี้เป็นการศึกษาความไวของวิธีการตรวจวิเคราะห์ซึ่งจะใช้ความเข้มข้นในระดับต่ำคือ 0.10, 0.15 และ 0.2 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม ในการทดสอบค่า LOD และ LOQ ผู้วิจัยจึงสร้างกราฟมาตรฐานของแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนสำหรับการคำนวณระดับของแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนที่ระดับความเข้มข้น 0.2-5 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมของเส้นผม เนื่องจากการทดลองเบื้องต้นพบว่าการใช้กราฟมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 0.2-10 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมของเส้นผม เมื่อนำไปคำนวณระดับของแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนจากตัวอย่างเส้นผมที่ความเข้มข้นระดับต่ำกว่า 0.5 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมของเส้นผม พบว่ามีผลการคำนวณระดับความเข้มข้นคลาดเคลื่อนไปจากความเป็นจริง โดยพิจารณาจากค่าความแม่นและความเที่ยงสูงเกิน 20% เนื่องจากความเข้มข้นที่ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม ของกราฟมาตรฐานมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการตรวจวิเคราะห์ 7 ครั้ง เท่ากับ 10(±0.26) นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม ซึ่งส่งผลกระทบต่อการนำกราฟมาตรฐานมาคำนวณความเข้มข้นในระดับต่ำๆ

ดังนั้นในการศึกษาค่า LOD และ LOQ ผู้วิจัยจึงเลือกใช้กราฟมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 0.2-5 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมของเส้นผม ซึ่งมีความเหมาะสมในการคำนวณระดับของแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนได้อย่างถูกต้อง

จากผลการทดสอบค่า LOD และ LOQ ของแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนในเส้นผม กำหนดความเข้มข้นที่ทดสอบเท่ากับ 0.10, 0.15 และ 0.2 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม โดยทดสอบภายในวันเดียวกัน (Intra-day) จำนวนสิบครั้งในแต่ละความเข้มข้น เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์แอมเฟตามีนที่ความเข้มข้น 0.15 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม พบว่าค่า %CV และ %RR มีค่าเท่ากับ 17.11% และ 150.50% ตามลำดับ ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นอันดับแรกที่มีค่าเกิน 20% และพิจารณาจาก mass ratio ของแอมเฟตามีนที่ความเข้มข้น 0.15 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม พบว่ามีค่าเท่ากับ 100, 65, 60 ซึ่งตรงกับเอกลักษณ์ของแอมเฟตามีน ดังนั้นค่า LOD ของแอมเฟตามีนเท่ากับ 0.15 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม ส่วนแอมเฟตามีนที่ความเข้มข้น 0.20 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม เมื่อพิจารณาจากค่า %CV และ %RR มีค่าเท่ากับ 14.13% และ 117.35% ตามลำดับ ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นที่มีค่าไม่เกิน 20% และพิจารณาจาก mass ratio ของแอมเฟตามีนที่ความเข้มข้น 0.20 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม พบว่ามีค่าเท่ากับ 100, 67, 50 ซึ่งตรงกับเอกลักษณ์ของแอมเฟตามีน ดังนั้นค่า LOQ ของแอมเฟตามีนเท่ากับ 0.20 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม สำหรับแอมเฟตามีนที่ความเข้มข้น 0.10 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม ไม่สามารถตรวจวัดได้

พิจารณาเมทแอมเฟตามีนที่ความเข้มข้น 0.10 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม พบว่าค่า %CV และ %RR มีค่าเท่ากับ 5.72% และ 71.25% ตามลำดับ ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นอันดับแรกที่มีค่าเกิน 20% และพิจารณาจาก mass ratio ของเมทแอมเฟตามีนที่ความเข้มข้น 0.10 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม มีค่าเท่ากับ 100, 30, 40 ซึ่งตรงกับเอกลักษณ์ของเมทแอมเฟตามีน ดังนั้นค่า LOD ของเมทแอมเฟตามีนเท่ากับ 0.10 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม ส่วนเมทแอมเฟตามีนที่ความเข้มข้น 0.15 และ 0.20 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม เมื่อพิจารณาจากค่า %CV และ %RR ซึ่งมีค่าเท่ากับ 4.68% กับ 88.77% และ 3.78% กับ 92.58% ตามลำดับ ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นที่มีค่าไม่เกิน 20% ทั้งสองความเข้มข้น และพิจารณาจาก mass ratio ของเมทแอมเฟตามีนที่ความเข้มข้น 0.15 และ 0.20 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม มีค่าเท่ากับ 100, 27, 16 และ 100, 28, 16 ตามลำดับ ซึ่งตรงกับเอกลักษณ์ของเมทแอมเฟตามีน ดังนั้นจึงกำหนดให้ค่า LOQ ของเมทแอมเฟตามีนเท่ากับ 0.15 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม

จากการทดสอบนี้ ค่า LOD และ LOQ ของแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนในการศึกษาอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ตามเกณฑ์ขององค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (US FDA, 2001) ที่กำหนดไว้สำหรับการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ในตัวอย่างชีววัตถุ ให้มี

ค่าไม่เกิน □20% ดังนั้นผู้วิจัยได้เลือกค่า LOD ของแอมเฟตามีนเท่ากับ 0.15 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม และค่า LOQ ของแอมเฟตามีนเท่ากับ 0.20 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม ส่วนค่า LOD ของเมทแอมเฟตามีนเท่ากับ 0.10 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม และค่า LOQ ของเมทแอมเฟตามีนเท่ากับ 0.15 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม ซึ่งผลการทดสอบค่า LOD และ LOQ ของการศึกษานี้เป็นไปตามเกณฑ์ของ Society of Hair Testing (SoHT) และ The Substance Abuse and Mental Health Services Administration (SAMHSA) ที่กำหนดไว้ว่าการวิเคราะห์แอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนในเส้นผม ควรจะสามารถตรวจพบสารได้ถึงระดับ 0.2 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม (SoHT, 2004) และ 0.3 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม (SAMHSA, 2002) ตามลำดับ

4.1.5 การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนในตัวอย่างเส้นผมจากผู้ที่เสพยาบ้า

1) ปริมาณแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนในตัวอย่างเส้นผมจากผู้ที่เสพยาบ้า

ปริมาณแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนในเส้นผมของผู้เสพยาบ้าในการศึกษาครั้งนี้พบว่าใน 45 ราย ตรวจพบแอมเฟตามีนในเส้นผม 15 ราย คิดเป็นร้อยละ 33.33 สาเหตุที่ตรวจไม่พบทุกรายอาจเนื่องมาจากกลุ่มผู้เสพยาบ้าอาจมีการใช้สารในปริมาณไม่มากหรือเสพเป็นครั้งคราว และระดับความเข้มข้นของแอมเฟตามีนที่ตรวจพบ คือ 0.22-2.76 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม ซึ่งค่าแอมเฟตามีนที่ตรวจพบอยู่ในช่วงความเข้มข้นที่มากกว่าที่รายงานโดย Yahata และคณะ (Yahata *et al.*, 2006) ที่ตรวจพบความเข้มข้นแอมเฟตามีนในเส้นผมของผู้เสพเมทแอมเฟตามีนอยู่ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.01-0.5 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม

สำหรับระดับเมทแอมเฟตามีนในเส้นผมของกลุ่มนี้ ตรวจพบเมทแอมเฟตามีนในเส้นผม 21 ราย คิดเป็นร้อยละ 46.67 ระดับความเข้มข้นของเมทแอมเฟตามีนที่ตรวจพบ คือ 0.20-20.06 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม

การตรวจพบความเข้มข้นแอมเฟตามีนในเส้นผมของผู้เสพยาบ้าจำนวน 15 ราย ในระดับความเข้มข้น 0.22-2.76 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม เป็นตัวอย่างเส้นผมเดียวกับที่ตรวจพบความเข้มข้นเมทแอมเฟตามีน 15 ราย จากที่ตรวจพบเมทแอมเฟตามีนทั้งหมด 21 ราย ซึ่งอยู่ในระดับความเข้มข้น 1.36-20.06 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม เมื่อนำมาคำนวณหาระดับความเข้มข้นแอมเฟตามีนต่อระดับความเข้มข้นเมทแอมเฟตามีนของทั้ง 15 ราย ที่ตรวจพบทั้งแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีน พบว่ามีค่าเฉลี่ยของระดับความเข้มข้นแอมเฟตามีนต่อระดับความเข้มข้นเมทแอมเฟตามีนของทั้ง 15 ราย เท่ากับ 0.15 และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับ 0.06 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lee และคณะ (Lee *et al.*, 2009) ที่รายงานว่าความสัมพันธ์ระหว่างแอมเฟตามีนต่อ

เมทแอมเฟตามีนจะอยู่ในช่วง 0.01-1.04 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.11 และนำข้อมูลที่ได้มาบ่งชี้ถึงความรุนแรงของการใช้ยาเสพติด ดังนั้นผลของอัตราส่วนแอมเฟตามีนต่อเมทแอมเฟตามีนในการศึกษานี้ สามารถนำไปยืนยันผลตรวจเส้นผมของผู้เสพยาบ้าได้อย่างน่าเชื่อถือ

2) ศึกษาหาความสอดคล้องกัน (measure of agreement) ของผลการตรวจวัดปริมาณแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนจากตัวอย่างเส้นผมจากผู้ที่เสพยาบ้าในกลุ่มเดียวกัน ที่ตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีการศึกษานี้กับวิธีการศึกษาที่รายงานก่อนหน้านี้ (Monnatee *et al.*, 2008)

จากวิธีการศึกษานี้ตรวจพบแอมเฟตามีนในเส้นผมจำนวน 15 รายจากทั้งหมด และวิธีการศึกษาที่รายงานก่อนหน้านี้ไม่สามารถตรวจพบแอมเฟตามีนในเส้นผมในกลุ่มตัวอย่างนี้ เมื่อนำมาศึกษาความสอดคล้องกันระหว่างผลการตรวจวิเคราะห์แอมเฟตามีนที่ตรวจด้วยวิธีการศึกษานี้กับวิธีการศึกษาที่รายงานก่อนหน้านี้ ปรากฏว่าไม่มีความสอดคล้องกันของวิธีการตรวจวัดปริมาณแอมเฟตามีนทั้ง 2 วิธี (Kappa = 0) เนื่องจากวิธีการศึกษาที่รายงานก่อนหน้านี้โดย มนต์นที (Monnatee *et al.*, 2008) มีค่า LOQ ของแอมเฟตามีนเท่ากับ 2.5 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม จึงไม่สามารถตรวจหาแอมเฟตามีนในระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่า 2.5 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม ได้ แต่วิธีการศึกษานี้ มีความไวสูงจึงสามารถนำมาตรวจหาแอมเฟตามีนที่ระดับความเข้มข้น 0.2 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม ตามเกณฑ์ของ SoHT ที่กำหนดไว้ว่าการตรวจวิเคราะห์หาสารเมทแอมเฟตามีนและแอมเฟตามีนในเส้นผม ดังนั้นวิธีการศึกษานี้จึงสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการบ่งชี้ถึงการเสพเมทแอมเฟตามีน จากการหาความสัมพันธ์ระหว่างแอมเฟตามีนต่อเมทแอมเฟตามีน

ในการศึกษาหาความสอดคล้องกันระหว่างปริมาณระดับเมทแอมเฟตามีนในเส้นที่ตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีการศึกษานี้กับวิธีการศึกษาที่รายงานก่อนหน้านี้ พบว่าวิธีการศึกษานี้ตรวจพบเมทแอมเฟตามีนในเส้นผมจำนวน 21 รายจากทั้งหมด และวิธีการศึกษาที่รายงานก่อนหน้านี้ตรวจพบเมทแอมเฟตามีนในเส้นผมจำนวน 17 รายจากทั้งหมด เมื่อนำมาศึกษาความสอดคล้องกันระหว่างผลการตรวจวิเคราะห์เมทแอมเฟตามีนที่ตรวจด้วยวิธีการศึกษานี้กับวิธีการศึกษาก่อนหน้านี้ ปรากฏว่ามีความสอดคล้องกันของวิธีการตรวจวัดปริมาณเมทแอมเฟตามีนทั้ง 2 วิธี เนื่องจากค่า Kappa = 0.819 ดังนั้นการตรวจหาระดับเมทแอมเฟตามีนในเส้นผมด้วยด้วยวิธีการศึกษานี้กับวิธีการศึกษาที่รายงานก่อนหน้านี้ ไม่มีความแตกต่างกันจึงสามารถใช้ตรวจวิเคราะห์หาเมทแอมเฟตามีนทดแทนกันได้ เนื่องค่าการทดสอบด้วย Cohen's Kappa Statistic มีค่ามากกว่า 0.8

4.2 สรุปผลการวิจัย

การพัฒนาเทคนิคการตรวจเมทแอมเฟตามีนและแอมเฟตามีนในเส้นผม โดยใช้การสกัดเส้นผมด้วยสารละลายด่างและเตรียมอนุพันธ์ด้วย HFBCl:HFBA (8:2 v/v) คู่ควบการใช้ Automated HS-SPME GC-MS วิธีการนี้ช่วยลดความยุ่งยากของขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเส้นผมและเพิ่มความไวในการตรวจวิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้น 0.2 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดไว้โดย SoHT และ SAMHSA วิธีการนี้สามารถประยุกต์ใช้ในงานประจำที่ต้องตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเส้นผมจำนวนครั้งละมากๆได้ และต้องการวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่มีความไวสูง

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเส้นผมจากกลุ่มตัวอย่างผู้ที่เสพยาบ้า ผลการตรวจวิเคราะห์พบว่าตรวจพบแอมเฟตามีนคิดเป็นร้อยละ 33.33 และเมทแอมเฟตามีนคิดเป็นร้อยละ 46.67 เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการศึกษาที่รายงานก่อนหน้านี้ที่ตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างกลุ่มเดียวกัน ไม่พบความสอดคล้องกันในการตรวจพบแอมเฟตามีนของทั้ง 2 วิธีนี้ ส่วนการตรวจพบเมทแอมเฟตามีนของทั้ง 2 วิธี มีความสอดคล้องกัน ในการศึกษานี้จึงสามารถหาความสัมพันธ์ระหว่างแอมเฟตามีนต่อเมทแอมเฟตามีน เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการบ่งชี้ถึงการเสพเมทแอมเฟตามีนได้

ข้อเสนอแนะจากการทดลองนี้ควรลดปริมาณของเส้นผมที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ เพื่อปรับปรุงความไวของเทคนิคการวิเคราะห์นี้ให้ดียิ่งขึ้น