Original Article

นิพนธ์ต้นฉบับ

# Stability of methamphetamine concentrations in bile samples under experimental conditions

# ความคงตัวของความเข้มข้นเมทแอมเฟตามีนในตัวอย่างน้ำดีภายใต้สภาวะการทดลอง

**Aonsutee Jannim, B.Sc.*, Wichai Wongchanapai, M.D.*., Somboon Thamtakerngkit, M.D.*, Worranut Uiprasertkul, M.Sc.***

** Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700, Thailand.*

**อรสุธี จันทร์นิ่ม, วท.บ.†, วิชัย วงศ์ชนะภัย, พ.บ.†, สมบูรณ์ ธรรมเถกิงกิจ, พ.บ.†, วรนุช อุยประเสริฐกุล, วท.ม.†**

*†ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทย์ศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10700, ประเทศไทย.*

## Abstract

**Objective:** Bile is an alternative specimen that can be used as a comprehensive toxicological analysis in worldwide forensic laboratories. This study, bile samples were prepared for studying stability and optimization of extraction conditions in an analysis of methamphetamine.

**Materials and Methods:** Methamphetamine was spiked into bile to make five concentrations: 2, 5, 10, 15 and 20 µg/ml, respectively, then it was extracted by dichloromethane in various conditions. These samples were stored at 4 ºC and room temperature (RT) in different fixation periods (0, 1, 3, 5, 7, 14, 28, 60 and 180 day) for studying of stability. After all, these samples were extracted with dichloromethane before being analyzed by gas chromatography-nitrogen phosphorus detector (GC-NPD).

**Results:** Extraction by dichloromethane in the basic condition was the most appropriate method, while studying for its stability revealed that methamphetamine concentration had no significant difference in both storage temperatures (4ºC and RT) in the case of the comparison to those of the initial day within each temperature (p-value ≥ 0.05). The concentration also showed no significant loss between 4ºC and RT. The study demonstrated that no significant change for methamphetamine analysis from bile during 6-monthed storage period.

**Conclusion:** Methamphetamine in bile could be stored in either 4ºC or RT for up to 6 months (180 days) without significant change.

**Keywords:** Bile extraction, Forensic toxicology, Methamphetamine concentration stability

## บทคัดย่อ

**วัตถุประสงค์**: น้ำดีเป็นสิ่งส่งตรวจที่สามารถนำมาใช้ในการตรวจสารเสพติดในทางนิติเวชศาสตร์ ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการตรวจวิเคราะห์เมทแอมเฟตามีน เพื่อศึกษาเสถียรภาพของความเข้มข้นเมทแอมเฟตามีนในน้ำดี รวมทั้งหาวิธีการสกัดที่เหมาะสมสำหรับเมทแอมเฟตามีนในน้ำดี

**วัสดุและวิธีการศึกษา**: ทำการเติมเมทแอมเฟตามีนในน้ำดีและเจือจางด้วยน้ำเกลือให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ (2, 5, 10, 15 และ 20 µg/ml) จากนั้นทำการสกัดน้ำดีด้วย dichloromethane ที่ในสภาวะต่างๆ และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 ºC และอุณหภูมิห้อง ในระยะเวลาต่างๆ (0, 1, 3, 5, 7, 14, 28, 60 และ 180 วัน) จากนั้นทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-ไนโตรเจนฟอสฟอรัสดีเท็คเตอร์

**ผลการศึกษา**: พบว่าการสกัดน้ำดีที่ถูกเจือจางด้วยน้ำเกลือด้วย dichloromethane ในสภาวะด่างนั้น เป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุด เมื่อเก็บรักษาน้ำดีที่มีเมทแอมเฟตามีนทั้งในอุณหภูมิ 4 ºC และอุณหภูมิห้อง พบว่าระดับของเมทแอมเฟตามีนไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับวันแรกของการทดลอง (p-value ≥ 0.05) จากทั้งสองสภาวะการทดลอง และเมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของเมทแอมเฟตามีนที่ได้เก็บรักษาไว้ระหว่างสองอุณหภูมิ ก็พบว่าความเข้มขันเมทแอมเฟตามีนไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p-value ≥ 0.05) เช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังมีความคงที่ตลอดการเก็บรักษาเป็นเวลา 6 เดือนด้วย

**สรุป**: แสดงให้เห็นว่าเมทแอมเฟตามีนสามารถคงตัวอยู่ในน้ำดีที่เป็นตัวอย่างส่งตรวจทั้งการเก็บรักษาไว้ที่ 4 ºC และอุณหภูมิห้อง ได้ในจนถึงระยะเวลาประมาณ 180 วัน (6 เดือน)

**คำสำคัญ**: การสกัดสารจากน้ำดี, นิติพิษวิทยา, ความคงตัวของความเข้มข้นของเมทแอมเฟตามีน

## บทนำ

เมทแอมเฟตามีนเป็นสารเสพติดประเภทกระตุ้นระบบประสาทส่วนกลาง ถูกใช้กันอย่างแพร่หลายทั่วโลก อีกทั้งยังเป็นสารเสพติดที่ผลิตได้ง่าย[1] ซึ่งส่งผลให้เกิดปัญหาต่อสังคม ด้วยเหตุนี้จึงทำให้มีการศึกษาหาวิธีการตรวจวิเคราะห์เมทแอมเฟตามีนในสิ่งส่งตรวจต่างๆเพิ่มมากขึ้น โดยมากเลือดและปัสสาวะ เป็นสิ่งส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการนิติเวช ที่ถูกนำมาใช้ตรวจวิเคราะห์เมทแอมเฟตามีน เนื่องจากเป็นสิ่งส่งตรวจที่เก็บและนำมาสกัดได้ง่าย แต่อย่างไรก็ตาม การตรวจวิเคราะห์จากสิ่งส่งตรวจเหล่านี้ ยังมีข้อจำกัดอยู่หลายประการ เช่น ปริมาณสิ่งส่งตรวจไม่เพียงพอต่อการสกัด รวมไปถึงในบางกรณีอาจไม่สามารถตรวจพบสารเสพติดได้จากปัสสาวะและเลือด แต่สามารถที่จะตรวจพบในสิ่งส่งตรวจน้ำดี อีกทั้งยังพบว่าระดับความเข้มข้นของสารเสพติดมีระดับความเข้มข้นที่สูงกว่าในเลือด[2] ด้วยเหตุนี้ น้ำดีจึงเป็นสิ่งส่งตรวจหนึ่งที่มีประโยชน์ สามารถนำมาใช้ตรวจวิเคราะห์ร่วมกับสิ่งส่งตรวจชนิดอื่นๆ ทำให้ผลการตรวจวิเคราะห์นั้นครอบคลุมมากยิ่งขึ้น

ในปัจจุบันการตรวจวิเคราะห์สารเสพติดในทางห้องปฏิบัติการนิติเวชศาสตร์ ต้องมีขั้นตอนและกระบวนการในการจัดการกับสิ่งส่งตรวจซึ่งรวมถึงขั้นตอนของการเก็บรักษาสิ่งส่งตรวจนั้นๆ เช่นในกรณีที่มีวันหยุดยาว รวมถึงเก็บรักษาเพื่อทำการตรวจวิเคราะห์ซ้ำหรือต้องการตรวจสารอื่นๆ เพิ่มเติม โดยมีระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาประมาณ180 วัน (6เดือน) หรือหลังจากเริ่มดำเนินการชันสูตร จนเสร็จสิ้นกระบวนการตามขั้นตอนของประมวลกฎหมายวิธีพิจารณาความอาญามาตรา 150 โดยการเก็บรักษาสิ่งส่งตรวจไว้เป็นระยะเวลานาน อาจ

ส่งผลทำให้สารเกิดการเสื่อมสลาย ส่งผลต่อการแปลผลการตรวจวิเคราะห์ได้ โดยการทดสอบความคงตัวของสารนั้น ถือเป็นวิธีที่สามารถอธิบายความแตกต่างระหว่างผลการตรวจวิเคราะห์ซ้ำกับผลในการตรวจวิเคราะห์ครั้งแรกได้ และยังสามารถช่วยกำหนดช่วงระยะเวลารวมถึงสภาวะที่เหมาะสมในการเก็บรักษาได้ ด้วยเหตุนี้การศึกษาความคงตัวของเมทแอมเฟตามีนในตัวอย่างน้ำดี จึงมีความสำคัญอย่างมาก ต่อการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการทางนิติเวชศาสตร์

## วัสดุและวิธีการศึกษา

ในการศึกษานี้ ได้แบ่งวิธีการศึกษาไว้ 3 ขั้นตอนหลัก คือ

1.ศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดเมทแอมเฟตามีนจากตัวอย่างน้ำดีโดยมีขั้นตอนสรุปได้ดังนี้

1.1.เปรียบเทียบวิธีการสกัดระหว่างการทำ hydrolysis และไม่ทำการ hydrolysis โดยการนำตัวอย่างน้ำดีปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วยน้ำเกลือในอัตราส่วน 1 ต่อ 3 (1.5 มิลลิลิตร) เขย่าให้เข้ากันและปรับค่า pH ให้มีค่าเป็นด่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.5 N ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันอีกครั้งประมาณ 1 นาที จากนั้นทำการสกัดโดยการเติม dichloromethane ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เทสารละลายผสมลงในกรวยแยกและนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลานำมาแยกเอาสารละลายในส่วนด้านล่าง จากนั้นนำไประเหยให้แห้งก่อนนำมาละลายกลับด้วยเมทานอลปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วสกัดเมทแอมเฟตามีนจากตัวอย่างน้ำดีด้วยสารละลาย acetonitrile โดยแบ่งตัวอย่างสกัดในสองสภาวะคือ ผ่านการ hydrolysis และไม่ผ่านการ hydrolysis จากนั้นจึงนำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

1.2.เปรียบเทียบสารละลายที่ใช้ในการสกัดระหว่าง สารละลาย acetonitrile และ สารละลายผสม dichloromethane: heptane: 2-propanol โดยทำการสกัดเมทเอมเฟตามีนจากตัวอย่างน้ำดีด้วยสารละลาย acetonitrile และ สารละลายผสม dichloromethane: heptane: 2-propanol ภายใต้สภาวะที่เป็นกรด เบส และกลาง จากนั้นจึงนำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-FID

1.3.เปรียบเทียบสารละลายที่ใช้ในการสกัดระหว่างสารละลาย Acetonitrile และ สารละลายผสม dichloromethane: heptane: 2-propanol ภายใต้สภาวะการตกตะกอนโปรตีนด้วย $ZnSO_4$ (1:1) เพื่อขจัดและลดสิ่งรบกวนที่เป็นโปรตีน

1.4.เปรียบเทียบผลการสกัดเมทแอมเฟตามีนจากตัวอย่างน้ำดีที่เตรียมในระดับความเข้มข้นต่างๆกัน(5, 10, 20 µg/ml) โดยสกัดด้วยสารละลายผสมภายใต้สภาวะที่เป็นเบสและตกตะกอนโปรตีน

1.5.เปรียบเทียบวิธีการสกัดระหว่างการเจือจางและไม่เจือจางตัวอย่างภายใต้สภาวะการตกตะกอนโปรตีน ทำโดยการเจือจาง (1:3) และไม่เจือจางตัวอย่างก่อนนำไปสกัดด้วยสารผสม (Dichloromethane: heptane: 2-propanol) และเปรียบเทียบกับการใช้สารละลาย Dichloromethane เพียงชนิดเดียว

1.6.เปรียบเทียบวิธีการตกตะกอนโปรตีนต่างๆและการไม่ตกตะกอนโปรตีนจากตัวอย่างที่ถูกเจือจางแล้ว ทำโดยการตกตะกอนโปรตีนด้วย ZnSO4 (1:1) กับ acetronitrile

2.ทดสอบความน่าเชื่อถือของวิธีการวิเคราะห์ (Method validation)

การทำ Method validation เป็นกระบวนการยืนยันความถูกต้อง ความเหมาะสมของวิธีการวิเคราะห์ที่ศึกษา เพื่อนำมาใช้วิเคราะห์ตัวอย่างในห้องปฏิบัติการ ช่วยทำให้ทราบว่าวิธีวิเคราะห์ให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้อง แม่นยำ และยอมรับได้[3] โดยวิธีการทดสอบจะครอบคลุมถึงคุณสมบัติของวิธีวิเคราะห์ดังนี้

2.1.ความจำเพาะ(Selectivity): ผสมสารมาตรฐานแต่ละชนิดเข้าด้วยกัน (amphetamine, methamphetamine, ephedrine, pseudoephedrine และ MDMA) และนำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-ไนโตรเจนฟอสฟอรัสดีเท็คเตอร์ แล้วดูค่า retention time

2.2.ความถูกต้อง (Accuracy): นำตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน (spiked sample) มาสกัด จากนั้นนำมาหาค่า estimated accuracy โดยสามารถคำนวณได้จากค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (% recovery)

2.3.ความเที่ยงตรง(Precision): นำตัวอย่างน้ำดีที่เติมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นหนึ่งๆ มาทำการสกัดซ้ำ 10 ซ้ำ จากนั้นนำค่าที่สกัดได้มาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD)

2.4.ค่า LOD และ LOQ ( Limit of detection and limit of quantitation): เติมสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่ำๆลงใน sample blank และนำมาหาค่าโดยการเทียบกับ signal to noise ซึ่งค่า LOD และ LOQ จะมีค่าเป็น 3 และ 10 เท่าของ signal to noise ตามลำดับ

2.5.Linearity and range: ทำการเติมสารมาตรฐานลงในตัวอย่างน้ำดีให้มีความเข้มข้นที่ต่างกัน คือ 1, 5, 10 และ 20 µg/ml โดยในแต่ละความเข้มข้นทำ 3 ซ้ำ จากนั้นนำค่าที่ได้มาเขียนกราฟเส้นระหว่างค่าความสูงของโครมาโตแกรมที่ได้กับค่าความเข้มข้นนั้นๆ และคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r)

3.ศึกษาความคงตัวของความเข้มข้นเมทแอมเฟตามีนในตัวอย่างน้ำดี

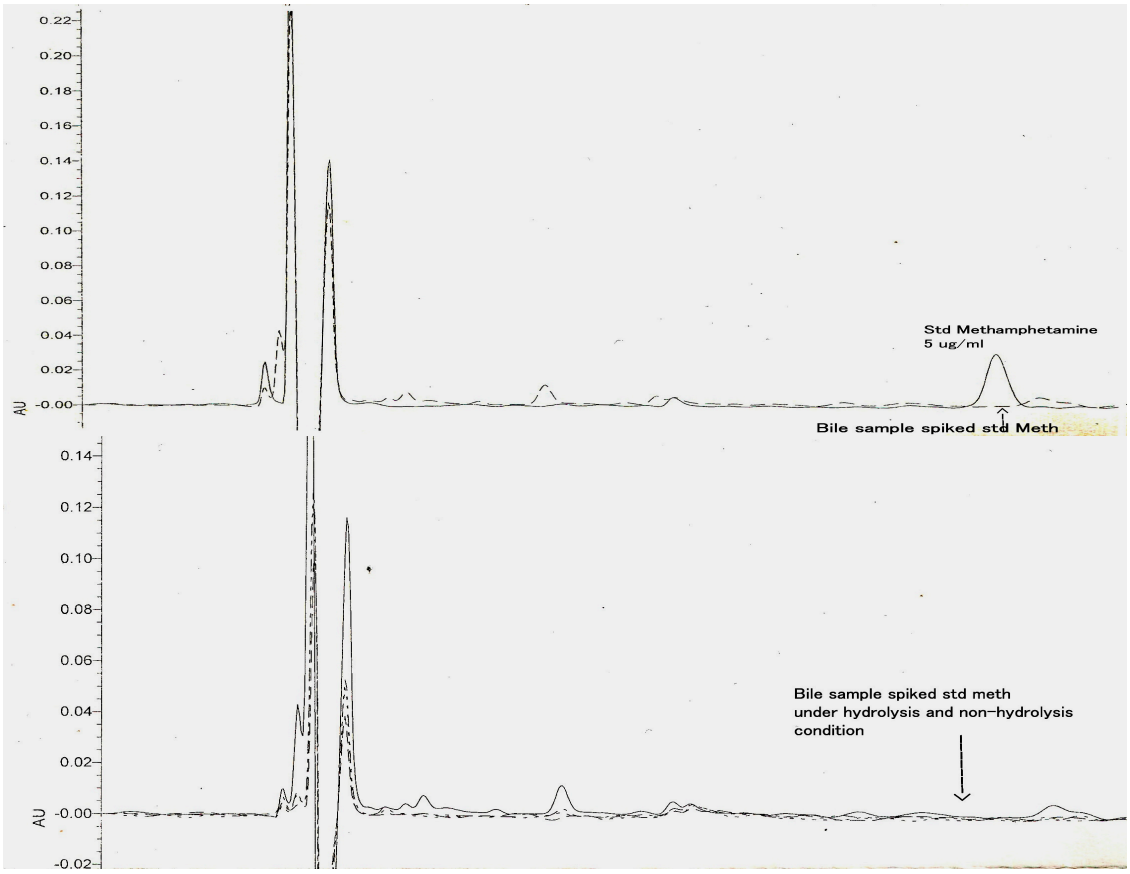
ทำการศึกษาโดยการเติมเมทแอมเฟตามีนลงในน้ำดี ให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ (2, 5, 10, 15 และ 20 µg/ml) และนำเก็บรักษาไว้ที่ 4 ºC และอุณหภูมิห้อง ในระยะเวลาต่างๆ (0, 1, 3, 5, 7, 14, 28, 60 และ 180 วัน) จากนั้นนำมาสกัดเมื่อถึงเวลาที่กำหนด และทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-ไนโตรเจนฟอสฟอรัสดีเท็คเตอร์

## ผลการศึกษา

1.ผลการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการที่เหมาะสมสำหรับสกัดเมทแอมเฟตามีนจากตัวอย่างน้ำดีในการศึกษานี้

1.1.เปรียบเทียบวิธีการสกัดระหว่างการทำ hydrolysis และไม่ทำการ hydrolysis ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 1 ซึ่งพบว่าไม่สามารถสกัดและตรวจวิเคราะห์หาเมทแอมเฟตามีนในน้ำดีได้ด้วยเครื่อง HPLC อีกทั้งวิธีการ

ทำ hydrolysis เป็นวิธีที่ใช้เวลานานและการทดลองนี้เป็นการทดลองที่ใช้วิธีการเติมสารมาตรฐานลงไปในตัวอย่างเพื่อทำการวิเคราะห์ วิธีการทำ hydrolysis จึงไม่มีความจำเป็นแต่อย่างใด




รูปที่ 1 โครมาโตแกรมแสดงสารมาตรฐานเมทแอมเฟตามีนเปรียบเทียบกับเมทแอมเฟตามีนที่ถูกสกัดจากน้ำดีที่ทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

1.2.ผลการตรวจวิเคราะห์จากการสกัดภายใต้สภาวะที่เป็นกรด เบส และกลางดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 1 พบว่าตัวอย่างน้ำดีที่ถูกสกัดด้วยสารละลายผสมภายใต้สภาวะที่เป็นเบสและเป็นกลาง สามารถตรวจหาเมทแอมเฟตามีนที่ให้เปอร์เซ็นต์การกลับคืน (% recovery) ประมาณ 20 % ซึ่งสูงกว่าการสกัดในสภาวะที่เป็นกรด ซึ่งอาจจะมีสิ่งปนเปื้อนในปริมาณมากกว่า

| Spiked | Extraction solvent & Condition | Peak Height NPD-signal (mpA) | Concentration (µg/ml) | % Recovery |
|---|---|---|---|---|
| Std MA 3 µg/ml | Mixed solvent under acid condition | 75.33 | 0.53 | 17.67 |
| | Mixed solvent under nature condition | 77.47 | 0.55 | 18.33 |
| | Mixed solvent under alkaline condition | 80.26 | 0.57 | 19.00 |
| | Acetonitrile solvent | 58.22 | 0.28 | 9.33 |

ตารางที่ 1 แสดงผลการสกัดเมทแอมเฟตามีนด้วยสารละลายในสภาวะที่แตกต่างกัน *ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทำซ้ำ 2 ครั้ง

1.3.ผลการตรวจวิเคราะห์จากการสกัดภายใต้สภาวะการตกตะกอนโปรตีนแสดงในตารางที่ 2 พบว่าไม่สามารถตรวจหาเมทแอมเฟตามีนจากน้ำดีได้ ยกเว้นสกัดด้วยสารละลายผสมในสภาวะที่เป็นเบส

| | Extraction solvent & Condition | Peak Height NPD-signal (pA) | Concentration (µg/ml) | % Recovery |
|---|---|---|---|---|
| Spiked Std MA 20 µg/ml | Mixed solvent under acid condition | -* | -* | -* |
| | Mixed solvent under nature condition | -* | -* | -* |
| | Mixed solvent under alkaline condition | 6.57 | 3.12 | 7.81 |
| | Acetonitrile solvent | -* | -* | -* |

ตารางที่ 2 แสดงผลการสกัดเมทแอมเฟตามีนด้วยสารละลายต่างๆ ภายใต้สภาวะการตกตะกอนโปรตีน *ไม่สามารถวัดค่าได้, **ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทำซ้ำ 2 ครั้ง

1.4.ผลการตรวจวิเคราะห์จากการสกัดเมทแอมเฟตามีนในแต่ละระดับความเข้มข้นพบว่า สามารถสกัดและตรวจพบเมทแอมเฟตามีนได้ทุกระดับความเข้มข้น แต่ยังคงมีเปอร์เซ็นต์การกลับคืน (%recovery) น้อยกว่า 10 % ดังแสดงในตารางที่ 3

| Spiked Std MA (µg/ml) | Peak Height NPD-signal (pA) | Concentration (µg/ml) | %Recovery |
|---|---|---|---|
| 5 | 1.15 | 0.59 | 5.40 |
| 10 | 2.33 | 1.09 | 5.46 |
| 20 | 4.93 | 2.30 | 5.76 |

ตารางที่ 3 แสดงผลการสกัดเมทแอมเฟตามีนจากตัวอย่างน้ำดีในแต่ละระดับความเข้มข้น *ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทำซ้ำ 2 ครั้ง

1.5.ผลการตรวจวิเคราะห์จากการสกัดเมทแอมเฟตามีนเปรียบเทียบระหว่างวิธีการเจือจางและไม่เจือจางก่อนนำไปสกัด พบว่าสามารถตรวจหาเมทแอมเฟตามีนได้ในทุกสภาวะที่ทำการสกัดด้วย dichloromethane โดยวิธีการเจือจางตัวอย่างก่อนนำไปสกัดนั้น มีเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน (%recovery) มากกว่า 10 % ซึ่งสูงกว่าการไม่เจือจาง ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4

| | Extraction Solvent | Sample Volume | | Peak Height NPD-signal (pA) | Concentration (µg/ml) | % Recovery |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Dilute (1:3) | Non-dilute | | | |
| Spiked Std MA 20 µg/ml | Dichloromethane | 2ml | - | 4.56 | 2.13 | 15.97 |
| | | 4ml | - | 6.11 | 3.18 | 11.93 |
| | | - | 2ml | 4.85 | 2.26 | 5.67 |
| | | - | 4ml | 13.17 | 6.13 | 7.66 |
| | Mixed Solvent (dichloromethane: heptanes: 2-propanol) | 2ml | - | -* | -* | -* |
| | | 4ml | - | -* | -* | -* |
| | | | 2ml | -* | -* | -* |
| | | | 4ml | -* | -* | -* |

ตารางที่ 4 แสดงผลการสกัดเมทแอมเฟตามีนในน้ำดีเมื่อเปรียบเทียบวิธีการเจือจางและไม่เจือจางก่อนนำไปสกัด
*ไม่สามารถวัดค่าได้, **ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทำซ้ำ 2 ครั้ง

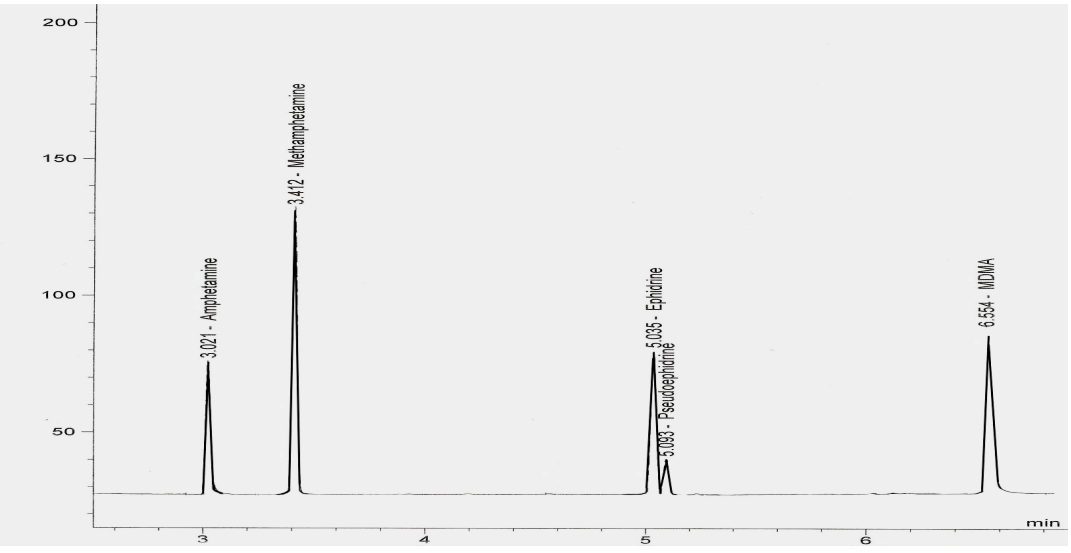
1.6.จากตารางที่ 5 แสดงให้เห็นว่าในสภาวะที่ไม่ตกตะกอนโปรตีนมีเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน (%recovery) ประมาณ 40% ซึ่งสูงกว่าทุกสภาวะที่ทดลองเปรียบเทียบ แต่กลับพบว่าในกลุ่มที่ตกตะกอนโปรตีนมีค่าเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน (%recovery) ต่ำกว่า 30 % ดังนั้น วิธีการเจือจางตัวอย่างน้ำดีก่อนนำไปสกัดโดยไม่ต้องตกตะกอนโปรตีนและนำไปสกัดด้วยสารละลาย dichloromethane จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดเมทแอมเฟตามีนในน้ำดี

| | Extraction condition | Peak Height NPD-signal (pA) | Concentration(µg/ml) | % Recovery |
|---|---|---|---|---|
| Spiked Std MA 20 µg/ml | Non-protein precipitation | | | |
| | - Freeze | 8.77 | 4.08 | 40.80 |
| | - Non-Freeze | 9.97 | 4.64 | 46.40 |
| | Protein precipitation* | | | |
| | - Freeze | 3.03 | 1.42 | 14.20 |
| | - Non-Freeze | 5.06 | 2.36 | 23.60 |
| | Protein precipitation ** | | | |
| | - Freeze | 2.89 | 1.36 | 13.60 |
| | - Freeze*** | 4.49 | 2.10 | 21.00 |

ตารางที่ 5 แสดงผลการสกัดเมทแอมเฟตามีนจากตัวอย่างน้ำดีที่ถูกเจือจางก่อนนำไปสกัดในสภาวะต่างๆ * ตกตะกอนด้วย ZnSO4 (1:1), ** ตกตะกอนด้วย acetronitrile, *** ไม่ใช้ dichloromethane สกัด, ****ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทำซ้ำ 2 ครั้ง

2.ผลการตรวจสอบความน่าเชื่อถือของวิธีการวิเคราะห์ (Method validation)

2.1.ความจำเพาะ(Selectivity) พบว่ามีค่าของ retention time ของสารมาตรฐาน amphetamine, methamphetamine, ephedrine, pseudoephedrine และ MDMA ตามลำดับดังนี้ 3.021, 3.412, 5.035, 5.093 และ 6.554 นาที ดังโครมาโตแกรมที่แสดงในรูปที่ 2




รูปที่ 2 โครมาโตแกรมแสดง retention time ของสารมาตรฐานamphetamine, methamphetamine, ephedrine, pseudoephedrine และ MDMA ตามลำดับจากซ้ายไปขวา ซึ่งทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-NPD

2.2.ความถูกต้อง (Accuracy) ในการศึกษานี้พบว่ามี ค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (% recovery) อยู่ที่ 80.0-99.7 %

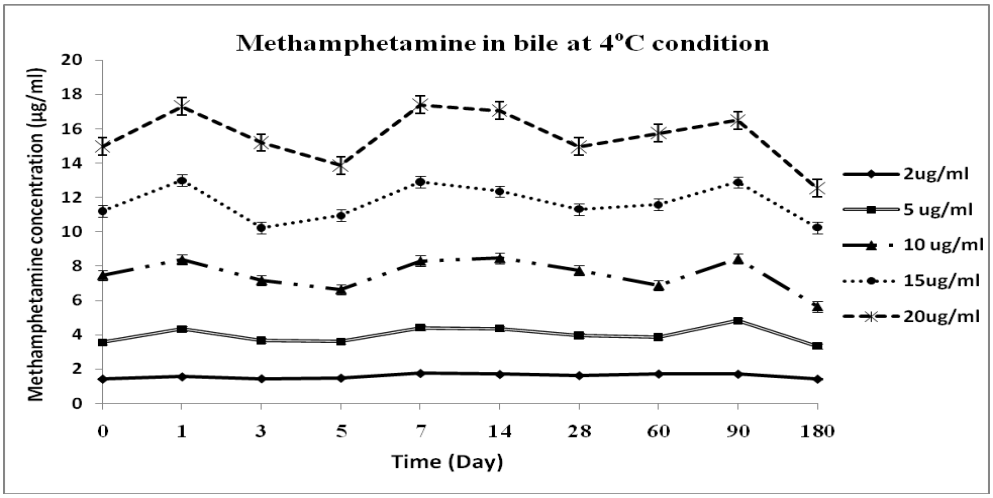
2.3.ความเที่ยงตรง(Precision) การหาค่าความแม่นยำของการวิเคราะห์ พบว่ามีค่าเปอร์เซ็นต์การเบี่ยงเบนมาตรฐาน สัมพัทธ์ (% RSD) อยู่ที่ 2.427%

2.4.ค่า LOD และ LOQ ( limit of detection and limit of quantitation ) ในการศึกษานี้มีค่าของ LOD และ LOQ อยู่ที่ 0.3 และ1.0 µg/ml ตามลำดับ

2.5.Linearity and range ได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) อยู่ที่ 0.99985 ซึ่งช่วงความเข้มข้นของสารที่วัดที่มีค่าความถูกต้องและแม่นยำเป็นที่ยอมรับได้ จะมีค่าตั้งแต่ 1-20 µg/ml

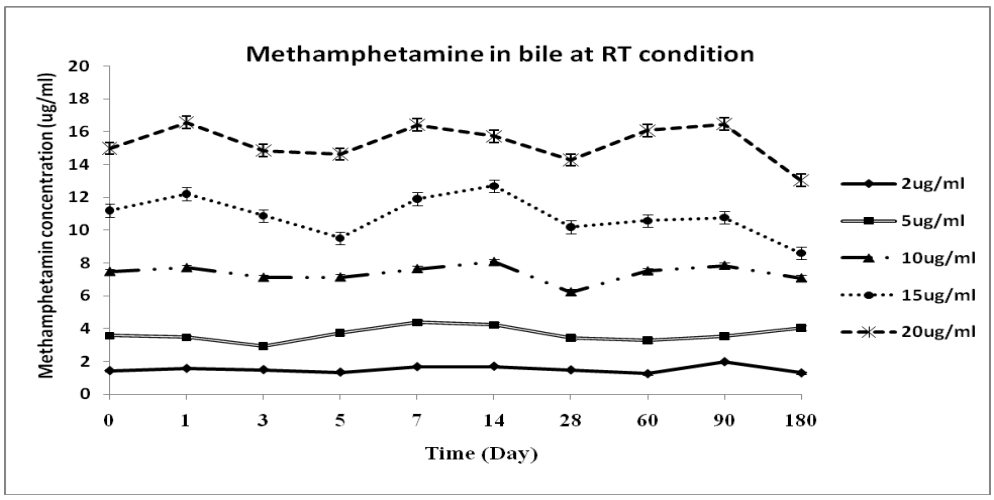
3.ผลการศึกษาความคงตัวของความเข้มข้นเมทแอมเฟตามีนในตัวอย่างน้ำดี

3.1.ผลการศึกษาความคงตัวของความเข้มข้นเมทแอมเฟตามีนในน้ำดีเมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4ºC เมื่อสกัดตัวอย่างน้ำดีที่ถูกเก็บไว้ในสภาวะอุณหภูมิ 4ºC เพื่อทดสอบความคงตัว ณ ช่วงระยะเวลาต่างๆ กันดังนี้ 0, 1, 3, 5, 7, 14, 28, 60, 90 และ180วัน ได้ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นเมทแอมเฟตามีนทั้งห้าระดับความเข้มข้น ดังแสดงในกราฟ เมื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบวัดซ้ำ (Repeated measurement ANOVA) พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของความเข้มข้นเมทแอมเฟตามีนในแต่ละช่วงระยะเวลาที่ทำการตรวจวิเคราะห์ (p>0.05)



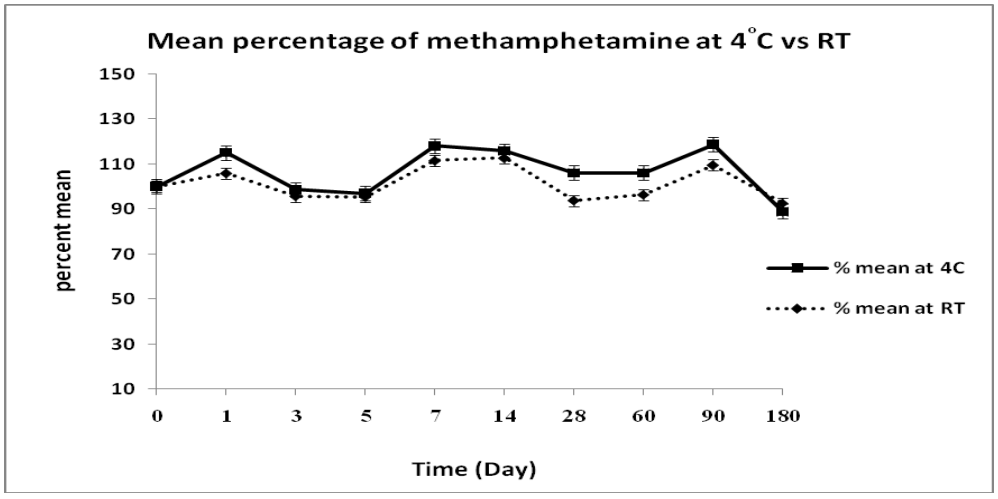

รูปที่ 3 ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นเมทแอมเฟตามีนทั้งห้าระดับความเข้มข้นที่ถูกเก็บไว้ใน สภาวะอุณหภูมิ 4ºC ณ ช่วงระยะเวลาต่างๆ กัน

3.2.ผลการศึกษาความคงตัวของเมทแอมเฟตามีนในน้ำดีเมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง (RT) เมื่อสกัดตัวอย่างน้ำดีที่ถูกเก็บไว้ในสภาวะอุณหภูมิห้อง (RT) เพื่อทดสอบความคงตัว ณ ช่วงระยะเวลาต่างๆ กันดังนี้ 0, 1, 3, 5, 7, 14, 28, 60, 90 และ180วัน ได้ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นเมทแอมเฟตามีนทั้งห้าระดับความเข้มข้น ดังแสดงในรูปที่ 4 เมื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบวัดซ้ำ (repeated measurement ANOVA) พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของความเข้มข้นเมทแอมเฟตามีนในแต่ละช่วงระยะเวลาที่ทำการตรวจวิเคราะห์ (p>0.05)




รูปที่ 4 ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นเมทแอมเฟตามีนทั้งห้าระดับความเข้มข้นที่ถูกเก็บไว้ใน สภาวะอุณหภูมิห้อง (RT) ณ ช่วงระยะเวลาต่างๆ กัน

3.3.ผลการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นระหว่างการเก็บรักษาไว้ที่ 4ºC และ RT เมื่อนำค่าความเข้มข้นในแต่ละความเข้มข้นมาแปลงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นโดยการเปรียบเทียบกับค่าความเข้มข้นของวันแรก และนำมา plot กราฟเพื่อเปรียบเทียบระหว่างสองสภาวะ ดังแสดงในรูปที่ 5 เมื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติด้วยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย 2 กลุ่มโดยตัวอย่างทั้งสองกลุ่มเป็นอิสระต่อกัน (Independent sample t-test) พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ของความเข้มข้นเมทแอมเฟตามีนในวันที่ 1 และวันที่ 28




รูปที่ 5 ผลการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของเมทแอมเฟตามีนที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4ºC และ RT ณ ช่วงระยะเวลาต่างๆ กัน

## อภิปรายผลการศึกษาและสรุป

จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดเมทแอมเฟตามีนในตัวอย่างน้ำดี การทำ hydrolysis เพื่อสลาย conjugated compound นั้นใช้เวลาในการทำถึง 30 นาทีและในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ตัวอย่างน้ำดีที่เติมสารมาตรฐานลงไป จึงไม่มีความจำเป็นที่จะต้องทำการ hydrolysis ในส่วนของการสกัดในสภาวะที่ทำการตกตะกอนโปรตีน ช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนได้ แต่พบว่าค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับนั้นมีค่าที่ลดลง ดังนั้นจึงใช้วิธีการเจือจางตัวอย่างน้ำดี ซึ่งทำให้ได้ค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับสูงขึ้นเป็นที่น่าพอใจ โดยในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกใช้การสกัดด้วยตัวทำละลาย (liquid-liquid extraction) เนื่องจากเป็นวิธีที่นิยมใช้โดยทั่วไปและค่าใช้จ่ายน้อย โดย

ในส่วนของการทดสอบการใช้ได้ของวิธีสกัด (method validation) จะเห็นได้ว่าค่าของพารามิเตอร์แต่ละตัวที่ใช้ในการพิจารณาการใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ มีค่าอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่ยอมรับได้

จากผลการศึกษาความคงตัวของความเข้มข้นเมทแอมเฟตามีนในตัวอย่างน้ำดี เมื่อพิจารณาจากกราฟที่ได้แสดงไว้ข้างต้นในทั้งสองสภาวะ จะเห็นได้ว่ามีแนวโน้มที่คงที่ตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา (6 เดือน) และเมื่อนำไปวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้ มีความสอดคล้องกับหลายผลการศึกษาที่ผ่านมา ตัวอย่างเช่น งานการศึกษาของ Jimenez, et al.[4] นั้นได้ศึกษาความคงตัวของเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะที่ปราศจากเชื้อและไม่ปราศจากเชื้อ พบว่าสามารถเก็บไว้ที่ 4ºC เป็นระยะเวลา 24 และ 6 เดือน ตามลำดับ ส่วนในการศึกษาของ Clauwaert, et al.[5] พบว่า derivatives เมทแอมเฟตามีนในตัวอย่างปัสสาวะ เลือด และ ซีรั่ม สามารถเก็บรักษาได้เป็นระยะเวลา 21, 5 และ 17 สัปดาห์ตามลำดับที่อุณหภูมิห้อง เป็นต้น ดังนั้นเมทแอมเฟตามีนในตัวอย่างน้ำดี สามารถเก็บรักษาไว้ที่ 4ºC และอุณหภูมิห้องได้เป็นระยะเวลา 6 เดือน โดยมีการเปรียบเทียบในทั้งสองสภาวะ เมื่อพิจารณาจากกราฟเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นที่ทำการเปรียบเทียบของทั้งสองสภาวะ จะเห็นได้ว่ามีแนวโน้มที่คงที่ของทั้งสองสภาวะตลอดระยะเวลาการศึกษา ถึงแม้จะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติถึงสองจุด คือในวันที่ 1 และวันที่ 28 ก็ตาม แต่เมื่อพิจารณาโดยรวมแล้ว ในทั้งสองสภาวะมีแนวโน้มที่คงที่ไม่แตกต่างกัน ในส่วนของการที่สามารถเก็บตัวอย่างน้ำดีไว้ที่อุณหภูมิห้องได้ถึง 6 เดือน อาจเนื่องมาจากส่วนประกอบส่วนใหญ่ในน้ำดีประกอบด้วยเกลือของน้ำดี ไขมันแลโคเลสเตอรอล ซึ่งเป็นสภาวะที่ไม่ค่อยเหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย อีกทั้งในการตรวจวัดค่าของ pH ยังพบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงแต่อย่างใด จึงเป็นไปได้ว่าเมทแอมเฟตามีนในตัวอย่างน้ำดีสามารถที่จะเก็บรักษาและทำการตรวจวิเคราะห์ได้เป็นระยะเวลา 6 เดือน

## สรุป

จากผลการทดลองพบว่าระดับของแมทแอมเฟตามีนไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับวันแรกของการทดลอง (p-value ≥ 0.05) ของทั้งสองสภาวะการทดลอง และเมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของเมทแอมเฟตามีนที่ได้เก็บรักษาไว้ระหว่างสองอุณหภูมิ ผลการศึกษาพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p-value ≥ 0.05) ของความเข้มขันเมทแอมเฟตามีนเช่นเดียวกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเมทแอมเฟตามีน สามารถคงตัวอยู่ในน้ำดีที่เป็นตัวอย่างส่งตรวจ ได้ในช่วงระยะเวลาประมาณ 180 วัน (6 เดือน)

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.นพ.วิชัย วงศ์ชนะภัย และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รศ.พญ.สมบูรณ์ ธรรมเถกิงกิจ ที่คอยดูแลให้คำแนะนำในงานวิจัยนี้

## เอกสารอ้างอิง

1. NIDA Research Report: Methamphetamine Abuse and Addiction, Washington (DC), U.S., 2002; Available from: http://www.drugabuse.gov/ReserchReports/methamph/methamph2.html#what

2. Vanbinst R., Koenig J., DiFazio V., Hassoun A. Bile analysis of drugs in postmortem cases., Forensic Sci Int, 2002; 128: 35-40.
3. จุไรรัตน์ มหาเทียน. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (Method Validation), เอกสารเผยแพร่ไม่ปรากฏสถานที่และปีที่พิมพ์.
4. Jimenez C., delaTorre R., Ventura M., Segura J., Ventura R. Stability studies of amphetamine and ephedrine derivatives in urine. J Chromatography B, 2006; 843:84-94.
5. Clauwaert K.M., Van Bocxlare J. F., De Leenheer A.P. Stability study of the designer drugs “MDA, MDMA and MDEA” in water, serum, whole blood, and urine under various storage temperatures, Forensic Sci. Int. 2001; 124: 36-42.