รายงานสัมมนาเรื่อง

การวิเคราะห์หาปริมาณ Mitragynine ในปัสสาวะของผู้ที่ใช้ใบกระท่อมโดยวิธี High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

ผู้ให้สัมมนา นางสาวรสสุคนธ์ ธนธีระบรรจง
รหัสประจำตัว 52312330

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.ศิริรัตน์ ชูสกุลเกรียง

วันที่ให้สัมมนา วันเสาร์ที่ 17 กรกฎาคม พ.ศ. 2553
สถานที่ ห้อง 4205 อาคาร ว.4 เวลา 9.00-12.00 น.
วิชา 510 701 สัมมนาสำหรับนิติวิทยาศาสตร์ 1
ภาคต้น ปีการศึกษา 2553

คำนำ

รายงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของ วิชาสัมมนาสำหรับนิติวิทยาศาสตร์ 1 รหัสวิชา 510701 หลักสูตรระดับปริญญามหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ ภาคเรียนที่ 1 ประจำปีการศึกษา 2553 โดยผู้จัดทำได้ทำการแปลและเรียบเรียงบทความต้นฉบับภาษาอังกฤษ เรื่อง Quantitative analysis of mitragynine in human urine by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry จาก Journal of Chromatography B, 877 (2009) 2499–2505 เกี่ยวกับการวิเคราะห์หาปริมาณ Mitragynine ในปัสสาวะของผู้ที่ใช้ใบกระท่อมโดยวิธี High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

เนื้อหาของรายงานสัมมนาฉบับนี้กล่าวถึง ในกรณีที่มีการใช้กระท่อมสามารถตรวจพบปริมาณของ Mitragynine ที่ตกค้างอยู่ในปัสสาวะได้ ซึ่งปริมาณที่น้อยมากของ Mitragynine ในปัสสาวะสามารถตรวจได้โดยวิธี High performance liquid chromatography ร่วมกับ Electrospray tandem mass spectrometry (HPLC-ESI/MS/MS) จากการทดลองใช้สารละลาย Methyl t-butyl ether (MTBE) สกัดเอา Mitragynine ออกมาและแยกวิเคราะห์สารผสมออกจากกันโดยใช้คอลัมน์ HILIC ซึ่งเทคนิค ESI/MS/MS ให้ผลนี้ใช้ Triple quadrupole mass spectrometer ในการตรวจวิเคราะห์สารที่มีประจุบวกและใช้โหมด Multiple reactions monitoring (MRM) ในงานวิจัยนี้ Ajmalicine ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกับ Mitragynine ถูกใช้เป็น Internal standard (IS) และค่าการตรวจวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและต่างวันกันให้ค่าความแม่นยำสูง งานวิจัยนี้มีความน่าเชื่อถือตามหลักเกณฑ์มาตรฐานเป็นที่ยอมรับในระดับนานาชาติ

ขอขอบคุณ อาจารย์ ดร.ศิริรัตน์ ชูสกุลเกรียง ที่กรุณาช่วยให้คำปรึกษาแนะนำ อาจารย์ดร. ศุภชัย ศุภลักษณ์นารี และพ.ต.ท.กฤษฎา ริบรวมทรัพย์ ที่กรุณาช่วยให้ข้อเสนอแนะ ทำให้การสัมมนาและรายงานฉบับนี้สมบูรณ์ สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบคุณผู้เข้าร่วมสัมมนาทุกท่าน

ท้ายนี้ ผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่า รายงานฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อท่านผู้อ่านที่มีความสนใจและต้องการศึกษาค้นคว้า ตลอดจนเป็นการเพิ่มพูนความรู้ในเรื่องดังกล่าวได้ไม่มากก็น้อย

ผู้จัดทำ

นางสาวรสสุคนธ์ ธนธีระบรรจง

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	
บทคัดย่อ	
1. บทนำ	
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1-6
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	
2. การทดลอง	
2.1 สารเคมี	7
2.2 เครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ (LC-MS/MS)	8
2.3 ขั้นตอนการทำ Mitragynine บริสุทธิ์	9
2.4 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน	10
2.5 การสกัดตัวอย่างตรวจ	10
2.6 การทำ Calibration	10-11
2.7 การพัฒนาวิธีการทดลองและการควบคุมคุณภาพ	11
3.ผลการทดลองและการอภิปราย	
3.1 MS/MS optimization	12-15
3.2 การวิเคราะห์โดย LC	15-16
3.3 การประเมินผลการสกัดด้วย Liquid	17
3.4 การควบคุมคุณภาพและ Method validation	17-19
3.5 Application	19
4. สรุป	20
ข้อเสนอแนะ	21-22
เอกสารอ้างอิง	23
วารสารการวิจัย Journal of Chromatography B, 877 (2009) 2499–2505	
เอกสารประกอบการสัมมนา	

บทคัดย่อ

Mitragynine เป็นสารอัลคาลอยด์หลักสำคัญ ที่สกัดจากใบของพืชที่มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Mitragyna speciosa* Korth ซึ่งพบในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และในประเทศไทยเป็นที่รู้จักกันโดยทั่วไปในชื่อว่ากระท่อม เป็นเวลาหลายศตวรรษแล้วที่ใบกระท่อมถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการบำบัดโรคและออกฤทธิ์ทางประสาทเพื่อช่วยลดอาการเจ็บปวด เทียบได้กับสารจำพวกฝิ่น ในกรณีที่มีการใช้กระท่อมสามารถตรวจพบปริมาณของ Mitragynine ที่ตกค้างอยู่ในปัสสาวะได้ ซึ่งปริมาณที่น้อยมากของ Mitragynine ในปัสสาวะ สามารถตรวจได้โดยวิธี High performance liquid chromatography ร่วมกับ Electrospray tandem mass spectrometry (HPLC-ESI/MS/MS) จากการทดลองใช้สารละลาย Methyl t-butyl ether (MTBE) สกัดเอา Mitragynine ออกมาและแยกวิเคราะห์สารผสมออกจากกันโดยใช้คอลัมน์ HILIC ซึ่งเทคนิค ESI/MS/MS ให้ผลนี้ใช้ Triple quadrupole mass spectrometer ในการตรวจวิเคราะห์สารที่มีประจุบวก และใช้โหมด Multiple reactions monitoring (MRM) ในงานวิจัยนี้ Ajmalicine ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกับ Mitragynine ถูกใช้เป็น Internal standard (IS) ของวิธีการทดลองที่ได้พัฒนาขึ้นมานี้ โดยในการวิเคราะห์ปริมาณ Mitragynine ในปัสสาวะ ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.1, 1 และ 5 ng/ml ได้ค่า % Recovery เป็น 90, 109 และ 98 และค่า % RSD เป็น 22, 12 และ 16 ตามลำดับ ส่วน Regression linearity ของ Mitragynine ซึ่งทำ Calibration ในช่วงตั้งแต่ 0.01 ถึง 5.0 ng/ml ให้ผลค่า Correlation coefficient มากกว่า 0.995 โดยมีค่าขีดจำกัดของการตรวจวัด 0.02 ng/ml และค่าการตรวจวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและต่างวันกันให้ค่าความแม่นยำสูง

Abstract

Mitragynine is the primary active alkaloid extracted from the leaves of *Mitragyna speciosa* Korth, a plant that originates in South-East Asia and is commonly known as kratom in Thailand. Kratom has been used for many centuries for their medicinal and psychoactive qualities, which are comparable to that of opiatebased drugs. Kratom abuse can lead to a detectable content of mitragynine residue in urine. Ultra trace amount of mitragynine in human urine was determined by a high performance liquid chromatography coupled to an electrospray tandem mass spectrometry (HPLC-ESI/MS/MS). Mitragynine was extracted by methyl t-butyl ether (MTBE) and separated on a HILIC column. The ESI/MS/MS was accomplished using a triple quadrupole mass spectrometer in positive ion detection and multiple reactions monitoring (MRM) mode. Ajmalicine, a mitragynine's structure analog was selected as internal standard (IS) for method development. Quality control (QC) performed at three levels 0.1, 1 and 5 ng/ml of mitragynine in urine gave mean recoveries of 90, 109, and 98% with average relative standard deviation of 22, 12 and 16%, respectively. The regression linearity of mitragynine calibration ranged from 0.01 to 5.0 ng/ml was achieved with correlation coefficient greater than 0.995. A detection limit of 0.02 ng/ml and high precision data within-day and between days analysis were obtained.

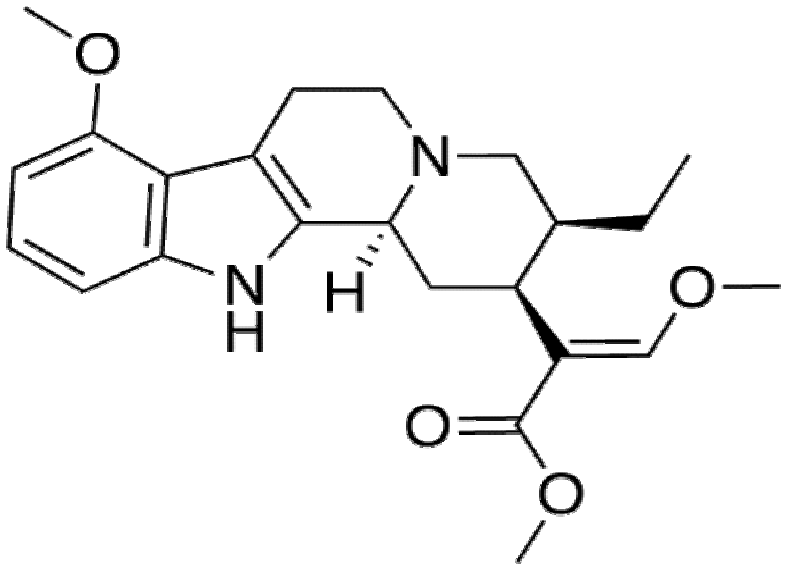
1. บทนำ

Mitragynine ชื่อทางเคมีคือ 9-methoxy-corynantheidine เป็นสารอัลคาลอยด์หลักสำคัญที่พบในพืชกระท่อม *Mitragyna speciosa* Korth ในประเทศไทยเป็นที่รู้จักกันโดยทั่วไปในชื่อว่ากระท่อม (Shellard., 1974) ใบกระท่อมได้ถูกนำมาใช้บริโภคตามท้องถิ่นในหลายประเทศของเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ประกอบด้วย ประเทศไทย มาเลเซีย และสหภาพพม่า ตั้งแต่ก่อนศตวรรษที่ 19 เนื่องจากพืชกระท่อมมีฤทธิ์บรรเทาปวด และออกฤทธิ์กระตุ้น (Babu et al., 2008) ในประเทศไทยกระท่อมจัดเป็นยาเสพติดให้โทษประเภทที่ 5 ตามพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ พ.ศ. 2522 ในใบกระท่อมมีสาร Mitragynine ทีออกฤทธิ์กระตุ้นประสาทเช่นเดียวกับใบโคคา ทำให้ทำงานไม่เหน็ดเหนื่อย ทนแดด ไม่รู้สึกร้อน และยังมีฤทธิ์กดศูนย์ประสาท เมื่อกินจำนวนมากทำให้ประสาทมึนชา เมื่อเสพจนติดผิวหนังจะดำเกรียมลักษณะเหมือนถูกแดดจัดเผา (พืชกระท่อมในสังคมไทย., 2548) สารสกัดจากพืชกระท่อมนี้สามารถเคลื่อนที่ผ่านเนื้อเยื่อที่แบ่งกั้นระหว่างระบบหมุนเวียนเลือดกับสมอง (blood-brain barrier) เพื่อเข้าไปออกฤทธิ์ที่ระบบประสาทส่วนกลางได้ นอกจากนี้คุณสมบัติลดอาการเจ็บปวดของ Mitragynine ถูกยับยั้งด้วยการใช้นาล็อกโซน (naloxone) ซึ่งเป็นตัวปิดกั้นการกระตุ้นที่ตัวรับของสารฝิ่น (opioid receptor) ทั้งหมด ผลดังกล่าวนี้บ่งชี้ว่าการออกฤทธิ์ยับยั้งความรู้สึกเจ็บปวดของ Mitragynine มีการกระตุ้นที่ตัวรับของสารฝิ่น การค้นพบนี้บ่งบอกว่าการออกฤทธิ์ต่อสมองคล้ายกับสารฝิ่น (Thongpradichote et al., 1998) กระท่อมได้ถูกนำมาใช้เพื่อทดแทนฝิ่น และในการรักษาอาการถอนยาของผู้ที่ติดมอร์ฟีน (Takayama., 2004) สำหรับโครงสร้างทางเมีและคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาของ Mitragynine นั้น ได้มีการศึกษาในลักษณะที่คล้ายๆกันเป็นจำนวนมาก(Thongpradichote et al., 1998) (Takayama., 2004) (Zacharias et al., 1965) (Takayama et al., 1995) เช่นเดียวกับด้านสารเสพติด ยาบรรเทาปวด และสารที่ทำให้เกิดการกระตุ้นที่เหมือนกันเนื่องจากมีการแย่งจับกับ opioid receptors (Takayama et al., 2002) ได้มีการศึกษาการออกฤทธิ์แก้ปวด (antinociceptive action) ของ Mitragynine พบว่าการฉีด Mitragynine เข้าที่ช่องท้องหรือฉีดโดยตรงเข้าที่สมองของหนูจะสามารถยับยั้งความเจ็บที่เกิดจากการทดสอบด้วยวิธีหนีบหาง (tail-pinch test) และวิธีสัมผัสกับแผ่นความร้อน (hot-plate test) (Matsumoto et al., 1996) Mitragynine ออกฤทธิ์ในสมองโดยอาศัยการกระตุ้นอย่างเด่นชัดที่ตัวรับของสารฝิ่นชนิด μ และ δ แต่ก็มีค่าจำเพาะของการกระตุ้นที่แตกต่างไปจากมอร์ฟีน (Thongpradichote et al., 1998) นอกจากการออกฤทธิ์ที่ตัวรับของสารฝิ่นในสมองแล้ว Mitragynine ยังออกฤทธิ์ลดความเจ็บปวดโดยการยับยั้งวิถีการส่งความรู้สึกเจ็บปวดไปสู่สมองซึ่งก็คือการลด การรับรู้ความเจ็บปวดนั่นเอง โดย Mitragynine อาจอาศัยกลไกที่เกี่ยวข้องกับการลดรดับความแรงของการนำสัญญาณประสาทเกี่ยวกับความเจ็บ ปวดจากอวัยวะที่มีบาดแผลหรือถูกกระแทกขึ้นไปยังสมองเพื่อแปลผลเป็นการรับรู้ความเจ็บปวด ถ้าการนำสัญญาณนี้ถูกลดความแรงลงก็จะทำให้สมองได้รับสัญญาณน้อยลง ซึ่งจะทำให้มีการแปลผลว่าความรู้สึกเจ็บนั้นลดน้อยลงไปด้วย โดยระบบที่เกี่ยวข้องนี้จะมีระบบเชื่อมต่อของกลุ่มเซลประสาทที่เรียกว่า descending noradrenergic system และ descending serotonergic system ที่ทำหน้าที่ลดระดับการนำสัญญาณประสาทของความรู้สึกเจ็บลง

จากการศึกษาผลของ Mitragynine พบว่า Mitragynine สามารถออกฤทธิ์ผ่านการกระตุ้นที่ descending noradrenergic system และ descending serotonergic system ในการลดอาการเจ็บปวด (Matsumoto et al., 1996) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาผลของ mitragynine pseudoindoxyl เปรียบเทียบกับ mitragynine ในหลอดทดลองต่อการหดตัวของลำไส้เล็กและหลอดอสุจิของหนูตะเภาเมื่อกระตุ้นด้วยไฟฟ้าพบว่า mitragynine pseudoindoxyl สามารถยับยั้งการหดตัวของลำไส้ดดยขนาดของการตอบสนองจะแปรผันกับขนาดของสารที่ได้รับ โดย mitragynine pseudoindoxyl มีความแรงในการออกฤทธิ์มากกว่า mitragynine และมอร์ฟีน 100 เท่า และ 20 เท่าตามลำดับ และสามารถต้านฤทธิ์ได้ด้วย naloxone ดังนั้น mitragynine pseudoindoxyl ออจออกฤทธิ์ในการยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบของลำไส้ผ่านตัวรับสารฝิ่นชนิด (μ-opioid receptor) นอกจากนี้ mitragynine pseudoindoxyl ยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบในหลอดอสุจิ โดยมีความแรงในการออกฤทธิ์มากกว่ามอร์ฟีน 35 เท่า และสามารถต้านฤทธิ์ด้วย naltrindole จึงเชื่อว่า mitragynine pseudoindoxyl อาจออกฤทธิ์ผ่านตัวรับสารฝิ่นชนิด (δ-opioid receptor) ซึ่งเป็นตัวรับที่พบได้ในกล้ามเนื้อเรียบของหลอดอสุจิ(Yamamoto et al., 1999) Mitragynine และสารที่คล้ายกันแสดงให้เห็นว่ามีผลยับยั้งในระบบการของเนื้อเยื่อเซลประสาทในสัตว์ทดลอง จากการศึกษาผลของ Mitragynine กับเนื้อเยื่อแบบนอกตัวสัตว์ทดลอง (in vitro study) โดยใช้ลำไส้เล็กส่วนไอเลียม (ileum) ของหนูตะเภา (guinea pig) เนื้อเยื่อลำไส้เล็กที่นำมาใช้ในการทดลองประกอบไปด้วยกล้ามเนื้อเรียบที่มีความไวต่อการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าให้หดตัว ผลการศึกษานี้พบว่า Mitragynine สามารถยับยั้งการหดตัวของลำไส้เล็กที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยไฟฟ้าโดยมีกลไกผ่านการทำหน้าที่ของตัวรับของสารฝิ่น(Watanabe et al., 1997) Mitragynine มีฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร (gastric secretion)ในหนูขาว โดยฤทธิ์นี้จะคล้ายกับฤทธิ์ของมอร์ฟีนโดยออกฤทธิ์ผ่านตัวรับสารฝิ่น (Tsuchiya et al., 2002) นอกจาก Mitragynine ซึ่งเป็นอัลคาลอยด์ที่เป็นสารประกอบหลักแล้ว 7-hydroxymitragynine ก็เป็นอีกสารหนึ่งที่สกัดได้จากพืชกระท่อมที่ถูกนำมาทดสอบ พบว่า มีฤทธิ์ลดอาการเจ็บปวดและมีผลต่อลำไส้เล็กส่วนไอเลียมของหนูตะเภาและในหนูขาวที่มีชีวิตด้วยความแรงการออกฤทธิ์ที่สูงกว่ามอร์ฟีนและยังสามารถออกฤทธิ์ได้แม้กระทั่งให้ทางปาก(Matsumoto et al., 2004) การค้นพบนี้แสดงให้เห็นว่ายังมีสารอัลคาลอยด์ที่เป็นองค์ประกอบย่อยที่สามารถออกทธิ์ได้ดีกว่า Mitragynine ที่เป็นสารประกอบหลัก

ถึงอย่างไรก็ตาม ในขณะนี้คุณสมบัติทางเภสัทวิทยาเป็นสิ่งที่น่าสนใจ แต่งานในด้านวิธีการตรวจวิเคราะห์เกี่ยวกับ Mitragynine ยังมีอยู่น้อยมาก และข้อมูลของการศึกษาวิเคราะห์ของตัวอย่างตรวจในคนก็เช่นเดียวกัน ปัจจุบันกระท่อมมีการแพร่หลายไปทั่ว สามารถหาได้ง่ายทางอินเทอร์เน็ต สะท้อนให้เห็นถึงความต้องการซื้อ(demand) อย่างกว้างขวางในทั่วโลก จากแนวโน้มของการใช้กระท่อม บ่งชี้ว่ากระท่อมไม่ได้เป็นสารเสพติดที่ถูกควบคุม ซึ่งนำไปสู่การแทนที่ของสารเสพติดที่คล้ายกับมอร์ฟีน เนื่องจากการใช้ประโยชน์ของกระท่อม ยังไม่ได้ถูกติดตาม ควบคุมดูแลกำกับ โดยการสำรวจตรวจสอบ จากหน่วยงานด้านสารเสพติดของชาติส่วนใหญ่รวมทั้งสหรัฐอเมริกา (Babu et al., 2008) (Assanangkornchai et al., 2007)

ได้มีการร้องขอจาก New York State Poison Control Center ว่า ควรมีการเตือนประชาชนอย่างเร่งด่วน พร้อมทั้งมีวิธีดำเนินการ เพื่อค้นหาผู้ใช้สารนี้ เนื่องจากพบว่าคนไข้ไม่มีการตอบสนองหลังจากใช้กระท่อม ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้อธิบายถึงความก้าวหน้าของวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่เหมาะสมใน bioanalytical การตรวจหาปริมาณที่น้อยมากของ Mitragynine ที่มีอยู่ในตัวอย่างปัสสาวะของผู้ที่ใช้ใบกระท่อม โดยวิธี HPLC-ESI/MS/MS มีสารหลายชนิดได้ถูกพิจารณาถึงความเป็นไปได้ที่จะใช้เป็น Internal Standard (IS) ของวิธีการทดลองที่ได้พัฒนาขึ้นมานี้ ซึ่งตัวอย่างของไอโซโทปที่ติดฉลากด้วยชนิดที่คล้ายกันจนถึงสารประกอบเป้าหมาย จะต้องเลือกที่เหมาะสมที่สุด อย่างไรก็ตามเนื่องจากไม่มีไอโซโทปที่ติดฉลากด้วย Mitragynine ที่หาซื้อได้ จึงใช้ Ajmalicine ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกับ Mitragynine เป็น Internal standard (IS) ใช้ Blank urine เป็น matrix ทุกครั้งของวิธีการทดลองที่ได้พัฒนาขึ้นมานี้ การสกัดโดยใช้วิธีแบบของเหลว (Liquid extraction) ได้ใส่ Mitragynine ลงไปเมื่อทำการสกัดเสร็จแล้ว และใช้ตัวทำลายหลายชนิดเช่น ethyl ether, ethyl acetate และ methyl t-butyl ether (MTBE) สำหรับการควบคุมคุณภาพ Quality control (QC) เป็นสิ่งที่จำเป็น ซึ่งจากการทดลองนี้ได้แสดงให้เห็นถึงระบบของ background ที่ระดับต่ำ ความถูกต้องและความแม่นยำสูง ทำให้วิธีการทดลองที่ได้พัฒนาขึ้นนี้ เป็นที่ยอมรับตามหลักเกณฑ์มาตรฐาน



รูปที่ (1 ก) **โครงสร้างทางเคมีของ** Mitragynine (9-methoxy-corynantheidine)

รูปที่ (2 ก) ต้นพืชกระท่อม

รูปที่ (2 ข) ลักษณะของใบกระท่อมก้านแดง

รูปที่ (2 ค) ลักษณะของใบกระท่อมก้านขาว

รูปที่ (3 ก) ตัวอย่างพืชกระท่อมที่หาซื้อได้ทาง Internet

รูปที่ (4 ก) **ตัวอย่างเครื่อง** High performance liquid chromatography coupled to an Electrospray tandem mass spectrometry (HPLC-ESI/MS/MS)

2. การทดลอง

2.1 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. ใบกระท่อมดิบป่น (15 x raw leaf extract) เพื่อใช้เตรียมเป็นสารมาตรฐาน Mitragynine standard โดยหาซื้อมาจากร้านค้าทางอินเทอร์เน็ต
2. Ajmalicine ($C_{21}H_{24}N_2O_3$, purity 99%)
3. anhydrous di-sodium hydrogen orthophosphate
4. acetic acid 99.8%
5. ammonium acetate 99.99%
6. ammonium hydroxide A.C.S. จาก Aldrich Chemical Company Inc. (Milwaukee, WI, USA)

ตัวทำละลายทั้งหมดที่ใช้เป็น HPLC เกรดหรือดีกว่า จาก Mallinckrodt Baker Inc. (Phillipsburg, NJ, USA)

7. SilicAR 60 A silicagel จาก Mallinckrodt Baker (Paris, KY, USA)
8. Purified water was เตรียมจากห้องปฏิบัติการ ด้วยระบบ Nanopure Diamond water system (Barnstead International Inc., Dubuque, IA, USA)

รูปที่ (5 ก) ลักษณะของใบกระท่อมดิบป่น

2.2 **เครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์** (LC-MS/MS)

HPLC-MS/MS ประกอบด้วย

2.1.1 เครื่อง HPLC ของบริษัท Agilent Technologies รุ่น Agilent Technologies Series 1200

(Wilmington, DE, USA) อุปกรณ์ประกอบด้วย

- Vacuum degasser
- Binary pump
- Thermostatted column compartment
- Autosampler

โดยเครื่อง HPLC จะเชื่อมต่อกับเครื่อง API-2000 triple quadrupole mass spectrometer

2.1.2 เครื่อง MS/MS ของบริษัท Applied Biosystems/MDS SCIEX รุ่น API-2000 triple quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems/MDS SCIEX, Toronto, Canada) อุปกรณ์ประกอบด้วย

- Turbo electrospray ionization (ESI) source ทำงานในระบบ positive mode ใช้ไนโตรเจนแก๊สใน nebulizer
- ตั้งค่าแก๊ส ESI sheath ไว้ที่ 50 psi
- ทำงานโดยใช้ MS/MS พารามิเตอร์
- Analyst software version 1.4.2 (Applied BioSystems/MDS SCIEX)

HPLC ทำการแยกสารในคอลัมน์ silica-gel based Waters (Milford, MA, USA) มีขนาด 50 mm × 3.0mm (ความยาว × หนา) ซึ่งภายในคอลัมน์เคลือบด้วยพาร์ติเคิ้ลหนา 3 μm Atlantis HILIC column thermostatted ที่ 40 °C ใช้ mobile phase A ประกอบด้วย 5mM ammonium acetate และ mobile phase B ประกอบด้วย methanol อัตราการไหล (flow rate) ที่ 0.25 ml/min ปริมาณของตัวอย่างที่ฉีดคือ 10 μl การแยกสารใช้โปรแกรม gradient คือ 0–3 นาที mobile phase B 90% ถึง 100% จากนั้นนาทีที่ 3.1–7 นาที mobile phase B 90%

2.3 ขั้นตอนการทำ Mitragynine บริสุทธิ์

สารมาตรฐาน Mitragynine ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ทำการสกัดและทำให้บริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการ โดยใช้ใบกระท่อมดิบ เนื่องจากไม่มี สารมาตรฐาน Mitragynine ที่สามารถหาซื้อได้ กระบวนการของการแยก และทำให้ Mitragynine บริสุทธิ์ ซึ่งได้อธิบายไว้โดย (Houghton et al., 1991, Ponglux et al., 1994, and Janchawee et al., 2007) สรุปได้ดังนี้ aqueous suspension จากการสกัดใบกระท่อมดิบ (5 g ใน 100 ml 10% acetic acid) นำมากรองโดยผ่านกระดาษกรอง และสกัดด้วย *n*-hexane 100 ml นำสารละลายที่ได้มาปรับค่า pH ให้เป็น pH 9 ด้วย 25% aqueous ammonium hydroxide และทำการสกัดอีกครั้งด้วย *n*-hexaneและตามด้วย dichloromethane ส่วนที่สกัดออกมาได้นั้นนำมาล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน และทำให้แห้งด้วย sodium sulfate anhydrous ขจัดเอาตัวทำละลายออกโดยการปั่นจนกระทั่งแห้ง ได้ส่วนที่เหลือ (aliquot of residue) 1 g ใน dichloromethane นำไปผ่าน silica-gel column chromatography สองครั้ง และล้างด้วย 10% methanol ใน chloroform เมื่อล้างเสร็จแล้วก็ทำการระเหยจนแห้ง และทำการตกผลึกด้วย methanol และchloroform ก็จะได้อัลคาลอยด์หลักที่สำคัญปริมาณ 0.1 g ซึ่งเกิดขึ้นเมื่อ spot ลงบน silica ในการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Thin layer chromatography (TLC) ทำการวิเคราะห์โดยใช้ ethyl acetate/methanol (4/1,v/v) เป็น mobile phase โดยในทั่วไป 10 g ของใบกระท่อมดิบสกัด (15 × kratom raw leaf extract) ให้ Mitragynine บริสุทธิ์ 0.5 g (ประมาณ 5% based on the crude extract weight)

Mitragynine บริสุทธิ์ พบว่าก่อให้เกิดพีคของโครมาโตแกรมอันเดียวที่เด่นขึ้นมา ในการวิเคราะห์ด้วย Agilent 6972/5972 gas chromatography-mass spectrometry (GCMS) (Agilent Technologies Inc., Wilmington, DE, USA) ทำใน electron impact (EI) ด้วยสแกนโหมด (100–500 *m*/*z*) ใช้ Chem-Station Version A 3.00 software (Agilent Technologies Inc.) สเปคตรัมของ Mitragynine บริสุทธิ์ ($C_{23}H_{30}N_2O_4$, exact molecular mass = 398.2207) ได้รับการยืนยันโดยเปรียบเทียบกับ NIST 98 แมสสเปคตราไลบรารี (mass spectral library) Mitragynine ที่ได้มาจากกระบวนนี้มีความบริสุทธิ์ประมาณ 95% ใช้เป็นพื้นฐาน (based on) ในการเทียบเคียงกับพื้นที่พีคของ Mitragynine ไปจนถึงสารอื่นที่มีความไม่บริสุทธิ์ จากการตรวจวิเคราะห์โดยวิธี GC-MS และใช้วิเคราะห์สารมาตรฐานทุกครั้ง โดยตลอดของวิธีการทดลองที่ได้พัฒนาขึ้นมานี้

2.4 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เตรียม Stock solutions Mitragynine 500 μg/ml และ Ajmalicine (IS)100 μg/ml ทำการเตรียมโดยละลายสารมาตรฐานผสมรวมกันใน 100% methanol เจือจาง Stock solutions ด้วย methanol เพื่อเตรียมเป็น working standard solutions ที่ความเข้มข้นลดลง สารละลายทั้งหมดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 20 °C และนำมาละลาย และใช้ vortex mixed ที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปใช้ Stock solutions คงตัวอยู่ได้ในระหว่างการศึกษาเป็นระยะเวลา 60 วัน

2.5 การสกัดตัวอย่างตรวจ

Pooled blank และตัวอย่างปัสสาวะของคนไข้ถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 80 °C จนกระทั่งทำการวิเคราะห์ ตัวอย่างปัสสาวะถูกนำมาละลาย และใช้ตัวอย่างปริมาณ 2.0 ml นำมาใส่ในหลอดแก้วใสขนาด 10 ml ที่มีฝาปิด และใส่ 20 μl ของ 100 ng/ml IS working solution ลงไป จากนั้นเติม Na_2HPO_4 ลงไป 500 μl ซึ่งเป็นบัพเฟอร์ (0.5M aqueous ได้ถูกปรับค่า pH ให้เป็น pH 11 ด้วย 25% aqueous sodium hydroxide) ใส่ลงไปในตัวอย่างปัสสาวะ และผสมกันโดยใช้ vortex เป็นเวลา 30 วินาที เติม MTBE 3 ml ลงไปในทุกตัวอย่าง จากนั้นนำไปเขย่าแรงๆ ด้วยเครื่อง Eberbach 6000 reciprocating shaker (Ann Arbor, MI, USA) เป็นเวลา 20 นาที และนำไปปั่นด้วยเครื่อง Eppendorf 5804 centrifuge (Hamburg, Germany) ที่ 1000 × g เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ ใส่ลงไปในหลอดเปล่าที่สะอาดอีกหลอดหนึ่ง และทำให้ระเหยจนแห้ง ภายใต้ gentle nitrogen stream ที่ 45 °C โดยใช้ Zymark Turbovap LV concentrator (Hopkinton, MA, USA)เมื่อทำการสกัดเสร็จแล้ว เติม methanol ลงไป 1ml และนำไปใส่ลงใน vial เพื่อทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC-MS/MS ต่อไป

2.6 การทำ Calibration

การหาปริมาณของ Mitragynine ทำการ calibrated โดยใช้เทคนิค IS ใช้โปรแกรมในการวิเคราะห์สำหรับ calibration curve สร้างโดย plot อัตราส่วนของพื้นที่พีคของ Mitragynine และ IS แล้วทำย้อนกลับระหว่างอัตราส่วนของความเข้มข้นของ Mitragynine และ IS วิเคราะห์ Regression ด้วย weighting factor ของ $1/x$ ทำให้ได้ค่า calibration equation และ correlation coefficient (r) ค่า Linearity ทำการประเมินโดยเตรียมสารมาตรฐาน Mitragynine 7 ระดับความเข้มข้น ในตัวอย่าง blank urine ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.025, 0.05, 0.2, 1, 2.5 และ 5.0 ng/ml เติม IS ลงไปและทำ calibration ตัวอย่างดังในวิธีการสกัดตัวอย่างตรวจซึ่งได้อธิบายไว้แล้วในข้อ 2.5 ก่อนนำไป ทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC-MS/MS ต่อไป ได้พิสูจน์ทำให้เป็นที่ยอมรับถึงขีดจำกัดสำหรับ calibration curve ของ Mitragynine ที่ ±

20% สำหรับค่า Relative standard deviation (RSD) ในส่วนปัจจัยของการตอบสนองทั้งหมดและ Correlation coefficient เป็น 0.99 หรือมากกว่า

2.7. การพัฒนาวิธีการทดลองและการควบคุมคุณภาพ

การพัฒนาวิธีการทดลองปฏิบัติตามข้อแนะนำของ Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation โดย Pooled blank urine ซึ่งไม่มี Mitragynine ได้ถูกผสมและกรองโดยผ่านกระดาษกรองเกรด 3 ของ (Whatman International Ltd., Springfield Mill, UK) และใช้ตัวอย่าง matrix ตลอดวิธีการทดลองที่ได้พัฒนาขึ้นมานี้

การควบคุมคุณภาพตัวอย่าง ประกอบด้วย 3 matrix samples ซึ่งได้ใส่ Mitragynine ที่ความเข้มข้น 0.1, 1.0 และ 5.0 ng/ml และ 1 matrix ที่เป็น blank สำหรับ matrix ที่ใส่ตัวอย่าง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 80 ˚C จนกระทั่งนำมาใช้

ความแม่นยำได้จากค่า Relative standard deviation (RSD) และ recoveries (quantified value/spiked value) ประเมินได้จากค่าการตรวจวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน โดยการตัดสินจากปริมาณรวมทั้งหมดของ Mitragynine ใน 3 ระดับที่ใส่เข้าไปเป็นการอ้างอิง ส่วนความแม่นยำในแต่ละวัน ตัดสินโดยการวิเคราะห์ในแต่ละวันของตัวอย่างตรวจที่ 4 ช่วงเวลา เริ่มการวิเคราะห์เมื่อใหม่ๆ หลังจาก 1 วัน 7 วัน และ 28 วัน โดยเก็บไว้ที่ - 80 ˚C ความถูกต้องซึ่งยอมรับได้เมื่อค่า %recovery อยู่ภายใน ± 30% ของ nominal concentration การยอมรับตามหลักเกณฑ์ของความแม่นยำ ค่า RSD อยู่ภายใน ± 20%

ข้อจำกัดของวิธีการตรวจ Method detection limit (MDL) ตั้งไว้ที่ 3 ครั้ง ส่วน standard deviation คำนวณได้จากค่าความเข้มข้นที่เกินจากค่าความเข้มข้นเฉลี่ย ตัดสินจากการทำการทดลองซ้ำถึง 7 ครั้ง โดยใส่ Mitragynine ลงใน matrix ที่ระดับความเข้มข้น 0.025 ng/ml ซึ่ง Lower limit of quantification (LLOQ) ของ Mitragynine ตั้งไว้ที่ 5 ครั้งของ MDL

3. ผลการทดลองและการอภิปราย

3.1 MS/MS optimization

การทำงานของพารามิเตอร์ต่างๆ สำหรับ ESI source เมื่อเลือกใช้ให้เหมาะสมจะได้ แมสสเปคตรัมที่ดีที่สุดทั้ง Mitragynine และ Ajmalicine โมเลกุลไอออนและ product ions ของ Mitragynine และ Ajmalicine สังเกตได้จากการไหลเข้าโดยตลอดอย่างต่อเนื่องของแต่ละสารผสมที่ความเข้มข้น 1 μg/ml ใน methanol ด้วยการทำงานของ ESI source ทั้งในโหมด positive และ negative เมื่อทำการสแกนโดย Full-scan mass spectra ได้บันทึกจาก 35 ถึง 450 amu เพื่อประเมินการทำงานของสัญญาณในแต่ละโหมด สัญญาณที่หนาแน่นได้มาจากโหมด positive พบว่ามีความสูงมากกว่า โหมด negative ทั้ง Mitragynine และ Ajmalicine ส่วน Full-scan daughter mass spectra ทำการประเมินด้วยเช่นกัน พร้อมด้วยการไหลเข้าอย่างต่อเนื่องใน product-ion สแกนโหมด ส่วน abundant product ion ปริมาณมากที่สุดของแต่ละสารผสมถูกคัดเลือกเพื่อแสดงถึงปริมาณโดย MS/MS

Full-scan mass spectrum ของ Mitragynine แสดงถึงสัญญาณที่เด่นชัดของไอออนที่มีมวลต่อประจุเท่ากับ 399 สอดคล้องกับ protonated molecular ion [M+H]+ ดังรูป (1A)

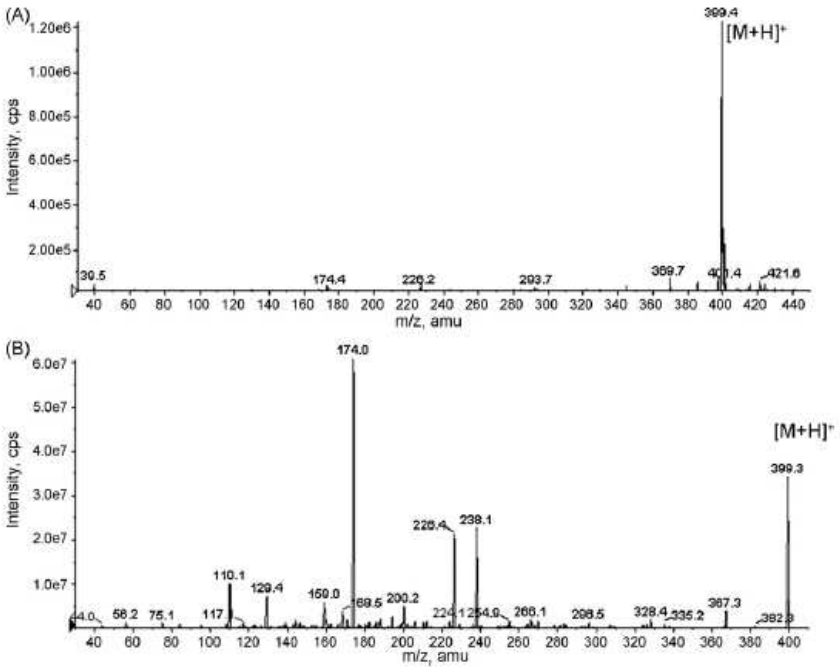


Fig. 1. Mass spectra of mitragynine. (A) Positive ESI in full-scan mode, and (B) in transaction of [M+H]+ *m/z* 399 product-ion scan mode acquired at collision energy of 40 eV.

มีไอออนจำนวนเล็กน้อยที่แตกตัวออกมาสังเกตได้จากใน full-scan mass spectrum ของ Mitragynine บ่งชี้ว่า โมเลกุลไอออนมีความเสถียรมาก ส่วน product ion spectrum ของ Mitragynine แสดง abundant daughter ions ที่ *m/z* = 174, 226 และ 238 เกิดที่ collision energy (CE) of 40 eV ดังรูป

(1B)แนะนำว่า precursor ion *m/z* = 399 เปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วให้ product ions *m/z* = 174, 226 และ 238 ภายใต้สภาวะ collisionally activated dissociation (CAD) หลาย mass ของ Mitragynine product ions (daughter ions) ที่ตรวจวัดได้เหมือนกันกับ Empirical formula จากการคำนวณโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ Analyst software, version 1.4.2 (Applied BioSystem/MDS Sciex) รูปแบบการแตกตัวของ Mitragynine ภายใต้สภาวะ(CAD)ได้แสดงไว้ในดังรูปที่(2)

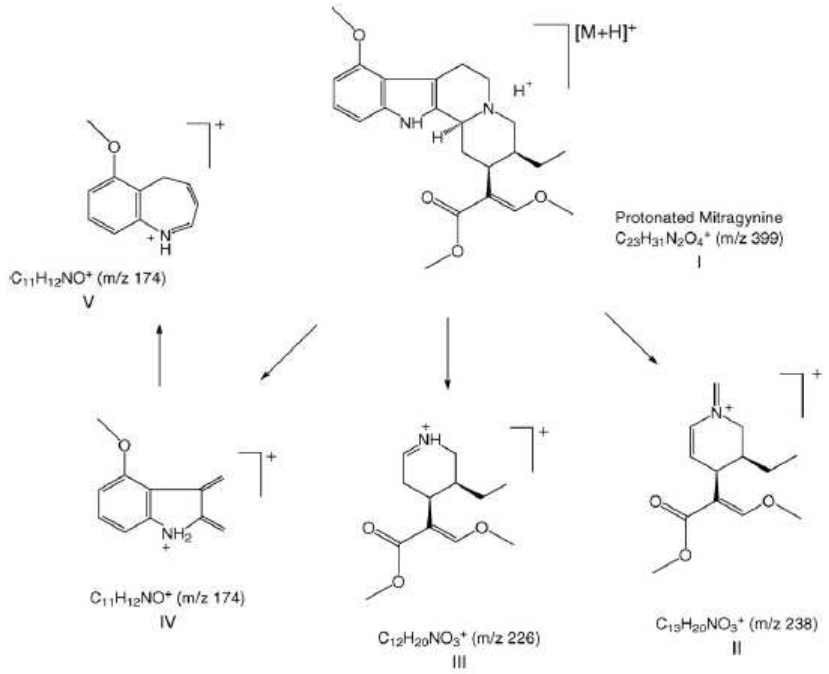


Fig. 2. Chemical structure of protonated mitragynine (I) and tentative identification of its fragment patterns (II, III, IV, and V) under CAD conditions. The structure analog to V was suggested by Khmel'nitskii [18].

ปริมาณมากที่สุดของ abundant daughter ion ที่ *m/z* 174 เป็น candidate ที่ดี ที่ติดตามการเปลี่ยนของปริมาณของ *m/z* 399 > 174 ในระหว่างการเกิดปฏิกิริยา CAD โดยใช้ MRM ทดสอบ ถึงแม้ว่า multiple second transitions ของ *m/z* 399 > 226 และ *m/z* 399 > 238 ก็สามารถใช้ในการยืนยันไอออน ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ Mitragynine

Full-scan และ product-ion scan mode spectra ของ Ajmalicineแสดงให้เห็นถึง precursor ion ที่ *m/z* 353 สอดคล้องกับสารผสม protonated molecular ion [M+H]+ ดังรูป (3A) และไอออนที่ *m/z* 144 มีปริมาณมากที่สุดของ abundant daughter ion ได้จาก collision energy of 30 eV ดังในรูป 3B และ รูปที่ (4) สิ่งอื่นที่มีการแตกตัวไม่มีความสำคัญ ด้วยเหตุนี้ transition ของ *m/z* 353 > 144 ถูกเลือกสำหรับการหาปริมาณของ Ajmalicine ใน MS/MS ของการทดลองนี้

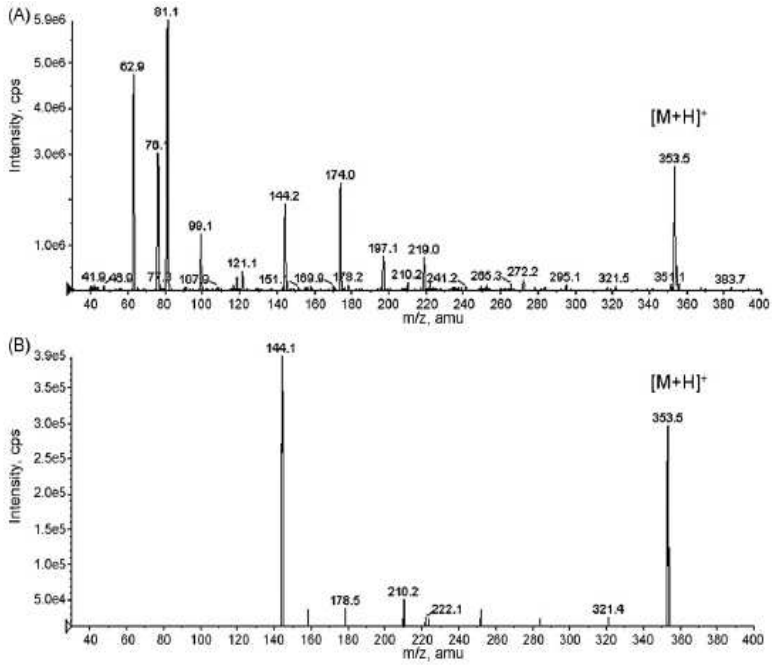


Fig. 3. Mass spectra of ajmalicine. (A) Positive ESI in full-scan mode, and (B) in transaction of [M+H]+ *m/z* 353 product-ion scan mode acquired at collision energy of 30 eV (B).

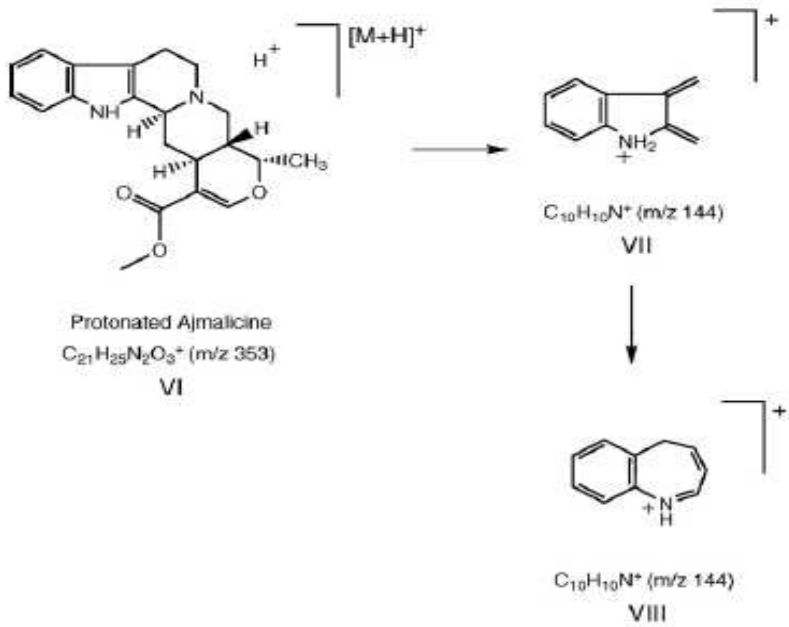


Fig. 4. Chemical structure of protonated ajmalicine (VI) and tentative identification of its fragment patterns (VII, and VIII) under CAD conditions. The structure of VIII was suggested by Khmel'nitskii [18].

หลายพารามิเตอร์ของ MS/MS รวมถึง ionization energies, temperature และ voltages ที่ใช้ใน ESI source ให้ผลดีที่สุดในโหมด MRM ทั้ง Mitragynine และ Ajmalicine ฉีดเข้าที่ปริมาณ 1 μg/ml ในอัตราส่วน 90:10 ของ methanol:ammonium acetate (5mM) ที่ 0.25 ml/min โดยใช้ flow injection analysis (FIA) เพื่อให้ได้ผลดีที่สุด ดังตารางที่ 1

Table 1
Optimized MS/MS operating parameters for mitragynine and ajmalicine obtained from API 2000 tandem mass spectrometry.

MS/MS parameter	Mitragynine	Ajmalicine
Polarity	Positive	Positive
Precursor ion (*m/z*)	399	353
Product ion (*m/z*)	174, 226, 238	144
Collision energy (eV)	45	40
Declustering potential (V)	50	50
Ionspray voltage (V)	4500	4500
Ion source temperature (°C)	550	550

สำหรับสภาวะที่ดีทีสุดของ ความแม่นยำ MS/MS จะต้องสแกนอย่างน้อยที่สุด 20 สแกนพีคตลอดตามแนวนอน เพื่อให้ได้ผลที่ดี อัตราการไหลของ nebulizing gas, auxiliary gasและ curtain gas โดยใช้ FIA ทำให้ได้ความไวสูงสุดของสัญญาณ MRM สำหรับ Mitragynine และ Ajmalicine การวิเคราะห์หาปริมาณ Mitragynine ทำในโหมด MRM พร้อมด้วย 3 mass transitions ของ *m/z* 399 > 174, 399 > 226, และ 399 > 238 ทำให้เพิ่มความไวของสัญญาณ ขณะที่ transition *m/z* 353 > 144 เท่านั้นที่ถูกใช้สำหรับ Ajmalicine ส่วน dwell time ตั้งค่าไว้ที่ 800 ms สำหรับทั้ง Mitragynine และ Ajmalicine

3.2 การวิเคราะห์ด้วย LC

ในส่วนของ HPLC ทำการแยก Mitragynine และ Ajmalicine ในคอลัมน์ ซึ่งการแยกในขั้นต้นนี้จะใช้ Agilent Zorbax Extend-C18 column (4.6mm ×150mm i.d.×length; 3.5 μm particle size) ใช้ methanol และ 5mM ammonium acetate ในการแยกโดยการละลายล้าง ส่วนระบบปฏิบัติการของ MS/MS พารามิเตอร์ ในโหมด MRM ได้อธิบายไว้แล้วในก่อนหน้านี้ ซึ่งได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณของ Mitragynine และ Ajmalicine ดังได้กล่าวไว้ในรายงานของ (Janchawee et al., 2007) Mitragynine ไม่ละลายในน้ำ แต่ละลายได้ดีใน methanol จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า Mitragynine และ Ajmalicine ละลายได้อย่างรวดเร็วใน methanol และ 5mM ammonium acetate ในอัตราส่วน 90:10 อย่างไรก็ตาม เนื่องจากเป็น strong hydrophobicity การแยกโดยวิธี LC ในการแยกของ 2 สาร ยังไม่สามารถแยกกันได้อย่างสมบูรณ์ด้วยการใช้คอลัมน์ C18 เมื่อใช้ methanol ในอัตราส่วนที่ลดลงพีคของ Mitragynine จะ shape ในทางตรงกันข้าม เมื่อใช้ methanol ในอัตราส่วนที่สูงขึ้นพีคของ Mitragynine กลายเป็นพีค broader และมีความเข้มลดต่ำลง ซึ่งทั้ง 2 สารเกือบจะถูกชะล้างออกมาหมด ในอีกทาง

หนึ่ง ใช้ LC ในการแยก Mitragynine และ Ajmalicine ก็เช่นเดียวกันซึ่งขึ้นอยู่กับค่า pH ของ eluent การสูญเสียของ Mitragynine สามารถเกิดขึ้นได้เนื่องจากกระบวนการ hydrolysis ของสารประกอบที่ pH สูง

ในการศึกษาครั้งนี้ ใช้ polar silica-gel เป็น stationary phase สำหรับการแยก Mitragynine และ Ajmalicine เป็นผลสำเร็จด้วยการใช้ Waters Atlantis HILIC column (50mm×3.0mm length×i.d.; 3 μm particle size) ชะล้างด้วย methanol และ 5mM ammonium acetate ในอัตราส่วน 90:10 สำหรับ matrix standard ซึ่งประกอบด้วยทั้ง Mitragynine และ Ajmalicine ใน blank urine ทำการทดสอบภายใต้สภาวะเงื่อนไขที่เหมือนกัน เพื่อแสดงให้เห็นถึงผลกระทบของ matrix และสิ่งรบกวนซึ่งอาจเกิดขึ้นได้ ตัวอย่างโครมาโตแกรมของ matrix standard ได้แสดงไว้ดังรูป (5A) และ (5B) จากการสังเกตพบว่าไม่มีสิ่งรบกวนในการตรวจวิเคราะห์ หรือ IS retention windows ส่วน retention times ของ Mitragynine และ Ajmalicine อยู่ 2.4 และ 1.2 นาที ตามลำดับ ในการแยก Mitragynine และ Ajmalicine ใน HILIC column ได้ทำการทดลองที่อุณหภูมิแตกต่างกันไปถึง 3 ค่า คือ 30, 40 และ 50 ˚C พบว่าไม่มีความสำคัญในการศึกษาครั้งนี้ เนื่องจากในระบบการวิเคราะห์ คอลัมน์เป็นแบบ thermostatted ที่ 40 ˚C ระบบจะสั่งการลดระดับลงเมื่อ LC ปั๊มความดันกลับคืนมา

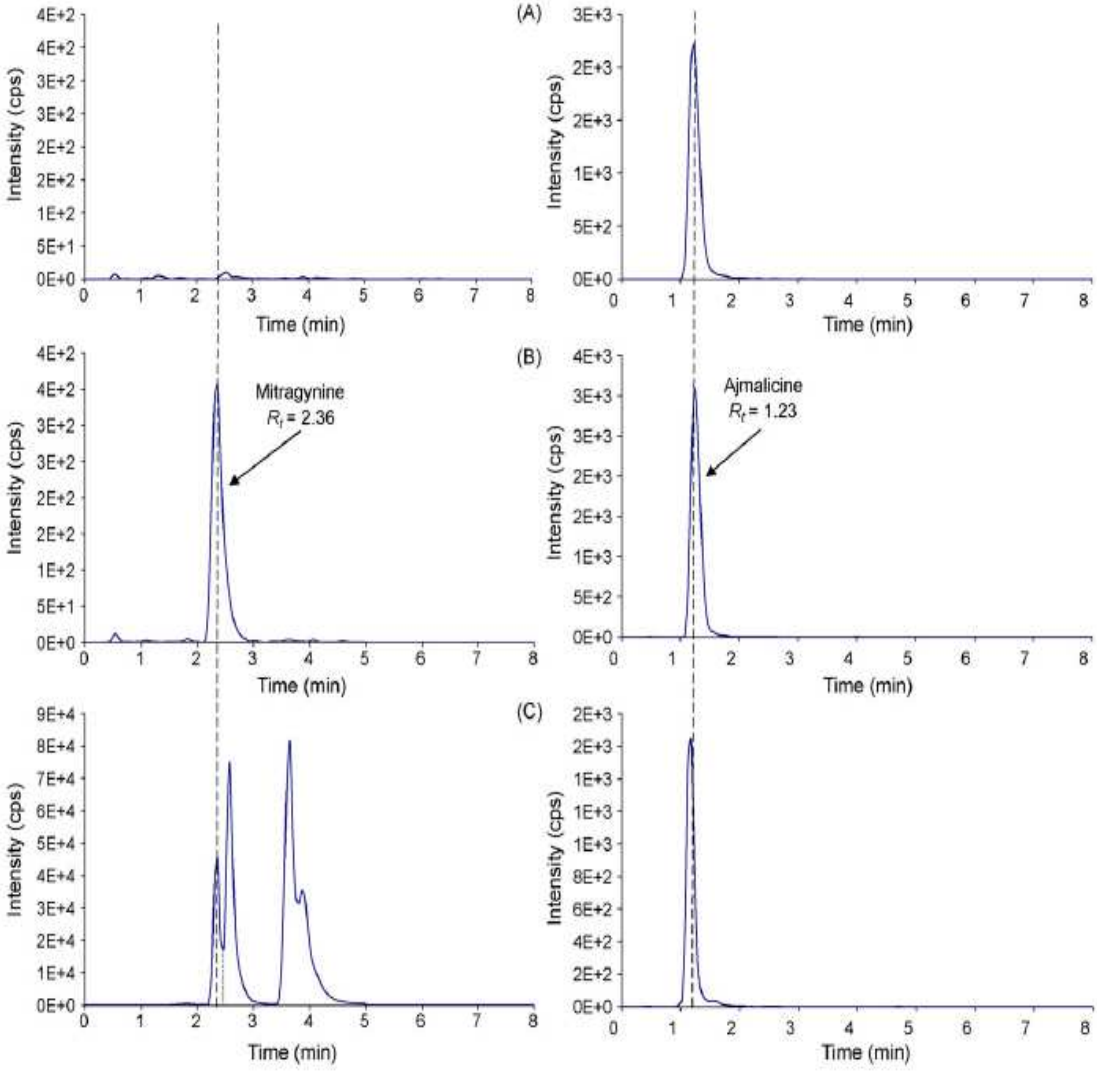


Fig. 5. HPLC-MS/MS extracted chromatograms of mitragynine (left) and ajmalicine (right). (A) Blank urine, (B) 5 ng/ml standard solution, and (C) urine extract from a kratom user. The transitions of *m/z* 399 > 174, 399 > 226, and 399 > 238 were used to monitor mitragynine, and the transition of *m/z* 353 > 144 was used for ajmalicine.

3.3 การประเมินค่าของการสกัดด้วย Liquid

สารเสพติดเมื่อเสพเข้าสู่ร่างกายแล้วจะตกค้างอยู่ในปัสสาวะได้นาน เพราะว่าความเข้มข้นของสารในรูปที่แตกตัวแล้ว (metabolites) และ/หรือ สารในรูปเดิม (parent drugs) โดยปกติจะพบว่ามีอยู่สูงใน matrix มากกว่าใน biological matrices อื่นๆ ดังเช่น ในเลือด น้ำลาย และจะต้องมีอยู่ในปริมาณที่มากต้องทำการเก็บตัวอย่างในทันที (Concheiro et at.,2007) การสกัดโดยวิธี Liquid–liquid extraction ใช้กันอย่างกว้างขวาง สำหรับการขจัดเอาสารออก(clean-up) จากตัวอย่างตรวจ ในการศึกษาครั้งนี้ ได้หาปริมาณของ Mitragynine โดยใช้การสกัดด้วยวิธี Liquid–liquid extraction ซึ่งใช้สารละลาย 3 ชนิดด้วยกัน คือ ethyl acetate, ethyl ether และ MTBE ส่วนค่า % Recovery หาได้จากอัตราส่วนระหว่าง ค่าปริมาณที่ตรวจได้และค่าของสารควบคุมที่ได้ใส่ลงไป กำหนดให้ทำซ้ำ 4 ครั้ง ในตัวอย่าง pooled urine ซึ่งได้ใส่ลงไปในตัวอย่างตรวจ Mitragynine และ Ajmalicine ด้วยเช่นกัน ปริมาณ 1 ng/ml และวิธีการดังในตัวอย่าง ตัวอย่างตรวจในการสกัดที่ใช้เป็น control คือ blank urine เติมด้วย Mitragynine และ Ajmalicine standard ก่อนที่จะนำไปฉีด

% Recovery ของ Mitragynine ในการสกัดด้วย ethyl acetate, ethyl Ether และ MTBE คือ 49, 82 และ 81% ตามลำดับ ดังในตารางที่ (2) ดังนั้น ethyl ether และ MTBE ให้ค่า % Recovery ที่ดี ทั้งใน Mitragynine และ Ajmalicine อย่างไรก็ดีการใช้ ethyl ether สามารถให้ค่าความเบี่ยงเบน (deviation) กว้างกว่า สำหรับ % Recovery ของ Mitragynine ในระหว่างกระบวนการสกัด สาเหตุจากสารละลายนี้สามารถระเหยการเป็นไอได้สูง (high volatility) ดังนั้น MTBE จึงถูกเลือกให้เป็นสารละลายสำหรับการสกัดของ Mitragynine ด้วยวิธีการทดลองที่ได้พัฒนาขึ้นมานี้

Table 2
Mean extraction recoveries of mitragynine (analyte) and ajmalicine (IS) at level of 1 ng/ml in different solvents (five replicates each).

Solvent	Mitragynine		Ajmalicine	
	Mean recovery, %	RSD	Mean recovery, %	RSD
Ethyl acetate	49	13	60	15
Ethyl ether	82	12	90	10
MTBE	81	8	92	8

3.4. การควบคุมคุณภาพและ method validation

ในการทำการตรวจวิเคราะห์ครั้งนี้ ตัวอย่างปัสสาวะเมื่อทำการสกัดเสร็จแล้ว จึงได้ใส่ Mitragynine ลงไปที่ความเข้มข้น 7 ระดับ ในช่วงตั้งแต่ 0.01 ถึง 5 ng/ml และวิธีการได้อธิบายไว้ในข้อ (2.6) ได้ใส่ Mitragynine ลงไปในปริมาณที่เท่ากัน แล้วทำการตรวจซ้ำ 3 ครั้ง ค่า linear regression ได้จากอัตราส่วนของพื้นที่ (analyte/IS) เปรียบเทียบกับอัตราส่วนความเข้มข้นของสารผสมด้วย

weighting factor ของ 1/*x* (เมื่อ *x* คือความเข้มข้น) แสดงว่ามีความถูกต้องถึง 90–115% และ ให้ผลค่า correlation factor $r > 0.995$

สำหรับการควบคุมคุณภาพได้ทำการวิเคราะห์ในตัวอย่างตรวจที่ 3 ค่า คือ 0.1, 1 และ 5 ng/ml แสดงให้เห็นถึงระดับต่ำ กลาง และสูงที่ได้ใส่สารลงไป ซึ่งได้ถูกนำมาใช้สำหรับวิธีการทดสอบ method validation ในช่วงของความเข้มข้นนี้ เหมาะสมกับทั้งในเรื่องของ ความไวของเครื่องมือ และการสกัดด้วย liquid–liquid ของ Mitragynine ในตัวอย่างปัสสาวะของคน ถ้าในตัวอย่างมี Mitragynine ที่ความเข้มข้นมาก เกินช่วงของ calibrated linear range ถ้าเป็นเช่นนั้นจำเป็นต้องทำการเจือจางก่อนนำมาสกัด

ได้ศึกษาถึงผลของ Matrix โดยเปรียบเทียบกับ retention times และพื้นที่พีคของ Mitragynine ในสารละลายที่ไม่ได้ผสม โดยใส่ลงไปก่อนการสกัด และหลังจากการสกัดเสร็จแล้วจึงใส่ลงไป ในความเข้มข้นตั้งแต่ 0.025 ถึง 2.5 ng/ml พบว่า retention times ไม่เปลี่ยน และการสกัด Mitragynine ยังนำผลที่ได้กลับมาใช้ได้อีก โดยไม่มีการปรับเปลี่ยน IS ช่วงจาก 53 ถึง 88% พื้นที่พีคของสารละลายที่ไม่ได้ผสมและหลังจากการสกัดเสร็จแล้วจึงใส่ลงไป ก็เป็นแบบเดียวกัน (ข้อมูลไม่ได้แสดงไว้) เพราะฉะนั้น matrix ไม่มีผลต่อการตรวจวิเคราะห์โดยวิธีนี้

ระบบ background ที่ต่ำ ของ Mitragynine ในตัวอย่าง blank urine ได้แสดงไว้ดังรูปที่ (5A) % Recovery ของ Mitragynine ทั้งหมด พบได้ตลอดระหว่าง 80 และ 110% จากการใส่ลงไปที่ 3 ระดับ คือ 0.1, 1 และ 5 ng/ml และได้ศึกษาทั้งการตรวจวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและต่างวันกัน การตรวจวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน มีค่าความแม่นยำ(RSD) เป็น 12 และ 16% ตามลำดับ สำหรับ matrix ที่ใส่ลงไปคือ ปริมาณ 1 และ 5 ng/ml ส่วนการใส่ลงไปในปริมาณระดับต่ำๆ ที่ 0.1 ng/ml ให้ผลค่า % RSD เป็น 22% ดังในตารางที่ (3) สำหรับความถูกต้องของวิธีการทดลองนี้ ได้ตกลงยอมรับร่วมกันว่าควรใส่สารลงไปที่ความเข้มข้นต่างๆ และทำการตรวจวัดค่า

Table 3
Intra-day assay precision for mitragynine determination in human urine in triplicate for each level.

Nominal concentration (ng/ml)	Measured concentration (ng/ml)	RSD
0.1	0.1	22
1.0	1.1	12
5.0	4.9	16

ค่ามากที่สุดของการตรวจวิเคราะห์ต่างวันกัน มีค่าความแม่นยำ(RSD) เป็น 33, 16 และ 16% ซึ่งได้จากความเข้มข้นที่ 0.1, 1.0 และ 5.0 ng/ml ตามลำดับ ดังในตารางที่ (4) จากการศึกษาครั้งนี้สังเกตพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ระหว่างการตรวจวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและต่างวันกัน ทั้งผลลัพธ์ที่ได้อยู่ภายในช่วงที่ยอมรับได้ตามเกณฑ์

Table 4
Inter-day assay precision for mitragynine in urine measured in triplicate for each level.

Analysis time (age of sample)	0.1 ng/ml		1 ng/ml		5 ng/ml	
	Mean recovery, %	RSD	Mean recovery, %	RSD	Mean recovery, %	RSD
Fresh	90	22	109	12	98	16
1 day	80	33	93	16	94	5
7 days	90	11	102	7	96	10
28 days	110	9	115	13	103	8

สำหรับค่า Minimum detectable level (MDL) ได้กำหนดให้ทำการตรวจซ้ำถึง 7 ครั้ง สำหรับ Mitragynine ในปัสสาวะคือ 0.02 ng/ml (RSD = 21%) ส่วนค่า Lower limit of quantification (LLOQ) ของ Mitragynine ในปัสสาวะคือ 0.1 ng/ml ค่า MDL และ LLOQ จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่ามีค่าต่ำมากกว่าที่ได้มีการรายงานไว้ในก่อนหน้านี้โดย (Janchawee et al., 2007) ซึ่งได้ใช้ HPLC-UV ในการตรวจวิเคราะห์

3.5 Application

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา ได้มาจากผู้ที่ถูกกล่าวหาว่าใช้กระท่อม จัดเตรียมไว้ให้โดย Upstate New York Poison Control Center และ SUNY Upstate Medical University ถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ - 80 ˚C จนกระทั่งนำมาตรวจวิเคราะห์ ในการตรวจวิเคราะห์เบื้องต้นของการสกัดปัสสาวะแสดงถึงระดับของ Mitragynine โดยส่วนมากเกินช่วงของ calibration range ดังนั้นจึงต้องเจือจางตัวอย่าง 20 เท่าด้วย methanol และตรวจวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง ทำให้ได้ค่าความแม่นยำจากการคำนวณถึง 95% ของค่าระดับความเชื่อมั่น ปริมาณของ Mitragynine ที่ตกค้าง พบในตัวอย่างถึง 167 ±15 ng/ml ซึ่งเป็นผลที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์โดยวิธี HPLC-MS/MS ดังรูปที่ (5C) จากการวิเคราะห์ด้วย MS/MS transitions ของ *m/z* 399 > 174, 399 > 226 และ 339 > 238 เป็นลักษณะเฉพาะของโมเลกุล Mitragynine ซึ่งยืนยันให้เห็นถึงสารประกอบนี้ได้จากการสกัดในปัสสาวะ

4. สรุป

กระท่อมสามารถเข้าหาได้ง่าย จัดเป็นสารเสพติดที่ผิดกฎหมาย มีเพิ่มมากขึ้นโดยทางอินเทอร์เน็ต จนกระทั่งในขณะนี้ยังไม่มีวิธีการตรวจ หรือการเปิดเผยถึงการตรวจยืนยันสารเสพติด ดังเช่นที่ได้ทำมาทั้งหมด และการรักษาคนไข้สังเกตว่ามีความสัมพันธ์กันกับผู้ที่ถูกสงสัยว่ามีการใช้สารโดยทั้งสิ้น การบริโภคกระท่อมสามารถนำไปสู่การตรวจพบปริมาณของ Mitragynine ที่ตกค้างอยู่ และ metabolite ในปัสสาวะ Mitragynine ที่ตกค้างอยู่ในปัสสาวะ ทำการสกัดออกมาโดยใช้สารละลาย Methyl t-butyl ether (MTBE) และแยกวิเคราะห์สารผสมออกจากกันโดยใช้คอลัมน์ HILIC ร่วมกับ Tandem mass spectrometry ในงานวิจัยนี้พบว่า Ajmalicine เหมาะสมที่สุด ที่ใช้เป็น Internal Standard (IS) ทั้งสำหรับการสกัด และการตรวจวิเคราะห์ Mitragynine โดยวิธี HPLC-MS/MS ซึ่งมีความถูกต้อง ความแม่นยำสูงและมีความไวสูง แสดงให้เห็นได้จากการตรวจวิเคราะห์ Mitragynine ในปัสสาวะ matrix ด้วยวิธี HPLC-MS/MS โดยมีค่าขีดจำกัดของการตรวจวัดถึง 0.02 และ 0.1 ng/ml ตามลำดับ ควรใช้สารมาตรฐาน Mitragynine ที่ได้รับการรับรองแล้ว จะทำให้การตรวจวิเคราะห์ทำได้ง่ายขึ้น และเฝ้าติดตามการศึกษาต่อไป

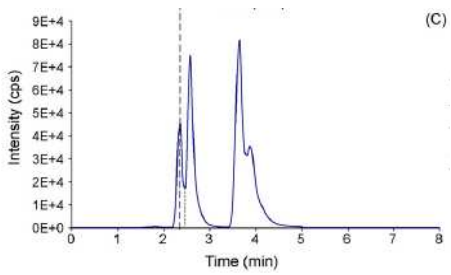
วิธีการทดลองที่ได้พัฒนาขึ้นมานี้ จะช่วยทำให้การรักษา ติดตามผลทางคลินิคก้าวหน้าต่อไป และในอนาคตเป็นไปได้ว่าจะมีงานวิจัยที่มีความสัมพันธ์กับความเป็นพิษอย่างรุนแรงในคนไข้ การศึกษา metabolites ของ Mitragynine และการสกัดโดยใช้ solid phase extraction (SPE) จะมีการพัฒนาขึ้นในอนาคตอันใกล้นี้

ข้อเสนอแนะ

ในประเทศไทย กระท่อมจัดเป็นยาเสพติดให้โทษประเภท 5 ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 135 (พ.ศ. 2539) เรื่องระบุชื่อและประเภทยาเสพติดให้โทษ ตามพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ พ.ศ. 2522 สำหรับทางการแพทย์ แบ่งสารเสพติดให้โทษเป็น 7 ประเภท ตามการออกฤทธิ์ ซึ่งกระท่อมจัดอยู่ในประเภท ยากระตุ้นประสาท (Stimulants) ถึงแม้ว่าปัจจุบันพืชกระท่อมยังคงมีสถานะเป็นยาเสพติดประเภท 5 คุณสมบัติในด้านที่เป็นโทษและคุณสมบัติที่ให้ประโยชน์ยังต้องการ การพิสูจน์ด้วยวิทยาการที่ชัดเจนอยู่ แต่ก็มีผู้ที่ใช้ใบกระท่อมอยู่ทั่วประเทศ โดยอาศัยความเชื่อจากคำบอกเล่าต่อกันมา ถึงประโยชน์นานาประการที่ใบกระท่อมมีอยู่ ในระหว่างที่ฝ่ายหนึ่งมีความเห็นว่าพืชกระท่อมควรอนุญาตให้มีการใช้อย่างถูกต้องตามกฎหมาย แต่อีกฝ่ายหนึ่งยังเห็นว่าการใช้กระท่อมอาจมีโทษ ทำให้เกิดอาการติดใบกระท่อมได้ ดังนั้นประเด็นการแก้พระราชบัญญัติยาเสพติดให้นำพืชกระท่อม ออกจากยาเสพติดประเภท 5 ก็ยังคงอยู่ในระหว่างการดำเนินการอยู่ในปัจจุบัน ด้วยเหตุผลที่ว่าไม่มีหลักฐานทางการวิจัยมาสนับสนุนว่าแท้จริงแล้วพืชกระท่อมเป็นสิ่งเสพติดและให้โทษต่อร่างกายหรือไม่ ซึ่งนักวิจัยหลายสาขาได้ร่วมกันเพื่อพยายามพิสูจน์ถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพืชกระท่อม รวมไปถึงการศึกษาด้านสังคมศาสตร์ด้วย และแม้ว่างานวิจัยทั้งในและต่างประเทศจะมีอยู่เป็นจำนวนมาก ก็ได้แต่หวังว่าข้อเท็จจริงของพืชกระท่อมที่เริ่มปรากฏออกสู่สาธารณชน น่าจะสามารถนำมาซึ่งความเปลี่ยนแปลงที่จะเกิดขึ้นในอนาคต ซึ่งอาจหมายถึงการเปลี่ยนแปลงกฎหมายยาเสพติด พ.ศ. 2522 หรือไม่เปลี่ยนก็เป็นไปได้

ในประเทศไทยการศึกษาวิจัยทางด้านวิธีการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณของ Mitragynine และสารอัลคาลอยด์อื่นๆ ทั้งในด้านการตรวจเบื้องต้นและการตรวจยืนยัน สำหรับการนำมาใช้ในงานประจำวันทางห้องปฏิบัติการยังมีน้อยมาก ส่วนเครื่องมือที่จะใช้สำหรับการตรวจวิเคราะห์ยืนยันมีราคาแพงและปัจจุบันนี้สารมาตรฐาน Mitragynine ยังไม่มีจำหน่าย อย่างไรก็ตาม จากวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณ Mitragynine ในปัสสาวะของผู้ที่ใช้ใบกระท่อมโดยวิธี High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry เป็นวิธีที่น่าสนใจอีกวิธีหนึ่ง ที่จะได้นำไปศึกษาทดลองเพื่อประยุกต์ใช้ในการพัฒนางานตรวจวิเคราะห์ประจำวันทางห้องปฏิบัติการต่อไป

จากงานวิจัยนี้ ในรูปที่ (5 C) พบว่าพีคของปัสสาวะที่สกัดมาจากผู้ที่ใช้กระท่อม พีคของ Mitragynine ยังทับซ้อนกันอยู่ อย่างไรก็ตาม สามารถยืนยันได้ว่าเป็น Mitragynine โดยได้จากการวิเคราะห์ด้วย MS/MS ดังรูปที่ (1) และจำนวนของตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง ควรมีจำนวนมากกว่านี้



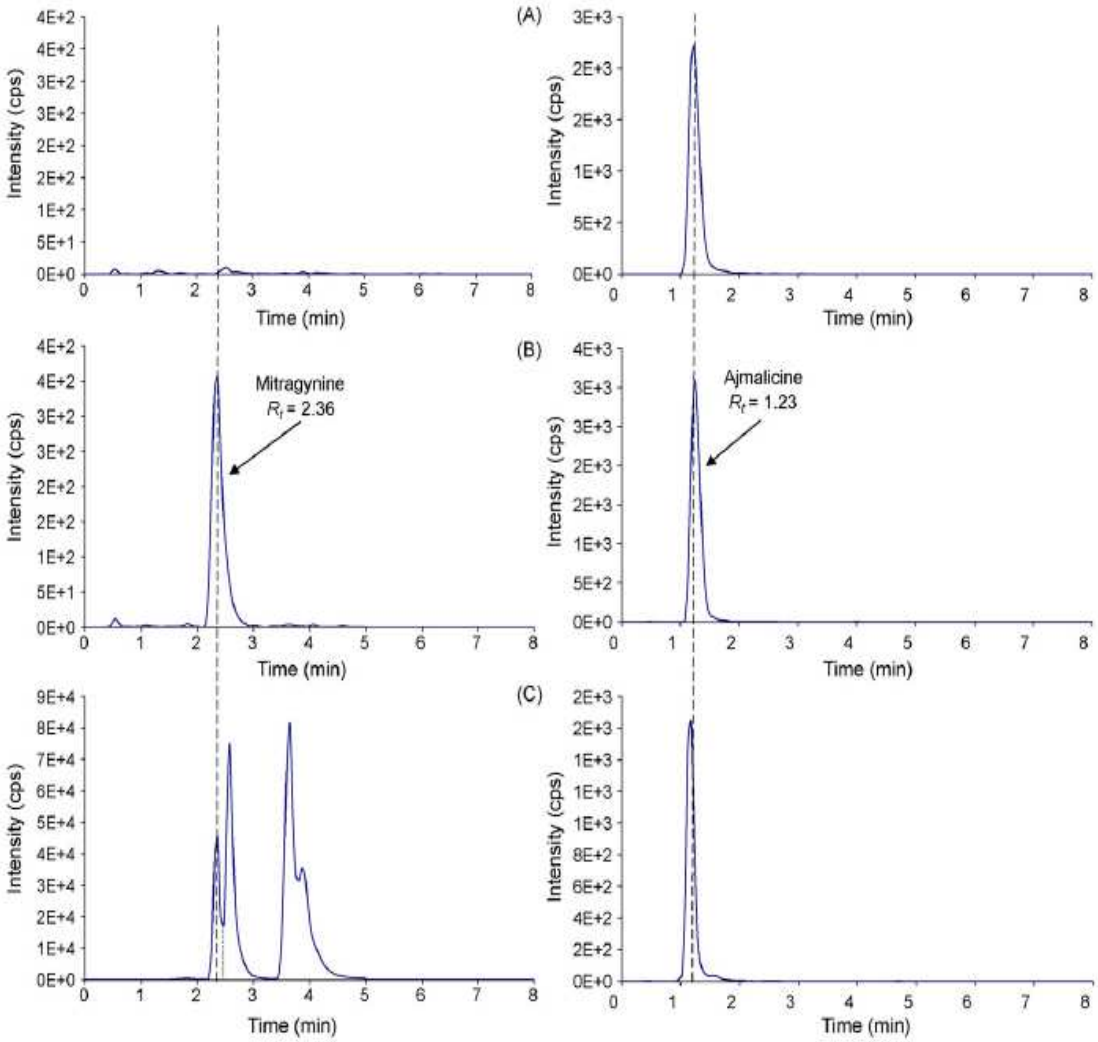


Fig. 5. HPLC-MS/MS extracted chromatograms of mitragynine (left) and ajmalicine (right). (A) Blank urine, (B) 5 ng/ml standard solution, and (C) urine extract from a kratom user. The transitions of *m/z* 399 > 174, 399 > 226, and 399 > 238 were used to monitor mitragynine, and the transition of *m/z* 353 > 144 was used for ajmalicine.

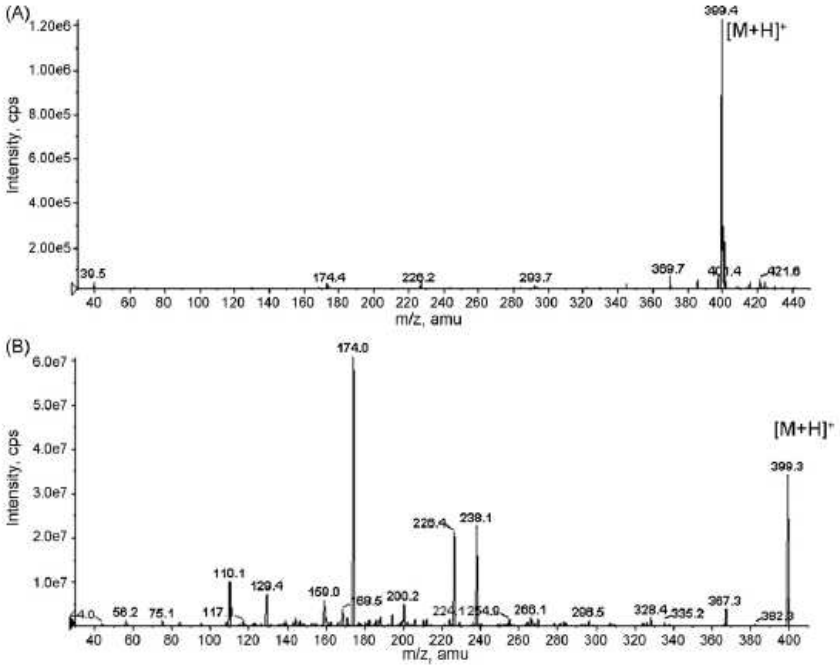


Fig. 1. Mass spectra of mitragynine. (A) Positive ESI in full-scan mode, and (B) in transaction of $[M+H]^+$ *m/z* 399 product-ion scan mode acquired at collision energy of 40 eV.

เอกสารอ้างอิง

1. Shijun Lua, Buu N. Trana, Jamie L. Nelsenb, Kenneth M. Aldousa. *Journal of Chromatography B*, 877 **(2009)** 2499–2505

2. E. Shellard, Bull. Narc. 26 (1974) 41.

3. S. Thongpradichote, K. Matsumoto, M. Tohda, H. Takayama, N. Aimi, S. Sakai, H.Watanabe, Life Sci. 62 (1998) 1371.

4. K.M. Babu, C.R. McCurdy, E.W. Boyer, Clin. Toxicol. (Phila.) 46 (2008)146.

5. H. Takayama, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 52 (2004) 359.

6. D.E. Zacharias, R.D. Rosenstein, G.A. Jeffrey, Acta Cryst. 18 (1965) 1039.

7.H. Takayama,M.Maeda, S. Ohbayashi, M. Kitajima, S. Sakai, N. Aimi, Tetrahedron Lett. 36 (1995) 9337.

8.K. Matsumoto, M. Mizowaki, T. Suchitra, H. Takayama, S. Sakai, N. Aimi, H.Watanabe, Life Sci. 59 (1996) 1149.

9.L.T. Yamamoto, S. Horie, H. Takayama, N. Aimi, S. Sakai, S. Yano, J. Shan, P.K. Pang, D. Ponglux, K.Watanabe, Gen. Pharmacol. 33 (1999) 73.

10. H. Takayama, H. Ishikawa, M. Kitajima, N. Aimi, J. Med. Chem. 45 (2002) 1949.

11. K.Watanabe, S. Yano, S. Horie, L.T. Yamamoto, Life Sci. 60 (1997) 933.

12. S. Tsuchiya, S. Miyashita, M. Yamamoto, S. Horie, S.I. Sakai, N. Aimi, H. Takayama, K.Watanabe, Euro. J. Pharmacol. 443 (2002) 185.

13. K. Matsumoto, S. Horie, H. Takayama, H. Ishikawa, N. Aimi, D. Ponglux, T.Murayama, K.Watanabe, Life Sci. 78 (2005) 187.

14.S. Assanangkornchai, A. Muekthong, N. Sam-Angsri, U. Pattanasattayawong,Subst. Use Misuse 45 (2007) 2145.

15. P.J. Houghton, A.L. Ikram, M. Saidb, Phytochemistry 30 (1991) 347.

16. D. Ponglux, S. Wongseripipatana, H. Takayama, M. Kikuchi, M. Kurihara, M.Kitajima, N. Aimi, S. Sakai, Planta Med. 60 (1994) 580.

17. B. Janchawee, N. Keawpradub, S. Chittrakarn, S. Prasettho, P.Wararatananurak, K. Sawangjareon, Biomed. Chromatogr. 21 (2007) 176.

18. สาวิตรี อัษณางค์กรชัย และอาภา ศิริวงศ์ ณ อยุธยา.(2548). พืชกระท่อมในสังคมไทย. กรุงเทพฯ : พิมพ์ที่ หจก.บางกอกบล๊อก.

19. www.wikipedia.com