วิธีตรวจปริมาณกัญชาในปัสสาวะแบบรวดเร็วและมีประสิทธิภาพด้วยตัวดูดซับของแข็งแบบออนไลน์ ลิควิดโครมาโทกราฟีแทนเดมแมสสเปกโทรเมทรี

รุ่งทิพย์ เจือตี่ ภรณ์ทิพย์ ท้วมทอง อชิรญา นาคฤทธิ์ และ อรพิณ ทนันขัติ
สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences

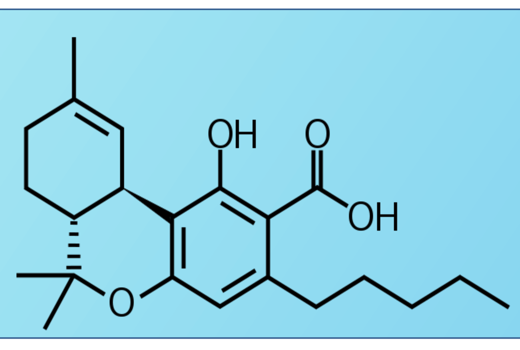
บทคัดย่อ

ข้อมูลจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์พบว่ามีผู้เสพกัญชาเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ตามพระราชบัญญัติป้องกันและปราบปรามยาเสพติด พ.ศ. 2519 เมื่อตรวจพบว่ามีสารออกฤทธิ์หรือกัญชาอยู่ในปัสสาวะตั้งแต่ 50 นาโนกรัม/มิลลิลิตรขึ้นไปถือว่าเป็นผู้มีสารเสพติดในร่างกาย วิธีการตรวจจึงต้องมีประสิทธิภาพสูงเพื่อตอบสนองความต้องการได้อย่างถูกต้องและรวดเร็ว วัตถุประสงค์ของการวิจัยเพื่อพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจปริมาณกัญชาในปัสสาวะด้วยตัวดูดซับของแข็งแบบออนไลน์ เทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี แทนเดม-แมสสเปกโทรเมทรี ย่อยสลายพันธะระหว่าง THCA และกลูคิวโรไนด์ด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ มี THCA-D3 เป็นสารมาตรฐานภายใน สกัดสารด้วยตัวดูดซับของแข็งแบบออนไลน์ แยกสารด้วยคอลัมน์ชนิด C18 ตรวจวัดด้วยแทนเดมแมสสเปกโทรเมทรี ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีอ้างอิงตาม FDA guidance พบว่าช่วงความเป็นเส้นตรง 10 – 300 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มีความแม่นอยู่ในช่วง 80.5-107.3 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าความเที่ยงภายในวันเดียวกัน และระหว่างวัน แสดงด้วยค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน มีค่าต่ำกว่า 13% ค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เท่ากับ 1.86 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตัวดูดซับของแข็งแบบออนไลน์ช่วยลดขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างและความผิดพลาด เทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีมีประสิทธิภาพในการแยกสารผสม แทนเดมแมสสเปกโทรเมทรีเพิ่มความเฉพาะเจาะจง วิธีที่พัฒนาสามารถใช้ได้กับตัวอย่างส่งตรวจจริงเหมาะสมต่อการใช้เป็นวิธีมาตรฐานของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ความเป็นมา

การเสพกัญชาเป็นสิ่งที่ผิดกฎหมายในประเทศไทย หากพบกัญชาในปัสสาวะตั้งแต่ 50 นาโนกรัม/มิลลิลิตรขึ้นไป ถือว่าเป็นผู้มีสารเสพติดในร่างกาย[1] การตรวจพิสูจน์ผู้เสพกัญชาสามารถตรวจได้โดยตรวจเมทาบอไลต์หลักของกัญชาคือ 11-nor-9-carboxy-delta-9-tetrahydrocannabinol (THCA)[2] (รูปที่ 1) ซึ่งสามารถตรวจพบในปัสสาวะได้แม้หยุดสูบนาน 58 ชั่วโมง[3]

THCA ขับออกทางปัสสาวะในรูปที่จับกับกลูคิวโรไนด์มากกว่า THCA อิสระ 1.3-4.5 เท่า[4] ในการตรวจวิเคราะห์ตรวจวัด THCA อิสระ จึงต้องสลายพันธะ (Hydrolysis) ระหว่าง THCA กับกลูคิวโรไนด์ ด้วยด่างหรือเอนไซด์เบต้ากลูคิวโรนิเดส และทำการสกัดด้วยวิธีการสกัดด้วยวัฏภาคของเหลว (Liquid-Liquid Extraction, LLE) หรือ การสกัดด้วยวัฏภาคของแข็ง (Solid-Phase Extraction, SPE)[5] วิธีการสกัดทั้งสองชนิดต้องใช้ปริมาณตัวอย่าง สารเคมีมาก และเวลาเตรียมตัวอย่างก่อนวิเคราะห์อย่างน้อย 120 นาที



รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างโมเลกุลของ 11-nor-Delta(9)-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid (THCA)

เอกสารอ้างอิง

1. สำนักงานคณะกรรมการป้องกันและปราบปรามยาเสพติด กระทรวงยุติธรรม.รวมกฎหมายยาเสพติด พร้อมด้วย กฎกระทรวง ระเบียบ ข้อบังคับ. พิมพ์ครั้งที่ 13. กรุงเทพฯ: ห้างหุ้นส่วนจำกัดบางกอกบล็อก;2556.
2. Priyamvada S, Pratima M, and Srinivas B. Chemistry, Metabolism, and Toxicology of Cannabis: Clinical Implications. Iran J Psychiatry. 2012;7(4): 149-56.
3. Huestis MA, Mitchell JM, Cone EJ. Urinary excretion profiles of 11-nor9-carboxy-delta 9-tetrahydrocannabinol in humans after single smoked doses of marijuana. J Anal Toxicol. 1996;20:441–452.
4. Jung J, Meyer MR, Maurer HH, Neusüss C, Weinmann W, Auwärter V. Studies on the metabolism of the Delta9-tetrahydrocannabinol precursor Delta9-tetrahydrocannabinolic acid A (Delta9-THCA-A) in rat using LC-MS/MS, LC-QTOF MS and GC-MS techniques. J Mass Spectrom. 2009;44(10):1423-33.
5. Wolfgang W, Susanne V, Rolf G, Claudia M, Andreas B. Simultaneous determination of THC-COOH and THC-COOH-glucuronide in urine samples by LC/MS/MS. Forensic Sci. Int. 2000;113(1-3): 381–7.
6. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER) and Center for Veterinary Medicine (CVM) [Internet]. Guidance for industry: Bioanalytical method validation [updated 2013 Sep; cited 2017 Mar 16]. Available from: https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm368107.pdf
7. Eurachem/CITAC Guide CG 4 [Internet]. Quantifying uncertainty in analytical measurement. 2000[cited 2017 Aug 20]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/236884859_EurachemCITAC_Guide_CG4_Quantifying_Measurement_Uncertainty_in_Analytical_Measurement
8. Núñez O, Gallart-Ayala H, Martins CP, Lucci P. New trends in fast liquid chromatography for food and environmental analysis. J Chromatogr A. 2012;1228:298-323

วัสดุและวิธีการ

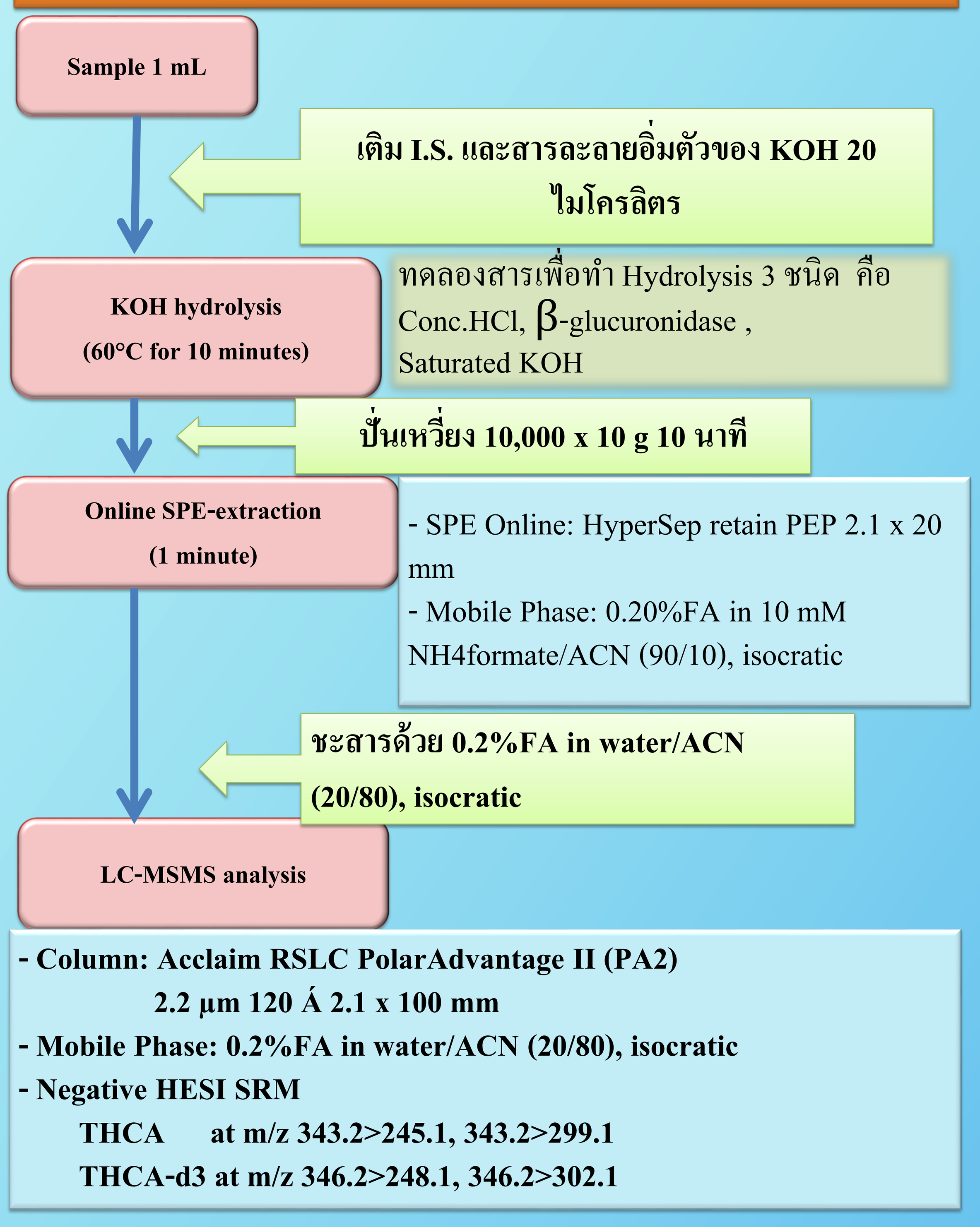
สารละลายมาตรฐาน 1.0 ± 0.0135 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในเมทานอลของ THCA ความบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 99.0 สารมาตรฐานภายใน (Internal standard solution; I.S.) 11-nor-9-carboxy-delta-9-tetrahydrocannabinol-D3 (THCA-D3) ความบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 98.0 ตัวอย่างส่งตรวจจำนวน 6 ตัวอย่าง ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างตรวจวิเคราะห์ดังรูปที่ 2

เครื่องลิควิดโครมาโทกราฟทำงานด้วยระบบ 2 ปั๊ม โดยมี switching valve เปลี่ยนทิศทางทางเดินของวัฏภาคเคลื่อนที่ (รูปที่ 3)

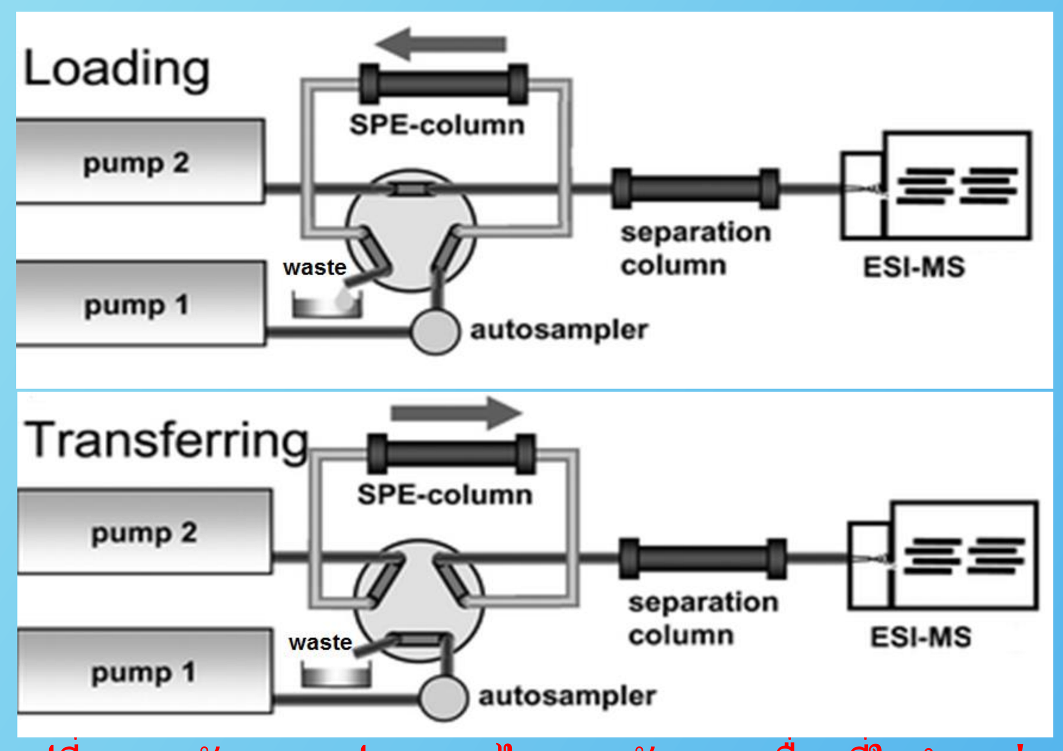
ตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์อ้างอิงตาม Food and drug administration guidance for industry: bioanalytical method validation [6] และคำนวณค่าความไม่แน่นอนการวัดตามแนวทาง ISO/GUM[7] (รูปที่ 4) ดังสูตร

$$u_c = \sqrt{(u(Calibration))^2 + (u(Standard))^2 + (u(Precision))^2 + (u(Bias))^2}$$

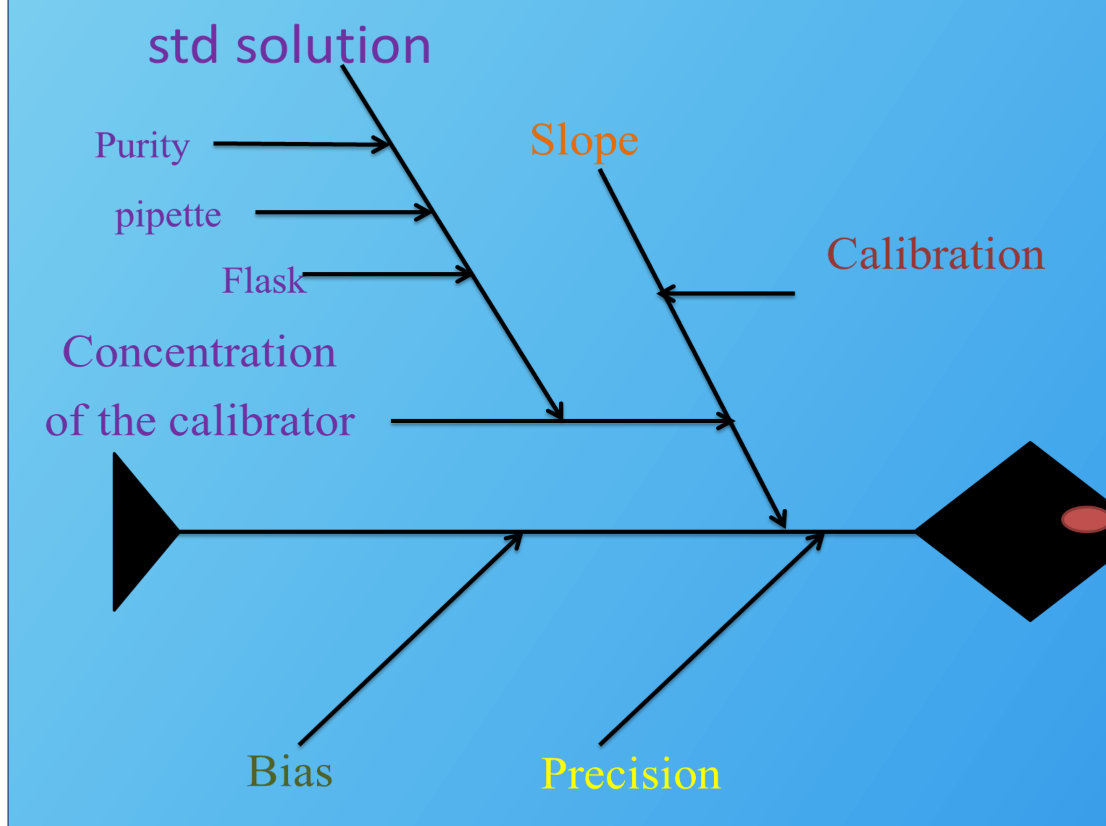
Expanded uncertainty at 95%, $U = k u_c$



รูปที่ 2 ผังงานแสดงกระบวนการตรวจวิเคราะห์

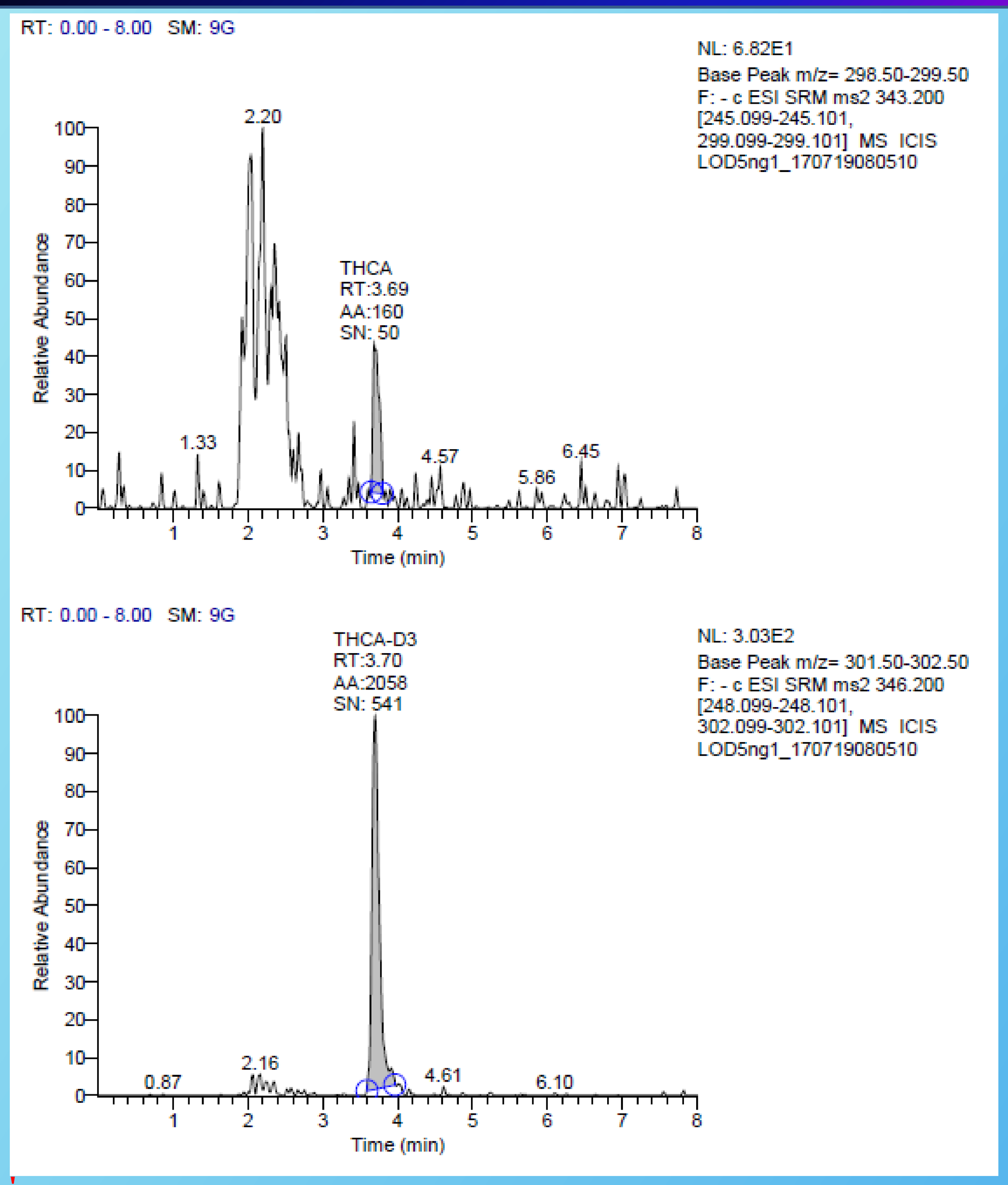


รูปที่ 3 แผนผังแสดงรูปแบบการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ในตำแหน่ง Loading และ Transferring (ปรับเปลี่ยนจากงานประพันธ์ของ N.H. Schebb)



รูปที่ 4 แผนภูมิก้างปลาแสดงแหล่งค่าความไม่แน่นอนการวัด THCA ในตัวอย่างปัสสาวะตามแนวทาง ISO/GUM

ผลการดำเนินงานและวิจารณ์



รูปที่ 5 แสดง Mass Chromatogram และ fracment ion ของ THCA , THCA-d3

ตารางที่ 1 สรุปผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี

Calibration range	**10-300 ng/mL**			
Selectivity	No interfering peak was observed from seven different batched of blank urine at the retention times of analyte.			
Accuracy (%RD)	LLOQ	QCL	QCM	QCH
Intra-day	12.25	3.95	7.81	9.55
Inter-day	7.42	1.54	4.16	2.32
Precision (%CV)	LLOQ	QCL	QCM	QCH
Intra-day	12.27	8.01	5.76	8.55
Inter-day	10.07	7.21	6.43	8.65
Limit of Quantitation	10 ng/mL			
Limit of Qualitation	5 ng/mL			
Matrix effect (%CV of Abs. matrix effect)	QCL 8.10		QCH 8.27	

ตารางที่ 2 Calibration curve parameters

Calibration curve	Regression parameters			
	Slope	Intercept	Correlation coefficient (r)	Coefficient of determination (r^2)
Day 1	0.019688	0.0275372	0.9987	0.9975
Day 2	0.019037	0.0268197	0.9993	0.9987
Day 3	0.017621	0.0164628	0.9999	0.9998

การทดลองย่อยสลายพันธะระหว่าง THCA และกลูคิวโรไนด์ ด้วยกรด HCl ความเข้มข้นสูง ทำให้ THCA-D3 สลายตัว สารละลายอิ่มตัวของ KOH ทำให้เกิด THCA อิสระได้ดีเท่ากับการใช้ β-glucuronidase ตั้งแต่การอบร้อน 10 นาที จนถึง 90 นาที ดังนั้นวิธีนี้จึงเลือกใช้ KOH ในการ hydrolysis และเป็นสารเคมีที่หาง่าย ราคาถูก

การสกัดสารด้วยตัวดูดซับของแข็งแบบออนไลน์ใช้เวลาเพียง 1 นาที ใช้ได้กับตัวอย่างที่มีปริมาณน้อย สัมผัสสารเคมีน้อย ทำซ้ำได้สะดวก มีการใช้อย่างกว้างขวางในการตรวจวิเคราะห์วัตถุพยานที่มาจากสิ่งมีชีวิต[8] ราคาถูกกว่าตัวดูดซับของแข็งแบบออฟไลน์ 1 ใน 4 เท่าต่อตัวอย่าง ได้ค่าความไม่แน่นอนขยายของวิธีวิเคราะห์ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เท่ากับ 1.86 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจตัวอย่างส่งตรวจจริงได้

สรุป

การตรวจกัญชาในปัสสาวะด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นด้วยการใช้ KOH hydrolysis และวิเคราะห์ด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี แทนเดมแมสสเปกโทรเมทรี และวัฏภาคของแข็งแบบออนไลน์ มีความถูกต้อง แม่นยำ จำเพาะเจาะจง รวดเร็ว สะดวกต่อการปฏิบัติงาน การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีตามแนวทางของ FDA ยืนยันว่าวิธีมีความถูกต้องใช้ได้ สามารถนำวิธีไปใช้ในการตรวจพิสูจน์ผู้เสพกัญชาตามพระราชบัญญัติป้องกันและปราบปรามยาเสพติด พ.ศ. 2519 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เหมาะสมต่อการใช้เป็นวิธีมาตรฐานของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และเป็นตัวอย่างวิธีให้ผู้ที่ต้องการวิธีเตรียมตัวอย่างที่สะดวก รวดเร็ว