

การตรวจวิเคราะห์สารเสพติดในเลือดและปัสสาวะด้วยเทคนิค Dried Spot

ผู้จัดทำ:

- จิรภิญญา เลี่ยมไครต่วน
- จิตนภา วรนิติกุล
- นิรมล จิตต์สมหมาย
- สุธธิตา รวมอร่าม

Keyword:

- blood, urine
- สารเสพติด
- drugs of abuse
- automated dried spot analysis
- LC-MS/MS

การตรวจสารเสพติดและสารออกฤทธิ์จากเลือดและปัสสาวะ ด้วยเทคนิค LC-MS/MS เป็นที่ยอมรับในระดับสากลและนิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน เช่น กลุ่มยาที่มีฤทธิ์กระตุ้นประสาทที่เป็นสารเคมีสังเคราะห์ เช่น เคตามีน เมทแอมเฟตามีน ซึ่งมีสารเมตาบอลไลต์คือ แอมเฟตามีน หรือการตรวจวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ในกลุ่มกัญชา เช่น THC และ CBD เป็นต้น

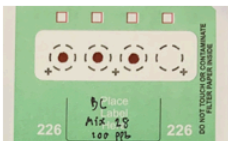
อย่างไรก็ตามทั้งเลือดและปัสสาวะเป็นตัวอย่างชีววัตถุที่จำเป็นต้องผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่างก่อนนำเข้าสู่เครื่องวิเคราะห์ ระบบ Automated Dried Spot Analysis ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อหลีกเลี่ยงการสัมผัสตัวอย่างและลดภาระงานของผู้ปฏิบัติงาน เนื่องจากการเตรียมตัวอย่างดังกล่าวต้องอาศัยทักษะและประสบการณ์เพื่อให้มีความปลอดภัยและได้ผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องและน่าเชื่อถือ

โดยระบบ Automated Dried Spot เป็นระบบที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ตัวอย่างเลือด, ปัสสาวะ หรือชีววัตถุอื่นๆ โดยใช้การหยดตัวอย่างระดับไมโครลิตรลงบนกระดาษเก็บตัวอย่างและรอให้ตัวอย่างแห้ง หลังจากนั้นผู้ปฏิบัติงานสามารถนำกระดาษดังกล่าวไปเข้าระบบสกัดแบบการชะด้วยตัวทำละลาย, ระบบทำความสะอาด (clean-up) ต่อพ่วงกับการแยกผ่านคอลัมน์ (LC) และระบบตรวจวัดด้วยเทคนิคการวัดมวล (MS/MS) ตามลำดับแบบอัตโนมัติ (รูปที่ 1) ซึ่งทำให้สามารถตรวจวิเคราะห์สารได้โดยง่าย รวดเร็วและมีความจำเพาะสูงจึงเหมาะสมอย่างยิ่งสำหรับการตรวจคัดกรอง (screening) ตัวอย่างจำนวนมาก

ในบทความนี้จึงนำเสนอการใช้ระบบ Automated Dried Spot Analysis ต่อพ่วงกับเครื่องมือวิเคราะห์ LC-S/MS ในการตรวจวิเคราะห์สารเสพติด 40 ชนิด ในตัวอย่างเลือด ซึ่งแต่ละตัวอย่างใช้เวลาในการสกัดและวิเคราะห์เพียง 7 นาทีเท่านั้น






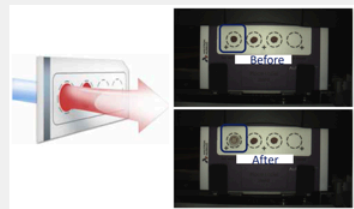


กระดาษเก็บตัวอย่าง

**Thermo Scientific™
Transcend DSX-1**




Flow-Through Desorption

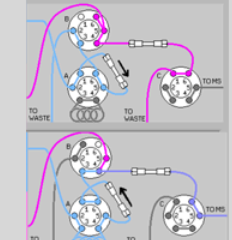


สกัดสารที่ต้องการวิเคราะห์จาก dried spot โดยใช้การชะผ่านด้วยตัวทำละลาย

**Thermo Scientific™
TSQ Altis MS/MS**

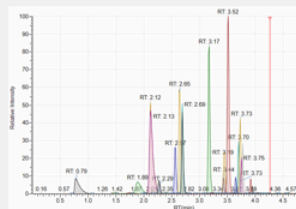


Clean-up & Separation



ทำความสะอาดตัวอย่างด้วย clean-up column และ แยกสารด้วย analytical column ตามลำดับ

Detection



อ่านสัญญาณในรูปแบบ LC-MS/MS chromatogram

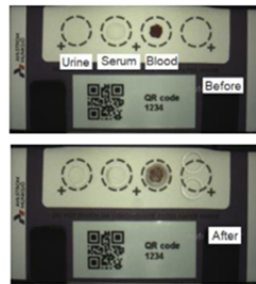
รูปที่ 1: แสดงระบบ Automated Dried Spot ต่อพ่วงกับระบบ LC-MS/MS

Desorption, clean-up and LC conditions

Desorption duration	20 s
Internal standard	Trimipramine 1 ppb in MeOH
Column 1 (Clean-up column)	Turboflow Cyclone, 50 x 0.5 mm
Column 2 (Analytical column)	Accucore Biphenyl 2.6 µm, 50 x 2.1 mm
Column temperature	40 °C
Mobile phase	<p>Loading pump A: 0.1% NH₄OH in H₂O B: H₂O:MeOH (20:80 v/v) + 0.2% FA C: H₂O:ACN:IPA:Acetone (40:40:10:10)</p> <p>Eluting pump A: 0.1% FA + 5mM NH₄COOH in H₂O B: 0.1% FA + 5mM NH₄COOH in MeOH</p>

MS/MS conditions

Ion source type	H-ESI
Spray voltage (+/-)	3500 V / 2500 V
Data acquisition mode	Selected ion monitoring (SRM)

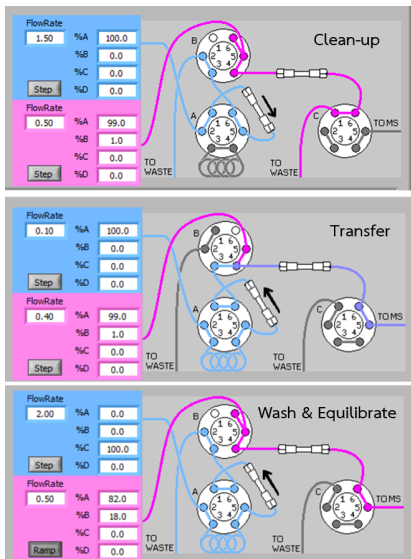


รูปที่ 2: กระดาษตัวอย่างเปรียบเทียบระหว่างก่อนและหลังการสกัด

ตารางที่ 1: แสดงอุปกรณ์สิ้นเปลืองและการตั้งพารามิเตอร์เครื่องมือวิเคราะห์



Gradient program



Time	Loading pump					Valve position			Eluting pump			
	Flow	Gard	%A	%B	%C	Tee	Loop	Divert	Flow	Gard	%A	%B
0.00	1.50	Step	100.0	-	-	===	out	Waste	0.50	Step	99.0	1.0
0.33	0.10	Step	100.0	-	-	===	out	Waste	0.40	Step	99.0	1.0
0.42	0.10	Step	100.0	-	-	T	in	Det	0.40	Ramp	99.0	1.0
1.17	2.00	Step	-	-	100.0	===	in	Det	0.50	Ramp	82.0	18.0
1.67	2.00	Step	100.0	-	-	===	out	Det	0.50	Ramp	65.0	35.0
2.17	2.00	Step	-	-	100.0	===	in	Det	0.50	Ramp	50.0	50.0
2.67	2.00	Step	100.0	-	-	===	out	Det	0.50	Ramp	35.0	65.0
3.17	2.00	Step	-	-	100.0	===	in	Det	0.50	Ramp	22.0	78.0
3.67	2.00	Step	100.0	-	-	===	out	Det	0.50	Ramp	10.0	90.0
4.17	2.00	Step	-	100.0	-	===	in	Det	0.50	Ramp	1.0	99.0
4.67	1.50	Step	100.0	-	-	===	out	Det	0.50	Step	1.0	99.0
5.17	1.50	Step	100.0	-	-	===	out	Waste	0.50	Step	99.0	1.0

ตารางที่ 2 แสดงการปรับสัดส่วนสารละลายที่ใช้ในระบบ Clean-up และ Analtical LC

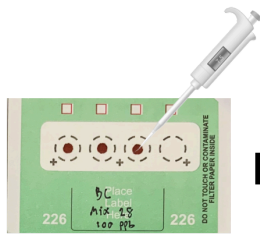
No. Compound	RT (min)	Precursor ion (m/z)	Target Peak		Confirming Peak	
			PI (m/z)	CE (V)	PI (m/z)	CE (V)
1 Alprazolam	3.78	309.1	281.0	41	205.0	26
2 Amphetamine	1.91	136.4	91.1	21	119.0	10
3 Benzoylcegonine	2.70	290.1	168.1	30	105.1	22
4 Buprenorphine	3.19	468.3	414.3	40	396.3	35
5 Cannabidiol (CBD)	4.26	315.2	123.0	36	135.1	18
6 Clonazepam	3.50	316.1	270.0	38	214.0	25
7 Codeine	2.27	300.1	165.1	42	215.1	26
8 Diazepam	3.92	285.1	193.1	26	154.1	31
9 Ecgonine methyl ester hydrochloride	0.79	200.1	182.1	25	82.3	18
10 Ethylone	2.43	222.1	147.0	20	174.1	20
11 Etizolam	3.95	343.0	259.0	35	314.0	26
12 Fentanyl	3.17	337.2	105.2	34	188.0	24
13 Flunitrazepam	3.71	314.1	268.1	35	239.2	27
14 Heroin	2.81	370.2	268.1	29	328.1	25
15 JWH-018	4.64	342.2	95.05	74	145.1	49
16 Ketamine	2.70	237.9	125.1	27	179.1	18
17 Lorazepam	3.44	321.0	274.9	22	302.9	15
18 MDEA	2.54	208.1	105.1	26	133.1	20
19 MDMA	2.39	194.3	105.2	29	163.1	17
20 MDPV	2.93	276.2	126.1	28	135.0	28

No. Compound	RT (min)	Precursor ion (m/z)	Target Peak		Confirming Peak	
			PI (m/z)	CE (V)	PI (m/z)	CE (V)
21 Mephedrone	2.46	178.1	144.1	28	145.1	24
22 Methadone	3.52	310.2	265.2	27	105.0	15
23 Methamphetamine	2.14	150.2	91.1	19	119.1	10
24 Methylone	2.29	208.1	132.0	28	149.1	30
25 Midazolam	3.45	326.0	291.0	60	222.0	33
26 Morphine	1.77	286.1	152.1	60	115.2	50
27 Nimetazepam	3.76	296.1	250.1	26	221.1	26
28 Nor-9-carboxy-69-THC	4.17	345.2	91.1	44	193.1	24
29 Nordiazepam	3.65	271.1	140.1	28	208.1	28
30 Norketamine	2.57	224.1	125.0	25	207.1	12
31 Phenazepam	3.66	351.0	206.0	50	179.0	36
32 Phencyclidine	3.28	244.2	86.1	15	91.1	37
33 Phentermine	2.14	150.1	91.1	36	65.0	18
34 PMMA	2.41	180.2	121.2	26	149.2	15
35 Temazepam	3.73	301.1	255.1	22	283.0	14
36 Tramadol	2.65	264.2	58.0	17	246.2	10
37 Trazodone	3.21	372.2	96.0	53	148.1	37
38 THC	4.27	315.2	123.0	36	135.1	18
39 6-MAM	2.30	328.1	165.1	47	211.1	31
40 α-Pyrrolidino valerophenone	2.78	232.2	91.1	25	95.1	42

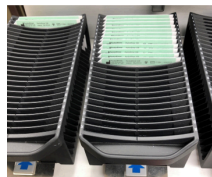
RT: Retention time, PI: Product ion, CE: Collision energy

ตารางที่ 3 แสดงข้อมูล Retention time, SRM transition และ Collision energy ของสารเสพติด 40 ชนิด

ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์



รอให้ตัวอย่างแห้งที่อุณหภูมิห้อง



วางกระดาษตัวอย่างลงบนช่องใส่กระดาษบนเครื่อง

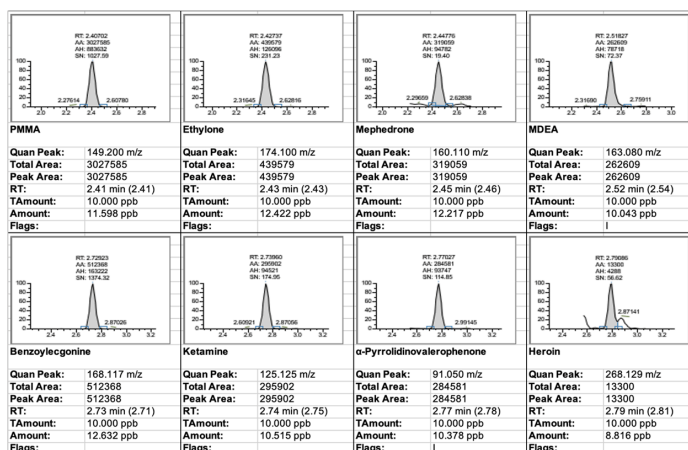


ส่งผ่านโปรแกรมเพื่อเริ่มการวิเคราะห์

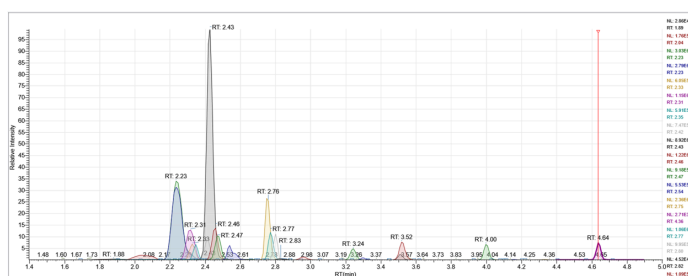
หยดตัวอย่างลงบนกระดาษทดสอบปริมาตร 3 ul สำหรับตัวอย่างเลือดหรือ 5 ul สำหรับตัวอย่างปัสสาวะ

ผลการวิเคราะห์

รูปที่ 3: หน้าต่างแสดงผลการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม TraceFinder



รูปที่ 4: ตัวอย่างการรายงานผลชนิดสารที่ตรวจพบ



รูปที่ 5: ตัวอย่าง Extracted Ion Chromatogram (XIC) จากการวิเคราะห์ด้วยระบบ Automated Dried Spot Analysis

ข้อมูลจากการตรวจวิเคราะห์สารเสพติดในตัวอย่างจากระบบ Automated Dried Spot Analysis ถูกประมวลผลด้วยโปรแกรม TraceFinder เพื่อระบุและยืนยันชนิดของสารเสพติดจาก Rt และ m/z ผลการทดลองพบว่าประสิทธิภาพของระบบดังกล่าวสามารถตรวจวัดสารเสพติดในเลือดและปัสสาวะได้ โดยมีขีดจำกัดของการตรวจวัดสารแต่ละชนิดอยู่ที่ระดับต่ำกว่า 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเพียงพอสำหรับการตรวจสกรีนนิงสารเสพติดในปัจจุบัน นอกจากนี้ระบบดังกล่าวได้ถูกทดสอบใช้ตรวจค้นหาสารเสพติดในเลือดจำนวน 50 ตัวอย่าง เพื่อแสดงประสิทธิภาพของเครื่องมือในการใช้ตรวจค้นหาสารเสพติดในตัวอย่างชีวภาพ และนำผลการทดสอบเปรียบเทียบกับวิธีที่มีอยู่เดิมคือการเตรียมตัวอย่างเลือดด้วยวิธีตกตะกอนโปรตีนด้วยอะซิโตนไนไตรล์, ปั่นเหวี่ยงเพื่อนำสารสกัดส่วนโสมการองและฉีดเข้าเครื่อง online-SPE-LC-MS/MS จากผลการทดสอบพบว่าทั้งสองวิธีวิเคราะห์สามารถตรวจพบชนิดสารเสพติดที่มีอยู่ในรายการทั้ง 40 ชนิดได้ผลตรงกันทุกตัวอย่าง (รูปที่ 6)



Sample No.	Method	Compound name																													
1	D																														
2	D																														
3	D																														
4	D																														
5	D																														
6	D																														
7	D																														
8	D																														
9	D																														
10	D																														
11	D																														
12	D																														
13	D																														
14	D																														
15	D																														
16	D																														
17	D																														
18	D																														
19	D																														
20	D																														
21	D																														
22	D																														
23	D																														
24	D																														
25	D																														
26	D																														
27	D																														
28	D																														
29	D																														
30	D																														
31	D																														
32	D																														
33	D																														
34	D																														
35	D																														
36	D																														
37	D																														
38	D																														
39	D																														
40	D																														
41	D																														
42	D																														
43	D																														
44	D																														
45	D																														
46	D																														
47	D																														
48	D																														
49	D																														
50	D																														

สรุปผลการตรวจวิเคราะห์

ระบบ Automated Dried Spot Analysis เป็นระบบที่สามารถใช้ในการตรวจค้นหาชนิดสารเสพติดได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากมีความจำเพาะสูงด้วยการตรวจวัดมวลแบบ MS/MS จึงทำให้สามารถระบุชนิดของสารเสพติดได้อย่างชัดเจน มีความน่าเชื่อถือสูง โดยสามารถตรวจวัดปริมาณได้ถึงระดับไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งรูปแบบการทำงานแบบอัตโนมัติทั้งระบบ ทำให้การตรวจวัดสารเสพติดทั้ง 40 ชนิด เสร็จสิ้นในแต่ละตัวอย่างภายใน 7 นาที และยังช่วยลดโอกาสในการสัมผัสสิ่งส่งตรวจของผู้ปฏิบัติงานได้เป็นอย่างดี

กิตติกรรมประกาศ

การทดลองนี้ขอขอบคุณกลุ่มงานพิษวิทยา สถาบันนิติเวชวิทยา โรงพยาบาลตำรวจ สำหรับการให้ข้อมูลสนับสนุนตลอดการทดสอบและการจัดทำเอกสารฉบับนี้



รูปที่ 6: สรุปผลการวิเคราะห์ตัวอย่างเปรียบเทียบระหว่างการใช้ระบบ Automated Dried Spot Analysis (D) กับระบบ online-SPE-LC-MS/MS (L) สำหรับตรวจหาสารเสพติดจำนวน 40 ชนิดในตัวอย่างเลือด จำนวน 50 ตัวอย่าง โดยระบุสารเสพติดที่ตรวจพบในแต่ละตัวอย่างด้วยพื้นหลังสีแดง

Sci Spec

บริษัท ชાયน์ สเปค จำกัด
10 ซอยกาญจนาภิเษก 0010 แยกสอง
เขตบางแค กทม. 10160
โทร 02 454 8533

thermo scientific

Authorized Distributor



scispec



@scispec



www.scispec.co.th