

Evaluation of Mitragynine Detection (Methods) and Stability in Vitreous Fluid.

Miss Timporn Boondamnern



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR) are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Science

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2014

Copyright of Chulalongkorn University

การประเมินการตรวจและการศึกษาความคงสภาพของไมทราไจนินในน้ำวุ้นลูกตา



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2557

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การประเมินการตรวจและการศึกษาความคงสภาพของ ไมทราไจนินในน้ำอุ่นลูกตา
โดย	นางสาวทิพย์พร บุญดำเนิน
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ญัฐ ตันศรีสวัสดิ์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ อุดมศักดิ์ หุ่นวิจิตร

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ โสภณ นภาธร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ เผด็จ สิริยะเสถียร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ญัฐ ตันศรีสวัสดิ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ อุดมศักดิ์ หุ่นวิจิตร)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ กรเกียรติ วงศ์ไพศาลสิน)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ วีระศักดิ์ จรัสชัยศรี)

ทิพย์พร บุญดำเนิน : การประเมินการตรวจและการศึกษาความคงสภาพของไมทราไจนิน
ในน้ำวุ้นลูกตา (Evaluation of Mitragynine Detection (Methods) and Stability in
Vitreous Fluid.) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. นพ. ญัฐ ตันศรีสวัสดิ์, อ.ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. นพ. อุดมศักดิ์ หุ่นวิจิตร, 56 หน้า.

ไมทราไจนินเป็นแอลคาลอยด์หลักที่ออกฤทธิ์ของใบกระท่อม โดยออกฤทธิ์ทั้งกระตุ้นระบบ
ประสาท และลดอาการปวดคล้ายกับสารจำพวกฝิ่น ในปัจจุบันมีการรายงานการเสียชีวิตจากการใช้
ไมทราไจนินมากขึ้น ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการตรวจหาระดับไมทราไจนินในศพเพื่อยืนยันสาเหตุการ
เสียชีวิต

วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เพื่อศึกษาการคงสภาพของไมทราไจนินในน้ำวุ้นลูกตา
และศึกษาวิธีการสกัดไมทราไจนินจากน้ำวุ้นลูกตาด้วยเทคนิคการสกัดสามวิธี ได้แก่ MTBE,
Hexane:isoamly alcohol และ SPE และเลือกวิธีการสกัดที่ดีที่สุดมาทำการ validation ของการ
ตรวจวิเคราะห์ และศึกษาการตรวจคัดกรองไมทราไจนินด้วย Marquis reagent, Simon's test
และ Duquenois Levine test

เทคนิคการสกัดที่ดีที่สุดคือ MTBE (%Recovery = 98.77%) การตรวจคัดกรองด้วย
Marquis reagent และ Duquenois Levine test ให้ผลบวก แต่ Simon's test ให้ผลลบ

การศึกษา validation ของการตรวจวิเคราะห์สารสกัดไมทราไจนินด้วย MTBE ให้ผลลัพธ์
ที่ดี โดยมีค่า linearity ซึ่ง $R^2 = 0.9979$, precisions ของการวิเคราะห์ในวันและต่างวัน (0.881 –
1.789 % และ 0.592 – 0.751%), accuracy (%CV ระหว่าง 1.0836 – 1.5423 %), range of
%recovery (90.5822 - 92.4098), LOD และ LOQ (7.521 และ 25.071 $\mu\text{g/mL}$) อุณหภูมิและ
ระยะเวลาในการเก็บรักษามีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการคงสภาพของไมทราไจนินในน้ำวุ้นลูกตา

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

ปีการศึกษา 2557

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5574123630 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS: MITRAGYNINE / DETECTION / STABILITY / VITREOUS FLUID / GC-MS

TIMPORN BOONDAMNERN: Evaluation of Mitragynine Detection (Methods) and Stability in Vitreous Fluid.. ADVISOR: ASST. PROF. NAT TANSRISAWAD, M.D., CO-ADVISOR: ASST. PROF. UDOMSAK HOONWIJIT, M.D., 56 pp.

Mitragynine is primary active alkaloid in kratom leaves (*Mitragyna speciosa* Korth.). It acts with both stimulant and opioid-like analgesic effects. Nowadays, death involving abuse of mitragynine is widely reported. So a method to determine the level of mitragynine in the body is mostly important to confirm the cause of death.

The present study aimed to determine the stability of mitragynine in vitreous fluid and to extract mitragynine with three methods from vitreous fluid as MTBE, Hexane : Isoamyl alcohol and SPE. The best method was selected for validation. Screening tests to detect mitragynine in this study were Marquis reagent, Simon's test and Duquenois Levine test.

The best extraction technique was MTBE (%recovery = 98.77%). Marquis reagent and Duquenois Levine test showed positive results but Simon's test was negative for mitragynine.

The validation of determination mitragynine extraction with MTBE demonstrated the good results: linearity with $R^2 = 0.9979$, precisions of intraday and interday (0.881 – 1.789 % and 0.592 – 0.751%, respectively), accuracy (%CV value is 1.0836 – 1.5423 %), range of %recovery (90.5822 - 92.4098), LOD and LOQ (7.521 and 25.071 $\mu\text{g/mL}$, respectively). Different temperatures and duration of storage were significant effects to the stability of mitragynine in vitreous fluid.

Field of Study: Medical Science

Academic Year: 2014

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผศ.นพ. ญัฐ ตันศรีสวัสดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และ อ.นพ.อุดมศักดิ์ หนูวิจิตร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม สำหรับคำปรึกษา คำแนะนำ และความช่วยเหลือเสมอมา จนทำให้การศึกษาระดับมหาบัณฑิตศึกษา และการทำวิทยานิพนธ์ผ่านพ้นไปด้วยดี

ขอขอบคุณการสนับสนุนทุนวิจัย “ทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิต” บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่สนับสนุนเงินทุนในการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร. นพ.เผด็จ สิริยะเสถียร ผศ.ดร.นพ.อมรพันธ์ เสรีมาศพันธ์ ผศ.นพ.กรเกียรติ วงศ์ไพศาลสิน และ ผศ.นพ. วีระศักดิ์ จรัสชัยศรี ที่กรุณาช่วยตรวจสอบความถูกต้องของวิทยานิพนธ์ตลอดจนให้คำแนะนำต่างๆที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ศูนย์ชั้นสูตรพลิกศพ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่เอื้อเพื่อสถานที่ในการทำวิจัย และขอขอบพระคุณ อ.นพ.ภาณุวัฒน์ ชุตินวงศ์ อ.นพ.ปองพล ไตรเทพชนะภัย อ.นพ.กรวิก มีศิลป์วิภัย และเจ้าหน้าที่ศูนย์ชั้นสูตรพลิกศพ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ทุกท่านสำหรับการสอน คำแนะนำ และความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างน้ำวุ้นลูกตาจนทำให้การทำวิจัยครั้งนี้ผ่านพ้นไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ภ.ทรงพล ศรีนิวล ภญ.รุจิรา บุญส่อง และ นางสาว ดอกรัก ก้อนทอง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ และหน่วยงานนิติพิษวิทยา ภาควิชานิติเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเพื่อสถานที่ในการทำวิจัยครั้งนี้ และตลอดจนคำปรึกษาในการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ นางปิยาภรณ์ พันธุ์ชาติ นางสาวดาวิณี ชิมวงศ์ นางสาวณัฐธิดา ราชแก้ว นางสาวศิริินภา เพ็ชรนาถ และเพื่อนร่วมหลักสูตรวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ได้ให้คำแนะนำ และช่วยเหลือในการเก็บข้อมูล

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความรู้ ประสิทธิ์ประสาทวิชา จนทำให้สำเร็จการศึกษาในระดับมหาบัณฑิตศึกษา

ขอขอบพระคุณนางสาวนริศรา เขตต์กัน บุคลากร และเจ้าหน้าที่ภาควิชานิติเวชศาสตร์ทุกท่าน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือตลอดการศึกษาในระดับมหาบัณฑิตศึกษา

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวที่ได้ให้ความสนับสนุน และกำลังใจจนสามารถสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูปภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ	11
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and Rationale).....	11
คำถามของการวิจัย (Research questions).....	14
วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Research objectives)	14
คำสำคัญ (Key Words).....	14
ผลและประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย (Expectable benefits and applications)....	14
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	15
พืชกระท่อม (<i>Mitragyna speciosa</i> Korth.)	15
ไมทราไจนิน (Mitragynine)	19
กลไกการออกฤทธิ์ของไมทราไจนิน.....	21
การกระจายตัวของไมทราไจนิน (Distribution).....	22
การตรวจวิเคราะห์ไมทราไจนิน.....	23
น้ำวุ้นลูกตา (Vitreous fluid)	24
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	26
กลุ่มประชากรที่ศึกษา (Target population and Sample population).....	26
เครื่องมือและอุปกรณ์ (Tools).....	26

สารเคมี (Chemicals)	27
พืช (Plant).....	27
ขั้นตอนการวิจัย (Methods)	28
การรวบรวมข้อมูล (Data collection).....	32
การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis).....	32
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	33
ผลการเปรียบเทียบเทคนิคการสกัดไมโทราเจินและจากใบกระท่อม	33
ผลการตรวจเบื้องต้นด้วยเทคนิค Color test	35
ผลการเปรียบเทียบเทคนิคการสกัดไมโทราเจินจากน้ำวุ้นลูกตา.....	37
Method validation.....	38
การศึกษาความคงสภาพ (Stability)	41
บทที่ 5 อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ.....	46
รายการอ้างอิง	49
ภาคผนวก.....	54
ภาคผนวก ก.....	55
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	56

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	จำนวนและร้อยละของผู้ป่วยยาเสพติดทั้งหมด จำแนกตามปีงบประมาณ 2553-2557 . 12
ตารางที่ 2	สารที่พบในพืชกระท่อม จากฐานข้อมูลของ NAPRALERT 16
ตารางที่ 3	แสดง ผล Peak area ของสารสกัดจากใบกระท่อมที่ RT 18.825 นาที..... 33
ตารางที่ 4	แสดง ค่าเฉลี่ยของ Peak area ของแต่ละเทคนิคการสกัดที่ความเข้มข้น 60 µg/mL.... 38
ตารางที่ 5	แสดงค่า Peak area และความเข้มข้นของไมทราจินีน 38
ตารางที่ 6	แสดง Peak area และ ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของ Intraday..... 39
ตารางที่ 7	แสดง Peak area และ ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของ Interday..... 39
ตารางที่ 8	แสดงค่า %Recovery ของวิธีการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS..... 40
ตารางที่ 9	แสดงค่า %Recovery ของวิธีการวิเคราะห์ไมทราจินีนตัวอย่างน้ำวุ้นลูกตา..... 40
ตารางที่ 10	แสดงค่าเฉลี่ยของความเข้มข้น และ %Recovery ที่พบในแต่ละวัน..... 42

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 1 โครงสร้างของไมทราเจนีน ⁽¹⁶⁾	20
รูปที่ 2 แสดงโครงสร้างภายในของลูกตา.....	25
รูปที่ 3 แสดงอุปกรณ์และวิธีการเจาะน้ำวุ้นลูกตา	25
รูปที่ 4 แสดง peak ของไมทราเจนีนที่สกัดได้จากใบกระท่อม RT ที่ 18.867.....	34
รูปที่ 5 แสดง mass spectrum ของไมทราเจนีนที่สกัดได้จากใบกระท่อม.....	34
รูปที่ 6 ผล Color test ของสารสกัดจากใบกระท่อม.....	35
รูปที่ 7 แสดงผล Marquis reagent.....	36
รูปที่ 8 แสดงผล Simon's test.....	36
รูปที่ 9 แสดงผล Duquenois Levine.....	37
รูปที่ 10 แสดงสมการเชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของไมทราเจนีนกับ Peak area	38
รูปที่ 11 แสดงกราฟระหว่างวันที่วิเคราะห์กับความเข้มข้นที่ลดลงในแต่ละอุณหภูมิ	44
รูปที่ 12 แสดงกราฟระหว่างวันที่วิเคราะห์กับความเข้มข้นที่ลดลงในแต่ละอุณหภูมิ	45
รูปที่ 13 แสดงกราฟระหว่างวันที่วิเคราะห์กับความเข้มข้นที่ลดลงในแต่ละอุณหภูมิ	45

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and Rationale)

ยาเสพติดจัดเป็นปัญหาที่อยู่คู่กับประเทศไทยมาอย่างยาวนาน แม้หลายหน่วยงานได้ร่วมกันป้องกันปราบปราม และบำบัดอย่างเต็มที่แต่ไม่สามารถขจัดปัญหา ยาเสพติดให้หมดไปได้⁽¹⁾ ซึ่งเห็นได้จากจำนวนของผู้ป่วยที่เข้าบำบัดการติดยาเสพติดที่สถาบันบำบัดรักษาและฟื้นฟูผู้ติดยาเสพติดแห่งชาติบรมราชชนนี ในระหว่างปีพ.ศ. 2553-2557 (ตารางที่ 1) พบว่ามีจำนวนผู้ป่วยเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในทุก ๆ ปี เมื่อเทียบสัดส่วนแล้วพบว่า เพศชายมีการใช้ยาเสพติดสูงกว่าเพศหญิง⁽²⁾ บ่งชี้ให้เห็นว่าการแก้ไขปัญหายาเสพติดในระดับชุมชนไม่เกิดประสิทธิผล โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มเด็กและเยาวชนเป็นกลุ่มหลักที่จะเข้ามาเกี่ยวข้องกับยาเสพติดเพิ่มขึ้น สำหรับประเภทของยาเสพติดที่สามารถจับกุมได้ในปีพ.ศ. 2553 จำนวนผู้ต้องหาเพิ่มขึ้นเป็น 3 เท่าจากปี 2548 ซึ่งคดีของพืชกระท่อมที่ถูกจับกุมได้เป็นลำดับที่ 3 รองจากคดีที่เกี่ยวกับยาบ้า และกัญชาแห้ง โดยคิดเป็นร้อยละ 4.7 และในปีพ.ศ. 2554 สำนักยุทธศาสตร์รายงาน ว่า สามารถจับกุมพืชกระท่อมและน้ำต้มใบกระท่อมได้ 32,931 กิโลกรัม⁽¹⁾ ซึ่งใกล้เคียงกับสถิติการเข้าบำบัดรักษา ยาเสพติดของสำนักบริหารการสาธารณสุข โดยสำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุขรายงาน ว่า ผู้ที่เข้ามารักษาบำบัดยาเสพติดสูงสุดคือ ผู้ที่ติดยาบ้า รองลงมาคือ กัญชา สารระเหย ผิ่น และกระท่อมตามลำดับ โดยมีจำนวนผู้ที่เข้าบำบัดในปีดังกล่าวกว่า 209,000 คน⁽³⁾

พืชกระท่อม (Kratom, Krathom) เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางอยู่ในวงศ์ Rubiaceae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Mitragyna speciosa* Korth. มีความสูงประมาณ 15-30 เมตร ใบมีความยาวประมาณ 10-15 เซนติเมตร และความกว้างประมาณ 6-9 เซนติเมตร ใบมีลักษณะเป็นใบเดี่ยว เรียงเป็นคู่ตรงข้าม (opposite) ด้านท้องใบเห็นเส้นใบชัดเจน⁽⁴⁾ พืชกระท่อมสามารถเติบโตในธรรมชาติของประเทศเขตร้อนชื้น เป็นพืชประจำถิ่นแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้⁽⁵⁾ โดยเฉพาะในประเทศไทย มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ และอินโดนีเซีย เป็นต้น ในประเทศไทยมีชื่อท้องถิ่นว่า อีถ่าง ท่อม กระท่อมโคก และในประเทศมาเลเซีย เรียกว่า Biak-Biak และ Ketum เป็นต้น พืชกระท่อมที่ใช้เป็นยาเสพติดมี 2 ประเภท ได้แก่ ก้านและเส้นใบเป็นสีแดง เรียกว่ากระท่อมก้านแดง และอีกประเภทหนึ่งใบมีสีเขียว เรียกว่ากระท่อมก้านเขียว⁽⁴⁾ ในประเทศไทยมีบันทึกการใช้พืชกระท่อมมานานกว่าหนึ่งศตวรรษ ทั้งใช้เป็นยาสมุนไพรรักษาโรค เช่น แก้โรคบิด แก้ท้องเสีย แก้ปวดท้อง รักษาโรคเบาหวาน เป็นต้น และการใช้เป็นยาเสพติดแทนการใช้ฝิ่น เริ่มมีการใช้อย่างแพร่หลายในช่วงรัชกาลที่ 7 เพราะ

การเข้าโรงฝิ่นมีราคาที่สูงขึ้นจากเกิดสงครามทำให้เกิดภาวะข้าวยากหามาแพงประชาชนที่ติดฝิ่นจึงหันไปนิยมเสฟไฟบะระท่อมแทน⁽⁴⁾ จึงได้มีการตราพระราชบัญญัติพิชกระท่อมตั้งแต่นั้นเป็นต้นมา จนกระทั่งปี พ.ศ. 2522 พืชกระท่อมถูกจัดให้เป็นยาเสพติดให้โทษประเภทที่ 5 ตามพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ พ.ศ. 2522 และในปัจจุบันมีการแก้ไขเพิ่มเติมเกี่ยวกับพืชกระท่อม 2 ครั้งคือพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2528 และพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ (ฉบับที่ 5) พ.ศ. 2545 โดยในมาตราที่ 75 ระบุไว้ว่า ผู้ใดผลิต นำเข้า หรือส่งออกซึ่งยาเสพติดให้โทษประเภทที่ 5 อันเป็นการฝ่าฝืนมาตรา 26 และถ้ายาเสพติดนั้นเป็นพืชกระท่อมผู้นั้นต้องระวางโทษจำคุกไม่เกิน 2 ปีและปรับไม่เกินสองแสนบาท และมีมาตราที่เกี่ยวข้องกับพืชกระท่อมอีกคือ มาตราที่ 26, 57, 76, 76/1 และ 92^(3, 4)

ตารางที่ 1 จำนวนและร้อยละของผู้ป่วยยาเสพติดทั้งหมด จำแนกตามปีงบประมาณ 2553-2557

ปีงบประมาณ	2553	%	2554	%	2555	%	2556	%	2557	%
จำนวนผู้ป่วยนอกทั้งหมด	3,459	100	4,036	100	6,120	100	4,406	100	3,712	100
ชาย	3,127	90.40	3,625	89.82	5,556	90.78	4,019	91.22	3,360	90.52
หญิง	332	9.60	411	10.18	564	9.22	387	8.78	352	9.48

ที่มา : สถาบันบำบัดรักษาและฟื้นฟูผู้ติดยาเสพติดแห่งชาติบรมราชชนนี⁽²⁾

สารหลักที่ออกฤทธิ์หลักของพืชกระท่อมคือ มิทรากาไจนิน (mitragynine) โดยออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system) มีฤทธิ์กระตุ้นประสาทคล้ายกับการใช้โคเคน⁽⁶⁾ ทำให้ผู้เสฟรู้สึกทำงานไม่เหน็ดเหนื่อย ทดแดด ทนร้อน และมีฤทธิ์กดประสาท เมื่อเสฟพืชกระท่อมในปริมาณสูง นอกจากนี้อาจทำให้เกิดอาการเมาใบกระท่อมหรือภาวะเป็นพิษจากเสฟพืชกระท่อม (intoxication) โดยเกิดอาการมีน ปวดศีรษะ อ่อนเปลี้ย มือสั่น ตัวสั่น แขนขาอ่อนแรงและแน่นหน้าอก⁽⁷⁾

วิธีการเสฟกระท่อมแบ่งออกเป็น 2 แบบ แบบแรกคือการใช้แบบดั้งเดิมโดยวิธีการเคี้ยวใบสดซึ่งนำใบสดมาลอกก้านและเส้นใบออกก่อน หรือนำมาตากแห้งแล้วนำมาบดเป็นผงใช้ชงกับน้ำร้อนเป็นชาใบกระท่อม หรือกรอกเข้าปากตามด้วยน้ำหรือเครื่องดื่มชนิดอื่น ๆ เช่น ชาหรือกาแฟ ผู้เสฟใบกระท่อมจะใช้ใบกระท่อมประมาณ 6-10 ใบต่อวัน^(4, 7) แบบที่ 2 เป็นการประยุกต์ใช้ในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา โดยนำใบของพืชกระท่อมประมาณ 15-100 ใบ ไปต้มและนำน้ำต้มใบกระท่อมไปผสมกับน้ำอัดลม ยาแก้ไอที่มีส่วนผสมของโคเดอีน (codeine) หรือไดเฟนไฮดรามีน (diphenhydramine)

ยากันยุงชนิดขด ได้เครื่องดื่มที่มีชื่อว่า สี่คูณร้อย (4 x 100) ซึ่งมีการแพร่ระบาดของสี่คูณร้อยอย่างมากในหมู่นักเรียนและกลุ่มวัยรุ่น โดยเฉพาะในจังหวัดชายแดนภาคใต้⁽⁸⁾ เมื่อมีการเสพสี่คูณร้อยจะทำให้เกิดอาการมีนเมา เคลิบเคลิ้ม และมีอาการประสาทหลอน ในปัจจุบันนอกจากเครื่องดื่มสี่คูณร้อยแล้วยังมีการผสมเหล้าแห้ง โซดา ยาแก้ปวดประสาทหรืออัลปราโซแลม (alprazolam) และสารฟลูออเรสเซนต์เพิ่มเข้าไป โดยมีชื่อว่า แปดคูณร้อย (8 x 100) ทำให้เกิดอันตรายถึงชีวิต⁽⁹⁾ ได้มีรายงานจากสถาบันนิติเวชวิทยา โรงพยาบาลตำรวจ มีศพผู้เสียชีวิตส่งมาชันสูตรเพื่อหาสาเหตุการเสียชีวิต ได้ทำการตรวจเลือดและปัสสาวะ ตรวจพบไมทราไจนิน (mitragynine) อัลปราโซแลม (alprazolam) นอร์ทริปไทลีน (nortriptyline) เมทาโดน (methadone) และเมทแอมเฟตามีน (methamphetamine) ซึ่งมีสารบางตัวเป็นส่วนประกอบของแปดคูณร้อยทั้งสิ้น⁽¹⁰⁾

การตรวจชันสูตรสารเสพติดในศพมีปัญหาหลักที่พบคือ เมื่อศพเริ่มมีการเน่าในระยะเวลาแล้ว การเก็บของเหลวจากร่างกาย เช่น เลือด (blood) ปัสสาวะ (urine) และสารจากกระเพาะอาหาร (gastric content) ทำได้ยากลำบากมากขึ้น เนื่องจากตัวอย่างเสื่อมสภาพ สูญสลายและอาจมีการปนเปื้อนจากสิ่งภายนอก (external contamination) ทำให้ไม่เหมาะสมที่จะนำมาตรวจวิเคราะห์และแปลผล ทำให้น้ำวุ้นลูกตา (vitreous fluid) เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ดี เนื่องจากน้ำวุ้นลูกตาเป็นสารน้ำที่สามารถอยู่ในร่างกายได้นานกว่าสารน้ำประเภทอื่น ๆ หลังจากเสียชีวิตและมีการปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อมรอบข้างน้อยกว่า ยาและสารเสพติดส่วนใหญ่จะมีการแพร่กระจายเข้าสู่ น้ำวุ้นลูกตาในระดับปริมาณที่สามารถนำมาเปรียบเทียบกับปริมาณสารที่พบในกระแสเลือดได้ ซึ่งทำให้การแปลผลความเป็นพิษต่อร่างกายชัดเจนขึ้นและสามารถช่วยในการประมาณเวลาการเสียชีวิตได้เช่นกัน ข้อดีของน้ำวุ้นลูกตาที่ดีกว่าเลือดคือ มีองค์ประกอบของเซลล์น้อยและไม่ค่อยมีการติดเชื้อแบคทีเรีย^(11, 12)

เนื่องจากในปัจจุบันนี้วิธีการตรวจหาไมทราไจนินในร่างกายจากน้ำวุ้นลูกตายังไม่มีการพัฒนามากนัก งานวิทยานิพนธ์นี้จึงมุ่งเน้นเพื่อศึกษาการตรวจวิเคราะห์หาไมทราไจนินจากน้ำวุ้นลูกตาและศึกษาการคงสภาพของไมทราไจนินในน้ำวุ้นลูกตา เพื่อให้ได้เทคนิควิธีการตรวจวิเคราะห์ไมทราไจนินและการเก็บรักษาตัวอย่างได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการตรวจวิเคราะห์ในอนาคตต่อไป

คำถามของการวิจัย (Research questions)

คำถามหลัก (Primary research question)

- สามารถตรวจพบสารไมทราเจนินได้จากน้ำวุ้นลูกตาด้วยวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่นำเสนอหรือไม่ และไมทราเจนินมีความคงสภาพในน้ำวุ้นลูกตาสำหรับนำมาตรวจวิเคราะห์ซ้ำหรือไม่

คำถามรอง (Secondary research questions)

- สามารถระบุระดับความเข้มข้นน้อยที่สุดของไมทราเจนินจากน้ำวุ้นลูกตาที่เครื่องมือสามารถตรวจวิเคราะห์ได้
- สามารถระบุร้อยละของการสลายตัวของไมทราเจนินในน้ำวุ้นลูกตาเมื่อมีการเก็บรักษาในเวลาที่ต่าง ๆ และ อุณหภูมิที่ต่างกันโดยศึกษาจาก %Recovery

วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Research objectives)

1. ศึกษาวิธีการตรวจวิเคราะห์ไมทราเจนินในน้ำวุ้นลูกตา
2. ศึกษาประสิทธิภาพของเทคนิคการสกัดไมทราเจนินจากน้ำวุ้นลูกตา
3. ศึกษาและประเมินผลความคงสภาพของไมทราเจนินในน้ำวุ้นลูกตา

คำสำคัญ (Key Words)

Mitragynine, Detection, Stability, Vitreous Fluid, GC-MS

ผลและประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย (Expectable benefits and applications)

จากการศึกษานี้จะแสดงให้เห็นทราบถึงเทคนิคการสกัดไมทราเจนินจากใบกระท่อม เทคนิคการสกัดไมทราเจนินจากน้ำวุ้นลูกตาที่เหมาะสม ความคงสภาพของไมทราเจนินในน้ำวุ้นลูกตา อุณหภูมิที่และระยะเวลาการเก็บตัวอย่างที่เหมาะสม ซึ่งจากข้อมูลเหล่านี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการเลือกวิธีการเก็บรักษาไมทราเจนินในน้ำวุ้นลูกตา และการตรวจวิเคราะห์ไมทราเจนินในน้ำวุ้นลูกตาภายในห้องปฏิบัติการนิติพิษวิทยาได้ ทำให้สามารถลดระยะเวลาในการศึกษาหาเทคนิคการสกัดตัวอย่าง ทำให้สามารถประเมินผลได้เร็ว และถูกต้องมากยิ่งขึ้น

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

พืชกระท่อม (*Mitragyna speciosa* Korth.)

พืชกระท่อมเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง มีความสูงประมาณ 15-30 เมตร พบได้ในบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จัดเป็นไม้ชนิดเด่น (Dominant species) โดยเฉพาะในประเทศไทย มาเลเซีย และอินโดนีเซีย เป็นต้น ในประเทศไทยพบได้มากในภาคใต้ โดยเฉพาะจังหวัด นครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี สงขลา ยะลา ปัตตานี และนราธิวาส เป็นต้น ในภาคกลางสามารถพบได้ในจังหวัดปทุมธานี นนทบุรี และนครปฐม เป็นต้น ลักษณะของใบกระท่อมเป็นใบเดี่ยว รูปไข่ ใบกว้าง ปลายแหลม ขอบเรียบ ด้านท้องใบสามารถเห็นเส้นใบได้ชัดเจน ก้านใบยาวมีสีแดงอ่อน หรือ สีเขียวอ่อน ลักษณะดอกเป็นช่อทรงกลมออกที่ปลายกิ่ง มีกลิ่นหอม เป็นดอกสมบูรณ์เพศ (perfect flower) ผลเป็นผลกลุ่มอัดกันแน่น เมื่อเป็นผลแก่จะแห้งแล้วแตกออกตามความยาวของผลเป็น 4 พู⁽⁴⁾

การใช้พืชกระท่อมในไทยนิยมใช้เพื่อให้ร่างกายทนต่อการทำงานหนัก แสงแดด และความร้อนได้ ซึ่งส่วนใหญ่มักเสพโดยการเคี้ยวใบสด นำใบแห้งชงกับน้ำร้อน ซึ่งการเคี้ยวใบสดนั้นมีทั้งที่คายกาก และไม่คาย รูดก้านใบออก และไม่รูดก้านใบ เป็นวัฒนธรรมที่สืบทอดต่อกันมาหลายชั่วอายุ⁽⁴⁾ เมื่อเสพเข้าร่างกายแล้วพืชกระท่อมจะออกฤทธิ์ภายใน 5-10 นาที จะรู้สึกสงบ มีความสุข มีเรี่ยวแรงสามารถทำงานกลางแดดได้นาน แต่จะกลัวฝนมีอาการหนาวสั่น⁽¹³⁾

อาการข้างเคียงเมื่อเสพพืชกระท่อม คือมีอาการเบื่ออาหาร น้ำหนักลด ชูบผอม ท้องผูก อุจจาระก้อนเล็กสีดำ ผิวหนังดำคล้ำโดยเฉพาะบริเวณแก้ม นอนไม่หลับ ความต้องการทางเพศลดลง เมื่อใช้ติดต่อกันจะเกิดการเสพติด มีรายงานว่าผู้ที่เสพไมทราจินีน อะซิเตด ปริมาณ 50 มิลลิกรัม ทำให้เกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน พืชกระท่อมมีผลต่อระบบประสาทส่วนกลาง ทั้งกระตุ้น และกดประสาท เมื่อขาดยาจะมีอาการก้าวร้าว น้ำตาไหล น้ำมูกไหล ปวดกล้ามเนื้อและกระดูก แขนขากระตุก อ่อนเพลีย ซึมเศร้า นอนไม่หลับ อาการคล้ายกับผู้ที่ขาดยาแอมเฟตามีน^(4, 13)

สารสำคัญที่พบในพืชกระท่อมคือแอลคาลอยด์และสารประกอบอื่น ๆ แสดงในตารางที่ 2 ซึ่งแอลคาลอยด์ที่พบมากที่สุดคือ ไมทราจินีน (mitragynine)

ตารางที่ 2 สารที่พบในพืชกระท่อม จากฐานข้อมูลของ NAPRALERT

สาร	ส่วนของพืช	ประเทศ	เอกสารอ้างอิง
Apigenin : flavonol	ใบ เปลือกต้น	ไทย	Hinou <i>et al.</i> , 1988
Apigenin-7-O-rhamnoglucoside : flavone	ใบ	ไทย	Hinou <i>et al.</i> , 1988
Astagalinalin : flavonol	ใบ	ไทย	Harvala <i>et al.</i> , 1988
Caffeic acid : phenylpropanoid	ใบ	ไทย	Hinou <i>et al.</i> , 1988
Catechin, epi, (-): flavonoid	ใบ	มาเลเซีย	Houghton <i>et al.</i> , 1986
Chlorogenic : indole alkaloid	ใบ	มาเลเซีย	Hinou <i>et al.</i> , 1988
Corynantheidaline : indole alkaloid	เปลือกต้น	ไทย	Shellard <i>et al.</i> , 1987
Corynoxine : indole alkaloid	ใบ เปลือกต้น	ไทย	Houghton <i>et al.</i> , 1986
Cosmosiin : flavone	ใบ เปลือกต้น	ไทย	Houghton <i>et al.</i> , 1986
Hyperoside : flavonol	ใบ		Hinou <i>et al.</i> , 1988
Kaempferol : flavonol	ใบ	ไทย	Harvala <i>et al.</i> , 1988
Mitraciliatine : indole alkaloid	ใบ	ไทย	Houghton <i>et al.</i> , 1991
Mitrafoline : indole alkaloid	ใบ เปลือกต้น	ไทย	Hemingway <i>et al.</i> , 1975
Mitrafoline, iso : indole alkaloid	ใบ	ไทย	Hemingway <i>et al.</i> , 1975
Mitragynaline : indole alkaloid	ใบ	มาเลเซีย	Houghton <i>et al.</i> , 1991 Takayama <i>et al.</i> , 1998 และ 2001

สาร	ส่วนของพืช	ประเทศ	เอกสารอ้างอิง
Mitragynalinic acid : indole alkaloid	ใบ	มาเลเซีย	Houghton <i>et al.</i> , 1991
Mitragynine : indole alkaloid	ใบ	ไทย มาเลเซีย พม่า	Hemingway <i>et al.</i> , 1975 Rueffer <i>et al.</i> , 1978 Jansen <i>et al.</i> , 1988 Houghton <i>et al.</i> , 1991 Pongluk <i>et al.</i> , 1994 Takayama <i>et al.</i> , 1998 Yamamoto <i>et al.</i> , 1999
Mitragynine, 3-4-5-6-dehydro : indole alkaloid	ใบ	มาเลเซีย	Takayama <i>et al.</i> , 1998
Mitragynine, 3-dehydro : indole alkaloid	ใบ	มาเลเซีย	Houghton <i>et al.</i> , 1986
Mitragynine, 7 (H) : 7-alpha-hydroxy : indole alkaloid	ใบ	ไทย มาเลเซีย	Pongluk <i>et al.</i> , 1986 Takayama <i>et al.</i> , 1998
Mitralactonal : indole alkaloid	ใบ	มาเลเซีย	Takayama <i>et al.</i> , 1998
Mitralactonine, (-) : indole alkaloid	ใบ	มาเลเซีย	Takayama <i>et al.</i> , 1998
Mitralactonine, 9-methoxy : indole alkaloid	ใบ	มาเลเซีย	Takayama <i>et al.</i> , 1998
Mitraphyline : indole alkaloid	ใบ	ไทย	Shellard <i>et al.</i> , 1978
Mitraphyline, iso : indole alkaloid	ใบ	ไทย	Shellard <i>et al.</i> , 1978

สาร	ส่วนของพืช	ประเทศ	เอกสารอ้างอิง
Mitrasulgynine : indole alkaloid	ใบ	มาเลเซีย	Shellard <i>et al.</i> , 1978
Paynantheine : indole alkaloid	ใบ	ไทย	Hemingway <i>et al.</i> , 1975 Pongluk <i>et al.</i> , 1986
Pinoresinol, (+) : lignin	ใบ	มาเลเซีย	Takayama <i>et al.</i> , 1998
Quercetin : flavonol	ใบ	ไทย	Harvala <i>et al.</i> , 1988
Quercetin-3-galactoside-7-rhamnoside : flavonol	ใบ	ไทย	Harvala <i>et al.</i> , 1988
Quercitrin : flavonol	ใบ	ไทย	Harvala <i>et al.</i> , 1988
Quercitrin, iso : flavonol	ใบ	ไทย	Harvala <i>et al.</i> , 1988
Rhynchociline : indole alkaloid	เปลือกต้น	ไทย	Shellard <i>et al.</i> , 1978
Rhynchophyline : indole alkaloid	ใบ เปลือกต้น	ไทย ฟิลิปปินส์	Hendrickson <i>et al.</i> , 1963 Shellard <i>et al.</i> , 1978
Rhynchophyline, iso : indole alkaloid	ใบ เปลือกต้น	ไทย	Shellard <i>et al.</i> , 1978
Rutin : flavonol	ใบ	ไทย	Harvala <i>et al.</i> , 1988
Speciocilliatine : indole alkaloid	ใบ เปลือกต้น	ไทย มาเลเซีย	Rueffer <i>et al.</i> , 1978 Houghton <i>et al.</i> , 1986 Pongluk <i>et al.</i> , 1986 Takayama <i>et al.</i> , 1998
Speciofoline : indole alkaloid	ใบ เปลือกต้น	ไทย	Hemingway <i>et al.</i> , 1975 Shellard <i>et al.</i> , 1978

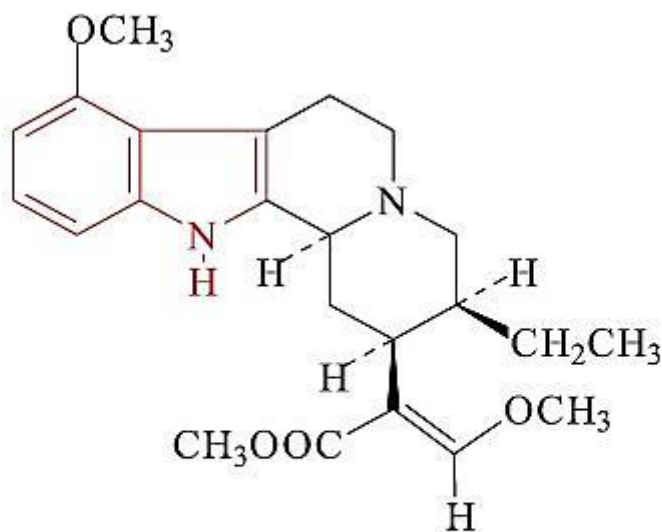
สาร	ส่วนของพืช	ประเทศ	เอกสารอ้างอิง
Speciofoline, iso : indole alkaloid	ใบ	ไทย	Hemingway <i>et al.</i> , 1975 Shellard <i>et al.</i> , 1978
Speciogynine : indole alkaloid	ใบ เปลือกต้น	ไทย มาเลเซีย	Hemingway <i>et al.</i> , 1975 Shellard <i>et al.</i> , 1978 Houghton <i>et al.</i> , 1986 Pongluk <i>et al.</i> , 1986 Takayama <i>et al.</i> , 1998
Specionoxeine, iso : indole alkaloid	ใบ	ไทย	Shellard <i>et al.</i> , 1978
Speciophyline : indole alkaloid	ใบ	ไทย	Shellard <i>et al.</i> , 1978
Stipulatine : indole alkaloid	เปลือก ใบ	ฟิลิปปินส์	Hendrickson <i>et al.</i> , 1963
Ursolic acid : triterpene	ใบ	มาเลเซีย	Said <i>et al.</i> , 1991

ที่มา : พืชกระท่อมในสังคมไทย⁽⁴⁾

ไมทราจินิกิน (Mitragynine)

ไมทราจินิกินเป็นแอลคาลอยด์ที่พบมากที่สุด และเป็นสารออกฤทธิ์หลักของพืชกระท่อม (มีประมาณร้อยละ 66 จากแอลคาลอยด์ที่พบทั้งหมดในพืชกระท่อม) โดยที่กระท่อมมีแอลคาลอยด์เป็นส่วนประกอบร้อยละ 0.5

ไมทราจินิกินมีสูตรเคมีคือ $C_{23}H_{30}N_2O_4$ ชื่อทางเคมีคือ 9-methoxy-corynantheidine น้ำหนักโมเลกุลคือ 398.5 กรัมต่อโมล จุดเดือดอยู่ระหว่าง 110-115.6°C จุดหลอมเหลวอยู่ในช่วง 230-240°C เป็นเบส มีลักษณะเป็นผง amorphous สีขาว ละลายในแอลกอฮอล์ (alcohol) คลอโรฟอร์ม (chloroform) เมทานอล (methanol) และกรดอะซิติก (acetic acid)^(7, 14, 15)



Mitragynine $C_{23}H_{30}N_2O_4$
MW : 398.5

รูปที่ 1 โครงสร้างของไมทราไจนีน⁽¹⁶⁾

ในปี ค.ศ. 1921 Field ได้ทำการสกัดแยกสารแอลคาลอยด์จากใบกระท่อมได้สารไมทราไจนีน (Mitragynine)⁽¹⁷⁾

ในปี ค.ศ. 1932 Grewel ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของไมทราไจนีนต่อเนื้อเยื่อของสัตว์ทดลอง ซึ่งไมทราไจนีนมีฤทธิ์ในการลดการตึงตัว (tone) และความแรง (amplitude) ของการบีบตัวกล้ามเนื้อเรียบ ทำให้เกิดการชาเฉพาะที่ นอกจากนี้มีฤทธิ์ฆ่าโปรโตซัวทั่วไปได้ แต่ไม่ฆ่าโปรโตซัวที่ก่อโรคต่อมนุษย์ และมีฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลางคล้ายกับการใช้โคเคน⁽¹⁸⁾ และในปี ค.ศ. 1963 Joshi และคณะ ได้ศึกษาและรายงานสูตรโครงสร้างของไมทราไจนีนว่าเป็นสาร indole alkaloid และบริเวณ C-9 จะมีกลุ่ม methoxy จับอยู่ โดยโครงสร้างของไมทราไจนีนเป็นวงแหวนแบบเปิด⁽¹⁹⁾

นพ.ประยูร นรการผดุง ได้รายงานไว้ในปี ค.ศ. 1966 และ ค.ศ. 1968 ว่ามีการศึกษาการใช้พืชกระท่อมเพื่อทดแทนมอร์ฟินในการรักษาผู้ป่วยที่ติดยาเสพติด ในประเทศไทย ซึ่งพืชกระท่อมนี้มีฤทธิ์อ่อนและสั้นกว่ามอร์ฟิน มีอาการขาดยาน้อยกว่าการใช้ยาจำพวกฝิ่น โดยกระท่อมมีฤทธิ์กระตุ้นประสาทคล้ายกับการใช้โคเคนและกดประสาทเหมือนการใช้ฝิ่นและกัญชา^(20, 21)

ในปี ค.ศ. 1972 Macko, Weisbech และ Douglas ทำการศึกษาฤทธิ์ของไมทราไจนีนในการระงับปวดและแก้ไอ ซึ่งผลที่ได้คือ ไมทราไจนีนมีประสิทธิภาพดีเทียบเท่ากับการใช้โคเคนในขนาดเท่ากัน แต่ไม่มีผลทำให้อาเจียนหรือหายใจขัด (dyspnea) และไม่ทำให้เสพติดเหมือนฝิ่น

จากการทดสอบในหนู mice พบว่าการให้ไมทราไจนีนทางปากออกฤทธิ์แก้ปวดได้ดีกว่าการฉีดเข้าชั้นใต้ผิวหนัง (subcutaneous injection) แสดงให้เห็นว่าเมตาบอไลต์ของไมทราไจนีนออกฤทธิ์ได้ดีกว่าไมทราไจนีน⁽²²⁾

ในปี 1974 นิวัติ แก้วประดับ ทำการสกัดใบกระท่อมสด สามารถสกัดแอลคาลอยด์ออกมาได้ทั้งหมด 9 ชนิด ได้แก่ mitragynine, paynantheine, speiogyne, mitraciliatine, ajmalicine, isotoropodine, mitraphyline และ tetrahydroalitonine โดย tetrahydroalitonine นี้ไม่มีรายงานที่เคยสกัดพบมาก่อนเนื่องจากความคงตัวไม่ดีจึงพบเฉพาะใบกระท่อมสดเท่านั้น⁽²³⁾ การศึกษาโดย Zarembo และ คณะซึ่งทำการศึกษาราย *Helminthosporum* sp. สามารถเปลี่ยนไมทราไจนีนเป็นสารออกฤทธิ์ (active metabolites) คือ mitragynine pseudoindoxyl และ hydroxyl mitragynine pseudoindoxyl โดย mitragynine pseudoindoxyl สามารถออกฤทธิ์แก้ปวดได้ดีกว่าไมทราไจนีน 10 เท่า และ hydroxyl mitragynine pseudoindoxyl มีฤทธิ์แรงกว่าไมทราไจนีนร้อยละ 20-30⁽²⁴⁾

นอกจากไมทราไจนีนจะเป็นแอลคาลอยด์หลักของพืชกระท่อมแล้ว Matsumoto และคณะได้นำ 7-hydroxymitragynine ที่สกัดได้จากพืชกระท่อมมาทดสอบฤทธิ์ลดอาการเจ็บปวดกับหนูทดลอง ซึ่งผลที่ได้คือ 7-hydroxymitragynine มีฤทธิ์ลดอาการเจ็บปวดและมีผลต่อลำไส้เล็กส่วนปลาย (Ilium) ในหนูตะเภาและในหนูขาวโดยการออกฤทธิ์มีความรุนแรงกว่ามอร์ฟินและไมทราไจนีนที่เป็นสารประกอบหลัก⁽²⁵⁾

กลไกการออกฤทธิ์ของไมทราไจนีน

ในปี 1966 Matsumoto และคณะ ได้ทำการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของไมทราไจนีน ซึ่งพบว่าไมทราไจนีนสามารถเคลื่อนที่ผ่านเยื่อกั้นระหว่างระบบหมุนเวียนเลือดกับสมองได้ (blood-brain barrier) ซึ่งไปออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลาง โดยที่กลไกลดอาการเจ็บปวดของไมทราไจนีนนั้นเป็นผลมาจากการกระตุ้นที่ตัวรับของสารฝิ่น (opioid receptor) จากการทดลองโดยใช้นาล็อกโซน (naloxone) ที่ทำหน้าที่เป็นตัวปิดกั้นการกระตุ้นที่ตัวรับของสารฝิ่น ผลคือการลดอาการเจ็บปวดของไมทราไจนีนได้ถูกยับยั้งเช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Thongpradichote และคณะ ในปี 1998 ได้ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของไมทราไจนีน พบว่าไมทราไจนีนออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลางโดยอาศัยการกระตุ้นที่ตัวรับฝิ่นชนิด μ และ δ แต่ก็มีการกระตุ้นที่จำเพาะแตกต่างกัน^(25, 26)

ปี ค.ศ. 2003 ในรายงานการประชุมวิชาการเรื่อง พืชกระท่อม : สมุนไพรหรือพืชยาเสพติด เกษัชกรวิโรจน์ได้รายงานไว้ว่า เมื่อใช้ไมทราไจนีนในขนาดต่ำ ไมทราไจนีนจะไปจับตัวรับ แอลฟา 2

แอดรีเนอร์จิก (α 2-adnergic receptor) และตัวรับฝิ่นเดลต้า 2 (δ 2-opioid receptor) ซึ่งกระตุ้นประสาทคล้ายกับ Yohimbine alkaloid เมื่อเพิ่มขนาดยาสูงขึ้น มีบางส่วนไปจับกับ δ 2-opioid receptor และถ้าเพิ่มขนาดยาสูงขึ้นอีกไมทราไจนินจะไปจับกับตัวรับมิว 1 (μ 1-receptor) และจะจับกับตัวรับมิว 1 มากขึ้นถ้ามีการใช้ร่วมกับยา opiates ⁽¹³⁾

การกระจายตัวของไมทราไจนิน (Distribution)

จากการศึกษาของ Holler และคณะ ในปี ค.ศ. 2011 ได้ทำการศึกษาผู้เสียชีวิตจากความ เป็นพิษของยาเสพติด โพรพิลเฮกซิดรีน (propylhexedrine) และไมทราไจนิน (mitragynine) ซึ่งได้ มีการศึกษาการกระจายตัวของของโพรพิลเฮกซิดรีน และไมทราไจนินในร่างกาย โดยได้ผลดังนี้คือ ไมทราไจนินมีการกระจายตัวไปมากที่สุดคือ ปัสสาวะ (1.2 มิลลิกรัมต่อลิตร) รองลงมาคือ น้ำดี (0.48 มิลลิกรัมต่อลิตร) เลือดในหัวใจ (0.39 มิลลิกรัมต่อลิตร) ม้าม (0.18 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ไต (0.16 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) น้ำวุ้นลูกตา (0.15 มิลลิกรัมต่อลิตร) ตับ (0.12 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ตามลำดับ และพบน้อยที่สุดคือที่ปอด (0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) หัวใจตรวจไม่พบไมทราไจนิน จะ เห็นได้ว่าปัสสาวะเป็นตัวอย่งที่สามารถนำมาตรวจหาไมทราไจนินได้ดีกว่าชีววัตถุชนิดอื่น ๆ เนื่องจากมีการกระจายตัวของไมทราไจนินในปริมาณที่สูง ⁽²⁷⁾

ปี ค.ศ. 2011 Kronstrand และคณะ ได้รายงานการตรวจพบไมทราไจนินจากการตรวจ วิเคราะห์เลือดที่เก็บจากการชันสูตรศพ 9 ราย จากรายงานทั้ง 9 รายมีการใช้ใบกระท่อม หรือ ผลิตภัณฑ์จากใบกระท่อมที่ขายในอินเทอร์เน็ต การตรวจวิเคราะห์ใช้เทคนิคการสกัดแบบ liquid-liquid extraction และทำการวิเคราะห์โดย ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) พบการกระจายตัวของไมทราไจนินในเลือดอยู่ ในช่วง 0.02-0.18 ไมโครกรัมต่อกรัมของเลือด ในปี 2010 Nelsen และคณะ รายงานการตรวจ วิเคราะห์พบไมทราไจนิน 167 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากปัสสาวะของชายวัย 64 ปี ที่มีรายงานการ ใช้ใบกระท่อมแล้วเกิดอาการชักและโคม่า และในปี 2013 Neerman, Frost และ Deking พบ ไมทราไจนินจากการตรวจวิเคราะห์ whole blood ที่เก็บจากการชันสูตรศพชายวัย 17 ปี พบ ไมทราไจนินปริมาณ 0.60 มิลลิกรัมต่อลิตร ⁽²⁸⁻³⁰⁾

การตรวจวิเคราะห์ไมทราไจนีน

ขั้นตอนการตรวจเบื้องต้นด้วยเทคนิค Color test โดยใช้ Duquenois-Levine test ให้ผลเกิดเป็นสีเขียวอมดำ (dull blackish green color) ส่วนวิธีการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค color test อื่น ๆ ที่อาจจะสามารถตรวจไมทราไจนีนได้คือ van Urk, Ehrlich และ Wasicky reagents⁽¹⁶⁾

การตรวจวิเคราะห์เบื้องต้นอีกวิธีหนึ่งคือการใช้เทคนิค Thin layer chromatography (TLC) โดยใช้ cyclohexane : toluene : diethylamine (75 : 15 : 10) เป็นสารเคลื่อนที่ (mobile phase) และทำการหยดไมทราไจนีนบนแผ่นซิลิกา (silica) ทำให้ปรากฏสีน้ำตาลอมม่วงเมื่อสเปรย์ด้วย FeCl_3 + acidified iodoplatinate solution วัดความยาวคลื่นที่ 366 nm และปรากฏสีเทาฟ้าเมื่อสเปรย์ตามด้วย modified Ehrlich's reagent วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 254 nm⁽⁷⁾

ในปี ค.ศ. 2005 Chan, Pakiam และ Rahim ได้ทำการแยกไมทราไจนีนจากพืชกระท่อมโดยใช้เทคนิค Gas chromatography-flame ionization detector (GC-FID) และ Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) จากการศึกษาพบว่าการวิเคราะห์ไมทราไจนีนด้วย GC-FID ปรากฏพีคของไมทราไจนีนที่เวลา 16.5 นาที และการวิเคราะห์ด้วย GC-MS ปรากฏพีคเพื่อใช้เป็นพีคอ้างอิงของไมทราไจนีนโดยมีค่ามวลต่อประจุ (m/z) ที่ 186, 199, 214, 383 และ 397 และเมื่อใช้ตรวจเครื่องตี๋มจากใบกระท่อมพบว่าให้ค่ามวลต่อประจุเช่นเดียวกัน⁽¹⁶⁾

ในปี ค.ศ. 2009 Natália และคณะ ได้ทำการศึกษาวิเคราะห์ไมทราไจนีนจากพลาสมาของหนูด้วยเทคนิค Liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) โดยทำการสกัดไมทราไจนีนจากพลาสมาของหนูด้วยวิธี liquid-liquid extraction ได้ % Recovery ของความเข้มข้นที่ 0.05, 500 และ 800 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร อยู่ที่ 95.7, 90.0 และ 99.1% ตามลำดับ ได้ค่า Limit of Quantification (LOQ) 0.02 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้ไวกว่าการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค วิธี High performance liquid chromatography-UV (HPLC-UV) ที่วิเคราะห์ค่า LOQ ได้ต่ำสุดเพียง 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร⁽³¹⁾

ในปี ค.ศ. 2010 Parthasarathy และคณะ ได้ศึกษาการตรวจวิเคราะห์ไมทราไจนีนด้วยวิธี High performance liquid chromatography-UV (HPLC-UV) จากพลาสมาของหนูทดลองโดยใช้เทคนิคการสกัดแบบ solid-phase extraction (SPE) ผลการทดลองที่ได้คือไมทราไจนีนดูดกลืนแสงได้สูงที่สุดที่ 223 nm⁽⁶⁾ ซึ่งผลที่ได้ใกล้เคียงกับของ Janchawee และคณะ ที่ได้ศึกษาว่าไมทราไจนีนมีความยาวคลื่น 225 nm⁽³²⁾ และ Parthasarathy และคณะ ได้พบว่าการสกัดแบบ SPE ให้ผลที่ดี โดยดูโครมาโตแกรมของไมทราไจนีนที่วิเคราะห์ด้วย HPLC-UV พบว่า resolution ของไมทราไจนีนและ internal standard มี retention time (RT) ที่ 2.9 และ 3.9 นาที ตามลำดับและจากโครมาโตแกรมไม่พบสารรบกวนอื่น ๆ จากการสกัดพลาสมาของหนูทดลอง⁽⁶⁾

น้ำวุ้นลูกตา (Vitreous fluid)

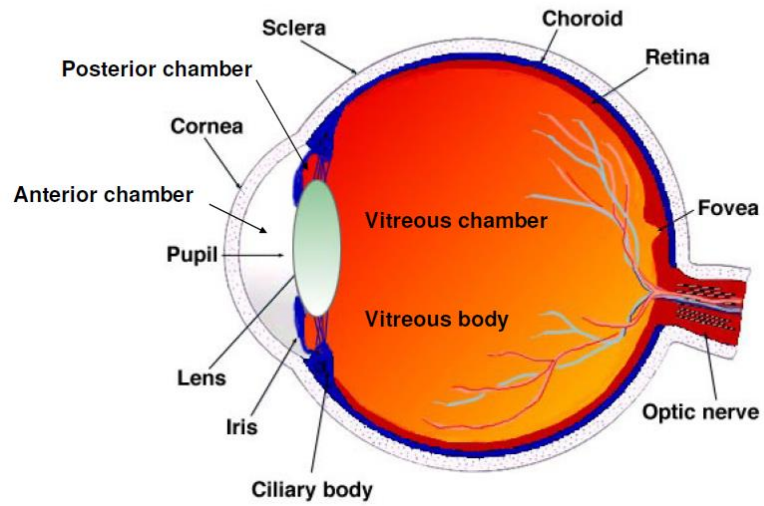
น้ำวุ้นลูกตาอยู่ระหว่างเลนส์ตาและเรตินา โดยปกติของคนทั่วไปจะมีน้ำวุ้นลูกตาอยู่ประมาณ 4 มิลลิลิตร ถือเป็นองค์ประกอบที่มากที่สุดในลูกตา น้ำวุ้นลูกตา ทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมอาหารของเลนส์ตาและยังป้องกัน extra-ocular cell และโปรตีนต่าง ๆ เข้าสู่เลนส์ตา⁽³³⁾ ในน้ำวุ้นลูกตาของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมนั้นประกอบด้วย collagen fibrils, proteoglycans และ glycosaminoglycans เช่น hyaluronan ลักษณะของน้ำวุ้นลูกตาคลายวุ้น มีความหนืด และใส⁽³⁴⁾ Ayad และ Weiss ได้ทำการศึกษาส่วนประกอบน้ำวุ้นลูกตาของวัวพบ collagen type II เป็น collagen หลัก

Hyaluronan ที่อยู่ในน้ำวุ้นลูกตาเป็นส่วนที่เก็บสะสมน้ำไว้ เมื่ออายุมากขึ้นจะมีการปล่อยน้ำออกไปเนื่องจาก synergetic process นำไปสู่การเสื่อมของ hyaluronan ทำให้ vitreous fibers มีเพิ่มมากขึ้น แต่ปริมาณของน้ำวุ้นลูกตาจะลดลง⁽³⁵⁾ Balazs and Denlinger ได้ศึกษาเปรียบเทียบ collagen fiber ที่พบในลูกตาของคนปกติในช่วงอายุ 70-90 ปี กับ อายุ 15-20 ปี พบว่าจะมีน้ำวุ้นลูกตาลดลงเมื่อมีอายุมากขึ้น ซึ่งมีผลทำให้มีแต่ collagen fiber เหลืออยู่ภายในน้ำวุ้นลูกตา ดังนั้นในกลุ่มคนที่อายุมากมีความเข้มข้นของ collagen มากกว่าของกลุ่มคนที่อายุน้อย⁽³⁶⁾

การนำน้ำวุ้นลูกตามาใช้ในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์นั้นมีการเจาะส่งตรวจเพื่อหาปริมาณยาหรือสารพิษต่าง ๆ เนื่องจากยาและสารต่าง ๆ นั้นสามารถกระจายเข้าสู่น้ำวุ้นลูกตาได้ในระดับที่เปรียบเทียบกับปริมาณยาที่พบในเลือดได้ จึงนำมาแปลผลความเป็นพิษต่อร่างกายได้เช่นกัน⁽¹²⁾

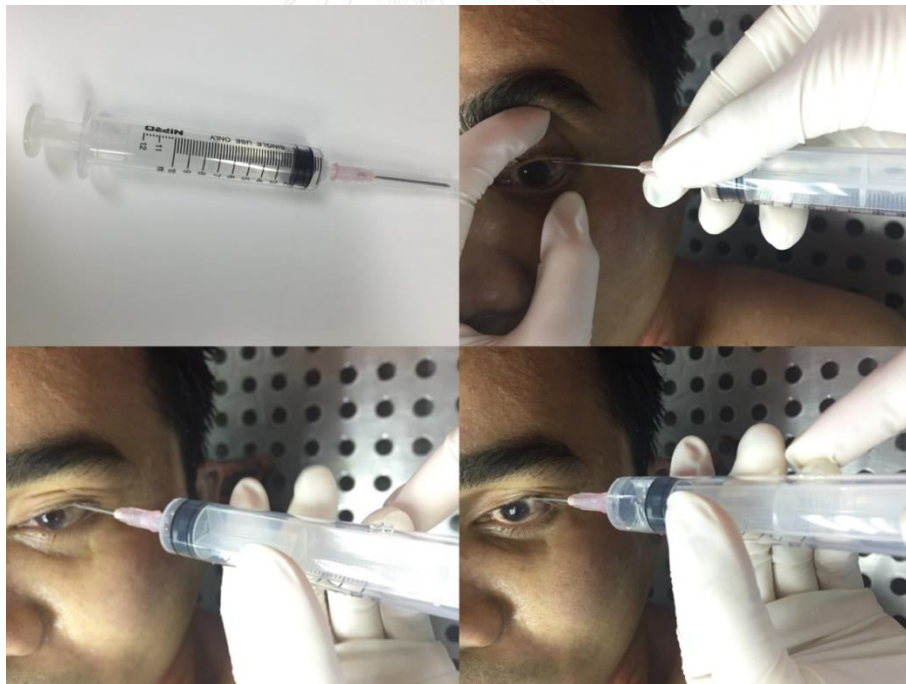
วิธีการเก็บน้ำวุ้นลูกตาจากศพนั้น จะทำการเจาะจากตาทั้ง 2 ข้าง โดยจะทำการเจาะบริเวณตาขาวใกล้กับตาดำ ตำแหน่งที่ทำการเจาะให้เจาะเฉียงไปด้านบนโดยการเปิดเปลือกตาบนขึ้นเพื่อซ่อนรอยเจาะเมื่อปิดตาศพ หลังทำการเจาะเสร็จให้ฉีดยาน้ำกลับเข้าไปในลูกตาในปริมาณที่เท่ากับที่ดูดน้ำวุ้นลูกตาออกมาเพื่อไม่ให้ลูกตายุบตัวลงหลังการเจาะ^(12, 37)

The vitreous chamber



รูปที่ 2 แสดงโครงสร้างภายในของลูกตา

ที่มา : <http://www.dicat.unige.it/stocchino/research/bio.html>



รูปที่ 3 แสดงอุปกรณ์และวิธีการเจาะน้ำวุ้นลูกตา

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

กลุ่มประชากรที่ศึกษา (Target population and Sample population)

การศึกษานี้จะใช้น้ำวุ้นลูกตาที่เก็บจากศพที่นำมาผ่าชันสูตรพลิกศพ ณ ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Inclusion criteria

ศพผู้เสียชีวิตต้องไม่มีประวัติการเสพยาเสพติด และไม่ได้เสียชีวิตจากการใช้สารเสพติดใด ๆ รวมทั้งการใช้จ่ายต่าง ๆ

Exclusion criteria

ศพผู้เสียชีวิตที่เน่า หรือเกิดอุบัติเหตุซึ่งทำให้เสียสภาพบริเวณใบหน้า และดวงตา

เครื่องมือและอุปกรณ์ (Tools)

1. กระดาษกรอง No.1 Whatman®
2. เครื่องแก้วและอุปกรณ์สำหรับห้องปฏิบัติการนิติพิษวิทยา
3. เครื่องปั่น (Blender) รุ่น HR2100 บริษัท Philips ประเทศเนเธอร์แลนด์
4. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge) รุ่น Mikro 220R บริษัท Hettich zentrifugen ประเทศเยอรมนี
5. เครื่องผสมสารละลาย (Vortex) รุ่น K5500GE บริษัท Scientific industries ประเทศสหรัฐอเมริกา
6. เครื่อง Gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) รุ่น GCMS-QP2010 Plus บริษัท Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น
7. ชุดอุปกรณ์การสกัดแบบ SPE โดยใช้ Bond elute certify (130 มิลลิกรัม, 3 มิลลิลิตร) บริษัท Agilent ประเทศสหรัฐอเมริกา
8. ตู้แช่แข็งสำหรับห้องปฏิบัติการ รุ่น Medical Freezer - U537 บริษัท Sanyo ประเทศญี่ปุ่น
9. ตู้เย็น 4°C รุ่น Libre บริษัท Sharp ประเทศญี่ปุ่น
10. ตู้อบ (Oven) Memmert ประเทศเยอรมนี

11. อัลตราโซนิคเตเตอร์ (Ultrasonicator) รุ่น USR 8 บริษัท Julabo ประเทศเยอรมนี

สารเคมี (Chemicals)

1. Acetaldehyde analytical grade (CH_3CHO : Merck, Germany)
2. Ammonia analytical grade (NH_3 : Merck, Germany)
3. Chloroform analytical grade (CHCl_3 : Merck, Germany)
4. Disodium hydrogen phosphate analytical grade (Na_2HPO_4 : Merck, Germany)
5. Ethanol analytical grade ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$: Merck, Germany)
6. Formaldehyde analytical grade (CH_2O : Merck, Germany)
7. Glacial acetic acid analytical grade ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$: Carlo erba reagenti, USA.)
8. Hexane analytical grade (C_7H_{16} : Merck, Germany)
9. Hydrochloric acid analytical grade (HCl : Merck, Germany)
10. Isoamyl alcohol analytical grade ($\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}$: Merck, Germany)
11. Methanol analytical grade (CH_4O : Merck, Germany)
12. Methyl tert-butyl ether analytical grade (MTBE, $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}$: Merck, Germany)
13. p-methylaminobenzaldehyde analytical grade (Merck, Germany)
14. Sodium hydroxide analytical grade (NaOH : Merck, Germany)
15. Sodium nitroprusside analytical grade ($\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$: Merck, Germany)
16. Sulfuric acid analytical grade (H_2SO_4 : Merck, Germany)
17. Tramadol ($\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{NO}_2$: DMSc Reference standard, Thailand)
18. Vanillin analytical grade ($\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$: Merck, Germany)

พืช (Plant)

1. ใบกระท่อม

ขั้นตอนการวิจัย (Methods)

1. เปรียบเทียบสารที่ใช้ในการสกัดไมทราเจนีนจากใบกระท่อม

นำใบกระท่อมไปอบที่ 50°C ในตู้อบนาน 6 ชั่วโมง จากนั้นนำใบแห้งมาปั่นให้เป็นผงด้วยเครื่องปั่น นำผงมา 2 กรัม เตรียมไว้ 5 ชุด ใส่ในบีกเกอร์ สกัดโดยใช้อัตราส่วนของ methanol (CH₄O) ผสมกับ chloroform (CHCl₃) ที่แตกต่างกัน 5 อัตราส่วน คือ 5 : 0, 4 : 1, 1 : 1, 1 : 4 และ 0 : 5 (v/v) ตามลำดับ ปริมาตรรวม 25 mL เทลงในบีกเกอร์ที่มีผงใบกระท่อมอยู่ นำไปวางใน ultrasonicator ใช้ความถี่ที่ 30 Hz นาน 30 นาที จากนั้นนำมารองเอาเศษใบออกด้วยกระดาษกรอง Whatman[®] No.1 กรองทั้งหมด 2 ครั้ง นำไประเหยให้แห้งที่ 45°C ละลายใหม่ด้วย methanol 2 mL แบ่งใส่หลอด 2 หลอดทดลอง โดยแต่ละหลอดทดลองใส่ตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นทำการทดสอบด้วยเทคนิค color test และทำการตรวจสอบด้วย GC-MS ทำซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง^(16, 38)

2. การสกัดไมทราเจนีนจากใบกระท่อม

นำผงใบกระท่อมมา 7.575 กรัม สกัดโดยใช้ methanol (CH₄O) ผสมกับ chloroform (CHCl₃) ในอัตราส่วน 4 : 1 (v/v) 100 mL นำไปวางใน ultrasonicator ใช้ความถี่ที่ 30 Hz นาน 30 นาที จากนั้นนำมารองเอาเศษใบออกด้วยกระดาษกรอง Whatman[®] No.1 กรองทั้งหมด 2 ครั้ง นำไประเหยให้แห้งที่ 45°C ละลายใหม่ด้วย methanol 25 mL นำไปสกัดซ้ำอีกครั้งด้วยเทคนิค SPE เพื่อให้ได้ไมทราเจนีนบริสุทธิ์มากขึ้น โดยใช้ 20% ammonia ใน methanol เป็นตัวชะคอลัมน์ จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้งที่ 45°C และทำการละลายใหม่อีกครั้งด้วย methanol 25 mL เป็นไมทราเจนีนมาตรฐาน (standard mitragynine) ที่มีความเข้มข้น 1 mg/mL^(5, 14, 32)

3. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation sample)

ตัวอย่างน้ำวุ้นลูกตา เป็นตัวอย่างน้ำวุ้นลูกตาที่ส่งตรวจที่ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และทำการตรวจตัวอย่างด้วยเทคนิค GC-MS ไม่พบไมทราเจนีน สารเมตาบอไลต์ต่าง ๆ ของไมทราเจนีน ยา และสารเสพติดต่าง ๆ ตัวอย่างที่เก็บมาจะเก็บมารวมกันเป็นกองกลางหรือ pool vitreous fluid เก็บไว้ที่ 4°C ตัวอย่างที่ใช้เก็บไว้ไม่เกิน 3 เดือน

4. การเตรียมสารมาตรฐาน

เตรียมไมทราเจนีนให้มีความเข้มข้น 500 µg/mL ใน methanol และเตรียม tramadol (internal standard) ให้มีความเข้มข้น 3 mg/mL เป็น stock solution เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

5. การตรวจสอบเบื้องต้นด้วยเทคนิค Color test

5.1 ตรวจสอบด้วย Marquis Reagent

เตรียม Reagent A โดยใช้ 37% formaldehyde 8-10 หยด ผสมกับ glacial acetic acid 10 mL Reagent B ใช้ concentrate sulfuric acid จากนั้นนำตัวอย่างหยดลงใน spot plate ทำการหยด Reagent A 1 หยด และ Reagent B 3 หยด ตรวจสอบบันทึกผลของสีที่ปรากฏ⁽³⁹⁾

5.2 ตรวจสอบด้วย Simon's test

เตรียม Reagent A ใช้ 10% (v/v) acetaldehyde reagent B ใช้ 10% (w/v) sodium nitroprusside จากนั้นนำตัวอย่างหยดลงใน spot plate ทำการหยด Reagent A 1 หยด และ Reagent B 2 หยด ตรวจสอบบันทึกผลของสีที่ปรากฏ⁽³⁹⁾

5.3 ตรวจสอบด้วย Duquenois Levine

เตรียม Duquenois Levine โดยใช้ วานิลลา 2 กรัม ละลายใน acetaldehyde 2.5 มิลลิลิตร ผสมกับ ethanol 100 mL จากนั้นนำตัวอย่างใส่ในหลอดทดลอง หยด Duquenois Levine 10 หยด นำไปเขย่า ตามด้วย concentrate hydrochloric acid 10 หยด นำไปเขย่า และตามด้วย chloroform 20 หยด และนำไปผสมโดยใช้ vortex ตรวจสอบบันทึกผลของสีที่ปรากฏ⁽⁴⁰⁾

6. การสกัดตัวอย่าง (Extraction)

6.1 Liquid-liquid extraction

6.1.1 Methyl t-butyl ether (MTBE)

นำตัวอย่างน้ำจืดลูกตามา มา 500 μL ทำการ spike ไมทราไจนินให้ได้ตัวอย่างที่มี ไมทราไจนินความเข้มข้นที่ 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ เติม Na_2HPO_4 buffer 250 μL ผสมโดยใช้ vortex 30 วินาที เติม MTBE 1,500 μL vortex อีกครั้ง นำไป centrifuge ที่ 3,500 รอบต่อนาที (rpm) นาน 10 นาที เก็บส่วนบนใส่นหลอดใหม่ นำไประเหยแห้งที่ 45°C จากนั้นนำมาละลายใหม่ด้วย methanol 1,000 μL ^(6, 41)

6.1.2 Hexane : isoamyl alcohol

นำตัวอย่างน้ำจืดลูกตามา มา 500 μL ทำการ spike ไมทราไจนินให้ได้ตัวอย่างที่มี ไมทราไจนินความเข้มข้นที่ 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ เติม 1M sodium hydroxide 500 μL และ hexane : isoamyl alcohol (99 : 1 , v/v) 2 mL เขย่าด้วย shaker 10 นาที นำไปเข้าเครื่อง centrifuge ปั่นที่ 3,500 รอบต่อนาที (rpm) นาน 10 นาที เก็บชั้นบน (organic phase) นำไประเหยแห้งที่ 45°C จากนั้นนำมาละลายใหม่ด้วย methanol 1,000 μL ⁽³¹⁾

6.2 Solid phase extraction (SPE)

ใช้ Bond elut certify เตรียมคอลัมน์โดยใช้ methanol 1 mL และตามด้วยน้ำ 1 mL จากนั้นนำตัวอย่างน้ำวุ้นลูกตามา 500 μ L ทำการ spike โมทร่าไจนีนให้ได้ตัวอย่างที่มีโมทร่าไจนีน ความเข้มข้นที่ 60 μ g/mL ใส่ไปในคอลัมน์ ล้างสิ่งเจือปนออกด้วยน้ำ 1 mL 0.01M Hydrochloric acid 1 mL และตามด้วย methanol 1 mL จากนั้นชะคอลัมน์ด้วย 20% ammonia ใน methanol (98:2, v/v) 1 mL ซึ่ง 20% ammonia ใน methanol ต้องทำการเตรียมใหม่ทุกครั้ง เก็บใส่หลอด ทดลองและนำไประเหยแห้งที่ 45°C จากนั้นนำมาละลายใหม่ด้วย methanol 1,000 μ L⁽⁶⁾

7. การทำ Method validation

7.1 Linearity

ทำ Calibration curve โดยนำตัวอย่างที่มีการ spiked โมทร่าไจนีน 30, 50, 100, 200 และ 300 μ g/mL และ tramadol 10 μ L (60 μ g/mL) ตัวอย่างละ 500 μ L นำไปสกัดโดยวิธี MTBE จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วย GC-MS ทำ 3 ซ้ำ คำนวณความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้ กราฟ (peak area ratio) และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient : R^2)⁽⁴²⁾

7.2 ความแม่นยำ (Precision)

7.2.1 Intraday precision

การตรวจสอบความแม่นยำโดยการเตรียมตัวอย่างให้มีความเข้มข้นของโมทร่าไจนีน ที่ 50, 100 และ 200 μ g/mL และ tramadol 10 μ L (60 μ g/mL) ตัวอย่างละ 500 μ L นำไปสกัด โดยวิธี MTBE จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วย GC-MS ทำ 6 ซ้ำ ภายในวันเดียวกัน นำค่า peak area ที่ ได้นำไปคำนวณค่าเฉลี่ยเทียบกับกราฟมาตรฐาน ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation : SD) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)⁽⁴²⁾

7.2.2 Interday precision

การตรวจสอบความแม่นยำโดยการเตรียมตัวอย่างให้มีความเข้มข้นของโมทร่าไจนีน ที่ 50, 100 และ 200 μ g/mL และ tramadol 10 μ L (60 μ g/mL) ตัวอย่างละ 500 μ L ทำความ เข้มข้นละ 1 ซ้ำ นำไปสกัดโดยวิธี MTBE จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วย GC-MS โดยทำการทดลองซ้ำ แบบเดิม 5 วันต่อเนื่องกัน นำค่า peak area ที่ได้นำไปคำนวณค่าเฉลี่ยเทียบกับกราฟมาตรฐาน ค่า ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation : SD) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD)⁽⁴²⁾

7.3 ความถูกต้อง (Accuracy)

การตรวจสอบความถูกต้องทำโดยเตรียมตัวอย่างให้มีความเข้มข้นของโมทร่าไจนีนที่ 40, 80 และ 160 μ g/mL และ tramadol 10 μ L (60 μ g/mL) ตัวอย่างละ 500 μ L นำไปสกัดโดยวิธี

MTBE จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วย GC-MS ทำ 3 ซ้ำ นำค่าความเข้มข้นที่วัดได้นำไปคำนวณเทียบกับความเข้มข้นที่ใส่ลงไปในตัวอย่างเป็นน้ำวุ้นลูกตา คำนวณค่าเฉลี่ย ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation : SD)⁽⁴³⁾ ค่า %Recover ซึ่งค่าที่ยอมรับได้คืออยู่ในช่วง ร้อยละ 90-110 ของระดับความเข้มข้นที่ spike เข้าไปในตัวอย่างและคำนวณสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน หรือ %CV โดยค่าที่ยอมรับได้คือ $\pm 10\%$ ⁽⁴²⁾

$$\text{ค่า \% CV} = \frac{\text{SD} \times 100}{\text{Average}} \quad \text{ค่าที่ยอมรับได้คือ } \pm 10\%$$

7.4 ร้อยละการคืนกลับ (%Recovery)

การตรวจสอบความถูกต้องทำโดยเตรียมตัวอย่างให้มีความเข้มข้นของไมทราไจนินที่ 50, 100 และ 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และ tramadol 10 μL (60 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ตัวอย่างละ 500 μL นำไปสกัดโดยวิธี MTBE และเตรียมไมทราไจนินใน methanol ที่ระดับความเข้มข้น 50, 100 และ 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และ tramadol 10 μL (60 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ตัวอย่างละ 500 μL เป็น solution standard นำไปวิเคราะห์ด้วย GC-MS ทำ 3 ซ้ำ นำค่า peak area ที่ได้นำไปคำนวณค่าเฉลี่ย ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation : SD) และ %Recovery ตามสูตร^(6, 42)

$$\text{ค่า \% Recovery} = \frac{\text{response after extraction}}{\text{response after direct injection}} \times 100$$

7.5 Limit of detection (LOD) และ limit of quantification (LOQ)

เตรียมตัวอย่างให้มีความเข้มข้นของไมทราไจนินที่ 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และ tramadol 10 μL (60 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ตัวอย่างละ 500 μL นำไปสกัดโดยวิธี MTBE และนำไปวิเคราะห์ด้วย GC-MS ที่กำหนดทำ 7 ซ้ำ นำค่า peak area มาหาค่าเฉลี่ยและค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation : SD) โดย LOD นำค่า SD ที่ได้คูณ 3 และ LOQ นำ SD คูณ 10⁽⁴²⁾

8. การศึกษาความคงสภาพ (Stability)

แบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 4 กลุ่มตามอุณหภูมิและการสัมผัสแสง คือ

กลุ่มที่ 1 เก็บที่อุณหภูมิ 25°C โดยไม่มีการห่อฟอยด์เพื่อป้องกันแสง เตรียมตัวอย่างน้ำวุ้นลูกตาให้มีความเข้มข้นของไมทราไจนิน 50, 100 และ 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และ tramadol 10 μL (60 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ตัวอย่างละ 500 μL เตรียมทั้งหมด 5 ชุด สำหรับการวิเคราะห์ผลในวันที่ 1, 3, 7, 15 และ 30 วัน (ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ)

กลุ่มที่ 2 เก็บที่อุณหภูมิ 25°C โดยมีการห่อฟอยด์เพื่อป้องกันแสง เตรียมตัวอย่างน้ำวุ้น ลูกลตาให้มีความเข้มข้นของไมทราไจนิน 50, 100 และ 200 µg/mL และ tramadol 10 µL (60 µg/mL) ตัวอย่างละ 500 µL เตรียมทั้งหมด 5 ชุด สำหรับการวิเคราะห์ผลในวันที่ 1, 3, 7, 15 และ 30 วัน (ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ)

กลุ่มที่ 3 เก็บที่อุณหภูมิ 4°C โดยมีการห่อฟอยด์เพื่อป้องกันแสง เตรียมตัวอย่างน้ำวุ้น ลูกลตาให้มีความเข้มข้นของไมทราไจนิน 50, 100 และ 200 µg/mL และ tramadol 10 µL (60 µg/mL) ตัวอย่างละ 500 µL เตรียมทั้งหมด 5 ชุด สำหรับการวิเคราะห์ผลในวันที่ 1, 3, 7, 15 และ 30 วัน (ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ)

กลุ่มที่ 4 เก็บที่อุณหภูมิ -20°C โดยมีการห่อฟอยด์เพื่อป้องกันแสง เตรียมตัวอย่างน้ำวุ้น ลูกลตาให้มีความเข้มข้นของไมทราไจนิน 50, 100 และ 200 µg/mL และ tramadol 10 µL (60 µg/mL) ตัวอย่างละ 500 µL เตรียมทั้งหมด 5 ชุด สำหรับการวิเคราะห์ผลในวันที่ 1, 3, 7, 15 และ 30 วัน (ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ)

เมื่อครบกำหนดนำมาสกัดโดยวิธี MTBE และนำไปวิเคราะห์ด้วย GC-MS นำค่า peak area ที่ได้นำไปคำนวณค่าเฉลี่ยเทียบกับกราฟมาตรฐาน ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation : SD) และ %Recovery ตามสูตร^(6, 31, 42)

เนื่องจากการเก็บในตู้เย็น (4°C) และ ตู้แช่แข็ง (-20°C) ไม่สามารถทำการวิเคราะห์แบบ มีแสงได้ จึงได้มีการทดลองแบบป้องกันแสงได้เพียงอุณหภูมิเดียวคือ 25°C

การรวบรวมข้อมูล (Data collection)

1. บันทึกการเปลี่ยนแปลงที่ปรากฏของการตรวจเบื้องต้นด้วยเทคนิค color test
2. เก็บและคำนวณค่า peak area ratio จากโครมาโตแกรมที่ได้จากเครื่อง GC-MS และ คำนวณความเข้มข้นของสารที่ได้โดยเทียบจาก calibration curve
3. บันทึกค่าร้อยละการคืนกลับของสารในน้ำวุ้นลูกลตาเทียบกับสารสกัดไมทราไจนินใน methanol

การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติจะถูกดำเนินการด้วยโปรแกรม SPSS version 22.0 โดยข้อมูลที่ได้จะนำมาหาค่าเฉลี่ย (Mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองโดยใช้ ANOVA กำหนดค่า $p < 0.05$

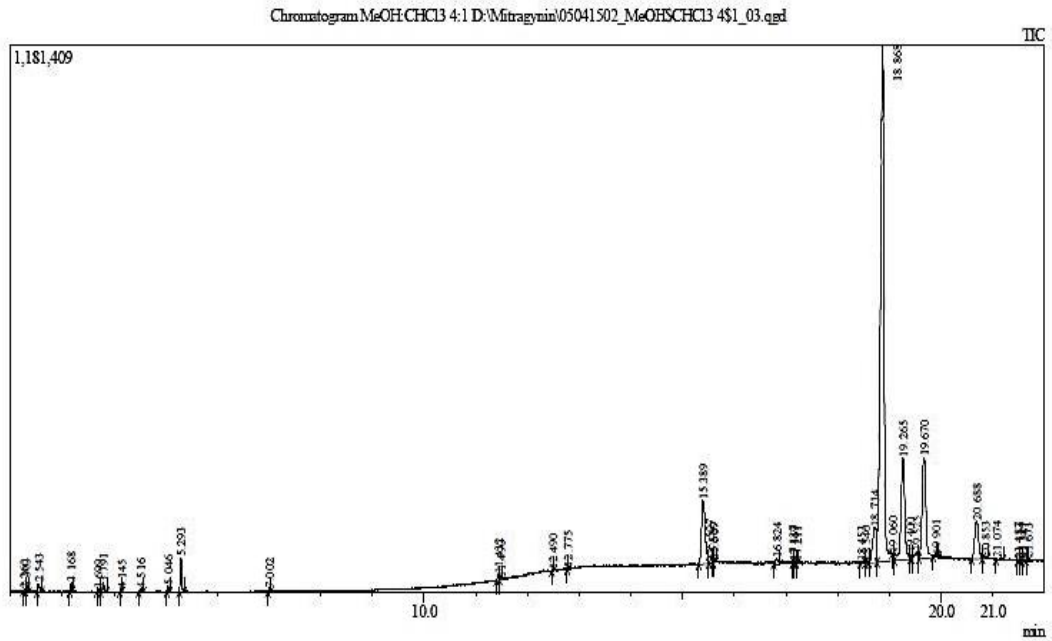
บทที่ 4 ผลการวิจัย

ผลการเปรียบเทียบเทคนิคการสกัดไมทราเจนีนและจากใบกระท่อม

ผลการการศึกษาการสกัดไมทราเจนีนจากใบกระท่อมโดยใช้ methanol (CH₄O) ผสมกับ chloroform (CHCl₃) ในอัตราส่วนที่ต่างกันพบว่าอัตราส่วนที่สกัดไมทราเจนีนได้ผลดีที่สุดคือ อัตราส่วน 4 : 1 (v/v) แสดงในตารางที่ 3 ผลการทำ GC-MS พบ peak ของไมทราเจนีนที่ retention time (RT) 18.867 นาที (รูปที่ 4) ได้ mass spectrum ซึ่งมีค่า m/z ของไมทราเจนีนที่สกัดได้จากใบกระท่อม คือ 214, 397, 383, 186, 199 และ 269 (รูปที่ 5) และการทดสอบด้วย color test โดยใช้ Duquenois Levine test พบว่า ให้ผลเป็นบวก (รูปที่ 6) เกิดเป็นสีเขียวอมดำ (dull blackish green color) ชัดเจนเมื่อเทียบกับ อัตราส่วนอื่น ๆ

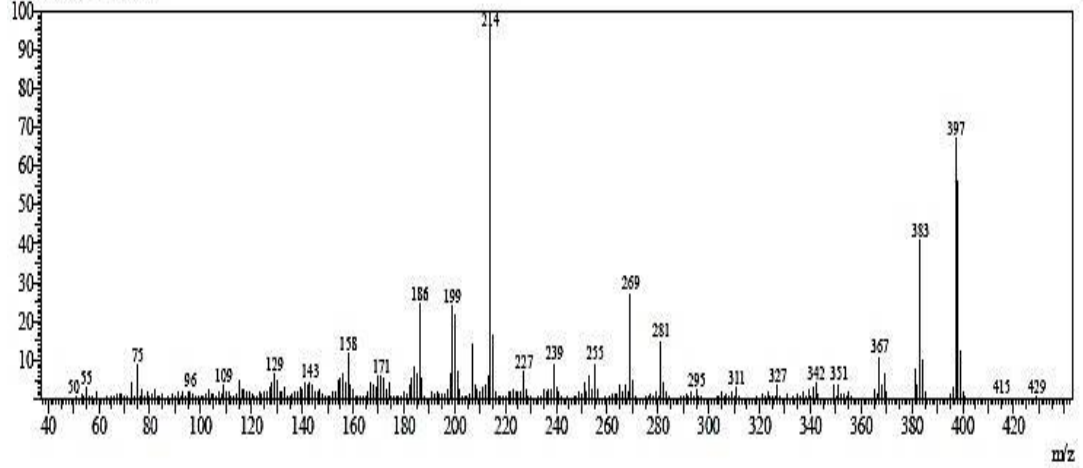
ตารางที่ 3 แสดง ผล Peak area ของสารสกัดจากใบกระท่อมที่ RT 18.825 นาที

ปริมาตร Methanol (mL)	ปริมาตร Chloroform (mL)	Peak area (mean \pm SD, n=3)
25	0	3628649 \pm 1.48902
20	5	5457485 \pm 0.96184
12.5	12.5	1104005 \pm 1.32914
5	20	15747 \pm 0.80137
0	25	2554 \pm 1.94025

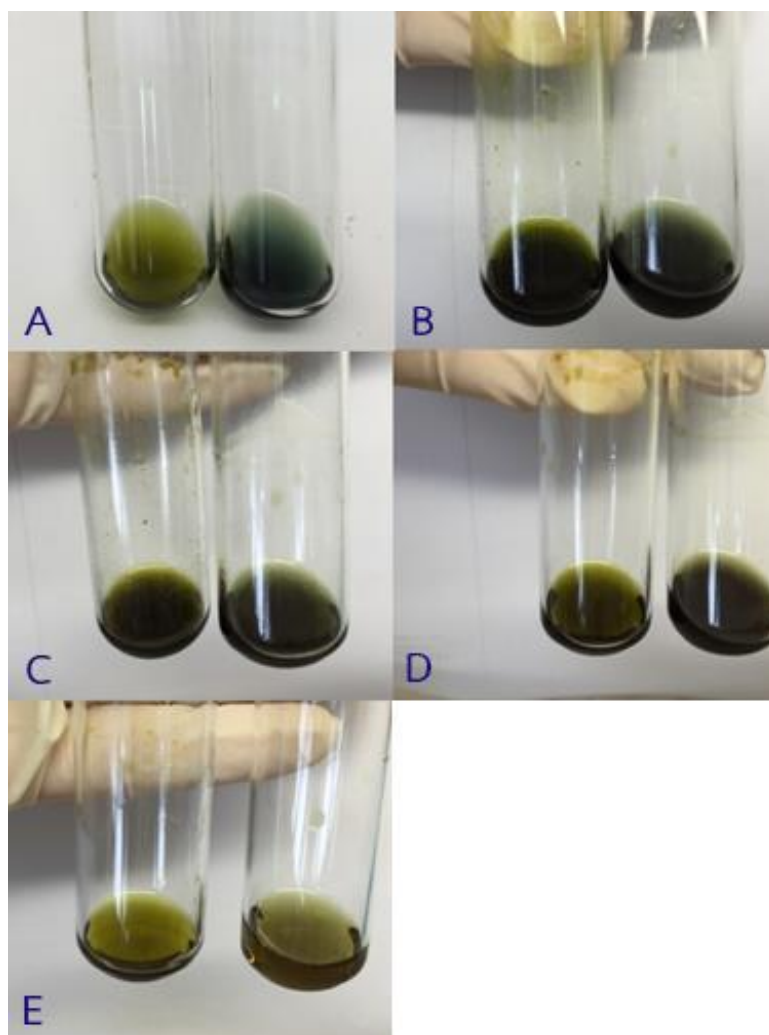


รูปที่ 4 แสดง peak ของไมทราไจนินที่สกัดได้จากใบกระท่อม RT ที่ 18.867

R Time: 18.867 (Scan#: 5061)
 Mass Peaks: 318
 Group 1 - Event 1 Scan



รูปที่ 5 แสดง mass spectrum ของไมทราไจนินที่สกัดได้จากใบกระท่อม



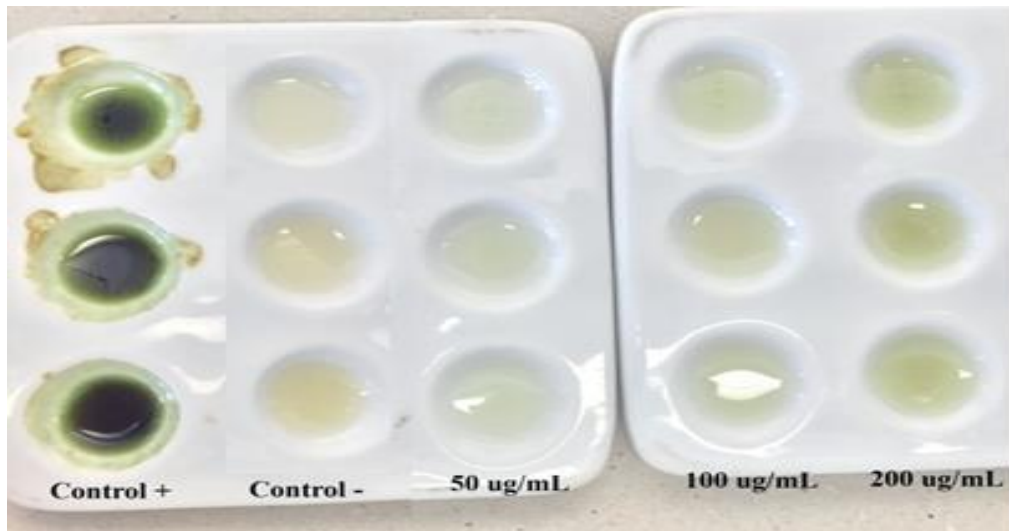
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 6 ผล Color test ของสารสกัดจากใบกระท่อม A คืออัตราส่วน $\text{CH}_4\text{O} : \text{CHCl}_3$ 4:1 , B คืออัตราส่วน $\text{CH}_4\text{O} : \text{CHCl}_3$ 5:0, C คืออัตราส่วน $\text{CH}_4\text{O} : \text{CHCl}_3$ 1:1, D คืออัตราส่วน $\text{CH}_4\text{O} : \text{CHCl}_3$ 1:4 และ E คืออัตราส่วน $\text{CH}_4\text{O} : \text{CHCl}_3$ 0:5 โดยหลอดทดลองหลอดซ้ายในแต่ละภาพคือสารสกัดไมทราจินีนจากใบกระท่อมซึ่งสกัดด้วยตัวทำละลายเช่นเดียวกันก่อนการทดสอบด้วย Duquenois Levine test

ผลการตรวจเบื้องต้นด้วยเทคนิค Color test

Marquis reagent

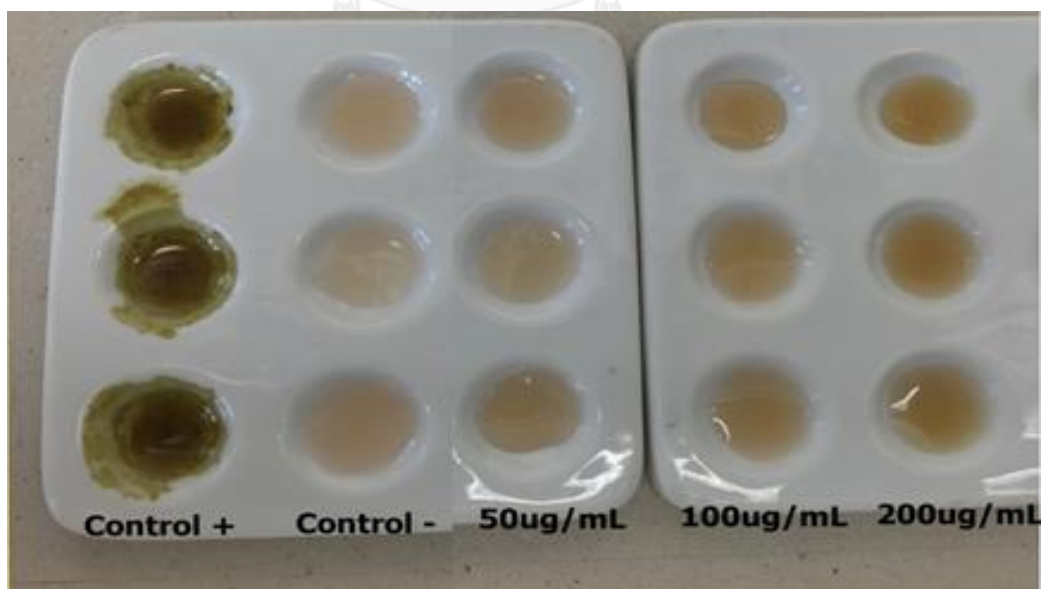
จากการตรวจเบื้องต้นด้วย marquis reagent มีการเปลี่ยนแปลงโดยตัวอย่างเปลี่ยนเป็นสีเขียวทันทีในตัวอย่างน้ำวุ้นลูกที่มีไมทราจินีนที่ความเข้มข้น 50, 100 และ 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ เช่นเดียวกับ positive control (ไมทราจินีน 1 mg/mL) ดังรูปที่ 7



รูปที่ 7 แสดงผล Marquis reagent

Simon's test

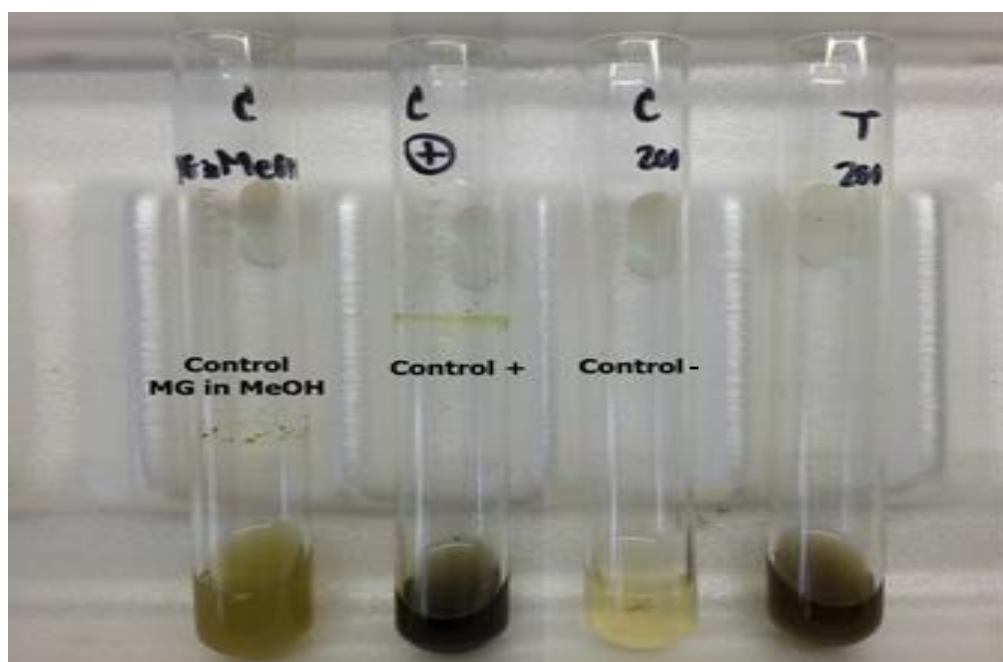
จากการตรวจเบื้องต้นด้วย Simon's test ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นเมื่อหยดลงไปในตัวอย่างที่มีไมทราจินีนที่ความเข้มข้น 50 100 และ 200 $\mu\text{g/mL}$ (Simon's test เป็นสารละลายสีแดงเข้ม) ดังรูปที่ 8



รูปที่ 8 แสดงผล Simon's test

Duquenois Levine test

จากการตรวจเบื้องต้นด้วย Duquenois Levine test มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นเมื่อหยด cholroform ลงไปในตัวอย่างน้ำวุ้นลูกตาที่มีไมทราไจนีนความเข้มข้น 200 μmL เปลี่ยนเป็นสีเขียว อมดำ เช่นเดียวกับในตัวอย่าง positive control (ไมทราไจนีน 1 mg/mL) ดังรูปที่ 9 ส่วนในระดับความเข้มข้นที่ 50 และ 100 ไม่พบการเปลี่ยนแปลง



รูปที่ 9 แสดงผล Duquenois Levine

ผลการเปรียบเทียบเทคนิคการสกัดไมทราไจนีนจากน้ำวุ้นลูกตา

การศึกษาเทคนิคที่นำมาสกัดไมทราไจนีน 60 $\mu\text{g/mL}$ จากน้ำวุ้นลูกตาจาก 3 เทคนิค พบว่าเทคนิคการสกัดด้วย MTBE สกัดไมทราไจนีนจากน้ำวุ้นลูกตามีประสิทธิภาพดีที่สุด โดยดูได้จาก peak area (148565.5 ± 1.0324) และ %Recovery (ร้อยละ 98.977) รองลงมาคือเทคนิคการสกัดแบบ Hexane : Isoamyl alcohol และ SPE ตามลำดับ แสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดง ค่าเฉลี่ยของ Peak area ของแต่ละเทคนิคการสกัดที่ความเข้มข้น 60 µg/mL

Method	Peak area (mean ± SD, n=3)	%Recovery
MTBE	148565.5 ± 1.0324	98.977
Hexane:Isoamyl alcohol	124666 ± 0.98765	83.055
SPE	27010 ± 0.75892	17.995

*หมายเหตุ Peak area ของไมทราเจนินใน methanol มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 150100 ± 0.841

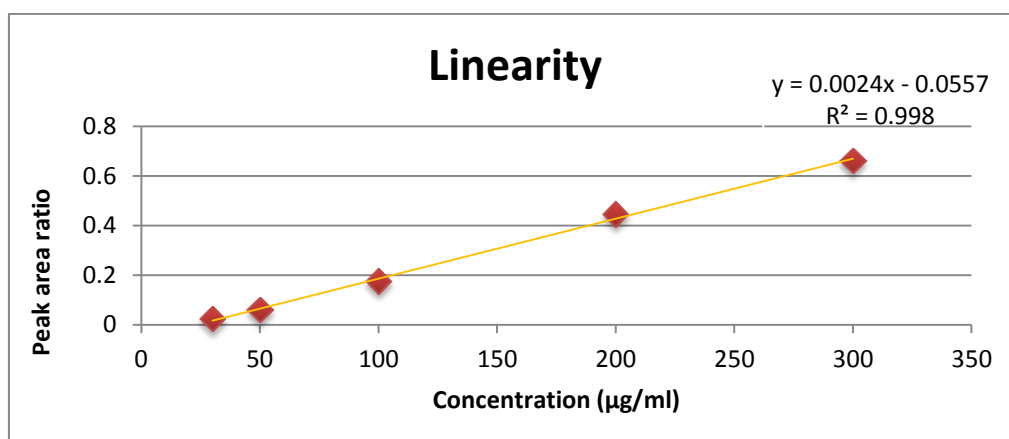
Method validation

1. Linearity

ค่า peak area ของการวิเคราะห์ไมทราเจนินในน้ำวุ้นลูกตาด้วย GC-MS ที่ความเข้มข้นระหว่าง 50 – 300 µg/mL แสดงในตารางที่ 5 ได้สมการ $y = 0.0024x - 0.0557$ และค่า $R^2 = 0.9979773$ ดังรูปที่ 10

ตารางที่ 5 แสดงค่า Peak area และความเข้มข้นของไมทราเจนิน

Concentration	Peak area (mean ± SD, n=3)
30	0.024 ± 0.013
50	0.059 ± 0.002
100	0.174 ± 0.145
200	0.445 ± 0.147
300	0.661 ± 0.229



รูปที่ 10 แสดงสมการเชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของไมทราเจนินกับ Peak area

2. Precision

- Intraday

จากการทดลอง 3 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 6 ครั้ง พบว่าค่า %RSD อยู่ระหว่าง 0.881 – 1.789 ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดง Peak area และ ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของ Intraday

Conc. of standard ($\mu\text{g/mL}$)	Peak area (mean \pm SD, n=6)	%RSD
50	1266 \pm 22.645	1.789
100	3506 \pm 43.387	1.237
200	7587.5 \pm 66.845	0.881

- Interday

จากการทดลอง 3 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 1 ครั้งต่อวัน ทำซ้ำในวันที่แตกต่างกันเป็นเวลา 5 วัน พบว่าค่า %RSD อยู่ระหว่าง 0.592 – 0.751 ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดง Peak area และ ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของ Interday

Conc. of standard ($\mu\text{g/mL}$)	Peak area (mean \pm SD, n=5)	%RSD
50	1269.867 \pm 7.523	0.592
100	3525.900 \pm 22.101	0.627
200	7507.067 \pm 56.399	0.751

3. Accuracy

เมื่อทำการทดลองวิเคราะห์ปริมาณไมทราไจนีนที่ทำการ spike ลงในน้ำวุ้นลูกตา 3 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ พบว่า %Recovery อยู่ในช่วง 100.532 – 101.202% โดยมีค่า %CV อยู่ในช่วง 1.0836 – 1.5423 ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงค่า %Recovery ของวิธีการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS

Amount add ($\mu\text{g/mL}$)	Amount found ($\mu\text{g/mL}$), n=3	%Recovery	Average of %Recovery (mean \pm SD, n=3)	%CV
40	40.63537	101.588425	100.532 \pm 1.0893	1.0836
	39.76503	99.412575		
	40.23812	100.5953		
80	80.09824	100.1228	101.202 \pm 1.4979	1.4801
	82.3298	102.91225		
	80.45722	100.571525		
160	163.60146	102.2509125	100.649 \pm 1.5523	1.5423
	160.87347	100.5459188		
	158.64234	99.1514625		

4. %Recovery

การทำ %Recovery ของวิธีการวิเคราะห์ไมทราจินีนในตัวอย่งน้ำวุ้นลูกตาโดยทำการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานไมทราจินีนใน methanol มีค่า area ratio อยู่ในช่วง 0.136246 - 2.2660691 ค่า %Recovery อยู่ระหว่าง 90.5822 - 92.4098 % และค่า %RSD อยู่ระหว่าง 0.65853 - 3.3693 แสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงค่า %Recovery ของวิธีการวิเคราะห์ไมทราจินีนตัวอย่งน้ำวุ้นลูกตา

Mitragynine in VF	Mean area ratio	SD (n=3)	%Recovery	%RSD
30	0.136246	0.0028406	92.4098	2.0849
50	0.246183	0.0016212	90.7509	0.65853
100	0.5302642	0.0145058	90.5822	2.7356
200	1.5153188	0.051055	91.0595	3.3693
300	2.2660691	0.0228859	91.8067	1.0099

5. Limit of detection (LOD) และ limit of quantification (LOQ)

จากการหาค่า Limit of detection (LOD) และ Limit of quantification (LOQ) โดยการ spike ไมทราไจนินที่ความเข้มข้น 5 µg/mL โดยทำซ้ำ 7 ครั้ง เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS ได้ค่า mean peak area \pm SD เท่ากับ 654.571 ± 2.507 และนำค่า SD มาคำนวณหาค่า LOD และ LOQ โดยนำมาคูณด้วย 3 และ 10 ทำให้ได้ค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 7.521 และ 25.071 µg/mL ตามลำดับ

ผลการศึกษาความคงสภาพ (Stability)

ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน ในตัวอย่างที่สัมผัสแสงนั้นมีการลดลงของไมทราไจนินแต่ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ แสดงดังตารางที่ 10

ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน ในตัวอย่างที่สัมผัสแสงมีการลดลงของไมทราไจนินที่ความเข้มข้นน้อยเร็วกว่าในระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น แต่ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ แสดงดังตารางที่ 10

ที่ความเข้มข้นต่างกัน ในตัวอย่างที่ไม่สัมผัสแสงมีการลดลงของไมทราไจนินในแต่ละความเข้มข้นแต่ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ แสดงดังตารางที่ 10

ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันที่ไม่สัมผัสแสงทั้ง 3 อุณหภูมิ โดยการเก็บรักษาที่อุณหภูมิสูงมีการเสื่อมของไมทราไจนินเร็วกว่าในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงดังรูปที่ 11-13

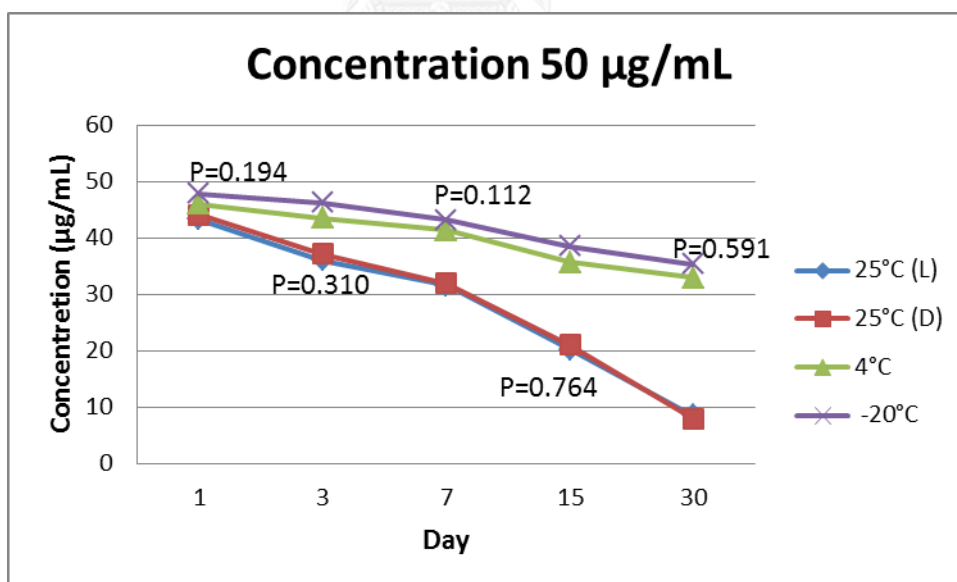
จากการที่นำความเข้มข้นที่พบในแต่ละวันที่นำมาวิเคราะห์ความคงสภาพเปรียบเทียบกับในแต่ละอุณหภูมิ พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 50 µg/mL ในวันที่ 1, 3, 7, 15 และ 30 วัน แต่ละอุณหภูมิมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P = 0.194, 0.310, 0.112, 0.764$ และ 0.591 ตามลำดับ ที่ระดับความเข้มข้น 100 µg/mL ในวันที่ 1, 3, 7, 15 และ 30 วัน แต่ละอุณหภูมิมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P = 0.832, 0.705, 0.540, 0.765$ และ 0.220 ตามลำดับ และที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL ในวันที่ 1, 3, 7, 15 และ 30 วัน แต่ละอุณหภูมิมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P = 0.166, 0.653, 0.692, 0.293$ และ 0.702 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 11-13

ตารางที่ 10 แสดงค่าเฉลี่ยของความเข้มข้น และ %Recovery ที่พบในแต่ละวัน

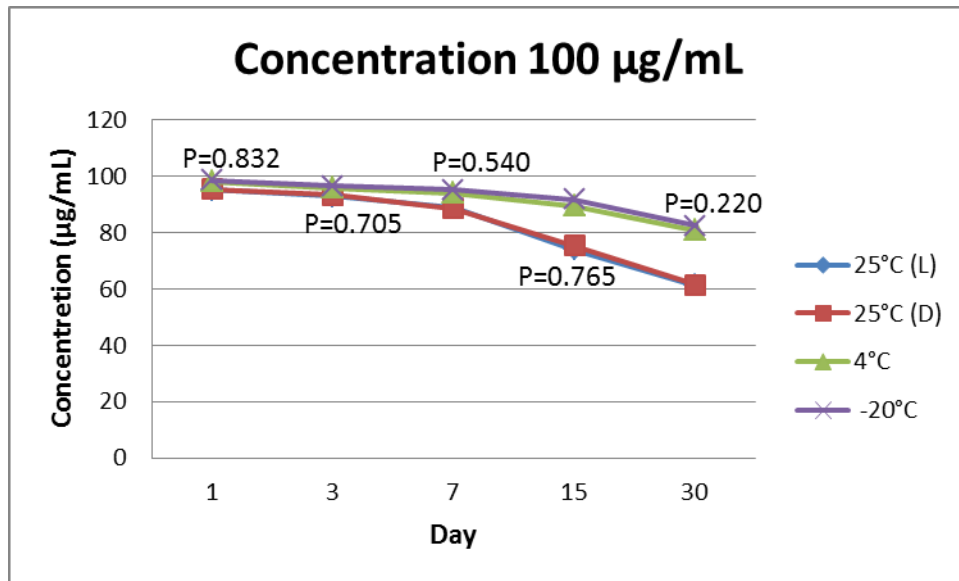
Day	Temperature	Amount add ($\mu\text{g/mL}$)	Amount found ($\mu\text{g/mL}$, mean \pm SD)	%Recovery
1	25°C, Light	50	43.321 \pm 0.513	86.642
		100	95.082 \pm 0.637	95.082
		200	186.858 \pm 2.751	93.429
	25°C, Dark	50	44.121 \pm 0.585	88.242
		100	95.449 \pm 0.580	95.449
		200	189.665 \pm 1.049	94.832
	4°C	50	46.114 \pm 0.518	92.227
		100	98.109 \pm 0.511	98.110
		200	194.797 \pm 1.072	97.399
	-20°C	50	47.926 \pm 0.185	95.852
		100	98.511 \pm 0.467	98.511
		200	197.595 \pm 1.159	98.798
3	25°C, Light	50	36.094 \pm 0.566	71.336
		100	92.832 \pm 1.027	92.832
		200	180.092 \pm 0.599	90.046
	25°C, Dark	50	37.214 \pm 1.458	73.953
		100	93.416 \pm 0.526	93.894
		200	181.865 \pm 1.107	90.951
	4°C	50	43.602 \pm 1.153	87.227
		100	95.869 \pm 0.872	96.813
		200	191.485 \pm 0.555	95.423
	-20°C	50	46.319 \pm 0.393	91.878
		100	96.406 \pm 0.593	96.648
		200	195.219 \pm 0.583	97.947

Day	Temperature	Amount add ($\mu\text{g/mL}$)	Amount found ($\mu\text{g/mL}$, mean \pm SD)	%Recovery
7	25°C, Light	50	31.608 \pm 1.155	63.215
		100	88.828 \pm 0.883	88.828
		200	174.959 \pm 0.999	87.479
	25°C, Dark	50	31.986 \pm 0.049	63.973
		100	88.458 \pm 0.732	88.458
		200	176.256 \pm 1.521	88.128
	4°C	50	41.393 \pm 1.106	82.786
		100	94.059 \pm 0.651	94.059
		200	189.719 \pm 1.046	94.859
	-20°C	50	43.280 \pm 0.531	86.561
		100	95.159 \pm 0.319	95.159
		200	192.487 \pm 1.580	96.244
15	25°C, Light	50	20.252 \pm 0.604	40.504
		100	73.933 \pm 1.979	73.933
		200	163.273 \pm 3.059	81.636
	25°C, Dark	50	21.070 \pm 0.699	42.140
		100	75.243 \pm 1.503	75.243
		200	165.679 \pm 2.114	82.839
	4°C	50	35.739 \pm 1.186	71.478
		100	89.326 \pm 1.527	89.326
		200	185.581 \pm 1.539	92.790
	-20°C	50	38.617 \pm 0.945	77.233
		100	91.749 \pm 0.952	91.749
		200	187.881 \pm 1.002	93.940

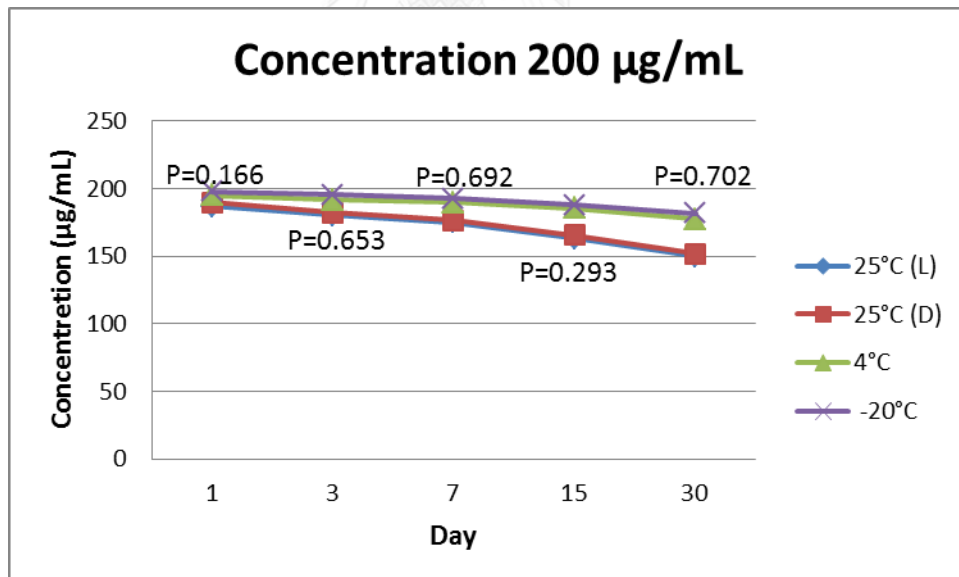
Day	Temperature	Amount add ($\mu\text{g/mL}$)	Amount found ($\mu\text{g/mL}$, mean \pm SD)	%Recovery
30	25°C, Light	50	8.49667 \pm 0.889	16.993
		100	61.172 \pm 1.447	61.172
		200	149.704 \pm 0.923	74.851
	25°C, Dark	50	7.893 \pm 1.282	15.966
		100	61.469 \pm 0.717	61.469
		200	151.843 \pm 1.101	75.921
	4°C	50	33.042 \pm 0.570	66.083
		100	80.698 \pm 1.063	80.698
		200	177.490 \pm 1.430	88.745
	-20°C	50	35.418 \pm 0.657	70.836
		100	82.342 \pm 0.390	82.342
		200	181.774 \pm 0.833	90.887



รูปที่ 11 แสดงกราฟระหว่างวันที่วิเคราะห์กับความเข้มข้นที่ลดลงในแต่ละอุณหภูมิ
ของระดับความเข้มข้นที่ 50 $\mu\text{g/mL}$



รูปที่ 12 แสดงกราฟระหว่างวันที่วิเคราะห์กับความเข้มข้นที่ลดลงในแต่ละอุณหภูมิ
ของระดับความเข้มข้นที่ 100 µg/mL



รูปที่ 13 แสดงกราฟระหว่างวันที่วิเคราะห์กับความเข้มข้นที่ลดลงในแต่ละอุณหภูมิ
ของระดับความเข้มข้นที่ 200 µg/mL

บทที่ 5

อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาการสกัดไมทราไจนีนจากใบกระท่อมโดยใช้เทคนิค Solid-liquid extraction ซึ่งมี methanol ผสม chloroform เป็นตัวทำละลายในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน พบว่าที่อัตราส่วน 4:1 (v/v) สามารถสกัดไมทราไจนีนออกจากใบกระท่อมมาได้ดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการงานวิจัยของ Chan และคณะ (2005) ที่ทำการแยกไมทราไจนีนออกจากใบกระท่อมสด ผงใบกระท่อมแห้ง และน้ำต้มใบกระท่อม พบว่าการสกัดไมทราไจนีนจากผงใบกระท่อมใช้ methanol ผสม chloroform ในอัตราส่วน 4:1⁽¹⁶⁾ เช่นเดียวกับ Haris (2013) ที่ได้ทำการศึกษาพัฒนาเทคนิคการสกัดใบกระท่อมให้ได้ไมทราไจนีนเพิ่มขึ้นจากการใช้ ultrasonic-assisted⁽⁴⁴⁾

งานวิจัยของ Hassan และคณะ (2012) ได้รายงานว่ามีไมทราไจนีนจะละลายได้ดีใน alcohol, chloroform และ acetic acid โดยไม่ละลายในน้ำ⁽¹⁴⁾ และในปี ค.ศ. 2015 Ramanathan และคณะ ได้รายงานว่ามีคุณสมบัติทั้ง hydrophobic และ lipophilic alkaloid ละลายได้ดีใน methanol alcohol และกรด⁽⁴⁵⁾ และจาก mass spectrum ที่ตรวจพบจาก GC-MS ในงานวิจัยครั้งนี้พบว่าได้แบบเดียวกับของ Chan และคณะ และจากงานวิจัยของ Scott และคณะ ในปี 2014 ซึ่ง peak หลักของ m/z ที่พบคือ 214, 397, 383, 186, 199 และ 269 ตามลำดับ^(16, 46)

การตรวจเบื้องต้นด้วยเทคนิค color test การใช้ Marquis test นั้นจะใช้ตรวจคัดกรองมอร์ฟินและอนุพันธ์ของมอร์ฟินซึ่งผลบวกที่ได้นั้นจะปรากฏสีม่วง⁽¹²⁾ Simon's test ใช้ตรวจสอบสารในกลุ่ม amphetamine (secondary amines) ปรากฏสีฟ้า⁽⁴⁷⁾ และการใช้ Duquenois-Levine test เป็นการทดสอบสารในกลุ่ม cannabinoid ซึ่งจะให้ผลบวกปรากฏสีม่วง⁽⁴⁸⁾ และสามารถตรวจสอบสารจำพวก indole alkaloid ได้ด้วย ซึ่งในงานวิจัยของ Chan และคณะ ได้กล่าวไว้ว่าไมทราไจนีนสามารถใช้ Duquenois-Levine test โดยผลที่ได้จะได้เป็นสีเขียวอมดำ (dull blackish green color) และได้มีรายงานไว้ในวารสารนิติเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี 2010 ว่า color test สำหรับการตรวจวิเคราะห์เบื้องต้นของพืชกระท่อมคือ Duquenois-Levine test เกิดเป็นสีเขียวอมดำเช่นกัน^(16, 47) ซึ่งผลที่ได้จากงานวิจัยครั้งนี้สอดคล้องกับในรายงานดังกล่าว ในปี 2014 Scott และคณะ ได้ทำการแยกไมทราไจนีนจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากอินเตอร์เน็ตและได้ใช้ color test ต่าง ๆ ทำการทดสอบเบื้องต้น พบว่า Marquis reagent และ Simon's test ไม่สามารถใช้ตรวจสอบไมทราไจนีนได้ ซึ่งใน Simon's test สอดคล้องกับงานวิจัยครั้งนี้ แต่ Marquis reagent ผลที่ได้มีความแตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากปริมาณของไมทราไจนีนมีความแตกต่างกันทำให้ผลของ color test ที่ได้ไม่สอดคล้องกัน และในส่วนของ Duquenois-Levine test Scott และคณะ ให้ผลบวกเป็นสีเขียว

อ่อน ซึ่งสีที่ได้มีความแตกต่างกันกับในงานวิจัยมีความเป็นไปได้ว่าปริมาณไมทราเจนินที่ใช้ในการทดสอบมีผลต่อสีของผล color test ที่แตกต่างกัน⁽⁴⁶⁾ ในรายงานของ National Institute of Justice ของประเทศสหรัฐอเมริกาได้ทำการทดสอบ color test reagents/kits⁽⁴⁹⁾ สำหรับการตรวจสอบสารเสพติดต่าง ๆ ซึ่งระบุว่า Simon's test ให้ผลบวกในการใช้ตรวจ d-Methamphetamine HCl, Dimethoxy-meth HCl, MDMA HCl ผลบวกเป็นสี deep blue และ methylphenidate HCl ผลบวกเป็นสี pale violet ซึ่งไม่ให้ผลบวกกับ ไมทราเจนิน ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้ในการศึกษาครั้งนี้

การศึกษาการสกัดไมทราเจนินจากตัวอย่างชีววัตถุในงานวิจัยของ Lu และคณะ ในปี 2009 ได้เปรียบเทียบ liquid-liquid extraction 3 วิธี คือ ethyl acetate, ethyl ether และ MTBE ในการสกัดไมทราเจนินจากตัวอย่างปัสสาวะ ได้ %Recovery คือ 49, 82 และ 81 % ตามลำดับ พบว่า ethyl ether และ MTBE ได้ผลการสกัดไม่แตกต่างกันสำหรับการสกัดไมทราเจนินจากตัวอย่างปัสสาวะ แต่ MTBE นั้นไม่ส่งผลต่อไมทราเจนินขณะทำการสกัดซึ่งแตกต่างจาก ethyl ether ที่มี high volatility ทำให้เกิดการผิดพลาดได้ง่ายในขณะทำการสกัดทำให้ผลที่ได้มีความคลาดเคลื่อนสูง MTBE จึงเป็นสารสกัดที่ให้ประสิทธิภาพที่ดีสุดใน 3 วิธี⁽⁴¹⁾ และ de Moraes และคณะ ได้ทำการทดลองสกัดไมทราเจนินจากพลาสมาของหนูทดลองโดยใช้ hexane : isoamyl alcohol (98:2, v/v) พบว่าสามารถสกัดไมทราเจนินได้ %Recovery ของความเข้มข้นที่ 0.5, 500 และ 800 ng/mL ได้ 95.7, 90.0 และ 99.1 % ตามลำดับ และได้ค่า LOQ อยู่ที่ 0.2 ng/mL⁽³¹⁾ และในปี 2010 Prathasarathy และคณะ ได้ทำการสกัดไมทราเจนินจากพลาสมาโดยใช้เทคนิค SPE ซึ่งให้ %Recovery 96.3 - 97.7 %⁽⁶⁾ และเนื่องจากงานวิจัยส่วนใหญ่ยังไม่มีเทคนิคที่เหมาะสมสำหรับการสกัดไมทราเจนินจากน้ำฉันทา จึงได้นำ 3 เทคนิคที่ให้ประสิทธิภาพสูงในการสกัดไมทราเจนินจากตัวอย่างชีววัตถุต่าง ๆ มาใช้ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมา แต่อาจจะเพราะข้อจำกัดของน้ำฉันทาที่มีความหนืดสูง ทำให้ได้ผลไม่ดีเท่ากับงานวิจัยดังกล่าว แต่ก็ทำให้ทราบได้ว่า เทคนิคการสกัดไมทราเจนินออกจากน้ำฉันทาที่มีประสิทธิภาพที่ดีและเหมาะสมที่สุดนั้นคือเทคนิค MTBE

จากการทำ Method validation พบว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีค่า linearity range อยู่ในช่วง 30-300 µg/mL ซึ่งมีความแตกต่างจากงานวิจัยของ Le และ คณะ ที่ทำการตรวจหาไมทราเจนิน และ เมตาบอไลต์จากปัสสาวะ ได้ค่า linearity range อยู่ในช่วง 1-500 ng/mL⁽⁴³⁾ เนื่องจากตัวอย่างในการศึกษาเป็นน้ำฉันทา มีความหนืดสูงส่งผลต่อการสกัดไมทราเจนินที่ความเข้มข้นต่างกัน จะไม่ได้อัตราส่วนการสกัดในระดับที่ใกล้เคียงกัน ทำให้ช่วง calibration curve แคบกว่าการศึกษาการสกัดจากตัวอย่างปัสสาวะ จากการวิเคราะห์ Precision แบบ Intraday และ Interday ค่า %RSD อยู่ในช่วง 0.881-1.789 และ 0.591-0.751 % ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้เนื่องจากค่า %RSD ที่ได้มีค่าน้อยกว่า 5 ทำวิธีการวิเคราะห์นี้มี Precision สูง การวิเคราะห์ Accuracy มีค่า %Recovery อยู่ในช่วง

100.532-101.202 % และมีค่า %CV อยู่ในช่วง 1.0836-1.5423 % โดยวิธีการวิเคราะห์นี้ถือว่ามี Accuracy ที่ดี เนื่องจากค่า %Recovery และ %CV ที่ได้ นั้น อยู่ในช่วงของ $\pm 10\%$ ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้ เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ %Recovery ที่ได้ อยู่ในช่วง 90.5822 - 92.4098% ถือว่าวิธีการนี้มี %Recovery ที่อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้คืออยู่ในช่วง 90 - 110% ค่า LOD และ LOQ ที่ได้จากการวิเคราะห์นี้มีค่าเท่ากับ 7.521 และ 25.071 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ⁽⁴²⁾

จากการศึกษาความคงสภาพของไมทราจินินในน้ำวุ้นลูกตา พบว่าที่อุณหภูมิ -20°C สามารถคงสภาพไมทราจินินได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิ 25°C และ 4°C ซึ่งดูจาก %Recovery ในความเข้มข้นเดียวกัน และเมื่อเทียบจากงานวิจัย Le และคณะในปีค.ศ. 2012 ที่ได้ %Recovery อยู่ในช่วง 77.8-94.0% เมื่อทำการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C และจากงานวิจัยของ Suhanya และคณะ ศึกษาความคงสภาพของไมทราจินินในพลาสมาที่อุณหภูมิ -20°C เก็บไว้เป็นเวลา 1 เดือน ได้ค่า %Recovery เท่ากับ 94.0% ซึ่งมีค่าใกล้เคียงงานวิจัยครั้งนี้คือ 90.887%^(6, 14, 43, 50) และอาจเป็นเพราะปัจจัยทางด้านอุณหภูมิที่ทำให้กระบวนการเปลี่ยนแปลงของไมทราจินินหยุดการทำงานในอุณหภูมิต่ำ ทำให้การคงสภาพของไมทราจินินในน้ำวุ้นลูกตายังคงสภาพอยู่ได้ดีกว่าการเก็บรักษาในอุณหภูมิสูง และทั้งแสง และอุณหภูมินั้นยังอาจส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ต่าง ๆ ที่อยู่ในน้ำวุ้นลูกตา ซึ่งเอนไซม์ต่าง ๆ นั้นอาจเป็นตัวเร่งในการทำให้ไมทราจินินเปลี่ยนรูปไปจนไม่สามารถตรวจพบได้ โดยการเก็บที่อุณหภูมิต่ำ ๆ ทำให้ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้

สำหรับการการศึกษาต่อยอดในอนาคตควรจะมีการนำใช้สารไมทราจินินมาตรฐานมาใช้ในการวิเคราะห์เพื่อให้งานวิจัยมีประสิทธิภาพที่ดียิ่งขึ้น และควรมีการนำไปเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจมาตรฐานเพื่อผลการวิเคราะห์ที่แม่นยำมากขึ้น และควรมีการศึกษาการคงสภาพของสารไมทราจินินในสภาวะแวดล้อมและปัจจัยต่าง ๆ รวมถึงการคงสภาพของไมทราจินินในชีววัตถุอื่น ๆ ที่ยังไม่มีการศึกษา เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในงานนิติเวชศาสตร์ และนิติวิทยาศาสตร์ได้อย่างถูกต้อง

รายการอ้างอิง

1. สำนักงานสถิติแห่งชาติ. “ผู้ป่วยยาเสพติด” ชีวิตที่ต้องการคืนสู่สังคม 2556 [updated 29 March 2013]. Available from:
[http://www.dmh.go.th/downloadportal/Health%20behaviors/%E0%B8%AA%E0%B8%B2%E0%B8%A3%E0%B9%80%E0%B8%AA%E0%B8%9E%E0%B8%95%E0%B8%B4%E0%B8%94%20\(Drug%20Use\)/Patient-drugs.pdf](http://www.dmh.go.th/downloadportal/Health%20behaviors/%E0%B8%AA%E0%B8%B2%E0%B8%A3%E0%B9%80%E0%B8%AA%E0%B8%9E%E0%B8%95%E0%B8%B4%E0%B8%94%20(Drug%20Use)/Patient-drugs.pdf).
2. สถาบันบำบัดรักษาและฟื้นฟูผู้ติดยาเสพติดแห่งชาติบรมราชชนนี. จำนวนและร้อยละของผู้ป่วยนอกยาเสพติด ปีงบประมาณ 2553-2557 2557 [updated 04 November 2014]. Available from:
http://www.thanyarak.go.th/thai/index.php?option=com_content&task=view&id=2023&Itemid=53.
3. สำนักงานคณะกรรมการป้องกันและปราบปรามยาเสพติด. สถานการณ์ปัญหาหายาเสพติดประเทศไทย ปี 2555 และแนวโน้ม. กรุงเทพฯ: สำนักงาน ป.ป.ส.; 2555.
4. สำนักงานคณะกรรมการป้องกันและปราบปรามยาเสพติด. พิษกระท่อมในสังคมไทย. กรุงเทพฯ: สำนักงาน ป.ป.ส.; 2548.
5. Philipp AA, Wissenbach DK, Zoerntlein SW, Klein ON, Kanogsunthornrat J, Maurer HH. Studies on the metabolism of mitragynine, the main alkaloid of the herbal drug Kratom, in rat and human urine using liquid chromatography-linear ion trap mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 2009;44(8):1249-61.
6. Parthasarathy S, Ramanathan S, Ismail S, Adenan MI, Mansor SM, Murugaiyah V. Determination of mitragynine in plasma with solid-phase extraction and rapid HPLC-UV analysis, and its application to a pharmacokinetic study in rat. *Anal Bioanal Chem.* 2010;397(5):2023-30.
7. บุรุมรา น. การหาปริมาณไมทราไจนีนในใบกระท่อมจากแหล่งต่างๆในประเทศไทย. นครปฐม: ศิลปากร; 2554.
8. สำนักงานคณะกรรมการป้องกันและปราบปรามยาเสพติด. ความรู้พื้นฐานเพื่อการป้องกันยาเสพติดในเยาวชน. กรุงเทพฯ: ห้างหุ้นส่วนจำกัด ไอเดีย สแควร์; 2554. 112 p.
9. ศูนย์วิชาการด้านยาเสพติด. สี่คูณร้อย 2009 [cited 2014 15 June]. Available from:
<http://nctc.oncb.go.th/new/images/stories/article/4x100.pdf>.

10. หนังสือพิมพ์มติชน. ยาเสพติด สูตรอันตราย กรุงเทพฯ: หนังสือพิมพ์มติชน; 2552 [updated 20/08/2009; cited 2014 13 March]. Available from: http://nctc.oncb.go.th/new/index.php?option=com_content&view=article&id=298:2009-10-26-06-24-21&catid=239:all-content&Itemid=270.
11. ไวนิชิกิจ ว. การตรวจวิเคราะห์สารน้ำจากการเจาะเพื่อส่งตรวจ. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2548. 277 p.
12. ญัฐ ตันศรีสวัสดิ์, เอี่ยมภักดิ์ ศ. นิติพิษวิทยา. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2550. 298 p.
13. สำนักพัฒนาการป้องกันและแก้ไขปัญหายาเสพติด. พืชกระท่อม: สมุนไพร หรือพืชยาเสพติด. พืชกระท่อม: สมุนไพร หรือพืชยาเสพติด 2546.
14. Hassan Z, Muzaimi M, Navaratnam V, Yusoff NH, Suhaimi FW, Vadivelu R, et al. From Kratom to mitragynine and its derivatives: physiological and behavioural effects related to use, abuse, and addiction. *Neurosci Biobehav Rev.* 2013;37(2):138-51.
15. Takayama H. Chemistry and pharmacology of analgesic indole alkaloids from the rubiaceae plant, *Mitragyna speciosa*. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2004;52(8):916-28.
16. Chan KB, Pakiam C, Rahim RA. Psychoactive plant abuse: the identification of mitragynine in ketum and in ketum preparations. *Bull Narc.* 2005;57(1-2):249-56.
17. Field E. Mitragynine and mitraversine, two new alkaloids from species of *Mitragyna*. *J Chem Soc.* 1921;119:5.
18. Grewal KS. The effect of mitragynine on man. *J Med Psychol.* 1932;12:18.
19. Joshi B, Raymond-Hamet, Taylor WI. Structure of mitragynine (9-methoxycorynantheidine). *J Soc C&I (SCI).* 1963;54(14).
20. Norakarnphadung P. Analytical Data of Drug Addict in Management of Narcotic Drug Dependence in Thanyarak Hospital. ปทุมธานี: โรงพยาบาลธัญญารักษ์ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 1968.
21. นรการมตุง ป. ประมวลความรู้เรื่องยาเสพติดให้โทษ. ปทุมธานี: โรงพยาบาลธัญญารักษ์ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2509.
22. Macko E, Weisbach JA, Douglas B. Some observations on the pharmacology of mitragynine. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1972;198:17.

23. แก้วประดับ น. แอลคาลอยด์จากใบสดของต้นกระท่อม. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2533.
24. Zarembo EJ, Douglas, B. V, Weisbach Ja. Metabolites of mitragynine. *JPharmSci.* 1974;63:15.
25. Matsumoto K, Mizowaki M, Suchitra T, Takayama H, Sakai S, Aimi N, et al. Antinociceptive action of mitragynine in mice: evidence for the involvement of supraspinal opioid receptors. *Life Sci.* 1996;59(14):1149-55.
26. Thongpradichote S, Matsumoto K, Tohda M, Takayama, , H. A, N., Sakai, , Watamabe Sa. Identification of opioid receptor subtypes in antinociceptive action of supraspinally-administered mitragynine in mice. *Life Sci J.* 1998;62:8.
27. Holler JM, Vorce SP, McDonough-Bender PC, Magluilo J, Jr., Solomon CJ, Levine B. A drug toxicity death involving propylhexedrine and mitragynine. *J Anal Toxicol.* 2011;35(1):54-9.
28. Kronstrand R, Roman M, Thelander G, Eriksson A. Unintentional fatal intoxications with mitragynine and O-desmethyltramadol from the herbal blend Krypton. *J Anal Toxicol.* 2011;35(4):242-7.
29. Neerman MF, Frost RE, Deking J. A drug fatality involving Kratom. *J Forensic Sci.* 2013;58 Suppl 1:S278-9.
30. Nelsen JL, Lapoint J, Hodgman MJ, Aldous KM. Seizure and coma following Kratom (*Mitragynina speciosa* Korth) exposure. *J Med Toxicol.* 2010;6(4):424-6.
31. de Moraes NV, Moretti RA, Furr EB, 3rd, McCurdy CR, Lanchote VL. Determination of mitragynine in rat plasma by LC-MS/MS: application to pharmacokinetics. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2009;877(24):2593-7.
32. Janchawee B, Keawpradub N, Chittrakarn S, Prasettho S, Wararatananurak P, Sawangjareon K. A high-performance liquid chromatographic method for determination of mitragynine in serum and its application to a pharmacokinetic study in rats. *Biomed Chromatogr.* 2007;21(2):176-83.
33. Balazs EA, Denlinger JL. The vitreous. In: Davson, J. (Ed.). New York: Academic Press; 1984. 54 p.

34. Neal RE, Bettelheim FA, Lin C, Winn KC, Garland DL, Zigler JS, Jr. Alterations in human vitreous humour following cataract extraction. *Exp Eye Res.* 2005;80(3):337-47.
35. Ayad S, Weiss J. A new look at vitreous-humour collagen. *Biochem J.* 1984;218:6.
36. Balazs E, Denlinger J. Aging changes in the vitreous. In: *Aging and Human Visual Function.* New York: Alan R Liss; 1982. 13 p.
37. ทองนพเนื่อ ๓. การวิเคราะห์ด้วยยาในชีวสาร. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2553.
38. Fernandez P, Seoane S, Vazquez C, Tabernero MJ, Carro AM, Lorenzo RA. Chromatographic determination of drugs of abuse in vitreous humor using solid-phase extraction. *J Appl Toxicol.* 2013;33(8):740-5.
39. Kovar K-A, Laudzun M. *Chemistry and Reaction Mechanisms of Rapid Tests for Drugs of Abuse and Precursors Chemicals* 1989.
40. Bureau THMwtNCS. Drug chemistry section technical procedure manual 2006 [updated 31 July 2014; cited 2015 June 2].
41. Lu S, Tran BN, Nelsen JL, Aldous KM. Quantitative analysis of mitragynine in human urine by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2009;877(24):2499-505.
42. กาญจนชุมพล ๓. การประเมินวิธีการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ (Evaluation Method for Laboratory Work). 2556.
43. Le D, Goggin MM, Janis GC. Analysis of mitragynine and metabolites in human urine for detecting the use of the psychoactive plant kratom. *J Anal Toxicol.* 2012;36(9):616-25.
44. Haris HM. An optimised recovery of mitragynine from *Mitragyna speciosa* using freeze drying and ultrasonic-assisted extraction method. *The Experiment.* 2013;15(3):7.
45. Ramanathan S, Parthasarathy S, Murugaiyah V, Magosso E, Tan SC, Mansor SM. Understanding the physicochemical properties of mitragynine, a principal alkaloid of *Mitragyna speciosa*, for preclinical evaluation. *Molecules.* 2015;20(3):4915-27.

46. Scott TM, Yeakel JK, Logan BK. Identification of mitragynine and O-desmethyltramadol in Kratom and legal high products sold online. *Drug Test Anal.* 2014;6(9):959-63.
47. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ภค. วารสารนิติเวชศาสตร์. กรุงเทพฯ 2553 กรกฎาคม - ตุลาคม 2553. 62 p.
48. Budavari S. *The Merck Index*. 12 ed. United state: Merck and Co., Inc; 1996. 1573-4 p.
49. Justice Nlo. *Color Test Reagents/Kits for Preliminary Identification of Drugs of Abuse*. Washington, DC 2000. Available from: <https://www.ncjrs.gov/pdffiles1/nij/183258.pdf>.
50. Overton P, Dean P, Redgrave P. Detection of visual stimuli in far periphery by rats: possible role of superior colliculus. *Exp Brain Res.* 1985;59(3):559-69.





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

การคำนวณ

1. การคำนวณปริมาณในการเตรียมสารละลายไมโทราไจนีนความเข้มข้น 1 µg/mL

จากรายงานของ Hassan และคณะ (2013) พบไมโทราไจนีนจากใบกระท่อมที่ 66% ของแอลคาลอยด์ทั้งหมด (14, 32) ซึ่งพบแอลคาลอยด์ 0.5% ของน้ำหนักใบแห้งนำมาคำนวณหาปริมาณเริ่มต้นของไมโทราไจนีนที่คาดว่าจะสกัดได้โดยกำหนดความเข้มข้นหลังการสกัดไว้ที่ 1 µg/mL

จากใบกระท่อม	100 mg	มี แอลคาลอยด์ 0.5 mg	
ดังนั้น แอลคาลอยด์	100%	มีน้ำหนัก 0.5 mg	
ถ้า	66%	มีน้ำหนัก 0.33 mg	
ดังนั้นในใบกระท่อม	100 mg	จะพบ ไมโทราไจนีน	0.33 mg.
ถ้าต้องการไมโทราไจนีน	1 mg	ต้องใช้ใบกระท่อม	303 mg.

การคำนวณความเข้มข้นในแต่ละการทดลองจะทำการเป็น serial dilution โดยเตรียมที่จาก stock 1 mg/mL dilute ความเข้มข้นสูงสุดก่อน แล้ว dilute ลงตามระดับความเข้มข้นเรื่อย ๆ โดยใช้สูตร

$$C_1V_1=C_2V_2$$

2. การเตรียมสารละลาย Internal standard

Tramadol เตรียม stock 3 mg/mL จาก standard และนำไป spike ลงในตัวอย่างในมีความเข้มข้นที่ 60µg/mL ในตัวอย่าง 500 µL โดยใช้สูตร

$$C_1V_1=C_2V_2$$

3. การเตรียม บัฟเฟอร์ 0.5M Na₂HPO₄ pH 11

ชั่ง Na₂PO₄ 35.49 g. ละลายใน น้ำ DI 450 mL คนให้ละลาย นำไปปรับให้เป็น pH 11 จากนั้น ปรับปริมาตรให้เป็น 500 mL ด้วย volume metric flask

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวทิมภ์พร บุญดำเนิน เกิดวันที่ 20 พฤศจิกายน 2531 ที่โรงพยาบาลราชวิถี กรุงเทพมหานคร ที่อยู่ปัจจุบัน ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล ธัญบุรี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สาขาวิชาชีววิทยา ในปีการศึกษา 2553 ต่อมาในปีพ.ศ. 2555 ได้เข้าศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษาแขนงนิติวิทยาศาสตร์ สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

