การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์คัดกรองสารเสพติดในน้ำวุ้นลูกตาด้วยเทคนิคการสกัด QuEChERS และตรวจด้วย LC-MS/MS

น.ส.บัณฑิตา บุญเฉลียว

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ ไม่สังกัดภาควิชา/เทียบเท่า
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2562
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

The method validation of drug abuse screening test in vitreous humor samples by QuEChERS extraction and LC-MS/MS

Miss Bundhita Boonchaleaw

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Medical Sciences
Common Course
FACULTY OF MEDICINE
Chulalongkorn University
Academic Year 2019

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์คัดกรองสารเสพติดในน้ำวุ้นลูกตาด้วยเทคนิคการสกัด QuEChERS และตรวจด้วย LC-MS/MS
โดย	น.ส.บัณฑิตา บุญเฉลียว
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ณัฐ ตันศรีสวัสดิ์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุทธิพงศ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วัชรี ลิมปนสิทธิกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ณัฐ ตันศรีสวัสดิ์)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.นพัต จันทรวิสูตร)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์สมิทธิ์ ศรีสนธิ์)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บัณฑิตา บุญเฉลียว : การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์คัดกรองสารเสพติดในน้ำวุ้นลูกตาด้วยเทคนิคการสกัด QuEChERS และตรวจด้วย LC-MS/MS. (The method validation of drug abuse screening test in vitreous humor samplesby QuEChERS extraction and LC-MS/MS) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ผศ. นพ.ณัฐ ตันศรีสวัสดิ์

น้ำวุ้นลูกตาถูกนำมาใช้เป็นตัวอย่างทางเลือก เนื่องจากทนต่อการเปลี่ยนแปลงหลังการเสียชีวิต รวมถึงมีส่วนประกอบที่เป็นเซลล์น้อยจึงสามารถนำมาเตรียมตัวอย่างได้ง่าย การเตรียมตัวอย่างทางนิติพิษวิทยาสามารถเตรียมได้หลายวิธี เช่น Solid Phase Extraction (SPE) และ Liquid-Liquid Extraction (LLE) แต่มีข้อเสียคือใช้เวลาในการเตรียมนาน มีค่าใช้จ่ายสูงและใช้สารที่เป็นอันตรายในปริมาณมาก เทคนิค modified QuEChERS ถูกนำมาพัฒนาให้เข้ากับงานทางนิติพิษวิทยา ซึ่งเทคนิคนี้ใช้เวลาในการเตรียมน้อย ทำได้ง่าย ค่าใช้จ่ายถูก มีประสิทธิภาพ มีความทนทานและมีความปลอดภัย เครื่องมือตรวจวเคราะห์ Liquid Chromatography -tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) สามารถวิเคราะห์สารประกอบได้หลากหลาย มีความจำเพาะสูงและการเตรียมตัวอย่างเพียงเล็กน้อยก็สามารถนำไปวิเคราะห์ได้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์คัดกรองสารเสพติดในน้ำวุ้นลูกตาด้วยเทคนิค modified QuEChERS และตรวจด้วย LC-MS/MS ทำการทดสอบความใช้ได้ (validation) ทั้งหมด 6 พารามิเตอร์ โดยนำน้ำวุ้นลูกตามา spike สารเสพติดลงไปทั้งหมด 24 ชนิด จากนั้นนำไปสกัดด้วยเทคนิค modified QuEChERS และตรวจวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS หลังจากนั้นนำเทคนิคที่ผ่านการทดสอบแล้วไปทดสอบกับตัวอย่างน้ำวุ้นลูกตาจริงทั้งหมด 10 ตัวอย่าง และเปรียบเทียบผลที่ได้กับการทดสอบในตัวอย่างเลือด ผลการศึกษาความใช้ได้พบว่า การทดสอบความใช้ได้ทั้ง 6พารามิเตอร์มีค่าอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ทั้งหมด และผลการทดสอบ selectivity ไม่พบการรบกวนของสารอื่น ๆ ในการทดสอบและเมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบตัวอย่างน้ำวุ้นลูกตากับตัวอย่างเลือดก็ให้ผลไม่แตกต่างกัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต .....

ปีการศึกษา 2562 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

6074068630 : MAJOR MEDICAL SCIENCES
KEYWORD: QuEChERS extraction/LC-MS/MS/Method validation/Vitreous humor

Bundhita Boonchaleaw : The method validation of drug abuse screening test in vitreous humor samplesby QuEChERS extraction and LC-MS/MS. Advisor: Asst. Prof. NAT TANSRISAWAD, M.D.

Vitreous humor can be used as an alternative sample because of low chemical change in postmortem and low cellular component. So, it is easy to prepare vitreous humor sample for the forensic toxicology analysis. Forensic toxicology samples are usually prepared in these two methods which are solid phase extraction (SPE) and liquid-liquid extraction (LLE). The disadvantages of these techniques are time consuming, high cost and high volume of organic solvent. The modified QuEChERS technique was developed and adapted to suit for forensic toxicology analysis. This technique takes less time, easy to perform, inexpensive, efficient, rugged and safe. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) is the instrument that can analyze a wide range of compounds with rapid and specific analysis. The purpose of this research is to investigate the method validation of vitreous humor sample drug screening test using QuEChERS extraction and analyzing by LC-MS/MS. Six validation parameters were carried out by spike pooled vitreous humor with 24 abused drugs then extracted by modified QuEChERS and analyzed by LC-MS/MS, then compared the results with blood analysis. After the validation was proved, the application of the validated technique was performed on 10 authentic forensic vitreous humor samples. The results of the validation showed all validated data were in acceptance criteria and no interference was detected in selectivity test. This method had been successfully applied to 10 authentic samples and the results were not different between blood and vitreous humor comparison.

Field of Study: Medical Sciences Student's Signature .....
Academic Year: 2019 Advisor's Signature .....

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์จาก
ผศ. นพ.ณัฐ ตันศรีสวัสดิ์ ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำแนะนำ คำปรึกษาและความช่วยเหลือตลอดจน
แนะนำตรวจสอบและแก้ไขข้อบกพร่องเพื่อทำให้วิทยานิพนธ์นี้มีความสมบูรณ์
ผู้วิจัยขอบขอบพระคุณท่านเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้
ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.วัชรี ลิมปนสิทธิกุล ประธานคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์
อาจารย์ ดร. นพัต จันทรวิสูทร และ ผศ.นพ.สมิทธิ์ ศรีสนธิ์ คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์
ที่กรุณาตรวจสอบความถูกต้องและให้คำแนะนำต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์
ต่อการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้
ขอขอบพระคุณกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ที่ได้ให้การสนับสนุนเงินทุนวิจัยในครั้งนี้
ขอขอบพระคุณรุ่นพี่และเพื่อน ๆ นิสิตปริญญาโทและพี่ ๆ แพทย์ประจำบ้านที่ได้ให้
ความช่วยเหลือให้การทำวิจัยนี้ผ่านไปได้ด้วยดี
ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้จนทำให้สำเร็จการศึกษาในระดับบัณฑิตศึกษา
สุดท้ายขอขอบพระคุณบิดา มารดาและครอบครัวที่สนับสนุนและเป็นกำลังใจเสมอ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บัณฑิตา บุญเฉลียว

สารบัญ

หน้า

..... ค

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ค

..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ง

กิตติกรรมประกาศ ..... จ

สารบัญ ..... ฉ

สารบัญตาราง 1

บทที่ 1 1

บทนำ 1

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา (Background and Rationale) 1

1.2. คำถามงานวิจัย (Research Question) 2

1.3 วัตถุประสงค์ (Objectives) 2

1.4 สมมติฐาน (Hypothesis) 2

1.5 กรอบแนวคิดงานวิจัย (Conceptual Framework) 2

1.6 รูปแบบงานวิจัย (Research Design) 3

1.7 คำสำคัญที่ใช้ในงานวิจัย (Keywords) 3

1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ (Expected Benefits) 3

บทที่ 2 4

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง 4

2.1 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (Review of the related literatures) 4

2.1.1 นิติพิษวิทยา (Forensic toxicology) 4

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.1.2 น้ำวุ้นลูกตา (Vitreous Humor) 4
2.1.3 การศึกษาวิจัยยาและสารเสพติดในน้ำวุ้นลูกตา 5
2.1.4 การเตรียมตัวอย่าง (Sample Preparation) 6
2.1.5 Modified QuEChERS Technique 8
2.1.6 Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) 10
บทที่ 3 12
วิธีดำเนินงานวิจัย 12
3.1 ประชากรที่ศึกษาและกลุ่มตัวอย่าง 12
3.2 เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัคร (Criteria) 12
3.3 ขนาดของประชากร (Sample size) 12
3.4 วิธีการดำเนินงานวิจัย 13
3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis) 19
3.6 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย (Tools) 19
3.7 สถานที่ทำวิจัย 19
3.8 ข้อพิจารณาทางจริยธรรม (Ethical Consideration) 19
บทที่ 4 20
ผลการวิจัย 20
บทที่ 5 26
สรุปผลและอภิปรายผลการวิจัย 26
บรรณานุกรม 28
ประวัติผู้เขียน 33

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบเทคนิคการเตรียมตัวอย่างทั้ง 3 วิธี 7

ตารางที่ 2 สารมาตรฐานที่ต้องการศึกษา 14

ตารางที่ 3 แสดงการเลือกใช้ MRM และ retention time ของสารทั้ง 24 ชนิด 21

ตารางที่ 4 แสดงผลการ validation ของสารทั้ง 24 ชนิด 22

ตารางที่ 5 แสดง Limit of detection (LOD) 23

ตารางที่ 6 การทดสอบเทคนิคที่ผ่านการ validation กับตัวอย่างน้ำวุ้นลูกตาทั้งหมด 10 ตัวอย่าง**.** 25

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา (Background and Rationale)

สารเสพติดเป็นปัญหาที่พบทั่วโลกและในประเทศไทยมาอย่างยาวนาน ปัจจุบันมีสารเสพติดประเภทใหม่เพิ่มขึ้นมาก โดยส่งผลกระทบทั้งในด้านสังคมและเศรษฐกิจ ซึ่งในกรณีที่เสพสารเสพติดจนเสียชีวิต จะต้องมีการเก็บตัวอย่างชีววัตถุเพื่อนำมาตรวจวิเคราะห์หาสารเสพติดที่ทำให้เสียชีวิต คือ เลือดและปัสสาวะ ในบางครั้งตัวอย่างทั้งคู่ไม่สามารถทำการเก็บได้จากการชันสูตรศพ รวมถึงในกรณีที่มีการปนเปื้อนจากสารเคมีที่เกิดจากกระบวนการเน่าสลายของร่างกาย น้ำวุ้นลูกตาจึงอาจเป็นตัวอย่างทางเลือก เนื่องจากมีข้อดีคือ อยู่แยกจากส่วนที่เป็นของเหลวอื่น ๆ ของร่างกาย ทนต่อการเน่าสลายหรือการเปลี่ยนแปลงหลังการเสียชีวิต การเผาไหม้หรือการได้รับบาดเจ็บ มีส่วนประกอบที่เป็นเซลล์น้อยจึงสามารถนำมาเตรียมตัวอย่างได้ง่าย [1]

ปัจจุบันการตรวจวิเคราะห์หาสารเสพติดทางนิติพิษวิทยามีวิธีการมาตรฐาน คือ การตรวจด้วย Gas Chromatography mass spectrometry (GC-MS) และ Liquid Chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) ในปัจจุบันมีแนวโน้มในการใช้ Liquid Chromatography -tandem mass spectrometry มากกว่า เนื่องจากสามารถวิเคราะห์สารประกอบได้หลากหลาย ตรวจวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็ว มีความจำเพาะเจาะจงสูงและการเตรียมตัวอย่างเพียงเล็กน้อยก็สามารถนำไปวิเคราะห์ได้ [2]

ตัวอย่างที่จะนำมาวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS ในงานนิติพิษวิทยาต้องมีการเตรียมตัวอย่าง ซึ่งมีหลายวิธี เช่น Solid Phase Extraction (SPE), Liquid-Liquid Extraction (LLE) และ QuEChERS ซึ่ง SPE และ LLE มีข้อดีคือ ผลการสกัดออกมาสะอาด แต่มีข้อเสียคือใช้เวลาในการเตรียมนาน มีค่าใช้จ่ายสูงและใช้สารที่เป็นอันตรายในปริมาณมาก ในช่วง 2 - 3 ปีที่ผ่านมาได้มีการนำเอาเทคนิค QuEChERS มาพัฒนาเพื่อเตรียมตัวอย่างทางนิติพิษวิทยา โดย QuEChERS ย่อมาจาก Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged และ Safe ซึ่งเทคนิคนี้ใช้เวลาในการเตรียมน้อย ทำได้ง่าย ค่าใช้จ่ายถูก มีประสิทธิภาพ มีความทนทานและมีความปลอดภัย เนื่องจากใช้สารที่เป็นอันตรายในปริมาณน้อย จึงเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมน้อยด้วย [3]

ปัจจุบันได้มีงานวิจัยนำเทคนิคการเตรียมตัวอย่างด้วย QuEChERS มาใช้กับตัวอย่างเลือด แต่ยังไม่มีงานวิจัยที่นำเทคนิค QuEChERS มาใช้กับตัวอย่างน้ำวุ้นลูกตา ดังนั้น ผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์คัดกรองสารเสพติดในน้ำวุ้นลูกตาด้วยเทคนิคการสกัด QuEChERS และตรวจด้วย LC-MS/MS

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

1.2. คำถามงานวิจัย (Research Question)

เทคนิคการสกัด QuChERS ในการตรวจวิเคราะห์คัดกรองสารเสพติดในตัวอย่างน้ำวุ้นลูกตาด้วย LC-MS/MS มีความใช้ได้หรือไม่

1.3 วัตถุประสงค์ (Objectives)

เพื่อตรวจสอบความใช้ได้ของเทคนิคการเตรียมตัวอย่าง QuEChERS ในการวิเคราะห์คัดกรองสารเสพติดในตัวอย่างน้ำวุ้นลูกตาด้วย LC-MS/MS

1.4 สมมติฐาน (Hypothesis)

เทคนิคการสกัด QuChERS สามารถใช้ในการตรวจวิเคราะห์คัดกรองสารเสพติดในตัวอย่างน้ำวุ้นลูกตาด้วย LC-MS/MS ได้

1.5 กรอบแนวคิดงานวิจัย (Conceptual Framework)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

1.6 รูปแบบงานวิจัย (Research Design)

เป็นการวิจัยแบบทดลอง (Experimental analysis)

1.7 คำสำคัญที่ใช้ในงานวิจัย (Keywords)

1. QuEChERS extraction
2. LC-MS/MS
3. Method validation
4. Vitreous humor

1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ (Expected Benefits)

1. สามารถใช้เทคนิคการสกัด QuEChERS ในการเตรียมตัวอย่างน้ำวุ้นลูกตาได้
2. สามารถนำน้ำวุ้นลูกตามาใช้ในการตรวจวิเคราะห์คัดกรองสารเสพติดได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (Review of the related literatures)

การศึกษาวิจัยเรื่องความใช้ได้ของเทคนิคการสกัด QuEChERS ในการตรวจวิเคราะห์คัดกรองสารเสพติดในตัวอย่างน้ำวุ้นลูกตาและตรวจด้วย LC-MS/MS ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาค้นคว้าตำราและงานวิจัยที่มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องเพื่อใช้เป็นแนวทางในการกำหนดกรอบแนวคิดในการวิจัยให้สามารถดำเนินการศึกษาได้อย่างสมบูรณ์ยิ่งขึ้น โดยแบ่งประเด็นที่มีความเกี่ยวข้อง ดังต่อไปนี้

2.1.1 นิติพิษวิทยา (Forensic toxicology)

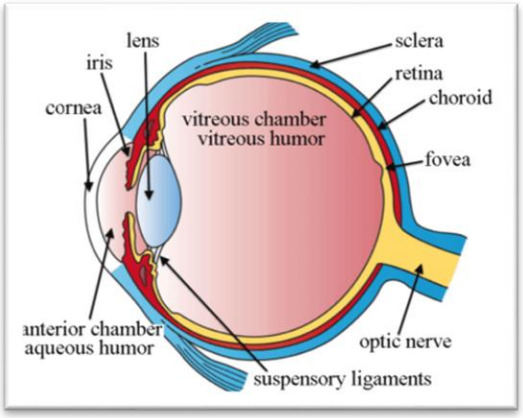
พิษวิทยาเป็นศาสตร์แขนงหนึ่งเกิดจากการรวมกันของ 3 สหวิชา คือ ชีวเคมี เภสัชวิทยาและการแพทย์โดยศึกษาเกี่ยวกับสารพิษและความเป็นพิษของสารพิษที่มีผลต่อสิ่งมีชีวิต [4]

นิติพิษวิทยาเป็นการประยุกต์พิษวิทยาเพื่อตอบปัญหาที่เกิดขึ้นในกระบวนการยุติธรรม เป็นการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติของสารพิษ กลไกการเกิดพิษ การเปลี่ยนรูปในร่างกาย วิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษ และการแปลผลการวิเคราะห์สารพิษ เพื่อใช้ประโยชน์ทางการแพทย์และเพื่อเป็นหลักฐานสำคัญในทางกฎหมาย [5] โดยวิธีการตรวจวิเคราะห์จะแบ่งเป็น 2 วิธีหลัก คือ วิธีการตรวจวิเคราะห์แบบคัดกรอง (Screening method) เป็นการทดสอบเบื้องต้นที่สามารถบอกถึงชนิดและปริมาณของยา สารพิษหรือสารเสพติดที่ได้รับเข้าไป วิธีที่สองคือวิธีการตรวจยืนยัน (Confirmatory method) เป็นการทดสอบเพื่อยืนยันผลการตรวจคัดกรองเพื่อยืนยันชนิดและปริมาณของยา สารพิษหรือสารเสพติด โดยตัวอย่างที่มีการส่งตรวจจากการชันสูตรศพทางนิติเวชศาสตร์มีการเก็บวัตถุพยานทางชีวภาพ ได้แก่ เลือด ปัสสาวะ ของเหลวในกระเพาะอาหาร น้ำวุ้นลูกตา และเนื้อเยื่อต่าง ๆ [6]

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.1.2 น้ำวุ้นลูกตา (Vitreous Humor)

เป็นส่วนประกอบที่อยู่ภายในช่องตาส่วนหลัง (อยู่หน้าต่อจอประสาทตาและแนบติดกับผิวของจอประสาทตา) มีลักษณะเป็นของเหลวใส ไม่มีสี ไม่มีตะกอน มีความหนืดคล้ายเจลหรือไข่ขาว โดยมีน้ำเป็นส่วนประกอบหลักถึง 98-99% [7] ทำหน้าที่เป็นตัวกลางให้แสงผ่าน ช่วยพยุงลูกตาให้คงรูปเป็นทรงกลม และเป็นแหล่งอาหารแก่แก้วตา จอประสาทตา โดยมีปริมาตรน้ำวุ้นลูกตา 2-3 mL ต่อข้าง [8] ดังแสดงในภาพที่ 1 น้ำวุ้นลูกตามีประโยชน์ในการตรวจสารชีวเคมีหลายชนิดเพื่อการวินิจฉัยภาวะต่าง ๆ ได้แก่ การตรวจ glucose และ ketone เพื่อช่วยวินิจฉัยการเสียชีวิตจากภาวะแทรกซ้อนของโรคเบาหวาน [7] รวมถึงมีประโยชน์ในการตรวจวิเคราะห์ยา สารพิษและสารเสพติดด้วย [9]



ภาพที่ 1แสดงบริเวณที่อยู่ของน้ำวุ้นลูกตา

(https://en.wikipedia.org/wiki/Vitreous_body, 16 พฤษภาคม 2562)

ในงานนิติพิษวิทยานิยมนำน้ำวุ้นลูกตามาใช้เป็นตัวอย่างทางเลือกมากกว่าตัวอย่างอื่น ๆ เนื่องจาก น้ำวุ้นลูกตามีแนวโน้มในการเกิดการเปลี่ยนแปลงหลังการเสียชีวิตต่ำ[10] อยู่แยกจากส่วนที่เป็นของเหลวอื่น ๆ ของร่างกาย ทนต่อการเน่าสลายจึงลดโอกาสการปนเปื้อนจากแบคทีเรียหรือสารเคมีต่าง ๆ [11] ทนต่อการเผาไหม้หรือการได้รับบาดเจ็บและมีส่วนประกอบที่เป็นเซลล์น้อยจึงสามารถนำมาเตรียมตัวอย่างได้ง่าย [1]

2.1.3 การศึกษาวิจัยยาและสารเสพติดในน้ำวุ้นลูกตา

ในปี ค.ศ.2010 Anna Pelander และคณะ ได้ทำการศึกษานำน้ำวุ้นลูกตามาใช้เป็นตัวอย่างทางเลือกสำหรับการตรวจคัดกรองสารเสพติดในผู้เสียชีวิตและวิเคราะห์ด้วย LC-TOF-MS โดยได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างปัสสาวะและน้ำวุ้นลูกตาที่เก็บจากศพทั้งหมด 50 ราย พบว่าสามารถตรวจหาสารเสพติดและเมตาบอไลต์ของสารเสพติดในน้ำวุ้นลูกตาได้น้อยกว่าในปัสสาวะ คือ 69 และ 97 ชนิดตามลำดับ แต่มีข้อเสนอแนะว่าในน้ำวุ้นลูกตามีปัจจัยรบกวนในการวิเคราะห์น้อยกว่าในปัสสาวะ ซึ่งอาจจะสามารถนำน้ำวุ้นลูกตามาใช้ในการตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพได้ [1]

Purificacion Fernandez และคณะ ศึกษาการสกัดสารเสพติดกลุ่มมอร์ฟีน โคเคน เมทาโดน รวมถึงเมตาบอไลต์ในน้ำวุ้นลูกตาด้วยเทคนิค SPE และตรวจวิเคราะห์ด้วย HPLC / photodiode array detector ผลการศึกษาสามารถใช้วิธีการดังกล่าวตรวจวิเคราะห์สารเสพติดทุกตัวได้โดยมีค่า LOD น้อยกว่า30 ng/mL [12]

ในปี 2016 Beauty Arora และคณะ ทำการพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของเทคนิคในการตรวจหาและวัดปริมาณสารที่มีความเกี่ยวข้องทางนิติเวชศาสตร์ทั้งหมด 24 ชนิดในตัวอย่างน้ำวุ้นลูกตา, เลือด และ plasma และวิเคราะห์ด้วย ESI-LC-MS/MS โดยผู้วิจัยทำการพัฒนาเทคนิคการเตรียมตัวอย่างแบบ Liquid-liquid extraction (LLE) ให้มีขั้นตอนที่ง่ายและใช้ตัวอย่างเพียง 20 µL เพื่อให้เหมาะสมกับปริมาตรตัวอย่างทางนิติเวชศาสตร์ที่มีอย่างจำกัด แล้วนำไปใช้ในการเตรียมตัวอย่างทุกชนิด พบว่า เทคนิคที่ทำการพัฒนาสามารถนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์คัดกรองและ

สามารถวัดปริมาณสารทั้ง 24 ชนิดที่ได้เป็นอย่างดี รวมถึงประสบความสำเร็จในการนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์คัดกรองตัวอย่างจริงที่เก็บจากผู้เสียชีวิตทั้ง 40 รายได้เช่นกัน [13]

ในปี ค.ศ. 2016 Elham Bazmi และคณะ ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณของ benzodiazepines ในน้ำวุ้นลูกตาทั้งหมด 21 ราย โดยนำมาเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิค Liquid-Liquid extraction (LLE) และวิเคราะห์ด้วย HPLC / photodiode array detector โดยได้วิเคราะห์หาสารกลุ่ม benzodiazepines ที่มีความสำคัญทางนิติเวชศาสตร์ 4 ชนิด ได้แก่ flurazepam, lorazepam, alprazolam และ diazepam พบว่า เส้นปรับเทียบ (Calibration curve) ของสารแต่ละชนิดอยู่ในช่วง 30 - 3,000 ng/mL ด้วย correlation coefficient มากกว่า 0.99 และจากการทดสอบความใช้ได้ของการศึกษาค่าทั้งหมดอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ [14]

2.1.4 การเตรียมตัวอย่าง (Sample Preparation)

การเตรียมตัวอย่างเป็นขั้นตอนสำคัญในเทคนิคการตรวจวิเคราะห์[15] เนื่องจากตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์จำนวนมากไม่สามารถนำเข้าสู่เครื่องตรวจวิเคราะห์ได้โดยตรงหรือเมื่อทำการวิเคราะห์แล้วให้ผลลัพธ์การตรวจวิเคราะห์ที่ไม่ดี โดยปัญหาที่เกิดขึ้นคือ มีสารรบกวนในตัวอย่างและสารที่ต้องการวิเคราะห์อาจมีคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีไม่เหมาะสม ทำให้มีความไวต่ำหรือไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ ดังนั้น วัตถุประสงค์ของการเตรียมตัวอย่าง คือ เพื่อกำจัดสิ่งรบกวนและเพิ่มความไวของการวิเคราะห์ [16]

การเตรียมตัวอย่างจึงเป็นการกำจัดสิ่งรบกวนออกจากสารที่ต้องการวิเคราะห์และยังเป็นการเพิ่มความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ ซึ่งการเตรียมตัวอย่างทางนิติพิษวิทยา นิยมใช้ 2 เทคนิค คือ Liquid-liquid extraction (LLE) เป็นเทคนิคการแยกสารที่ใช้คุณสมบัติการละลายและการกระจายของสารในของเหลว 2 ชนิดที่แตกต่างกันออกจากกัน มีข้อเสียคือ มีการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นอันตรายต่อผู้ปฏิบัติงานในปริมาตรสูงและต้องทำการสกัดหลายครั้งการสกัดจึงจะสมบูรณ์ ทำให้เกิดการปนเปื้อนได้ง่าย วิธีนี้จึงเป็นวิธีที่ใช้เวลานานและเป็นอันตรายต่อผู้ใช้งาน วิธีที่สองคือ Solid-phase extraction (SPE) เป็นการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็งที่สามารถทำได้ภายในครั้งเดียว จึงช่วยลดการปนเปื้อนระหว่างการเตรียมตัวอย่างได้ แต่มีข้อเสียคือ หลอด cartridge ที่ใช้ในการสกัดมีราคาค่อนข้างแพงและไม่สามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้ [17] และปัจจุบันได้นำเอาเทคนิคการเตรียมตัวอย่าง QuEChERS มาใช้ในงานด้านนิติพิษวิทยามากขึ้น

QuEChERS เป็นเทคนิคที่เกิดจากการรวมกันของคำ 6 คำ คือ Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged และ Safe เป็นเทคนิคการสกัดที่สามารถทำได้ง่ายและรวดเร็ว ราคาถูก มีประสิทธิภาพ มีความทนทานและมีความปลอดภัยต่อผู้ใช้งาน ขั้นตอนการสกัดประกอบไปด้วย 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกคือ การสกัดแยกด้วยตัวทำละลายโดยมีการใส่เกลือบางตัวเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการสกัด

ในขั้นตอนนี้ตัวทำละลายที่นิยมใช้คือ acetonitrile, acetone หรือ ethyl acetate [18] โดยตัวทำละลายแต่ละชนิดก็มีข้อดีและข้อเสียที่แตกต่างกัน เช่น Ethyl acetate เหมาะสำหรับแยกสารที่ไม่มีขั้วและมีขั้วปานกลาง มีความสามารถละลายในน้ำได้เล็กน้อยและสามารถรวมตัวกับไขมันและ wax ได้ [19] Acetone สามารถสกัดสารที่มีขั้วมากได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่อาจจะต้องใส่สารที่ไม่มีขั้วอื่น ๆ ลงไปด้วยเพื่อให้เกิดการแยกชั้นกับน้ำอย่างชัดเจน ซึ่งอาจทำให้สารที่ต้องการวิเคราะห์เจือจางลง [3, 19] ส่วน Acetonitrile เหมาะสำหรับการสกัดสารประกอบที่ไม่มีขั้ว ขั้วปานกลางหรือมีขั้วก็ได้ [19] แต่สกัดสารจำพวกไขมันได้น้อย และแยกชั้นกับน้ำได้ดีทำให้สามารถกำจัดน้ำที่ตกค้างในชั้นตัวทำละลายด้วย Mg_2SO_4 ได้ดีขึ้น [3, 19]

ในขั้นตอนการสกัดที่มีการใส่เกลือ Mg_2SO_4 มีวัตถุประสงค์เพื่อให้เกิด salting-out และเกิดการแยกชั้นระหว่างน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ [3, 18] และยังช่วยดูดซับน้ำที่ยังคงเหลืออยู่ในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ ส่วนการเติม NaCl เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดสารประกอบที่มีขั้ว โดยสัดส่วนของ Mg_2SO_4 ต่อ NaCl ที่นิยมใช้เพื่อแยกสารและปรับความเป็นขั้วของสารคือ 4:1 [20-23] ในการเติม Mg_2SO_4 นั้นทำให้เกิดปฏิกิริยาคายความร้อน หากตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์สามารถสลายตัวด้วยความร้อนอาจจะต้องทำการสกัดที่อุณหภูมิต่ำเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัด [3] นอกจากนี้การใช้ Mg_2SO_4 ปริมาณมากอาจจะทำให้เกิดการรวมตัวเป็นก้อนทำให้รบกวนการสกัดได้

ในขั้นตอนที่สองของเทคนิค QuEChERS คือ การสกัดด้วยเทคนิค dispersive solid-phase extraction (d-SPE) โดยนำส่วนบนของตัวอย่างที่ผ่านการสกัดในขั้นตอนแรกใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยง (centrifuge tube) ที่มีตัวดูดซับ SPE เช่น Primary-secondary amines (PSA) ผสมกันด้วยการเขย่าหรือ vortex เพื่อทำให้สาร SPE ที่กระจายตัวอยู่ในของเหลวดูดซับสิ่งที่ไม่ต้องการ ทำให้ตัวอย่างที่ได้มีความสะอาดมากขึ้น จากนั้นสามารถทำการแยกออกโดยการปั่นเหวี่ยงหรือการกรองและสามารถนำส่วนบนของการสกัด (supernatant) ไปทำการวิเคราะห์ได้โดยตรง [18]

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบเทคนิคการเตรียมตัวอย่างทั้ง 3 วิธี

เทคนิค	SPE	LLE	QuECHERS
ปริมาตรตัวอย่าง (mL)	1	1	0.1
ปริมาตร solvent (mL)	> 10	> 10	1
เวลาที่ใช้ในการสกัด (hr)	2 - 3	3 - 4	0.5
จำนวนครั้งในการสกัด	1	>1	1
Recovery (%)	70 - 80	60 - 50	60 - 50

ดัดแปลงจาก [24],[25]

2.1.5 Modified QuEChERS Technique

การสกัดด้วยเทคนิค QuEChERS ได้รับความนิยมและมีการนำไปประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวาง โดยมีการศึกษาวิจัยปรับปรุงเทคนิค QuEChERS ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นทั้งในด้านความสามารถในการสกัด การลดขั้นตอน และการลดระยะเวลา

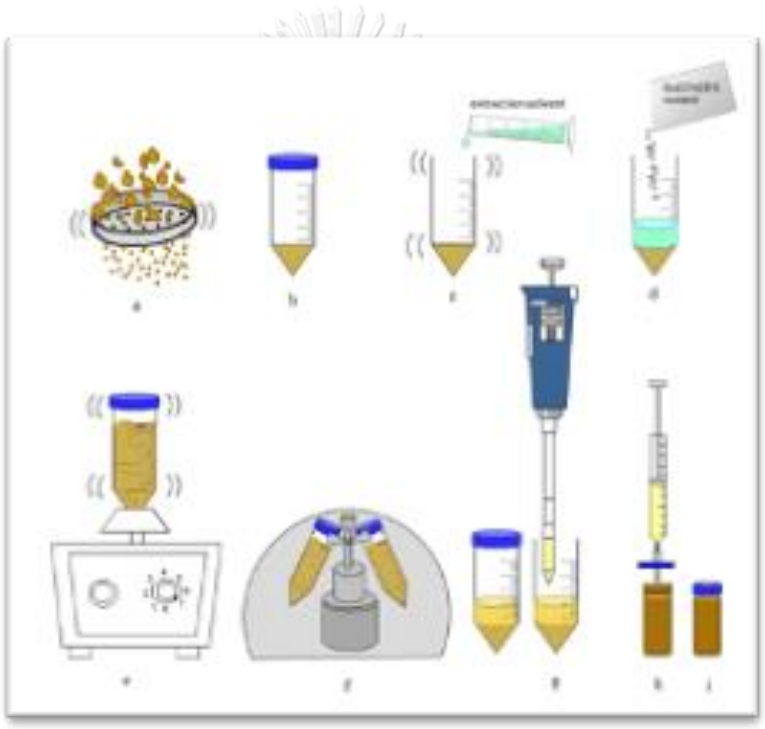
ในปี 2012 Kiyotaka Usui และคณะ ได้ทำการศึกษาและดัดแปลงเทคนิคการสกัด QuEChERS เพื่อใช้ในการเตรียมตัวอย่างเลือดและตรวจวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS โดยได้แบ่งขั้นตอนการสกัดออกเป็นสองขั้นตอนและได้นำเทคนิคที่ทำการดัดแปลงแล้วไปใช้กับตัวอย่างเลือดทางนิติเวชศาสตร์ พบว่าในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างด้วยชุดสกัด QuEChERS สามารถเตรียมตัวอย่างได้ภายในเวลา 7 นาที และตรวจหาสารเสพติดที่มีความสำคัญทางนิติเวชศาสตร์ทั้งหมด 90 ชนิดได้เป็นอย่างดี อีกทั้งเทคนิคนี้ไม่เป็นอันตรายต่อผู้ใช้งานและเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ [26]

ในปี 2014 Kiyotaka Usui และคณะ ปรับปรุงเทคนิค QuEChERS ในการตรวจวิเคราะห์ยากลุ่ม benzodiazepines จากตับ โดยเทคนิคนี้ลดขั้นตอนที่หนึ่ง โดยใส่ผงสกัดสำเร็จรูป (Mg_2SO_4 + sodium acetate) ลงในตัวอย่างผสมกันแล้วปั่นแยก และขั้นตอนที่สองนำส่วนบนใส่ตัวดูดซับของแข็ง (PSA+C18) และเกลือ Mg_2SO_4 ลงไปผสมให้เข้ากันและนำไปปั่นแยก นำส่วนบนไปวิเคราะห์ต่อด้วย LC-MS/MS [27]

ในปี 2016 Dulaurent Sylvain และคณะ ได้ศึกษาเทคนิค Modified QuEChERS มาใช้ในการสกัดตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม opiate, amphetamine และ cocaine metabolites โดยเทคนิค Modified QuEChERS ประกอบด้วยขั้นตอนที่ 1 สกัดเลือดด้วย acetonitrile โดยการผสมเข้ากันด้วย vortex หลังจากนั้นในขั้นตอนที่สองเติมเกลือ QuEChERS ลงไปผสมแล้วปั่นแยก นำส่วนบนไปตรวจวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS ซึ่งประสบผลสำเร็จในการสกัดและตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคดังกล่าว โดยมีการนำไปประยุกต์ใช้ในการปฏิบัติงานให้บริการจริงและประสบผลสำเร็จในการตรวจวิเคราะห์ [28]

ในปี 2017 Sayed Majid Salami และคณะ ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบเทคนิค Modified QuEChERS กับการสกัดด้วยวิธี LLE ในการตรวจวิเคราะห์เมทาโดนจากปัสสาวะผู้เสียชีวิตด้วย GC-MS พบว่า เทคนิค Modified QuEChERS ให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่ดีกว่าเทคนิค LLE ทั้งในด้าน %recovery, LOD และ LOQ นอกจากนี้ยังใช้ระยะเวลาและสารเคมีที่เกี่ยวข้องน้อยกว่าเทคนิค LLE โดย Modified QuEChERS โดยในการศึกษาครั้งนี้ ขั้นตอนแรกเป็นการปรับสภาพตัวอย่างปัสสาวะด้วย HCl เพื่อกำจัดน้ำตาลที่อาจมีอยู่ในตัวอย่างออก หลังจากนั้นปรับสภาพตัวอย่างให้เป็นเบสด้วยสารละลาย ammonia แล้วจึงเข้าสู่ขั้นตอนการสกัดด้วยเทคนิค Modified QuEChERS โดยขั้นตอนแรกเติมตัวทำละลาย ethyl acetate พร้อมกับเกลือ Mg_2SO_4 และ NaCl ผสมให้เข้ากันและปั่นแยก นำส่วนบนไประเหยแห้งก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย GC-MS [29]

ในปี ค.ศ. 2018 Michal P. Dybowski และคณะ ได้นำเทคนิค QuEChERS มาพัฒนาและประยุกต์ใช้กับตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจหาสารเสพติดในพืชกัญชา คือ THC และเมตาบอไลต์ของ THC คือ 11-OH-THC และ 11-COOH-THC และวิเคราะห์ด้วย GC-MS/MS โดยหลังจากที่ทำการพัฒนาเทคนิคแล้ว ผู้วิจัยได้นำเทคนิคไปใช้กับตัวอย่างเลือดจริงที่เก็บจากผู้ต้องสงสัยที่มีการใช้สารเสพติดขณะขับขี่ยานพาหนะทั้งหมด 30 ราย พบว่าการทดสอบความใช้ได้ของเทคนิคที่ทำการพัฒนาอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ทั้งหมดและนำเทคนิคไปใช้กับงานประจำและกับตัวอย่างเลือดจากผู้ที่ยังมีชีวิตหรือเสียชีวิตเพื่อวิเคราะห์หา THC ได้ [30]



ภาพที่ 2 แสดงขั้นตอนการสกัดด้วยเทคนิค QuEChERS

a.บดสารที่ต้องการวิเคราะห์ b.ทำให้สารเป็นเนื้อเดียวกัน c. ใส่สารละลายอินทรีย์เพื่อแยกชั้น d. ใส่ผงสกัด QuEChERS e. vortex ให้เข้ากัน f. centrifuge g. เก็บส่วน supernatant h. ใส่ supernatant ลงในขวดvial i. ปิดฝาขวด vial (https://www.researchgate.net/figure/Steps-in-QuEChERS-extraction-a-sieving-b-teflon-tube-with-soil-sample-c-addition-of_fig1_279221361,26 มิถุนายน2562)

2.1.6 Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

ภาพที่ 3 Liquid chromatography-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS)
(https://www.shimadzu.de/new-lcms-8060 , 16 พฤษภาคม)

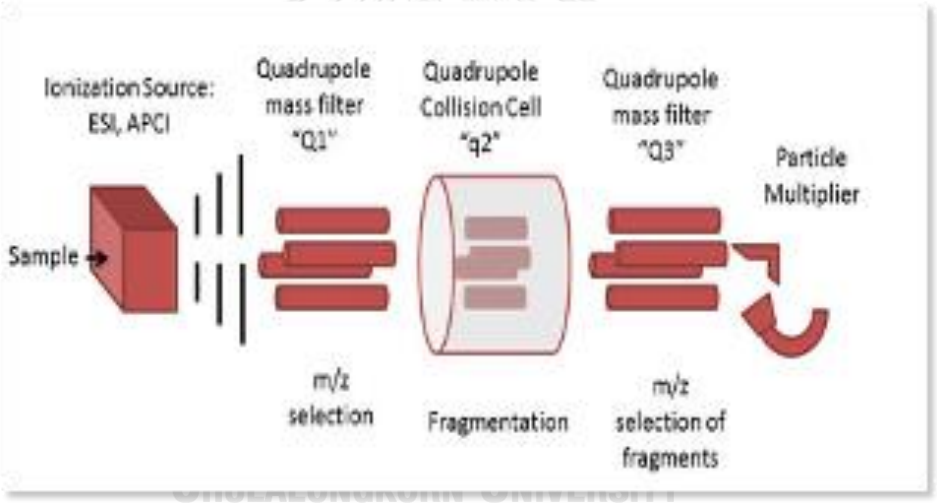
2.1.6.1 High performance liquid chromatography (HPLC) โครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) เป็นเทคนิคโครมาโตกราฟีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในห้องปฏิบัติการ[31] การวิเคราะห์ด้วย HPLC ได้รับการพัฒนาขึ้นสำหรับการใช้งานด้านเภสัชกรรม เคมี อาหาร เครื่องสำอางและสิ่งแวดล้อมโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อแยกสารในของผสมออกจากกัน ดังนั้น จึงสามารถระบุชนิดและสามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณของสารที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ได้ หลักการแยกสารนั้นจะขึ้นอยู่กับคุณสมบัติสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่มีการกระจายตัวที่ต่างกันในเฟสคงที่ (stationary phase) และเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) สารจึงถูกพาไปกับเฟสเคลื่อนที่ซึ่งเคลื่อนที่ผ่านเฟสคงที่ไปถึงเครื่องตรวจวัดในเวลาที่แตกต่างกันไป โดยทั่วไประบบ HPLC มีส่วนประกอบที่สำคัญ คือ เฟสเคลื่อนที่ ปั๊ม หัวฉีด คอลัมน์ เฟสคงที่ และเครื่องตรวจวัด [32, 33]

2.1.6.2 Mobile phase ของเหลวในเฟสเคลื่อนที่อาจจะเป็นตัวทำละลายมีขั้วหรือไม่มีขั้วขึ้นกับสารที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ ซึ่งในการวิเคราะห์ด้วย HPLC จะต้องเลือกเฟสเคลื่อนที่ให้เหมาะกับตัวอย่างที่ต้องการตรวจวิเคราะห์และอาจจะต้องมีการปรับสัดส่วนเฟสเคลื่อนที่ในแต่ละช่วงเวลา (gradient) เพื่อให้การแยกสารมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น และตัวทำละลายของเหลวในเฟสเคลื่อนที่ทั้งหมดจะต้องผ่านการกรองด้วยแผ่นกรองก่อนเข้าสู่ระบบ HPLC เพื่อที่จะกำจัดสารขนาดเล็กหรือฟองอากาศออกจากระบบ ของเหลวที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ส่วนใหญ่เป็นการผสมของ acetonitrile, volatile aqueous solution และน้ำ [32, 33]

2.1.6.3 Stationary phase เป็นสารที่บรรจุหรือเคลือบอยู่ภายในคอลัมน์ ที่มีความยาวคอลัมน์ตั้งแต่ 10 - 35 ซม. และมีเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 1-10 มม. โดยเฟสคงที่มีหลายประเภท เช่น เฟสแบบย้อนกลับ, เฟสปกติ, การแยกขนาด และการแลกเปลี่ยนไอออน เป็นต้น เฟสคงที่ซึ่งมี

การใช้บ่อยในห้องปฏิบัติการนิติพิษวิทยาเป็นแบบระบบเฟสย้อนกลับ โดยมักเลือกใช้ซิลิกาซึ่งมีการปรับเปลี่ยนทางเคมี (ไม่มีขั้ว) โดยทำให้มีพันธะโควาเลนต์กับ hydrophobic alkyl chains ของ C8 (octyl group) หรือ C18 (octadecyl group)

2.1.6.4 Mass spectrometer (MS) เป็นเครื่องมือตรวจวัดมวลต่อประจุของสาร โดยการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้ MS ชนิด triple quadrupole เชื่อมต่อกัน 3 ตัว โดยที่แต่ละ quadrupole จะมีแท่งโลหะ 4 แท่งวางตัวขนานกัน มีการใส่กระแสไฟฟ้าและคลื่นวิทยุที่สามารถปรับค่าได้เข้าไป[34] โดยที่ quadrupole (Q1) ตัวแรกเป็นตัวเลือก ion ตามค่าที่กำหนดไว้และ quadrupole (Q2) ตัวที่สองเป็น Collision-induced dissociation (CID) ทำหน้าที่ให้ ion ที่ถูกเลือกจาก Q1 เกิดการแตกตัว (fragmentation) และ quadrupole (Q3) ตัวที่สาม ทำหน้าที่วัดมวลต่อประจุของ ion ที่เกิดขึ้นจาก Q2 โดยที่ไอออนอื่น ๆ ที่มีอัตราส่วนมวลต่อประจุนอกเหนือจากที่เลือกไว้จะถูกดันไปชนกับแท่งโลหะและสลายไป[35]



ภาพที่ 4 แสดงการทำงานของ mass spectrometer ชนิด Triple quadrupole เทคนิค MRM (Multiple Reaction Monitoring)

(https://en.wikipedia.org/wiki/Triple_quadrupole_mass_spectrometer)

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

การวิจัยเรื่องการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์คัดกรองสารเสพติดในน้ำวุ้นลูกตาด้วยเทคนิคการสกัด QuEChERS และตรวจด้วย LC-MS/MS เป็นการวิจัยแบบ experimental analysis โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความใช้ได้ของเทคนิคการเตรียมตัวอย่าง QuEChERS ในการวิเคราะห์คัดครองสารเสพติดในน้ำวุ้นลูกตาด้วย LC-MS/MS เพื่อที่จะสามารถนำเทคนิคดังกล่าวไปใช้ในการเตรียมตัวอย่าง รวมถึงสามารถนำตัวอย่างน้ำวุ้นลูกตามาใช้ในการตรวจวิเคราะห์คัดกรองสารเสพติดได้

3.1 ประชากรที่ศึกษาและกลุ่มตัวอย่าง

3.1.1 ประชากร

น้ำวุ้นลูกตาของผู้ที่เสียชีวิต

3.1.2 กลุ่มตัวอย่าง

น้ำวุ้นลูกตาของผู้เสียชีวิตที่ถูกตรวจวิเคราะห์โดยหน่วยนิติพิษวิทยา ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

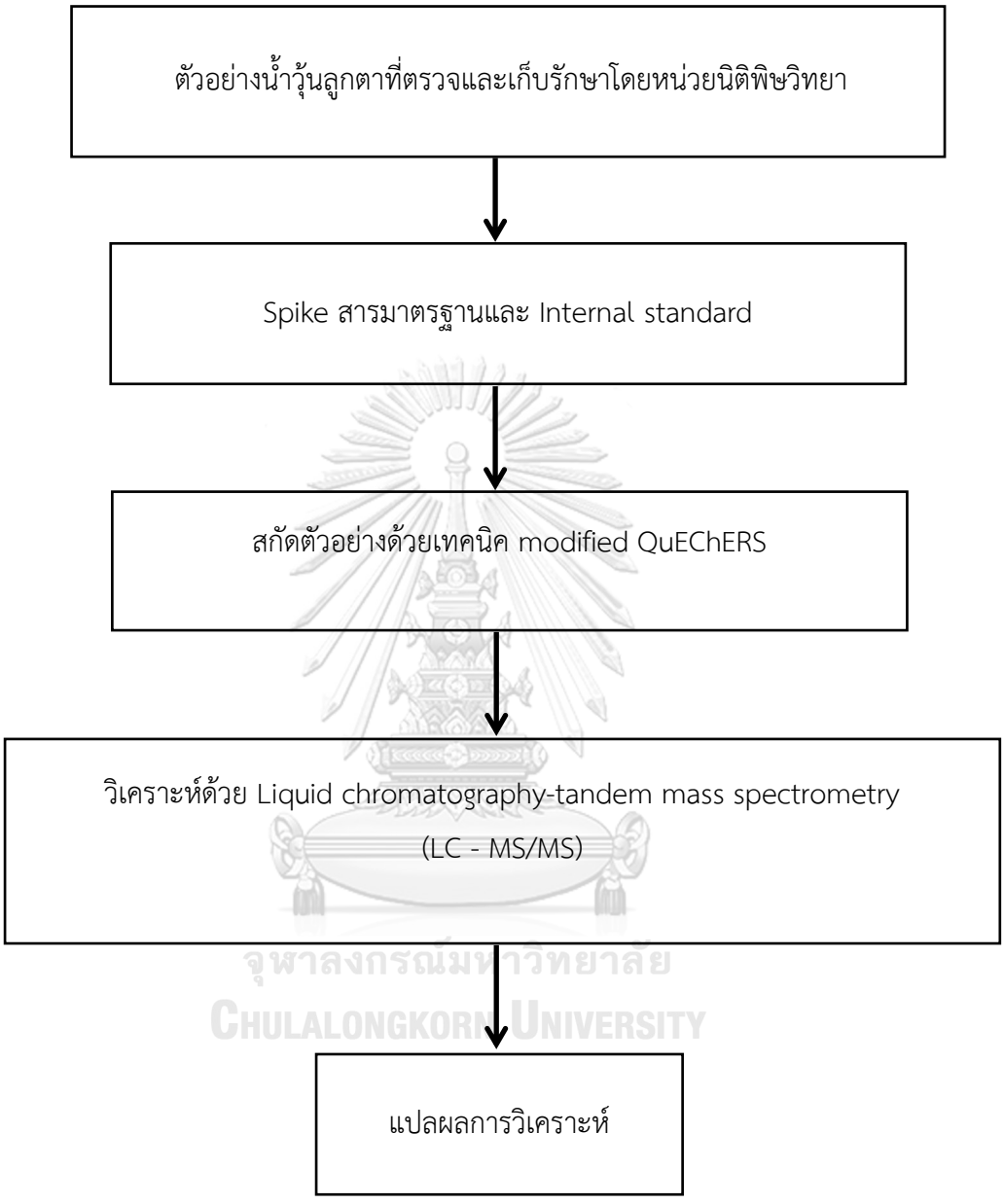
3.2 เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัคร (Criteria)

ใช้ตัวอย่างน้ำวุ้นลูกตาซึ่งผ่านการตรวจจากหน่วยนิติพิษวิทยา จึงไม่มีอาสาสมัคร

3.3 ขนาดของประชากร (Sample size)

เนื่องจากเป็นการวิจัยเชิงการทดลอง การทดสอบความใช้ได้จะมีการทดสอบ 5 ซ้ำ [36] โดยใช้ปริมาตรตัวอย่างน้ำวุ้นลูกตาทั้งหมด 20 mL.

3.4 วิธีการดำเนินงานวิจัย



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.4.1 สารที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

สารที่ใช้ในงานวิจัย ผลิตโดย Cerilliant® Analytical Reference Standard และทำการสั่งซื้อจากบริษัท Chemical Express จำกัด

1. Internal standard

6-Acethyl Morphine-D3, Benzoylecgonine-D3, Cocaethylene-D3, EME-D3,Cocaine-D3, Diazepam-D5, Imipramine-D3, Methamphetamine-D5, Norpseudoephedrine - D3, Oxycodone-D3, Pseudoephedrine-D3, MDMA-D5, Zaleplon-D4, Zopiclone-D4

2. สารมาตรฐานที่ต้องการศึกษา (ดังแสดงในตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 แสดงสารมาตรฐานที่ต้องการศึกษา

6-Acetyl Morphine	Pseudoephedrine
Benzoylecgonine	3,4-Methylenedioxypyrovalerone
Cocaethylene	Cathinone
Cocaine	Fentanyl
EME (Ecgonine Methyl Ester)	LSD
Clobazam	MDEA
Dextromethorphan	Mephedrone
Imipramine	MDMA
Trimipramine	Methcathinone
Methamphetamine	Sibutramine
Norpseudoephedrine	Zolpidem
Oxycodone	Zopiclone

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3. สารที่ใช้ในการศึกษา selectivity

- caffeine, acetaminophen, nicotine, estazepam, triazolam

4. สารเคมีอื่น ๆ ที่ใช้ในการสกัดและใช้กับ LC-MS/MS

- Acetronitrile (HPLC grade): Merck millipore®
- Formic acid (HPLC grade): Merck millipore®
- 10 mM Ammonium formate (Crystalline/Certified ACS): Fisher chemical®
- ผงสกัด QuEChERS: UCT®

ประกอบด้วย Mg_2SO_4 4000 mg. และ NaCl 1000 mg.

3.4.2 ตัวอย่างน้ำวุ้นลูกตา ใช้น้ำวุ้นลูกตาที่ผ่านการตรวจวิเคราะห์แล้วว่าไม่มีสารเสพติดเป้าหมาย โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C และได้รับการอนุมัติการให้นำมาศึกษาวิจัยจากมติที่ประชุมคณะกรรมการบริการภาควิชานิติเวชศาสตร์และหัวหน้าภาควิชานิติเวชศาสตร์ นำตัวอย่างมา spike สารที่ต้องการทดสอบ 5 ความเข้มข้น คือ 5, 50, 100, 200 และ 500 ng/mL และการศึกษาครั้งนี้ใช้ Internal standard ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 200 ng/mL สกัดและนำไปวิเคราะห์

3.4.3 เตรียมตัวอย่างเลือดเพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสกัดด้วยเทคนิค modified QuEChERS และตรวจวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS โดยการ spike สารที่ต้องการทดสอบ 3 ความเข้มข้น คือ 5, 50 และ 500 ng/mL สกัดและนำไปวิเคราะห์

การเลือกระดับความเข้มข้นในการศึกษาครั้งนี้อาศัยผลการศึกษาของ Purificacion Fernandez และคณะ และการศึกษาของ Fabien Bevalot และคณะ ซึ่งทั้งสองการศึกษาได้ตรวจวิเคราะห์ยาและสารเสพติดในน้ำวุ้นลูกตาโดยมีรายงานระดับค่าที่ตรวจวัดได้ [12, 37] ร่วมกับข้อมูลซึ่งผู้วิจัยได้ทดลองศึกษานำร่องที่สามารถตรวจวิเคราะห์สารทุกตัวได้ในระดับ 5 ng/mL

3.4.4 เทคนิคการสกัด modified QuEChERS ในการศึกษาครั้งนี้พัฒนาจากงานวิจัยของ Dulaurent และคณะ [28] โดยมีรายละเอียด ดังนี้

1.นำตัวอย่างน้ำวุ้นลูกตาปริมาตร 100 µL ซึ่ง spike สารที่ต้องการวิจัยและ Internal standard แล้วใส่ในหลอด Eppendorf® ขนาด 1 mL

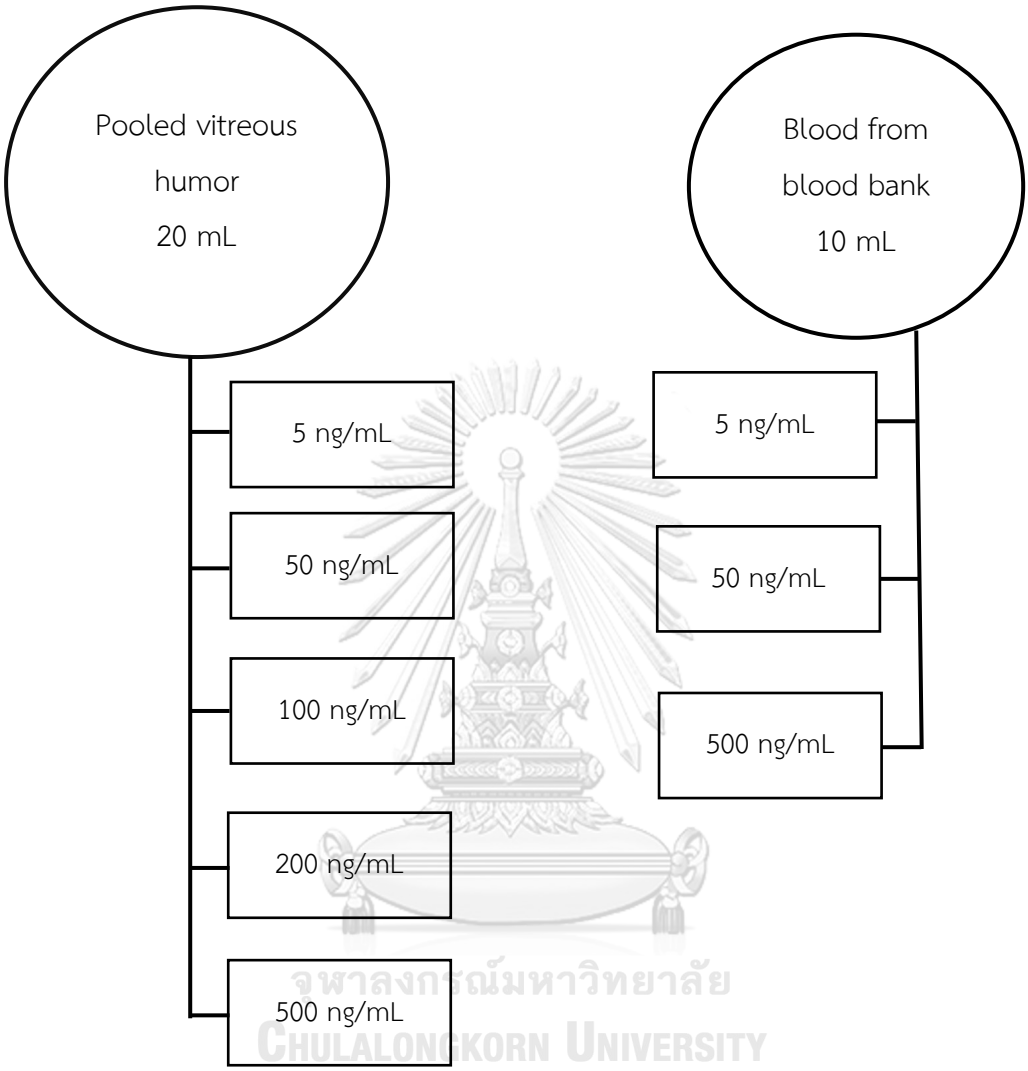
2.ใส่ acetonitrile ซึ่งมีอุณหภูมิ -20°C ลงไปให้ได้ปริมาตรรวม 320 µL และ vortex ให้เข้ากัน

3.ใส่ผงสกัด QuEChERS (UCT®) ปริมาณ 80 mg ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง shaker ตั้งค่า 5,000 รอบ เป็นเวลา 5 นาที

4.ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ตั้งค่า 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วน supernatant 50 µL ใส่หลอด vial ขนาด 1 mL และเติม mobile phase ที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS ปริมาตร 150 µL (โดยมีอัตราส่วน mobile phase A:B, 1:3)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

แผนผังแสดงขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อทำการ Validation



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

- pooled vitreous humor : ผ่านการตรวจวิเคราะห์แล้วว่าไม่มีสารเสพติดเป้าหมายโดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C แบ่งตัวอย่างออกเป็น 6 ขวด ขวดละ 3 mL โดย spike สารมาตรฐานที่ต้องการศึกษาให้มีความเข้มข้น 0, 5, 20, 50, 100 และ 200 ng/mL โดยทุกขวดเติม internal standard ที่มีความใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน

- blood from blood blank : ผ่านการตรวจวิเคราะห์แล้วว่าไม่มีสารเสพติดเป้าหมายเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C นำมาแบ่งออกเป็น 3 ขวด ขวดละ 3 mL spike สารมาตรฐานที่ต้องการศึกษาให้มีความเข้มข้น 5, 50 และ 200 ng/mL โดยทุกขวดเติม internal standard ที่มีความใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน

3.4.4 การทดสอบความใช้ได้ของวิธีการ (Method validation)

การศึกษาครั้งนี้เลือกใช้ method validation ตามการศึกษาวิจัยของ Sylvain Dulaurent และคณะ [36] ประกอบไปด้วย

1.) Precision (ความแม่นยำ) วัดความสามารถของวิธีการวิเคราะห์ที่ให้ผลการวิเคราะห์ที่ค่าใกล้เคียงกันเมื่อทำการทดสอบซ้ำกันหลาย ๆ ครั้ง โดยการศึกษาครั้งนี้เลือกศึกษา intraday precision เพื่อให้สอดคล้องกับการปฏิบัติงานจริง ที่ทำการวิเคราะห์ batch ต่อ batch

- โดยจะทำการวิเคราะห์ตัวอย่างความเข้มข้น 5, 50 และ 500 ng/mL ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำภายในวันเดียวกัน จากนั้นคำนวณร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

2.) Accuracy (ความเที่ยงตรง) ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์แสดงความใกล้เคียงกันระหว่างค่าที่ได้จากการวิเคราะห์นั้นเปรียบเทียบกับค่าจริงหรือค่าอ้างอิงซึ่งเป็นที่ยอมรับ

- โดยจะทำการวิเคราะห์ตัวอย่างความเข้มข้น 5, 50 และ 500 ng/mL ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ เปรียบเทียบกับค่าที่ตรวจวิเคราะห์สารมาตรฐานที่ไม่ผ่านการสกัดและฉีดเข้าเครื่องโดยตรงและคำนวณร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

3.) Recovery (ค่าคืนกลับ) การคำนวณค่าคืนกลับของการสกัด เพื่อแสดงถึงประสิทธิภาพในการสกัด

- โดยจะทำการวิเคราะห์ตัวอย่างความเข้มข้น 5, 50 และ 500 ng/mL ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ แล้วเปรียบเทียบค่าที่ได้จากการ spike สารที่สนใจก่อนการสกัดเทียบกับการ spike สารหลังการสกัด จากนั้นคำนวณร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

4.) Calibration curve (เส้นปรับเทียบ) ประเมินความเป็นเส้นตรงระหว่างค่าสัญญาณจากการวิเคราะห์กับความเข้มข้นของสาร

- โดยจะทำการวิเคราะห์ตัวอย่างความเข้มข้น 5, 50, 100, 200 และ 500 ng/mL ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ และคำนวณค่าจาก Correlation coefficient ของregression line

5.) Limit of detection (LOD) (ค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้)

คำนวณโดยใช้สูตร Quantitation limit (QL) = 10/S (S = slope of calibration curve)

-โดยจะทำการตรวจวิเคราะห์โดย spike สารมาตรฐานความเข้มข้นที่ได้จากการคำนวณในน้ำวุ้นลูกตาและนำไปสกัดตรวจวิเคราะห์ เพื่อยืนยันค่าที่คำนวณได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

6.) Selectivity (ความจำเพาะ) ความสามารถของวิธีวิเคราะห์ในการจำแนกสารที่ต้องการวิเคราะห์ออกจากสารอื่น ๆ รวมถึงสารปนเปื้อน (impurities) สารที่เกิดจากการสลายตัว (degradant) และ matrix

-โดยจะทำการ spike สารมาตรฐานที่อาจจะพบได้ในชีวิตประจำวัน ได้แก่ caffeine, nicotine,acetaminophen, estazepam, triazolam ลงในน้ำวุ้นลูกตา สกัดและตรวจวิเคราะห์เพื่อตรวจสอบเทียบกับวิธีที่เลือกใช้สามารถแยกสารมาตรฐานที่ทำการศึกษาออกจากสารอื่น ๆ ที่อาจมีอยู่ในน้ำวุ้นลูกตาได้

3.4.5 การทดสอบการนำไปใช้ในการให้บริการ ภายหลังการทดลองวิจัยถ้าวิธีการที่ศึกษาผ่านการ validation ที่ได้กำหนดไว้ จะนำวิธีดังกล่าวไปลองทดสอบกับตัวอย่างน้ำวุ้นลูกตาจริงที่ได้ผ่านการตรวจวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการ 10 ตัวอย่าง เพื่อเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์

3.4.6 การตรวจวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS

ในการวิเคราะห์ครั้งนี้ได้ใช้เครื่อง LC-MS/MS รุ่น Shimadzu 8060 triple quadrupole mass spectrometer โดยในส่วน LC ประกอบด้วย LC-30AD pumps (NexeraX2), ACTO 20AC oven และ SIL-30AC-MP (Autosampler) และ column ใช้ Shimadzu shim-pack GIST C18 SP-C18, 1.8 µm. (2.1 x 100 mm.)

ภาพที่ 5 แสดงเครื่อง liquid chromatography mass spectrometer

3.4.7 ค่าที่ตั้งไว้ (condition) สำหรับการตรวจวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS

- Mobile phase :

mobile phase A :10 mM ammonium formate in water +0.1 % formic acid

mobile phase B :10 mM ammonium formate in methanol +0.1% formic acid

- ค่าที่ตั้งไว้สำหรับ LC : ใช้ gradient ของ mobile phase A และ B โดยคงอัตราการไหล 0.3 mL/นาที เป็นเวลา 0.00 – 2.00 นาที, 15 % mobile phase B; 2.00-10.00 นาที, 15 ถึง 50 % mobile phase B; 10.00– 12.00 นาที, 50 ถึง 95 % mobile phase B; 12.00 –20.00 นาที, 95 ถึง 5 % mobile phase B; 21.00–26.00 นาที, และปรับสมดุลของ column ด้วย 5 % mobile phase B ที่อุณหภูมิของ oven 40°C
- ค่าที่ตั้งไว้สำหรับ MS : ใช้ positive electrospray ionization mode (ESI) และได้ทำการตั้งค่าดังนี้ nebulizing gas flow 3 L/นาที, heating gas flow 10 L/นาที interface temperature 300 °C, Desolvation Line (DL) temperature 250°C heat block temperature 400 °C และ drying gas flow 10 L/ นาที และเลือกใช้โหมด Multiple reaction monitoring (MRM)

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

ใช้โปรแกรม Labsolution software ในการวิเคราะห์โครมาโตแกรม
วิเคราะห์สถิติด้วยโปรแกรม SPSS V 22.0

3.6 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย (Tools)

- LC-MS/MS : Shimadzu 8060 triple quadrupole mass spectrometer
- Column : Shimadzu shim-pack Velox SP-18, 1.8 µm. (2.1 x 100 mm)
- Centrifuge : Hettich® รุ่น Mikro 220R
- Shaker

3.7 สถานที่ทำวิจัย

หน่วยนิติพิษวิทยา ชั้น 11 อาคาร อปร.
ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.8 ข้อพิจารณาทางจริยธรรม (Ethical Consideration)

เนื่องจากเป็นตัวอย่างน้ำวุ้นลูกตาของผู้เสียชีวิตที่ผ่านการตรวจวิเคราะห์โดยหน่วยนิติพิษวิทยาและมีการเก็บรักษาอยู่ในขั้นตอนระหว่างรอการกำจัดทิ้งตามกระบวนการ ดังนั้นงานวิจัยจึงไม่มีความเกี่ยวข้องกับการวิจัยในมนุษย์และสัตว์ทดลอง

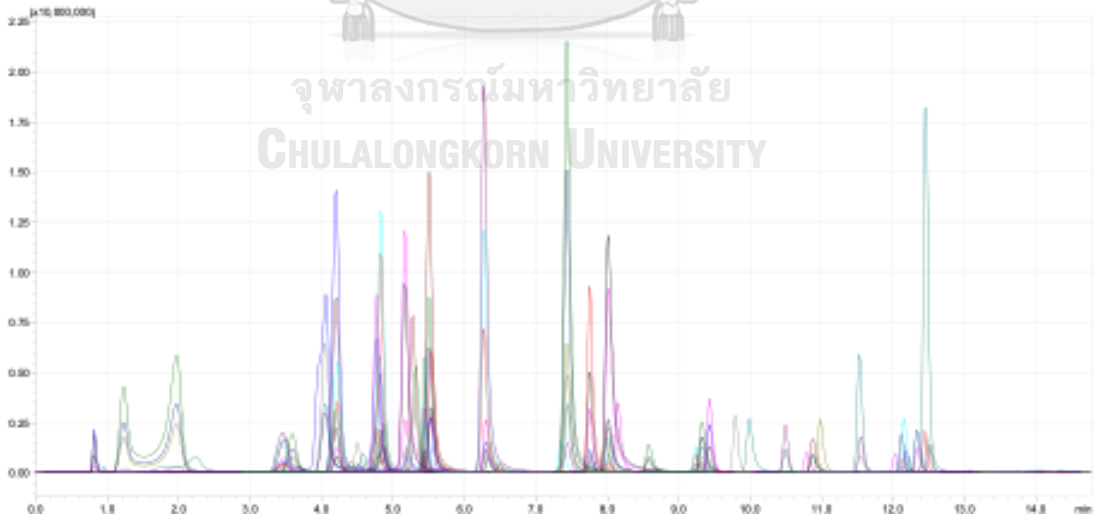
โดยงานวิจัยนี้ผ่านการรับรองและได้รับการยกเว้นจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมวิจัยในมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย COE No. 038/2019, IRB No. 465/62

บทที่ 4

ผลการวิจัย

ในการศึกษาวิจัยเรื่องการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์คัดกรองสารเสพติดในน้ำวุ้นลูกตาด้วยเทคนิคการสกัด QuEChERS และตรวจด้วย LC-MS/MS มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความใช้ได้ของเทคนิคการสกัด QuEChERS ในการเตรียมตัวอย่างทางนิติพิษวิทยา และสามารถนำตัวอย่างน้ำวุ้นลูกตามาใช้ตรวจวิเคราะห์คัดกรองสารเสพติดด้วย LC-MS/MS ในงานนิติเวชศาสตร์ได้ โดยในการศึกษาครั้งนี้ได้นำตัวอย่างน้ำวุ้นลูกตาจากผู้เสียชีวิตมา spike สารที่สนใจทั้ง 24 ชนิดและ internal standard จากนั้นจึงสกัดด้วยเทคนิค QuEChERS และทดสอบความใช้ได้ของเทคนิคการเตรียมตัวอย่างทั้งหมด 6 พารามิเตอร์ ประกอบด้วย precision (ความแม่นยำ), accuracy (ความเที่ยงตรง), Recovery (ค่าคืนกลับ), calibration curve (เส้นปรับเทียบ), limit of detection (ค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้) และ selectivity (ความจำเพาะ) โดยผลการศึกษา มีดังนี้

4.1 ตารางแสดงสารมาตรฐาน (standard), สารมาตรฐานภายใน (Internal standard) และการเลือกใช้ Multiple reaction monitoring (MRM) ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการ spike สารที่สนใจทั้ง 24 ชนิดที่มีความเข้มข้น 5, 50, 100, 200 และ 500 ng/mL พบว่า retention time ของสารตัวแรก คือ Ecgonine Methyl Ester (EME) ที่ 0.875 นาที และสารตัวสุดท้าย คือ Sibutramine ที่ 13.081 นาที แสดงดังตารางที่ 3



ภาพที่ 6 แสดงโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานและสารมาตรฐานภายใน

ตารางที่ 3 ตารางแสดงการเลือกใช้ MRM และ retention time ของสารทั้ง 24 ชนิด

Standard	Internal standard	Retention time (min)	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)
6-Acetyl Morphine	6-Acetyl Morphine - D3	5.888	328.00>165.00	328.00>152.00
Benzoylecgonine	Benzoylecgonine - D3	7.609	290.15>168.15	290.15>77.00
Cocaethylene	Cocaethylene - D3	9.925	318.15>196.15	318.15>82.05
Cocaine	Cocaine - D3	8.511	304.15>182.15	304.15>82.05
EME	EME - D3	0.875	200.10>182.10	200.10>82.10
Clobazam	Diazepam - D5	12.909	301.05>259.05	301.05>224.10
Dextromethorphan	Diazepam - D5	11.656	272.20>215.15	272.20>171.10
Imipramine	Imipramine - D3	12.847	281.20>86.10	281.20>58.05
Trimipramine	Imipramine - D3	13.026	295.20>100.15	295.20>58.10
Methamphetamine	Methamphetamine - D5	5.858	150.15>91.10	150.15>119.15
Norpseudoephedrine	Norpseudoephedrine - D3	4.212	151.95>134.05	151.95>115.05
Oxycodone	Oxycodone - D3	5.40	316.15>241.15	316.15>256.15
Pseudoephedrine	Pseudoephedrine - D3	4.813	166.00>148.00	166.00>133.00
3,4-Methylenedioxypyrovalerone	MDMA - D5	9.087	276.15>126.20	276.15>175.10
Cathinone	MDMA - D5	4.326	150.10>117.15	150.10>105.15
Fentanyl	MDMA - D5	11.285	337.25>188.15	337.25>105.10
LSD	MDMA - D5	9.936	324.20>223.15	324.20>207.15
MDEA	MDEA - D5	6.912	208.15>163.10	208.15>105.10
Mephedrone	MDMA - D5	7.002	178.10>145.15	178.10>144.15
MDMA	MDMA - D5	6.172	194.10>163.10	194.10>105.10
Methcathinone	MDMA - D5	4.666	164.10>131.10	164.10>130.10
Sibutramine	MDMA - D5	13.081	280.20>125.10	280.20>139.10
Zolpidem	Zaleplon - D4	9.769	308.20>235.15	308.20>263.10
Zopiclone	Zopiclone - D4	8.165	389.10>244.95	389.10>217.00

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4 แสดงผลการ validation ของสารทั้ง 24 ชนิด

Standard	Internal standard	R^2	Recovery(%) (%RSD) n=5			Precision (Inter-day) AVE (%RSD) n=5			Accuracy SD (%RSD) n=5		
			Low	Medium	High	Low	Medium	High	Low	Medium	High
6-Acethyl Morphine	6-Acethyl Morphine - D3	0.997	66.2 (8.58)	63.1 (4.59)	68.8 (1.89)	5.84 (2.86)	2.78 (1.61)	5.26 (4.10)	2.50 (4.132)	145.451 (2.054)	483.833 (9.849)
Benzoylecgonine	Benzoylecgonine - D3	0.998	115.7 (12.60)	97.8 (14.41)	87.3 (5.96)	5.97 (2.23)	2.93 (1.55)	4.21 (4.46)	2.50 (2.743)	105.661 (2.016)	473.731 (8.652)
Cocaethylene	Cocaethylene - D3	0.999	83.0 (7.46)	Out 8.5	80.3 (2.85)	7.31 (5.71)	2.78 (2.06)	4.87 (4.70)	0.50 (7.724)	22.365 (2.268)	94.242 (12.481)
Cocaine	Cocaine - D3	0.997	83.5 (6.11)	Out 852	93.4 (0.94)	4.08 (1.62)	3.05 (2.12)	7.45 (9.88)	5.0 (3.510)	High (2.085)	High (2.56)
Ecgonine Methyl Ester (EME)	EME - D3	0.999	125.7 (4.54)	119.7 (8.64)	110.6 (3.63)	12.23 (15.26)	3.20 (2.71)	5.63 (5.72)	5.0 (2.503)	218.434 (1.555)	958.799 (15.013)
Clobazam	Diazepam - D5	0.997	84.9 (7.4)	76.0 (4.4)	67.4 (6.7)	16.83 (17.04)	7.87 (3.63)	8.05 (4.32)	2.50 (4.005)	120.429 (5.571)	473.387 (10.654)
Dextromethorphan	Diazepam - D5	0.999	94.2 (11.60)	85.5 (2.71)	81.0 (4.83)	13.79 (10.79)	7.73 (1.59)	9.37 (3.06)	1.0 (10.956)	46.147 (5.755)	195.454 (10.097)
Imipramine	Imipramine - D3	0.999	80.5 (7.76)	87.2 (5.85)	83.5 (4.98)	13.74 (5.98)	5.48 (1.73)	6.18 (1.87)	0.5 (2.417)	21.844 (1.380)	94.482 (15.337)
Trimipramine	Imipramine - D3	0.999	75.7 (4.45)	82.3 (6.15)	69.2 (8.06)	17.95 (14.54)	8.78 (3.91)	9.32 (1.23)	0.5 (8.713)	22.734 (1.644)	101.993 (16.807)
Methamphetamine	Methamphetamine - D5	0.996	87.4 (3.51)	66.6 (4.06)	68.4 (2.73)	2.27 (4.10)	3.12 (1.74)	4.72 (5.27)	1.0 (9.514)	41.681 (1.642)	193.601 (10.805)
Norpseudoephedrine	Norpseudoephedrine - D3	0.999	120.0 (8.35)	112.2 (11.40)	107.5 (6.06)	5.13 (3.65)	2.57 (1.70)	5.09 (5.26)	5.0 (7.641)	288.343 (1.055)	1135.17 (4.503)
Oxycodone	Oxycodone - D3	0.999	92.2 (10.44)	94.0 (1.34)	91.9 (2.62)	10.95 (2.42)	2.52 (1.68)	5.47 (6.67)	5.0 (2.715)	287.755 (3.950)	1126.024 (4.418)
Pseudoephedrine	Pseudoephedrine - D3	0.999	93.9 (5.1)	96.4 (5.8)	97.9 (11.2)	6.00 (2.76)	2.80 (2.12)	4.50 (4.55)	5.0 (7.641)	215.832 (1.072)	1110.156 (5.727)
3,4-Methylenedioxypyrovalerone	MDMA - D5	0.995	86.7 (5.32)	63.0 (2.27)	60.7 (4.81)	3.75 (1.68)	3.36 (2.54)	5.84 (5.89)	1.0 (7.924)	44.945 (2.452)	189.149 (12.029)
Cathinone	MDMA - D5	0.995	105.7 (5.61)	121.2 (7.72)	115 (4.02)	5.51 (2.56)	3.39 (1.64)	6.00 (5.46)	5.0 (3.382)	205.330 (1.250)	1226.965 (15.610)
Fentanyl	MDMA - D5	0.999	78.0 (5.72)	77.3 (3.14)	75.6 (0.97)	6.60 (2.81)	5.30 (2.68)	7.98 (7.54)	0.50 (3.373)	21.597 (2.433)	97.258 (13.513)
LSD	MDMA - D5	0.998	93.5 (5.63)	81.3 (1.34)	75.7 (3.89)	4.47 (2.97)	3.81 (2.09)	5.43 (6.46)	1.0 (4.944)	45.347 (2.660)	190.838 (12.192)
MDEA	MDEA - D5	0.995	86.3 (11.51)	63.6 (4.28)	62.2 (4.38)	4.20 (3.03)	2.56 (1.80)	4.93 (4.76)	1.0 (9.114)	41.841 (1.688)	190.179 (12.202)
Mephedrone	MDMA - D5	0.995	96.3 (7.70)	67.8 (3.04)	64.5 (5.22)	3.21 (1.43)	3.02 (1.95)	5.03 (5.19)	1.0 (10.190)	42.942 (1.888)	202.097 (10.835)
MDMA	MDMA - D5	0.996	89.9 (3.71)	103.1 (4.04)	99.5 (3.14)	5.60 (3.19)	3.23 (1.53)	5.63 (6.08)	2.50 (3.320)	109.897 (1.541)	474.284 (12.741)
Methcathinone	MDMA - D5	0.999	103.5 (3.64)	107.1 (4.90)	99.1 (3.47)	6.95 (7.84)	3.00 (1.63)	5.12 (5.83)	5.0 (2.827)	334.403 (1.069)	1170.713 (4.406)
Sibutramine	MDMA - D5	0.999	92.9 (8.8)	84.4 (2.0)	78.4 (8.3)	19.32 (10.33)	9.31 (1.26)	10.61 (5.84)	1.0 (9.565)	60.878 (5.723)	185.920 (17.504)
Zolpidem	Zaleplon - D4	0.999	84.0 (6.27)	86.7 (1.43)	89.8 (1.23)	7.16 (2.73)	5.42 (1.09)	6.05 (2.67)	0.50 (4.636)	21.025 (4.225)	98.409 (13.135)
Zopiclone	Zopiclone - D4	0.998	90.1 (3.91)	73.7 (2.59)	71.3 (4.47)	5.72 (3.61)	2.93 (1.65)	4.30 (4.77)	1.0 (6.144)	43.839 (1.653)	192.361 (10.500)

การทดสอบความใช้ได้ (validation) ของเทคนิคการสกัด QuEChERS ในการเตรียมตัวอย่างน้ำวุ้นลูกตาได้ทำการทดสอบทั้งหมด 6 พารามิเตอร์ ได้แก่ precision (ความแม่นยำ), accuracy (ความเที่ยงตรง), Recovery (ค่าคืนกลับ), calibration curve (เส้นปรับเทียบ), limit of detection (ค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้) และ selectivity (ความจำเพาะ) โดยได้ผลดังนี้

- Precision (ความแม่นยำ) ทำการทดสอบแบบ intra-day เพื่อให้มีความใกล้เคียงกับการปฏิบัติงานจริงในห้องปฏิบัติการนิติพิษวิทยา ความเข้มข้นที่นำมาใช้ทดสอบคือ 5, 50, 500 ng/mL(n=5) โดยค่า %RSD น้อยกว่า 20% และค่าทั้งหมดอยู่ในช่วง 1.43-17.04%

- Accuracy (ความเที่ยงตรง) หลังจากทำการทดสอบ ค่า %RSD น้อยกว่า 20% โดยค่าทั้งหมดอยู่ในช่วง 1.055 – 17.504%

- ค่า Recovery(ค่าคืนกลับ)แสดงประสิทธิภาพของการสกัด โดยมีค่า %RSD น้อยกว่า 20%

- Calibration curve (เส้นปรับเทียบ) ทำการทดสอบแบบ linear regression โดยใช้ความเข้มข้นของสาร 5, 50 และ 500 ng/mL (n=5) ให้ค่า R^2 มากกว่า 0.99

- Selectivity (ความจำเพาะ) ไม่พบการรบกวนของสารอื่น ๆ ในการทดสอบ

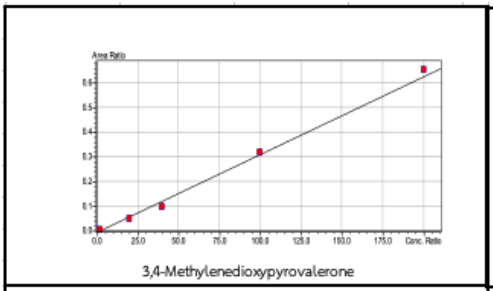
และในการศึกษา limit of detection (LOD) ได้ทำการเจือจางความเข้มข้นสารละลายที่มีความเข้มข้นน้อยที่สุดของสารแต่ละชนิด 10 เท่า โดยมีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.05 – 0.50 ng/mL และสารทุกชนิดมีค่า S/N > 3 ดังแสดงในตารางที่ 5

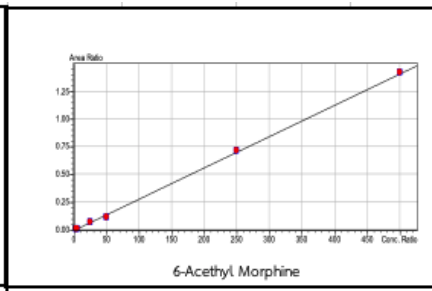
ตารางที่ 5 แสดง Limit of detection (LOD)

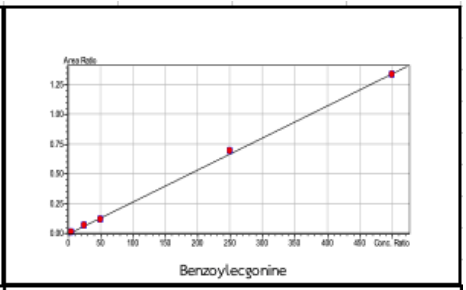
Name	Concentration (ng/mL.)	LOD (S/N > 3)
3,4-Methylenedioxypyrovalerone	0.10	48
6-Acetyl Morphine	0.25	71
Benzoylecgonine	0.25	46
Cathinone	0.50	15
Clobazam	0.25	3
Cocaethylene	0.05	56
Cocaine	0.50	502
Dextromethorphan	0.10	15
EME	0.50	25
Fentanyl	0.05	61
Imipramine	0.05	4
LSD	0.10	150
MDEA	0.10	14
MDMA	0.25	179
Mephedrone	0.10	29
Methamphetamine	0.10	13
Methcathinone	0.50	31
Norpseudoephedrine	0.50	6
Oxycodone	0.50	80
R-Pseudoephedrine	0.50	23
Sibutramine	0.10	13
Trimipramine	0.05	17
Zolpidem	0.05	151
Zopiclone	0.10	16

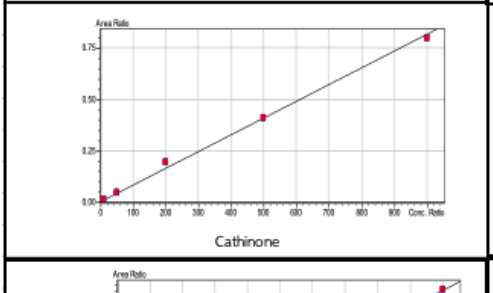
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

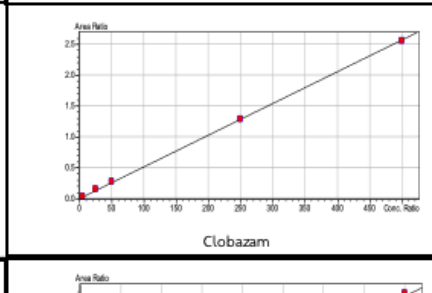
แสดงกราฟ calibration curve ของสารทั้ง 24 ชนิด

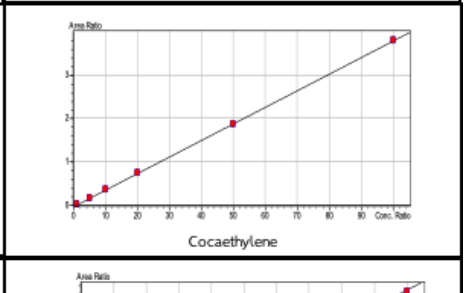

3,4-Methylenedioxypyrovalerone

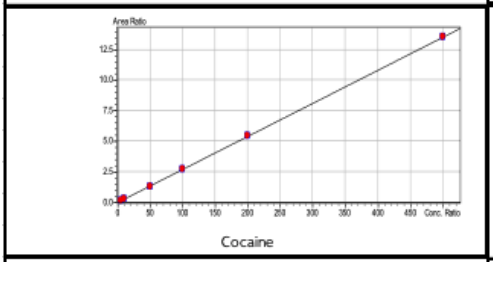

6-Acethyl Morphine

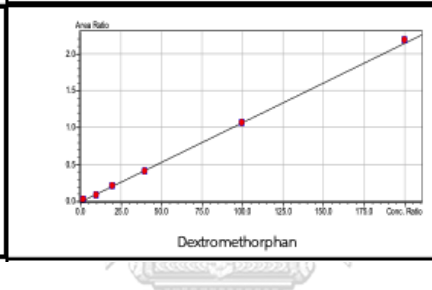

Benzoylecgonine

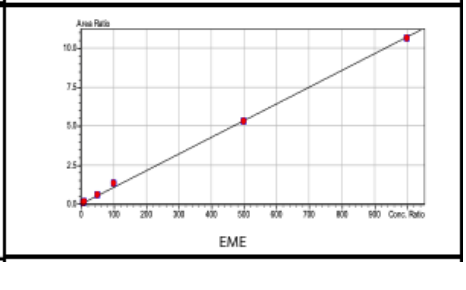

Cathinone

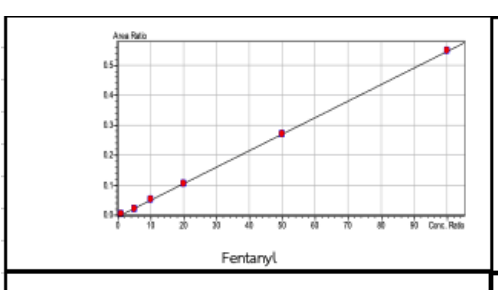

Clobazam

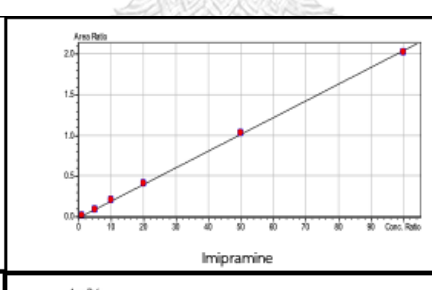

Cocaethylene

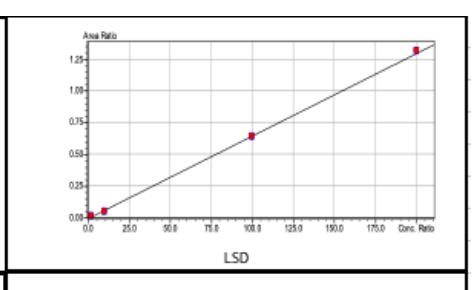

Cocaine

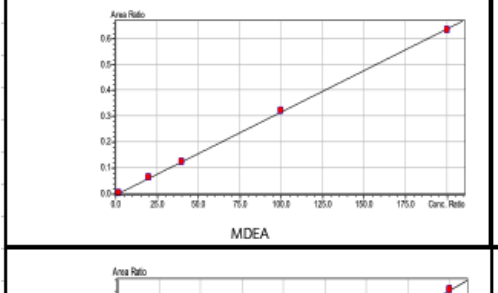

Dextromethorphan

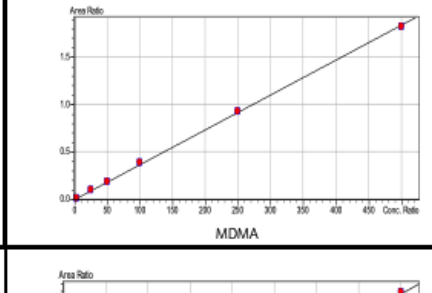

EME

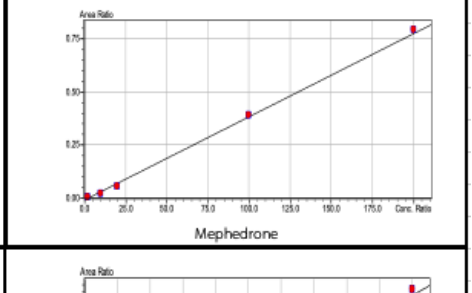

Fentanyl

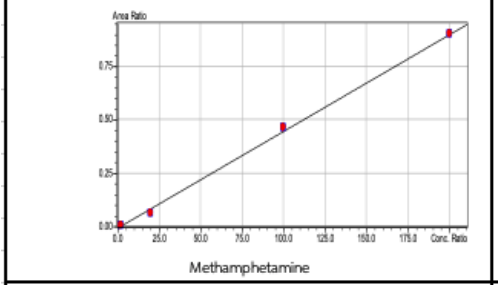

Imipramine

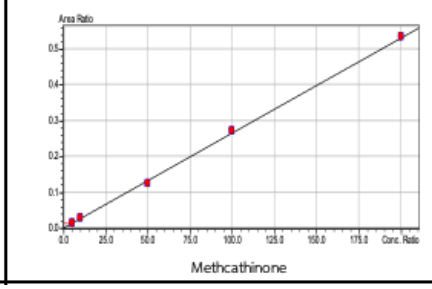

LSD

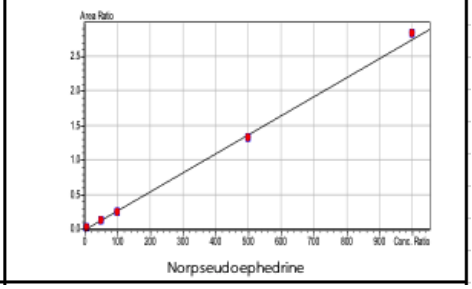

MDEA

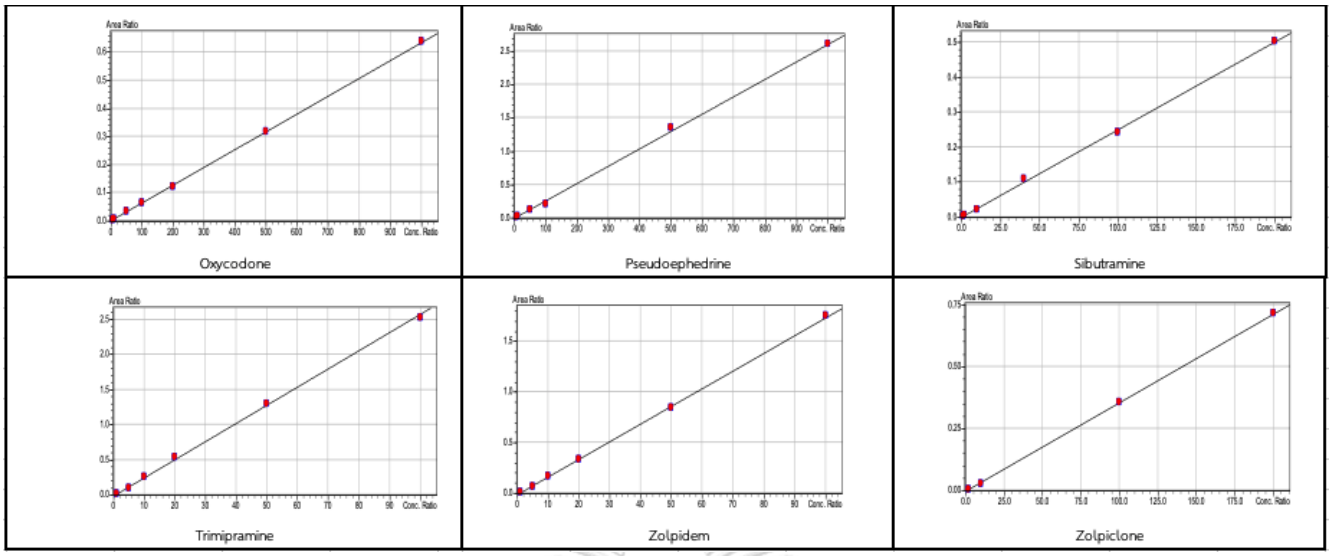

MDMA


Mephedrone


Methamphetamine


Methcathinone


Norpseudoephedrine



และหลังจากทำ validation แล้ว ได้นำเทคนิคดังกล่าวไปทดสอบกับตัวอย่างน้ำวุ้นลูกตาจริงที่ผ่านการตรวจวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการทั้งหมด 10 ตัวอย่าง โดยได้ผลดังที่แสดงในตาราง

ตารางที่ 6 การทดสอบเทคนิคที่ผ่านการ validation กับตัวอย่างน้ำวุ้นลูกตาทั้งหมด 10 ตัวอย่าง

No.	สารที่พบ
1.	Caffeine, Acetaminophen, Dextromethorphan
2.	Caffeine, Carbamazepine
3.	Methamphetamine, Theophylline
4.	Caffeine, Amphetamine, Methamphetamine
5.	Caffeine, Amphetamine, Methamphetamine, Mitragynine
6.	Caffeine, Nordiazepam
7.	Caffeine, Amphetamine, Methamphetamine, Ketamine
8.	Caffeine, Clonazepam
9.	Caffeine, Carbamazepine
10.	Caffeine, Acetaminophen

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 5

สรุปผลและอภิปรายผลการวิจัย

ในการศึกษานี้ผู้วิจัยได้นำเทคนิค modified QuChERS มาทำการทดสอบความใช้ได้ในการเตรียมตัวอย่างน้ำวุ้นลูกตาเพื่อตรวจหาสารเสพติด 24 ชนิด ที่ความเข้มข้น 5, 50, 100, 200 และ 500 ng/mL ทำการทดสอบทั้งหมด 6 พารามิเตอร์ด้วย LC-MS/MS โดย retention time ของสารตัวแรก คือ Ecgonine Methyl Ester (EME) ที่ 0.875 นาที และตรวจพบ Sibutramine ที่ 13.081 นาทีเป็นสารตัวสุดท้าย โดยที่ EME, imipramine, oxycodone และ sibutramine ให้ผลของการทดสอบความใช้ได้ให้ค่าที่ยอมรับได้ทั้งหมดและค่า r^2 >0.998 เมื่อเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากการเตรียมตัวอย่างในตัวอย่างเลือดให้ผลที่ไม่แตกต่างกัน ยกเว้น ผลการทดสอบ Recovery (ค่าคืนกลับ) ความเข้มข้น 100 ng/mL ของ cocaethylene และ cocaine ที่มีค่าการทดสอบสูงกว่าเกณฑ์ที่ยอมรับได้ รวมถึงในการทดสอบค่า accuracy (ค่าความเที่ยงตรง) ที่ความเข้มข้น 100 และ 500 ng/mL. cocaine มีค่าสูงเกินเกณฑ์ที่ยอมรับได้อีกเช่นกัน ซึ่งอาจเกิดจากเทคนิคการเตรียมตัวอย่าง QuEChERS ไม่เหมาะกับการเตรียมสารทั้งคู่

ในกรณีที่ผู้ใช้สารเสพติดมีความทนต่อสารเสพติดอาจจะไม่เกิดสภาวะเป็นพิษต่อร่างกาย แต่ในกรณีผู้ที่พึ่งเริ่มใช้สารเสพติดอาจจะก่อให้เกิดสภาวะเป็นพิษกับร่างกายได้ เช่น methamphetamine ที่สามารถก่อให้เกิดสภาวะเป็นพิษกับร่างกายตั้งแต่ความเข้มข้น 200 ng/L [38] หรือ LSD และ MDMA ที่ปริมาณความเข้มข้นสูง ๆ จึงจะก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อร่างกาย (100 mg – 2 g) แต่จะเพิ่มความเสี่ยงในการเสียชีวิตมากขึ้นเมื่อมีการใช้ร่วมกับแอลกอฮอล์[39] หรือสารเสพติดชนิดอื่น ๆ เช่น โคเคน เมื่อมีการใช้ร่วมกับแอลกอฮอล์จะทำให้เกิดสารตัวใหม่ขึ้น คือ cocaethylene ซึ่งจะเป็นพิษกับร่างกายเมื่อมีความเข้มข้นในร่างกายเพียง 0.348 mg/L และโคเคนที่ความเข้มข้น 0.758 mg/L เป็นต้นไปขึ้นอยู่กับสภาพร่างกายของผู้ใช้ดังที่กล่าวข้างต้น ซึ่งระดับดังกล่าวสามารถตรวจวิเคราะห์ได้ในการศึกษาครั้งนี้

จากงานวิจัยที่ผ่านมาได้ใช้เทคนิค liquid-liquid extraction (LLE) และ Solid phase extraction (SPE) ในการเตรียมตัวอย่าง โดยสามารถตรวจหาสารเสพติดและเมตาบอไลท์ของสารเสพติดได้ เช่น โคเคน เมทาโดน benzodiazepines และผลอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ทั้งหมด เทคนิคการเตรียมตัวอย่างข้างต้นสามารถให้ผลการสกัดสะอาด แต่ใช้สารที่เป็นอันตรายในปริมาณสูง ใช้เวลาในการเตรียมนานและค่าใช้จ่ายในการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิค LLE และ SPE อยู่ที่ 100 – 200 บาทต่อตัวอย่าง และในบางกรณีอาจจะต้องใช้เวลาถึง 1- 2 วันในการเตรียมตัวอย่าง ดังนั้น จึงได้มีการนำเทคนิค QuEChERS มาใช้ทำการศึกษากับตัวอย่างเลือดและตับ โดยสามารถตรวจหาสารเสพติดได้ถึง 90 ชนิด แต่ยังคงมีขั้นตอนที่ซับซ้อนและยังคงใช้เวลาในการเตรียมนานอยู่ ต่อมาจึงมีการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

พัฒนาและปรับปรุงเทคนิคเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและลดเวลาในการเตรียมตัวอย่างลง โดยเทคนิค modified QuEChERS สามารถเตรียมตัวอย่างได้ทีละหลาย ๆ ตัวอย่าง โดยใช้เวลา 20-30 นาที และค่าใช้จ่ายในการเตรียมตัวอย่าง 10 บาทต่อตัวอย่าง จะเห็นว่าเทคนิค modified QuChERS ช่วยประหยัดทั้งเวลาและค่าใช้จ่ายในการเตรียมตัวอย่างได้

อาจกล่าวได้ว่าเทคนิคการสกัด modified QuEChERS สามารถนำมาใช้ในการเตรียมตัวอย่างน้ำวุ้นลูกตาเพื่อตรวจหาสารเสพติดที่สนใจทั้ง 24 ชนิด ด้วย LC-MS/MS ได้เป็นอย่างดี และสามารถนำมาเตรียมตัวอย่างทางนิติพิษวิทยาได้อย่างรวดเร็ว ง่าย มีค่าใช้จ่ายถูก มีประสิทธิภาพในการสกัด และทนทาน จึงควรนำเทคนิคไปพัฒนาและปรับใช้กับงานประจำทางนิติเวชศาสตร์ต่อไป

<u>สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ</u>

อาจกล่าวได้ว่าเทคนิคการสกัด modified QuEChERS สามารถนำมาใช้ในการเตรียมตัวอย่างน้ำวุ้นลูกตาเพื่อตรวจหาสารเสพติดที่สนใจทั้ง 24 ชนิด ด้วย LC-MS/MS ได้เป็นอย่างดี และสามารถนำมาเตรียมตัวอย่างทางนิติพิษวิทยาได้อย่างรวดเร็ว ง่าย มีค่าใช้จ่ายถูก มีประสิทธิภาพในการสกัด และทนทาน จึงควรนำเทคนิคไปพัฒนาและปรับใช้กับงานประจำทางนิติเวชศาสตร์ต่อไป แต่เนื่องจากในงานวิจัยนี้ศึกษายังไม่ครอบคลุมสารสเพติดและสารที่มีความเกี่ยวข้องทางนิติเวชศาสตร์ทั้งหมด จึงเสนอแนะให้มีการศึกษาประเภทของสารเสพติดให้มีความคลอบคลุมมากยิ่งขึ้นเพื่อเป็นประโยชน์ต่อการตรวจวิเคราะห์คัดกรองตัวอย่างในงานประจำทางนิติเวชศาสตร์ต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บรรณานุกรม

1. Pelander A, Ristimaa J, Ojanperä I. Vitreous humor as an alternative matrix for comprehensive drug screening in postmortem toxicology by liquid chromatography – Time -Of - Flight mass spectrometry. J Anal Toxicol. 2010;34:312 - 8.

2. Perez ER, Knapp JA, Horn CK, Stillman SL, Evans JE, Arfsten DP. Comparison of LC-MS-MS and GC-MS Analysis of Benzodiazepine Compounds Included in the Drug Demand Reduction Urinalysis Program. J Anal Toxicol. 2016;40(3):201-7.

3. Anastassiades M LS, Stajnbaher D, Schenck FJ. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determi- nation of pesticide residues in produce. J AOAC Int. 2003;86:412 - 31.

4. Amdur MO, Doull J, Klaassen CD, Casarett. The basic science of poisons. forth ed. New York: Pergamon press; 1991.

5. Gossel TA, Bricker JD. Principles of clinical toxicology. 2nd ed. New York: Raven press; 1990.

6. Flanagan RJ, Braithwaite RA, Brown SS, Widdop B, de Wolff FA. Basic Analytical Toxicology. England: WHO Geneva; 1995.

7. Jenkins AJ, Caplan YH, Levine S. Drug testing in alternative biological specimens. Painesville: Humana Press; 2008.

8. Forrest AR. Obtaining samples at post mortem examination for toxicological and biochemical analyses. J Clin Pathol. 1993;46:292 - 6.

9. Jenkins AJ, Oblock J. Phencyclidine and cannabinoids in vitreous humor. Leg Med(Tokyo). 2008;10:201 - 3.

10. Baniak N, Campos-Baniak G, Mulla A, Kalra J. Vitreous humor : a short review on post-mortem applications. J Clin Exp Pathol. 2015;4:1 - 7.

11. Flanagan RJ, Belsey S, Launiainen. Clinical biochemistry: Forensic biochemistry. 3rd ed. England: Churchil livingstone; 2014.

12. Fernandez P, Seoane S, Vazquez C, Tabernero MJ, Carro AM, Lorenzo RA. Chromatographic determination of drugs of abuse in vitreous humor using solid-phase

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

extraction. J Appl Toxicol. 2013;33:740 - 5.

13. Arora B, Velpandian T, Saxena R, Lalwani S, Dogra TD, Ghose S. Development and validation of an ESI-LC-MS/MS method for simultaneous identification and quantification of 24 analytes of forensic relevance in vitreous humour, whole blood and plasma. Drug Test Anal. 2016;8(1):86-97.

14. Bazmi E, Behnoush B, Akhgari M, Bahmanabadi L. Quantitative analysis of benzodiazepinesin vitreous humor by high-performance liquid chromatography. SAGE open Med. 2016;4.

15. Stimpfl T, Mueller K, Gergov M, LeBeau M, Sporkert F. Recommendations on sample preparation of biological specimens for systematic toxicological analysis :TIAFT-Bulletin. 41th ed2014.

16. Samenath M. Sample preparation techniques in analytical chemistry. New Jersey: Wiley; 2003.

17. Rodriguez MS, Lopez MJ, Barceló D. Advantages and limitations of on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry technologies versus biosensors for monitoring of emerging contaminants in water. J Chromatogr A. 2007:97 - 115.

18. Major RE. QuEChERS - A new technique for multiresidue analysis of pesticides in foods and agricultural samples. LCGC Asia Pacific. 2008;11:1- 7.

19. Diez C, Traag WA, Zommer P, Marinero P, Atienza J. Comparison of an acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” method with classical multi-residue methods for the extraction of herbicide residues in barley samples. J Chromatogr A. 2006;1131:11 - 23.

20. Benerjee K, Oulkar DP, Dasgupta S, Partil SB, Partil SH, Savant R, et al. Validation and uncertainty analysis of a multi-residue method for pesticides in grapes using ethyl acetate extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Chromatogr A. 2007;1173:98 - 109.

21. Cunha SC, Lehotay SJ, Mastovska K, Fernandes JO, Beatriz M, Oliveira PP. Evaluation of the QuEChERS sample preparation approach for the analysis of pesticides in olives. J Sep Sci. 2007;30:620 - 32.

22. Hercegova A, Domotorova M, Kruzlicova D, Matisova E. Comparison of sample

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

preparation metods combine with gas chromatography-mass spectrometry for ultratrance analysis of pesticide residues in baby food. J Sep Sci. 2006;29:1102 - 09.

23. Gilbert-Lopez B, Garcia-Reyes JF, Lozano A, Fernandez-Alba AR, Molina-Diaz A. Large scale pesticide testing in olives by liquid chromatography tandem mass spectrometry using two sample preparation methods based on matrix solid-phase dispersion and QuEChERS. J Chromatogr A. 2010;1217:6022 - 35.

24. Ötles S, Kartal C. Solid-Phase Extraction (SPE): Principles and applications in food samples. Acta Sci Pol Techno Aliment. 2016;15:5 -15.

25. Schou AMV, Lykkesfeldt J. Comparison of three sample preparation procedures for the quantification of L-arginine, asymmetric dimethylarginine, and symmetric dimethylarginine in human plasma using HPLC-FLD. J Anal Methods Chem. 2018:1-7.

26. Usui K, Hayashizaki Y, Hashiyada M, Funayama M. Rapid drug extraction from human whole blood using a modified QuEChERS extraction method. Leg Med (Tokyo). 2012;14:286 - 96.

27. Usui K, Hashiyada M, Hayashizaki Y, Hosoya T, Igari Y, Sakai J, et al. Application of modified QuEChERS method to liver samples for forensic toxicological analysis. Forensic Toxicol. 2014;32:139 - 47.

28. Dulaurent S, El Balkhi S, Poncelet L, Gaulier JM, Marquet P, Saint-Marcoux F. QuEChERS sample preparation prior to LC-MS/MS determination of opiates, amphetamines, and cocaine metabolites in whole blood. Anal Bioanal Chem. 2016;408(5):1467-74.

29. Seyed MSA, Mohammad JK, Zahra M, Marya A. Methadone Extraction by Modified Quechers and Liquid-Liquid Extraction from Post-Mortem Urine by GC-MS. J Med Toxicol Clin Forens Med. 2017;3:1-4.

30. Dybowski MP, Dawidowicz AL. Application of the QuEChERS procedure for analysis of Delta(9)-tetrahydrocannabinol and its metabolites in authentic whole blood samples by GC-MS/MS. Forensic Toxicol. 2018;36(2):415-23.

31. Watson JT, Sparkman OD. Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, applications and strategies for data interpretation. 4th ed. West Sussex: Wiley; 2007.

32. Ardrey RE. Liquid Chromatography-Masss spectrometry: An introduction. Huddersfield: Wiley; 2003.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

33. Meyer VR. Practical High-Performance Liquid Chromatography. 4th ed. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd.; 2004.

34. Ho CS, Lam CWK, Chan MHM, Cheung RHM LL, Lit LCW. Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. Clin Biochem Rev. 2003;24:3 - 12.

35. Prasain JK. Tandem mass spectrometry - applications and principles [Internet]. Rijeka: InTech. 2012. [cited 16/05/2019].

36. Peter FT, Drummer OH, Musshoff F. Validation of new methods. Forensic Sci Int. 2007;165:216 - 24.

37. Bevalot F, Cartiser N, Bottinelli C, Fanton L, Guitton J. Vitreous humor analysis for the detection of xenobiotics in forensic toxicology: a review. Forensic Toxicol. 2016;34:12-40.

38. Kaye S DS, Duflou J, McKetin R. Methamphetamine-related fatalities in Australia: demographics, circumstances, toxicology and major organ pathology. Addiction. 2008;103:1353-60.

39. SR. G. Comparison of acute lethal toxicity of commonly abused psychoactive substances. Society for the study of Addiction. 2004;99:686-96.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวบัณฑิตา บุญเฉลียว
วัน เดือน ปี เกิด	16 พฤศจิกายน 2537
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2559 สำเร็จการศึกษา ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (สาขาพยาธิวิทยากายวิภาค) คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ที่อยู่ปัจจุบัน	199/72 หมู่ 1 ตำบลหนองไม้แดง อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี 20000

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University