ว กรมวิทย พ 2566; 65 (2): 84-100

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ยาแผนปัจจุบันที่ปลอมปนในผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร โดยเทคนิค Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

กัญญารัตน์ เชื้อกูลชาติ วิทวัส วังแก้วหิรัญ อัจฉรี อินแก้ว เสาวณีย์ วาจาสิทธิ์ สุวิมล หมวดหม้ะ สกุลรัตน์ สมสันติสุข และ ทองสุข ปายะนันทน์

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่อ้างสรรพคุณในการช่วยลดน้ำหนัก เพิ่มสมรรถภาพทางเพศ บำรุงผิวพรรณ หรือช่วยแก้ไขปัญหาสุขภาพอาจมีการปลอมปนของวัตถุออกฤทธิ์หรือยาแผนปัจจุบัน เพื่อให้เกิดผลที่ต้องการอย่างรวดเร็วโดยไม่คำนึงถึงความปลอดภัยของผู้บริโภค ซึ่งการใช้สารเหล่านี้อย่างผิดวัตถุประสงค์อาจก่อให้เกิดปัญหาสุขภาพอย่างร้ายแรงจนเสียชีวิตได้ การศึกษานี้จึงได้พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพ เพื่อตรวจสอบการปลอมปนของยาแผนปัจจุบัน 16 ชนิด ที่นิยมนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารประเภทผง เม็ด แคปซูล และเครื่องดื่ม โดยใช้ตัวทำละลาย MeOH:H_2O (70:30) ในการสกัดและปรับค่า pH ของสารละลายให้เป็นกรด จากนั้นนำสารสกัดเจือจาง 10 เท่า ตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ซึ่งวิธีที่พัฒนาขึ้นมีขีดจำกัดการตรวจวัดสำหรับการยืนยันผลเท่ากับ 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับตัวอย่างทุกประเภท จากการทดสอบความใช้ได้ของวิธี พบว่าค่า %diagnostic sensitivity, %diagnostic specificity, %positive predictive value และ %negative predictive value มีค่าเท่ากับ 100% ดังนั้นวิธีวิเคราะห์นี้จึงมีความไว ความจำเพาะ ความแม่นยำสูง ไม่ทำให้เกิดผลบวกลวงหรือผลลบลวง และสามารถวิเคราะห์ยาทั้ง 16 ชนิด ได้ในครั้งเดียว ซึ่งเป็นการลดปริมาณการใช้สารเคมีและระยะเวลาในการวิเคราะห์ เกิดประโยชน์ในการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์เสริมอาหารให้เป็นไปตามกฎหมายและคุ้มครองความปลอดภัยให้กับผู้บริโภค

คำสำคัญ: การพัฒนาวิธีวิเคราะห์, ยาแผนปัจจุบัน, ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร, LC-MS/MS

Corresponding author E-mail: kanyarat.ch@dmsc.mail.go.th

Received: 17 January 2023 *Revised: 31 May 2023* *Accepted: 2 June 2023*

บทนำ

ปัจจุบันผู้บริโภคนิยมใช้ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อวัตถุประสงค์ต่าง ๆ เช่น ลดน้ำหนัก เสริมสร้างการเจริญเติบโตของกล้ามเนื้อ เพิ่มสมรรถภาพทางเพศ บำรุงผิวพรรณ หรือแก้ไขปัญหาสุขภาพอื่น ๆ ซึ่งผลิตภัณฑ์บางชนิดอาจมีการปลอมปนด้วยยาแผนปัจจุบัน เพื่อให้เกิดผลลัพธ์ที่ต้องการในระยะเวลาอันรวดเร็ว แต่อาจส่งผลข้างเคียงต่อสุขภาพของผู้บริโภคอย่างรุนแรง[1] พบได้จากข่าวการเสียชีวิตหรืออาการประสาทหลอนของผู้ที่บริโภคผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสำหรับลดน้ำหนัก สาเหตุหลักที่ทำให้เกิดอันตราย คือ การปลอมปนยาลดน้ำหนักในผลิตภัณฑ์ดังกล่าว โดยทั่วไปยาลดน้ำหนักจะสั่งจ่ายโดยแพทย์ เพื่อใช้เป็นส่วนหนึ่งของการรักษาโรคอ้วน ยาลดน้ำหนักแบ่งเป็น 2 ประเภท ตามการออกฤทธิ์ของยา[2] ได้แก่ กลุ่มออกฤทธิ์ต่อสมองมีผลต่อศูนย์ควบคุมการรับประทานอาหารหรือความรู้สึกอยากอาหาร โดยกระตุ้นศูนย์ควบคุมความอิ่มและทำให้เกิดอาการเบื่ออาหาร เช่น sibutramine, phentermine, fluoxetine, desoxy-D2PM ยาชนิดออกฤทธิ์กดประสาทและลดการทำงานของศูนย์ควบคุมความหิว เช่น fenfluramine และกลุ่มที่ออกฤทธิ์กับอวัยวะอื่น ๆ เช่น ephedrine, pseudoephedrine ที่ช่วยกระตุ้นกระบวนการเผาผลาญในร่างกายและเพิ่มอัตราการเผาผลาญไขมัน phenolphthalein มีฤทธิ์เป็นยาระบาย กระตุ้นการบีบตัวของลำไส้ ทำให้เกิดการขับถ่ายมากขึ้นหรือบ่อยขึ้น เมื่อร่างกายสูญเสียน้ำและเกลือแร่จึงทำให้รู้สึกผอมลงอย่างรวดเร็ว และอาจมีการใช้ diazepam เพื่อลดผลข้างเคียงจากยาลดน้ำหนักที่กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลางร่วมด้วย การได้รับยาเหล่านี้ในปริมาณที่มากเกินไปอาจส่งผลเสียต่อสุขภาพ เช่น เกิดอาการวิตกกังวล หวาดระแวง นอนไม่หลับ ขาดความสมดุลของสภาวะเกลือแร่ในร่างกาย หรือการทำงานของบางอวัยวะผิดปกติ และหากใช้ยาเหล่านี้ติดต่อกันเป็นเวลานานหรือใช้ในปริมาณที่เกินขนาด อาจส่งผลต่อระบบประสาท หัวใจ และหลอดเลือด จนถึงขั้นเสียชีวิต

นอกจากนี้พบผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่อ้างสรรพคุณช่วยรักษาปัญหาสุขภาพ แต่มีการปลอมปนยาประเภทสเตียรอยด์ เช่น prednisolone[3] และ dexamethasone[4] ที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ กดภูมิคุ้มกัน ใช้รักษาอาการแพ้ รักษาความผิดปกติเกี่ยวกับระบบกล้ามเนื้อ กระดูกและข้อ ทางเดินหายใจ ทางเดินอาหาร และต่อมไร้ท่อ หากใช้เป็นเวลานานหรือใช้บ่อยเกินไปอาจก่อให้เกิดผลข้างเคียง เช่น เพิ่มความเสี่ยงการติดเชื้อแบคทีเรียจากฤทธิ์การกดภูมิคุ้มกัน เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด เพิ่มการสะสมไขมัน เพิ่มความเสี่ยงต่อภาวะกระดูกพรุน และอาจทำให้ร่างกายหยุดสร้างสเตียรอยด์ตามธรรมชาติ ดังนั้นเมื่อหยุดใช้ยานี้ทันทีจะทำให้ร่างกายขาดสเตียรอยด์อย่างฉับพลัน อาจเกิดภาวะช็อก หมดสติ และเสียชีวิต ผลิตภัณฑ์ช่วยเสริมสมรรถภาพทางเพศเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่อันตราย มีการใช้ sildenafil (viagra), tadalafil หรือ vardenafil[5] ซึ่งเป็นยารักษาโรคหย่อนสมรรถภาพทางเพศ ออกฤทธิ์ช่วยผ่อนคลายกล้ามเนื้อของหลอดเลือด ช่วยเพิ่มการไหลเวียนโลหิตไปยังอวัยวะเพศชาย และช่วยให้อวัยวะเพศแข็งตัว หากได้รับในปริมาณมากเกินไปอาจทำให้สูญเสียการมองเห็นอย่างฉับพลันหรือทำให้หัวใจวายจนเสียชีวิต ดังนั้นการผสมยาเหล่านี้ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่ไม่มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เป็นยาและไม่ได้รับการควบคุมปริมาณการบริโภคดังเช่นยา อาจทำให้ผู้บริโภคได้รับความเสี่ยงจากผลข้างเคียงอย่างร้ายแรง เกิดอันตรายต่อสุขภาพ และเสียชีวิตได้

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 293 พ.ศ. 2548 เรื่อง ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร[6] ให้คำนิยาม ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารว่า เป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้รับประทานนอกเหนือจากการรับประทานอาหารตามปกติ ซึ่งมีสารอาหารหรือสารอื่นเป็นองค์ประกอบอยู่ในรูปแบบเม็ด แคปซูล ผง เกล็ด ของเหลว หรือลักษณะอื่น ซึ่งมิใช่รูปแบบอาหารตามปกติ สำหรับผู้บริโภคที่คาดหวังประโยชน์ทางด้านส่งเสริมสุขภาพ ดังนั้นการนำวัตถุออกฤทธิ์[7] เช่น sibutramine และ desoxy-D2PM ที่ถูกจัดเป็นวัตถุออกฤทธิ์ประเภท 1 alprazolam, ephedrine, phentermine และ pseudoephedrine ที่เป็นวัตถุออกฤทธิ์ประเภท 2 และ diazepam ที่เป็นวัตถุออกฤทธิ์ประเภท 4 มาใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารถือเป็นการกระทำที่ผิดกฎหมาย นอกจากนี้การปลอมปนยาควบคุมพิเศษ[8] เช่น sildenafil, tadalafil, fluoxetine, prednisolone, dexamethasone ยาอันตราย[9] เช่น

fluoxetine ยาแผนปัจจุบันที่ใช้ตามแพทย์หรือเภสัชกรสั่งเท่านั้น เช่น มี bisacodyl ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ซึ่งเป็นการใช้อย่างผิดวัตถุประสงค์ อาจก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคและเป็นการกระทำที่ผิดกฎหมาย

เทคนิคการตรวจวิเคราะห์วัตถุออกฤทธิ์และยาแผนปัจจุบันมีหลายเทคนิค[10] ตั้งแต่วิธีการพื้นฐานที่ใช้ตรวจคัดกรองเบื้องต้น ได้แก่ โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (thin-layer chromatograph; TLC)[11-13] ที่อาศัยเทคนิคการแยกสารแบบของแข็งและของเหลว โดยใช้ alumina หรือ silica gel เป็นวัฏภาคคงที่ (stationary phase) เคลือบบนแผ่นกระจกหรือแผ่น aluminum แล้วใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ซึ่งเป็นวิธีการวิเคราะห์เชิงคุณภาพแบบง่ายและรวดเร็ว แต่ใช้แยกสารปริมาณมาก ๆ ได้ไม่ดี มีค่าขีดจำกัดการตรวจวัดสูง และอาจต้องทำการตรวจยืนยันผลอีกครั้ง นอกจากนี้ยังมีเทคนิค gas chromatography (GC) และ liquid chromatography (LC)[14,15] ที่มีความจำเพาะ ความไว และความแม่นยำสูง สามารถวิเคราะห์สารได้หลายชนิดในเวลาเดียวกัน โดย LC นิยมใช้กับ detector ชนิด UV/VIS หรือ MS/MS ซึ่งทำให้การวิเคราะห์มีความน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาการตรวจวิเคราะห์ยาแผนปัจจุบัน 16 ชนิด ได้แก่ alprazolam, bisacodyl, desoxy-D2PM, dexamethasone, diazepam, ephedrine, fenfluramine, fluoxetine, phenolphthalein, phentermine, prednisolone, pseudoephedrine, sibutramine, sildenafil, tadalafil และ vardenafil โดย LC-MS/MS ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดผง เม็ด และแคปซูล ดำเนินการทดสอบความถูกต้องของวิธีโดยศึกษาความจำเพาะเจาะจง ขีดจำกัดการตรวจวัดสำหรับการยืนยันผล ความไว ของวิธีวิเคราะห์ positive predictive value (PPV) และ negative predictive value (NPV) ซึ่งวิธีที่พัฒนานี้สามารถนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง เพื่อควบคุมคุณภาพอาหารตามกฎหมาย และใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการวางแผนให้กับหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง เพื่อป้องกันและเฝ้าระวังสถานการณ์ความปลอดภัยในการบริโภคผลิตภัณฑ์เสริมอาหารต่อไป

วัสดุและวิธีการ

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารมาตรฐาน: alprazolam, diazepam, ephedrine hydrochloride, phentermine hydrochloride, pseudoephedrine hydrochloride (DMSc reference standard, ความบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 99.0), bisacodyl, dexamethasone, fluoxetine hydrochloride, phenolphthalein, prednisolone, tadalafil, vardenafil hydrochloride (Dr. Ehrenstorfer GmbH, ความบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 97.0), desoxy-D2PM, sildenafil citrate (Sigma-Aldrich, ความบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 99.0), fenfluramine hydrochloride, sibutramine hydrochloride monohydrate (LGC GmbH, ความบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 98.00)

สารเคมี: acetonitrile (ACN), methanol (MeOH) เป็น HPLC grade และ formic acid เป็น AR grade

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องชั่งความละเอียด 0.001 กรัม (Sartorius AG, รุ่น LP 620S, Germany) และ 0.01 มิลลิกรัม (Mettler-Toledo AG, รุ่น XPE, Switzerland), refrigerated centrifuge, เครื่องปั่น (Nessei, Japan), vortex mixer, shaker, micro pipette ขนาด 2-20, 10-100, 20-200, 100-1,000 และ 1,000-10,000 ไมโครลิตร, screw cap centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร, micro-spin filter tube 0.2 ไมโครเมตร ชนิด PVDF, ขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 และ 1,000 มิลลิลิตร, กระบอกตวง ขนาด 100 และ 500 มิลลิลิตร, pH paper ช่วง 0-14 และ 2.5-4.5, เครื่อง LC-MS/MS ประกอบด้วย binary pump, auto-sampler, micro vacuum degasser, thermostatted column compartment: Agilent 1100-API 4000, detector ชนิด triple quadrupole mass spectrometer (Agilent Technologies, Germany) และคอลัมน์ Zorbax SB C-18 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm)

วิธีวิเคราะห์

การเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดผง เม็ด และแคปซูล ทำการบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดปั่นจนเป็นเนื้อเดียวกัน (homogenize) โดยแต่ละชนิดตัวอย่างจะนำจากทุกส่วนมารวมกันและทำการชั่งตัวอย่างเพื่อตรวจวิเคราะห์ ส่วนตัวอย่างที่เหลือจากการชั่งจะเก็บในสภาวะที่เหมาะสม (reserved portion) ในการสุ่มตัวอย่างใช้หลัก hypermetric distribution ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%[16] เช่น ตัวอย่างชนิดเม็ด หากมีตัวอย่าง 100 เม็ด ให้นำตัวอย่างทั้งหมดบดปั่นและดำเนินการตามที่กล่าวข้างต้น ตัวอย่างชนิดแคปซูล เลือกใช้เฉพาะส่วนที่อยู่ในแคปซูลเท่านั้น ตัวอย่างชนิดผงนำตัวอย่างทั้งหมดรวมกันและดำเนินการเช่นเดียวกับชนิดเม็ด กรณีตัวอย่างเป็นของเหลว นำทุกส่วนของหน่วยบรรจุเทรวมกันและผสมเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นดำเนินการเช่นเดียวกับตัวอย่างชนิดอื่น ๆ สำหรับตัวอย่าง matrix blank ได้จากตัวอย่างที่ส่งวิเคราะห์ของสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ผ่านการสกัดและวิเคราะห์ตามวิธีที่พัฒนา จากนั้นฉีดสารสกัดเข้าเครื่อง LC-MS/MS และตรวจสอบว่าไม่มี mass หรือสัญญาณรบกวนที่สารมาตรฐานทั้ง 16 ชนิด เพื่อป้องกันความผิดพลาดของผลวิเคราะห์

การสกัดตัวอย่าง

สกัดผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดผง เม็ด แคปซูล และเครื่องดื่ม โดยชั่งตัวอย่าง 1.000±0.05 กรัม ใส่ screw cap centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร ละลายด้วยตัวทำละลายผสม MeOH:H_2O อัตราส่วน 70:30 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นปรับค่า pH ซึ่งขั้นตอนนี้มีการศึกษาค่า pH ช่วงต่าง ๆ เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของการสกัดสารเป้าหมาย โดยมีการปรับค่า pH ในช่วงต่าง ๆ ได้แก่ 1.5-2.5, 2.5-3.5 และ 3.5-4.5 ด้วย formic acid ผสมให้เข้ากันและเขย่าด้วย shaker นาน 15 นาที จากนั้นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใส 1 มิลลิลิตร (กรณีผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดเครื่องดื่ม เนื่องจากตัวอย่างจะรวมเป็นเนื้อเดียวกันกับตัวทำละลายจึงสามารถดูดสารละลายได้ทั้งหมด) ใส่ลงใน micro-spin filter ชนิด PVDF ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำสารละลายที่ได้มาเจือจาง 10 เท่า ด้วย MeOH:H_2O อัตราส่วน 70:30 ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐาน stock standard solution ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งสารมาตรฐานแต่ละชนิดประมาณ 10 มิลลิกรัม ละลายและปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วย methanol คำนวณความเข้มข้นของสารมาตรฐานเป้าหมาย เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมความเข้มข้น 100, 10 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการเจือจางด้วย methanol สำหรับสารละลายมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณด้วย LC-MS/MS เป็นแบบ single point standard ที่ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

การวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS

เครื่อง Agilent 1110 series API 4000 MS/MS ที่สภาวะดังนี้ mobile phase เป็น 0.1% formic acid และ acetonitrile ใช้โปรแกรม gradient ในการแยกสาร เวลาในการวิเคราะห์ทั้งหมด 22 นาที โดยมีสภาวะของ mass spectrometer ประกอบด้วย ion spray voltage: 5500 volts, temperature (TEM): 400 องศาเซลเซียส, collision gas (CAD): nitrogen; medium, curtain gas (CUR): 30 psig, ion spray nebulizer gas (GAS-1): 40 psig, tis heater gas (GAS-2): 50 psig อุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับ 35 องศาเซลเซียส และ injection volume เท่ากับ 5 ไมโครลิตร โดยสารถูกทำให้เป็นไอออนบวกด้วย electro spray ionization (ESI) ไอออนที่ได้ถูกวิเคราะห์ด้วย multiple reaction monitoring (MRM) และศึกษา mass ที่ m/z ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 MS/MS fragmentation conditions

No.	Compound name	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Retention Time (RT) (min)
1	alprazolam	309.100	281.300 (primary) 205.300 (secondary)	8.29
2	bisacodyl	362.000	184.000 (primary) 167.000 (secondary)	7.35
3	desoxy-D2PM	238.000	97.000 (primary) 117.000 (secondary)	6.34
4	dexamethasone	393.000	147.000 (primary) 355.000 (secondary)	7.16
5	diazepam	285.300	193.200 (primary) 154.200 (secondary)	7.89
6	ephedrine	166.200	117.100 (primary) 115.100 (secondary)	6.07
7	fenfluramine	232.200	159.100 (primary) 109.100 (secondary)	6.38
8	fluoxetine	310.100	44.000 (primary) 148.100 (secondary)	6.35
9	phenolphthalein	319.000	225.000 (primary) 141.100 (secondary)	6.72
10	phentermine	150.100	91.100 (primary) 105.100 (secondary)	6.15
11	prednisolone	361.000	307.000 (primary) 343.000 (secondary)	6.90
12	pseudoephedrine	166.200	117.100 (primary) 115.100 (secondary)	6.19
13	sibutramine	280.000	125.000 (primary) 139.000 (secondary)	6.92
14	sildenafil	475.100	58.000 (primary) 100.000 (secondary)	6.34
15	tadalafil	390.100	268.100 (primary) 135.100 (secondary)	6.88
16	vardenafil	489.400	151.000 (primary) 312.200 (secondary)	6.20

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ (specificity)

ตรวจสอบ specificity โดยพิจารณาจาก ion ratio และ retention time ของสารละลายตัวอย่างต้องแตกต่างจาก ion ratio และ retention time เฉลี่ยของสารมาตรฐาน ที่ได้จากการฉีดสารมาตรฐาน จำนวน 3 ซ้ำ ก่อนทำการฉีดสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ (system suitability) ไม่เกินเกณฑ์การยอมรับ[17] และวิเคราะห์ matrix blank พิจารณา chromatogram ของตัวอย่าง โดยต้องไม่พบสัญญาณที่มีค่า retention time (RT) และค่า m/z ที่ตรงกับสารมาตรฐานทั้ง 16 ชนิด

ขีดจำกัดการตรวจวิเคราะห์สำหรับการยืนยันผลบวก (cut-off) และความใช้ได้ของวิธีการสกัดตัวอย่างชนิดต่าง ๆ

วัตถุประสงค์ของการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ยาแผนปัจจุบันที่ปลอมปนในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารนี้ จึงเป็นการตรวจวิเคราะห์เพื่อพิสูจน์และยืนยันการปลอมปนการใช้ยาผิดวัตถุประสงค์ โดยกำหนดค่า cut-off ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งเป็นค่าที่ใช้ในการรักษาทางการแพทย์[18] หากผู้ประกอบการหรือบริษัทผู้ผลิตมีเจตนาผสมยาในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารบางชนิด เพื่อให้เกิดผลลัพธ์ที่ต้องการในระยะเวลาอันรวดเร็วจะผสมยาในปริมาณที่มากเกินพอ

การยืนยันระดับความเข้มข้นสำหรับการยืนยันผลบวก แบ่งการศึกษาออกเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 เป็นตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดผง เม็ด แคปซูล และเครื่องดื่ม ที่ปราศจากสารกลุ่มเป้าหมาย (matrix blank) และกลุ่มที่ 2 เติมสารกลุ่มเป้าหมาย 16 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ลงในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดผง เม็ด แคปซูล และเครื่องดื่ม ที่ปราศจากสารกลุ่มเป้าหมาย ซึ่งทั้ง 2 กลุ่ม ทำซ้ำชนิดตัวอย่างละ 100 ซ้ำ โดยทำการสกัด วิเคราะห์และประเมินผล

ความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ (diagnostic specificity)

วิเคราะห์ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดผง เม็ด แคปซูล และเครื่องดื่ม ที่ปราศจากสารกลุ่มเป้าหมาย ตัวอย่างชนิดละ 100 ซ้ำ ประเมินผลโดยคำนวณตามสมการ[19]

$$\text{diagnostic specificity} = \frac{\text{number of true negative sample}}{\text{total number of samples without condition}}$$

ความไวของวิธีวิเคราะห์ (diagnostic sensitivity)

วิเคราะห์ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดผง เม็ด แคปซูล และเครื่องดื่ม ที่เติมสารกลุ่มเป้าหมาย 16 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ชนิดตัวอย่างละ 100 ซ้ำ ประเมินผลโดยคำนวณตามสมการ[19]

$$\text{diagnostic specificity} = \frac{\text{number of true positive sample}}{\text{total number of samples without condition}}$$

positive predictive value (PPV)

วิเคราะห์เพื่อทดสอบสัดส่วนของโอกาสจากผลการวิเคราะห์ สำหรับการตรวจพบสารกลุ่มเป้าหมายที่ให้ผลถูกต้อง โดยวิเคราะห์ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดผง เม็ด แคปซูล และเครื่องดื่ม ที่มีสารกลุ่มเป้าหมายที่มีระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ชนิดตัวอย่างละ 100 ซ้ำ ประเมินผลโดยคำนวณตามสมการ[19]

$$\text{positive predictive value} = \frac{\text{number of true positives}}{\text{total number of positives}}$$

negative predictive value (NPV)

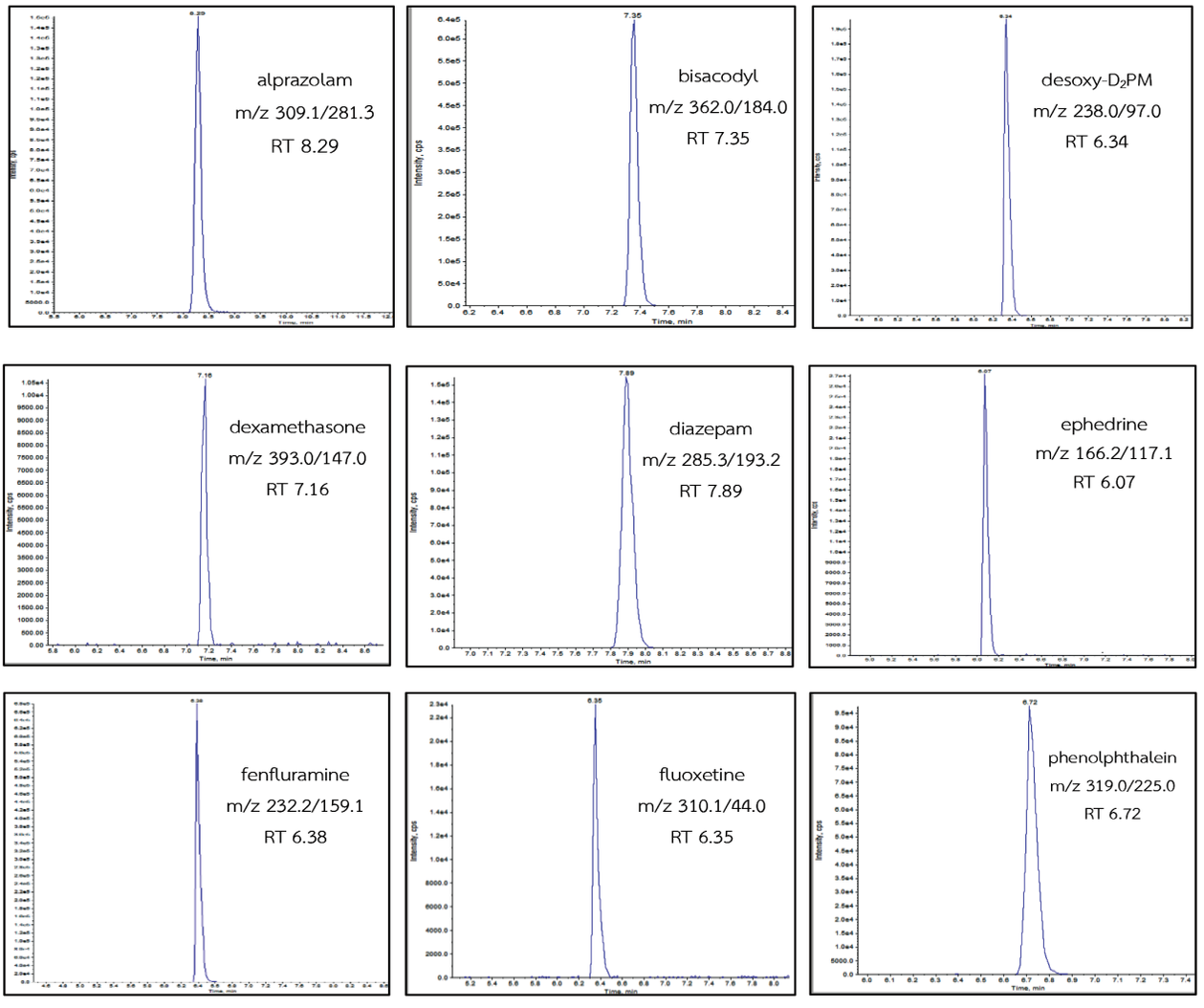
วิเคราะห์เพื่อทดสอบสัดส่วนของโอกาสจากผลการวิเคราะห์ สำหรับการตรวจไม่พบสารกลุ่มเป้าหมายที่ให้ผลถูกต้อง โดยวิเคราะห์ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดผง เม็ด แคปซูล และเครื่องดื่ม ที่ไม่มีสารกลุ่มเป้าหมาย ชนิดตัวอย่างละ 100 ซ้ำ ประเมินผลโดยคำนวณตามสมการ[19]

$$\text{negative predictive value} = \frac{\text{number of true negative}}{\text{total number of negative}}$$

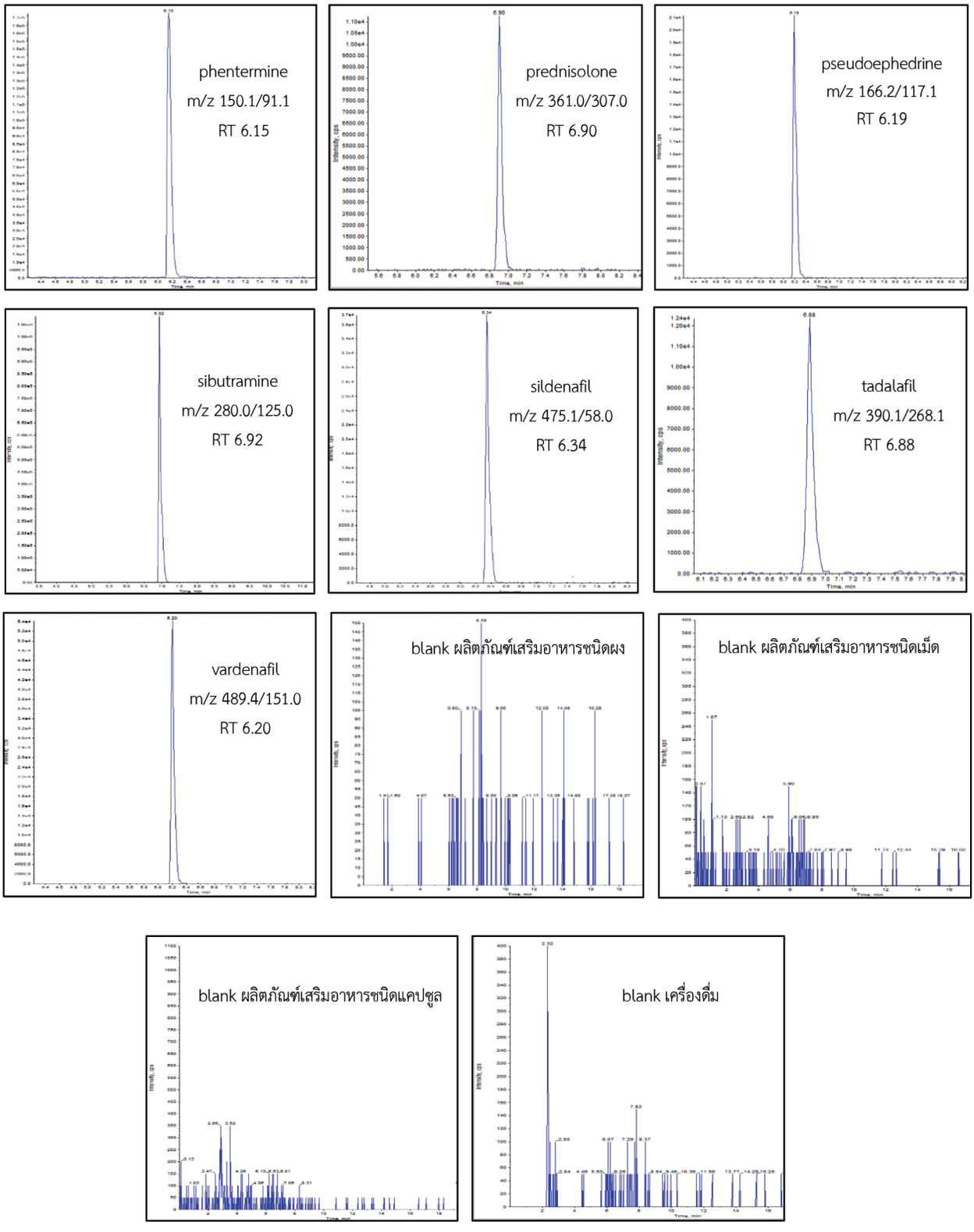
ผล

ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์

จากการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มเป้าหมาย 16 ชนิด โดยวิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ตามสภาวะที่กำหนด วิเคราะห์สารละลายตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งผ่านการสกัดตามวิธีที่พัฒนาจากการทดสอบเติมสารกลุ่มเป้าหมายลงใน matrix blank พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถตรวจพบสารกลุ่มเป้าหมายทั้ง 16 ชนิด ตรวจสอบ specificity พบว่า ion ratio และ retention time (RT) ของสารละลายตัวอย่างแตกต่างจาก ion ratio และ RT เฉลี่ยของสารมาตรฐาน จากการตรวจสอบด้วยระบบ system suitability ไม่เกินร้อยละ 20 และ 2 ตามลำดับ และวิเคราะห์ matrix blank พิจารณาโครมาโทรแกรมของตัวอย่างไม่พบสัญญาณที่มีค่า RT และค่า m/z ที่ตรงกับสารมาตรฐาน วิธีนี้จึงมีความจำเพาะเจาะจง ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานยาแผนปัจจุบัน 16 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS และ matrix blank ของตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดผง เม็ด แคปซูล และเครื่องดื่ม



ภาพที่ 1 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานยาแผนปัจจุบัน 16 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS และ matrix blank ของตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดผง เม็ด แคปซูล และเครื่องดื่ม(ต่อ)

ขีดจำกัดการตรวจวิเคราะห์สำหรับการยืนยันผลบวก (cut-off) และความใช้ได้ของวิธีการสกัดในตัวอย่าง

การยืนยัน cut-off โดยสกัดตัวอย่างที่ไม่มีการเติมสารกลุ่มเป้าหมาย (matrix blank) และตัวอย่างที่มีการเติมสารกลุ่มเป้าหมาย ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ชนิดตัวอย่างละ 100 ซ้ำ พบว่าทุกตัวอย่างที่ไม่มีการเติมสารกลุ่มเป้าหมาย ไม่ทำให้เกิดผลบวก ส่วนตัวอย่างที่เติมสารกลุ่มเป้าหมายให้ผลบวกทั้ง 16 ชนิด ในทุกตัวอย่าง ดังนั้นที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถใช้เป็นจุด cut-off ได้ ดังแสดงในตารางที่ 2 และ 3 และใช้ค่าดังกล่าวเป็นค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD) ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดผง เม็ด แคปซูล และเครื่องดื่ม เนื่องจากผลการทดสอบพบว่า ตัวอย่างทุกประเภทตรวจพบสารมาตรฐานยาแผนปัจจุบันทั้ง 16 ชนิด ตามหลักเกณฑ์มาตรฐานการตรวจพบที่กำหนด[19] และตัวอย่างที่ไม่มีการเติมสารกลุ่มเป้าหมาย พบว่าตรวจไม่พบสารกลุ่มเป้าหมายในทุกชนิดตัวอย่างเช่นกัน

ตารางที่ 2 การทดสอบขีดจำกัดการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดผง เม็ด แคปซูล และเครื่องดื่ม สำหรับการยืนยันผลที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ชนิดสาร	ชนิดผง		ชนิดเม็ด		ชนิดแคปซูล		ชนิดเครื่องดื่ม	
	Conc. (mg/kg)	%rec	Conc. (mg/kg)	%rec	Conc. (mg/kg)	%rec	Conc. (mg/kg)	%rec
alprazolam	4.15	83.00	4.23	84.60	4.30	86.00	4.14	82.80
bisacodyl	4.77	95.40	3.98	79.60	3.77	75.40	3.96	79.20
desoxy-D2PM	4.34	86.80	4.25	85.00	4.81	96.20	3.91	78.20
dexamethasone	4.09	81.80	3.83	76.60	3.86	77.20	4.86	97.20
diazepam	4.21	84.20	4.76	95.20	3.75	75.00	4.11	82.20
ephedrine	4.23	84.60	4.19	83.80	3.80	76.00	4.36	87.20
fenfluramine	4.12	82.40	4.40	88.00	4.13	82.60	4.17	83.40
fluoxetine	4.71	94.20	4.16	83.20	4.31	86.20	4.33	86.60
phenolphthalein	3.85	77.00	3.79	75.80	3.79	75.80	4.00	80.00
phentermine	4.19	83.80	4.07	81.40	3.78	75.60	3.89	77.80
prednisolone	4.36	87.20	3.95	79.00	3.75	75.00	3.92	78.40
pseudoephedrine	4.43	88.60	4.16	83.2	4.28	85.60	4.02	80.40
sibutramine	4.27	85.40	4.08	81.60	3.98	79.60	3.98	79.60
sildenafil	4.29	85.80	4.29	85.80	5.16	103.20	5.06	101.20
tadalafil	3.84	76.80	4.66	93.20	3.80	76.00	3.93	78.60
vardenlafil	3.90	78.00	4.17	83.40	5.02	100.40	4.60	92.00

ตารางที่ 3 การยืนยันขีดจำกัดการตรวจวิเคราะห์สำหรับตัดสินผลบวก (cut-off) ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และผลการทดสอบในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารประเภทต่าง ๆ

	samples above cut-off (n)	**sample below cut-off (n)**	**total sample**
positive test	100	0	100
negative test	0	100	100
ประเภทตัวอย่าง			
ชนิดผง	100	0	100
ชนิดเม็ด	100	0	100
ชนิดแคปซูล	100	0	100
เครื่องดื่ม	100	0	100

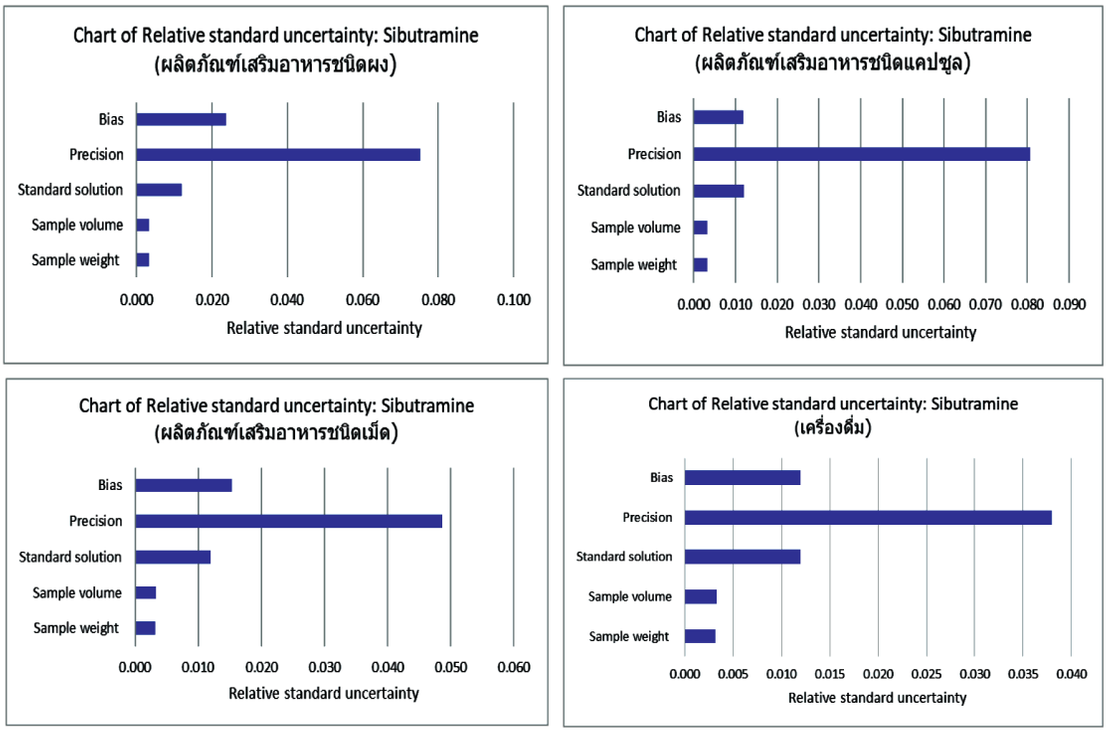
การทดสอบค่า %diagnostic sensitivity, %diagnostic specificity, %PPV และ %NPV

วิธีที่พัฒนาขึ้นมีค่า %diagnostic sensitivity, %diagnostic specificity, %PPV และ %NPV เท่ากับ 100% แสดงให้เห็นว่าความน่าจะเป็นของผลการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ไม่มีการเติมสารกลุ่มเป้าหมายให้ผลเป็นลบจริง 100% และความน่าจะเป็นของผลการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีการเติมสารกลุ่มเป้าหมาย 16 ชนิด ให้ผลเป็นบวกจริง 100% ดังนั้นวิธีที่พัฒนาขึ้นจึงมีความไวต่อการวิเคราะห์มีความจำเพาะและข้อมูลมีความน่าเชื่อถือ

จากขั้นตอนการสกัดโดยชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารทั้ง 4 ประเภท น้ำหนัก 1.000±0.05 กรัม ทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซึ่งขั้นตอนนี้มีการทดลองและศึกษาปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพผลการวิเคราะห์ โดยมีการปรับค่า pH ในช่วง 1.5–2.5, 2.5–3.5 และ 3.5–4.5 เพื่อให้การสกัดมีประสิทธิภาพสูงสุดและได้สารกลุ่มเป้าหมายครบทุกชนิด พบว่าที่ช่วง pH 2.5–3.5 เป็นช่วงที่เหมาะสมที่สุด สามารถสกัดสารกลุ่มเป้าหมายได้ครบทุกสารและให้ผลการวิเคราะห์ดีที่สุด ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถตรวจพบสารอยู่ในช่วงความเข้มข้น 3.84–4.77 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม คิดเป็นร้อยละการคืนกลับพบว่าอยู่ในช่วง 76.8–95.4 ซึ่งอยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับ[17] ดังนั้นจึงเลือกใช้วิธีการสกัดที่ช่วง pH 2.5–3.5 ด้วยตัวทำละลาย methanol:H_2O อัตราส่วน 70:30

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ (measurement uncertainty)

การประเมินค่าความไม่แน่นอน โดยใช้เกณฑ์การคำนวณจากค่า standard deviation ซึ่งค่าความไม่แน่นอนที่เหมาะสมควรน้อยกว่า 2 เท่าของ predicted Horwitz'z RSDr[20] โดยค่าความไม่แน่นอนที่ควรจะเป็นจากการคำนวณของ sibutramine ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดผง เม็ด แคปซูล และเครื่องดื่ม ที่ระดับ 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เท่ากับ 8.00%, 8.26%, 5.26% และ 4.18% ตามลำดับ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (k = 2) ทั้งนี้การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีนี้ได้นำค่าความไม่แน่นอนจากทุกแหล่งมาพิจารณา ประกอบด้วย sample weight, sample volume, concentration of sample, precision และ bias ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 Chart of relative standard uncertainty ของการวิเคราะห์สาร sibutramine ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารประเภทต่าง ๆ จากแหล่งความไม่แน่นอน

วิจารณ์

ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารประเภทต่าง ๆ ที่เป็นตัวแทนในการศึกษาทั้งชนิดผง เม็ด แคปซูล และเครื่องดื่ม พบว่าผลิตภัณฑ์เสริมอาหารแต่ละประเภทมีลักษณะและส่วนประกอบหลักที่แตกต่างกัน ได้แก่ ผลิตภัณฑ์ชนิดผงและแคปซูล พบว่ามีส่วนประกอบของน้ำตาลหรือสารให้ความหวานที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ มีส่วนผสมของวิตามิน แร่ธาตุ และสมุนไพรชนิดต่าง ๆ ซึ่งส่งผลรบกวนต่อระบบการตรวจวิเคราะห์ ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดเม็ด พบว่าเม็ดยามีน้ำตาลหรือฟิล์มเป็นตัวเคลือบ มีส่วนประกอบของสมุนไพรหลายชนิด ตัวยาละลายช้า ความสม่ำเสมอของตัวยาน้อย ซึ่งยากต่อการสกัดสารกลุ่มเป้าหมายออกจากตัวอย่าง ส่วนผลิตภัณฑ์ชนิดเครื่องดื่มที่มีลักษณะเป็นน้ำใสและตะกอนแขวนลอย มีส่วนประกอบของสมุนไพรและน้ำเป็นหลัก พบว่าผลิตภัณฑ์ที่อยู่ในรูปของของเหลวจะมีการสลายตัวของสารกลุ่มเป้าหมายได้ง่ายเมื่ออยู่ในรูปของสารสกัด จึงได้ทำการศึกษาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีในทุกชนิดตัวอย่างเพื่อให้มั่นใจในความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์จนได้สภาวะที่เหมาะสมที่สุด และเมื่อนำวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ไปใช้จะให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่ถูกต้อง ไม่เกิดผลวิเคราะห์ลวง

โดยสกัดด้วย MeOH:H_2O อัตราส่วน 70:30 สารกลุ่มเป้าหมายถูกสกัดออกมาอยู่ในชั้นของสารละลาย ยกเว้นตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดเครื่องดื่มที่ตัวอย่างจะรวมเป็นเนื้อเดียวกันกับสารละลาย เนื่องจากคุณสมบัติความมีขั้วของน้ำ และ methanol ปรับสภาพสารสกัดให้อยู่ในรูปของกรด[5] ที่มีค่า pH อยู่ในช่วง 2.5–3.5 ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมกับสารกลุ่มเป้าหมายทั้งหมดที่ต้องการวิเคราะห์ เนื่องจากคุณสมบัติของสารที่เป็น hydrophilic เลือกใช้ methanol แทนการใช้ acetonitrile และ dichloromethane ที่มีงานวิจัยยืนยันว่า methanol สามารถสกัดสารกลุ่มเป้าหมายออกจากตัวอย่างทั้ง 4 ประเภทได้ดี[20] หลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีที่มีคลอรีนและกลุ่มไซยาไนด์เป็นองค์ประกอบที่เป็นอันตราย การหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิติดลบ (–4 องศาเซลเซียส) เป็นการกำจัดไขมันในตัวอย่างและทำการกรองสารละลายด้วย micro-spin filter ขนาด 0.2

ไมโครเมตร ชนิด PVDF เพื่อลดการรบกวนจาก matrix ของตัวอย่าง เนื่องจากผลิตภัณฑ์เสริมอาหารมีส่วนประกอบที่หลากหลายทั้งน้ำตาล ครีมเทียม ไขมัน และสีองค์ประกอบของสมุนไพร

เทคนิค LC-MS/MS สามารถวิเคราะห์สารได้หลายชนิดในเวลาเดียวกัน ช่วงความเข้มข้นกว้างตั้งแต่ระดับ ppb ถึง ppm และสามารถเลือก m/z ได้ทั้ง positive และ negative mode ตรงตามคุณสมบัติของสารเป้าหมายที่ต้องการวิเคราะห์ รวมทั้งสามารถปรับตั้งค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ จากหลักการทำงานของเครื่อง เพื่อให้สารมีความจำเพาะมากยิ่งขึ้น สร้างความเชื่อมั่นในการยืนยันผลการตรวจวิเคราะห์[14,15] จึงเลือกใช้เทคนิค LC-MS/MS ในการตรวจวิเคราะห์ยาแผนปัจจุบันหรือสารกลุ่มเป้าหมายที่ปลอมปนในผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ซึ่งการวิเคราะห์กลุ่มสารเป้าหมายนี้สามารถทำได้หลายเทคนิค เช่น TLC แต่เป็นการตรวจวัดเบื้องต้นเท่านั้น และ GC-MS มีความยากต่อการเตรียมตัวอย่าง ซึ่งมีส่วนประกอบที่หลากหลาย โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร และใช้ปริมาตรของสารสกัดตัวอย่างมากกว่าเทคนิค LC-MS/MS[21] จากการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ LC-MS/MS ที่มีความไว (sensitivity) และความจำเพาะสูง (specificity) ใช้หลักการ mass spectrometry ตรวจวัด ion ของสารที่แยกกันด้วยค่ามวลต่อประจุ (mass-to-charge ratio, m/z) ที่แตกต่างกันจึงมีความจำเพาะสูง และเลือกใช้เทคนิค electrospray ionization (ESI) เพื่อให้เกิด ionization ดียิ่งขึ้น โดยการเติมสาร 0.1% formic acid ซึ่งเป็นสาร additives ทำให้การแยกของสารที่ต้องการออกจาก matrix ได้ดียิ่งขึ้น ป้องกันการเกิด co-elute และ detector ชนิด MRM ตรวจวัดโดยเลือกค่าที่เหมาะสมสำหรับประจุแม่ (precursor ion) และประจุลูก (product ion) ที่ได้จากการแตกตัวของประจุแม่ ซึ่งเป็นค่าที่เฉพาะเจาะจงของประจุแม่กับประจุลูกคู่นั้น ๆ โดย quadrupole ที่ 1 จะถูกตั้งค่าความต่างศักย์และความถี่ที่เหมาะสม เพื่อให้ก๊าซเฉื่อยวิ่งชนทำให้เกิด fragmentation ส่งประจุแม่ผ่านไปยัง quadrupole ที่ 2 หรือที่เรียกว่า collision cell แตกตัวให้ประจุลูกที่เสถียรและเป็นเอกลักษณ์เฉพาะของประจุแม่เพื่อส่งไป quadrupole ที่ 3 ซึ่งถูกตั้งค่าความต่างศักย์และความถี่ สำหรับประจุลูกแต่ละตัว (product ions) ที่มีค่า response สูงและไม่มีสารอื่นรบกวนการตรวจวิเคราะห์ เช่น alprazolam เลือก m/z 309.100 เป็น precursor ion และเลือก product ion ที่ m/z 281.300 กับ 205.300 ดังแสดงในตารางที่ 1

ยาแผนปัจจุบันถูกกำหนดให้เป็นสารห้ามใช้ในอาหารตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ซึ่งวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถวิเคราะห์ปริมาณของสารได้ต่ำกว่าปริมาณที่ใช้สำหรับการรักษา ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในการวิเคราะห์จึงกำหนดการควบคุมคุณภาพ (internal quality control) เพื่อให้ผลการวิเคราะห์ถูกต้องและมีความมั่นใจในผลการวิเคราะห์ ตัวอย่างทุก batch ทำการทดสอบ method blank, matrix blank, duplicate analysis และ spike sample ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วง 70-110 และเลือก identification point ซึ่งเป็นระบบการคิดเพื่อยืนยันชนิดยาในการแปลผลข้อมูล โดยการใช้จำนวน parent ion เริ่มต้น กับ daughter ion กำหนดค่าความแตกต่างสูงสุดที่ยอมรับได้ (maximum permitted tolerance) ของ relative ion intensities และเปรียบเทียบค่า RT ของสารละลายมาตรฐาน โดยกำหนดความแตกต่างสูงสุดที่ยอมรับได้ของ relative RT ตามกำหนดตามเกณฑ์มาตรฐาน Codex Alimentarius International Food Standards, Revision 2012, 2014[17] ส่วนการยืนยันขีดจำกัดการตรวจวัดสำหรับการตัดสินผลบวก (cut-off) ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยเลือกใช้ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดผง เม็ด แคปซูล และเครื่องดื่ม เป็นตัวแทนมีการเติมและไม่เติมสารกลุ่มเป้าหมาย ชนิดตัวอย่างละ 100 ซ้ำ ถึงแม้ว่ามาตรฐานดังกล่าวระบุให้มีการทดสอบ positive test และ negative test อย่างละ 30 ซ้ำ ต่อชนิดตัวอย่าง สำหรับ cut-off แต่งานวิจัยนี้ได้ตระหนักถึงส่วนผสมของตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารทั้งชนิดผง เม็ด แคปซูล และเครื่องดื่ม ซึ่งมีส่วนประกอบหลากหลายผสมอยู่ เช่น คอลลาเจน แอล-อาร์จินีน ซิงค์อะมิโน-แอซิดคีเลต โครเมียมพิโคลิเนต ไคโตซาน อะเซโรล่าเชอร์รี่ วิตามิน ไฟเบอร์ น้ำตาล กรดอะมิโน โปรตีนจากถั่วเหลือง สมุนไพร ตังกุย ผงไซเลี่ยมฮักส์ ผงต้นข้าวสาลี สารให้ความหวาน สารสกัดจากส้ม สารสกัดจากส้มแขก สาร

สกัดจากโกจิเบอร์รี่ สารสกัดจากถั่งเช่า สารสกัดว่านชักมดลูก สารสกัดจากเจียวกู่หลาน สารสกัดจากเมล็ดกาแฟ สารสกัดจากพริกไทยดำ สารสกัดจากกระบองเพชร สารสกัดจากถั่วข้าว สารสกัดจากเมล็ดองุ่น สารสกัดกวาวเครือขาว สารสกัดจากทับทิม สารสกัดดอกกุหลาบ สารสกัดจากหอยนางรม และสารสกัดจากยีสต์ เป็นต้น จึงทำให้ผู้วิจัยได้รวบรวมตัวอย่างแต่ละชนิดที่มีส่วนประกอบผสมอยู่ในผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างกันให้ได้มากที่สุด เพื่อศึกษาปัจจัยรบกวนที่อาจจะส่งผลต่อการตรวจวิเคราะห์ยาแผนปัจจุบัน เมื่อคำนวณผล พบว่ามีค่า %diagnostic sensitivity, %diagnostic specificity, %PPV และ %NPV อยู่ที่ 100% แสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะสูง ไม่มีโอกาสเกิดผลบวกลวงและลบลวง สร้างความมั่นใจและความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ว่าสามารถตรวจวิเคราะห์ยาแผนปัจจุบันได้ครอบคลุมตัวอย่างที่มีส่วนประกอบหลากหลายได้

การตรวจวิเคราะห์การปลอมปนยาแผนปัจจุบันในผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เริ่มเปิดบริการตรวจวิเคราะห์ตั้งแต่ ปี พ.ศ. 2550 โดยใช้เทคนิค HPLC สำหรับการตรวจวัดยาทั้ง 16 ชนิด ใช้วิธีการสกัดและตรวจวิเคราะห์ชนิดสาร 3 วิธี เพื่อให้ครอบคลุมชนิดยาทั้งหมด จึงใช้ระยะเวลานาน การตรวจวิเคราะห์ของแต่ละวิธีต้องใช้อุปกรณ์และสารเคมีที่แตกต่างกันทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย หากพบชนิดยาดังกล่าวต้องทำการยืนยันผลการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS และ GC-MS อีกครั้ง ส่งผลให้การรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ล่าช้าไม่ทันต่อความต้องการของผู้ใช้บริการ โดยเฉพาะในกรณีคดีความ กรณีพิเศษ และเร่งด่วน ดังนั้นจึงทำการศึกษาและพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์การปลอมปนยาแผนปัจจุบัน 16 ชนิด ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารทั้ง 4 ประเภท ด้วยเทคนิค LC-MS/MS เพื่อตอบสนองต่อภารกิจและปริมาณตัวอย่างที่ส่งตรวจวิเคราะห์จำนวนมาก จากการพัฒนาวิธี พบว่าสามารถลดต้นทุนค่าใช้จ่าย ใช้ปริมาณสารเคมีน้อย สามารถตรวจวิเคราะห์ชนิดยาทั้ง 16 ชนิด ได้ในวิธีเดียวกัน โดยใช้ระยะเวลาในการสกัดตัวอย่างน้อยกว่าวิธีเดิม 8 เท่า ถึงแม้มีกฎหมายบังคับห้ามใช้ยาในผลิตภัณฑ์โดยเด็ดขาดจึงไม่จำเป็นต้องรายงานผลปริมาณการปลอมปนยาที่ตรวจพบเชิงปริมาณ แต่วิธีที่พัฒนาสามารถวิเคราะห์สารเชิงปริมาณได้

เมื่อพิจารณาค่าความไม่แน่นอนเพื่อนำไปใช้กรณีผลการวิเคราะห์อยู่ในช่วงการตัดสินใจ (พบ/ไม่พบ) โดยใช้เกณฑ์การคำนวณจากค่า standard deviation ซึ่งค่าความไม่แน่นอนที่เหมาะสมควรน้อยกว่า 2 เท่าของ predicted Horwitz'z RSDr[22] โดยค่าความไม่แน่นอนที่ควรจะเป็นจากการคำนวณของ sibutramine ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดผง เม็ด แคปซูล และเครื่องดื่ม ที่ระดับ 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เท่ากับ 8.00%, 8.26%, 5.26% และ 4.18% ตามลำดับ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (k = 2) ซึ่งพบว่ามีความสมเหตุสมผลของความไม่แน่นอน ดังแสดงในภาพที่ 2 การเปรียบเทียบสัดส่วนค่าความไม่แน่นอนจากแหล่งความไม่แน่นอนที่ส่งผลต่อปริมาณสาร sibutramine พบว่าความเที่ยงมีค่ามากที่สุดในทุกตัวอย่าง ดังนั้นจึงพิจารณาค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับในทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ตามมาตรฐาน Codex[17] ซึ่งต้องอยู่ในช่วงร้อยละ 70-110 โดยเติมสารกลุ่มเป้าหมายที่ระดับความเข้มข้นระดับ 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ลงใน matrix blank และทำการสกัดตามขั้นตอนการวิเคราะห์เช่นเดียวกับตัวอย่าง เพื่อเป็นการตรวจสอบผลกระทบจากลักษณะตัวอย่าง (matrix effect) ที่อาจเกิดขึ้นในขั้นตอนการสกัด นอกจากนี้การเลือกใช้สารมาตรฐานและเครื่องมือที่มีค่าความไม่แน่นอนน้อย มีผลทำให้ค่าความไม่แน่นอนของวิธีลดลงได้เช่นกัน ทั้งนี้การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีนี้ได้นำค่าความไม่แน่นอนจากทุกแหล่งมาพิจารณา ประกอบด้วย sample weight, sample volume, concentration of sample, precision และ bias การรายงานผลตัวอย่างที่พบปริมาณสารปลอมปนใกล้ค่า cut-off ต้องพิจารณานำค่าความไม่แน่นอนมาใช้เป็นแนวทางในการรายงานผลการทดสอบด้วยทุกครั้ง เพื่อให้เป็นไปตามกฎการตัดสินผลทดสอบ ทั้งนี้วัตถุประสงค์ของการเลือกใช้ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารของผู้บริโภคส่วนใหญ่เป็นการตอบสนองต่อความต้องการ โดยเน้นการให้ผลลัพธ์ที่รวดเร็วจนนำมาสู่การฉวยโอกาสของผู้ประกอบการในการเติมสารต้องห้ามลงในผลิตภัณฑ์เพื่อกระตุ้นยอดขาย ผลการตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างจริง พบว่าปริมาณปลอมปนกลุ่มยามีค่าปริมาณที่น้อยที่สุดที่ 5 เท่า และมากที่สุดที่ 96,000 เท่า ของ cut-off

จากรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจากห้องปฏิบัติการสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ในปีงบประมาณ พ.ศ. 2564-2565 พบว่าในปีงบประมาณ พ.ศ. 2564 ตัวอย่างจำนวน 599 ตัวอย่าง พบการปลอมปน 81 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 13.5 และปีงบประมาณ พ.ศ. 2565 ตัวอย่างจำนวน 579 ตัวอย่าง พบการปลอมปน 79 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 13.6 โดยชนิดยาที่ตรวจพบมากที่สุด คือ sildenafil เป็นยากระตุ้นสมรรถภาพทางเพศ sibutramine เป็นยาควบคุมน้ำหนัก และพบยากลุ่มอื่น ได้แก่ bisacodyl, desoxy-D2PM, dexamethasone, fluoxetine, prednisolone และ tadalafil นอกจากนี้พบผลิตภัณฑ์ที่มีการปลอมปนชนิดยา 2 ชนิด ในตัวอย่างเดียวกัน ลักษณะเสริมฤทธิ์กัน เช่น พบ bisacodyl รวมกับ sibutramine หรือ dexamethasone รวมกับ prednisolone หรือ fluoxetine รวมกับ sibutramine หรือ sildenafil รวมกับ tadalafil และพบ 3 ชนิดยารวมกัน ได้แก่ fluoxetine, sibutramine และ sildenafil นอกจากนี้วิธีวิเคราะห์ยาแผนปัจจุบันที่ปลอมปนในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารโดยเทคนิค LC-MS/MS ได้รับการขึ้นทะเบียนเป็นห้องปฏิบัติการที่ผ่านการรับรองความสามารถตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 ของสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ และเปิดให้บริการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น โดยเริ่มใช้ตราสัญลักษณ์การรับรองมาตรฐานดังกล่าวในวันที่ 25 มีนาคม พ.ศ. 2565

สรุป

การตรวจวัดยาแผนปัจจุบันที่มีการปลอมปนในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารด้วยเทคนิค LC-MS/MS ที่ได้พัฒนาขึ้นสามารถใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารเป้าหมายได้ 16 ชนิด ได้แก่ alprazolam, bisacodyl, desoxy-D_2PM, dexamethasone, diazepam, ephedrine, fenfluramine, fluoxetine, phenolphthalein, phentermine, prednisolone, pseudoephedrine, sibutramine, sildenafil, tadalafil และ vardenafil โดยมีความจำเพาะต่อชนิดของสารเป้าหมายที่ทำการวิเคราะห์ มีขีดจำกัดการตรวจวัดที่ต่ำ ไม่เกิดผลบวกลวงและผลลบลวง แสดงถึงความถูกต้องแม่นยำ ความน่าเชื่อของผลวิเคราะห์ ใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์สั้น ผลการตรวจวิเคราะห์เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐาน สามารถนำวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดผง เม็ด แคปซูล และเครื่องดื่ม ที่มีส่วนประกอบ ลักษณะผลิตภัณฑ์ และสถานะของตัวอย่างที่แตกต่างกันได้ ดังนั้นวิธีดังกล่าวสามารถนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ เพื่อดำเนินคดีความควบคุมคุณภาพอาหารตามกฎหมาย คุ้มครองผู้บริโภค และรองรับกฎหมายของประเทศต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นางลัดดา แก้วกล้าปัญญาเจริญ หัวหน้าห้องปฏิบัติการยาสัตว์และวัตถุออกฤทธิ์ สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ที่สนับสนุนการศึกษาวิจัย และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่าน ที่ช่วยดำเนินการพัฒนาวิธีวิเคราะห์และสนับสนุนในทุกขั้นตอน จนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. กองอาหาร สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่เป็นอันตรายและผิดกฎหมาย. [ออนไลน์]. 2561; [สืบค้น 20 ก.ค. 2564]; [34 หน้า]. เข้าถึงได้ที่ : URL: https://www.fda.moph.go.th/sites/food/FileNews/DangerousSupplements.pdf.
2. กองควบคุมวัตถุเสพติด สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. โรคอ้วนและปัญหาการใช้ยาลดความอ้วน. [ออนไลน์]; [สืบค้น 20 ก.ค. 2564]; [4 หน้า]. เข้าถึงได้ที่ : URL: https://mnfda.fda.moph.go.th/narcotic/?p=6079.
3. กองยา สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. ข้อมูลยาสำหรับบุคลากรทางการแพทย์ ยาเพรดนิโซโลน (Prednisolone) 2.5 มิลลิกรัม ชนิดเม็ด 5 มิลลิกรัม ชนิดเม็ด และชนิดแคปซูล. [ออนไลน์]; [สืบค้น 20 ก.ค. 2564]; [31 หน้า]. เข้าถึงได้ที่ : URL: http://ndi.fda.moph.go.th/uploads/drug_doc/SPC-Prednisolone-Tablet-19-5-59_edit_13-4-61.pdf.

4. กองยา สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. เดกซาเมทาโซน 0.25, 0.5, 4 มิลลิกรัม ชนิดเม็ด. [ออนไลน์]; [สืบค้น 20 ก.ค. 2564]; [2 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: http://ndi.fda.moph.go.th/uploads/drug_doc/PIL_Dexamethasone_Tab_025.pdf.
5. Singh S, Prasad B, Savaliya AA, Shah RP, Gohil VM, Kaur A. Strategies for characterizing sildenafil, vardenafil, tadalafil and their analogues in herbal dietary supplements, and detecting counterfeit products containing these drugs. TrAC Trends Anal Chem 2009; 28(1): 13-28.
6. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 293 (พ.ศ. 2548) เรื่อง ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 122 ตอนพิเศษ 150 ง (วันที่ 28 ธันวาคม 2548).
7. สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ระบุชื่อวัตถุออกฤทธิ์ พ.ศ. 2561. [ออนไลน์]. 2561; [สืบค้น 21 ก.ค. 2564]. เข้าถึงได้ที่ : https://website.bdn.go.th/th/knowledge/detail/qQScZUtk.
8. กองยา สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ยาควบคุมพิเศษ. [ออนไลน์]. [สืบค้น 21 ก.ค. 2564]. เข้าถึงได้ที่ : https://www.fda.moph.go.th/sites/drug/SitePages/Law03-03.aspx.
9. กองยา สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ยาอันตราย. [ออนไลน์]. [สืบค้น 21 ก.ค. 2564]. เข้าถึงได้ที่ : https://www.fda.moph.go.th/sites/drug/SitePages/Law03-04.aspx.
10. สำนักยาและวัตถุเสพติด. วิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจพิสูจน์สารเสพติดในปัสสาวะ เล่มที่ 1. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2558.
11. Phattanawasin P, Sotanaphun U, Sukwattanasini T, Akkarawaranthorn J, Kitchaiya S. Quantitative determination of sibutramine in adulterated herbal slimming formulations by TLC-image analysis method. Forensic Sci Int 2012; 219: 96-100.
12. Lv D, Cao Y, Lou Z, Li S, Chen X, Chai Y, et al. Rapid on-site detection of ephedrine and its analogues used as adulterants in slimming dietary supplements by TLC-SERS. Anal Bioanal Chem 2015; 407(5): 1313-25.
13. Minh DTC, Thi LA, Huyen NTT, Vu LV, Anh NTK, Ha PTT. Detection of sildenafil adulterated in herbal products using thin layer chromatography combined with surface enhanced Raman spectroscopy: "Double coffee-ring effect" based enhancement. J Pharm Biomed Anal 2019; 174: 340-7.
14. Woo H, Kim JW, Han KM, Lee JH, Hwang IS, Kim J, et al. Simultaneous analysis of 17 diuretics in dietary supplements by HPLC and LC-MS/MS. Food Addit Contam Part A 2013; 30(2): 209-17.
15. Shi Y, Sun C, Gao B, Sun A. Development of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of eight adulterants in slimming functional foods. J Chromatogr A 2011; 1218: 7655-62.
16. World Health Organization (WHO), Food and Agriculture Organization (FAO). Recommended methods of sampling for the determination of pesticide residues for compliance with MRLs; CAC/GL 33-1999. Rome, Italy: Codex Alimentarius International Food safety Standards; 1999.
17. World Health Organization (WHO), Food and Agriculture Organization (FAO). Guidelines for the design and implementation of national regulatory food safety assurance programme associated with the use of veterinary drugs in food producing animals; CAC/GL 71 2009. Adopted 2009, Revision 2012, 2014. Rome, Italy: Codex Alimentarius International Food safety Standards; 2017.

18. Drug Dosage. [online]; [cited 2021 Jul 20]; [4 screens]. Available from: URL: https://www.drugs.com/dosage.
19. Annex D-notes on qualitative analysis. In: Magnusson B, Ömemark U, editors. Eurachem guide: the fitness for purpose of analytical methods a laboratory guide to method validation and related topics. 2nd ed. United Kingdom: Eurachem; 2014. p. 56-58.
20. Rocha T, Amaral JS, Oliveira MBPP. Adulteration of dietary supplements by the Illegal addition of synthetic drugs: a review. Compr Rev Food Sci Food Saf 2016; 15: 43-62.
21. LC-MS/MS in drugs of abuse testing for target screening and quantitative confirmation. [online]; [cited 2021 Jul 20]; [4 screens]. Available: URL: https://chromsystems.com/en/lc-ms-ms-in-drugs-of-abuse-testing-for-target-screening-and-quantitative-confirmation.
22. ทิพวรรณ นิ่งน้อย. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549.

The Method Development of Modern Drugs Adulterated in Dietary Supplement Products by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

Kanyarat Chuakunchat, Witthawat Wangkaewhiran, Atcharee Inkaew, Saovanee Wajasit, Suwimol Muadmah, Sakulrat Somsuntisuk, and Thongsuk Payanan

Bureau of Quality and Safety of Food, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT The dietary supplement products that claim to aid in weight loss, enhance sexual performance, improve skin health, or cure health problems might be intentionally adulterated with psychotropic substances or modern drugs. Misusing these substances can lead to serious health issues or even death. This study aimed to develop the qualitative analysis method for detecting the adulteration of 16 modern drugs, which are commonly used in dietary supplement products, including powder, tablet, capsule and beverages. The extraction method involved dissolving the sample in a MeOH:H_2O (70:30) solution and adjusting its pH to acid and then the extraction solution was analyzed by LC-MS/MS after a 10-fold dilution. This developed method provided a limit of detection for confirming (cut-off) at 5 mg/kg for all categories of the sample. The validation indicated that this method showed 100% of %diagnostic sensitivity, %diagnostic specificity, %positive predictive value, and %negative predictive value. Moreover, it was simultaneously used to analyze 16 modern drugs in a single run that reducing the use of chemical substances and time consuming. Overall, this developed method is highly beneficial for ensuring that dietary supplement products comply with the laws and for consumer protection.

Keywords: Method development, Modern drugs, Dietary supplement products, LC-MS/MS