Journal of Professional Routine to Research Volume 2, August 2015: 54-62

การตรวจยาขับปัสสาวะโดยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวและแมสสเปกโทรมิเตอร์

Simultaneous Determination of Diuretics by UFLC-Mass Spectrometer

รุ่งกานต์ ภู่ตระกรณ์ชัย[1]*, มรกต แก้วกล่ำ[1], ธาริณี อินทอง[1], ธนิต คูสำราญ[1] และ สุพรชัย กองพัฒนากูล[1]

Rungkan Pootrakronchai[1]*, Morakot Kaewklum[1], Tarinee Inthong[1],

Thanit Kusamran[1] and Supornchai Kongpattanakul[1]

บทคัดย่อ

ยาขับปัสสาวะเป็นสารต้องห้ามในนักกีฬาที่กำหนดโดย World Anti-Doping Agency (WADA) สามารถตรวจวิเคราะห์โดยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟีและแมสสเปกโทรมิเตอร์ซึ่งเป็นวิธีที่เคยใช้กันแพร่หลาย แต่มีข้อด้อยคือจำเป็นต้องเตรียมสารตัวอย่างให้เป็นอนุพันธ์ (derivatization)ก่อนการวิเคราะห์อีกทั้งมีข้อจำกัดในการตรวจวัดยาขับปัสสาวะใหม่บางชนิดดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้นำเทคนิคการตรวจวิเคราะห์โดยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวและแมสสเปกโทรมิเตอร์มาศึกษา วิจัย และพัฒนาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวัดยาขับปัสสาวะโดยศึกษาสภาวะเหมาะสมและทดสอบความใช้ได้ของวิธีพบว่าสามารถตรวจวัดยาขับปัสสาวะ 20 ชนิดได้พร้อมกันอย่างแม่นยำและเป็นไปตามข้อกำหนดของ WADA ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าวิธีการนี้สามารถนำมาใช้ในงานประจำได้ และอาจพัฒนาประยุกต์เพื่อวิเคราะห์ยาขับปัสสาวะในผลิตภัณฑ์อื่น ๆได้

คำสำคัญ: ยาขับปัสสาวะ/ เทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวและแมสสเปกโทรมิเตอร์/ สารต้องห้ามในนักกีฬา

Abstract

Diuretics are included in the WADA prohibited substances list for athletes. These compounds can be detected by the GC-MS technique, which is effective and has been widely used. However, the GC-MS requires derivatization in the sample preparation step and is limited in sensitivity for the detection of some new diuretics. Therefore, UFLC-MS/MS was developed in this study to improve the analysis and identification of the diuretics for the screening of these compounds as part of sport anti-doping efforts. The conditions for chromatographic separation and mass fragmentations were optimized for reproducible identification of all the compounds. The developed method was validated and found fit-for-purpose for the WADA requirements for screening of the twenty diuretics in anti-doping. The method has potential application for routine analysis of diuretics in other types of samples.

Keywords: Diuretics/ UFLC-MS/MS/ Anti-Doping

1. บทนำ

ยาขับปัสสาวะในทางการแพทย์ใช้เป็นยาที่เพิ่มอัตราการขับถ่ายปัสสาวะเพื่อปรับระดับปริมาณของเหลวในร่างกาย มักใช้ปรับระดับเกลือแร่สำหรับผู้ป่วยที่มีอาการหัวใจล้มเหลว (heart failure)โรคตับแข็ง (liver cirrhosis) ความดันโลหิตสูง (hypertension) และโรคไต (kidney disease) เป็นต้น[1]นอกจากนี้ยาขับปัสสาวะจัดเป็นสารต้องห้ามในนักกีฬาที่กำหนดโดยองค์กรWorld Anti-Doping Agency (WADA) [2] เนื่องจากมีความสามารถในการขับน้ำออกจากร่างกายทำให้มีน้ำหนักลดลงอย่างรวดเร็วซึ่งมีผลต่อนักกีฬาประเภทใช้น้ำหนักเป็นเกณฑ์ ปริมาณน้ำที่ถูกขับออกมากทำให้ความเข้มข้นของสารต่าง ๆในปัสสาวะเจือจางลงอาจเป็น

[1] ศูนย์ตรวจสอบสารต้องห้ามในนักกีฬา มหาวิทยาลัยมหิดล

[1] National Doping Control Centre, Mahidol University

* Corresponding author: rungkan.poo@mahidol.ac.th

เจตนาใช้เป็นสารปกปิดการใช้ยาอื่นๆ [3]ซึ่งการตรวจสอบสารดังกล่าวเป็นพันธกิจหนึ่งของศูนย์ตรวจสอบสารต้องห้ามในนักกีฬา มหาวิทยาลัยมหิดล

ยาขับปัสสาวะมีหลายชนิด การตรวจวัดทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณจึงมีความสำคัญเพื่อให้การใช้ยาเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ วิธีตรวจที่เคยเป็นที่นิยมใช้กันมากคือเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟีและแมสสเปกโทรมิเตอร์ (GC-MS)[4] ซึ่งมีขั้นตอนการเตรียมอนุพันธ์ (derivatization) เพื่อให้สารตัวอย่างระเหยในการวิเคราะห์ซึ่งใช้เวลาและค่าใช้จ่าย[5] อีกทั้งมีข้อจำกัดที่ไม่สามารถตรวจวัดยาขับปัสสาวะบางชนิดได้ในระยะหลังจึงได้มีการพัฒนาใช้ เทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวและแมสสเปกโทรมิเตอร์ (UFLC-MS/MS) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์สารชนิดต่างๆรวมทั้งยาขับปัสสาวะ[6-8] วิธีนี้ลดขั้นตอนโดยไม่ต้องเตรียมอนุพันธ์มีความสะดวกและประสิทธิภาพสูง

ดังนั้นวัตถุประสงค์ในการวิจัยนี้เพื่อพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ยาขับปัสสาวะให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้นโดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวและแมสสเปกโทรมิเตอร์(UFLC-MS/MS) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเพื่อให้การวิเคราะห์สามารถครอบคลุมยาขับปัสสาวะทุกชนิด ด้วยความถูกต้องแม่นยำ ในระดับความเข้มข้นต่ำ (minimum required performance level, MRPL) ให้ได้มาตรฐานตามข้อกำหนดของWADA [9]

2. วัสดุและวิธีการ

2.1 สารเคมี

Cyclopenthiazideและepitizid(อภินันทนาการจาก World Association of Anti-Doping Scientists, WAADS), methylchlorthiazide (Pharmacopeial Convention Inc., USA), สารมาตรฐานยาขับปัสสาวะอื่นๆ (Sigma-Aldrich, USA), Escherichia coli β-glucuronidase (Roche, Germany), tert-butyl-methyl-ether (TBME; AR-Grade) และ acetonitrile (HPLC Grade) จาก RCI Labscan Ltd, Thailand

2.2 เครื่องมือวิเคราะห์

งานวิจัยนี้ใช้เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวและแมสสเปกโทรมิเตอร์(UFLC-MS/MS, Shimadzu, Japan)ประกอบด้วย UFLC (LC20 Prominence Shimadzu, Japan) ใช้คอลัมน์ Luna C18 (ขนาด100 x 2.0 มิลลิเมตรและขนาดอนุภาค 3 ไมโครเมตร)สารถูกชะด้วยอัตราการไหลคงที่ 0.3 มิลลิลิตรต่อนาทีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสโดยเปลี่ยนความเข้มข้นตัวชะB (acetonitrile) ในตัวชะA (0.1% formic acid และ5mM ammonium acetate) ดังนี้: ร้อยละ30 คงที่ (0 -5 นาที), ร้อยละ30-60 (2 นาที), ร้อยละ60 คงที่ (8 นาที), ร้อยละ60-80 (2 นาที), ร้อยละ80 คงที่ (1 นาที)และปรับล้างคอลัมน์ด้วยร้อยละ80-30 (1 นาที), ร้อยละ30 คงที่ (4 นาที) รวมเวลาทั้งหมด 23 นาที สารที่ถูกชะจากคอลัมน์ถูกทำให้แตกตัวเป็นไอออนด้วยเทคนิคESI (electrospray ionization)โดยใช้ทั้งระบบอนุภาคที่มีประจุบวกและประจุลบควบคู่กัน ที่แรงดันไฟฟ้า 1.76 กิโลโวลต์ และวิเคราะห์เอกลักษณ์ของขนาดมวลต่อประจุ (m/z) โดยวิธี MRM (multiple reaction monitoring)

2.3 การเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างปัสสาวะถูกสกัดด้วยเทคนิคการสกัดด้วยของเหลว (liquid-liquid extraction) สองขั้นตอน [7] ที่ดัดแปลงเพื่อให้เหมาะสมกับห้องปฏิบัติการของศูนย์ตรวจสอบสารต้องห้ามในนักกีฬา โดยนำตัวอย่างปัสสาวะ(2.5 มิลลิลิตร) เติมสารมาตรฐานของยาขับปัสสาวะชนิดต่างๆรวมทั้งสารมาตรฐานภายใน(internal standard, IS, 17α-methyltestosterone) ตามความเข้มข้นที่ต้องการทำการย่อยด้วยเอนไซม์Escherichia coli β-glucuronidase ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อสลายสารประกอบเชิงซ้อนในปัสสาวะให้อยู่ในรูปอิสระทั้งหมดปรับสภาพความเป็นเบสโดยเติม 250 ไมโครลิตรของสารละลายโปแตสเซียมคาร์บอเนต(ร้อยละ5)จากนั้นสกัดด้วย TBME(5 มิลลิลิตร)โดยใช้เครื่องเขย่าอัตโนมัติเป็นเวลา 20 นาที และใช้เครื่องหมุนเหวี่ยงสารให้ตกตะกอน(3,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที) เพื่อแยกชั้นสารละลายนำสารละลายอินทรีย์ (TBME) ที่อยู่ส่วนบนไประเหยให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน และนำส่วนเป็นน้ำด้านล่างที่เหลือปรับสภาพความเป็นกรดอีกครั้งด้วยการเติม150 ไมโครลิตรของสารละลายกรดเกลือ(3M HCl)ทำการสกัดซ้ำด้วยTBME(5 มิลลิลิตร) โดยการเขย่าและเหวี่ยงสารให้ตกตะกอนนำสารละลายอินทรีย์ส่วนบนรวมใส่ในหลอดทดลองเดิมที่เคยนำส่วนแรกไปทำให้แห้ง ตามด้วยการทำให้แห้งอีกครั้ง แล้วจึงละลายตะกอนทั้งหมดที่สกัดได้ด้วย

acetonitrile (40 ไมโครลิตร) และน้ำ (60 ไมโครลิตร) เพื่อนำไปฉีดเข้าเครื่อง UFLC-MS/MS ต่อไป

2.4 การทดสอบความใช้ได้ของวิธี (method validation)

เพื่อให้เป็นไปตามข้อกำหนดของ ISO 17025:2005 ทุกวิธีการที่มีการพัฒนาต้องมีการทดสอบความใช้ได้ของวิธี ซึ่งในงานวิจัยนี้ประกอบด้วย

2.4.1 LOD (limit of detection) คือ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ โดยพิจารณาจากค่าอัตราส่วนสัญญาณต่อสัญญาณกวน (signal-to-noise ratio) $\geq$ 3ในงานวิจัยนี้ใช้ตัวอย่างปัสสาวะ7 แหล่งที่ทดสอบแล้วว่าไม่มีสารต้องห้าม นำมาเติมสารมาตรฐานของยาขับปัสสาวะ ที่ระดับความเข้มข้น 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (MRPL) และลดความเข้มข้นลงครึ่งหนึ่ง เป็นลำดับ รวม 4 ลำดับ

2.4.2 การได้กลับคืนของการสกัด (recovery) เป็นการหาค่าคืนกลับของการสกัดที่ความเข้มข้น 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (MRPL) จาก 3 ตัวอย่างปัสสาวะ โดยคำนวณจากค่าเฉลี่ยอัตราส่วนของพื้นที่พีคกับสารมาตรฐานภายใน (IS) ของตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานก่อนการสกัดต่ออัตราส่วนของพื้นที่พีคกับสารมาตรฐานภายใน (IS) ที่เติมสารมาตรฐานหลังการสกัด

2.4.3ความสม่ำเสมอของเครื่องมือ (repeatability) โดยพิจารณาจากระดับความถูกต้องใกล้เคียงกันของพื้นที่จากการวัด 10 ครั้งในช่วงเวลาใกล้เคียงกันของสารที่ระดับความเข้มข้นMRPL โดยกำหนดให้ร้อยละของความคลาดเคลื่อนน้อยกว่า 15 [10]

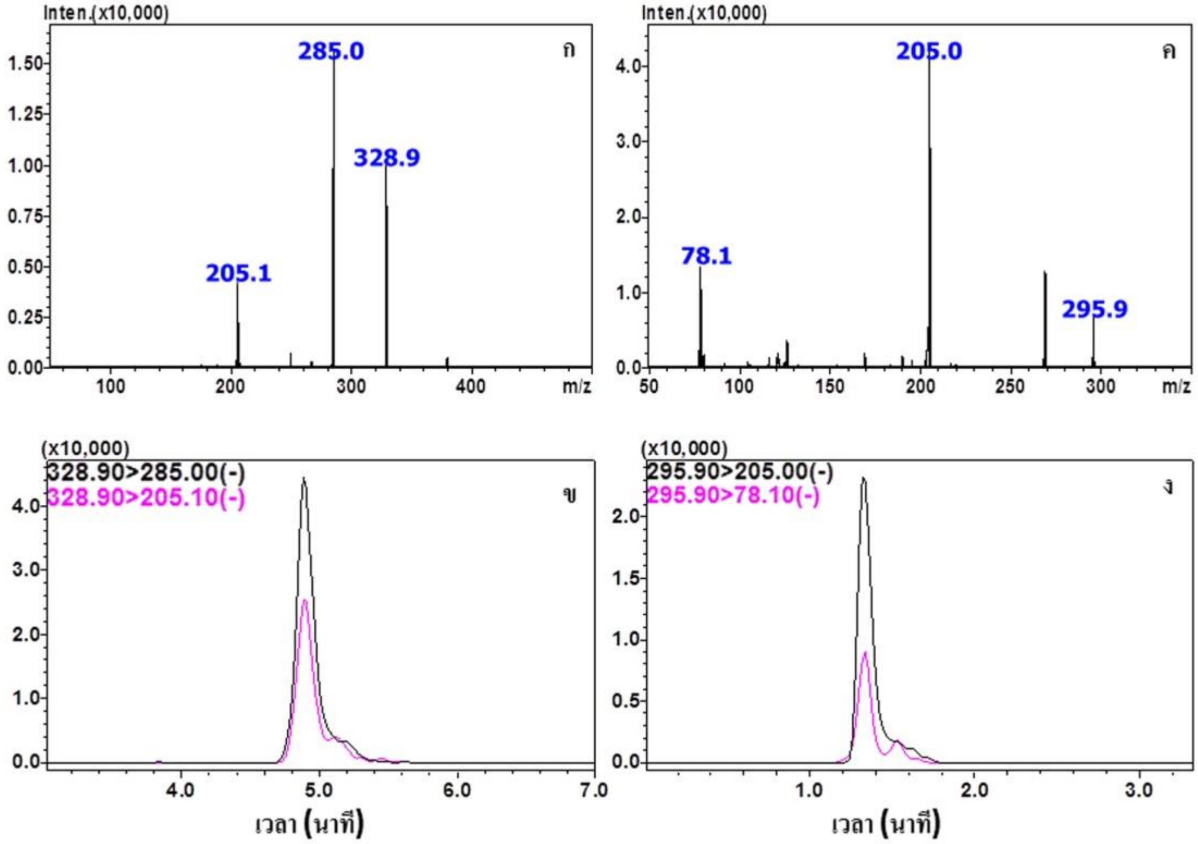
3. ผลการวิจัยและอภิปรายผล

จากผลการวิจัยพบเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวและแมสสเปกโทรมิเตอร์ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถใช้ในการวิเคราะห์ยาขับปัสสาวะ 20 ชนิดที่ใช้กันมากในปัจจุบันได้อย่างมีประสิทธิภาพ สารที่สกัดได้ถูกวิเคราะห์โดยตรงไม่ต้องผ่านการเตรียมสารอนุพันธ์ก่อนการวิเคราะห์ซึ่งนอกจากจะช่วยลดค่าใช้จ่ายในขั้นตอนดังกล่าวแล้ว ยังสามารถลดระยะเวลาการสกัดสารตัวอย่างจากเดิม 7 ชั่วโมงลงเหลือเพียง 4 ชั่วโมงได้อีกด้วย

วิธีการสกัดด้วยของเหลวเป็นวิธีที่สะดวกประหยัดค่าใช้จ่าย และใช้งานง่าย การสกัดสองขั้นตอนโดยการปรับตัวอย่างปัสสาวะให้อยู่ในสภาพเบสและกรด สามารถสกัดยาขับปัสสาวะมาตรฐานทุกชนิดที่ตรวจสอบซึ่งมีคุณสมบัติทั้งเบสและกรดแตกต่างกันได้ในการสกัดเพียงครั้งเดียวเพื่อให้ยาขับปัสสาวะแต่ละชนิดถูกวิเคราะห์อย่างจำเพาะ และแม่นยำในเวลาเดียวกัน จึงต้องทำการทดลองเพื่อพัฒนาและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการหาค่าเอกลักษณ์ของยาดังกล่าว โดยนำสารมาตรฐานของยาแต่ละชนิดมาทำการทดสอบ ดังแสดงเป็นตัวอย่างการปรับสภาวะที่เหมาะสมของ furosemide และ hydrochlorothiazide (ภาพที่ 1)ซึ่งเป็นยาขับปัสสาวะที่พบการใช้มากสูงสุดในนักกีฬาทั่วโลกในปี 2556 จากการรวบรวมสถิติของ WADA [11]สาร furosemide มีมวลโมเลกุล 330.0 ดาลตันถูกชะออกจากคอลัมน์ที่เวลา 4.90 นาทีเมื่ออยู่ในระบบที่มีอนุภาคประจุลบ (negative mode)สารจะแตกตัวที่แมสสเปกโทรมิเตอร์ขั้นแรกได้ขนาดมวลต่อประจุ(m/z) ของไอออน 328.90 เมื่อปรับสภาวะการแตกตัวขั้นที่สองให้เหมาะสมจะได้ขนาดมวลต่อประจุของไอออนสองชนิด คือ 285.00 และ 205.10 ในสภาวะเหมาะสม (optimum condition)จะได้พบไอออนทั้งสามชนิดในอัตราส่วนที่เหมาะสม (ภาพที่ 1 ก) ไอออนเหล่านี้เป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัว (characteristic ions) ของ furosemide และแสดงเป็นโครมาโตแกรมได้ เมื่อตรวจสอบโดยวิธีแบบ MRM (ภาพที่ 1ข) ภาพที่ 1ค การปรับสภาวะได้ทำนองเดียวกันของ hydrochlorothiazide ซึ่งมีมวลโมเลกุล 297.0 ดาลตัน และถูกชะออกจากคอลัมน์ที่เวลา 1.33 นาทีเมื่อแตกตัวในระบบที่มีอนุภาคประจุลบ (negative mode) จะได้ไอออนขนาดมวลต่อประจุ 295.90 และเมื่อแตกตัวต่อจะให้ไอออนอีกสองขนาดคือ 205.00 และ78.10 (ภาพที่ 1ค)ดังปรากฏเป็นโครมาโตแกรมเมื่อใช้วิธีแบบ MRM (ภาพที่ 1ง)จะเห็นได้ว่าเวลาชะและไอออนที่เกิดขึ้นในการแตกโมเลกุลเป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัว (characteristic ion) ของยาแต่ละชนิด

จากการทดสอบสารมาตรฐานของยาขับปัสสาวะทั้ง 20 ชนิดได้ค่าสภาวะที่เหมาะสม (optimum condition) เพื่อใช้แยก และวิเคราะห์ยาดังกล่าวในเวลาเดียวกันได้อย่างจำเพาะและถูกต้อง(ตารางที่1) โดยใช้ความแตกต่างของเวลาในการชะสารออกจากคอลัมน์และไอออนจากการแตกตัวของโมเลกุลอันเป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัวของสารค่าของไอออนเอกลักษณ์ที่เกิดขึ้นจากการแตกตัวในวิธีMRM transition ที่พัฒนาขึ้นนี้ยังคงเหมือนค่ามาตรฐานในรายงานการวิเคราะห์อื่น ๆ[6,12] สำหรับ เวลาในการชะ และพลังงานที่ใช้ในการแตกตัว มีค่าแตกต่างจากรายงานอื่นดังกล่าว ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของเครื่องมือในการ

วิเคราะห์และวิธีการทางโครมาโตกราฟีที่พัฒนาให้มีความเหมาะสมและประสิทธิภาพสูงสุดในการปฏิบัติงานของศูนย์ตรวจสอบสารต้องห้ามในนักกีฬา มหาวิทยาลัยมหิดล



ภาพที่ 1 การหาเวลาชะและไอออนที่เป็นเอกลักษณ์จากการแตกตัวของ furosemide และhydrochlorothiazide (ก) แสดงแมสสเปกตรัมการแตกตัวของ furosemide และ(ค) hydrochlorothiazide (ข) แสดงเวลาชะและโครมาโตแกรมของไอออนที่เป็นเอกลักษณ์การแตกตัวของ furosemide ที่มีขนาดไอออน 285.00 (เส้นสีดำ) และ 205.10 (เส้นสีชมพู)และ(ง)hydrochlorothiazide ที่มีขนาดไอออน 205.00 (เส้นสีดำ) และ78.10 (เส้นสีชมพู)

ตารางที่ 1 สภาวะเหมาะสมและค่าเอกลักษณ์ในการวิเคราะห์ยาขับปัสสาวะมาตรฐาน 20 ชนิดโดยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวและแมสสเปกโทรมิเตอร์

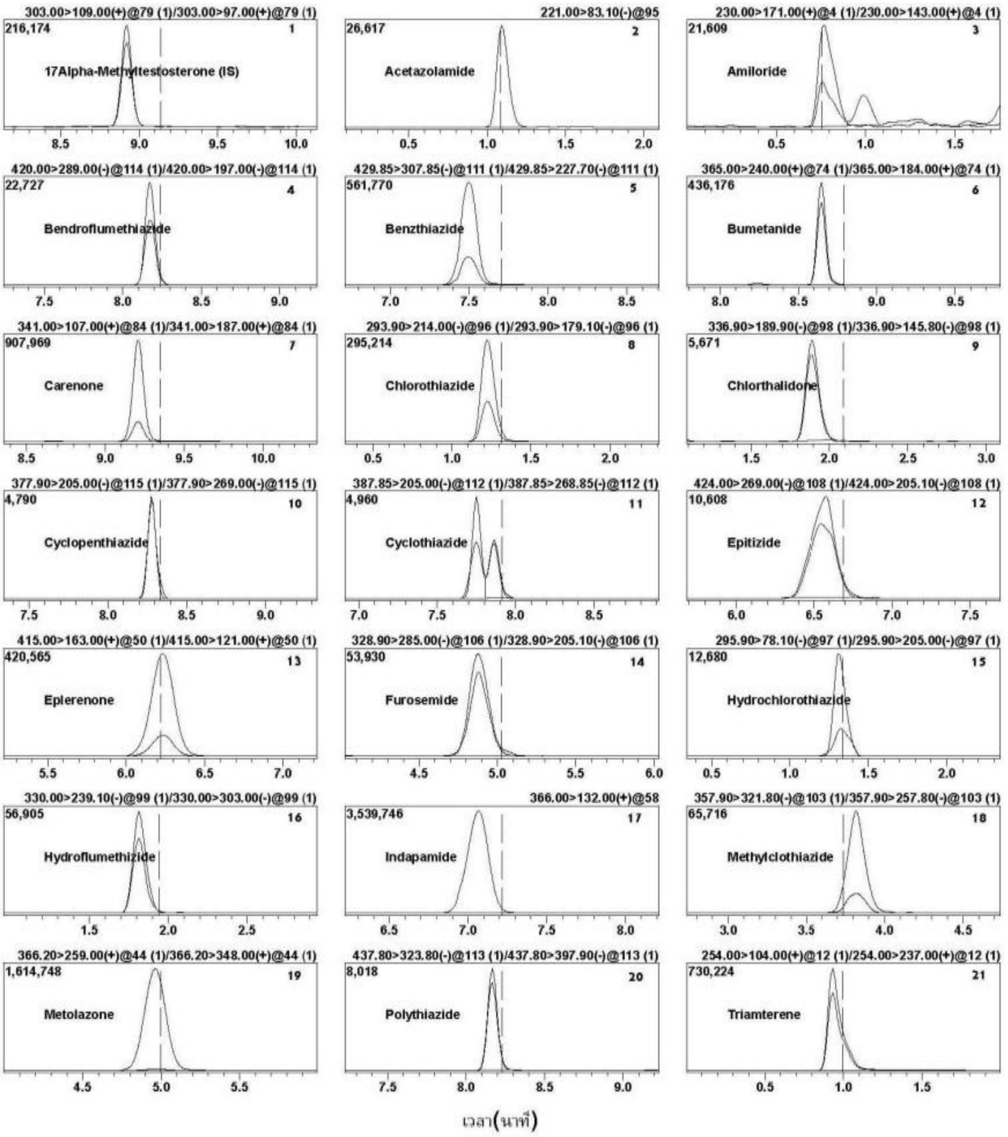
	ยาขับปัสสาวะ	มวลโมเลกุล	เวลาสัมพัทธ์*	พลังงานในการแตกตัว (eV)	ประจุในการแตกตัว	MRM transition (มวลต่อประจุ)
1	Acetazolamide	222.0	0.12	24	Negative	221.00 > 83.10
2	Amiloride	229.0	0.08	18	Positive	230.00 > 171.00, 143.00
3	Bendroflumethiazide	421.0	0.92	24	Negative	420.00 > 289.00, 197.00
4	Benzthiazide	431.0	0.84	24	Negative	429.85 > 307.85, 227.70
5	Bumetanide	364.1	0.97	20	Positive	365.00 > 240.00, 184.00

	ยาขับปัสสาวะ	มวลโมเลกุล	เวลาสัมพัทธ์*	พลังงานในการแตกตัว (eV)	ประจุในการแตกตัว	MRM transition (มวลต่อประจุ)
6	Carenone	340.2	1.03	36	Positive	341.00 > 107.00, 187.00
7	Chlorothiazide	295.0	0.14	30	Negative	293.90 > 214.00, 179.10
8	Chlorthalidone	338.0	0.21	16	Negative	336.90 > 189.90, 145.80
9	Cyclopenthiazide	379.0	0.93	30	Negative	377.90 > 205.00, 269.00
10	Cyclothiazide	389.0	0.87	35	Negative	387.85 > 205.00, 268.85
11	Epitizide	425.0	0.74	33	Negative	424.00 > 269.00, 205.10
12	Eplerenone	414.2	0.69	20	Positive	415.00 > 163.00, 121.00
13	Furosemide	330.0	0.55	16	Negative	328.90 > 285.00, 205.10
14	Hydrochlorothiazide	297.0	0.15	38	Negative	295.90 > 78.10, 205.00
15	Hydroflumethizide	331.0	0.21	28	Negative	330.00 > 239.10, 303.00
16	Indapamide	365.1	0.79	18	Positive	366.00 > 132.00
17	Methylclothiazide	359.0	0.43	15	Negative	357.90 > 321.80, 257.80
18	Metolazone	365.1	0.55	20	Positive	366.20 > 259.00, 348.00
19	Polythiazide	439.0	0.91	25	Negative	437.80 > 323.80, 397.90
20	Triamterene	253.1	0.10	42	Positive	254.00 > 104.00, 237.00

* เวลาสัมพัทธ์ เป็นค่าอัตราส่วนเวลาชะสารแต่ละชนิดเทียบกับเวลาชะสารมาตรฐานภายใน (internal standard, IS, 17α-methyltestosterone) ออกจากคอลัมน์

การแสดงผลการวิเคราะห์ในลักษณะโครมาโตแกรมของไอออนของยาขับปัสสาวะทั้ง 20 ชนิด (ภาพที่2) ช่วยให้การอ่านและแปลผลสะดวก รวดเร็ว ถูกต้องแม่นยำโครมาโตแกรมของไอออนที่เป็นเอกลักษณ์ไอออนเดียวจะแสดงเพียง 1พีค เช่น acetazolamide (ภาพที่ 2-2) ถ้ามี 2ไอออนจะปรากฏเป็น2 พีค ซ้อนอยู่ที่เวลาชะที่เดียวกันเช่น furosemide (ภาพที่ 2-14) สารมาตรฐานของยาขับปัสสาวะทุกชนิดจะถูกชะออกที่เวลาคงที่ และการวิเคราะห์ไอออนเอกลักษณ์ให้ความแม่นยำสูง และสม่ำเสมอ แม้ว่าจะปรากฏคล้ายมีสัญญาณรบกวนบ้าง (ภาพที่2-2, 2-8, 2-12) แต่ไม่เป็นอุปสรรคเมื่อการทดสอบความใช้ได้ของวิธี(method validation)(ตารางที่2) นอกจากนั้นยังพบว่าวิธีการนี้สามารถตรวจยาขับปัสสาวะ benzthiazide, cyclopenthiazide, eplerenone, epitizide, methylclothiazide และpolythiazideได้อีกด้วยซึ่งเดิมมีข้อจำกัดในการตรวจโดยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟฟีและแมสสเปกโทรมิเตอร์

การทดสอบความใช้ได้ของวิธี(method validation) ของเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวและแมสสเปกโทรมิเตอร์ที่พัฒนาขึ้นนี้ พบค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้อย่างแม่นยำ (LOD) อยู่ที่ระดับ 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ยกเว้น amiloride และ chlorthalidone อยู่ที่ 100 และ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ (ตารางที่2)

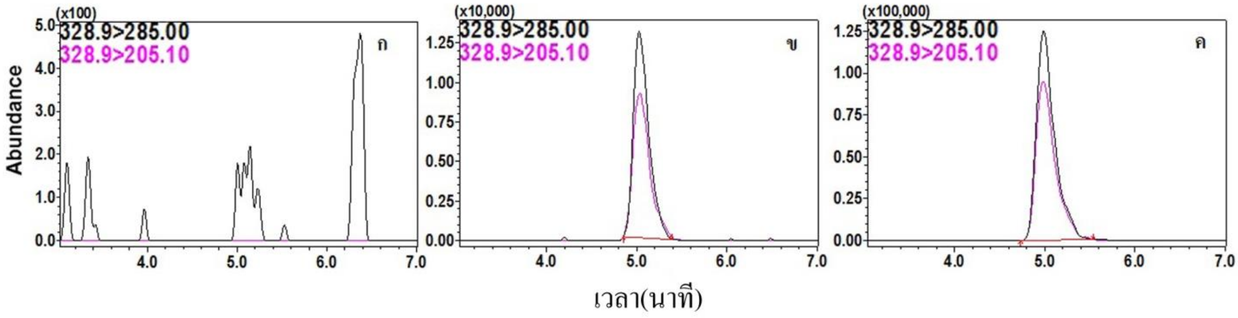


ภาพที่ 2 โครมาโตแกรมแสดงเวลาชะและไอออนที่เป็นเอกลักษณ์ของยาขับปัสสาวะ ทั้ง 20 ชนิดที่ระดับความเข้มข้น 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (2) - (21) พร้อมด้วย 17α- methyltestosterone IS (1) ในแต่ละโครมาโตแกรมแสดงไอออนที่เป็นเอกลักษณ์ในการแตกตัว และปริมาณสัญญาณที่ตรวจวัดได้ รวมทั้งตำแหน่งของเวลาชะที่คาดหมาย (เส้นประ)

ตารางที่ 2 ตารางแสดงผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธี โดยแสดงค่า LOD ร้อยละการได้กลับคืนและ ร้อยละความคลาดเคลื่อน

	ยาขับปัสสาวะ	LOD (ng/ml)	ร้อยละการได้กลับคืน	ร้อยละความคลาดเคลื่อน
1	Acetazolamide	25	28	13
2	Amiloride	100	4	9
3	Bendroflumethiazide	25	36	14
4	Benzthiazide	25	61	3

	ยาขับปัสสาวะ	LOD (ng/ml)	ร้อยละการได้กลับคืน	ร้อยละความคลาดเคลื่อน
5	Bumetanide	25	93	6
6	Carenone	25	95	3
7	Chlorothiazide	25	69	9
8	Chlorthalidone	50	75	9
9	Cyclopenthiazide	25	16	14
10	Cyclothiazide	25	20	14
11	Epitizide	25	34	3
12	Eplerenone	25	89	3
13	Furosemide	25	95	5
14	Hydrochlorothiazide	25	89	11
15	Hydroflumethizide	25	90	14
16	Indapamide	25	93	3
17	Methylclothiazide	25	87	6
18	Metolazone	25	87	3
19	Polythiazide	25	96	11
20	Triamterene	25	19	10



ภาพที่ 3 ตัวอย่างการตรวจพบสาร furosemide ในตัวอย่างปัสสาวะของนักกีฬาในการแข่งขัน
ก) ตัวอย่างปัสสาวะควบคุมแสดงผลลบ ข) ตัวอย่างปัสสาวะควบคุมแสดงผลบวกและ
ค) ตัวอย่างปัสสาวะของนักกีฬาที่ตรวจพบสาร furosemide
ระดับสัญญาณของทั้ง 3 ตัวอย่างมีอัตราส่วนขยายเป็น (×100, ×10,000, ×100,000) เท่าตามลำดับ

ซึ่งเป็นไปตามมาตรฐานกำหนดในการตรวจสารต้องห้ามในนักกีฬาของWADA ที่ว่าวิธีการจะใช้ได้เมื่อค่า LOD ต้องมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับครึ่งหนึ่งของ MRPL[9] ในการสกัดยาขับปัสสาวะมาตรฐาน 20 ชนิดโดยของเหลวสองขั้นตอนร่วมกับ TBME ซึ่งช่วยแก้ปัญหาการสกัดยาขับปัสสาวะส่วนใหญ่ที่มีส่วนประกอบของซัลเฟตได้ [13] โดยพบว่าร้อยละของการได้กลับคืนมีค่ามากกว่าร้อยละ 30 ยกเว้น acetazolamide, amiloride, triamterene, cyclopean-thiazide และ cyclothiazide แต่เนื่องจากการใช้ TBME ในวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ช่วยให้สามารถสกัดสารกลุ่มอื่น ๆที่ละลายได้ดีในTBMEและทำการวิเคราะห์ควบคู่ไปพร้อมกับยาขับปัสสาวะได้ในคราวเดียว เพราะเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวและแมสสเปกโทรมิเตอร์สามารถตรวจวัดด้วยความไวและความแม่นยำสูง จึงสามารถชดเชยในการตรวจวัดสำหรับสารที่มีร้อยละการได้กลับคืนต่ำได้ ส่วนร้อยละของความคลาดเคลื่อนที่เกิดจากเครื่องมือวิเคราะห์มีค่าอยู่ระหว่าง 3-14 น้อยกว่าร้อยละ 15 ซึ่งเป็นเกณฑ์ที่ยอมรับได้ [10,14]

เพื่อเป็นการทดสอบการใช้งาน ได้นำวิธีดังกล่าวไปใช้ในการตรวจคัดกรองสารต้องห้ามของนักกีฬาในการแข่งขันจริง และสามารถตรวจพบ furosemide อย่างชัดเจน (ภาพที่ 3) แสดงถึงประโยชน์ในการประยุกต์ใช้วิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นจากข้อมูลข้างต้นสามารถสรุปได้ว่าวิธีการทดสอบที่ถูกพัฒนามีความใช้ได้ของวิธีการตามวัตถุประสงค์ (fit-for-purpose) จึงสามารถนำกลับมาประยุกต์ใช้กับงานประจำได้อีกทั้งวิธีดังกล่าวยังสามารถนำไปพัฒนาต่อเนื่องเพื่อใช้ตรวจสารต้องห้ามในกลุ่มอื่น ๆ เช่น กลุ่มยาเบต้า-บล็อกเกอร์ หรือ กลุ่มยาเสพติดหรือตัวอย่างประเภทอื่น ๆ จากคนไข้ ยาลดน้ำหนัก ยาแผนโบราณ สมุนไพร หรืออาหารอื่น ๆได้

4. เอกสารอ้างอิงและบรรณานุกรม

1. Jackson EK. Diuretics. In: Brunton L, Lazo J, Parker K, editors. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 11th edn. New York: McGraw-Hill; 2006. pp. 737-770.
2. World Anti-Doping Agency. The 2015 Prohibited List. International Standard, Montreal. 2015 (cited 2015 March 24). Available from: https://www.wada-ama.org /en/what-we-do/prohibited-list.
3. Amendola L, Colamonici C, Mazzarino M , Botrè F. Rapid determination of diuretics in human urine by gas chromatography-mass spectrometry following microwave assisted derivatization. Analytica Chimica Acta 2003; 475: 125-136.
4. Trout GJ, Kazlauskas R. Sports drug testing--an analyst's perspective. Chem Soc Rev. 2004; Jan 10;33(1):1-13.
5. Carreras D, Imaz C, Navajas R, Garcia MA, Rodriguez C, Rodriguez AF, Cortes R. Comparison of derivatization procedures for the determination of diuretics in urine by gas chromatography-mass spectrometry. J. Chroma togr. A 1994 Oct 14; 683(1): 195-202.
6. Deventer K, Van Eenoo P, Delbeke FT. Simultaneous determination of beta-blocking agents and diuretics in doping analysis by liquid chromatography/mass spectrometry with scan-to-scanpolarity switching.RapidCommun Mass Spectrom 2005; 19(2):90-85.
7. Mazzarino M, Torre X, Botrè F. A screening method for the simultaneous detection of glucocorticoids, diuretics, stimulants, anti-oestrogens, beta-adrenergic drugs and anabolic steroids in human urine by LC-ESI-MS/MS. Anal Bioanal Chem 2008 Oct; 392(4): 681-698.
8. Mazzarino M, Fiacco I, Torre X, Botrè F. A mass spectrometric approach for the study of the metabolism of clomiphene, tamoxifen and toremifene by liquid chromatography time-of-flight spectroscopy. Eur. J. Mass Spectrom 2008; 14(3): 171-180.
9. WorldAnti-Doping Agency.Minimum required performance levels for detection and identification of non-threshold (cited 2015 March24). Available fromhttps://www.wada-ama.org/en/resources/sciencemedicine/td2014-mrpl.

10. Committee for medical products for human use European medicines agency science medicines health. Guideline on bioanalytical method validation. London; 21 July 2011.
11. World Anti-Doping Agency. 2013 Laboratory Report Anti-Doping Testing Figures. 2013 (cited 2015 March 24). Available from: https://www.wada-ama.org/en/resources/laboratories/2013-anti-doping-testing-figures-laboratory-report.
12. Bogusz MJ, Hassan H, Al-Enazi E, Ibrahim Z, Al-Tufail M. Application of LC-ESI-MS-MS for detection of synthetic adulterants in herbal remedies. J Pharm Biomed Anal 2006 May 3; 41(2): 554-564.
13. Catrin G, Graham T, Rymantas K . Rapid screening method for diuretics in doping control using automated solid phase extraction and liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. Analytica Chimica Acta 2004 January 23; 502 (1): 65-74.
14. Jimenez C, Ventura R, Segura J. Validation of qualitative chromatographic methods: strategy in antidoping control laboratories. Journal of Chromatography B 2002 February 15; 767 (2): 341-351.