



วารสาร ไทยโกชัยอิมพ์เนร์

ปีที่ 2 ฉบับเดือนสิงหาคม 2548 (หน้า 167-178)

บทความเป็นวิทยาทาน สำหรับการศึกษาต่อเนื่องทางเภสัชศาสตร์



## การประยุกต์ใช้ลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสส์สเปกโทรเมตรี (Application of Liquid-Chromatography and Mass spectrometry)

ภญ.พศ.ดร.ชุตินา ลิ้มมัททาภิรัตน์  
ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร  
วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ อ.เมือง จ.นครปฐม 73000

รหัส 1-000-SPU-000-0508-01  
จำนวน 2.0 หน่วยกิตการศึกษาต่อเนื่อง  
วันที่รับรอง 1 สิงหาคม พ.ศ. 2548  
วันที่หมดอายุ 1 สิงหาคม พ.ศ. 2550

### วัตถุประสงค์เชิงพฤติกรรม

1. เพื่อให้ผู้อ่านได้ทราบถึงหลักการเบื้องต้นของลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสส์สเปกโทรเมตรี
2. เพื่อให้ผู้อ่านแล้ถึงถึงความสำคัญของลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสส์สเปกโทรเมตรี ในการนำไปใช้งานด้านต่าง ๆ
3. เพื่อให้ผู้อ่านได้ทราบถึงข้อดีและข้อเสียของลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสส์สเปกโทรเมตรี

### บทคัดย่อ

ในปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสส์สเปกโทรเมตรี (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS) มาใช้ในการวิเคราะห์สารหลายชนิด เช่น ยาและเมแทบอลิท์ของยา ยาฆ่าแมลง ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ และสารมลพิษ เป็นต้น โดยเป็นการศึกษาในเชิงคุณภาพและปริมาณวิเคราะห์ ซึ่งได้แก่ การวิเคราะห์ยาเพื่อศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ ชีวประสิทธิผล และชีวสมมูล การแยกและการอธิบายโครงสร้างทางเคมีของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ การวิเคราะห์สารมลพิษในอาหารและสิ่งแวดล้อม และการศึกษาทางด้านพิษวิทยา เป็นต้น LC-MS มีข้อดีเหนือกว่าเทคนิคอื่นโดยเฉพาะความไวและความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวิเคราะห์สาร นอกจากนี้ยังสามารถวิเคราะห์สารที่มีขั้วและน้ำหนักโมเลกุลสูงได้เป็นอย่างดี

### คำสำคัญ

ลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสส์สเปกโทรเมตรี ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ สารมลพิษ สารพิษ

### บทนำ

ลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสส์สเปกโทรเมตรี (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS) เป็นเทคนิคขั้นสูงสำหรับการวิเคราะห์สารที่มีความซับซ้อน<sup>1</sup> ตัวอย่าง (sample) จะถูกแยกให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ (column) โดย

เทคนิคที่เรียกว่าโครมาโทกราฟีชนิดของเหลว (liquid chromatography, LC) จากนั้นสารบริสุทธิ์จะถูกตรวจวัดด้วยเครื่องมือแมสสเปกโตรมิเตอร์ (mass spectrometer) การแยกสารด้วย LC เป็นการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่เป็นของเหลว ซึ่งจะถูกบีบเข้าสู่คอลัมน์ที่อยู่ในบรรจุด้วยอนุภาคของแข็งขนาดเล็ก ทำหน้าที่เป็นวัฏภาคคงที่ (stationary phase) การแยกเกิดขึ้นในคอลัมน์ได้ เนื่องจากสารแต่ละชนิดเคลื่อนที่ผ่านวัฏภาคคงที่ด้วยความเร็วที่แตกต่างกัน แมสสเปกโตรเมตรี (mass spectrometry, MS) เป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์สารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ โดยตัวอย่างจะถูกทำให้แตกตัวเป็นไอออนด้วยวิธีต่างๆ เช่น electrospray ionization (ESI), atmospheric pressure chemical ionization (APCI) และ collision-induced decomposition (CID) ในระยะหลังได้พัฒนาการทำให้เกิดไอออนโดยใช้พลังงานต่ำ (soft ionization) เช่น fast atom bombardment ionization (FAB) และ matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) ที่สามารถทำให้เกิดไอออนได้โดยสารไม่สลายตัว จึงเหมาะสำหรับการวิเคราะห์สารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่และระเหยได้ยาก<sup>2,3</sup> เช่น การศึกษาการสลายตัวของชีวภาพ (biodegradation) และการศึกษาเมแทบอลิซึมของยา (drug metabolism) เป็นต้น MS สามารถวิเคราะห์มวลของไอออนที่เกิดขึ้นด้วยวิธีต่างๆ ได้ดังนี้ time of flight (TOF), magnetic sector ion trap และ Fourier-transform ion cyclotron resonance (FTICR) ซึ่งจะทำให้เกิดสเปกตรัม (spectrum) ของไอออนได้อย่างสมบูรณ์ การวิเคราะห์มวลด้วย TOF มีข้อดีที่แตกต่างไปจากวิธีอื่น คือ สามารถบันทึกค่ามวลของไอออนได้ทั้งหมดในเวลาอันรวดเร็ว จึงช่วยลดระยะเวลาในการวิเคราะห์ และในขณะเดียวกันยังให้ผลการวิเคราะห์ที่เชื่อถือได้ แมสสเปกโตรมิเตอร์จะตรวจวัดไอออนที่เกิดขึ้นและปรากฏเป็นพีก (peak) บนสเปกตรัมตามขนาดมวลต่อประจุของไอออน ดังนั้นจึงใช้ MS ศึกษาน้ำหนักโมเลกุลและอธิบายโครงสร้างทางเคมี (structure elucidation) ของสารได้ LC-MS มีความไวในการวิเคราะห์สูง เนื่องจากใช้ปริมาณตัวอย่างเพียงเล็กน้อยในระดับพิโคกรัม (picogram) หรือระดับหนึ่งต่อพันล้านส่วนหรือพีพีบี (part per billion, ppb) เท่านั้น

แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) เป็นการผสมผสานสองเทคนิคเข้าด้วยกัน คือ โครมาโทกราฟีชนิดแก๊ส (gas chromatography, GC) และ MS สารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากการผ่านตัวอย่างไปบนคอลัมน์ GC จะถูกส่งไปยัง MS เพื่อตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลและรูปแบบการแตกตัวของสาร สามารถใช้ GC-MS อธิบายโครงสร้างทางเคมีของสารได้เกือบทุกชนิด โดยการเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลหรือแมสสเปกตรัมของตัวอย่างกับน้ำหนักโมเลกุลหรือแมสสเปกตรัมของสารมาตรฐานที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GC เป็นเทคนิคการแยกสารที่ระเหยได้ออกจากสารผสม ไอของสารจะเคลื่อนที่ไปพร้อมกับแก๊สเฉื่อย (inert gas) ซึ่งทำหน้าที่ในการพาสารเคลื่อนไปในคอลัมน์ สารแต่ละชนิดจะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ด้วยความเร็วแตกต่างกัน โดยขึ้นอยู่กับขนาดโมเลกุลและความสามารถในการกลายเป็นไอ ดังนั้นจึงสามารถแยกสารหลายชนิดออกจากกันได้ สารบริสุทธิ์ที่ถูกแยกออกมาจะเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ไปยังแมสสเปกโตรมิเตอร์ ข้อจำกัดของ GC-MS คือ ไม่สามารถวิเคราะห์สารที่มีขั้วสูงหรือน้ำหนักโมเลกุลสูงได้ เนื่องจากสารเหล่านี้ไม่สามารถกลายเป็นไอได้หมด หรือสารบางชนิดจับกับวัฏภาคคงที่ในคอลัมน์แน่นจนเกินไป รวมทั้งในบางกรณีอุณหภูมิที่ใช้วิเคราะห์สูงจนทำให้สารสลายตัวได้ ดังนั้นการวิเคราะห์สารเหล่านี้จึงต้องอาศัยเทคนิคการทำอนุพันธ์ (derivatization) เข้ามาช่วยเพื่อให้สามารถวิเคราะห์ด้วย GC ได้วัตถุประสงค์ของการทำอนุพันธ์ คือ เพิ่มการกลายเป็นไอของสาร ลดความเป็นขั้วของสาร ลดการเสื่อมสลายของสารจากความร้อน เพิ่มการตอบสนองของเครื่องตรวจวัด และเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกสาร เป็นต้น GC-MS เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงในการวิเคราะห์คุณภาพน้ำดื่ม น้ำเสีย การตรวจคุณภาพของบรรยากาศโดยตรวจวัดสารอินทรีย์ที่ระเหยได้ซึ่งปนเปื้อนอยู่ในอากาศ การตรวจหาสารพิษในทางนิติเวช การวิเคราะห์ยา และการพิสูจน์เอกลักษณ์สารแต่งกลิ่นและรสในอาหาร เป็นต้น

ลิควิดโครมาโทกราฟี-อัลตราไวโอเล็ตสเปกโทรสโกปี (liquid chromatography-ultraviolet spectroscopy, LC-UV) เป็นการผสมผสานสองเทคนิคเข้าด้วยกัน คือ LC และอัลตราไวโอเล็ตสเปกโทรสโกปี (ultraviolet spectroscopy, UV) ซึ่งอัลตราไวโอเล็ตสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (ultraviolet spectrophotometer) เป็นเครื่องมือพื้นฐานที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการทั่วไป ใช้สำหรับการวิเคราะห์สารอินทรีย์ เมื่อผ่านแสงอัลตราไวโอเล็ตไปยังตัวอย่าง โมเลกุลของสารจะถูกกระตุ้นและดูดกลืนแสงไว้ ปริมาณแสงที่ถูกดูดกลืนที่ความยาวคลื่นหนึ่งๆ เป็นลักษณะเฉพาะตัวของสาร<sup>1</sup> หลักการนี้จึงช่วยบอกถึงองค์ประกอบของตัวอย่างได้ นิยมใช้ LC-UV ในการวิเคราะห์และควบคุมคุณภาพในทางเภสัชกรรม และใช้ในอุตสาหกรรมเคมีและอาหาร เช่น การตรวจหาสารปรุงแต่งกลิ่น สี และรส

หากเปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียระหว่าง LC-MS, GC-MS และ LC-UV พบว่า LC-MS มีความถูกต้อง ความแม่นยำ ความไว และความจำเพาะเจาะจงสูงกว่าเทคนิคอื่น สามารถนำมาวิเคราะห์สารที่มีขั้วและน้ำหนักโมเลกุลสูง (เช่น ยาฆ่าแมลงและสารมลพิษ) ได้ดีกว่า GC-MS อย่างไรก็ตาม GC-MS วิเคราะห์สารที่มีขั้วและน้ำหนักโมเลกุลสูงได้ แต่จำเป็นต้องเตรียมสารให้อยู่ในรูปที่ระเหยได้ง่ายโดยการทำอนุพันธ์ด้วยปฏิกิริยาเคมี ดังนั้นจึงสิ้นเปลืองทั้งเวลาและค่าใช้จ่าย นอกจากนี้ยังใช้ LC-MS วิเคราะห์สารที่ไม่คงตัวต่อความร้อนได้ดีกว่า GC-MS อีกด้วย ข้อเสียของ MS คือ ไม่สามารถให้ข้อมูลเกี่ยวกับเคมีที่เกี่ยวข้องกับระยะอะตอมในโมเลกุล (stereochemistry) ของสารได้ จึงต้องอาศัยข้อมูลจากนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR) หรือข้อมูลจากการวิเคราะห์โครงสร้างผลึกด้วยรังสีเอ็กซ์ (X-ray crystallography) ที่สามารถบอกถึงโครงสร้างทางเคมีของสารในเชิงสามมิติได้เป็นอย่างดี ทั้งนี้สารที่จะใช้กับเทคนิคนี้ได้ต้องสามารถตกผลึกได้ ในปัจจุบันได้พัฒนา LC-MS มาใช้ในงานวิเคราะห์ด้านต่างๆ ทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณวิเคราะห์ เช่น การวิเคราะห์ยาและเมแทบอลิท์เพื่อศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ (pharmacokinetic) ชีวประสิทธิผล (bioavailability) และชีวสมมูล (bioequivalence) การแยกและอธิบายโครงสร้างทางเคมีของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ การวิเคราะห์สารมลพิษในอาหารและสิ่งแวดล้อม การศึกษาทางด้านพิษวิทยา และการใช้ประโยชน์ในด้านอื่น ๆ

### การวิเคราะห์ยาและเมแทบอลิท์

ได้มีการนำ LC-MS มาใช้ศึกษาการดูดซึม การแพร่กระจาย เมแทบอลิซึม และการกำจัด (absorption, distribution, metabolism และ elimination, ADME) ของยาที่ถูกเมแทบอลิท์ในสิ่งมีชีวิต ซึ่งข้อมูลที่ได้จะมีประโยชน์อย่างมากต่อการพัฒนายาเนื่องจาก mass spectrum ช่วยอธิบายโครงสร้างทางเคมีของเมแทบอลิท์ที่เกิดขึ้นได้ นอกจากนี้ LC-MS ยังมีความไวในการตรวจวิเคราะห์ยาและเมแทบอลิท์ที่มีปริมาณน้อยมากในของเหลวทางชีวภาพ อีกทั้งมีความจำเพาะเจาะจงสูงอีกด้วย<sup>4</sup> การทราบถึงเภสัชจลนศาสตร์และกลไกการเปลี่ยนแปลงของยาในสิ่งมีชีวิตจะช่วยปรับปรุงสูตรโครงสร้างทางเคมีของยาให้มีฤทธิ์ดีขึ้นและลดความเป็นพิษลง<sup>5</sup> การวิเคราะห์ยาและเมแทบอลิท์ในเนื้อเยื่อหรือของเหลวในร่างกายสิ่งมีชีวิตมักเป็นกระบวนการที่ทำได้ยากและใช้เวลานาน จึงส่งผลให้กระบวนการพัฒนายาเป็นไปอย่างล่าช้า ดังนั้นจึงได้นำ LC-MS เข้ามาเป็นส่วนหนึ่งของการประเมินค่าทางเภสัชจลนศาสตร์ของยาที่จะพัฒนามาใช้กับมนุษย์ สำหรับคอลัมน์ที่ใช้ร่วมกับ LC-MS เพื่อแยกสารให้บริสุทธิ์นั้นมีหลายชนิด เช่น คอลัมน์ที่แยกสารตามลำดับความมีขั้ว และคอลัมน์ที่แยกสารตามขนาดโมเลกุล เป็นต้น ซึ่งกลไกที่ใช้แยกสารตามขนาดโมเลกุลนี้เรียกว่า size exclusion mechanism โดยโปรตีนหรือชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ที่ปะปนอยู่กับยาจะถูกชะออกจากคอลัมน์ไปก่อน ต่อมา ยาและเมแทบอลิท์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าจะถูกชะตามออกมาในภายหลัง ในปัจจุบันได้มีการนำเทคนิค column switching มาใช้ในการแยกตัวอย่างที่ซับซ้อน โดยมี pre-column ซึ่งเป็นคอลัมน์ตัวแรกที่ช่วยแยกองค์ประกอบในพลาสมาออกไปจากตัวอย่างก่อนที่จะแยกตัวอย่างให้บริสุทธิ์ต่อไปด้วยคอลัมน์ตัวที่สองหรือคอลัมน์วิเคราะห์ (analytical column)

ซึ่งเป็นคอลัมน์ที่มีประสิทธิภาพสูงมากสำหรับการแยกสารให้บริสุทธิ์ ดังนั้นเทคนิคนี้จึงทำให้การแยกสารมีประสิทธิภาพดีขึ้นและประหยัดเวลาในการวิเคราะห์ เนื่องจากคอลัมน์ตัวที่สองสามารถกลับคืนสู่สมดุลได้อย่างรวดเร็ว<sup>6</sup> เพื่อให้การวิเคราะห์ยาและเมแทบอลิทในของเหลวทางชีวภาพมีประสิทธิภาพดีขึ้นจึงได้มีการนำ solid-phase extraction (SPE) มาใช้ร่วมกับ LC-MS ซึ่งช่วยลดระยะเวลาในการวิเคราะห์ได้อย่างมีนัยสำคัญจึงจัดเป็น high-throughput mode สำหรับการศึกษาระดับยาในของเหลวทางชีวภาพ SPE เป็นการแยกสารด้วยคอลัมน์ขนาดเล็กมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร ภายในบรรจุอนุภาคที่มี normal-phase group (silica, polar phase) หรือ reversed-phase group (octyl, C8, nonpolar phase) เป็นต้น การเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมจะสามารถชะสารปนเปื้อนให้หลุดออกมาก่อน แต่สำหรับสารที่ต้องการวิเคราะห์จะถูกจับเอาไว้ ทำให้สารที่ต้องการวิเคราะห์มีความเข้มข้นสูงขึ้นและบริสุทธิ์มากขึ้น จากนั้นจึงชะสารที่ต้องการวิเคราะห์ออกมาด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมกับสารนั้น คอลัมน์สำหรับ SPE นี้มักทำมาจากอนุภาค ชนิดเดียวกันกับที่ใช้ในการเตรียมคอลัมน์สำหรับ high-performance liquid chromatography (HPLC) แต่มีขนาดอนุภาคใหญ่กว่า โดยทั่วไป HPLC จะใช้อนุภาคที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3 ถึง 10 ไมครอน ในขณะที่ SPE จะใช้อนุภาคที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 40 ถึง 80 ไมครอน ขนาดคอลัมน์ของ SPE มีเส้นผ่าศูนย์กลางและความยาวประมาณ 10 และ 75 มิลลิเมตร ตามลำดับ ข้อดีของ SPE คือ ช่วยทำให้สารที่ต้องการวิเคราะห์บริสุทธิ์ขึ้น และมีความเข้มข้นสูงขึ้นโดยใช้ตัวทำละลายเพียงเล็กน้อยเท่านั้น จึงช่วยให้การแยกสารด้วย LC-MS มีประสิทธิภาพดีและรวดเร็วขึ้น ทั้งนี้การวิเคราะห์ยาในของเหลวทางชีวภาพด้วย SPE ร่วมกับ LC-MS จึงได้มีการคัดเลือกยาบางชนิดมาเป็นตัวแทนกลุ่มยาที่หลากหลายเพื่อเป็นแนวทางในการวิเคราะห์ยาทั่วไป โดยปัจจัยที่ใช้ในการคัดเลือก คือ (ก) ความมีขั้วของยา ตัวอย่างยาที่มีขั้ว คือ theobromine และตัวอย่างยาที่ไม่มีขั้ว คือ taxol (ข) ความเป็นกรด-เบสของยา ตัวอย่างยาที่เป็นกรด คือ sulfadiazine และตัวอย่างยาที่เป็นเบส คือ procainamide และ (ค) โครงสร้างทางเคมีของยา ตัวอย่างยาที่มีโครงสร้างทางเคมีเป็นเส้นตรง คือ ranitidine และตัวอย่างยาที่มีโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนอะโรเมติก คือ carbamazepine ผลที่ได้จากวิธีการนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์ยาอื่นๆ ในของเหลวทางชีวภาพได้

ตัวอย่างของงานวิจัยในปัจจุบันที่มีการประยุกต์ใช้ LC-MS สำหรับการวิเคราะห์ยาและเมแทบอลิทอื่นๆ ได้แก่ (ก) การศึกษาเภสัชพลศาสตร์ (pharmacodynamic) ของยาด้านมะเร็งโดยการนำ strong anion exchange-solid phase extraction (SAX-SPE) ซึ่งจัดเป็น SPE ชนิดหนึ่งซึ่งช่วยให้ตัวอย่างสะอาดและเข้มข้นมากขึ้น มาเชื่อมต่อกับ HPLC และทำการอธิบายโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ด้วย atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry (APCI-MS) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค LC-MS ที่ใช้กับเทคนิคอื่นๆ พบว่า LC-MS เป็นเทคนิคที่มีความไวและความจำเพาะเจาะจงสูงกว่า HPLC-UV (high-performance liquid chromatography-ultraviolet spectroscopy) และเป็นวิธีที่สะดวกกว่า GC-MS เนื่องจากไม่ต้องเตรียมยาด้านมะเร็งให้เป็นอนุพันธ์ที่ระเหยง่ายก่อน และยาด้านมะเร็งยังไม่คงตัวต่อความร้อนที่เกิดขึ้นใน GC อีกด้วย<sup>8</sup> (ข) การวิเคราะห์หาปริมาณของยากลุ่ม  $\alpha_2\beta_3$  bone integrin antagonist และเมแทบอลิทในพลาสมาและปัสสาวะเพื่อศึกษาเภสัชจลนศาสตร์โดย high throughput LC-MS ซึ่งยาในกลุ่มนี้มีฤทธิ์ยับยั้งการสลายของกระดูก จึงมีประโยชน์ในการรักษาและป้องกันภาวะกระดูกพรุน (osteoporosis) ในการทดลองนี้เนื่องจากยามีหมู่คาร์บอกซิล (-COOH) อยู่ในโครงสร้างจึงต้องปรับสภาพของการวิเคราะห์ให้เป็นกรดเพื่อให้หมู่คาร์บอกซิลไม่แตกตัวและชอบจับกับ reversed-phase group ที่ใช้เป็นวัฏภาคคงที่ของการวิเคราะห์<sup>9</sup> (ค) การศึกษาชีวสมมูลของ pioglitazone hydrochloride ซึ่งจัดเป็นยาในกลุ่ม thiazolidinedione ที่ใช้รักษาโรคเบาหวาน ในอดีตได้มีการใช้ HPLC-UV ศึกษาชีวสมมูลของยาชนิดนี้ ซึ่งให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่ำและใช้เวลานาน แต่ในปัจจุบันใช้เทคนิคที่มีประสิทธิภาพดีกว่าเดิม คือ direct-injection high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry โดยใช้ rosiglitazone เป็นสารมาตรฐาน ซึ่งยาและสารมาตรฐาน จะมีโครงสร้างทางเคมีที่คล้ายคลึงกันมาก แต่สามารถแยกออกจากกันด้วย HPLC และต่างก็มี mass spectrum ที่แตกต่างกัน จึงสามารถวิเคราะห์หาปริมาณของ pioglitazone ได้ โดยเปรียบเทียบกับปริมาณของสารมาตรฐาน<sup>10</sup> ซึ่ง

เทคนิคใหม่นี้จะช่วยลดขั้นตอนความยุ่งยากในการเตรียมสารตัวอย่างก่อนฉีดเข้า HPLC และสามารถอธิบายโครงสร้างเคมีจากรูปแบบการแตกตัวของสารได้ถูกต้องมากกว่าการใช้อัลตราไวโอเล็ตสเปกโทรโฟโตเมทรี (ง) การติดตามระดับของยาในเลือด (therapeutic drug monitoring, TDM) ของยากดภูมิคุ้มกัน (immunosuppressant) ในการรักษาผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนอวัยวะด้วยยากดภูมิคุ้มกันร่วมกัน 3 ชนิด ที่มีกลไกการออกฤทธิ์ต่างกัน คือ (1) ยาที่ออกฤทธิ์โดยผลิต interleukin-2 (2) ยาที่มีฤทธิ์ยับยั้ง interleukin-2 driven T-lymphocyte proliferation และ (3) glucocorticoids ยาทั้งสามกลุ่มนี้มีฤทธิ์เสริมกันจึงสามารถลดขนาดยาแต่ละชนิดลงได้ ดังนั้นจึงช่วยลดอาการข้างเคียงที่จะเกิดขึ้นจากการใช้ยาแต่ละชนิดในขนาดสูงได้ อย่างไรก็ตามยากดภูมิคุ้มกันมักมีช่วงการรักษาที่ปลอดภัย (therapeutic range) แคบ ดังนั้นการติดตามระดับยาในเลือดของยาเหล่านี้จึงมีความสำคัญมากโดยเฉพาะในผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนอวัยวะ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการวิเคราะห์ระดับยาในเลือดระหว่าง LC-MS และ LC-UV พบว่า LC-MS มีข้อดีกว่า LC-UV เพราะขนาดยาที่ลดลงส่งผลให้ความเข้มข้นของยาแต่ละชนิดในกระแสเลือดลดต่ำลงมาก ทำให้อัลตราไวโอเล็ต-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (ultraviolet-visible spectrophotometer) ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ นอกจากนี้สารอื่นที่สามารถดูดกลืนรังสีได้ในช่วงความยาวคลื่นเดียวกันกับยาที่ต้องการวิเคราะห์ยังส่งผลกระทบต่อวิเคราะห์อีกด้วย<sup>11</sup>

#### การแยกและการอธิบายโครงสร้างทางเคมีของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคการแยกและการอธิบายโครงสร้างทางเคมีของสารจาก LC-UV ไปเป็น LC-MS และ LC-NMR (liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy) จนกระทั่งเป็น LC-MS-NMR (liquid chromatography-mass spectrometry-nuclear magnetic resonance spectroscopy) โดยทั่วไป mass spectrometer สามารถวิเคราะห์สารในระดับพิโคกรัมซึ่งต่ำกว่า nuclear magnetic resonance spectrometer ที่สามารถวิเคราะห์สารได้ในระดับนาโนกรัม (nanogram) แสดงว่า mass spectrometer มีความไวสูงกว่า nuclear magnetic resonance spectrometer ในการศึกษาผลิตภัณฑ์ธรรมชาตินิยมใช้ LC-MS, LC-NMR หรือ LC-MS-NMR เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์สารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาซึ่งมีปริมาณน้อยมากได้ โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีปริมาณต่ำมากซึ่งมักพบในสิ่งมีชีวิตในทะเล<sup>12</sup> ตัวอย่างเช่น (ก) การนำ LC-MS มาศึกษา taurine, hypotaurine และ thiotaurine ที่มีปริมาณต่ำมากและจัดเป็น sulfur amino acid ในเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตในทะเลที่อาศัยอยู่ร่วมกัน (marine symbiotic organism) สารที่แยกได้จะถูกอธิบายโครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิค positive ion mode tandem mass spectrometry จากการทดลองสรุปได้ว่าพบ thiotaurine ได้ในสิ่งมีชีวิตในทะเลที่อาศัยอยู่ร่วมกันในทะเลลึกเท่านั้น<sup>13</sup> (ข) การนำ reversed-phase HPLC มาใช้ร่วมกับ MALDI-TOF-MS (matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry) เพื่อศึกษา  $\alpha$ -amidated neuropeptide ในสมองของ red swamp crayfish ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตในทะเลชนิดหนึ่ง โดยเริ่มจากการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วย HPLC จากนั้นจึงอธิบายโครงสร้างทางเคมีของสารด้วย MALDI-TOF-MS เทคนิคนี้เหมาะสำหรับการวิเคราะห์สารจำพวกเปปไทด์และโปรตีนที่มีปริมาณน้อยโดยไม่จำเป็นต้องมีการเตรียมตัวอย่างให้บริสุทธิ์มากขึ้นก่อนฉีดเข้า HPLC จากการศึกษาพบว่า neuropeptide มักกระจายอยู่ทั่วไปในสัตว์จำพวก arthropods และมีความสำคัญต่อการทำงานของระบบ ประสาท<sup>14</sup> (ค) การนำ liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS-MS) มาใช้ในการศึกษา pectenotoxins ซึ่งจัดเป็นสารพิษ (toxins) ที่มีโครงสร้างทางเคมีเป็น polyether macrolide สามารถทำให้เกิดอาการท้องเสียที่เรียกว่า diarrhetic shellfish poisoning (DSP) และมีพิษต่อตับ (hepatotoxic) อย่างไรก็ตามสามารถพัฒนาสารพิษเหล่านี้ให้เป็นยาด้านมะเร็งได้ เพราะมีความเป็นพิษต่อ human cancer cell line หลายชนิด จากการทดลองพบว่าสามารถใช้ LC-ESI-MS-MS ค้นพบสารพิษชนิดใหม่ชื่อ pectenotoxin 11 จาก *Dinophysis acuta* ซึ่งจัดเป็น dinoflagellate ในทะเลที่พบได้ในประเทศนิวซีแลนด์<sup>15</sup>

นอกจากจะใช้ LC-MS ในการแยกและอธิบายโครงสร้างทางเคมีของสารสำคัญในสิ่งมีชีวิตในทะเลแล้ว ยังพบว่าสามารถใช้ LC-MS ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในพืชเพื่อช่วยจำแนกชนิดของพืชได้อย่างถูกต้องและรวดเร็ว ในอดีตนักอนุกรมวิธาน (taxonomist) ได้อาศัยเทคนิค DNA sequencing และ cladistic data analysis ในการศึกษาอนุกรมวิธานเพื่อจัดจำแนกชนิดของพืช อย่างไรก็ตามการศึกษาร่วมกันขององค์ประกอบทางเคมีในพืชจะทำให้ทราบถึงวิวัฒนาการทางชีวเคมี (biochemical evolution) ของพืช hyphenated technique ประกอบด้วยวิธีการทางโครมาโทกราฟีและสเปกโทรสโกปี เช่น GC-MS, LC-MS และ LC-NMR เป็นต้น ซึ่งใช้ในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของพืช โดยนิยมใช้ GC-MS ในการวิเคราะห์สารที่ระเหยได้ เช่น น้ำมันหอมระเหย (essential oils) แต่สำหรับสารที่ต้องการวิเคราะห์ระเหยไม่ได้จะต้องเตรียมเป็นอนุพันธ์ที่ระเหยได้ง่ายขึ้นด้วยการใช้ปฏิกิริยาเคมีจึงทำให้เกิดความยุ่งยากในการวิเคราะห์ต่อมาได้พัฒนามาใช้ LC-MS ซึ่งเป็นเทคนิคที่นิยมใช้กันมากในปัจจุบัน ตัวอย่างเช่น การใช้ LC-MS ในการศึกษา flavonoids, alkaloids และ non-protein amino acids ในพืชวงศ์ Leguminosae โดยใช้เทคนิค ESI และ APCI ในการทำให้สารแตกตัวเป็นไอออน<sup>16</sup> ต่อมาได้มีการนำ LC-UV, LC-MS และ LC-NMR มาศึกษาโครงสร้างทางเคมีขององค์ประกอบสำคัญในสารสกัดหยาบ (crude extract) จากพืชหลายชนิด เพื่อค้นหาสารใหม่ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและเป็นการศึกษาทางเคมีอนุกรมวิธาน (chemotaxonomy) โดยทั่วไปนิยมใช้ LC-MS ที่ทำให้สารเกิดการแตกตัวเป็นไอออนด้วย APCI หรือ ESI เพราะใช้พลังงานต่ำจึงส่งผลให้โมเลกุลของสารไม่แตกตัว ทำให้สามารถอธิบายโครงสร้างทางเคมีของสารหลายชนิดได้อย่างถูกต้อง<sup>17</sup> นอกจากนี้ LC-MS จะช่วยศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในพืชแล้ว ยังช่วยอธิบายและยืนยันความถูกต้องของโครงสร้างทางเคมีของสารที่สกัดแยกได้ในสภาวะที่แตกต่างกัน เช่น การค้นพบ Rg3 และ Rh2 ซึ่งจัดเป็น ginsenosides ที่พบได้ทั่วไปในรากของ Korean red ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meger) ว่ามีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย เช่น ด้านมะเร็ง กระตุ้นภูมิคุ้มกัน บำรุงประสาท และเป็นสารต้านออกซิเดชัน เป็นต้น จากการศึกษา ginsenosides ที่มีโครงสร้างเป็น triterpenoid ที่เชื่อมต่อกับน้ำตาล พบว่าการสกัดโบโซมด้วยน้ำร้อนจะพบ Rg3 และ Rh2 แต่การสกัดด้วย 80% aqueous ethanol ที่อุณหภูมิห้องจะไม่พบ ginsenosides ทั้งสองชนิดนี้ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า Rg3 และ Rh2 นั้นไม่ใช่สารที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติแต่เกิดจากสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมีโครงสร้างทางเคมีเปลี่ยนแปลงไปเป็น Rg3 และ Rh2 เมื่อสัมผัสกับตัวทำละลายและความร้อนในกระบวนการสกัดโบโซม สำหรับการทดลองนี้เทคนิคที่ใช้แยกสารให้บริสุทธิ์และอธิบายโครงสร้างทางเคมี คือ HPLC-ESI-MS และใช้คอลัมน์ที่เป็น fresh polymeric absorbent Amberlite XAD-4<sup>18</sup>

### การวิเคราะห์วิตามินและสารปนเปื้อนในอาหาร

สามารถใช้ LC-MS ในการควบคุมคุณภาพและความปลอดภัยในอาหารได้ โดยเฉพาะการตรวจวิเคราะห์อาหารที่มีส่วนผสมของวิตามินหรืออาหารที่ปนเปื้อนด้วยยาปฏิชีวนะและยาฆ่าแมลง ตัวอย่างเช่น การวิเคราะห์วิตามิน B<sub>5</sub> ซึ่งเป็นวิตามินที่มีความสำคัญต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมและการสร้างพลังงานในมนุษย์ การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามิน B<sub>5</sub> ในอาหาร โดยเฉพาะอาหารสำหรับทารกนั้นมีความสำคัญมาก แต่เดิมจะใช้ HPLC-UV ในการวิเคราะห์วิตามิน B<sub>5</sub> ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะเจาะจงต่ำ เพราะสารประกอบหลายชนิดที่ปะปนอยู่กับวิตามิน B<sub>5</sub> สามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นเดียวกันกับวิตามิน B<sub>5</sub> สำหรับการวิเคราะห์วิตามิน B<sub>5</sub> ด้วย GC-MS นั้นจะต้องเตรียมวิตามิน B<sub>5</sub> ให้เป็นอนุพันธ์ที่ระเหยได้ง่ายใน GC เสียก่อน ซึ่งทำให้เกิดความยุ่งยากในการวิเคราะห์ ดังนั้นจึงได้นำเทคนิค LC-MS มาใช้แทน HPLC-UV และ GC-MS<sup>19</sup>

ในปัจจุบันมีการให้ยาหลายชนิดกับสัตว์เลี้ยงที่ใช้เป็นอาหาร จึงทำให้ยาปนเปื้อนในอาหารโดยเฉพาะยาปฏิชีวนะที่พบในเนื้อสัตว์หรือนม เช่น ยาในกลุ่ม β-lactams, aminoglycosides, chloramphenicol, sulfonamides, trimethoprim, tetracyclines, macrolides, quinolones, nitrofurans และ nitroimidazoles เป็นต้น นอกจากนี้ยัง

พบยากล่อมประสาทในเนื้อสุกรและพบสเตียรอยด์ที่ใช้เร่งการเจริญเติบโตของสัตว์อีกด้วย ดังนั้นการวิเคราะห์หาปริมาณยาเหล่านี้ในอาหารจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง<sup>20</sup> Sulfonamides จัดเป็นสารต้านจุลชีพ (antimicrobial agents) ที่นิยมนำมาใช้กับสัตว์เลี้ยงที่ใช้เป็นอาหาร โดยทำหน้าที่เป็นสารกระตุ้นการเจริญเติบโต (growth promoter) และนำมาใช้กับผึ้งเพื่อป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียที่เรียกว่าโรค ดังนั้นการเก็บน้ำผึ้งในช่วงที่มีการใช้ยาจึงอาจมีการปนเปื้อนของ sulfonamides เข้ามาในน้ำผึ้งได้ ในประเทศสวีเดนและแลนด์ได้กำหนดค่า maximum residue level (MRL) ของยาปฏิชีวนะที่ปะปนมากับน้ำผึ้ง ให้มีค่าไม่เกินกว่า 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในอดีตการวิเคราะห์ sulfonamides ในน้ำผึ้งจะใช้เทคนิค enzyme immunoassay และ thin-layer chromatography (TLC) ซึ่งต่อมาได้นำ GC-MS มาใช้ในการวิเคราะห์ แต่มีข้อเสีย คือ ต้องเตรียม sulfonamides ซึ่งเป็นสารที่มีขี้ผึ้งให้เป็นอนุพันธ์ที่ระเหยง่ายเสียก่อน ในปัจจุบันได้พัฒนามาใช้เทคนิค LC-ESI-MS-MS ที่มีความไวในการวิเคราะห์ถึงระดับไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และสามารถวิเคราะห์ sulfonamides ที่แตกต่างกันได้ถึง 10 ชนิด อย่างไรก็ตามส่วนหนึ่งของการวิเคราะห์จะต้องนำน้ำผึ้งมาผ่านกระบวนการ acid hydrolysis เพื่อเปลี่ยน sugar-bound sulfonamides ที่จับกับน้ำตาลไปเป็น sulfonamides อิสระเสียก่อน จากนั้นจึงทำการสกัดด้วย liquid-liquid extraction และวิเคราะห์ด้วย LC-MS-MS ตามลำดับ<sup>21</sup>

ในทางเกษตรกรรมนิยมใช้ยาฆ่าแมลงเพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืช แต่ยาเหล่านี้มีความเป็นพิษและก่อให้เกิดมะเร็งได้ โดยเฉพาะในอาหารสำหรับเด็กที่มีการเจือปนของ organophosphates และ carbamates ที่มีพิษต่อระบบประสาท ยาฆ่าแมลงส่วนใหญ่ออกฤทธิ์เป็น acetylcholinesterase (AChE) inhibitor ซึ่ง 55 เปอร์เซ็นต์ จัดเป็นสารในกลุ่ม pyrethroids และ chlorinated hydrocarbons ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ยาในกลุ่มนี้มาใช้ acetylcholinesterase-biosensor<sup>22</sup> และ LC-MS สำหรับวิธี acetylcholinesterase-biosensor เป็นวิธีที่สะดวกเพราะสามารถตรวจหาฆ่าแมลงในตัวอย่างอาหารได้ทันทีโดยไม่ต้องมีการเตรียมตัวอย่างก่อนการตรวจวิเคราะห์ ในขั้นตอนการวิเคราะห์จะบ่ม (incubate) ตัวอย่างอาหารกับ AChE biosensor ที่เตรียมขึ้นจากเอ็นไซม์ AChE จากนั้นจึงตรวจวัดการทำงานของเอ็นไซม์ที่เหลืออยู่ด้วยวิธีวัดกระแสไฟฟ้า (amperometry) สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณยา ฆ่าแมลงที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำผลไม้ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS-MS จะใช้คอลัมน์ในการแยกเป็น reverse-phase polar และชะสารออกจากคอลัมน์ด้วยเทคนิค gradient elution<sup>23</sup> ซึ่งการวิเคราะห์ด้วย acetylcholinesterase-biosensor เป็นเทคนิคใหม่ที่มีขั้นตอนไม่ยุ่งยาก ประหยัดเวลา และมีความไวสูงกว่าเทคนิค LC-ESI-MS-MS

### การวิเคราะห์สารมลพิษในสิ่งแวดล้อม

ในปัจจุบันนิยมวิเคราะห์สารมลพิษ (pollutants) ที่มักเป็นสารที่มีขี้ผึ้งสูงและไม่ระเหยในตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะตัวอย่างที่เป็นน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติ ตะกอนใต้แหล่งน้ำ และน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม ตัวอย่างเช่น การวิเคราะห์ความปนเปื้อนของ alkylphenolic surfactants, steroid sex hormones และยาชนิดต่างๆ ในแหล่งน้ำ ซึ่งนิยมวิเคราะห์ด้วย LC-MS โดยทำให้สารแตกตัวเป็นไอออนด้วยเทคนิค ESI ที่เหมาะสำหรับการวิเคราะห์สารประกอบที่มีขี้ผึ้งสูง ในขณะที่เทคนิค APCI เหมาะสำหรับการวิเคราะห์สารที่มีขี้ผึ้งต่ำถึงปานกลาง LC-MS สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างของแข็ง เช่น ตะกอนใต้แหล่งน้ำ ได้ดีกว่าเทคนิคอื่นเพราะ LC-MS ในปัจจุบันมีความไวสูงสามารถตรวจพบสารปนเปื้อนในปริมาณต่ำมากได้ นอกจากนี้ยังนิยมใช้ LC-MS วิเคราะห์ยาจำพวก macrolides, sulfonamides, penicillins และ tetracyclines อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ tetracyclines ไม่ควรใช้คอลัมน์ที่มีวัฏภาคคงที่เป็นซิลิกาเจล (silica gel) เพราะ silanol group ของซิลิกาเจล จะจับกับหมู่ฟังก์ชันของยาอย่างไม่ผันกลับ (irreversible) ทำให้ไม่สามารถชะยาออกจากคอลัมน์ได้ จากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่า LC-MS สามารถวิเคราะห์สารที่มีขี้ผึ้งสูงได้ซึ่งเทคนิคอื่นทำไม่ได้ และสามารถวิเคราะห์สารที่มีความเข้มข้นต่ำมากได้ถึงระดับพิโคกรัมต่อลิตรหรือพิโคกรัมต่อกรัม<sup>24</sup>

## การใช้ประโยชน์ในด้านอื่น

ได้มีการประยุกต์ใช้ LC-MS ในงานด้านพิษวิทยา เพื่อวิเคราะห์ยาหรือสารอื่นๆ ในเชิงพิษวิทยา เช่น ยาในกลุ่มมอร์ฟีน ยาต้านมะเร็ง ยาแก้ปวด ยานอนหลับ และแอลกอฮอล์ เป็นต้น ตัวอย่างเช่น การวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์และยานอนหลับในมนุษย์ที่ได้รับสารเหล่านี้และเกิดเป็นคดีทางกฎหมาย โดยทั่วไป 95 ถึง 98 เปอร์เซ็นต์ของแอลกอฮอล์ (ethanol) ที่รับประทานเข้าไปจะถูกเมแทบอลิซึมในตับโดย class I isozymes ด้วยเอนไซม์ alcohol dehydrogenase สำหรับแอลกอฮอล์ที่เหลืออีก 2 ถึง 5 เปอร์เซ็นต์ จะถูกขับออกจากร่างกายทางปัสสาวะ เหงื่อ และลมหายใจออก นอกจากนี้แอลกอฮอล์ในปริมาณน้อยมาก (ต่ำกว่า 0.1 เปอร์เซ็นต์) สามารถเกิด phase II conjugation reaction โดย UDP-glucuronyltransferase ได้เป็น ethyl glucuronide (EtG) ที่ละลายน้ำได้และถูกขับออกจากร่างกายทางปัสสาวะ ดังนั้น EtG จึงเป็น เมแทบอลิซึมของแอลกอฮอล์ที่ตรวจพบได้ในปัสสาวะ ในอดีตจะใช้ GC-MS ในการศึกษาปริมาณ EtG ในปัสสาวะ แต่ในปัจจุบันนิยมใช้ LC-MS มากกว่าเนื่องจากมีความจำเพาะเจาะจงและความไวสูงกว่า GC-MS ค่าครึ่งชีวิตของ EtG ในปัสสาวะจะยาวนานกว่าค่าครึ่งชีวิตของแอลกอฮอล์ ดังนั้นการตรวจวัดระดับ EtG ในปัสสาวะจึงบอกถึงระยะเวลาที่รับประทานแอลกอฮอล์ในครั้งสุดท้ายได้ดี และเป็นข้อมูลที่ช่วยในการตัดสินคดีที่เกี่ยวข้องกับการกระทำความผิดทางกฎหมายโดยเฉพาะคดีทางด้านอุบัติเหตุที่เกิดจากการขับขี่ยานพาหนะของผู้ที่เสพของมีนเมา มีรายงานว่าสามารถใช้ negative ion electrospray LC-MS วิเคราะห์หาปริมาณ EtG ในปัสสาวะ โดยมี deuterium-labeled EtG เป็นสารมาตรฐาน<sup>25</sup>

นอกจากนี้ยังใช้ LC-MS ในการพิสูจน์หลักฐานของเหยื่อที่ถูกวางยานอนหลับชื่อ zolpidem ซึ่งจัดเป็นยาในกลุ่ม imidazopyridine derivative มีฤทธิ์ทำให้ง่วงนอนและประสาทหลอน ยาจะถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดและเมแทบอลิซึมจะถูกกำจัดออกทางปัสสาวะ นอกจากนี้เมแทบอลิซึมบางส่วนยังถูกสะสมอยู่ในเส้นผม LC-MS เป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณเมแทบอลิซึมของยานอนหลับในปัสสาวะและเส้นผม และยังสามารถระบุได้ว่าเหยื่อได้รับยา ตั้งแต่เมื่อใด เพราะความยาวและอายุของเส้นผมที่มีเมแทบอลิซึมสะสมอยู่จะบอกถึงระยะเวลาของการได้รับยา หากเพิ่งได้รับยาจะสามารถตรวจพบเมแทบอลิซึมได้ในปัสสาวะ แต่ถ้าเคยได้รับยาเพียงครั้งเดียวและผ่านมานานแล้วจะไม่พบเมแทบอลิซึมของยาในปัสสาวะแต่จะพบในเส้นผมเท่านั้น มีรายงานว่าสามารถใช้ LC-MS ในการวิเคราะห์ปริมาณเมแทบอลิซึมของยานอนหลับชนิดอื่นที่อยู่ในเส้นผมของเหยื่อที่ได้รับยา เช่น zopiclone, flunitrazepam, clonazepam, bromazepam และ alprazolam<sup>26</sup> เมื่อเหยื่อได้รับยานานเกินกว่า 17 ชั่วโมง จะไม่สามารถตรวจพบเมแทบอลิซึมในปัสสาวะได้จึงต้องทำการวิเคราะห์เมแทบอลิซึมในเส้นผม ซึ่งโดยปกติเส้นผมจะยาวประมาณ 0.7-1.4 เซนติเมตรต่อเดือน ดังนั้นการสะสมของยาในเส้นผมที่ความยาวต่างกันจะช่วยบอกถึงช่วงเวลาที่ได้รับยานั้น เทคนิคการวิเคราะห์เช่นนี้มีความไวสูง จึงสามารถตรวจพบเมแทบอลิซึมของยาที่ไม่คงตัวและมีปริมาณต่ำมากได้

## บทสรุป

LC-MS เป็นเทคนิคที่ควบคู่กันระหว่างการแยกสารด้วย LC และการอธิบายโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ด้วย MS ในปัจจุบันนิยมใช้ LC-MS ในการวิเคราะห์หาสาร ปนเปื้อน สารปรุงแต่งอาหาร และวิตามิน ที่มีอยู่ในอาหารชนิดต่างๆ งานทางด้านพิษวิทยา งานควบคุมคุณภาพ และในกระบวนการพัฒนายา เป็นต้น LC-MS มีข้อดีเหนือกว่าเทคนิคอื่น ทั้งในแง่ที่นำมาใช้กับสารที่มีขั้วสูง สารที่ไม่ระเหย และสารที่มีปริมาณต่ำได้ ซึ่งจะให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง แม่นยำ สะดวก และรวดเร็ว จึงเป็นเทคนิคที่ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางใน แวดวงของงานวิเคราะห์ อย่างไรก็ตาม LC-MS ก็มีข้อเสียที่ไม่สามารถให้ข้อมูลเกี่ยวกับระยะเวลาของยาในโมเลกุลได้ ดังนั้นจึงต้องอาศัยข้อมูลจาก X-ray crystallography เข้ามาช่วยในการอธิบายโครงสร้างในเชิงสามมิติ จากตัวอย่างการนำ LC-MS ไปใช้ประโยชน์ในงานวิเคราะห์ด้านต่างๆ ดังที่กล่าวมาข้างต้น จะเห็นได้ว่า LC-MS เป็นเทคนิคหนึ่งที่น่าสนใจและสามารถประยุกต์ใช้กับงานได้หลายประเภท ดังนั้นนักวิจัยหลายกลุ่มจึงหันมาสนใจเทคนิคนี้มากขึ้นและมีแนวโน้มว่าจะมีการพัฒนาเทคนิคนี้ต่อไปในอนาคตอย่างไม่หยุดยั้ง



## เอกสารอ้างอิง

1. Zubritsky E. MALDI-TOF MS: Biomolecules and beyond. *Anal Chem* 1998 ; 69 : 733A-7A.
2. Fenselau C. MALDI MD and strategies for protein analysis. *Anal Chem* 1997 ; 69 : 661-5.
3. Silverstein RM, Bassler GC and Morrill TC. *Spectrometric identification of organic compound*, 5th ed., Singapore : John Wiley & Son, 1991 : 3-39.
4. Kassel D. Applications of high-throughput ADME in drug discovery. *Curr Opin in Chem Bio* 2004 ; 8(3) : 339-45.
5. Ma Y, Kiesewetter D, Lang L, et al. Application of LC-MS to the analysis of new radiopharmaceuticals. *Mol Imag & Bio* 2003 ; 5(6) : 397-403.
6. Berna M, Ackerman B, and Murphy A. High-throughput chromatographic approaches to liquid chromatographic/tandem mass spectrometric bioanalysis to support drug discovery and development. *Anal Chim Acta* 2004 ; 509(1) : 1-9.
7. Schellem A, Ooms B, Lagemaat D, et al. Generic solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for fast determination of drugs in biological fluids. *J Chromatogr B* 2003 ; 788 : 251-3.
8. Li K, Clarke S, and Rivory L. Quantitation of plasma thymidine by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry and its application to pharmacodynamic studies in cancer patients. *Anal Chim Acta* 2003 ; 486 : 51-61.
9. Zhang J, Zeng W, Kitchen C, et al. High-throughput sample preparation procedures for the quantitation of a new bone integrin  $\alpha_1\beta_3$  antagonist in human plasma and urine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2004 ; 806(2) : 167-75.
10. Xue Y, Turner K, Meeker J, et al. Quantitative determination of pioglitazone in human serum by direct-injection high-performance liquid chromatography mass spectrometry and its application to a bioequivalence study. *J Chromatogr A* 2003 ; 795 : 215-26.
11. Deters M, Kaefer V, and Kirchner G. Liquid chromatography-mass spectrometry for therapeutic drug monitoring of immunosuppressants. *Anal Chim Acta* 2003 ; 492 : 133-45.
12. Elipe M. Advantages and disadvantages of nuclear magnetic resonance spectroscopy as a hyphenated technique. *Anal Chim Acta* 2003 ; 497(1-2) : 1-25.
13. Chaimbault P, Alberic P, Elfakir C, et al. Development of LC-MS/MS method for the quantification of taurine derivatives in marine invertebrates. *Anal Biochem*, In press, 2004.
14. Yasuda A, Yasuda-Kamatani Y, Nozaki M, et al. Identification of GYRKPPFNGSIFamide (crustacean-SIFamide) in the crayfish *Procambarus clarkii* by topological mass spectrometry analysis. *Gen and Comp Endocrin* 2004 ; 135 : 394-400.
15. Suzuki T, Beuzenberg V, Mackenzie L, et al. Liquid chromatography-mass spectrometry of spiroketal stereoisomers of pectenotoxins and the analysis of novel pectenotoxin isomers in the toxic dinoflagellate *Dinophysis acuta* from New Zealand. *J Chromatogr A* 2003 ; 992 : 141-50.