

ความสัมพันธ์ระหว่างความแตกต่างทางพันธุกรรมของ CYP2A6 กับเภสัชจลนศาสตร์ของนิโคตินและ
ระดับนิโคตินเมแทบอไลต์ในเส้นผมของผู้สูบบุหรี่ที่มาตรวจสุขภาพ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์



นางสาวขวัญเรือน เพ็ชรน้อย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชวิทยา (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THE RELATIONSHIP BETWEEN GENETIC VARIATIONS OF CYP2A6 AND PHARMACOKINETICS
OF NICOTINE AND HAIR NICOTINE METABOLITES IN CIGARETTE SMOKERS VISITING MEDICAL
CHECK-UP CLINIC AT KING CHULALONGKORN MEMORIAL HOSPITAL

Miss Khwanruan Phetnoi



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Pharmacology
(Interdisciplinary Program)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2015

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ความสัมพันธ์ระหว่างความแตกต่างทางพันธุกรรมของ CYP2A6 กับเภสัชจลนศาสตร์ของนิโคตินและระดับนิโคตินเมแทบอลิต์ในเส้นผมของผู้สูบบุหรี่ที่มาตรวจสุขภาพ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

โดย นางสาวขวัญเรือน เพ็ชรน้อย

สาขาวิชา เกสัชวิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก แพทย์หญิง ดร.ปาจรีย์ จรรย์วิลาศกุล

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม รองศาสตราจารย์ สุพีชา วิทยเลิศปัญญา

ดร.ณภัทรวรรต บัวทอง

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุนทร ชุตินธรานนท์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ร้อยโทหญิง เนาวรัตน์ สุขัฒนาภพงษ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(แพทย์หญิง ดร.ปาจรีย์ จรรย์วิลาศกุล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์ สุพีชา วิทยเลิศปัญญา)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ดร.ณภัทรวรรต บัวทอง)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ เกสัชกรหญิง พันตำรวจโทหญิง ดร.สมทรง ลาวัณย์ประเสริฐ)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุวรา วัฒนพิทยกุล)

ขวัญเรือน เพ็ชรน้อย : ความสัมพันธ์ระหว่างความแตกต่างทางพันธุกรรมของ CYP2A6 กับเภสัชจลนศาสตร์ของนิโคตินและระดับนิโคตินเมแทบอไลต์ในเส้นผมของผู้สูบบุหรี่ที่มาตรวจสุขภาพโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ (THE RELATIONSHIP BETWEEN GENETIC VARIATIONS OF CYP2A6 AND PHARMACOKINETICS OF NICOTINE AND HAIR NICOTINE METABOLITES IN CIGARETTE SMOKERS VISITING MEDICAL CHECK-UP CLINIC AT KING CHULALONGKORN MEMORIAL HOSPITAL) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: พญ. ดร.ปาจรีย์ จรรย์วิลาศกุล, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. สุพีชา วิทยเลิศปัญญา, ดร.ณภัทรวรรต บัวทอง, 131 หน้า.

เอนไซม์ไซโตโครมพี 450 (CYP2A6) เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมของนิโคติน โดยร้อยละ 90% ของนิโคตินที่เข้าสู่ร่างกายถูกเมแทบอลิซึมผ่านเอนไซม์ CYP2A6 อย่างไรก็ตามพบว่า ประชากรในแต่ละคนแต่ละเชื้อชาติมีกระบวนการเมแทบอลิซึมที่แตกต่างกัน เอนไซม์ CYP2A6 มีบทบาทสำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึมของ nicotine ได้เป็นสารประกอบสำคัญ ได้แก่ โคทีนีน (cotinine) และ *trans*-3'-hydroxycotinine ซึ่งอัตราการเมแทบอลิซึมนี้มีผลโดยตรงต่อการสูบบุหรี่, พฤติกรรมการสูบบุหรี่ และการติดบุหรี่ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ CYP2A6 และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความแตกต่างทางพันธุกรรมของ CYP2A6 กับเภสัชจลนศาสตร์ของ nicotine และระดับ nicotine และ cotinine ในเส้นผมของผู้สูบบุหรี่ที่มาตรวจสุขภาพ ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ผลการศึกษานี้ได้แบ่งความหลากหลายทางพันธุกรรมของ CYP2A6 ออกเป็น 2 กลุ่มตามการทำงานของเอนไซม์ ได้แก่ กลุ่มที่มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 แบบปกติ (normal metabolizers) ประกอบด้วย CYP2A6*1A/*1A, CYP2A6*1A/*1B และ CYP2A6*1B/*1B) และกลุ่มที่มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ต่ำกว่าปกติ (slow metabolizers) ประกอบด้วย CYP2A6*1A/*4, CYP2A6*1A/*9, CYP2A6*1B/*9, CYP2A6*9/*9, CYP2A6*4/*4, CYP2A6*4/*9 และ CYP2A6*1B/*4 นอกจากนี้พบว่าระดับเฉลี่ยของพลาสมา nicotine ในกลุ่ม slow metabolizers มีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่ม normal metabolizers ทุกช่วงเวลา, มีค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ ได้แก่ T_{max} นานกว่า ($P = 0.019$), มีค่าคงที่ของอัตรากำจัด nicotine ต่อหนึ่งหน่วยเวลาแสดงโดยค่า Kel ลดลง ($P = 0.024$) ส่งผลให้ $t_{1/2}$ ของ nicotine ในอาสาสมัครกลุ่มนี้ยาวขึ้น ($P = 0.024$) และมีแนวโน้มที่จะมีความสอดคล้องกับค่า 3HC/COT ratio ที่ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่ม normal metabolizers นอกจากนี้พบว่าการสะสมของระดับ nicotine และ cotinine ในเส้นผมของกลุ่ม normal metabolizers มีแนวโน้มที่จะมีการสะสมมากกว่ากลุ่ม slow metabolizers ซึ่งไม่เป็นไปตามสมมติฐานที่ตั้งไว้ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของ CYP2A6 มีแนวโน้มที่จะสัมพันธ์กับเภสัชจลนศาสตร์ของ nicotine แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับการสะสมของระดับ nicotine และ cotinine ในเส้นผม

สาขาวิชา เภสัชวิทยา

ปีการศึกษา 2558

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5587107820 : MAJOR PHARMACOLOGY

KEYWORDS: NICOTINE / COTININE / GENETIC POLYMORPHISM / CYP2A6 / HAIR

KHWANRUAN PHETNOI: THE RELATIONSHIP BETWEEN GENETIC VARIATIONS OF CYP2A6 AND PHARMACOKINETICS OF NICOTINE AND HAIR NICOTINE METABOLITES IN CIGARETTE SMOKERS VISITING MEDICAL CHECK-UP CLINIC AT KING CHULALONGKORN MEMORIAL HOSPITAL. ADVISOR: PAJAREE CHARİYAVILASKUL, MD, Ph.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. SUPEECHA WITTAYALERTPANYA, NAPAkkAWAT BUATHONG, Ph.D., 131 pp.

Enzymes of the cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) are responsible for the metabolism of >90% of nicotine. Genetic polymorphism of CYP2A6 plays a major role in the large inter-individual and interethnic difference in nicotine metabolism. CYP2A6 is important metabolic pathway of nicotine leading to cotinine formation is further metabolized to *trans*-3'-hydroxycotinine. The rate of nicotine metabolism by CYP2A6 affects cigarette smoking behavior, including nicotine dependence. We assessed CYP2A6 genotype and the relationship between genetic variations of CYP2A6 on the pharmacokinetics of nicotine and the accumulation of hair nicotine/cotinine concentrations in Thai smokers attending the medical check-up clinic at King Chulalongkorn Memorial Hospital. The subjects were divided into two groups according to the CYP2A6 activity included normal metabolizers (CYP2A6*1A/*1A, CYP2A6*1A/*1B and CYP2A6*1B/*1B) and slow metabolizers (CYP2A6*1A/*4, CYP2A6*1A/*9, CYP2A6*1B/*9, CYP2A6*9/*9, CYP2A6*4/*4, CYP2A6*4/*9 and CYP2A6*1B/*4). Subject having slow metabolizers would probably have high plasma nicotine all the time. The T_{max} and $t_{1/2}$ of nicotine for slow metabolizers were significantly longer than normal metabolizers ($P = 0.019$ and $P = 0.024$), the K_{el} were significantly lower than normal metabolizers ($P = 0.019$) and probably consistent with the lower of 3HC/COT ratio in plasma compared with normal metabolizers. Moreover, the accumulations of hair nicotine/cotinine concentrations in normal metabolizers were found to be higher than slow metabolizers which do not conform to the hypothesis. In summary, our study demonstrated that CYP2A6 genotype were probably correlated with pharmacokinetics of nicotine but no correlated with accumulation of hair nicotine/cotinine concentrations.

Field of Study: Pharmacology

Academic Year: 2015

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

การทำวิจัยและจัดทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาอย่างสูงจาก อาจารย์แพทย์หญิง ดร.ปาจรีย์ จรรย์วิลาศกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์, รองศาสตราจารย์สุพิชา วิทย์เลิศปัญญา และอาจารย์ ดร.ณภัทรวรรต บัวทอง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม โดยให้คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนช่วยชี้แนวทางในการแก้ไขปัญหา ขอกราบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณคุณนันทพร พรหมพิลา และเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการ PK Chula researchทุกท่าน ที่ช่วยเหลือให้คำปรึกษา ตลอดจนแนะแนวทางในการปฏิบัติงานในการทำวิจัยเป็นอย่างดี

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ประจำหลักสูตรภาควิชาเภสัชวิทยา สหสาขาวิชาเภสัชวิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ ตลอดจนจริยธรรมให้แก่ผู้เขียน

ขอขอบคุณทุนวิจัย "ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ครั้งที่ 2/2558", "ทุนรัชดาภิเษกสมโภช" และทุนงบประมาณแผ่นดิน ซึ่งเป็นแหล่งเงินทุนอุดหนุนสำหรับงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ Clinical Pharmacokinetics Research Unit in Renal and Cardiovascular Disease และบุคลากรในภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่คอยช่วยเหลือ ให้คำปรึกษาต่าง ๆ ตลอดจนแนวทางการแก้ปัญหาในการทำงานวิจัยนี้เป็นอย่างดี

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ภาควิชาเภสัชวิทยา สหสาขาวิชาเภสัชวิทยา ทุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจให้ผู้เขียนเสมอมา

สุดท้ายนี้ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวที่คอยช่วยเหลือ ให้กำลังใจ และเป็นแรงผลักดันให้ผู้เขียนศึกษาทำงานวิจัยและจัดทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ	ฐ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฅ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and Rational)	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives).....	3
1.3 สมมติฐานการวิจัย (Hypothesis)	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
1.5 แบบแผนการวิจัย (Experimental design).....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 สารประกอบในบุหรี่	5
2.2 ลักษณะของการติดบุหรี่ในทางคลินิก (Clinical aspects of nicotine addiction).....	6
2.3 กลไกการเสพติดนิโคติน (Nicotine addiction)	6
2.4 เภสัชวิทยาของนิโคติน (Pharmacology of nicotine).....	9
2.5 เอนไซม์ Cytochrome P450.....	15
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	25
3.1 ศึกษาจีโนไทป์ของ CYP2A6 (CYP2A6 genotype)	25
3.2 รูปแบบการวิจัย (Research design)	27

3.3 การทดลอง	27
3.3.1 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA Extraction).....	27
3.3.2 การวิเคราะห์หาจีโนไทป์ของ CYP2A6*1A, CYP2A6*1B และ CYP2A6*4	28
3.3.3 การวิเคราะห์หาจีโนไทป์ของ CYP2A6*9	31
3.4 ศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของนิโคติน (Pharmacokinetics of nicotine)	33
3.4.1 ตัวอย่างเลือดและเส้นผมของประชากรตัวอย่าง.....	33
3.4.2 ประชากร	34
3.4.3 รูปแบบงานวิจัย (Research design).....	35
3.4.4 ขั้นตอนการวิจัย.....	35
3.4.5 การทดลอง.....	36
3.4.5.1 การวัดระดับ nicotine, cotinine และ trans-3'-hydroxycotinine ใน plasma.....	36
3.4.5.2 การวัดปริมาณการสะสมของ nicotine และ cotinine ในเส้นผม	43
3.5 การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติ	48
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	49
4.1 ศึกษาจีโนไทป์ของ CYP2A6 (CYP2A6 genotype)	49
4.1.1 ลักษณะทั่วไปของกลุ่มตัวอย่าง.....	49
4.1.2 จีโนไทป์ของ CYP2A6 ของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่ที่มารับตรวจสุขภาพ ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์.....	50
4.2 ศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของนิโคติน (Pharmacokinetics of nicotine)	51
4.2.1 ลักษณะทั่วไปของกลุ่มตัวอย่าง.....	51
4.2.2 ระดับ nicotine ในพลาสมาของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่หลังได้รับหมากฝรั่งนิโคติน	53
4.2.3 พารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ของนิโคติน	56

4.2.4 การทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ในอาสาสมัครสูบบุหรี่ 2 กลุ่มที่ได้รับหมากฝรั่ง นิโคตินขนาด 2 มิลลิกรัม	57
4.2.5 ปริมาณการสะสมของ nicotine และ cotinine ในเส้นผมของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่	64
บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลองและสรุปผลการวิจัย	67
5.1 การศึกษาจีโนไทป์ของ CYP2A6 ของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่ที่มาตรวจสุขภาพ ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์	67
5.2 ระดับ nicotine ในพลาสมาของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่หลังได้รับหมากฝรั่งนิโคติน	69
5.3 พารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ของนิโคตินที่ได้รับหมากฝรั่งนิโคติน	70
5.4 การทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ในอาสาสมัครที่สูบบุหรี่ 2 กลุ่มที่ได้รับหมากฝรั่งนิโคติน ขนาด 2 มิลลิกรัม	71
5.5 ปริมาณการสะสมของ nicotine และ cotinine ในเส้นผมของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่.....	72
5.6 สรุปผลการวิจัย	74
รายการอ้างอิง	83
ภาคผนวก.....	84
ภาคผนวก ก ข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย	85
ภาคผนวก ข ใบยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย.....	94
ภาคผนวก ค เอกสารรับรองโครงการวิจัย	97
ภาคผนวก ง การเตรียมสารละลาย	101
ภาคผนวก จ การประเมินความน่าเชื่อถือของการวิเคราะห์	116
1. ผลการทดสอบความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ความเข้มข้นของ nicotine, cotinine และ <i>trans-3-hydroxycotinine</i> ในพลาสมา.....	116
1.1 การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ (Specificity/Selectivity).....	116

1.2	การวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ nicotine, cotinine และ <i>trans</i> -3'-hydroxycotinine ในพลาสมาที่วิธีนี้สามารถวัดได้ (Lower limit of quantification, LLOQ).....	118
1.3	ค่าความเป็นเส้นตรง (Linearity/Standard calibration curve).....	119
1.4	ค่าความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy) และความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ (Precision).....	120
1.5	ประสิทธิภาพการคืนกลับของการสกัด (Recovery of extraction).....	122
1.6	ความคงตัวของสารหลังจากการสกัด (Post-preparative stability).....	124
2.	ผลการทดสอบความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ความเข้มข้นของ nicotine และ cotinine ในเส้นผม.....	126
2.1	การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ (Specificity/Selectivity).....	126
2.2	การวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ nicotine และ cotinine ในเส้นผมที่วิธีนี้สามารถวัดได้ (Lower limit of quantification, LLOQ).....	127
2.3	ค่าความเป็นเส้นตรง (Linearity/Standard calibration curve).....	128
2.4	ค่าความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy) และความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ (Precision).....	129
	ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	131

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1	แสดงตำแหน่ง nAChRs ในการควบคุมการหลั่งสารสื่อประสาทชนิดต่างๆ ของระบบประสาทส่วนกลาง	8
ตารางที่ 2	แสดงการแสดงออกของเอนไซม์ CYP2A ในเนื้อเยื่อต่างๆ.....	16
ตารางที่ 3	แสดงอัลลีลของ CYP2A6 กับการทำงานของเอนไซม์.....	18
ตารางที่ 4	แสดงความถี่ของ CYP2A6 alleles ในประชากรชาวเอเชียและชาวคอเคเซียน.....	19
ตารางที่ 5	แสดงข้อมูลพื้นฐานของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่ที่มาตรวจสุขภาพ ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ผ่านเกณฑ์การเข้าร่วมโครงการวิจัยจำนวน 127 คน	49
ตารางที่ 6	แสดงค่าเฉลี่ยของข้อมูลพื้นฐานของอาสาสมัครจำนวน 18 คน ในกลุ่ม normal metabolizers และ slow metabolizers.....	52
ตารางที่ 7	แสดงผลการวิเคราะห์ระดับ nicotine ในพลาสมา ณ เวลาต่างๆ ของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่ที่ได้รับหมากฝรั่งนิโคตินขนาด 2 มิลลิกรัม.....	53
ตารางที่ 8	เปรียบเทียบระดับ nicotine ในพลาสมาของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่ 2 กลุ่มที่ได้รับหมากฝรั่งนิโคตินขนาด 2 มิลลิกรัม.....	55
ตารางที่ 9	เปรียบเทียบระดับ nicotine ในพลาสมาของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่ 2 กลุ่มที่ได้รับหมากฝรั่งนิโคตินขนาด 2 มิลลิกรัม.....	56
ตารางที่ 10	แสดงผลการวิเคราะห์ระดับ cotinine ในพลาสมา ณ เวลาต่างๆ ของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่ที่ได้รับหมากฝรั่งนิโคตินขนาด 2 มิลลิกรัม.....	58
ตารางที่ 11	แสดงผลการวิเคราะห์ระดับ trans-3'-hydroxycotinine ในพลาสมา ณ เวลาต่างๆ ของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่ที่ได้รับหมากฝรั่งนิโคตินขนาด 2 มิลลิกรัม	59
ตารางที่ 12	แสดงค่าเฉลี่ยของ 3HC/COT ratio ของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่ 2 กลุ่ม	64
ตารางที่ 13	เปรียบเทียบระดับ nicotine และ cotinine ในเส้นผมของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่ 2 กลุ่ม	65

ตารางที่ 14	ความถี่การกระจายตัวของจีโนไทป์ของ CYP2A6 ของการศึกษานี้เทียบกับ การศึกษาก่อนหน้านี้.....	68
ตารางที่ 15	ความถูกต้องและเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ nicotine ในวันเดียวกัน (Intra-day)....	121
ตารางที่ 16	ความถูกต้องและเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ cotinine ในวันเดียวกัน (Intra-day)....	121
ตารางที่ 17	ความถูกต้องและเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ <i>trans</i> -3'-hydroxycotinine (3HC) ใน วันเดียวกัน (Intra-day).....	121
ตารางที่ 18	ความถูกต้องและเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ nicotine ในต่างวันกัน (Inter-day)	122
ตารางที่ 19	ความถูกต้องและเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ cotinine ในต่างวันกัน (Inter-day)	122
ตารางที่ 20	ความถูกต้องและเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ <i>trans</i> -3'-hydroxycotinine (3HC) ใน ต่างวันกัน (Inter-day).....	122
ตารางที่ 21	แสดงประสิทธิภาพของวิธีการสกัด nicotine และ nicotine-D ₄ (internal standard).....	123
ตารางที่ 22	แสดงประสิทธิภาพของวิธีการสกัด cotinine และ cotinine-D ₃ (internal standard)	123
ตารางที่ 23	แสดงประสิทธิภาพของวิธีการสกัด <i>trans</i> -3'-hydroxycotinine (3HC) และ <i>trans</i> -3'- hydroxycotinine-D ₃ (internal standard).....	123
ตารางที่ 24	แสดงร้อยละการเปลี่ยนแปลงของ nicotine	125
ตารางที่ 25	แสดงร้อยละการเปลี่ยนแปลงของ cotinine	125
ตารางที่ 26	แสดงร้อยละการเปลี่ยนแปลงของ <i>trans</i> -3'-hydroxycotinine (3HC).....	126
ตารางที่ 27	ความถูกต้องและเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ nicotine.....	129
ตารางที่ 28	ความถูกต้องและเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ cotinine.....	130

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างของ nAChRs.....	7
ภาพที่ 2 แสดงผลของ nicotine ต่อการหลั่งสารสื่อประสาทในสมอง	8
ภาพที่ 3 แสดงผลของค่า pH ของ biological membranes ต่อการดูดซึม nicotine.....	9
ภาพที่ 4 แสดงระดับ nicotine ในเลือดระหว่างและหลังได้รับ cigarettes, oral snuff, chewing tobacco และ chewed nicotine gum.....	10
ภาพที่ 5 แสดงกระบวนการเมแทบอลิซึมของ nicotine ในร่างกายมนุษย์	12
ภาพที่ 6 แสดงภาพรวมของกระบวนการเมแทบอลิซึมของ nicotine ในร่างกายมนุษย์	13
ภาพที่ 7 แสดงปริมาณของ nicotine ที่สะสมอยู่ในเส้นผมของผู้สูบบุหรี่.....	23
ภาพที่ 8 แผนภูมิแท่งแสดงความถี่การกระจายตัวของจีโนไทป์ของ CYP2A6 ของอาสาสมัครที่ สูบบุหรี่ที่มาตรวจสุขภาพ ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์จำนวน 127 คน	51
ภาพที่ 9 แสดงระดับ nicotine ในพลาสมาของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่กลุ่ม normal metabolizers ที่ได้รับหมากฝรั่งนิโคตินขนาด 2 มิลลิกรัม	54
ภาพที่ 10 แสดงระดับ nicotine ในพลาสมาของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่กลุ่ม slow metabolizers ที่ได้รับหมากฝรั่งนิโคตินขนาด 2 มิลลิกรัม	54
ภาพที่ 11 แสดงค่าเฉลี่ย (Mean \pm SEM) ระดับ nicotine ในพลาสมาของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่ ระหว่างกลุ่ม normal metabolizers และ slow metabolizers ที่ได้รับหมากฝรั่ง นิโคตินขนาด 2 มิลลิกรัม.....	55
ภาพที่ 12 แสดงระดับ cotinine ในพลาสมาของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่กลุ่ม normal metabolizers ที่ได้รับหมากฝรั่งนิโคตินขนาด 2 มิลลิกรัม	60
ภาพที่ 13 แสดงระดับ cotinine ในพลาสมาของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่กลุ่ม slow metabolizers ที่ได้รับหมากฝรั่งนิโคตินขนาด 2 มิลลิกรัม	60
ภาพที่ 14 แสดงค่าเฉลี่ย (Mean \pm SEM) ระดับ cotinine ในพลาสมาของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่ ระหว่างกลุ่ม normal metabolizers และ slow metabolizers ที่ได้รับหมากฝรั่ง นิโคตินขนาด 2 มิลลิกรัม.....	61

ภาพที่ 15	แสดงระดับ <i>trans</i> -3' hydroxycotinine ในพลาสมาของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่ในกลุ่ม normal metabolizers ที่ได้รับหมากฝรั่งนิโคตินขนาด 2 มิลลิกรัม	61
ภาพที่ 16	แสดงระดับ <i>trans</i> -3'-hydroxycotinine ในพลาสมาของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่ในกลุ่ม slow metabolizers ที่ได้รับหมากฝรั่งนิโคตินขนาด 2 มิลลิกรัม.....	62
ภาพที่ 17	แสดงค่าเฉลี่ย (Mean \pm SEM) ระดับ <i>trans</i> -3'-hydroxycotinine ในพลาสมาของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่ระหว่างกลุ่ม normal metabolizers และ slow metabolizers ที่ได้รับหมากฝรั่งนิโคตินขนาด 2 มิลลิกรัม	62
ภาพที่ 18	แสดงค่าเฉลี่ย (Mean \pm SEM) ของ 3HC/COT ratio ของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่ในกลุ่ม normal metabolizers และ slow metabolizers.....	63
ภาพที่ 19	แสดง Boxplots ระดับ nicotine ในเส้นผมของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่ 2 กลุ่ม	66
ภาพที่ 20	แสดง Boxplots ระดับ cotinine ในเส้นผมของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่ 2 กลุ่ม	66
ภาพที่ 21	แสดงโครมาโตแกรมของ nicotine ในพลาสมา	116
ภาพที่ 22	แสดงโครมาโตแกรมของ cotinine ในพลาสมา	117
ภาพที่ 23	แสดงโครมาโตแกรมของ <i>trans</i> -3'-hydroxycotinine ในพลาสมา	118
ภาพที่ 24	กราฟมาตรฐานของ nicotine ในพลาสมา.....	119
ภาพที่ 25	กราฟมาตรฐานของ cotinine ในพลาสมา.....	120
ภาพที่ 26	กราฟมาตรฐานของ <i>trans</i> -3'-hydroxycotinine ในพลาสมา.....	120
ภาพที่ 27	กราฟมาตรฐานของ nicotine ในเส้นผม.....	128
ภาพที่ 28	กราฟมาตรฐานของ cotinine ในเส้นผม.....	129

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

%	Percent
°C	Degree Celsius
3HC	<i>Trans</i> -3'-hydroxycotinine
3HC/COT	Ratio of <i>trans</i> -3'-hydroxycotinine/cotinine
3HC-D ₃	<i>Trans</i> -3'-hydroxycotinine-D ₃
Acc II	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
AUC	Area under the curve
BMI	Body mass index
BP	Blood pressure
bp	Base pairs
BUN	Blood urea nitrogen
CH ₃ COONH ₄	Ammonium acetate
COT	Cotinine
COT-D ₃	Cotinine-D ₃
C _{max}	Maximum concentration
Eco81 I	<i>Escherichia coli</i> RFL81
HQC	High quality control
HR	Heart rate
hr.	Hour
Kel	Elimination rate constant
L	Liter
LLOQ	Lower limit of quantification
LQC	Low quality control
M	Molarity
mg	Milligram

min	Minute
ml	Milliliter
MQC	Medium quality control
ng	Nanogram
ng/mg	Nanogram per milligram
nAChRs	Nicotinic acetylcholine receptors
NaOH	Sodium hydroxide
NIC	Nicotine
NIC-D ₄	Nicotine-D ₄
PCR	Polymerase chain reaction
RBC	Red blood cells
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
SGOT	Serum glutamic oxaloacetic transaminase
SGPT	Serum glutamic pyruvate transaminase
TBE	Tris borate buffer
Temp.	Temperature
T _{max}	Time at maximum concentration
t _{1/2}	Half-life
U	Unit
µg/ml	Microgram per milliliter
µl	Microliter
V	Volt
WBC	White blood cells

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and Rational)

ปัจจุบันการสูบบุหรี่ถือเป็นปัญหาสำคัญในหลายประเทศทั่วโลก รวมถึงประเทศไทย เนื่องจากในบุหรี่ประกอบด้วยสารเคมีต่างๆ มากกว่า 4,000 ชนิด โดยที่มากกว่า 40 ชนิดเป็นสารก่อมะเร็ง จึงส่งผลให้ผู้ที่สูบบุหรี่และผู้ใกล้ชิดมีอัตราเสี่ยงเป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินหายใจมากกว่าคนทั่วไปที่ไม่ได้สูบบุหรี่ รวมถึงเสี่ยงที่จะมีอาการของโรคหัวใจขาดเลือด, หัวใจวายและโรคที่เกี่ยวข้องต่างๆ ส่งผลให้เกิดการเสียชีวิตตามมา

อุบัติการณ์การเกิดโรคต่างๆ จากการสูบบุหรี่ เกิดขึ้นเนื่องจากสารนิโคติน (nicotine) ที่เป็นสารประกอบในบุหรี่และยังเป็นสารที่ทำให้เกิดการเสพติด จากการรายงานของ World Health Organization (WHO) พบว่าในแต่ละปีจะมีผู้เสียชีวิตก่อนวัยอันควรจากการสูบบุหรี่เป็นจำนวน 6 ล้านคนทั่วโลก และคาดว่าจะการสูบบุหรี่ต่อวันทั้งในผู้ชายและผู้หญิงมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นไปจนถึงปี 2025 และมีแนวโน้มจะเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ ทั้งในทวีปยุโรปและทวีปเอเชีย (1)

กระบวนการเมแทบอลิซึมของสารต่างๆ ทั้งภายในและภายนอกร่างกาย เช่น ฮอร์โมน, ยา หรือสารปนเปื้อนต่างๆ มักเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ในกลุ่มไซโตโครมพี 450 (cytochrome P450; CYP450) แต่บทบาทสำคัญของเอนไซม์ในกระบวนการเมแทบอลิซึม nicotine คือ CYP2A6 ซึ่งเป็นไอโซฟอร์มย่อยของเอนไซม์ CYP โดยประมาณร้อยละ 80-90% ของ nicotine ที่เข้าสู่ร่างกายถูกเมแทบอลิซึมผ่านเอนไซม์ CYP2A6 ในตับเกิดเป็นสารประกอบที่สำคัญ ได้แก่ โคทีนิน (cotinine) และ *trans*-3'-hydroxycotinine (2) กระบวนการเมแทบอลิซึม nicotine ผ่านทาง CYP2A6 มีผลต่อพฤติกรรม การสูบบุหรี่ของแต่ละบุคคล ความแตกต่างในการตอบสนองต่อฤทธิ์ของ nicotine ที่เกิดขึ้นนั้นเป็นผลมาจากความหลากหลายของลักษณะทางพันธุกรรม (genetic polymorphisms) ของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทางเภสัชจลนศาสตร์ คือ CYP2A6 (3) เนื่องจากพบว่าแอลลีลบางแบบของเอนไซม์ CYP2A6 มีความบกพร่องในการทำงาน ได้แก่ CYP2A6*4 และ CYP2A6*9 จึงส่งผลให้บุคคลที่มีอัลลีลดังกล่าวไม่สามารถเปลี่ยนแปลง nicotine หรือเปลี่ยนแปลงได้ช้ากว่าบุคคลที่มีอัลลีลแบบปกติซึ่งคือ CYP2A6*1 ทำให้บุคคลนั้นมีพฤติกรรมสูบบุหรี่ต่อวันน้อยกว่าบุคคลที่มีอัลลีลแบบปกติ

สามารถแสดงได้โดยใช้ค่าอัตราส่วนระหว่าง *trans*-3'-hydroxycotinine/cotinine (3HC/COT ratio) ซึ่งเป็นค่าที่ใช้เพื่อประเมินการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 โดยบุคคลที่มีความบกพร่องในการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 จะมีค่า 3HC/COT ratio ในพลาสมาต่ำกว่า รวมถึงมีความเสี่ยงในการติดบุหรี่น้อยกว่า, มีความเสี่ยงเป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับการสูบบุหรี่น้อยกว่า และสามารถเลิกสูบบุหรี่ได้ง่ายกว่าบุคคลที่มีการทำงานของเอนไซม์แบบปกติ (3-5)

การวิเคราะห์หาปริมาณของ nicotine หรือสารเมแทบอลิต์ ได้แก่ cotinine และ *trans*-3'-hydroxycotinine มีความจำเป็นอย่างมากสำหรับประเมินการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 นอกจากการวิเคราะห์หาปริมาณของ nicotine และ cotinine สามารถตรวจวิเคราะห์จากเลือด ปัสสาวะ และน้ำลาย เส้นผมเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถตรวจวัดได้เช่นกัน (6) เนื่องจากเส้นผมเป็นบริเวณที่ nicotine และ cotinine กระจายไปถึงและสามารถใช้บ่งบอกถึงการสะสมของสารได้นานเป็นสัปดาห์หรือเดือนขึ้นอยู่กับความยาวของเส้นผม โดยเฉลี่ยอัตราการเจริญของเส้นผมจากหนังศีรษะประมาณ 1 เซนติเมตรต่อเดือน (7) ถ้าหากเก็บเส้นผมยาว 5 เซนติเมตรและตรวจพบระดับ nicotine และ cotinine แสดงว่าได้รับสารดังกล่าวในระยะเวลา 5 เดือนที่ผ่านมา นอกจากนี้ยังพบว่าในบุคคลที่มีความบกพร่องในการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 มีความเป็นไปได้สูงที่น้ำจะพบการสะสมของ nicotine และ cotinine ในเส้นผมมากกว่าบุคคลที่มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 แบบปกติ

การทำความเข้าใจเกี่ยวกับความหลากหลายของลักษณะทางพันธุกรรมของ CYP2A6 กับเภสัชจลนศาสตร์ของ nicotine สามารถนำมาใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาวิธีการรักษาหรือบำบัดบุคคลที่มีความต้องการเลิกบุหรี่โดยใช้ CYP2A6 เป็นเป้าหมายหลักในการรักษา หรือใช้เป็นข้อมูลเพื่อใช้หาสารจากธรรมชาติที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 เพื่อช่วยคงระดับของ nicotine ในร่างกาย ซึ่งอาจส่งผลให้มีการสูบบุหรี่ลดลงและลดระดับความเสี่ยงในการเกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินหายใจรวมถึงโรคที่มีความเกี่ยวข้องกับการสูบบุหรี่ในผู้สูบบุหรี่ที่มีความต้องการเลิกสูบบุหรี่ต่อไปในอนาคต ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ CYP2A6 ต่อเภสัชจลนศาสตร์ของ nicotine และระดับ nicotine, cotinine ในเส้นผมของผู้สูบบุหรี่ที่มาตรวจสุขภาพ ณ คลินิกตรวจสุขภาพ ภปร 2 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives)

1. เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ CYP2A6 ในผู้สูบบุหรี่ที่มาตรวจสุขภาพ ณ คลินิกตรวจสุขภาพ ภปร 2 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
2. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความแตกต่างทางพันธุกรรมของ CYP2A6 กับเภสัชจลนศาสตร์ของ nicotine และปริมาณการสะสมของ nicotine และ cotinine ในเส้นผม

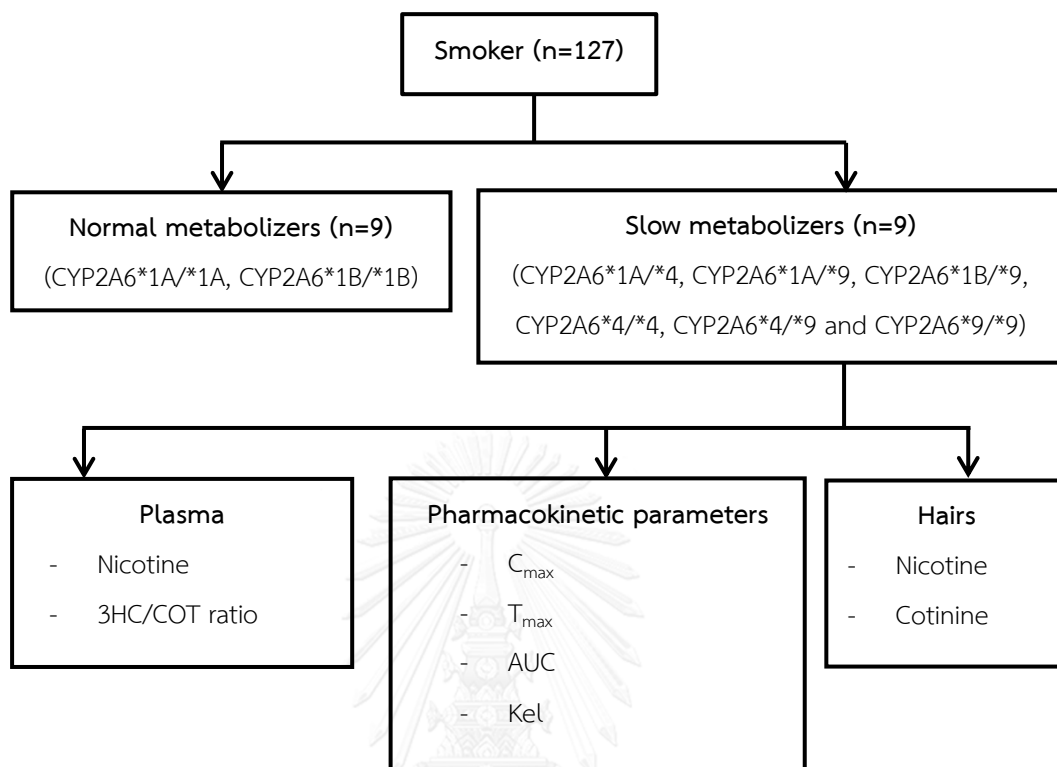
1.3 สมมติฐานการวิจัย (Hypothesis)

ผู้สูบบุหรี่ที่มาตรวจสุขภาพ ณ คลินิกตรวจสุขภาพ ภปร 2 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทยมีเภสัชจลนศาสตร์ของ nicotine และระดับ nicotine และ cotinine ในเส้นผมสัมพันธ์กับความหลากหลายทางพันธุกรรมของ CYP2A6

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบถึงความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของ CYP2A6 กับเภสัชจลนศาสตร์ของ nicotine และปริมาณการสะสมของ nicotine และ cotinine ในเส้นผมของผู้สูบบุหรี่ที่มาตรวจสุขภาพ ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ เพื่อนำมาใช้เป็นแนวทางในปรับขนาดของนิโคตินทดแทน (Nicotine replacement therapy) ให้มีความเหมาะสมกับบุคคลที่มีความต้องการเลิกบุหรี่ ซึ่งอาจส่งผลให้บุคคลนั้นสามารถเลิกสูบบุหรี่ได้สำเร็จ

1.5 แบบแผนการวิจัย (Experimental design)



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สารประกอบในบุหรี่

ในบุหรี่ประกอบด้วยสารเสพติดตามธรรมชาติที่มาจากใบยาสูบแล้วยังประกอบด้วยสารปรุงแต่งอีกมากมาย ในบุหรี่ยี่นั้นประกอบด้วยสารเคมีประมาณ 4,800 ชนิดอยู่ในรูปของละอองและก๊าซซึ่งส่งผลโดยตรงต่อสุขภาพของผู้สูบและผู้ได้รับควันบุหรี่ ส่วนใหญ่บุหรี่ประกอบด้วยสารเคมีแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มดังนี้ (8)

1. ส่วนอนุภาค (particle phase) ประกอบด้วยด้วยอนุภาคสำคัญ ตัวอย่างเช่น

นิโคติน (nicotine) เป็นสารประกอบหลักที่พบในยาสูบ มีลักษณะคล้ายน้ำมัน ไม่มีสี และละลายได้ในน้ำ nicotine สามารถซึมผ่านผิวหนังของคนและสัตว์ได้ และสามารถผ่านตัวกรองกั้นระหว่างเลือดและสมอง (blood brain barrier) nicotine มีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ที่สมองโดยตรงส่งผลให้ผู้สูบบุหรี่มีความสุขสบาย ที่สำคัญทำให้เกิดการติดบุหรี่และเลิกสูบบุหรี่ยาก

น้ำมันดิบ (tar) เป็นสารเหนียวสีน้ำตาล ลักษณะคล้ายดินน้ำมัน เกิดจากการเผาไหม้ของใบยาสูบ กระจาดขมวน และส่วนผสมอื่นๆ ของบุหรี่ ส่วนของละอองน้ำมันดิบสามารถเกาะติดตามผนังของหลอดลมและถุงลมปอด เมื่อละอองน้ำมันดิบที่เกาะตามผนังหลอดลมรวมตัวกับฝุ่นละออง ส่งผลให้เกิดการรวมตัวและสะสมอยู่ภายในปอด ทำให้เกิดการระคายเคืองของระบบทางเดินหายใจ ส่งผลให้เกิดอาการไอเรื้อรังและมีเสมหะ เป็นสาเหตุของโรคปอดอุดกั้นเรื้อรัง (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) และโรคมะเร็งปอด (lung cancer)

2. ส่วนไอ (vapor phase) ประกอบด้วยส่วนที่เป็นก๊าซ ตัวอย่างเช่น

คาร์บอนมอนอกไซด์ (carbon monoxide) เป็นก๊าซพิษที่ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น เกิดจากการเผาไหม้ของใบยาสูบ ก๊าซชนิดนี้จะไปจับตัวกับฮีโมโกลบิน (hemoglobin) ในเม็ดเลือดแดงได้ดีกว่าออกซิเจน ทำให้การลำเลียงออกซิเจนไปยังส่วนต่างๆ ของร่างกายน้อยลง ส่งผลให้หัวใจทำงานหนักมากขึ้นเพื่อให้เลือดนำออกซิเจนไปเลี้ยงส่วนต่างๆ ให้เพียงพอต่อความต้องการของร่างกาย

ไฮโดรเจนไซยาไนด์ (Hydrogen cyanide) เป็นก๊าซที่สามารถทำลายเยื่อหลอดลมส่วนต้นของระบบทางเดินหายใจ ส่งผลให้เกิดอาการไอ มีเสมหะ และหลอดลมอักเสบเรื้อรัง ซึ่งเป็นผลมาจาก

การที่ไฮโดรเจนไซยาไนด์ไปทำลายซีเลีย (cilia) ที่ทำหน้าที่ในการพัดพาสิ่งแปลกปลอมไม่ให้เข้าสู่ระบบทางเดินหายใจ

ไนโตรเจนไดออกไซด์ (nitrogen dioxide) เป็นก๊าซที่มีฤทธิ์ทำลายเยื่อหลอดลมส่วนปลายและถุงลมปอด ทำให้น้ำของถุงลมโป่งพอง, จำนวนถุงลมในปอดลดลง, ทำให้ประสิทธิภาพในการทำงานของปอดลดลง และร่างกายได้รับออกซิเจนไม่เพียงพอกับความต้องการของร่างกาย

2.2 ลักษณะของการติดยาในทางคลินิก (Clinical aspects of nicotine addiction)

1. การติดยาทางจิตใจ (Psychological dependent)

ผู้สูบบุหรี่ที่มีความปรารถนาต่อฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ nicotine ที่มีอยู่ในบุหรี่ เช่น ทำให้ผู้สูบบุหรี่มีอาการเป็นสุข ลดอาการเครียดและความวิตกกังวล ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงาน ลักษณะของการติดยาในลักษณะนี้ขึ้นอยู่กับจิตใจและความเคยชินของผู้สูบ เช่น เมื่อมีความเครียดก็สูบบุหรี่ เป็นต้น (9, 10)

2. การเสพติดยาทางร่างกาย (Behavioral of tobacco addiction)

เป็นการเสพติดยาที่ร่างกายขาดยาไม่ได้ (9) เมื่อมีการหยุดใช้ยาจะทำให้มีอาการขาดนิโคติน (withdrawal symptoms) ส่งผลให้มีอาการหงุดหงิด โกรธง่าย มีอัตราการเต้นของหัวใจช้าลง และมีอาการอยากยา ทำให้เป็นอุปสรรคที่สำคัญในการเลิกยา ซึ่งอาการขาด nicotine หรือยาที่พบว่ามีอาการรุนแรงในช่วงสัปดาห์แรกของการเลิกยา และอาจทำให้ผู้สูบกลับไปสูบบุหรี่อีกครั้ง (11)

2.3 กลไกการเสพติดยา (Nicotine addiction)

องค์การอนามัยโลกให้ความหมายของยาเสพติดยา คือ สิ่งที่ยาเข้าไปแล้วทำให้เกิดความต้องการทางร่างกายและจิตใจ โดยผู้เสพไม่สามารถหยุดได้ และเพิ่มปริมาณการเสพมากขึ้นเรื่อยๆ จนในที่สุดทำให้เกิดโรคร้ายไข้เจ็บต่อร่างกายและจิตใจ

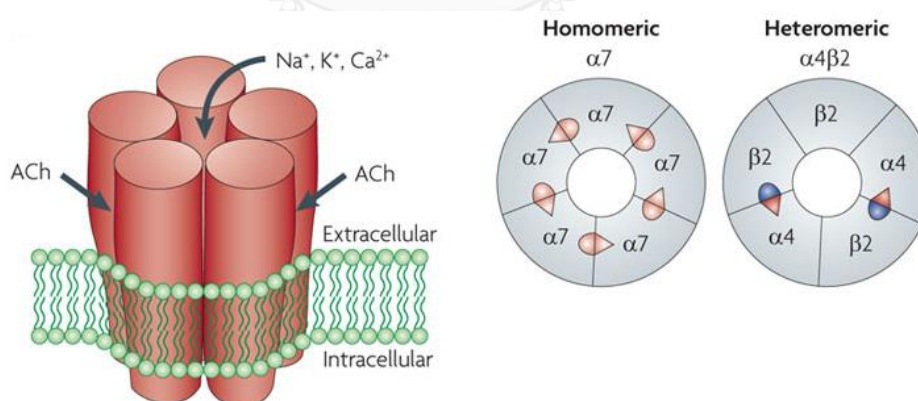
การเสพติดยาเกิดขึ้นเนื่องจากสาร nicotine ที่มีอยู่ในยา เมื่อผู้สูบยาเข้าไป nicotine จากควันยาเข้าสู่ร่างกายโดยถูกดูดซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ทางเดินหายใจ ผ่านเข้าไปในปอด (pulmonary venous circulation) จากนั้นเข้าสู่ระบบไหลเวียนเลือดของร่างกายและสมองอย่าง

รวดเร็ว และกระจายตัวเข้าไปในเนื้อเยื่อสมอง (brain tissue) ไปจับกับตัวรับ nicotine ที่ชื่อ nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) ส่งผลให้มีการเปิดออกของไอออนแชนเนล ทำให้มีโซเดียม (Na^+) และแคลเซียม (Ca^{2+}) ผ่านเข้ามาภายในเซลล์เกิดการกระตุ้น voltage-dependent calcium channel ทำให้แคลเซียมผ่านเข้ามาทางปลายเซลล์ประสาทพรีซินแนปส์ (presynapse) ระดับของแคลเซียมภายในเซลล์ที่เพิ่มสูงขึ้นทำให้เกิดการหลั่งสารสื่อประสาทชนิดต่างๆ ออกมาโดยขึ้นอยู่กับว่า nAChRs อยู่บริเวณใดของสมอง (9)

2.3.1 ตัวรับนิโคติน (nicotinic acetylcholine receptors; nAChRs)

nAChRs เป็น ligand-gated ion channel มีลักษณะเป็น pentameric receptor complex มี 5 subunits เรียงตัวล้อมรอบไอออนแชนเนล ซึ่งเป็นช่องสำหรับให้ไอออนต่างๆ ผ่าน nAChRs สามารถพบได้ที่ระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system; CNS) และระบบประสาทส่วนปลาย (peripheral nervous system; PNS) (12) nAChRs ประกอบด้วย 9 α -subunits isoform (α -2 - α -10) และ 3 β -subunits isoform (β -2 - β -4)

ในระบบประสาทส่วนกลางของมนุษย์ พบว่า nAChRs ที่พบมากเป็นชนิด $\alpha_4\beta_2$ จัดเป็นแบบเฮเทอโรเมอร์ (heteromer) ประกอบด้วย α_4 2 subunits, β_2 3 subunits และชนิด α_7 จัดเป็นแบบโฮโมเมอร์ (homomer) ประกอบด้วย α_7 5 subunits (9)



ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างของ nAChRs (12)

ในสมอง พบว่าร้อยละ 90 ของ nAChRs เป็นแบบ α_4 และ β_2 โดยทั้ง 2 ชนิดนี้มีการจับกันแบบเฉพาะเจาะจง ส่งผลให้มีการหลั่งสารสื่อประสาทชนิดต่างๆ ออกมา สารสื่อประสาทที่หลั่ง

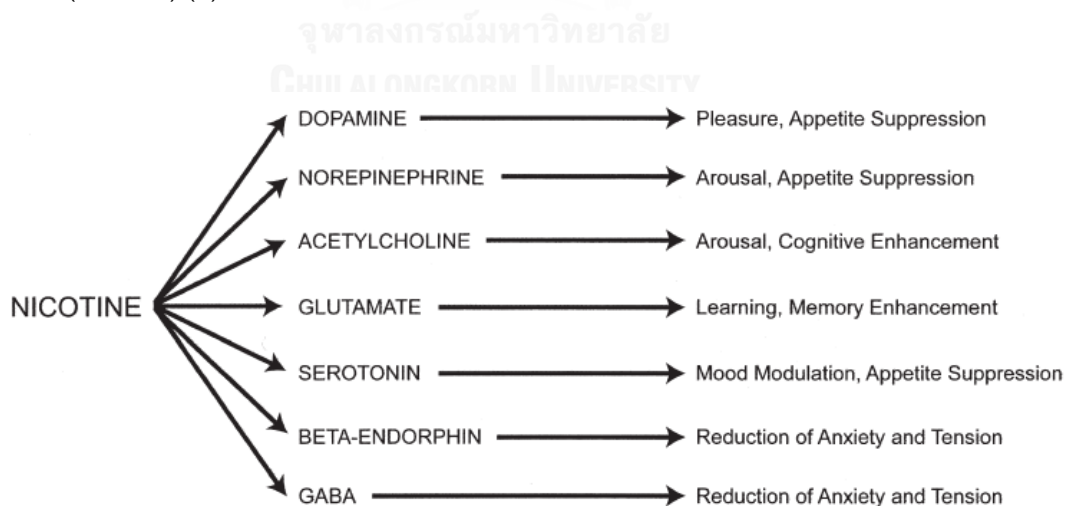
ออกมานั้นขึ้นอยู่กับ nAChRs อยู่ที่บริเวณใดของสมอง เช่น พบ $\alpha_4\beta_2$ ที่บริเวณ hippocampus ทำให้มีการหลั่ง acetylcholine (ACh) และ gamma aminobutyric acid (GABA) เป็นต้น (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงตำแหน่ง nAChRs ในการควบคุมการหลั่งสารสื่อประสาทชนิดต่างๆ ของระบบประสาทส่วนกลาง (13)

	ACh	DA	NE	5-HT	GABA	Glu
cerebellum						α_7^*
hippocampus	$\alpha_4\beta_2^*/\alpha_3\beta_4^*$		$\alpha_3\beta_4^*, \alpha_6\beta_2\beta_3^*$	X	$\alpha_3\beta_2^*, \alpha_4\beta_2^*, \alpha_7^*$	α_7^*
cortex	$\alpha_4\beta_2^*/\alpha_3\beta_4^*$		$\alpha_3\beta_2^*/(\alpha_4)\alpha_6\beta_2\beta_3^*$	X		α_7^*
olfactory bulb						α_7^*
striatum		$\alpha_4\beta_2^*, \alpha_6\beta_2\beta_3^*$			$\alpha_4\beta_2^*$	α_7^*
thalamus		$\alpha_4\beta_2^*$			$\alpha_4\beta_2^*$	
IPN						
dorsal raphe nucleus	$\alpha_3\beta_4^*$					
spinal cord				non- $\alpha_4\beta_2$, non- α_7	$\alpha_3\beta_2^*, \alpha_7^*$	α_7^*

* "X" indicates that the neurotransmitter release is under nAChR modulation by a not yet identified subtype. The table is primarily based on ref 5. IPN: interpeduncular nucleus.

สารสื่อประสาทที่หลั่งออกมาจากปลายเซลล์ประสาทพรีซินแนปส์ที่มีความสำคัญกับการสูบบุหรี่คือ dopamine (DA) ส่งผลให้ผู้สูบบุหรี่มีความสุข ลดความเครียด และลดความอยากอาหาร นอกจากนี้ nicotine จะมีผลเพิ่มการหลั่ง dopamine แล้วยังมีผลต่อการหลั่งสารสื่อประสาทชนิดอื่นๆ ออกมาจากปลายเซลล์ประสาทพรีซินแนปส์อีกด้วย เช่น norepinephrine (NE), glutamate (Glu) เป็นต้น (ภาพที่ 2) (9)



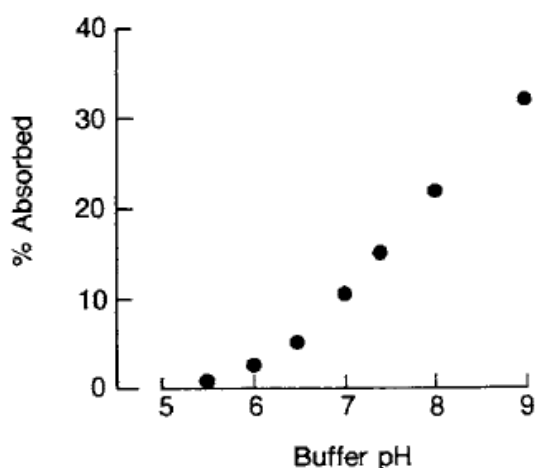
ภาพที่ 2 แสดงผลของ nicotine ต่อการหลั่งสารสื่อประสาทในสมอง (9)

2.4 เภสัชวิทยาของนิโคติน (Pharmacology of nicotine)

การที่ nicotine จากการสูบบุหรี่เข้าสู่ร่างกายและไปถึงตำแหน่งที่ออกฤทธิ์ได้นั้น ขึ้นอยู่กับกระบวนการทางเภสัชจลนศาสตร์ (pharmacokinetic) ดังต่อไปนี้

1. การดูดซึม (Absorption)

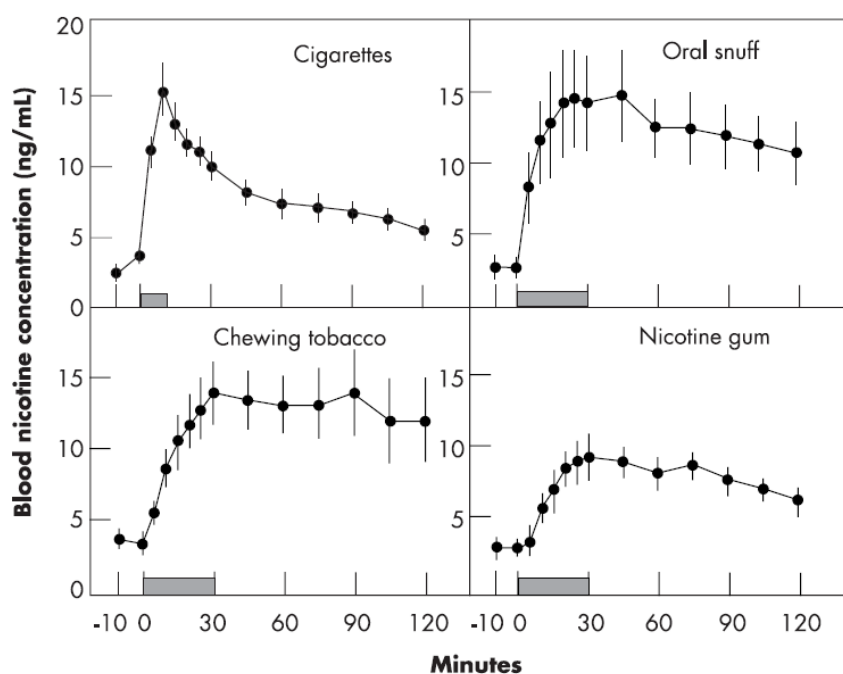
การดูดซึม nicotine เข้าสู่ร่างกายเกิดขึ้นได้หลายช่องทางขึ้นอยู่กับการบริหาร nicotine เข้าสู่ร่างกาย (administration) โดยการดูดซึมสามารถเกิดขึ้นผ่านทางช่องปาก ผิวหนัง ปอด กระเพาะปัสสาวะ และระบบทางเดินอาหาร อัตราการดูดซึม nicotine นั้นขึ้นอยู่กับค่า pH ของ biological membranes หากอยู่ในสภาวะที่มีความเป็นกรด nicotine จะถูกดูดซึมได้น้อย (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 แสดงผลของค่า pH ของ biological membranes ต่อการดูดซึม nicotine (14)

การดูดซึม nicotine ผ่านทางช่องปาก เป็นช่องทางหลักของการดูดซึม nicotine ที่ได้จากการสูบบุหรี่ที่ไม่ได้พ่นควันหรือออกมาและสำหรับผู้ที่ใช้บุหรี่แบบไร้ควัน เช่น ยาสูบแห้งสำหรับเคี้ยว (chewing tobacco) หรือหมากฝรั่งนิโคติน (nicotine gum) แต่ผู้ที่มีการสูบบุหรี่และพ่นควันออกมา nicotine ที่อยู่ในควันบุหรี่จะถูกสูดดมผ่านไปยัง small airways และถูกดูดซึมผ่านทางถุงลมของปอด การดูดซึม nicotine ผ่านถุงลมปอดนี้เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้ความเข้มข้นของ nicotine ในเลือดระหว่างการสูบบุหรี่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเช่นกัน ทั้งนี้เป็นเพราะปอดมีพื้นที่ผิวมาก นอกจากนี้ยังพบว่า การดูดซึม nicotine ผ่านทางถุงลมปอดยังขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ nicotine ที่อยู่ในบุหรี่อีกด้วย ซึ่งบุหรี่แต่ละชนิดมีความเข้มข้นของ nicotine ที่แตกต่างกันออกไป (3, 9, 15)

นอกจากนี้ยังพบว่า nicotine สามารถดูดซึมผ่านทางผิวหนัง การดูดซึมผ่านช่องทางนี้มี ความสำคัญสำหรับผู้ที่ได้รับ nicotine ทดแทน (nicotine replacement therapies) ในรูปของ nicotine แบบแผ่นแปะ โดยอัตราการดูดซึม nicotine ผ่านผิวหนังขึ้นอยู่กับ permeability ของ ผิวหนัง, อัตราการแพร่กระจายผ่านทาง polymer matrix ซึ่งเป็นตัวควบคุมการปล่อยตัวยาออกจาก แผ่นแปะ (3) และ nicotine สามารถดูดซึมผ่านทางระบบทางเดินอาหาร เช่น การใช้อย่างสูบสวนทาง ทวารเพื่อรักษาอาการท้องผูก แต่การดูดซึม nicotine ผ่านช่องทางนี้เกิดขึ้นได้ไม่ดังก เนื่องจาก ภายใต้อาหารมีน้ำย่อยที่มีความเป็นกรด (14)



ภาพที่ 4 แสดงระดับ nicotine ในเลือดระหว่างและหลังได้รับ cigarettes, oral snuff, chewing tobacco และ chewed nicotine gum (3)

2. การกระจาย (Distribution)

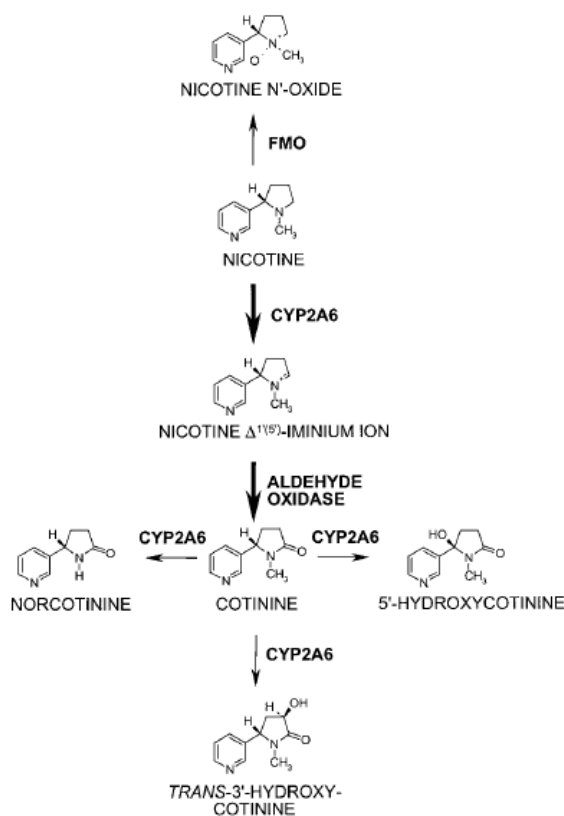
หลังจาก nicotine ถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดแล้ว พบว่าที่ pH 7.4 ประมาณ 69% nicotine จะอยู่ในรูปแตกตัว และ 31% อยู่ในรูปไม่แตกตัว การจับกันของ nicotine กับ plasma proteins เกิดขึ้นน้อยกว่า 5% nicotine จะกระจายเข้าสู่ตับ, ไต, ม้าม และปอดมากที่สุด nicotine

จากการสูบบุหรี่จะไปยังระบบไหลเวียนเลือดดำในปอด (pulmonary venous circulation) และเคลื่อนที่ไปยังหัวใจห้องล่างซ้าย (left ventricle) จากนั้นเข้าสู่ระบบไหลเวียนเลือดของร่างกายและสมองอย่างรวดเร็ว ระยะเวลาที่ nicotine ไปถึงสมองประมาณ 10-20 วินาที (3)

นอกจาก nicotine มีการกระจายไปตามเนื้อเยื่อต่างๆ ของร่างกายแล้ว ยังสามารถกระจายไปยังเส้นผมได้ด้วย โดย nicotine ที่อยู่ในกระแสเลือดมีการกระจายมายังเส้นผมผ่านทางเส้นเลือด (blood vessels) ที่อยู่รอบเซลล์รากผม (16) จากนั้น nicotine และเมแทบอลิต์คือ cotinine จะจับกับเมลานินที่อยู่ในเส้นผม ส่งผลให้ nicotine และ cotinine มีการกระจายตัวจากเลือดไปยังเส้นผม พบว่าในเส้นผมสีเข้ม เช่น สีดำ มีแนวโน้มที่ nicotine จะจับกับเมลานินได้มากกว่าคนที่มีเส้นผมสีอ่อน เช่น สีบลอนด์และสีขาว (3, 17)

3. การเมแทบอลิซึม (Metabolism)

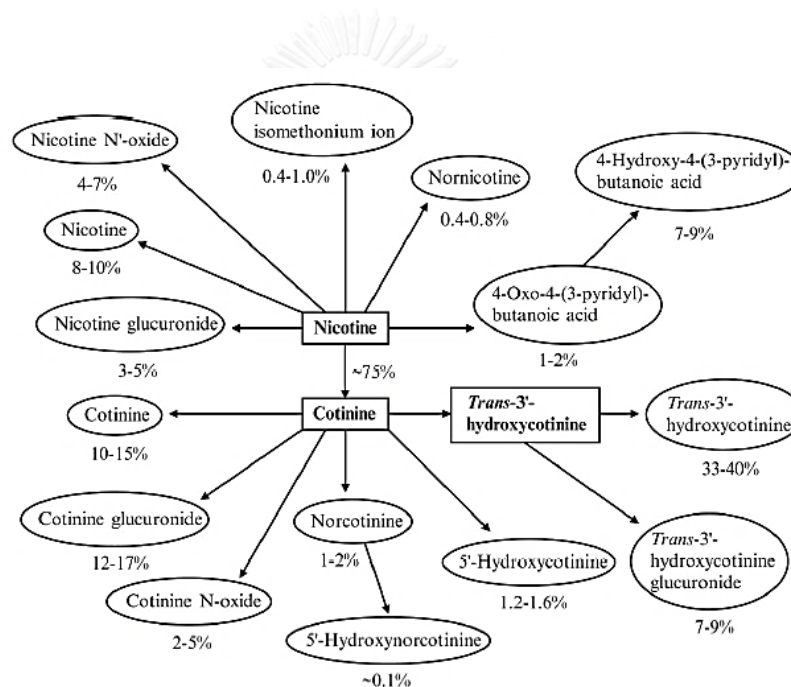
อวัยวะหลักในการเมแทบอลิซึม nicotine ในร่างกายมนุษย์คือ ตับ พบว่าประมาณร้อยละ 80-90 ของ nicotine เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) โดยเอนไซม์ CYP2A6 ในตับได้เป็น cotinine อยู่ในรูปที่ไม่มีฤทธิ์ (inactive metabolite) ในขั้นตอนแรกพบว่า nicotine ถูกเปลี่ยนเป็น nicotine- $\Delta^{1(5)}$ -iminium ion โดยเอนไซม์ CYP2A6 และถูกเปลี่ยนไปเป็น cotinine โดย cytosolic aldehyde oxidase (3) จากนั้น cotinine ที่เกิดขึ้นถูกเปลี่ยนไปเป็น *trans*-3'-hydroxycotinine, 5'-hydroxycotinine และ norcotinine โดยเอนไซม์ CYP2A6 (ภาพที่ 5) ซึ่งสามารถตรวจพบได้ในเลือดและปัสสาวะของผู้สูบบุหรี่ (18)



ภาพที่ 5 แสดงกระบวนการเมแทบอลิซึมของ nicotine ในร่างกายมนุษย์ (18)

นอกจาก CYP2A6 แล้ว nicotine ที่เข้าสู่ร่างกายสามารถเปลี่ยนไปเป็นเมแทบอลิต์ตัวอื่นผ่านทางปฏิกิริยาทางเคมีอื่นๆ ได้แก่ N-oxidation, N-demethylation และ glucuronidation พบว่ามีเพียงแค่ 7-10% ของ nicotine ถูกเปลี่ยนเป็น Nicotine-1'-N-oxide ซึ่งเป็น main product ของปฏิกิริยา N-oxidation (3) นอกจากนี้พบว่า Nicotine-1'-N-oxide ไม่เป็นพิษ (non-toxic) แต่อาจจะเปลี่ยนไปเป็นสารไนโตรซามีน (nitrosamines) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งได้ สำหรับกระบวนการเมแทบอลิซึม nicotine ผ่านทางปฏิกิริยา N-demethylation พบว่า nicotine ถูกเปลี่ยนเป็น nornicotine ซึ่งสามารถตรวจพบได้ในปัสสาวะเพียงเล็กน้อย สุดท้ายกระบวนการเปลี่ยนแปลง nicotine ผ่านทางปฏิกิริยา glucuronidation โดยเอนไซม์ uridine diphosphate-glucuronosyltransferase (UGT) ปฏิกิริยานี้จะรวม nicotine และเมแทบอลิต์ของ nicotine เข้ากับ glucuronide ได้เป็น nicotine N-glucuronides, cotinine N-glucuronides และขับออกทางปัสสาวะ (9, 19)

การวัดปริมาณการเมแทบอลิต์ของ nicotine พบว่า 80–90% ถูกเปลี่ยนไปเป็น cotinine โดยพบว่า cotinine มี elimination half-life ประมาณ 16 ชั่วโมง ส่วน nicotine ที่เหลือจะถูกเปลี่ยนเป็น Nicotine-1'-N'-oxide ประมาณ 4-7% และ nicotine glucuronide ประมาณ 3-5% nicotine ที่ถูกเปลี่ยนเป็น cotinine พบว่าถูกขับออกทางปัสสาวะในรูปของ cotinine ประมาณ 10-15% ส่วนที่เหลือถูกเปลี่ยนเป็นเมแทบอลิต์ตัวอื่น ได้แก่ *trans*-3'-hydroxycotinine (33-40%) โดยเอนไซม์ CYP2A6 ซึ่ง *trans*-3'-hydroxycotinine มี elimination half-life 5 ชั่วโมง (19, 20) nicotine ส่วนที่เหลือยังถูกเปลี่ยนเป็น cotinine glucuronide (12–17%) และ *trans*-3'-hydroxycotinine glucuronide (7–9%) ดังแสดงในภาพที่ 6



ภาพที่ 6 แสดงภาพรวมของกระบวนการเมแทบอลิซึมของ nicotine ในร่างกายมนุษย์ (3)

จากการศึกษามีข้อมูลที่แสดงให้เห็นว่าอัตราส่วนระหว่าง *trans*-3'-hydroxycotinine/cotinine (3HC/COT ratio) ในพลาสมาและน้ำลายได้ถูกนำมาใช้เป็น noninvasive marker สำหรับการวัด CYP2A6 activity ในผู้สูบบุหรี่ และสะท้อนให้เห็นถึงอัตราการเมแทบอลิซึมของ nicotine (3, 19, 21) การวัด CYP2A6 activity อาจวัดจากอัตราส่วนของ cotinine/nicotine (COT/NIC ratio) ก็ได้ แต่เนื่องจาก nicotine มี half life ค่อนข้างสั้น

(ประมาณ 2 ชั่วโมง) ขณะที่ cotinine นั้นมี half life โดยเฉลี่ยประมาณ 16 ชั่วโมง ซึ่งระดับ cotinine ในเลือดของผู้สูบบุหรี่ค่อนข้างคงที่เมื่อเวลาผ่านไป แต่จากการที่ nicotine มี half life สั้น เมื่อเวลาผ่านไประดับของ nicotine ในเลือดจะค่อยๆ ลดลง ส่งผลให้ COT/NIC ratio ในเลือดไม่คงที่ (3) นอกจากนี้เอนไซม์ CYP2A6 ยังทำหน้าที่ในการเมแทบอลิซึม cotinine เป็น *trans*-3'-hydroxycotinine ซึ่ง *trans*-3'-hydroxycotinine ปกติมี half life ประมาณ 5 ชั่วโมง ส่งผลให้ระดับ cotinine และ *trans*-3'-hydroxycotinine ในเลือดเป็นสัดส่วนกัน นอกจากนี้พบว่ากระบวนการเมแทบอลิซึมของ nicotine ไปเป็น cotinine ไม่ได้เกิดผ่านทาง CYP2A6 โดยตรง ซึ่ง nicotine ต้องถูกเปลี่ยนเป็น nicotine- $\Delta^{1(5)}$ -iminium ion โดยเอนไซม์ CYP2A6 ก่อน ถึงจะเปลี่ยนมาเป็น cotinine แต่กระบวนการเมแทบอลิซึมของ nicotine เป็น *trans*-3'-hydroxycotinine เกิดขึ้นผ่านทาง CYP2A6 โดยตรง ดังนั้น 3HC/COT ratio จึงเหมาะสำหรับนำมาใช้ในการวัด CYP2A6 activity มากกว่า COT/NIC ratio (5, 20, 22)

4. การขับถ่าย (Excretion)

ในมนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่นๆ ไตเป็นอวัยวะหลักในการขับถ่าย nicotine การขับถ่าย nicotine ผ่านทางไตนั้นขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรดต่างของปัสสาวะ โดยปกติ nicotine ถูกขจัดออกทางไตประมาณ 5% ของ total clearance ซึ่งมี renal clearance โดยเฉลี่ยประมาณ 35-90 mL/min⁻¹ ในสถานะที่ปัสสาวะเป็นด่าง nicotine จะอยู่ในรูปที่ไม่มีประจุและถูกดูดซึมกลับผ่านทางท่อไต (renal tubule) โดยมี renal clearance ต่ำประมาณ 17 mL/min⁻¹ (urine pH 7.0) ส่งผลให้การขับถ่าย nicotine ออกจากร่างกายลดลง ในทางตรงกันข้ามถ้าปัสสาวะเป็นกรด nicotine จะอยู่ในรูปที่มีประจุมากขึ้น เกิดการดูดซึมกลับลดลง อาจทำให้มี renal clearance สูงขึ้นถึง 600 mL/min⁻¹ (urinary pH 4.4) ขึ้นอยู่กับอัตราการไหลของปัสสาวะ การขับถ่าย nicotine ออกจากร่างกายนั้นอาจจะถูกขจัดออกในรูปแบบเดิมที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลง หรือถูกขจัดออกในรูปแบบเมแทบอลิต์คือ cotinine ก็ได้ ซึ่งการขับถ่าย cotinine ผ่านทางไตคิดเป็น 12% ของ total clearance ในทางตรงกันข้ามพบว่าเมแทบอลิต์ของ nicotine ตัวอื่น คือ Nicotine-1'-N'-oxide ถูกขับออกทางปัสสาวะได้ 100% และ *trans*-3'-hydroxycotinine 63% (3) นอกจากนี้ nicotine สามารถถูกขับถ่ายออกจากร่างกายทางน้ำนม ทำให้เด็กที่กินนมแม่ได้ฤทธิ์ของ nicotine และสามารถ

ถูกขับถ่ายออกทางอุจจาระ, น้ำดี, น้อยลงในกระเพาะอาหาร และเหงื่อ แต่ถูกขับออกมาในปริมาณไม่มากจึงไม่ค่อยมีความสำคัญ (14)

จะเห็นได้ว่ากระบวนการทางเภสัชจลนศาสตร์ของ nicotine มีผลต่อระดับของ nicotine ในเลือด ส่งผลให้มีความเกี่ยวข้องกับพฤติกรรมกาสูบบุหรี ดังที่กล่าวไปแล้วในข้างต้นว่า เมื่อสูบบุหรี nicotine จะเข้าสู่ร่างกายไปจับกับ nAChRs ทำให้มีการหลั่งสารสื่อประสาทชนิดต่างๆ ออกมา ส่งผลต่ออารมณ์และพฤติกรรมกาสูบบุหรี เมื่อมีกระบวนการเมแทบอลิซึมเข้ามาเกี่ยวข้อง พบว่า nicotine จะถูกเปลี่ยนเป็นเมแทบอลิต์ตัวอื่น โดยเอนไซม์หลักที่ทำหน้าที่ในการเปลี่ยนแปลง nicotine คือ CYP2A6 ทำให้มีระดับ nicotine ในร่างกายลดลงไปมีผลต่อพฤติกรรมกาสูบบุหรี ซึ่งพฤติกรรมกาสูบบุหรีที่เกิดขึ้นนั้นจะมีความแตกต่างกันออกไปในแต่ละบุคคล แต่ละเชื้อชาติ รวมถึงส่งผลต่อการเลิกสูบบุหรีอีกด้วย ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับเภสัชจลนศาสตร์ โดยเฉพาะด้านกระบวนการเมแทบอลิซึมของ nicotine เป็นสิ่งที่สำคัญ เพื่อช่วยในการทำนายการเปลี่ยนแปลงระดับ nicotine ในเลือดที่เป็นผลมาจากการทำงานของ CYP2A6 ในผู้สูบบุหรีที่มีความต้องการเลิกสูบบุหรี

2.5 เอนไซม์ Cytochrome P450

เอนไซม์ในกลุ่มไซโตโครมพี 450 (cytochrome P450; CYP450) ถูกค้นพบเมื่อประมาณ 50 กว่าปีที่แล้ว เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการเปลี่ยนแปลงสาร (phase I) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์และสลายสารจำเป็นในร่างกาย (endogenous compounds) เช่น คอเลสเตอรอล (cholesterol), กรดน้ำดี (bile acid), สเตอรอยด์ฮอร์โมน (steroid hormone) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีบทบาทในการเมแทบอลิซึมสารแปลกปลอมจากภายนอก (exogenous compounds หรือ xenobiotic) เช่น ยาโรคหัวใจ, สารก่อมะเร็งที่ปนเปื้อนในอาหารหรือสิ่งแวดล้อม (23) CYP450 ส่วนใหญ่พบได้ภายในตับและสามารถพบได้ที่อวัยวะอื่นๆ ได้แก่ สมอง, ปอด, เต้านม และลำไส้ใหญ่ นอกจากนี้เอนไซม์ CYP450 สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น แบคทีเรีย, รา, พืช และสัตว์ (24) ซึ่งในมนุษย์นั้นพบว่าส่วนใหญ่มี 57 ไอโซฟอร์ม (isoform) จาก 18 แฟมิลี (families) และ 42 แฟมิลีย่อย (subfamilies) (25) เช่น CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 และ 3A4/5 เป็นต้น ระบบการเรียกชื่อ CYP450 ขึ้นอยู่กับความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโน หากมีความคล้ายคลึง

กัน 40% ขึ้นไป จัดอยู่ในแฟมิลีเดียวกัน โดยแสดงเป็นตัวเลขอารบิก เช่น CYP1, CYP2, CYP3 แต่ถ้ามีความคล้ายคลึงกัน 55% ขึ้นไป ก็จะจัดอยู่ในแฟมิลีย่อยเดียวกันแสดงเป็นตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวใหญ่ เช่น CYP1A, CYP2B, CYP1A2 (26)

2.5.1 เอนไซม์ CYP2A

การแสดงออกและการทำงานของเอนไซม์ CYP2A ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน พบว่าในมนุษย์ประกอบด้วย CYP2A จำนวน 3 ไอโซฟอร์ม ได้แก่ CYP2A6, CYP2A7, CYP2A13 และยีนที่เสียสภาพการทำงาน (pseudogene) จำนวน 2 ไอโซฟอร์ม ได้แก่ CYP2A7P(T) และ CYP2A7P(C) (27, 28) การแสดงออกของเอนไซม์ CYP2A ในเนื้อเยื่อต่างๆ พบว่าเอนไซม์ CYP2A6 มีการแสดงออกมากที่สุด (1-10%) และส่วนน้อยพบที่เยื่อบุจมูกและทางเดินหายใจ, CYP2A13 พบการแสดงออกมากที่สุดที่เยื่อบุจมูก, ทางเดินหายใจและตับตามลำดับ ส่วนยีนที่เสียสภาพการทำงาน ได้แก่ (CYP2A7(C) และ CYP2A7(T)) มีการแสดงออกที่ตับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 แสดงการแสดงออกของเอนไซม์ CYP2A ในเนื้อเยื่อต่างๆ (28)

Alleles/genes	Expression tissue (mRNA)	Expression (protein)	Enzyme activities
<i>CYP2A6*1</i>	liver (+++) nasal mucosa (+)	Yes	Yes
<i>CYP2A6*2</i>	-	No	No
<i>CYP2A6*3</i>	-	?	?
<i>CYP2A7</i>	liver (+++)	No	No
<i>CYP2A7P(C)</i>	liver (++)	No	No
<i>CYP2A7P(T)</i>	liver (++)	No	No
<i>CYP2A13</i>	nasal mucosa (+++) respiratory tract (+) liver (+)	Yes	Yes

nicotine จากการสูบบุหรี่ที่เข้าสู่ร่างกายเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) โดยเอนไซม์ CYP2A6 ในตับได้เป็น cotinine อยู่ในรูปที่ไม่มีฤทธิ์ (inactive metabolite) และถูกขับออกทางปัสสาวะ (29) นอกจากนี้พบว่าเอนไซม์ CYP450 ชนิดอื่นก็สามารถเปลี่ยนแปลง nicotine ได้ เช่น เอนไซม์ CYP2B6, CYP2D6 และ CYP2E1 แต่พบว่าไม่ใช่เอนไซม์หลักในการเปลี่ยนแปลง nicotine (9, 19) ในทางตรงกันข้ามพบว่ามียาหรือสารหลายชนิดที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ CYP2A6 ทำให้อัตราการเมแทบอลิซึมของ nicotine เพิ่มขึ้นและเร็วขึ้น เช่น ไรแฟมพิซิน

(rifampicin) เป็นยาที่ใช้รักษาวัณโรค, เดกซาเมทาโซน (dexamethasone) เป็นยาในกลุ่มสเตียรอยด์และฟีโนบาร์บิทัล (phenobarbital) เป็นต้น (3) นอกจากนี้พบว่ามีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้ เช่น methoxsalen (8-methoxypsoralen) เป็นยาที่ใช้สำหรับผิวหนัง, pilocarpine เป็นยาสำหรับการรักษาโรคต้อหิน และ menthofuran (30)

การศึกษากระบวนการเมแทบอลิซึม nicotine ผ่านทาง CYP2A6 พบว่าแต่ละบุคคลและแต่ละเชื้อชาติมีความแตกต่างในการตอบสนองต่อฤทธิ์ของ nicotine เป็นผลมาจากความหลากหลายของลักษณะทางพันธุกรรม (genetic polymorphisms) ของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทางเภสัชจลนศาสตร์ คือ CYP2A6 โดยพบว่าอัลลีลของเอนไซม์ CYP2A6 มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ในแต่ละคนแต่ละเชื้อชาติมีความแตกต่างกันของอัลลีล ตัวอย่างเช่น CYP2A6*1A เป็นอัลลีลชนิด wild type พบว่ามีความถี่สูงมากประมาณร้อยละ 80-90 ในประชากรชาวคอเคเซียนและแอฟริกาผิวดำ ส่วนในคนเอเชียตะวันออกและคนไทยมีความชุกของอัลลีลนี้ประมาณร้อยละ 45-60 เท่านั้น ส่วน CYP2A6*2 เป็นอัลลีลที่สร้างเอนไซม์ที่ไม่ทำงาน ซึ่งมีความถี่ในประชากรชาวคอเคเซียนประมาณร้อยละ 1-3 และไม่พบในคนเอเชีย (31) ในขณะที่ CYP2A6*4 เป็นอัลลีลที่มีความสำคัญอย่างมาก เนื่องจากมีการขาดหายไปของยีน CYP2A6 และมีการทำงานของเอนไซม์ลดลงอย่างมาก พบว่าความถี่ของอัลลีลชนิดนี้พบในประชากรชาวเอเชียประมาณร้อยละ 10-20 ส่วนในประชากรชาวคอเคเซียนและแอฟริกาผิวดำพบเพียงร้อยละ 1-4 เท่านั้น สำหรับอัลลีลแบบ CYP2A6*7 จะมี gene conversion และมี single nucleotide polymorphism (SNP) ใน cDNA ที่ตำแหน่ง 1412T>C (ตำแหน่งบนยีนที่ 6558) ส่งผลให้มีการทำงานของเอนไซม์ลดลง (32) ในทางเดียวกัน CYP2A6*9 พบว่ามีความถี่สูงในประชากรชาวเอเชียประมาณร้อยละ 20 ส่วนในประชากรชาวคอเคเซียนและแอฟริกาผิวดำมีความถี่ของอัลลีลชนิดนี้ต่ำมาก (ตาราง 4) และ CYP2A6*9 ชนิดนี้มี SNP บริเวณ 5' flanking region ซึ่งมีผลต่อ TATA box ส่งผลให้มีการลดการสร้าง mRNA และลดการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 (31, 33)

ตารางที่ 3 แสดงอัลลีลของ CYP2A6 กับการทำงานของเอนไซม์ (33)

Allele name	Type of polymorphism	Enzyme activity
CYP2A6*1A	Wild Type	Normal
CYP2A6*1B	Gene conversion with CYP2A7 in 3'-UTR (flanking region)	Increase
CYP2A6*2	L160H	None
CYP2A6*3	CYP2A6 / CYP2A7 hybrid	?
CYP2A6*4	CYP2A6 allele gene deleted	None
CYP2A6*5	G479V	None
CYP2A6*6	R128Q	Decrease
CYP2A6*7	I471T	Decrease
CYP2A6*8	R485L	?
CYP2A6*9	-48T>G	Decrease
CYP2A6*10	I471T; R485L	Decrease

ความหลากหลายของลักษณะทางพันธุกรรมของ CYP2A6 สามารถแบ่งความแตกต่างออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

1. กลุ่มที่มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ปกติ (normal metabolizers)

พบว่าคนที่มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 แบบ Extensive metabolizers มีการเมแทบอลิซึมนิโคตินได้เร็วและมีแนวโน้มที่จะสูบบุหรี่มากกว่าคนปกติ โดยมีลักษณะยีนส์เป็น wild type allele ได้แก่ CYP2A6*1A และ CYP2A6*1B (18, 34)

2. กลุ่มที่มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ปานกลาง (intermediate metabolizers; IMs)

มีอัลลีลของ CYP2A6 ปกติหนึ่งชุดและมีอัลลีลที่มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ลดลงหนึ่งชุด ได้แก่ CYP2A6*1/*4, CYP2A6*1/*7, CYP2A6*1/*9, CYP*1/*10 ซึ่งมีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ประมาณ 75% ของการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 แบบปกติ (31, 35)

3. กลุ่มที่มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ต่ำกว่าปกติมากหรือไม่มีเลย (poor metabolizers; PMs)

มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ลดลง 2 ชุดหรือมีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ลดลงหนึ่งชุดร่วมกับอัลลีล CYP2A6*4 ที่มีการขาดหายไปของยีนส์ CYP2A6 (whole deletion allele) ได้แก่ CYP2A6*7/*9, CYP2A6*7/*10, CYP2A6*9/*10, CYP2A6*4/*9 หรือมีอัลลีล CYP2A6*4 จำนวน 2 ชุด คือ CYP2A6*4/*4 ทำให้มีการทำงานของเอนไซม์น้อยกว่าปกติ ซึ่งมีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ประมาณ 25-50% ของการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 แบบปกติ (35) นอกจากนี้พบว่ากลุ่มคนที่มี CYP2A6*4/*4 ทำให้ขาดความสามารถในการเปลี่ยนแปลงนิโคตินหรือมีการเมแทบอลิซึมนิโคตินช้ามาก ทำให้ระดับนิโคตินอยู่ในร่างกายมาก จึงมีความเป็นไปได้ที่จะสูบบุหรี่ลดลง (34)

ตารางที่ 4 แสดงความถี่ของ CYP2A6 alleles ในประชากรชาวเอเชียและชาวคอเคเซียน (31)

Alleles	Thais ^a (%)	Japanese ^b (%)	Koreans ^b (%)	Caucasians ^c (%)	Black Africans ^d (%)
CYP2A6*1	58.8	48.3	59.2	88.8-97.1	92.4
CYP2A6*2	ND	0.0	0.0	1.0-3.0	0.0
CYP2A6*4	14.2	20.1	11.0	1.0-4.0	1.9
CYP2A6*5	ND	0.0	0.5	ND	0.0
CYP2A6*7	5.0	6.5	3.6	0.0	0.0
CYP2A6*8	0.0	2.2	1.4	0.0	0.0
CYP2A6*9	20.4	21.3	22.3	5.2-7.2	5.7
CYP2A6*10	1.6	1.1	0.5	0.0	0.0
CYP2A6*11	ND	ND	ND	0.0	0.0
CYP2A6*17	ND	0.0	0.0	ND	ND
CYP2A6*18	ND	0.0	0.5	ND	ND
CYP2A6*19	ND	0.5	1.0	ND	ND
CYP2A6*20	ND	0.0	0.0	ND	ND

a: Current study, b: Yoshida *et al.* 2002¹⁶, Yoshida *et al.* 2003¹⁵, Fukami *et al.* 2004¹⁹, Fukami *et al.* 2005²⁰ and Fukami *et al.* 2005²¹, c: unpublished data obtained in our laboratory, d: Gyamfi *et al.* 2004¹⁰, ND: not determined

การศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์ CYP2A6

ปี ค.ศ. 2001 Jun-Tack Kwona และคณะ (27) ศึกษาผลของความแตกต่างในการเมแทบอลิซึม nicotine และความถี่อัลลีล CYP2A6 ในอาสาสมัครชาวเกาหลีจำนวน 209 คน ทำการศึกษาโดยให้อาสาสมัครเคี้ยวหมากฝรั่งนิโคตินขนาด 2 มิลลิกรัม จากนั้นวัดจีโนไทป์ของ CYP2A6 พบว่ากลุ่มอาสาสมัครชาวเกาหลีมีความถี่ของอัลลีล CYP2A6 แบบ CYP2A6*1A มากที่สุด (45.7%) รองลงมาคือ CYP2A6*1B (37.5%) และ CYP2A6*4 (20.1%) ตามลำดับ ซึ่งความถี่ของอัลลีล CYP2A6 มีความคล้ายคลึงกับอาสาสมัครชาวญี่ปุ่นตามที่ได้มีการรายงานไว้ก่อนหน้านี้ อาสาสมัครชาวเกาหลีจำนวน 4 คน มีอัลลีลแบบ CYP2A6*4 (homozygotes) พบว่ามีการเมแทบอลิซึม nicotine

ไปเป็น cotinine ซ้ำ ซึ่งมีความสอดคล้องกับข้อมูลที่พบในชาวญี่ปุ่น ในทางตรงกันข้ามอาสาสมัครชาวเกาหลีที่มีอัลลีลแบบ CYP2A6*4 (heterozygotes) ได้แก่ CYP2A6*1A/*4 และ CYP2A6*1B/*4 พบว่ามีอัตราการเมแทบอลิซึม (metabolic ratio) ต่ำกว่าอาสาสมัครที่ไม่มีอัลลีลแบบ CYP2A6*4 (heterozygotes) และในอาสาสมัครที่มีอัลลีลแบบ CYP2A6*1B แสดงให้เห็นว่ามีการเมแทบอลิซึม nicotine ไปเป็น cotinine ได้มาก ดังนั้นจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างในแต่ละบุคคลและเชื้อชาติ มีผลต่อการเมแทบอลิซึม nicotine ซึ่งมีความสัมพันธ์กันอย่างมากกับความแตกต่างทางพันธุกรรมของ CYP2A6

ปี ค.ศ. 2001 Nakajima และคณะ (36) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความแตกต่างของแต่ละบุคคลในการเมแทบอลิซึม nicotine และความแตกต่างทางพันธุกรรมของ CYP2A6 ในอาสาสมัครสุขภาพดีชาวญี่ปุ่นจำนวน 92 คน ทำการศึกษาโดยให้อาสาสมัครเคี้ยวหมากฝรั่งนิโคตินขนาด 2 มิลลิกรัมจำนวน 1 ซินเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเก็บตัวอย่างเลือดก่อนและหลังเคี้ยวหมากฝรั่งนิโคตินเป็นเวลา 2 ชั่วโมงเพื่อนำมาตรวจสอบเมแทบอลิซึมของ nicotine พบว่าอาสาสมัครแต่ละคนมีเมแทบอลิซึมของ nicotine แตกต่างกันไป โดยอาสาสมัครมีความถี่ของอัลลีล CYP2A6 แบบ CYP2A6*1A มากที่สุด (42.4%) รองลงมาคือ CYP2A6*1B (37.5%) และ CYP2A6*4 (20.1%) ตามลำดับ ในขณะที่ความถี่ของอัลลีล CYP2A6 แบบ CYP2A6*2, CYP2A6*3 และ CYP2A6*5 ไม่มีการแสดงออกในกลุ่มอาสาสมัครที่ศึกษา ในอาสาสมัครจำนวน 3 คน มีจีโนไทป์ของ CYP2A6 แบบ CYP2A6*4/*4 มีการเมแทบอลิซึม nicotine ไปเป็น cotinine ซ้ำ ในทางตรงกันข้ามอาสาสมัครที่มีอัลลีลแบบ CYP2A6*1A/*1B มีการเมแทบอลิซึม nicotine ไปเป็น cotinine ได้มากกว่าอาสาสมัครที่มีอัลลีลแบบ CYP2A6*1A/*1A แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าในแต่ละคนมีความแตกต่างกันของการเมแทบอลิซึม nicotine และมีความสัมพันธ์กับความแตกต่างทางพันธุกรรมของ CYP2A6

ปี ค.ศ. 2006 Malaiyandi และคณะ (37) ศึกษาจีโนไทป์ของ CYP2A6 ต่อการทำงานของ CYP2A6 โดยใช้ 3HC/COT ratio และพฤติกรรมการสูบบุหรี่ในอาสาสมัครสุขภาพดีชาวคอเคเซียนที่ได้รับนิโคตินแบบแผ่นแปะและแบบสเปรย์ พบว่าอาสาสมัครมีการทำงานของ CYP2A6 แบบ slow metabolizers มีค่า 3HC/COT ratio ต่ำกว่าอาสาสมัครที่มีการทำงานของ CYP2A6 แบบ normal metabolizers และมีพฤติกรรมการสูบบุหรี่ต่อวันน้อยกว่าอาสาสมัครที่มีการทำงานของ CYP2A6 แบบ normal metabolizers นอกจากนี้พบว่าอาสาสมัครที่มีการทำงานของ CYP2A6 แบบ slow

metabolizers จะมีระดับ nicotine ในพลาสมาสูงกว่าอาสาสมัครที่มีการทำงานของ CYP2A6 แบบ normal metabolizers การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าความแตกต่างของจีโนไทป์ของ CYP2A6 มีผลต่อพฤติกรรมการสูบบุหรี่ในอาสาสมัครชาวคอเคเซียนที่ได้รับนิโคตินทดแทน และมีผลต่อระดับ nicotine ในพลาสมา

ปี ค.ศ. 2007 Mwenifumbo และคณะ (2) ศึกษาความสัมพันธ์ของการสูบบุหรี่, เพศ, อายุ, การใช้แอลกอฮอล์และกัญชากับการทำงานของ CYP2A6 โดยใช้ 3HC/COT ratio และเภสัชจลนศาสตร์ของนิโคติน (area under the curve (AUC)) ในอาสาสมัครชาวนิโกรที่มีจีโนไทป์ของ CYP2A6 ที่คล้ายคลึงกัน พบว่าในอาสาสมัครที่สูบบุหรี่มีค่า 3HC/COT ratio สูงกว่าอาสาสมัครที่ไม่สูบบุหรี่ และอาสาสมัครเพศหญิงมีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 มากกว่าอาสาสมัครเพศชาย ในทางตรงกันข้ามอายุไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ในอาสาสมัครชาวนิโกร และการดื่มแอลกอฮอล์หรือการใช้กัญชาไม่มีความสัมพันธ์กับการทำงานของ CYP2A6 และเภสัชจลนศาสตร์ของ nicotine การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าอาสาสมัครชาวนิโกรมีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 เพิ่มขึ้นโดยมีความสัมพันธ์กับการสูบบุหรี่เพิ่มขึ้นด้วย

ปี ค.ศ. 2008 Emamghoreishi และคณะ (38) ศึกษาความถี่ของอัลลีล CYP2A6 ในกลุ่มประชากรชาวอิหร่าน ทำการศึกษาโดยตรวจสอบความถี่ของอัลลีล CYP2A6 แบบ CYP2A6*2, CYP2A6*4, CYP2A6*9 และ CYP2A6*12 ในอาสาสมัครชายชาวอิหร่านจำนวน 250 คน พบว่าการกระจายตัวของอัลลีล CYP2A6 ในประชากรชาวอิหร่านมีความแตกต่างจากการรายงานการกระจายตัวของอัลลีล CYP2A6 ของเชื้อชาติอื่นๆ ซึ่งความแตกต่างนี้มีความสำคัญต่อการตรวจสอบการพึ่งพาบุหรี่ และการเกิดมะเร็งปอดในประชากรชาวอิหร่าน

ปี ค.ศ. 2009 Apinan และคณะ (34) ศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของ CYP2A6, ความสัมพันธ์ของจีโนไทป์ของ CYP2A6 และการได้รับ cadmium ต่อการเมแทบอลิซึมของ nicotine ในอาสาสมัครชาวไทยจำนวน 182 คน ทำการศึกษาโดยให้อาสาสมัครเคี้ยวหมากฝรั่งนิโคตินขนาด 2 มิลลิกรัมจำนวน 1 ชิ้นเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นให้อาสาสมัครดื่มน้ำและเก็บตัวอย่างปัสสาวะเพื่อวัดเมแทบอลิต์ของ nicotine คือ cotinine, วัดการขจัด cadmium และเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อวัดจีโนไทป์ของ CYP2A6 พบว่าอาสาสมัครที่ศึกษามีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 แบบ extensive metabolizers มากที่สุด (CYP2A6*1A/*1A, CYP2A6*1A/*1B และ CYP2A6*1B/*1B) และมีความสัมพันธ์กับระดับ cotinine ในปัสสาวะ cadmium เป็นสารประกอบที่มีอยู่ในบุหรี่ ซึ่ง

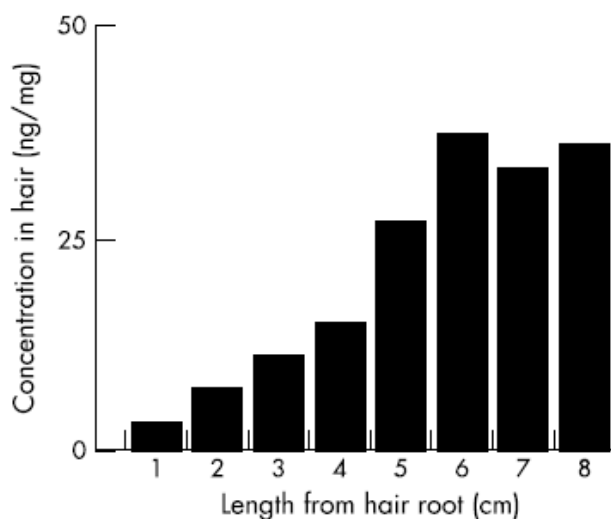
ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณการขจัด cadmium และ cotinine ทางปัสสาวะ พบว่าอาสาสมัครที่สูบบุหรี่มีปริมาณการขจัด cadmium และ cotinine สูงกว่าอาสาสมัครที่ไม่ได้สูบบุหรี่

ปี ค.ศ. 2009 Mahavorasirikul และคณะ (4) ศึกษาจีโนไทป์ของ CYP2A6 กับการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 โดยใช้ coumarin เป็น substrate และศึกษาความสัมพันธ์ของการสูบบุหรี่กับการเมแทบอลิซึมของ coumarin ในอาสาสมัครชาวไทยจำนวน 194 คน พบว่าอาสาสมัครมีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 แบบ extensive metabolizers ได้แก่ CYP2A6*1A/*1A, CYP2A6*1A/*1B และ CYP2A6*1B/*1B ร้อยละ 45.4 มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 แบบ intermediate metabolizers ได้แก่ CYP2A6*1A/*4, CYP2A6*1B/*4, CYP2A6*1A/*7, CYP2A6*1A/*8, CYP2A6*1A/*9, CYP2A6*1A/*10, CYP2A6*1B/*7, CYP2A6*1B/*8, CYP2A6*1B/*9 และ CYP2A6*1B/*10 ร้อยละ 47.9 มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 แบบ poor metabolizer ได้แก่ CYP2A6*7/*9, CYP2A6*7/*10, CYP2A6*9/*10, CYP2A6*4/*9 และ CYP2A6*4/*4 ร้อยละ 6.7 เมื่อทำการศึกษาความถี่ของอัลลีล CYP2A6 ในกลุ่มประชากรพบว่าประชากรไทยมีความถี่ในการกระจายตัวของอัลลีลแบบ wild type คือ CYP2A6*1A และ CYP2A6*1B ร้อยละ 69.3 และมีความถี่ในการกระจายตัวของ CYP2A6*4 ร้อยละ 9.3 จากนั้นศึกษาผลของการสูบบุหรี่ต่อการเมแทบอลิซึม coumarin ไปเป็น 7-hydroxycoumarin (7-OHC) พบว่าการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 อาจไม่มีผลต่อการเมแทบอลิซึม coumarin ในอาสาสมัครชาวไทยที่สูบบุหรี่

การศึกษาเกี่ยวกับปริมาณการสะสมของ nicotine และ cotinine ในเส้นผม

การตรวจระดับสารเคมีในร่างกายนิยมเก็บตัวอย่างจากเลือดหรือปัสสาวะเป็นหลัก เส้นผมเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถนำมาตรวจวัดระดับของสารเคมีในร่างกายได้ การใช้เส้นผมสามารถบ่งบอกถึงการใช้จ่ายหรือสารเคมีนานเป็นสัปดาห์หรือเดือนได้ขึ้นอยู่กับความยาวของเส้นผม โดยเฉลี่ยอัตราการเจริญของเส้นผมจากหนังศีรษะประมาณ 1 เซนติเมตรต่อเดือน โดยผมบริเวณด้านหลังศีรษะ (back of scalp) เป็นบริเวณที่มีการเจริญของเส้นผมสม่ำเสมอมากที่สุด เส้นผมบริเวณนี้จึงเหมาะแก่การนำมาตรวจวัดหารสารเคมีต่างๆ จากการศึกษาปริมาณ nicotine ของผู้สูบบุหรี่ที่เข้าร่วมโครงการเลิกสูบบุหรี่ พบว่าเมื่อตัดเส้นผมจากหนังศีรษะของผู้สูบบุหรี่ที่เข้าร่วมโครงการเลิกสูบบุหรี่มาตรวจวัดระดับ nicotine พบว่าระดับ nicotine ในเส้นผมค่อยๆ ลดลงหลังจากที่เข้าร่วมโครงการเลิกสูบบุหรี่

(ที่ความยาวของเส้นผม 4 เซนติเมตรจากหนังศีรษะ) และมีระดับนิโคตินในเส้นผมต่ำสุดที่ความยาวของเส้นผม 1 เซนติเมตรจากหนังศีรษะ (แสดงถึงการหยุดใช้นิโคตินในปัจจุบัน) (ภาพที่ 7) แสดงให้เห็นว่า nicotine สามารถกระจายและสะสมอยู่ภายในเส้นผมของผู้สูบบุหรี่ได้ (7) ดังนั้นเส้นผมจึงถูกนำมาใช้ในการตรวจหาสารเคมีในผลิตภัณฑ์ยาสูบ คือ nicotine และ cotinine



ภาพที่ 7 แสดงปริมาณของ nicotine ที่สะสมอยู่ในเส้นผมของผู้สูบบุหรี่ (7)

nicotine และ cotinine จะจับกับเมลานินที่อยู่ในเส้นผม โดย nicotine และ cotinine ในคนที่เส้นผมสีดำสามารถจับกับเมลานินได้มากกว่าคนที่เส้นผมสีบลอนด์หรือผมสีขาว (3) nicotine ที่อยู่ในบุหรี่เมื่อเข้าสู่ร่างกายถูกเอนไซม์ CYP2A6 เปลี่ยนไปเป็น cotinine พบว่าความแตกต่างของเชื้อชาติส่งผลให้เกิดความแตกต่างกันในแง่ของการเมแทบอลิซึม nicotine ไปเป็น cotinine ในคนที่มีการเมแทบอลิซึม nicotine ช้า (slow metabolism) ทำให้มี nicotine และ cotinine อยู่ในกระแสเลือดเป็นเวลานาน ส่งผลให้มีสารเหล่านี้ที่อยู่ในเส้นผมมากตามไปด้วย (7)

ปี ค.ศ. 1985 Haley และคณะ (39) ศึกษา nicotine ในเส้นผมกับพฤติกรรมการสูบบุหรี่ โดยแบ่งการศึกษาออกเป็น 2 กลุ่ม คือ ศึกษาในเส้นผมของผู้ที่สูบบุหรี่เป็นเวลาอย่างน้อย 3 ปี และศึกษา nicotine ในเส้นผมของหนูที่ได้รับ nicotine ขนาดต่างๆ โดยนำเส้นผมและขนของหนูมาวิเคราะห์หาระดับการสะสมของ nicotine โดยใช้ gas chromatograph พบว่าปริมาณการสูบบุหรี่มีความสัมพันธ์กับระดับ nicotine ในเส้นผมของมนุษย์และพบว่าระดับ nicotine ในเส้นผมที่มีสีขาวยมีระดับ nicotine ต่ำกว่าเส้นผมที่มีสีดำ ส่วนระดับ nicotine ในเส้นผมของหนูที่ได้รับ nicotine

พบว่ามึ่ระดับ nicotine สูงขึ้นซึ่งมีความสัมพันธ์กับปริมาณ nicotine ที่ได้รับ แสดงให้เห็นว่าระดับ nicotine ในเส้นผมมีความสัมพันธ์กับปริมาณการสูบบุหรี่ยืนยันโดยใช้ผลของระดับ nicotine ในเส้นขนของหนูที่ได้รับ nicotine

ปี ค.ศ. 2004 Groner และคณะ (40) ศึกษาาระดับ cotinine ในเส้นผมของมารดาและบุตร อายุต่ำกว่า 3 ปี วิเคราะห์โดยใช้ radioimmunoassay ทำการเก็บเส้นผมของมารดาที่สูบบุหรี่และไม่สูบบุหรี่ และเก็บเส้นผมของบุตรมาทำการวิเคราะห์ พบว่าบุตรมีระดับ cotinine ในเส้นผมสัมพันธ์กับมารดาที่สูบบุหรี่และไม่สูบบุหรี่ ซึ่งบุตรมีระดับ cotinine สูงกว่ามารดาที่สูบบุหรี่เนื่องจากในเด็กมีการดูดซึม nicotine จากสิ่งแวดล้อมเข้าสู่ระบบทางเดินหายใจได้มากและเร็วกว่าในผู้ใหญ่

ปี ค.ศ. 2012 Apelberg และคณะ (41) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการสูบบุหรี่กับระดับ nicotine ในเส้นผม โดยตรวจสอบความแตกต่างของเชื้อชาติกับปริมาณ nicotine ในเส้นผมของผู้ที่สูบบุหรี่ในพื้นที่ Baltimore metropolitan โดยใช้ gas chromatography พบว่าระดับ nicotine ในเส้นผมของผู้สูบบุหรี่ผิวดำมีระดับสูงกว่าผู้สูบบุหรี่ผิวขาว 5 เท่า ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการที่ผู้สูบบุหรี่ผิวดำมีอัตราการเมแทบอลิซึม nicotine ช้ากว่าจึงทำให้มีปริมาณ nicotine ในเส้นผมมากกว่าผู้สูบบุหรี่ผิวขาว นอกจากนี้พบว่าผู้สูบบุหรี่ที่มีการทำสีผมหรือย้อมผมมีระดับ nicotine ในเส้นผมลดลง นอกจากนี้ระยะเวลาการสูบบุหรี่ หรือปริมาณการสูบบุหรี่สามารถนำมาใช้ในการทำนายระดับ nicotine ในเส้นผมได้เช่นเดียวกัน

จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่ายังไม่มีการศึกษาถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมของ CYP2A6 ต่อเภสัชจลนศาสตร์ของ nicotine, การทำงานของ CYP2A6 โดยใช้ 3HC/COT ratio และปริมาณการสะสมของ nicotine และ cotinine ในเส้นผมของผู้สูบบุหรี่คนไทย ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงสนใจศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความแตกต่างทางพันธุกรรมของ CYP2A6 กับเภสัชจลนศาสตร์ของ nicotine และปริมาณการสะสมของ nicotine และ cotinine ในเส้นผมของคนสูบบุหรี่ที่มาตรวจสุขภาพ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

แบ่งการวิจัยออกเป็น 2 โครงการวิจัยย่อย ได้แก่

- 1) ศึกษาจีโนไทป์ของ CYP2A6 (CYP2A6 genotype)
- 2) ศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของนิโคติน (Pharmacokinetics of nicotine)

3.1 ศึกษาจีโนไทป์ของ CYP2A6 (CYP2A6 genotype)

3.1.1 ตัวอย่างเลือดของประชากรตัวอย่าง

การคำนวณขนาดตัวอย่าง (Sample size determination)

ศึกษาในประชากรตัวอย่างที่สุ่มบุหรีที่มาตรวจสุขภาพ ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จำนวนผู้เข้าร่วมการศึกษาคำนวณจากงานวิจัยที่ Mahavorasirikul และคณะ (4) เคยทำการศึกษามาก่อนหน้านี้ โดยสูตรที่ใช้ในการคำนวณ คือ

$$n = \frac{Z_{\alpha/2}^2 PQ}{d^2}$$

โดย n = จำนวนตัวอย่าง (Sample size)

$Z_{\alpha/2}$ = ค่าที่เปิดจากตารางค่าของการแจกแจงแบบปกติมาตรฐาน โดยเมื่อกำหนด $\alpha = 0.05$ จะได้ $Z_{\alpha/2} = 1.96$

P = ความชุกของ CYP2A6 ที่ได้อ้างอิงจากงานวิจัยของ Mahavorasirikul คณะ (4)

แทนค่าในสูตร

$$n = \frac{1.96^2 \times 0.45(0.546)}{0.09^2}$$

$$n = 118 \quad \text{คน}$$

ดังนั้น จากการคำนวณพบว่าการศึกษานี้ต้องใช้ประชากรตัวอย่างอย่างน้อย 118 คน

3.1.2 ประชากร

ในการศึกษานี้ใช้ตัวอย่างเลือดของผู้สูบบุหรี่ที่มาตรวจสุขภาพ ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยคัดเลือกอาสาสมัครจากแบบประเมินความรุนแรงของการเสพติดนิโคตินในบุหรี่ คือ Fagerstrom test for nicotine dependence (FTND) (42) และขอความยินยอมขอตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัคร โดยอาสาสมัครจะได้รับคำชี้แจงถึงประโยชน์และคำอธิบายที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาวิจัยอย่างครบถ้วนและมีสิทธิที่จะตัดสินใจให้ความยินยอมเข้าร่วมการศึกษาด้วยความเต็มใจหรือปฏิเสธการเข้าร่วมการศึกษาอย่างอิสระ ซึ่งข้อมูลของอาสาสมัครจะถูกเก็บรักษาเป็นความลับ เมื่ออาสาสมัครตัดสินใจให้ความยินยอมเข้าร่วมการศึกษาก็ต้องแสดงเจตนาโดยลงนามในหนังสือแสดงความยินยอม (consent form) ไว้เป็นหลักฐาน สำหรับเกณฑ์ในการคัดเลือกอาสาสมัครเพื่อศึกษาจีโนไทป์ของ CYP2A6 ใช้หลักเกณฑ์ดังต่อไปนี้

เกณฑ์ในการคัดเลือกเข้าร่วมโครงการวิจัย (Inclusion Criteria)

- 1) เป็นอาสาสมัครที่มาตรวจสุขภาพ ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ มีอายุระหว่าง 18-60 ปี
- 2) มีเชื้อชาติไทยและสามารถพูด อ่าน เขียน ภาษาไทยได้
- 3) มีการสูบบุหรี่เป็นประจำทุกวันในช่วงที่ผ่านมาอย่างน้อย 5 เดือน (สูบบุหรี่อย่างน้อย 100 มวน และปัจจุบันยังสูบบุหรี่)
- 4) ยินยอมเข้าร่วมการศึกษาด้วยความสมัครใจและลงนามในหนังสือแสดงความยินยอม (Informed consent)

เกณฑ์ในการคัดเลือกตัดออกจากโครงการวิจัย (Exclusion Criteria)

- 1) รับประทานยาหรืออาหารที่มีฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำ CYP2A6 คือ Rifampicin, Dexamethasone, และ Phenobarbital หรือรับประทานยาหรืออาหารที่มีฤทธิ์ยับยั้ง CYP2A6 คือ Methoxsalen (8-methoxypsoralen), Tranylcypromine, Tryptamine และ Coumarin ภายในเวลา 14 วัน ก่อนเข้าร่วมโครงการวิจัย
- 2) เป็นโรคที่มีผลต่อการเมแทบอลิซึมของ nicotine คือ โรคตับ และโรคไต
- 3) อยู่ในระหว่างตั้งครรภ์หรือให้นมบุตร
- 4) เข้าร่วมโครงการวิจัยทางคลินิกอื่นภายในเวลา 30 วัน

3.1.3 การเก็บตัวอย่างเลือด (Blood samples)

เก็บตัวอย่างเลือดจากหลอดเลือดดำบริเวณท้องแขนของอาสาสมัครที่ผ่านเกณฑ์ในการคัดเลือกเข้าร่วมโครงการวิจัย คนละ 3 มิลลิลิตร เก็บไว้ในหลอดบรรจุที่มีสารต้านการแข็งตัวของเลือด คือ EDTA และเก็บที่อุณหภูมิ -20°C จนถึงวันที่ทำการวิเคราะห์จีโนมของ CYP2A6

3.2 รูปแบบการวิจัย (Research design)

Observational study

3.3 การทดลอง

3.3.1 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA Extraction)

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ PureLink™ Genomic DNA Mini Kit [Invitrogen]

การเตรียมการสกัด

- 1) นำตัวอย่างเลือด 200 μl ใส่ลงใน microcentrifuge tube
- 2) เติม Proteinase K ปริมาตร 20 μl
- 3) เติม RNAase ปริมาตร 20 μl
- 4) ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer เป็นเวลา 15 วินาที จากนั้นตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที
- 5) เติม Genomic lysis ปริมาตร 200 μl
- 6) ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer เป็นเวลา 15 วินาที
- 7) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 10 นาที
- 8) เติม ethanol ปริมาตร 200 μl
- 9) ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer เป็นเวลา 5 วินาที
- 10) ดูดส่วนใสด้านบน ปริมาตร 640 μl ใส่ลงใน spin column
- 11) นำไปปั่นแยกด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 10,000 g เป็นเวลา 1 นาที
- 12) เติม wash buffer 1 ปริมาตร 500 μl

- 13) นำไปปั่นแยกด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 10,000 g เป็นเวลา 1 นาที
- 14) เติม wash buffer 2 ปริมาตร 500 μ l
- 15) นำไปปั่นแยกด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 13,000 g เป็นเวลา 3 นาที
- 16) เติม genomic elution buffer ปริมาตร 50 μ l จากนั้นตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที
- 17) นำไปปั่นแยกด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 13,000 g เป็นเวลา 1 นาที
- 18) เก็บรักษาดีเอ็นเอที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

การตรวจวัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ (DNA Quantification and DNA purity)

การตรวจวัดปริมาณและความบริสุทธิ์ดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยใช้เครื่อง NanoDrop™ 2000c Spectrophotometers [Thermo Scientific, USA] ที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm จากนั้นโปรแกรมจะคำนวณปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอให้ ซึ่งค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอควรมีค่าไม่ต่ำกว่า 1.8-1.9 ซึ่งถ้าต่ำกว่านี้แสดงว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีนสูง

3.3.2 การวิเคราะห์หาจีโนไทป์ของ CYP2A6*1A, CYP2A6*1B และ CYP2A6*4

การศึกษาจีโนไทป์ของ CYP2A6*1A, CYP2A6*1B และ CYP2A6*4 ด้วยวิธี restriction fragment length polymorphism method (PCR-RFLP) ดัดแปลงมาจากวิธีของ Ariyoshi และคณะ (43)

สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์

สารเคมี

- Acc II restriction enzyme [Takara, Japan]
- Agarose [Vivantis, Malaysia]
- Boric acid [Vivantis, Malaysia]
- dNTP Mixture [Takara, Japan]
- Eco81 I [Takara, Japan]

- Ethidium bromide [Applicham, Germany]
- Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) [Amesco, Solon, Ohio, USA]
- Forward primer (5'-CACCGAAGTGACCTATGCTG-3') [Ward Medic, Thailand]
- Reverse primer (5'-TGAAAATGGGCATGAACGCCC-3') [Ward Medic, Thailand]
- $MgCl_2$ [Takara, Japan]
- Sodium hydroxide [Aldrich-Sigma, USA]
- Taq polymerase [Takara, Japan]
- Tris-base [Vivantis, Malaysia]
- 6X Loading dye [Vivantis, Malaysia]
- 10X M Buffer [Takara, Japan]
- 10X PCR Buffer [Takara, Japan]
- 100 bp DNA ladder [Vivantis, Malaysia]

วัสดุอุปกรณ์

- Autopipets ขนาด 1 - 1000 μ l [Glison, USA and Band, Germany]
- Centrifuge [Hettich, USA and Eppendorf, Germany]
- Erlenmeyer flask ขนาด 125 ml [Pyrex, USA]
- Gel document [Bio-Rad, Thailand]
- Gel electrophoresis machine [Thermo Scientific, USA]
- Heat block [Major science, USA]
- Microwave [Sharp, Thailand]
- PCR thermal cycler [Applied Biosystems, USA]
- pH meter [Mettler Toledo, Switzerland]
- NanoDrop 2000c Spectrophotometer [Thermo Scientific, USA]
- Vortex mixer [Scientific Industries, USA]

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำหรับนำมาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ CYP2A6*1A, CYP2A6*1B และ CYP2A6*4 โดยเตรียมส่วนผสมต่างๆ ที่ต้องใช้ในกระบวนการ PCR ปริมาตร 25 μ l ประกอบด้วย 2.5 mM MgCl₂, 1X PCR buffer, 0.2 μ M forward primer, 0.2 μ M reverse primer, 0.4 mM dNTP mixture, 1U Taq polymerase และ 50 ng/ μ l Genomic DNA จากนั้นเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเครื่อง PCR thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

- Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 1 นาที
- Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 1 นาที
- Annealing ที่อุณหภูมิ 56 °C เป็นเวลา 1 นาที
- Extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 2 นาที
(ขั้นตอน 2-4 จำนวน 30 รอบ)

2. การตัดดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme)

เพื่อให้เห็นความแตกต่างของ CYP2A6*1A, CYP2A6*1B และ CYP2A6*4 จึงต้องมีการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะมาตัด PCR product ผลจากการตัดทำให้สามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของ CYP2A6 ได้

- 1) นำ PCR product มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ คือ Acc II และ Eco81 I
- 2) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง
- 3) นำตัวอย่างที่ได้จากการตัดจำเพาะด้วยเอนไซม์มาทำการวิเคราะห์โดยวิธี agarose gel electrophoresis

3. การตรวจวิเคราะห์ PCR product จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

- 1) เตรียม 1.5% agarose gel นำไปอุ่นใน microwave จน agarose powder ละลาย และวางไว้ที่อุณหภูมิห้องให้อุณหภูมิลดลงเล็กน้อย
- 2) นำ agarose ที่ละลายเหลวใน gel tray ซึ่งวาง comb ไว้เรียบร้อยแล้ว
- 3) วาง agarose gel ลงใน electrophoresis chamber และเติม 1X TBE buffer จนท่วมผิวหน้าของ agarose gel
- 4) นำ PCR product จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะผสมกับ 6X loading dye และนำไป load ลงในช่องของ 1.5% agarose gel
- 5) ให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 V เป็นเวลา 70 นาที
- 6) นำ agarose gel ไปย้อมด้วย ethidium bromide เป็นเวลา 5 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 15 นาที
- 7) นำ agarose gel ไปถ่ายภาพและบันทึกภาพด้วยเครื่อง gel document เพื่อแยกชิ้นส่วนของ DNA ที่มีขนาดต่างๆ เทียบกับ DNA ladder หรือ DNA ที่ทราบขนาดแน่นอนแล้ว

3.3.3 การวิเคราะห์หาจีโนไทป์ของ CYP2A6*9

วิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real time PCR โดยใช้ TaqMan SNP genotyping assays (rs28399433) [Applied Biosystems, USA] ที่มี primer จำเพาะต่อ CYP2A6*9

สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์

สารเคมี

- TaqMan[®] Genotyping Master Mix [Applied Biosystems, USA]
- TaqMan[®] Genotyping Assay (rs28399433) [Applied Biosystems, USA]

วัสดุอุปกรณ์:

- Autopipets ขนาด 1 - 200 μl [Glison, USA and Band, Germany]
- Vortex mixer [Scientific Industries, USA]
- NanoDrop 2000c Spectrophotometer [Thermo Scientific, USA]
- StepOnePlusTM Real-Time PCR system [Applied Biosystems, USA]
- Spin Down [Lab tech, Korea]

วิธีดำเนินการวิจัย

1. นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาวัดปริมาณด้วยเครื่อง NanoDropTM 2000c Spectrophotometers
2. เตรียมดีเอ็นเอที่ความเข้มข้น 10 ng/ μl
3. เตรียม Real time PCR reaction mixture ปริมาตร 20 μl ประกอบด้วย TaqMan[®] Genotyping Master Mix 10 μl , TaqMan[®] Genotyping Assay (rs28399433) 1 μl , ddH₂O 6 μl และดีเอ็นเอ 3 μl
4. นำไปวิเคราะห์หาจีโนไทป์ด้วยเครื่อง Real time PCR โดยตั้งโปรแกรมดังนี้
 - Pre-PCR read ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 30 วินาที
 - Holding stage ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 10 นาที
 - Cycling stage ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 15 วินาที และอุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 1 นาที (จำนวน 40 รอบ)
 - Post PCR read ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 30 วินาที

3.4 ศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของนิโคติน (Pharmacokinetics of nicotine)

3.4.1 ตัวอย่างเลือดและเส้นผมของประชากรตัวอย่าง

การคำนวณขนาดตัวอย่าง (Sample size determination)

ในการศึกษานี้ใช้ตัวอย่างเลือดและตัวอย่างเส้นผมของผู้ที่ผ่านการตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรมของยีนไซโตโครมพี 450 (CYP2A6) แล้วในขั้นตอนแรกของการวิจัย โดยคัดเลือกผู้ที่มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 แบบปกติ (normal metabolizers) ได้แก่ CYP2A6*1A/*1A และเป็นผู้ที่มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 แบบปานกลางหรือต่ำกว่าปกติมาก (slow metabolizers) ได้แก่ CYP2A6*1A/*4, CYP2A6*1B/*4, CYP2A6*1A/*9, CYP2A6*1B/*9, CYP2A6*9/*9, CYP2A6*4/*9, และ CYP2A6*4/*4 จำนวนผู้เข้าร่วมการศึกษาคำนวณจากงานวิจัยที่ Heravi และคณะ (44) เคยทำการศึกษามาก่อนหน้านี้ โดยสูตรที่ใช้ในการคำนวณ คือ

$$n = \frac{Z^2_{\alpha/2} \sigma^2}{d^2}$$

โดย	n	=	จำนวนตัวอย่าง (Sample size)
	$Z_{\alpha/2}$	=	ค่าที่เปิดจากตารางค่าของการแจกแจงแบบปกติมาตรฐาน โดยเมื่อกำหนด $\alpha = 0.05$ จะได้ $Z_{\alpha/2} = 1.96$
	σ	=	Variance ของข้อมูลที่ได้อ้างอิงจากงานวิจัยของ Heravi และคณะ (44)
	d	=	ค่าความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้

กลุ่มที่มีทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 เป็นแบบ normal metabolizers

$$\text{แทนค่าในสูตร} \quad n = \frac{1.96^2 \times (0.276)^2}{0.2^2}$$

$$n = 7.32 \text{ คน}$$

$$n = 8 \text{ คน}$$

จากการคำนวณ พบว่าจำนวนอาสาสมัครในกลุ่มที่มีทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 แบบ normal metabolizers เท่ากับ 8 คน เพื่อการถอนตัว ดังนั้นจำนวนอาสาสมัครในกลุ่มนี้จึงเท่ากับ 10 คน

กลุ่มที่มีทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 เป็นแบบ slow metabolizers

$$\begin{aligned} \text{แทนค่าในสูตร} \quad n &= \frac{1.96^2 \times (0.098)^2}{0.07^2} \\ n &= 7.52 \text{ คน} \\ n &= 8 \text{ คน} \end{aligned}$$

จากการคำนวณ พบว่าจำนวนอาสาสมัครในกลุ่มที่มีทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 เป็นแบบ slow metabolizers เท่ากับ 8 คน เพื่อการถอนตัว ดังนั้นจำนวนอาสาสมัครในกลุ่มนี้จึงเท่ากับ 10 คน

3.4.2 ประชากร

เกณฑ์ในการคัดเลือกเข้าร่วมโครงการวิจัย (Inclusion Criteria)

- 1) เป็นอาสาสมัครที่ผ่านการตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรมของยีนไซโตโครมพี 450 (CYP2A6) โดยเป็นผู้ที่มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 แบบ normal metabolizers (CYP2A6*1A/*1A) และเป็นผู้ที่มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 แบบ slow metabolizers (CYP2A6*1A/*4, CYP2A6*1B/*4, CYP2A6*1A/*9, CYP2A6*1B/*9, CYP2A6*9/*9, CYP2A6*4/*9, และ CYP2A6*4/*4)
- 2) งดสูบบุหรี่หรือใช้ nicotine ในรูปแบบอื่นเป็นเวลาอย่างน้อย 12 ชั่วโมงก่อนเข้าร่วมโครงการวิจัย
- 3) เป็นอาสาสมัครที่มีผม โดยมีความยาวของเส้นผมจากหนังศีรษะอย่างน้อย 6 เซนติเมตร
- 4) ยินยอมให้เก็บเส้นผมบริเวณด้านหลังศีรษะจำนวน 100 มิลลิกรัม โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของกระจุกเส้นผมประมาณ 0.5 เซนติเมตร
- 5) ยินยอมเข้าร่วมการศึกษาด้วยความสมัครใจและลงนามในหนังสือแสดงความยินยอม (Informed consent)

เกณฑ์ในการคัดเลือกตัดออกจากโครงการวิจัย (Exclusion Criteria)

- 1) รับประทานยาหรืออาหารที่มีฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำ CYP2A6 คือ rifampicin, dexamethasone, และ phenobarbital หรือรับประทานยาหรืออาหารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 คือ methoxsalen (8-methoxypsoralen), coumarin, tranlycypromine, tryptamine raloxifene และ grapefruit juice ภายในเวลา 14 วัน ก่อนเข้าร่วมโครงการวิจัย
- 2) รับประทานยาหรือเครื่องดื่มที่มีรสเปรี้ยว เช่น กาแฟ, น้ำอัดลม, น้ำมะนาว, น้ำส้ม ภายในเวลา 30 นาที ก่อนเข้าร่วมโครงการวิจัย
- 3) เป็นโรคที่มีผลต่อการเมแทบอลิซึมของ nicotine คือ โรคตับ และโรคไต
- 4) อยู่ในระหว่างตั้งครรภ์หรือให้นมบุตร
- 5) มีผมสีขาว, ยึด หรือทำสีผม
- 6) มีประวัติว่ามีความผิดปกติที่เกี่ยวข้องกับระบบการเคี้ยวและข้อต่อขากรรไกร
- 7) เข้าร่วมโครงการวิจัยทางคลินิกอื่นภายในเวลา 30 วัน

3.4.3 รูปแบบงานวิจัย (Research design)

Experimental study

3.4.4 ขั้นตอนการวิจัย

1. ขอความยินยอมจากอาสาสมัคร

อาสาสมัครจะได้รับคำชี้แจงถึงประโยชน์ ความเสี่ยงที่อาจเกิดจากการศึกษาวิจัยอย่างครบถ้วนจนเป็นที่พอใจและเข้าใจดีผู้ป่วยมีเวลาเพียงพอในการตัดสินใจให้ความยินยอมเข้าร่วมการศึกษาด้วยความเต็มใจ โดยลงนามในหนังสือแสดงความยินยอมไว้เป็นหลักฐาน

2. ขั้นตอนการเก็บเลือดและเส้นผม

2.1 ขั้นตอนการเก็บเส้นผม

ทำการเก็บตัวอย่างเส้นผมจากโคนผมบริเวณด้านหลังศีรษะจำนวน 100 มิลลิกรัม โดยใช้แผ่นพลาสติกขนาดความยาว 15 เซนติเมตร กว้าง 5 เซนติเมตร และมีเส้นสีแดงห่างจากขอบของ

แผ่นพลาสติก 1 เซนติเมตร วิธีการเก็บคือ ใช้มือเปิดผมของอาสาสมัครบริเวณด้านหลังศีรษะ จากนั้นนำแผ่นพลาสติกที่เตรียมไว้วางลงบนเส้นผมโดยวางให้ชิดกับโคนผมและใช้กรรไกรตัดเส้นผมตรงบริเวณเส้นสีแดงบนแผ่นพลาสติก โดยทำการเก็บเส้นผมให้มีความยาว 5 เซนติเมตรจากจุดตัด จากนั้นเก็บตัวอย่างเส้นผมลงในถุงพลาสติก และเก็บไว้ที่ -80°C จนกระทั่งนำมาวิเคราะห์ผล

2.2 ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างเลือด

อาสาสมัครสูบบุหรี่ที่ผ่านเกณฑ์การเข้าร่วมโครงการวิจัย ต้องงดสูบบุหรี่หรือใช้ nicotine ในรูปแบบอื่นเป็นเวลาอย่างน้อย 12 ชั่วโมง และงดรับประทานอาหารหรือเครื่องดื่มที่มีรสเปรี้ยวภายในเวลา 30 นาทีก่อนเข้าร่วมโครงการวิจัย จากนั้นอาสาสมัครจะได้รับคำอธิบายเกี่ยวกับระเบียบวิธีการของการวิจัยรวมถึงวิธีการเคี้ยวหมากฝรั่งนิโคติน จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างเลือดปริมาตร 3 ml ใส่ลงในหลอดบรรจุที่มีสารต้านการแข็งตัวของเลือดคือ EDTA โดยเก็บเลือดก่อนได้รับหมากฝรั่งนิโคติน ($t=0$) จากนั้นอาสาสมัครจะได้รับหมากฝรั่งนิโคตินขนาด 2 มิลลิกรัม (Nicotinell[®] gum) ให้เคี้ยวเป็นเวลา 30 นาที พร้อมกับทำการเก็บตัวอย่างเลือดเป็นเวลา 0.25, 0.50, 1, 1.50, 2, 2.50, 3, 4.50 และ 6 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างเลือดปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกส่วนประกอบที่เป็น plasma และแช่เก็บที่อุณหภูมิต่ำ -80°C จนกระทั่งนำมาวิเคราะห์ผล

3.4.5 การทดลอง

3.4.5.1 การวัดระดับ nicotine, cotinine และ *trans*-3'-hydroxycotinine ใน plasma

วัดระดับ nicotine, cotinine และ *trans*-3'-hydroxycotinine การศึกษาเริ่มจากการประเมินความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ จากนั้นทำการตรวจวัดระดับ nicotine, cotinine และ *trans*-3'-hydroxycotinine ด้วยเทคนิค Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) ดัดแปลงมาจากวิธีของ Ghosheh และคณะ (45)

สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์

สารเคมี

- Acetonitrile (LC-MS grade) [Merk, Germany]
- Ammonium acetate ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) [Merk, Germany]
- Cotinine [Cerilliant, USA]
- Cotinine- D_3 [Cerilliant, USA]
- Dichloromethane (LC-MS grade) [Merk, Germany]
- Methanol (LC-MS grade) [Merk, Germany]
- Nicotine [Cerilliant, USA]
- Nicotine- D_4 [Cerilliant, USA]
- Sodium hydroxide (NaOH) [Merk, Germany]
- *trans*-3'-hydroxycotinine [Cerilliant, USA]
- *trans*-3'-hydroxycotinine- D_3 [Cerilliant, USA]

วัสดุอุปกรณ์

- Autopipets ขนาด 1 - 1000 ไมโครลิตร [Glison, USA and Band, Germany]
- Centrifuge [Hettich, USA and Eppendorf, Germany]
- Cylinder ขนาด 10 – 1000 ml
- Evaporator [Genevac, USA]
- Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) [Shimadzu, Japan]
- Luna C18 100A, 3 μm , 100 mm x 2 mm [Phenomenex, USA]
- Oasis HLB cartridges 1cc 30 mg [Water, Japan]
- pH meter [Mettler Toledo, Switzerland]
- Volumetric flask ขนาด 1000 ml
- Vortex mixer [Scientific Industries, USA]

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน (Standard solution)

สารละลายมาตรฐานที่เตรียมแล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C

1) การเตรียมสารละลายของ nicotine เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve)

เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 1000, 400, 200, 100, 40, 20, 5 ng/ml โดยทำ serial solution จากสารละลายมาตรฐานเข้มข้น 10 µg/ml แล้วนำสารมาตรฐานที่ได้ความเข้มข้นละ 10 µl spiked ลงใน mobile phase หรือ plasma ให้ได้ปริมาตรรวม 200 µl จะได้ nicotine ใน mobile phase หรือ plasma ที่ความเข้มข้น 50, 20, 10, 5, 2, 1, 0.25 ng/ml ตามลำดับ

2) การเตรียมสารละลายของ cotinine เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve)

เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 6000, 3000, 1000, 200, 50, 20, 5 ng/ml โดยทำ serial solution จากสารละลายมาตรฐานเข้มข้น 1 mg/ml แล้วนำสารมาตรฐานที่ได้ความเข้มข้นละ 10 µl spiked ลงใน mobile phase หรือ plasma ให้ได้ปริมาตรรวม 200 µl จะได้ cotinine ใน mobile phase หรือ plasma ที่ความเข้มข้น 300, 150, 50, 10, 2.5, 1, 0.25 ng/ml ตามลำดับ

3) การเตรียมสารละลายของ *trans*-3'-hydroxycotinine (3HC) เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve)

เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 4000, 2000, 1000, 200, 50, 20, 10 ng/ml โดยทำ serial solution จากสารละลายมาตรฐานเข้มข้น 1 mg/ml แล้วนำสารมาตรฐานที่ได้ความเข้มข้นละ 10 µl spiked ลงใน mobile phase หรือ plasma ให้ได้ปริมาตรรวม 200 µl จะได้ 3HC ใน mobile phase หรือ plasma ที่ความเข้มข้น 200, 100, 50, 10, 2.5, 1, 0.5 ng/ml ตามลำดับ

การเตรียมตัวอย่างสำหรับฉีดเข้าเครื่อง LC-MS/MS

- 1) การเตรียมสารละลายเพื่อทำ validation method มีขั้นตอนดังนี้
 - 1.1 ผสม mobile phase 240 μl + nicotine, cotinine, 3HC standards อย่างละ 10 μl + nicotine-D₄, cotinine-D₃, 3HC-D₃ internal standards อย่างละ 10 μl
 - 1.2 นำสารละลายที่ได้ฉีดเข้าเครื่อง LC-MS/MS ปริมาตร 7 μl

- 2) การเตรียมตัวอย่าง plasma ทั้งใน unknown และการทำ validation method มีขั้นตอนดังนี้
 - 2.1 Blank plasma 170 μl + nicotine, cotinine, 3HC standards อย่างละ 10 μl + nicotine-D₄, cotinine-D₃, 3HC-D₃ internal standards อย่างละ 10 μl
 - 2.2 เติม 10 M NaOH 20 μl
 - 2.3 ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer เป็นเวลา 30 วินาที
 - 2.4 เติม dichloromethane 3 ml
 - 2.5 ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer เป็นเวลา 2 นาที
 - 2.6 นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 2,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที
 - 2.7 ดูดส่วนใสด้านล่างมาระเหยด้วยเครื่อง evaporator เป็นเวลา 40 นาที
 - 2.8 ละลายกลับด้วย mobile phase (0.2 mM Ammonium acetate : Acetonitrile; 30:70) ปริมาตร 300 μl
 - 2.9 ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer เป็นเวลา 30 วินาที
 - 2.10 กรอง sample ด้วย Oasis HLB cartridges ก่อนฉีดเข้าเครื่อง LC-MS/MS
 - 2.11 นำสารละลายส่วนใสที่ได้ฉีดเข้าเครื่อง LC-MS/MS ด้วยปริมาตรการฉีด 7 μl

สภาวะของเครื่อง LC-MS/MS ที่ใช้ในการวิเคราะห์

เฟสเคลื่อนที่	: 0.2 mM Ammonium acetate : Acetonitrile (25:75)
คอลัมน์	: Luna C18 100A, 3 μ m, 100 mm x 2 mm
อัตราการไหล	: 0.25 ml/min
เครื่องตรวจวัด	: Mass spectrometry
อุณหภูมิคอลัมน์	: 40 °C
อุณหภูมิ auto sampler	: 5 °C

สภาวะของ MS ที่ใช้ในการวิเคราะห์

Scan mode	: MRM scan
Ionisation mode	: ESI (positive mode)
Source temperature	: 400 °C

สภาวะของ MS/MS ที่ใช้ในการวิเคราะห์

Compound	Ion transitions (m/z)	Dwell time	Acquisition window
nicotine	Quant 163.10 > 130.10	100 ms	1.917 - 3.917 min
	Confirm 163.10 > 132.10	100 ms	
nicotine-D ₄	167.10 > 134.10	100 ms	
cotinine	Quant 177.10 > 80.10	50 ms	0.178 - 2.178 min
	Confirm 177.10 > 98.15	50 ms	
cotinine-D ₃	180.20 > 101.15	50 ms	
3HC	Quant 193.05 > 80.15	50 ms	0.109 - 2.109 min
	Confirm 193.05 > 134.15	50 ms	
3HC-D ₃	196.05 > 134.10	50 ms	

การประเมินความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ (Validation method)

การประเมินความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ เป็นกระบวนการตรวจสอบความถูกต้องเหมาะสมของวิธีที่พัฒนาขึ้นก่อนที่จะนำวิธีวิเคราะห์นั้นมาใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างจริง โดยได้อ้างอิงตาม US FDA Guideline (46)

1. ความจำเพาะของการวิเคราะห์ (Specificity)

สกัดและวิเคราะห์ blank plasma จำนวน 6 ตัวอย่างที่แตกต่างกัน โดยผลการวิเคราะห์ blank plasma ทั้ง 6 ตัวอย่างต้องไม่ถูกรบกวนการวิเคราะห์ด้วยสารอื่นๆ

2. การวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ nicotine, cotinine และ *trans*-3'-hydroxycotinine ในพลาสมาที่วิธีนี้สามารถวัดได้ (Lower limit of quantification, LLOQ)

ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ nicotine, cotinine และ *trans*-3'-hydroxycotinine ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ โดยเตรียม nicotine, cotinine และ *trans*-3'-hydroxycotinine ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีนี้สามารถตรวจวัดได้ โดยต้องมีค่าความถูกต้อง (accuracy) อยู่ระหว่าง 80-120% และมีค่าความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ (precision) ซึ่งแสดงด้วยค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation, %CV) ไม่เกิน 20%

3. ความเป็นเส้นตรง (Linearity/Standard calibration curve)

ทำการสกัดและวิเคราะห์ nicotine, cotinine และ *trans*-3'-hydroxycotinine ใน blank plasma ที่ความเข้มข้น 7 ระดับ โดยเตรียม nicotine ความเข้มข้น 0.25, 1, 2, 5, 10, 20 และ 50 ng/ml, cotinine ความเข้มข้น 0.25, 1, 2.5, 10, 50, 150 และ 300 ng/ml และ *trans*-3'-hydroxycotinine ความเข้มข้น 0.5, 1, 2.5, 10, 50, 100 และ 200 ng/ml จากนั้นหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงโดยนำค่า peak area ratio ที่ได้จากอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟของ standard และ internal standard ที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานและหาค่า coefficient of determination (R^2) ซึ่งค่า R^2 ที่ได้ควรมีค่าเข้าใกล้ 1

4. ความถูกต้อง (Accuracy) และความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ (Precision)

ทำการสกัดและวิเคราะห์ nicotine, cotinine และ *trans*-3'-hydroxycotinine ใน blank plasma ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ ได้แก่ ต่ำ (LQC), กลาง (MQC), สูง (HQC) ในช่วงระดับความเข้มข้นของกราฟมาตรฐานภายในวันเดียวกันและต่างวันกัน โดยต้องมีค่าความถูกต้อง (accuracy) อยู่ระหว่าง 85-115% และมีค่าความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ (precision) ซึ่งแสดงด้วยค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation, %CV) ไม่เกิน 15%

5. การทดสอบประสิทธิภาพการคืนกลับของการสกัด (Recovery of extraction)

เป็นการศึกษาหาประสิทธิภาพของวิธีการสกัดสาร โดยเตรียม nicotine, cotinine และ *trans*-3'-hydroxycotinine ใน blank plasma ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ ได้แก่ ต่ำ (LQC), กลาง (MQC), สูง (HQC) ใน blank plasma และ solution ความเข้มข้นละ 3 หลอดทดลอง และทำการเปรียบเทียบ peak area ที่ได้ทั้งใน blank plasma และ solution

$$\% \text{Recovery} = \frac{\text{Peak area ของสารมาตรฐานใน blank plasma}}{\text{Peak area ของสารมาตรฐานใน solution}} \times 100$$

6. ความคงตัวของสารหลังจากการสกัด (Post-preparative stability)

ทำการสกัดและวิเคราะห์ nicotine, cotinine และ *trans*-3'-hydroxycotinine ใน blank plasma ที่ความเข้มข้น 2 ระดับ ได้แก่ ต่ำ (LQC) และสูง (HQC) ความเข้มข้นละ 3 หลอดทดลอง และเปรียบเทียบการวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารใน blank plasma ที่ผ่านกระบวนการสกัดที่เวลาเริ่มต้น (t = 0 hr.) กับสารเดิมที่วางไว้ใน auto sampler ที่อุณหภูมิ 5 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (t = 24 hr.) และนำผลที่ได้มาคำนวณค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลง (%change) โดยต้องมี %change ไม่เกิน 15%

3.4.5.2 การวัดปริมาณการสะสมของ nicotine และ cotinine ในเส้นผม

วัดปริมาณการสะสมของ nicotine และ cotinine ในเส้นผม การศึกษาเริ่มจากการประเมินความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ จากนั้นทำการตรวจวัดระดับ nicotine และ cotinine ด้วยเทคนิค Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) ดัดแปลงมาจากวิธีของ Kim และ Tzatzarakis (6, 47)

สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์

สารเคมี

- Acetonitrile (LC-MS grade) [Merk, Germany]
- Ammonium acetate ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) [Merk, Germany]
- Cotinine [Cerilliant, USA]
- Cotinine- D_3 [Cerilliant, USA]
- Dichloromethane (LC-MS grade) [Merk, Germany]
- Hexane [Merk, Germany]
- Methanol (LC-MS grade) [Merk, Germany]
- Nicotine [Cerilliant, USA]
- Nicotine- D_4 [Cerilliant, USA]
- Sodium hydroxide (NaOH) [Merk, Germany]

วัสดุอุปกรณ์

- Autopipets ขนาด 1 - 1000 ไมโครลิตร [Glison, USA and Band, Germany]
- Centrifuge [Hettich, USA and Eppendorf, Germany]
- Cylinder ขนาด 10 – 1000 ml
- Evaporator [Genevac, USA]
- Hot air oven
- Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) [Shimadzu, Japan]

- Luna C18 100A, 3 μ m, 100 mm x 2 mm [Phenomenex, USA]
- Oasis HLB cartridges 1cc 30 mg [Water, Japan]
- pH meter [Mettler Toledo, Switzerland]
- Volumetric flask ขนาด 1000 ml
- Vortex mixer [Scientific Industries, USA]

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน (Standard solution)

สารละลายมาตรฐานที่เตรียมแล้วเก็บที่อุณหภูมิต่ำ -20°C

1) การเตรียมสารละลายของ nicotine เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve)

เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 100000, 10000 และ 100 ng/ml โดยทำ serial solution จากสารละลายมาตรฐานเข้มข้น 1 mg/ml แล้วนำสารมาตรฐานที่ได้ spiked ลงในเส้นผมที่ได้มาจากคนที่ไม่สูบบุหรี่ (blank ของเส้นผม) หนัก 50 mg เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.25, 1, 2, 5, 10, 20, 50 และ 100 ng/mg

2) การเตรียมสารละลายของ cotinine เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve)

เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 10000 และ 100 ng/ml โดยทำ serial solution จากสารละลายมาตรฐานเข้มข้น 1 mg/ml แล้วนำสารมาตรฐานที่ได้ spiked ลงในเส้นผมที่ได้มาจากคนที่ไม่สูบบุหรี่ (blank ของเส้นผม) หนัก 50 mg เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.15, 0.25, 1, 2, 5, 10, 20 และ 30 ng/mg

การเตรียมตัวอย่างสำหรับฉีดเข้าเครื่อง LC-MS/MS

- 1) การเตรียมตัวอย่างเส้นผมทั้ง unknown และการทำ validation method มีขั้นตอนดังนี้
 - 1.1 ชั่งเส้นผมหนัก 50 mg
 - 1.2 ล้างเส้นผมด้วยน้ำกลั่น, Hexane และ dichloromethane อย่างละ 2 ครั้ง เพื่อล้างเส้นผมที่อาจสัมผัสกับควันบุหรี่จากภายนอก
 - 1.3 ทำให้เส้นผมแห้งด้วยการนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
 - 1.4 เติมสารละลายมาตรฐาน nicotine, cotinine + nicotine-D₄, cotinine-D₃ internal standards อย่างละ 10 µl เฉพาะการทำ validation method หรือทำ standard curve โดยใช้ blank hair ที่พิสูจน์แล้วว่าไม่มี nicotine
 - 1.5 เติม 1 M NaOH 2 ml
 - 1.6 ทำให้เส้นผมละลายด้วยการนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 90 นาที
 - 1.7 วางให้เย็นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที
 - 1.8 เติม dichloromethane 3 ml
 - 1.9 ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer เป็นเวลา 2 นาที
 - 1.10 นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 4,500 rpm เป็นเวลา 10 นาที
 - 1.11 เติม 1 M HCl 50 µl
 - 1.12 ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer เป็นเวลา 30 วินาที
 - 1.13 ตูดส่วนในสไลด์กลางมาระเหยด้วยเครื่อง evaporator เป็นเวลา 40 นาที
 - 1.14 ละลายกลับด้วย mobile phase (0.2 mM Ammonium acetate : Acetonitrile; 30:70) ปริมาตร 300 µl
 - 1.15 ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer เป็นเวลา 30 วินาที
 - 1.16 กรอง sample ด้วย Oasis HLB cartridges ก่อนฉีดเข้าเครื่อง LC-MS/MS
 - 1.17 นำสารละลายส่วนสไลด์ที่ได้ฉีดเข้าเครื่อง LC-MS/MS ด้วยปริมาตรการฉีด 7 µl

สภาวะของเครื่อง LC-MS/MS ที่ใช้ในการวิเคราะห์

เฟสเคลื่อนที่	: 0.2 mM Ammonium acetate : Acetonitrile (25:75)
คอลัมน์	: Luna C18 100A, 3 μ m, 100 mm x 2 mm
อัตราการไหล	: 0.25 ml/min
เครื่องตรวจวัด	: Mass spectrometry
อุณหภูมิคอลัมน์	: 40 °C
อุณหภูมิ auto sampler	: 5 °C

สภาวะของ MS ที่ใช้ในการวิเคราะห์

Scan mode	: MRM scan
Ionisation mode	: ESI (positive mode)
Source temperature	: 400 °C

สภาวะของ MS/MS ที่ใช้ในการวิเคราะห์

Compound	Ion transitions (m/z)	Dwell time	Acquisition window
nicotine	Quant 163.10 > 130.10	100 ms	0.25 - 3.917 min
	Confirm 163.10 > 132.10	100 ms	
nicotine-D ₄	167.10 > 134.10	100 ms	
cotinine	Quant 177.10 > 80.10	50 ms	0.178 - 2.178 min
	Confirm 177.10 > 98.15	50 ms	
cotinine-D ₃	180.20 > 101.15	50 ms	

การประเมินความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ (Validation method)

การประเมินความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ เป็นกระบวนการตรวจสอบความถูกต้องเหมาะสมของวิธีที่พัฒนาขึ้นก่อนที่จะนำวิธีวิเคราะห์นั้นมาใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างจริง โดยได้อ้างอิงตาม US FDA Guideline (46)

1. ความจำเพาะของการวิเคราะห์ (Specificity)

สกัดและวิเคราะห์ blank hair โดยผลการวิเคราะห์ blank hair ต้องไม่ถูกรบกวนการวิเคราะห์ด้วยสารอื่นๆ

2. การวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ nicotine และ cotinine ในเส้นผมที่วิธีนี้สามารถวัดได้ (Lower limit of quantification, LLOQ)

ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ nicotine และ cotinine ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ โดยเตรียม nicotine และ cotinine ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีนี้สามารถตรวจวัดได้ โดยต้องมีค่าความถูกต้อง (accuracy) อยู่ระหว่าง 80-120% และมีค่าความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ (precision) ซึ่งแสดงด้วยค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation, %CV) ไม่เกิน 20%

3. ความเป็นเส้นตรง (Linearity/Standard calibration curve)

ทำการสกัดและวิเคราะห์ nicotine และ cotinine ใน blank hair ที่ความเข้มข้น 8 ระดับ โดยเตรียม nicotine ความเข้มข้น 0.25, 1, 2, 5, 10, 20, 50 และ 100 ng/mg และ cotinine ความเข้มข้น 0.15, 0.25, 1, 2, 5, 10, 20 และ 30 ng/mg จากนั้นหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงโดยนำค่า peak area ratio ที่ได้จากอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟของ standard และ internal standard ที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานและหาค่า coefficient of determination (R^2) ซึ่งค่า R^2 ที่ได้ควรมีค่าเข้าใกล้

4. ความถูกต้อง (Accuracy) และความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ (Precision)

ทำการสกัดและวิเคราะห์ nicotine และ cotinine ใน blank hair ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ ได้แก่ ต่ำ (LOC), กลาง (MOC), สูง (HOC) ในช่วงระดับความเข้มข้นของกราฟมาตรฐาน โดยต้องมีค่าความถูกต้อง (accuracy) อยู่ระหว่าง 85-115% และมีค่าความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ (precision) ซึ่งแสดงด้วยค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation, %CV) ไม่เกิน 15%

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติ

การเก็บบันทึกข้อมูลของอาสาสมัครแต่ละรายใช้โปรแกรม Microsoft Excel และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม Statistical Packages for the Social Science เวอร์ชัน 20 (SPSS version 20.0, SPSS Inc., USA) แสดงผลข้อมูลที่ได้เป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean \pm standard deviation) และค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (mean \pm standard error of mean)

คำนวณค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ (pharmacokinetic parameters) ด้วยโปรแกรม STATA เวอร์ชัน 12 และวิเคราะห์ความแตกต่างของระดับ nicotine ในพลาสมา, การทำงานของเอนไซม์ CYP2A6, ค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ และการสะสมของระดับ nicotine, cotinine ในเส้นผมระหว่างกลุ่มที่มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 แบบ normal metabolizers กับกลุ่มที่มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 แบบ slow metabolizers ด้วยวิธีทดสอบของแมนและวิทนี (The Mann-Whitney U test) พิจารณาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P -value น้อยกว่า 0.05 ($P < 0.05$)

บทที่ 4 ผลการทดลอง

4.1 ศึกษาจีโนไทป์ของ CYP2A6 (CYP2A6 genotype)

4.1.1 ลักษณะทั่วไปของกลุ่มตัวอย่าง

อาสาสมัครที่สูบบุหรี่ที่มาตรวจสุขภาพ ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ผ่านเกณฑ์การเข้าร่วมโครงการวิจัยในการศึกษาจีโนไทป์ของ CYP2A6 จำนวน 127 คน ลักษณะข้อมูลพื้นฐานของอาสาสมัครแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงข้อมูลพื้นฐานของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่ที่มาตรวจสุขภาพ ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ผ่านเกณฑ์การเข้าร่วมโครงการวิจัยจำนวน 127 คน

Characteristics	n	%
Gender		
Male	122	96.06
Female	5	3.94
Age		
≤ 30 years	34	26.77
31-40 years	49	38.58
> 40 years	44	34.65
Age at starting smoking (Years)		
≤ 15 years	48	37.80
16-20 years	66	51.97
> 20 years	13	10.24
Duration of smoke (Years)		
≤ 10 years	24	18.90
11-20 years	43	33.86
> 20 years	60	47.24

Cigarette consumption

≤ 10 class per day	83	65.35
11-20 class per day	41	32.28
> 20 class per day	3	2.36

Nicotine dependence*

Low	58	45.7
Moderate	28	22.0
High	41	32.3

Alcohol consumption

Yes	90	70.87
No	37	29.13

Caffeine consumption

Yes	94	74.02
No	33	25.98

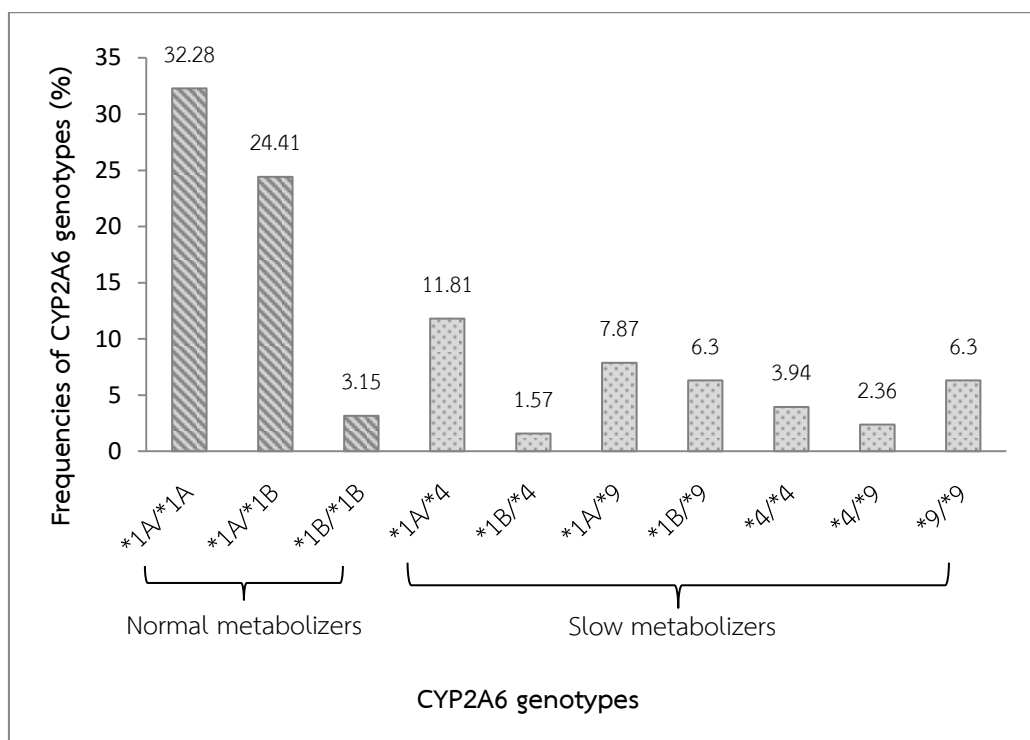
* คัดจากแบบประเมินความรุนแรงของการเสพติดนิโคติน FTND scores

- ประเมินได้คะแนนไม่เกิน 4 คะแนน แสดงว่ามีระดับการเสพติดนิโคตินต่ำ
- ประเมินได้คะแนน 4-7 คะแนน แสดงว่ามีระดับการเสพติดนิโคตินปานกลาง
- ประเมินได้คะแนน 8-10 คะแนน แสดงว่ามีระดับการเสพติดนิโคตินสูง

4.1.2 จีโนไทป์ของ CYP2A6 ของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่ที่มาตรวจสุขภาพ ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

จากการวิเคราะห์หาจีโนไทป์ของ CYP2A6 ในอาสาสมัครที่สูบบุหรี่ที่มาตรวจสุขภาพ ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์จำนวน 127 คน พบว่าอาสาสมัครส่วนใหญ่มีจีโนไทป์ของ CYP2A6 แบบ CYP2A6*1A/*1A จำนวน 41 คน (32.28%) รองลงมา ได้แก่ CYP2A6*1A/*1B จำนวน 31 คน (24.41%) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มที่มีการทำงานของเอนไซม์แบบ normal metabolizers และพบจีโนไทป์ของ CYP2A6 แบบ CYP2A6*1A/*4 จำนวน 15 คน (11.81%), CYP2A6*1A/*9 จำนวน 10 คน

(7.87%), CYP2A6*1B/*9 จำนวน 8 คน (6.30%), CYP2A6*9/*9 จำนวน 8 คน (6.30%), CYP2A6*4/*4 จำนวน 5 คน (3.94%), CYP2A6*4/*9 จำนวน 3 คน (2.36%) และ CYP2A6*1B/*4 จำนวน 3 คน (1.57%) ตามลำดับ ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มที่มีการทำงานของเอนไซม์แบบ slow metabolizers แสดงในภาพที่ 8



ภาพที่ 8 แผนภูมิแท่งแสดงความถี่การกระจายตัวของจีโนไทป์ของ CYP2A6 ของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่ที่มาตรวจสุขภาพ ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์จำนวน 127 คน

4.2 ศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของนิโคติน (Pharmacokinetics of nicotine)

4.2.1 ลักษณะทั่วไปของกลุ่มตัวอย่าง

อาสาสมัครที่สูบบุหรี่ผ่านเกณฑ์การเข้าร่วมโครงการวิจัยเภสัชจลนศาสตร์ของนิโคตินจำนวน 18 คน โดยแบ่งกลุ่มตัวอย่างเป็น 2 กลุ่ม คือ เป็นผู้ที่มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 แบบ normal metabolizers (CYP2A6*1A/*1A) จำนวน 9 คน และเป็นผู้ที่มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 แบบ slow metabolizers (CYP2A6*1A/*4, CYP2A6*1B/*4, CYP2A6*1A/*9, CYP2A6*1B/*9,

CYP2A6*9/*9, CYP2A6*4/*9, และ CYP2A6*4/*4) จำนวน 9 คน ลักษณะข้อมูลพื้นฐานของอาสาสมัครแสดงในตารางที่ 6

อาสาสมัครที่ผ่านเกณฑ์เข้าร่วมโครงการวิจัยได้รับหมากฝรั่งนิโคติน (Nicotinell® gum) ขนาด 2 มิลลิกรัมให้เคี้ยวเป็นเวลา 30 นาที

ตารางที่ 6 แสดงค่าเฉลี่ยของข้อมูลพื้นฐานของอาสาสมัครจำนวน 18 คน ในกลุ่ม normal metabolizers และ slow metabolizers

Characteristics	Normal metabolizers (Mean ± SD)	Slow metabolizers (Mean ± SD)	P-value
Age (years)	35.67 ± 5.77 (30-47)	35.56 ± 10.73 (26-58)	0.387
BMI (kg/m ²)	28.23 ± 5.46 (19.72-37.85)	23.38 ± 2.47 (19.72-24.72)	0.050*
Systolic BP (mm/Hg)	124 ± 7.82 (110-135)	126.29 ± 11.71 (115-147)	0.779
Diastolic BP (mm/Hg)	75.13 ± 6.64 (66-86)	65.86 ± 9.34 (55-76)	0.152
HR (ครั้ง/นาที)	72.00 ± 16.40 (53-96)	74.57 ± 14.26 (60-96)	0.613
Temp. (°C)	36.40 ± 0.28 (36.00-36.80)	36.37 ± 0.40 (35.50-36.70)	0.779
WBC (×10 ³ /μL)	7.52 ± 1.71 (5.81-9.22)	7.59 ± 1.52 (6.06-9.97)	0.881
RBC (×10 ⁶ /μL)	5.60 ± 0.26 (5.42-5.90)	5.03 ± 0.47 (4.43-5.52)	0.393
Hemoglobin (g/dL)	15.73 ± 0.25 (15.50-16.00)	14.60 ± 0.98 (13.60-16.10)	0.25
Hematocrit (%)	48.30 ± 2.01 (46.40-56.40)	43.86 ± 3.03 (39.40-47.60)	0.071
BUN (mg/dL)	12.25 ± 4.57 (7-18)	10.40 ± 2.70 (8-15)	0.556
Creatinine (mg/dL)	1.11 ± 0.26 (0.90-1.55)	0.99 ± 0.07 (0.89-1.06)	0.548
AST (U/L)	20.00 ± 3.46 (18-24)	34.00 ± 16.39 (21-58)	0.114
ALT (U/L)	26.00 ± 10.44 (19-38)	42.00 ± 20.28 (16-65)	4.000
ALK (U/L)	66.33 ± 2.89 (63-68)	69.33 ± 28.57 (49-102)	0.700

4.2.2 ระดับ nicotine ในพลาสมาของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่หลังได้รับหมากฝรั่งนิโคติน

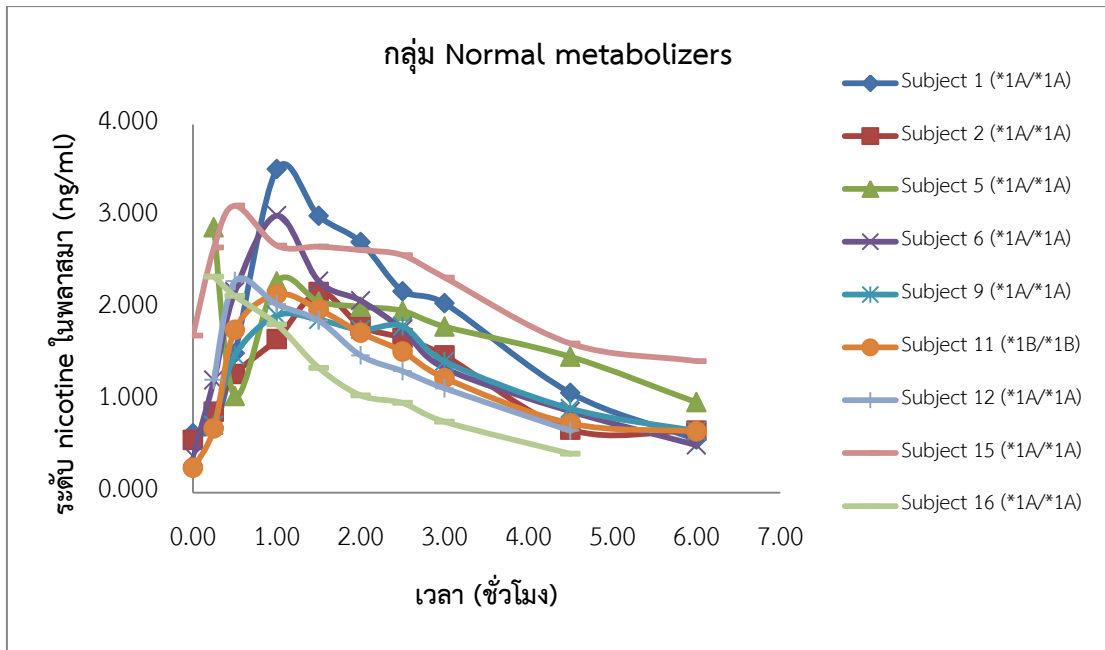
กลุ่มที่มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 แบบ normal metabolizers และกลุ่มที่มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 แบบ slow metabolizers มีระดับ nicotine ณ จุดเวลาต่างๆ ดังตารางที่ 7

ภาพที่ 9-10 แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างระดับ nicotine ในพลาสมา กับเวลาหลังจากได้รับหมากฝรั่งนิโคตินขนาด 2 มิลลิกรัม ของอาสาสมัครแต่ละคนในกลุ่ม normal metabolizers และกลุ่ม slow metabolizers

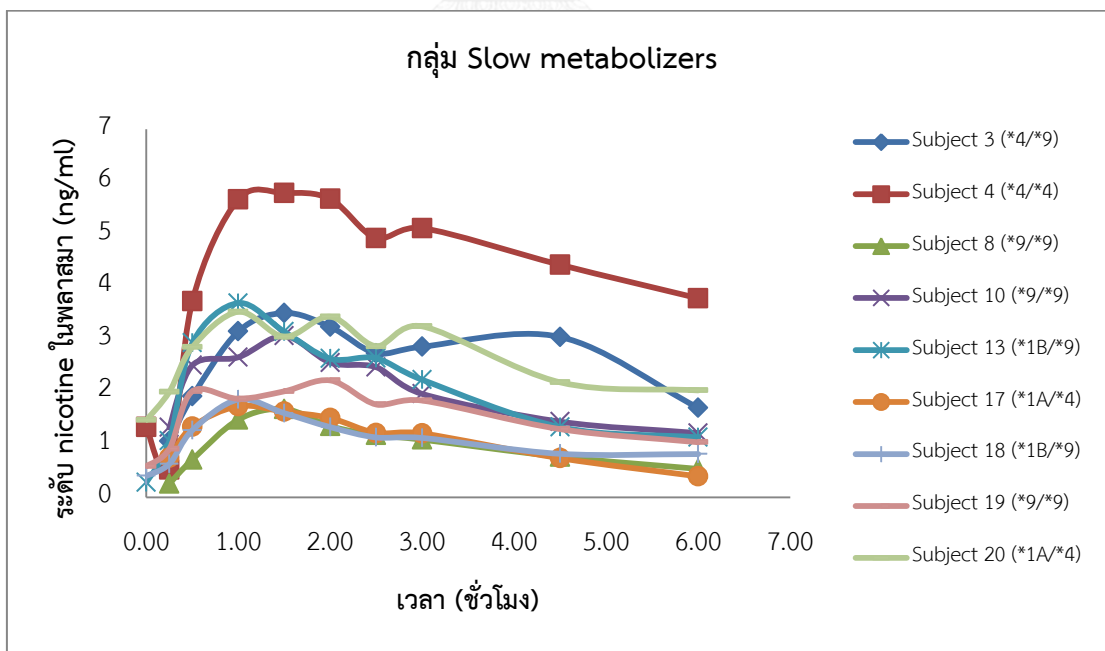
ภาพที่ 11 แสดงกราฟเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของค่าเฉลี่ยของระดับ nicotine ในพลาสมา กับเวลาหลังจากได้รับหมากฝรั่งนิโคตินขนาด 2 มิลลิกรัมระหว่างกลุ่ม normal metabolizers และ slow metabolizers พบว่าระดับเฉลี่ย nicotine ในพลาสมาในกลุ่ม normal metabolizers มีแนวโน้มต่ำกว่ากลุ่ม slow metabolizers ทุกช่วงเวลา

ตารางที่ 7 แสดงผลการวิเคราะห์ระดับ nicotine ในพลาสมา ณ เวลาต่างๆ ของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่ที่ได้รับหมากฝรั่งนิโคตินขนาด 2 มิลลิกรัม

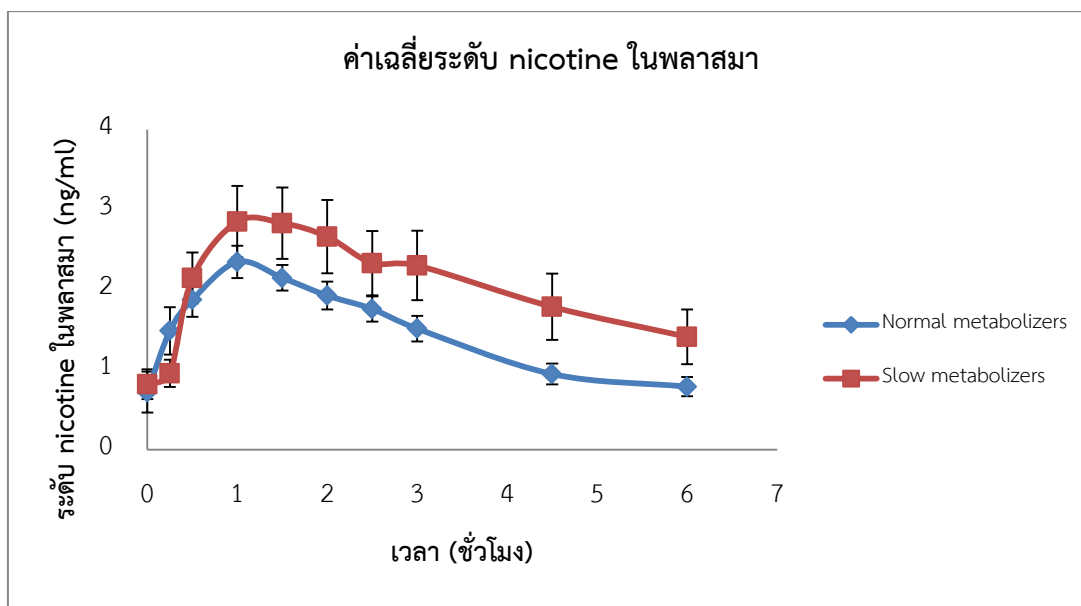
Subject no.	0	เวลาหลังจากได้รับหมากฝรั่งนิโคติน (ชั่วโมง)									
		0.25	0.50	1.00	1.50	2.00	2.50	3.00	4.50	6.00	
Normal metabolizers											
1 (*1A/*1A)	0.645	0.706	1.514	3.515	3.005	2.721	2.187	2.056	1.082	0.575	
2 (*1A/*1A)	0.572	0.876	1.287	1.668	2.178	1.811	1.678	1.488	0.684	0.673	
5 (*1A/*1A)	<LLOQ	2.883	1.047	2.293	2.074	2.020	1.975	1.804	1.475	0.980	
6 (*1A/*1A)	0.398	1.223	2.183	3.010	2.296	2.085	1.770	1.350	0.882	0.515	
9 (*1A/*1A)	<LLOQ	0.731	1.491	1.924	1.879	1.770	1.807	1.425	0.912	0.667	
11 (*1B/*1B)	0.267	0.695	1.769	2.154	1.992	1.735	1.533	1.244	0.751	0.665	
12 (*1A/*1A)	<LLOQ	1.224	2.298	2.045	1.868	1.489	1.319	1.132	0.671	0.137	
15 (*1A/*1A)	1.707	2.663	3.117	2.684	2.673	2.635	2.580	2.336	1.619	1.428	
16 (*1A/*1A)	<LLOQ	2.347	2.136	1.826	1.355	1.055	0.973	0.769	0.421	<LLOQ	
Slow metabolizers											
3 (*4/*9)	<LLOQ	1.066	1.916	3.153	3.504	3.240	2.736	2.864	3.048	1.701	
4 (*4/*4)	1.337	0.527	3.729	5.666	5.786	5.673	4.924	5.118	4.421	3.784	
8 (*9/*9)	<LLOQ	0.258	0.715	1.476	1.677	1.351	1.184	1.095	0.769	0.539	
10 (*9/*9)	0.215	1.327	2.509	2.663	3.069	2.561	2.473	1.965	1.437	1.220	
13 (*1B/*9)	0.282	1.073	2.933	3.693	3.148	2.635	2.646	2.234	1.334	1.139	
17 (*1A/*4)	<LLOQ	0.747	1.342	1.732	1.627	1.506	1.221	1.214	0.742	0.397	
18 (*1B/*9)	0.406	0.634	1.276	1.859	1.599	1.333	1.137	1.128	0.826	0.821	
19 (*9/*9)	0.591	0.921	2.016	1.873	2.015	2.222	1.764	1.839	1.295	1.046	
20 (*1A/*4)	1.468	2.006	2.856	3.528	3.052	3.433	2.871	3.250	2.185	2.032	



ภาพที่ 9 แสดงระดับ nicotine ในพลาสมาของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่ในกลุ่ม normal metabolizers ที่ได้รับหมากฝรั่งนิโคตินขนาด 2 มิลลิกรัม



ภาพที่ 10 แสดงระดับ nicotine ในพลาสมาของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่ในกลุ่ม slow metabolizers ที่ได้รับหมากฝรั่งนิโคตินขนาด 2 มิลลิกรัม



ภาพที่ 11 แสดงค่าเฉลี่ย (Mean \pm SEM) ระดับ nicotine ในพลาสมาของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่ระหว่างกลุ่ม normal metabolizers และ slow metabolizers ที่ได้รับหมากฝรั่งนิโคตินขนาด 2 มิลลิกรัม

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบระดับ nicotine ในพลาสมาของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่ 2 กลุ่มที่ได้รับหมากฝรั่งนิโคตินขนาด 2 มิลลิกรัม

เวลา (ชั่วโมง)	Normal metabolizers (Mean \pm SEM)	Slow metabolizers (Mean \pm SEM)	<i>P</i> -value
0.00	0.72 \pm 0.26	0.82 \pm 0.24	0.841
0.25	1.48 \pm 0.30	0.95 \pm 0.17	0.258
0.50	1.87 \pm 0.21	2.14 \pm 0.32	0.667
1.00	2.35 \pm 0.20	2.85 \pm 0.45	0.667
1.50	2.15 \pm 0.16	2.83 \pm 0.45	0.340
2.00	1.92 \pm 0.17	2.66 \pm 0.46	0.297
2.50	1.76 \pm 0.16	2.33 \pm 0.40	0.387
3.00	1.51 \pm 0.16	2.30 \pm 0.43	0.297
4.50	0.94 \pm 0.13	1.78 \pm 0.41	0.114
6.00	0.79 \pm 0.12	1.41 \pm 0.34	0.174

4.2.3 พารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ของนิโคติน

ค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ของ nicotine ในอาสาสมัครที่สูบบุหรี่ทั้ง 2 กลุ่ม และเปรียบเทียบความแตกต่างแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบระดับ nicotine ในพลาสมาของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่ 2 กลุ่มที่ได้รับหมากฝรั่งนิโคตินขนาด 2 มิลลิกรัม

Subject no.	Pharmacokinetic parameters					
	C _{max} (ng/ml)	T _{max} (hr)	AUC ₀₋₆ (ng·hr/ml)	AUC _{0-inf} (ng·hr/ml)	t _{1/2} (hr)	Kel (hr ⁻¹)
Normal metabolizers						
1 (*1A/*1A)	3.52	1.00	10.72	12.20	1.79	0.39
2 (*1A/*1A)	2.18	1.50	7.35	9.71	2.43	0.29
5 (*1A/*1A)	2.88	0.25	10.07	15.52	3.85	0.18
6 (*1A/*1A)	3.01	1.00	8.80	10.30	2.01	0.34
9 (*1A/*1A)	1.92	1.00	7.65	10.17	2.62	0.26
11 (*1B/*1B)	2.15	1.00	7.39	10.01	2.73	0.25
12 (*1A/*1A)	2.30	0.50	6.21	6.45	1.21	0.57
15 (*1A/*1A)	3.12	0.50	13.10	21.52	4.09	0.17
16 (*1A/*1A)	2.35	0.25	5.06	6.16	1.81	0.38
Mean ± SEM	2.60 ± 0.18	0.78 ± 0.14	8.48 ± 0.82	11.34 ± 1.58	2.50 ± 0.32	0.32 ± 0.04
Slow metabolizers						
3 (*4/*9)	3.50	1.50	16.44	30.01	5.53	0.13
4 (*4/*4)	5.79	1.50	27.62	68.99	7.58	0.09
8 (*9/*9)	1.68	1.50	5.85	8.22	3.04	0.23
10 (*9/*9)	3.07	1.50	11.61	17.82	3.53	0.20
13 (*1B/*9)	3.69	1.00	12.47	17.28	2.93	0.24
17 (*1A/*4)	1.73	1.00	6.45	7.67	2.13	0.32
18 (*1B/*9)	1.86	1.00	6.66	10.62	3.34	0.21
19 (*9/*9)	2.22	2.00	9.67	15.48	3.85	0.18
20 (*1A/*4)	3.53	1.00	16.41	31.56	5.16	0.13
Mean ± SEM	3.01 ± 1.33	1.33 ± 0.12	12.58 ± 2.31	23.07 ± 6.41	4.12 ± 0.56	0.19 ± 0.07
P-value	0.730	0.019*	0.258	0.094	0.024*	0.024*

พบว่าค่าพารามิเตอร์เภสัชจลนศาสตร์ของอาสาสมัครในกลุ่ม normal metabolizers และ slow metabolizers มีค่าความเข้มข้นสูงสุดของ nicotine ในพลาสมา (C_{max}) เท่ากับ 2.60 ± 0.18 ng/ml และ 3.01 ± 1.33 ng/ml ตามลำดับ เวลาที่ระดับ nicotine สูงสุดในเลือด (T_{max}) เท่ากับ 0.78 ± 0.14 ชั่วโมง และ 1.33 ± 0.12 ชั่วโมง มีพื้นที่ใต้กราฟของ nicotine ในพลาสมา กับเวลาที่เก็บตัวอย่างครั้งสุดท้าย (AUC_{0-6}) เท่ากับ 8.48 ± 0.82 ng•hr/ml และ 12.58 ± 2.31 ng•hr/ml ตามลำดับ มีพื้นที่ใต้กราฟของ nicotine ในพลาสมา กับเวลานับตั้งแต่การริเริ่ม (AUC_{0-inf}) เท่ากับ 11.34 ± 1.58 ng•hr/ml และ 23.07 ± 6.41 ng•hr/ml ตามลำดับ มีค่าครึ่งชีวิตของการขจัดยาออก ($t_{1/2}$) เท่ากับ 2.50 ± 0.32 ชั่วโมง และ 4.12 ± 0.56 ชั่วโมง ตามลำดับ มีค่าคงที่ของอัตราการกำจัดยา (Kel) เท่ากับ 0.32 ± 0.04 ต่อชั่วโมง และ 0.19 ± 0.07 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ

ผลการทดสอบทางสถิติของค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ พบว่าค่า C_{max} , AUC_{0-6} และ AUC_{0-inf} ระหว่างกลุ่ม normal metabolizers และ slow metabolizers ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ T_{max} และ $t_{1/2}$ ของ nicotine ในกลุ่ม normal metabolizers มีค่าต่ำกว่ากลุ่ม slow metabolizers ($P = 0.019$ และ $P = 0.024$) และกลุ่ม slow metabolizers มีค่า Kel ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่ม normal metabolizers ($P = 0.024$)

4.2.4 การทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ในอาสาสมัครสูบบุหรี่ 2 กลุ่มที่ได้รับหมากฝรั่งนิโคตินขนาด 2 มิลลิกรัม

กลุ่ม normal metabolizers และกลุ่ม slow metabolizers มีระดับ cotinine และ *trans*-3'-hydroxycotinine ณ จุดเวลาต่างๆ ดังตารางที่ 10-11 ตามลำดับ

ภาพที่ 12-13 แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างระดับ cotinine ในพลาสมา กับเวลาหลังจากได้รับหมากฝรั่งนิโคตินขนาด 2 มิลลิกรัม ของอาสาสมัครแต่ละคนในกลุ่ม normal metabolizers และ slow metabolizers

ภาพที่ 14 แสดงกราฟเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของค่าเฉลี่ยของระดับ cotinine ในพลาสมา กับเวลาหลังจากได้รับหมากฝรั่งนิโคตินขนาด 2 มิลลิกรัมระหว่างกลุ่ม normal metabolizers และ slow metabolizers

ภาพที่ 15-16 แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างระดับ *trans*-3'-hydroxycotinine ในพลาสมา กับเวลาหลังจากได้รับหมากฝรั่งนิโคตินขนาด 2 มิลลิกรัม ของอาสาสมัครแต่ละคนในกลุ่ม normal metabolizers และ slow metabolizers

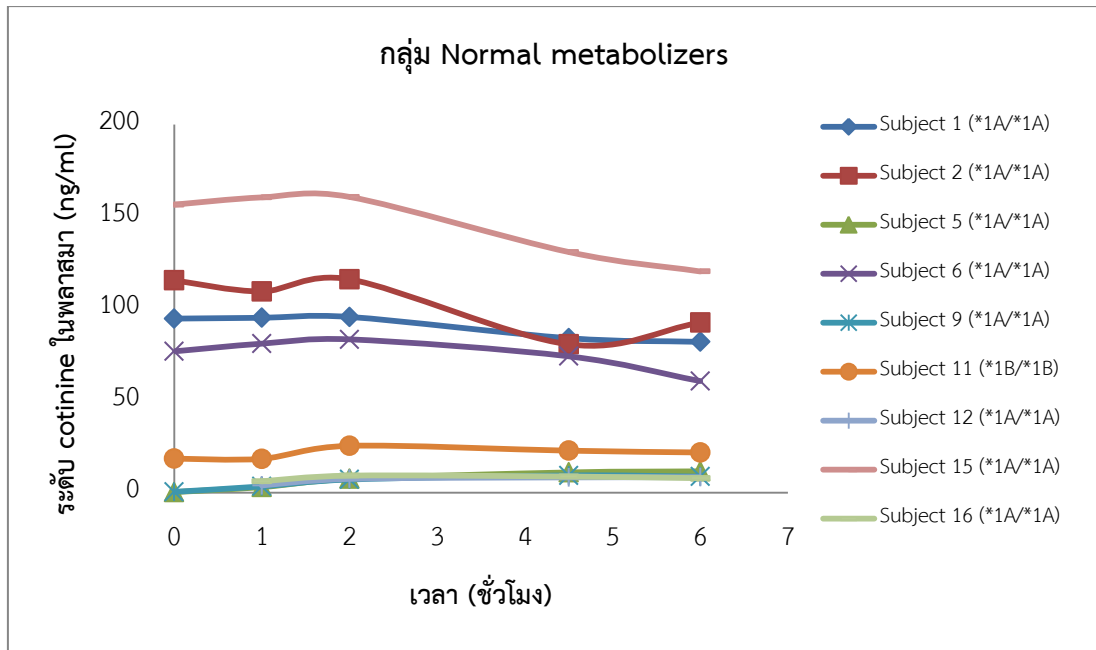
ภาพที่ 17 แสดงกราฟเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของค่าเฉลี่ยของระดับ *trans*-3'-hydroxycotinine ในพลาสมา กับเวลาหลังจากได้รับหมากฝรั่งนิโคตินขนาด 2 มิลลิกรัมระหว่างกลุ่ม normal metabolizers และ slow metabolizers

ตารางที่ 10 แสดงผลการวิเคราะห์ระดับ cotinine ในพลาสมา ณ เวลาต่างๆ ของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่ที่ได้รับหมากฝรั่งนิโคตินขนาด 2 มิลลิกรัม

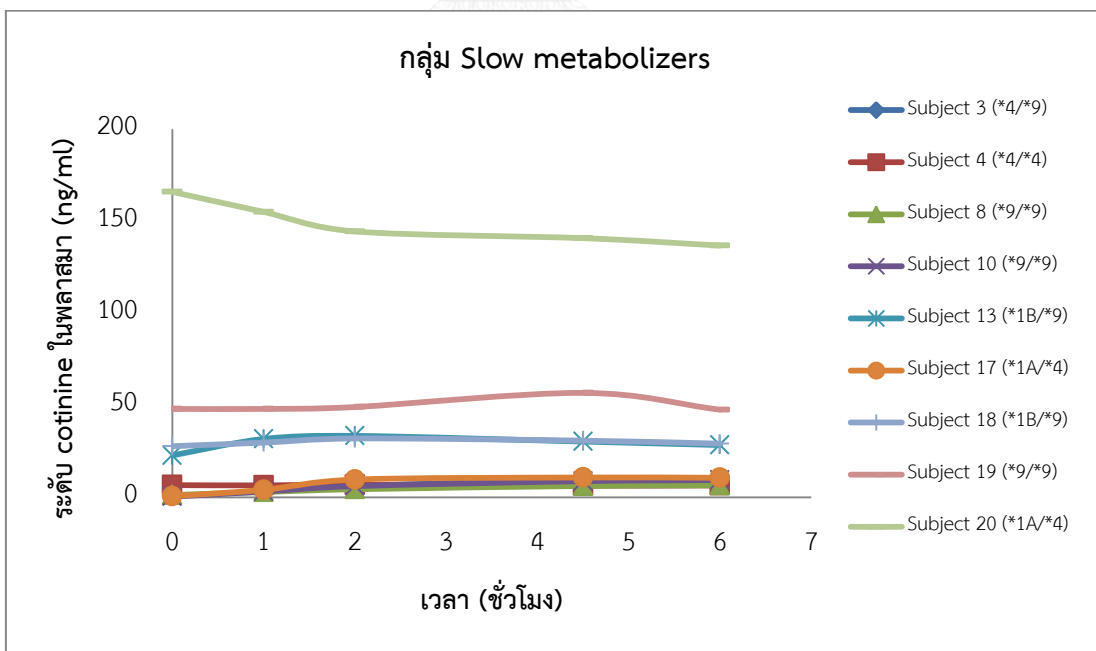
Subject no.		เวลาหลังจากได้รับหมากฝรั่งนิโคติน (ชั่วโมง)					
		0	1.0	2.0	4.5	6.0	
Normal metabolizers							
1 (*1A/*1A)	ระดับ cotinine หลังจากได้รับหมากฝรั่งนิโคติน 2 มิลลิกรัม (ng/ml)	94.542	94.981	95.439	83.901	81.905	
2 (*1A/*1A)		115.357	109.279	115.890	80.564	92.360	
5 (*1A/*1A)		0.270	2.957	7.457	10.950	11.546	
6 (*1A/*1A)		76.743	80.937	83.260	74.050	60.596	
9 (*1A/*1A)		0.397	3.356	7.088	9.321	8.671	
11 (*1B/*1B)		18.460	18.351	25.405	22.764	21.793	
12 (*1A/*1A)		<LLOQ	3.874	7.443	8.243	8.330	
15 (*1A/*1A)		156.475	160.430	160.666	130.726	120.168	
16 (*1A/*1A)		<LLOQ	6.126	9.209	8.714	7.812	
Slow metabolizers							
3 (*4/*9)		<LLOQ	3.458	6.006	9.707	9.733	
4 (*4/*4)		6.577	6.449	6.793	6.331	6.418	
8 (*9/*9)		1.187	2.852	4.356	6.112	6.533	
10 (*9/*9)		0.354	3.095	6.052	8.748	9.365	
13 (*1B/*9)		22.722	31.677	33.345	30.261	28.362	
17 (*1A/*4)		0.557	4.031	9.621	10.738	10.574	
18 (*1B/*9)	27.746	29.695	31.943	30.759	29.119		
19 (*9/*9)	48.004	46.998	49.028	56.709	47.581		
20 (*1A/*4)	165.923	155.074	144.466	140.801	136.778		

ตารางที่ 11 แสดงผลการวิเคราะห์ระดับ *trans*-3'-hydroxycotinine ในพลาสมา ณ เวลาต่างๆ ของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่ที่ได้รับหมากฝรั่งนิโคตินขนาด 2 มิลลิกรัม

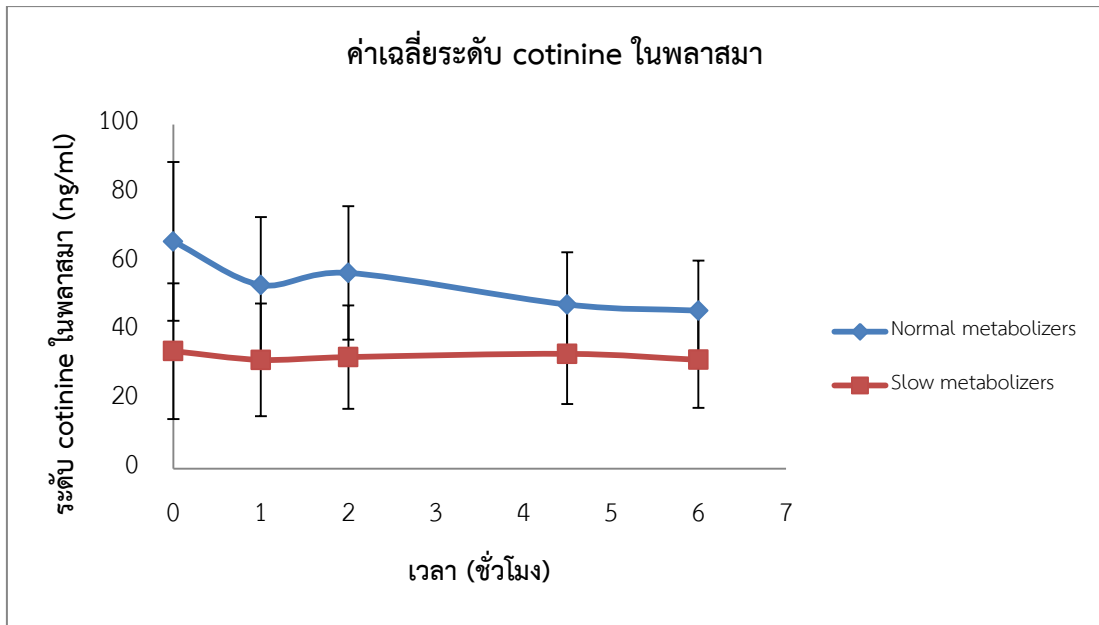
Subject no.		เวลาหลังจากได้รับหมากฝรั่งนิโคติน (ชั่วโมง)				
		0	1.0	2.0	4.5	6.0
Normal metabolizers	ระดับ <i>trans</i> -3'-hydroxycotinine ที่หลังจากได้รับหมากฝรั่งนิโคติน 2 มิลลิกรัม (ng/ml)					
1 (*1A/*1A)		43.915	42.031	40.460	44.592	43.376
2 (*1A/*1A)		36.166	35.923	32.599	22.636	30.022
5 (*1A/*1A)		<LLOQ	0.735	0.957	1.410	1.306
6 (*1A/*1A)		41.194	40.257	39.126	37.887	36.757
9 (*1A/*1A)		<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	0.773	0.938
11 (*1B/*1B)		19.829	17.636	17.752	16.761	16.749
12 (*1A/*1A)		<LLOQ	<LLOQ	0.724	1.176	1.301
15 (*1A/*1A)		30.795	30.097	31.162	26.633	26.513
16 (*1A/*1A)		<LLOQ	0.555	1.818	1.843	2.075
Slow metabolizers						
3 (*4/*9)		<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	0.699
4 (*4/*4)		<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ
8 (*9/*9)		0.580	<LLOQ	0.546	0.676	1.021
10 (*9/*9)		<LLOQ	<LLOQ	0.565	<LLOQ	0.618
13 (*1B/*9)		5.546	5.999	6.072	6.654	6.063
17 (*1A/*4)		0.964	0.555	0.872	1.628	2.031
18 (*1B/*9)		12.408	11.340	11.727	11.016	8.531
19 (*9/*9)		9.803	9.072	9.537	8.953	9.457
20 (*1A/*4)	28.406	28.123	25.793	25.144	22.531	



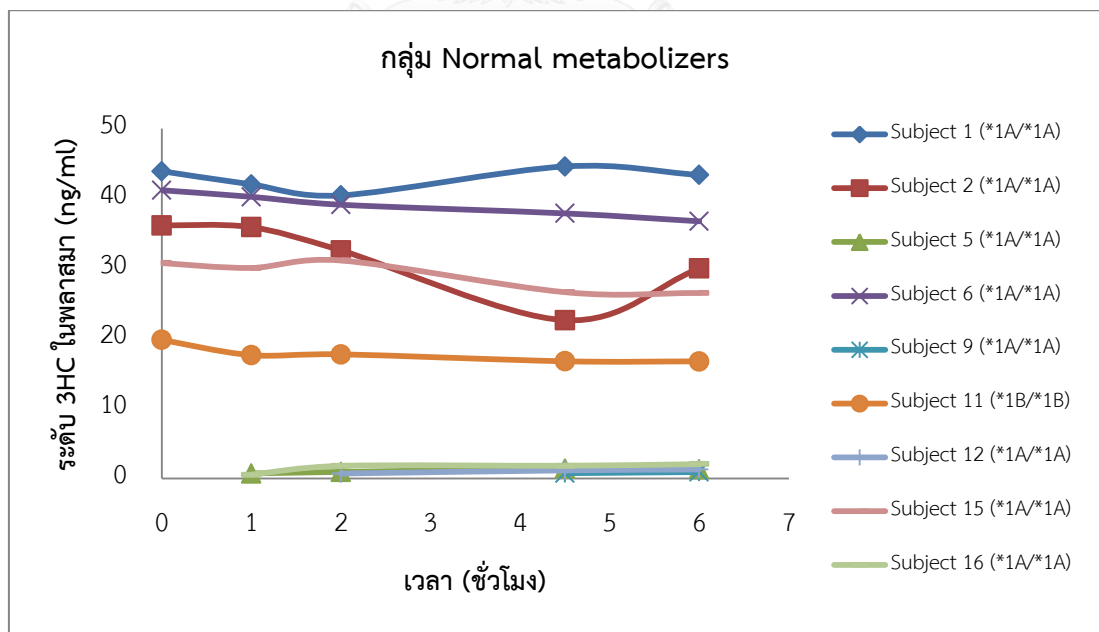
ภาพที่ 12 แสดงระดับ cotinine ในพลาสมาของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่ในกลุ่ม normal metabolizers ที่ได้รับหมากฝรั่งนิโคตินขนาด 2 มิลลิกรัม



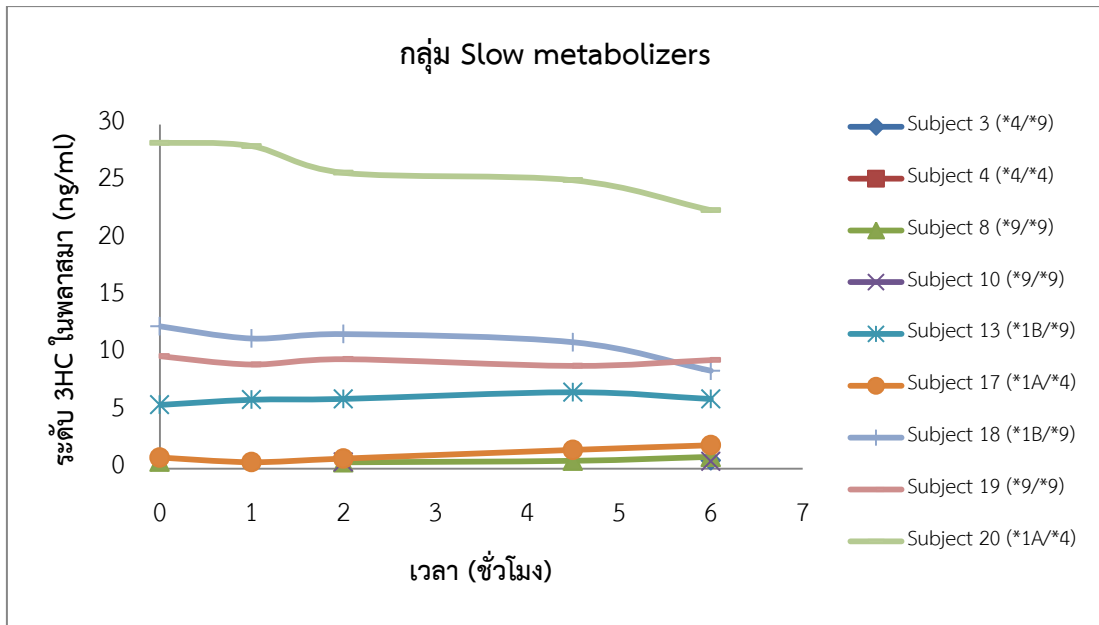
ภาพที่ 13 แสดงระดับ cotinine ในพลาสมาของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่ในกลุ่ม slow metabolizers ที่ได้รับหมากฝรั่งนิโคตินขนาด 2 มิลลิกรัม



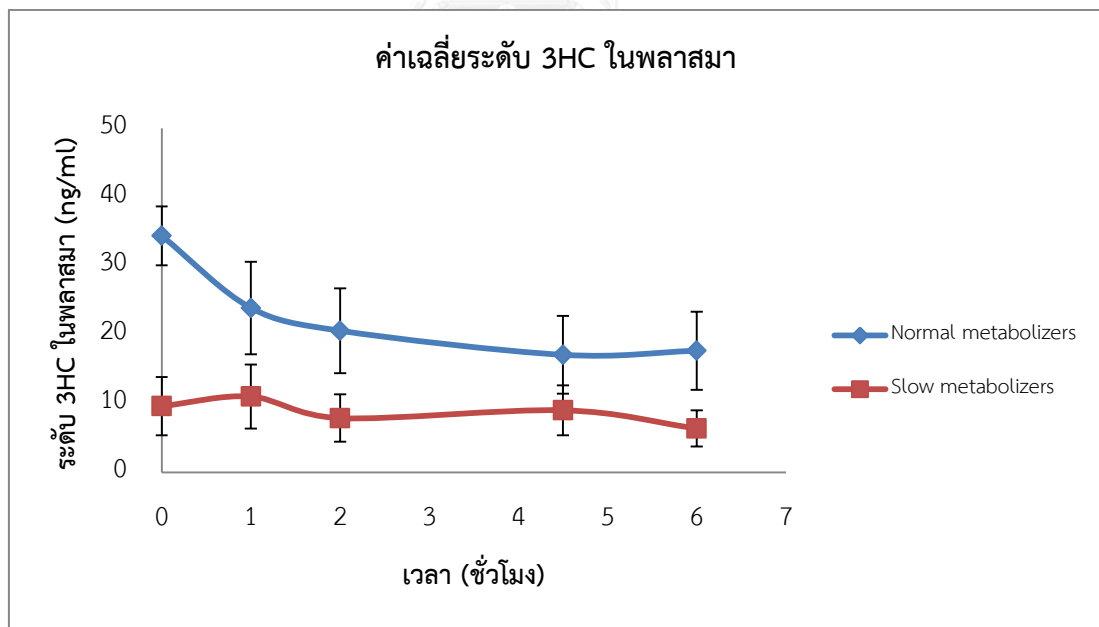
ภาพที่ 14 แสดงค่าเฉลี่ย (Mean \pm SEM) ระดับ cotinine ในพลาสมาของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่ระหว่างกลุ่ม normal metabolizers และ slow metabolizers ที่ได้รับหมากฝรั่งนิโคตินขนาด 2 มิลลิกรัม



ภาพที่ 15 แสดงระดับ *trans*-3' hydroxycotinine ในพลาสมาของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่ในกลุ่ม normal metabolizers ที่ได้รับหมากฝรั่งนิโคตินขนาด 2 มิลลิกรัม

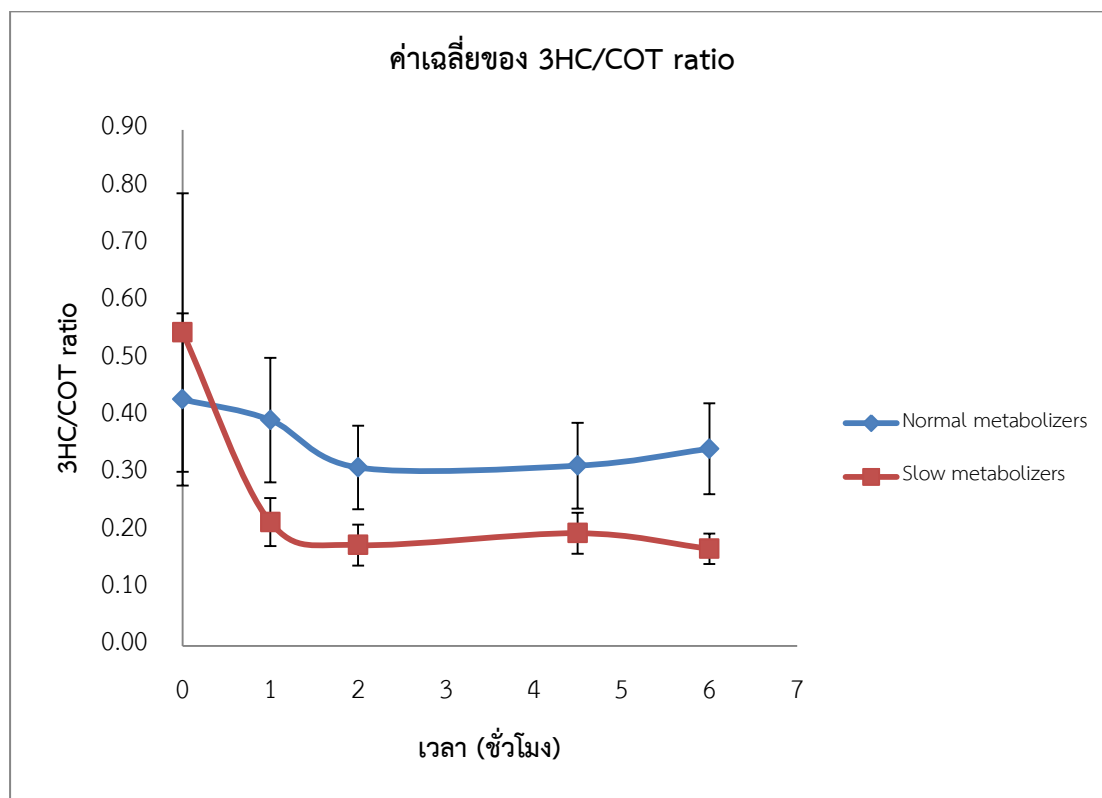


ภาพที่ 16 แสดงระดับ *trans*-3'-hydroxycotinine ในพลาสมาของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่ในกลุ่ม slow metabolizers ที่ได้รับหมากฝรั่งนิโคตินขนาด 2 มิลลิกรัม



ภาพที่ 17 แสดงค่าเฉลี่ย (Mean \pm SEM) ระดับ *trans*-3'-hydroxycotinine ในพลาสมาของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่ระหว่างกลุ่ม normal metabolizers และ slow metabolizers ที่ได้รับหมากฝรั่งนิโคตินขนาด 2 มิลลิกรัม

เมื่อศึกษาการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ในอาสาสมัครกลุ่ม normal metabolizers และ slow metabolizers โดยดูจากค่าอัตราส่วนของ *trans*-3'-hydroxycotinine/cotinine (3HC/COT ratio) พบว่าค่า 3HC/COT ratio ของอาสาสมัครในกลุ่ม slow metabolizers มีแนวโน้มต่ำกว่ากลุ่ม normal metabolizers แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 12)



ภาพที่ 18 แสดงค่าเฉลี่ย (Mean ± SEM) ของ 3HC/COT ratio ของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่ในกลุ่ม normal metabolizers และ slow metabolizers

ตารางที่ 12 แสดงค่าเฉลี่ยของ 3HC/COT ratio ของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่ 2 กลุ่ม

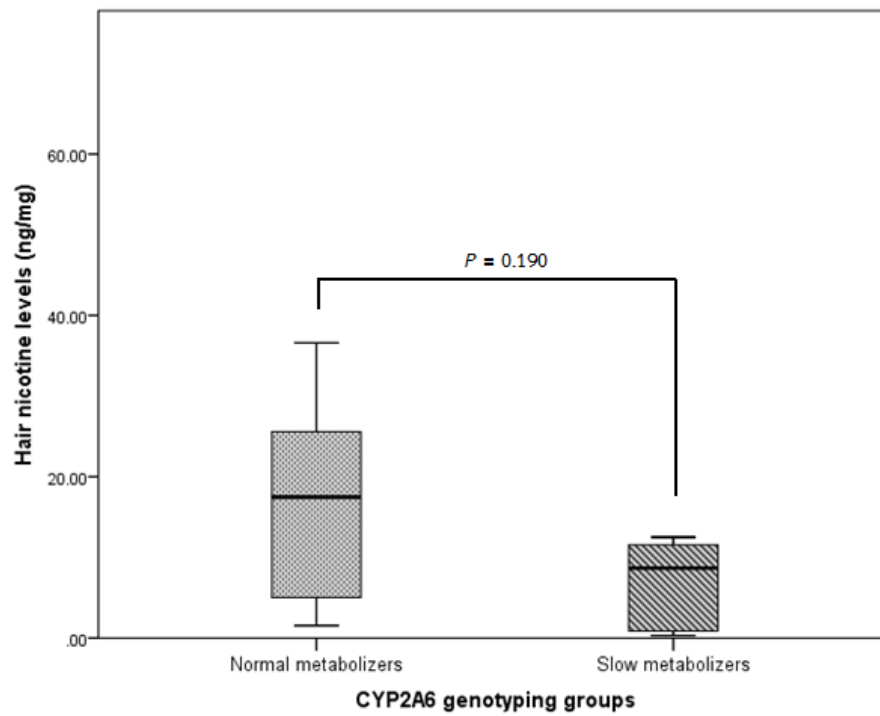
เวลา (ชั่วโมง)	3HC/COT Ratio (Mean \pm SEM)		P-value
	Normal metabolizers	Slow metabolizers	
0.0	0.43 \pm 0.15	0.55 \pm 0.24	0.937
1.0	0.39 \pm 0.11	0.22 \pm 0.04	0.268
2.0	0.31 \pm 0.07	0.18 \pm 0.04	0.094
4.5	0.31 \pm 0.08	0.20 \pm 0.04	0.529
6.0	0.34 \pm 0.08	0.17 \pm 0.03	0.114

4.2.5 ปริมาณการสะสมของ nicotine และ cotinine ในเส้นผมของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่

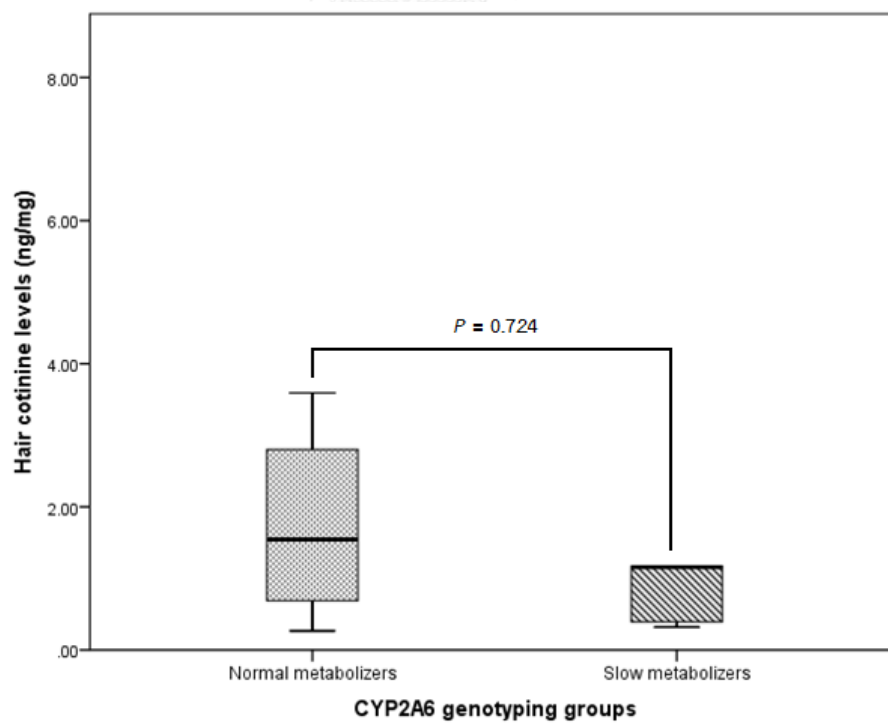
ปริมาณการสะสมของ nicotine และ cotinine ในเส้นผมของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่ดูจากระดับ nicotine และ cotinine พบว่าในกลุ่ม normal metabolizers มีระดับ nicotine เท่ากับ 16.24 ± 4.28 ng/mg และมีระดับ cotinine เท่ากับ 2.23 ± 0.84 ng/mg ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่ม slow metabolizers มีระดับ nicotine เท่ากับ 12.15 ± 19.60 ng/mg และมีระดับ cotinine เท่ากับ 2.15 ± 1.40 ng/mg แม้ว่าทดสอบทางสถิติแล้วไม่ต่าง แต่แนวโน้มมีความเป็นไปได้ที่กลุ่ม normal metabolizers จะมีการสะสมของ nicotine และ cotinine ในเส้นผมมากกว่ากลุ่ม slow metabolizers แสดงในตารางที่ 13 และภาพที่ 19-20

ตารางที่ 13 เปรียบเทียบระดับ nicotine และ cotinine ในเส้นผมของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่ 2 กลุ่ม

Subject No.	nicotine (ng/mg)	cotinine (ng/mg)
Normal metabolizers		
1 (*1A/*1A)	36.59	7.49
2 (*1A/*1A)	17.48	3.59
5 (*1A/*1A)	3.40	1.24
6 (*1A/*1A)	25.57	2.01
9 (*1A/*1A)	5.01	0.35
11 (*1B/*1B)	28.94	1.03
12 (*1A/*1A)	1.56	<LLOQ
15 (*1A/*1A)	22.00	1.85
16 (*1A/*1A)	5.61	0.27
Mean ± SEM	16.24 ± 4.28	2.23 ± 0.84
Slow metabolizers		
3 (*4/*9)	0.88	<LLOQ
4 (*4/*4)	8.68	0.39
8 (*9/*9)	0.31	<LLOQ
10 (*9/*9)	0.60	<LLOQ
13 (*1B/*9)	12.50	0.32
17 (*1A/*4)	0.87	<LLOQ
18 (*1B/*9)	11.56	1.17
19 (*9/*9)	11.45	1.16
20 (*1A/*4)	62.48	7.72
Mean ± SEM	12.15 ± 6.53	2.15 ± 1.40
P-value	0.190	0.724



ภาพที่ 19 แสดง Boxplots ระดับ nicotine ในเส้นผมของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่ 2 กลุ่ม



ภาพที่ 20 แสดง Boxplots ระดับ cotinine ในเส้นผมของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่ 2 กลุ่ม

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลองและสรุปผลการวิจัย

5.1 การศึกษาจีโนไทป์ของ CYP2A6 ของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่ที่มาตรวจสุขภาพ ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

จากการศึกษาจีโนไทป์ของ CYP2A6 ในอาสาสมัครที่สูบบุหรี่ที่มาตรวจสุขภาพ ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์จำนวน 127 คน พบว่าอาสาสมัครส่วนใหญ่มีจีโนไทป์ของ CYP2A6 แบบ CYP2A6*1A/*1A จำนวน 41 คน (32.28%) รองลงมา ได้แก่ CYP2A6*1A/*1B จำนวน 31 คน (24.41%) และพบจีโนไทป์ของ CYP2A6 แบบ CYP2A6*1A/*4 จำนวน 15 คน (11.81%), CYP2A6*1A/*9 จำนวน 10 คน (7.87%), CYP2A6*1B/*9 จำนวน 8 คน (6.30%), CYP2A6*9/*9 จำนวน 8 คน (6.30%), CYP2A6*4/*4 จำนวน 5 คน (3.94%), CYP2A6*4/*9 จำนวน 3 คน (2.36%) และ CYP2A6*1B/*4 จำนวน 3 คน (1.57%) ตามลำดับ เมื่อเทียบกับการศึกษาก่อนหน้านั้นในกลุ่มประชากรเชื้อชาติอื่นๆ พบว่ามีความแตกต่างกันแสดงในตารางที่ 14

มีรายงานความถี่การกระจายตัวของ CYP2A6 ในประชากรเชื้อชาติต่างๆ พบว่าความถี่การกระจายตัวของ CYP2A6 แบบ CYP2A6*1A/*1A และ CYP2A6*1A/*1B มีความถี่สูงในประชากรทุกกลุ่มทั้งในประชากรชาวคอเคเซียนและเอเชีย แต่เปอร์เซ็นต์ของการกระจายตัวในแต่ละกลุ่มประชากรมีความแตกต่างกันออกไป มีการรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ในคนไทยที่สูบบุหรี่โดย Ujjin และคณะ (48) พบความถี่ของการกระจายตัวของ CYP2A6*1A/*1A คล้ายคลึงกับการศึกษาในครั้งนี้ แต่มีความถี่การกระจายตัวของ CYP2A6*1A/*1B, CYP2A6*1B/*1B, CYP2A6*1A/*4, CYP2A6*1B/*4 และ CYP2A6*1A/*9 ที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ได้ทำการวัดจีโนไทป์ของ CYP2A6 ตัวอื่นเพิ่มเติมจากการศึกษาของ Ujjin และคณะ ได้แก่ CYP2A6*1A/*9, CYP2A6*1B/*9, CYP2A6*4/*9 และ CYP2A6*9/*9 พบว่าความถี่การกระจายตัวจีโนไทป์ของ CYP2A6 ดังกล่าวมีเปอร์เซ็นต์ของการกระจายตัวคล้ายคลึงกับการศึกษาในคนไทยที่ไม่สูบบุหรี่โดย Peamkrasatam และคณะ (31) นอกจากนี้พบว่าความถี่การกระจายตัวจีโนไทป์ของ CYP2A6 ใน

การศึกษานี้มีเปอร์เซ็นต์ของการกระจายตัวคล้ายคลึงกับผู้สูบบุหรี่คนญี่ปุ่น แต่แตกต่างจากชาวคอเคเซียนที่ไม่สูบบุหรี่, ชาวอเมริกันผิวดำที่ไม่สูบบุหรี่ และชาวฝรั่งเศสที่ไม่สูบบุหรี่ (36, 43, 49)

ตารางที่ 14 ความถี่การกระจายตัวของเงินไปของ CYP2A6 ของการศึกษานี้เทียบกับการศึกษาก่อนหน้านี้

กลุ่มประชากรที่ใช้ศึกษา	จำนวน ประชากร (คน)	การกระจายตัวของเงินไปของ CYP2A6 (%)											
		*1A/*1A	*1A/*1B	*1B/*1B	*1A/*4	*1B/*4	*1A/*9	*1B/*9	*4/*4	*4/*9	*9/*9	เอกสารอ้างอิง	
คนญี่ปุ่นที่ไม่สูบบุหรี่	444	15.5	34.5	16.7	15.3	14.6	-	-	3.4	-	-	-	(43)
ชาวฝรั่งเศสที่ไม่สูบบุหรี่	242	41.4	40.6	10.1	7.9	0	-	-	0	-	-	-	(43)
ชาวคอเคเซียนที่ไม่สูบบุหรี่	165	33.3	29.7	9.1	5.5	0.6	9.7	4.8	-	-	-	-	(49)
ชาวอเมริกันผิวดำที่ไม่สูบบุหรี่	94	41.5	19.1	0	1.1	0	11.7	2.1	-	-	-	-	(49)
คนไทยที่ไม่สูบบุหรี่	120	11.7	18.3	7.5	9.2	10	7.5	8.3	3.3	1.7	11.7	-	(31)
คนเกาหลี 7 คนสูบบุหรี่	209	19.6	42.6	16.7	9.1	9.1	-	-	1.9	-	-	-	(27)
202 คนไม่สูบบุหรี่													
ผู้สูบบุหรี่คนญี่ปุ่น	92	23.9	20.7	18.5	16.3	17.4	-	-	3.3	-	-	-	(36)
ผู้สูบบุหรี่คนไทย	198	28.8	41.4	16.2	6.6	5.1	-	-	2	-	-	-	(48)
การศึกษาครั้งนี้	127	32.3	24.4	3.15	11.8	1.6	7.9	6.3	4.0	2.4	6.3	6.3	

5.2 ระดับ nicotine ในพลาสมาของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่หลังได้รับหมากฝรั่งนิโคติน

การศึกษาครั้งนี้ทำในอาสาสมัครสูบบุหรี่ที่มาตรวจสุขภาพ ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ได้รับหมากฝรั่งนิโคตินขนาด 2 มิลลิกรัม เคี้ยวเป็นเวลานาน 30 นาที จากนั้นทำการเก็บเลือดของอาสาสมัครที่ช่วงเวลาต่างๆ พบว่าระดับเฉลี่ย nicotine ในพลาสมาของอาสาสมัครในกลุ่ม normal metabolizers มีแนวโน้มต่ำกว่ากลุ่ม slow metabolizers ทุกช่วงเวลา (ตารางที่ 8) เช่นเดียวกับการรายงานก่อนหน้านี้โดย Jun-Tack Kwona และคณะ (27) พบว่าอาสาสมัครชาวเกาหลีที่ได้รับหมากฝรั่งนิโคตินขนาด 2 มิลลิกรัมให้เคี้ยวเป็นเวลา 30 นาที ที่มีจีโนไทป์แบบ CYP2A6*1/*1 พบค่าเฉลี่ยของระดับ nicotine ในพลาสมาที่เวลา 2 ชั่วโมงหลังเคี้ยวหมากฝรั่งนิโคตินเท่ากับ 4.14 ± 1.75 ng/ml ในขณะที่อาสาสมัครที่มีจีโนไทป์เป็นแบบ CYP2A6*1A/*4, CYP2A6*1B/*4, CYP2A6*4/*4, CYP2A6*1A/*5 และ CYP2A6*1B/*5 มีค่าเฉลี่ยของ nicotine เฉลี่ยในพลาสมาเท่ากับ 4.73 ± 1.17 ng/ml ซึ่งจะเห็นได้ว่าการศึกษานี้มีค่าเฉลี่ยของ nicotine ในพลาสมาไม่แตกต่างเหมือนกับการศึกษาของเรา แต่มีแนวโน้มว่ากลุ่มอาสาสมัครที่มีจีโนไทป์แบบ CYP2A6*1/*1 จะมีค่าเฉลี่ยของระดับ nicotine ในพลาสมาจะน้อยกว่าอาสาสมัครที่มีจีโนไทป์เป็นแบบ CYP2A6*1A/*4, CYP2A6*1B/*4, CYP2A6*4/*4, CYP2A6*1A/*5 และ CYP2A6*1B/*5

จากการรายงานก่อนหน้านี้โดย Ho และคณะ (21) พบว่าอาสาสมัครในกลุ่ม slow metabolizers มีความสัมพันธ์กับระดับ nicotine ในพลาสมา โดยมีระดับ nicotine ในพลาสมาสูงกว่า normal metabolizers อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.003$) และสอดคล้องกับระดับ 3HC/COT ratio ที่ลดลง ผลที่พบในการศึกษาครั้งนี้ แม้ว่าจะไม่แตกต่างทางสถิติแต่มีแนวโน้มที่ระดับ nicotine ในพลาสมาจะแตกต่างกันในทางเดียวกับการศึกษาของ Ho และคณะ นั้นแสดงให้เห็นถึงอาสาสมัครในกลุ่ม slow metabolizers มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ลดลง

จากการศึกษาระดับ nicotine ที่กล่าวมาแล้วข้างต้น พบว่าในอาสาสมัครกลุ่ม normal metabolizers คือ เป็นผู้ที่จีโนไทป์เป็นแบบ CYP2A6*1/*1 ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มที่มีการทำงานของเอนไซม์รวดเร็ว ในขณะที่กลุ่ม slow metabolizers ประกอบด้วยจีโนไทป์หลายรูปแบบ ได้แก่ CYP2A6*1A/*4, CYP2A6*1B/*4, CYP2A6*1A/*9, CYP2A6*1B/*9, CYP2A6*9/*9, CYP2A6*4/*9, และ CYP2A6*4/*4 ซึ่งส่งผลให้ในกลุ่ม slow metabolizers มีความแปรปรวนของการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ค่อนข้างมาก นอกจากนี้ยังมีปัจจัยที่รบกวนระดับ nicotine ได้แก่

การเคี้ยวหมากฝรั่งนิโคติน และการดูดซึม nicotine จากหมากฝรั่งนิโคติน ซึ่งการดูดซึมเกิดขึ้นอย่างช้าๆ ทำให้ระดับ nicotine ในเลือดค่อยๆ เพิ่มสูงขึ้นซึ่งมีความแตกต่างกับระดับ nicotine ที่ได้จากการสูบบุหรี่ (50) อย่างไรก็ตามพบว่าปริมาณ nicotine จากหมากฝรั่งนิโคตินที่เข้าสู่ร่างกายมีปริมาณน้อยกว่าปริมาณนิโคตินที่อยู่ในหมากฝรั่ง (ภาพที่ 4) ส่วนหนึ่งอาจเกิดจากระหว่างเคี้ยวหมากฝรั่งนิโคตินมีการกลืนน้ำลายลงไป ทำให้ nicotine ลงไปสู่ระบบทางเดินอาหาร แต่เนื่องจากภายในระบบทางเดินอาหารมีน้ำย่อยที่มีความเป็นกรด ทำให้การดูดซึม nicotine ภายในระบบทางเดินอาหารเกิดขึ้นได้ไม่ดี (3, 14) ซึ่งผู้วิจัยได้ลดความผิดพลาดโดยการซักซ้อมทำความเข้าใจกับอาสาสมัครถึงวิธีการเคี้ยวหมากฝรั่งนิโคติน โดยให้เคี้ยวหมากฝรั่งอย่างช้าๆ 3-4 ครั้ง จนได้รสเพื่อนของ nicotine แล้วอมหมากฝรั่งนิโคตินไว้ระหว่างกระพุ้งแก้มกับเหงือก รอจนรสเพื่อนหายไปถึงเริ่มเคี้ยวใหม่สลับกับการอมเป็นเวลา 30 นาที เพื่อที่จะให้อาสาสมัครแต่ละคนมีการเคี้ยวหมากฝรั่งนิโคตินเหมือนกัน ดังนั้นเราเชื่อว่าผลของการวิจัยครั้งนี้มีความถูกต้อง

5.3 พารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ของนิโคตินที่ได้รับหมากฝรั่งนิโคติน

ในกลุ่ม slow metabolizers พบว่ามีค่า T_{max} นานกว่า ($P = 0.019$), มีค่าคงที่ของอัตรากำจัด nicotine ต่อหนึ่งหน่วยเวลาแสดงโดยค่า Kel ลดลง ($P = 0.024$) ส่งผลให้ $t_{1/2}$ ของ nicotine ในอาสาสมัครกลุ่มนี้ยาวขึ้น ($P = 0.024$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม normal metabolizers

จากการรายงานก่อนหน้านี้โดย Dempsey และคณะ (51) รายงานว่าจีโนไทป์ของ CYP2A6 มีผลต่อระดับ nicotine ในพลาสมา, C_{max} และ AUC อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องจากความแตกต่างทางลักษณะทางพันธุกรรมของ CYP2A6 มีผลต่ออัตราการเมแทบอลิซึมและการดูดซึม nicotine เข้าสู่กระแสเลือด โดยทั่วไป nicotine มี $t_{1/2}$ ประมาณ 2 ชั่วโมง แต่ในคนที่มีการทำงานของเอนไซม์ที่ช้ามาก จะส่งผลให้ nicotine อยู่ในเลือดนานขึ้น และเกิดการสะสมของ nicotine ตามอวัยวะต่างๆ ดังนั้น ทำให้คนที่มีการทำงานของเอนไซม์ที่ช้ามากมี $t_{1/2}$ ของ nicotine นานมากกว่า 2 ชั่วโมงและอาจมี $t_{1/2}$ นานถึง 4 ชั่วโมงได้ (19)

จากการรายงานก่อนหน้านี้โดย Garg และคณะ (52) พบว่าอาสาสมัครชาวอินเดียที่สูบบุหรี่ได้รับหมากฝรั่งนิโคตินขนาด 2 มิลลิกรัมให้เคี้ยวเป็นเวลา 30 นาที มีค่า C_{max} ของ nicotine เท่ากับ 7.26 ± 2.07 ng/ml, มีค่า T_{max} เท่ากับ 0.67 ชั่วโมง, มีค่า AUC_{0-24} เท่ากับ 32.30 ± 11.49 ng·hr/ml, มี

ค่า $AUC_{0-\infty}$ เท่ากับ 36.63 ± 13.44 ng•hr/ml, มีค่า $t_{1/2}$ เท่ากับ 7.44 ± 4.71 ชั่วโมง และมีค่า Kel เท่ากับ 0.13 ± 0.07 ต่อชั่วโมง จากการรายงานนี้ผู้วิจัยไม่ได้มีการแบ่งกลุ่มอาสาสมัครตามการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ดังนั้นผลของค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ที่ได้จึงมีความแตกต่างกับงานวิจัยของเรา

จากการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของ nicotine ที่กล่าวมาข้างต้น เห็นได้ว่าคุณสมบัติเภสัชจลนศาสตร์ของ nicotine มีแนวโน้มที่จะเป็นไปตามความแตกต่างทางพันธุกรรมของ CYP2A6 อย่างไรก็ตามพบว่าค่าทางเภสัชจลนศาสตร์ของ nicotine จะแตกต่างกันไปในอาสาสมัครแต่ละกลุ่ม

5.4 การทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ในอาสาสมัครที่สูบบุหรี่ 2 กลุ่มที่ได้รับหมากฝรั่งนิโคติน ขนาด 2 มิลลิกรัม

พบว่าจีโนไทป์ของ CYP2A6 มีแนวโน้มที่จะสัมพันธ์กับ 3HC/COT ratio โดยอาสาสมัครที่สูบบุหรี่ในกลุ่ม normal metabolizers มีแนวโน้มที่ค่าเฉลี่ยของ 3HC/COT ratio มากกว่าอาสาสมัครที่สูบบุหรี่ในกลุ่ม slow metabolizers (ตารางที่ 12) ค่า 3HC/COT ratio เป็นค่าที่ใช้บ่งบอกถึงอัตราการเมแทบอลิซึมของ nicotine ยังมีค่ามากแสดงว่าอัตราการเมแทบอลิซึมเกิดขึ้นเร็ว (53) การที่อาสาสมัครกลุ่ม slow metabolizers มีค่าเฉลี่ย 3HC/COT ratio ในพลาสมาน้อยกว่ากลุ่ม normal metabolizers เนื่องจากมีอัตราการเมแทบอลิซึม nicotine ไปเป็นเมแทบอลิต์ช้า ส่งผลให้มีระดับ nicotine ในพลาสมาสูงหลังจากได้รับนิโคตินทดแทน เช่น หมากฝรั่งนิโคติน หรือแผ่นแปะนิโคติน (54) เช่นเดียวกับการศึกษาก่อนหน้านี้โดย Mwenifumbo และคณะ (2) ได้ศึกษาถึงการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 กับ 3HC/COT ratio ในชาวอเมริกันผิวดำ พบว่าค่าเฉลี่ยของ 3HC/COT ratio ในกลุ่ม normal metabolizers มีค่ามากกว่ากลุ่ม slow metabolizers เนื่องจากกลุ่ม normal metabolizers มีอัตราการเมแทบอลิซึม nicotine เกิดขึ้นได้เร็ว ทำให้เกิดเมแทบอลิต์ ได้แก่ cotinine และ *trans*-3'-hydroxycotinine ได้เร็วกว่า นอกจากนี้ยังพบว่าทั้ง cotinine และ *trans*-3'-hydroxycotinine มีครึ่งชีวิตที่ยาวนาน โดย cotinine มีครึ่งชีวิตประมาณ 16 ชั่วโมง และ *trans*-3'-hydroxycotinine มีครึ่งชีวิตประมาณ 5 ชั่วโมง ด้วยเหตุผลนี้จึงทำให้ 3HC/COT ratio ที่เกิดขึ้นมีความเสถียรเมื่อเวลาผ่านไป

จากการรายงานก่อนหน้านี้โดย Malaiyandi และคณะ (55) พบว่าอาสาสมัครสูบบุหรี่ชาวคอเคเซียนในกลุ่มที่มีการทำงานแบบ slow metabolizers มีค่าเฉลี่ย 3HC/COT ratio น้อยกว่ากลุ่ม normal metabolizers อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) โดยค่าเฉลี่ยของ 3HC/COT ratio ในกลุ่ม normal metabolizers เท่ากับ 0.45 ± 0.22 ng/ml และ slow metabolizers เท่ากับ 0.23 ± 0.17 ng/ml เช่นเดียวกับการศึกษาของ Swan และคณะ (5) พบค่าเฉลี่ยของ 3HC/COT ratio ในอาสาสมัครฝาแฝดชาวคอเคเซียนกลุ่ม normal metabolizers (0.26 ± 0.01 ng/ml) มีค่ามากกว่ากลุ่ม slow metabolizers (0.16 ± 0.02 ng/ml) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.0009$)

จากการศึกษาผลของการทำงานของเอนไซม์ที่กล่าวมาแล้วข้างต้น เห็นได้ว่าคุณค่าเฉลี่ย 3HC/COT ratio ในกลุ่ม normal metabolizers มีค่ามากกว่ากลุ่ม slow metabolizers แต่การศึกษาของเรา มีแนวโน้มว่ากลุ่ม normal metabolizers จะมีค่าเฉลี่ย 3HC/COT ratio มากกว่ากลุ่ม slow metabolizers ปัจจัยที่อาจมีผลต่อ 3HC/COT ratio ในการศึกษาของเรา คือ จำนวนอาสาสมัครในการศึกษาครั้งนี้อาจน้อยเกินไป และกลุ่ม slow metabolizers ประกอบด้วยจีโนไทป์หลายรูปแบบ ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดความแปรปรวนของการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ค่อนข้างมาก ซึ่งปัจจัยเหล่านี้อาจส่งผลต่อค่า 3HC/COT ratio ที่ไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นที่มีผลต่อ 3HC/COT ratio ได้แก่ เพศ, อายุ และ BMI ของอาสาสมัคร พบว่าเพศหญิง, ผู้สูงอายุ (60-77 ปี) และผู้ที่มี BMI ต่ำ (<29.7 kg/m²) จะมีค่า 3HC/COT ratio ที่เพิ่มขึ้น และผู้ที่สูบบุหรี่ที่มีเมทอล (menthol) เป็นส่วนประกอบ ทำให้มีค่า 3HC/COT ratio ลดลง (21)

5.5 ปริมาณการสะสมของ nicotine และ cotinine ในเส้นผมของอาสาสมัครที่สูบบุหรี่

พบว่าอาสาสมัครแต่ละคนมีระดับ nicotine และ cotinine แตกต่างกัน โดยผลการศึกษาครั้งนี้ พบว่าในกลุ่ม normal metabolizers มีค่าเฉลี่ยของการสะสม nicotine และ cotinine ในเส้นผม เท่ากับ 16.24 ± 4.28 ng/mg และ 2.23 ± 0.84 ng/mg ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่ม slow metabolizers มีค่าเฉลี่ยของการสะสม nicotine และ cotinine ในเส้นผมเท่ากับ 12.15 ± 6.53 ng/mg และ 2.15 ± 1.40 ng/mg จากผลข้างต้นจะเห็นได้ว่าในกลุ่ม normal metabolizers มีแนวโน้มที่ค่าเฉลี่ยของการสะสม nicotine และ cotinine มากกว่ากลุ่ม slow metabolizers (ตารางที่ 13)

จากการรายงานก่อนหน้านี้โดย Tzatzarakis และคณะ (6) พบว่าปริมาณการสะสมของระดับ nicotine และ cotinine ในเส้นผมของผู้สูบบุหรี่ มีค่าเฉลี่ยของ nicotine และ cotinine เท่ากับ 27.97 ± 22.32 ng/mg และ 1.16 ± 0.75 ng/mg ตามลำดับ เช่นเดียวกับการรายงานก่อนหน้านี้โดย Apelberg และคณะ (41) พบว่า การสะสม nicotine ในเส้นผมของผู้สูบบุหรี่มีระดับการสะสมมากกว่าผู้สูบบุหรี่ผิวขาว (37.8 ng/mg และ 5.7 ng/mg ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้มีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับสัมพันธภาพการสะสมของ nicotine พบว่าในผู้สูบบุหรี่ผิวดำที่มีเส้นผมสีดำนี้อาจมีปริมาณการสะสม nicotine มากกว่าผู้สูบบุหรี่ผิวขาว (65% และ 3% ตามลำดับ), ผู้สูบบุหรี่ผิวดำที่มีเส้นผมสีน้ำตาลมีปริมาณการสะสม nicotine น้อยกว่าผู้สูบบุหรี่ผิวขาว (32% และ 66% ตามลำดับ) และผู้สูบบุหรี่ผิวดำที่มีเส้นผมสีอ่อนๆ มีปริมาณการสะสม nicotine น้อยกว่าผู้สูบบุหรี่ผิวขาว (4% และ 31% ตามลำดับ) ซึ่งความแตกต่างระหว่างการสะสมของ nicotine และ cotinine ในเส้นผมของผู้สูบบุหรี่ผิวดำและผู้สูบบุหรี่ผิวขาวนั้น อาจเกิดจากความแตกต่างทางพันธุกรรม โดยผู้สูบบุหรี่ผิวดำมีแนวโน้มที่มีอัตราการเผาผลาญเกิดขึ้นได้ช้ากว่าผู้สูบบุหรี่ผิวขาว จึงส่งผลให้มีระดับของ nicotine ในร่างกายมากกว่า (9) นอกจากนี้การสัมผัสกับควันบุหรี่ (secondhand smoke) ก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อปริมาณการสะสมของ nicotine ในเส้นผม พบว่าผู้สูบบุหรี่ผิวดำที่มีการสัมผัสกับควันบุหรี่ มีระดับการสะสมของ nicotine ในเส้นผมมากกว่าผู้สูบบุหรี่ผิวขาวมีการสัมผัสกับควันบุหรี่ (89% และ 58% ตามลำดับ) นอกจากนี้ยังพบว่าการสัมผัสกับควันบุหรี่ของเด็กอายุน้อยกว่า 3 ปีที่มีแม่สูบบุหรี่และไม่สูบบุหรี่มีความสัมพันธ์กัน ซึ่งเด็กที่มีแม่สูบบุหรี่มีปริมาณการสะสม cotinine ในเส้นผมมากกว่าเด็กที่แม่ไม่สูบบุหรี่ (1.92 ng/mg และ 0.35 ng/mg ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) (40)

ผลการศึกษาก่อนหน้านี้ ส่วนใหญ่เน้นไปที่ผลของปริมาณการสูบบุหรี่และการสัมผัสกับควันบุหรี่ต่อการสะสมของ nicotine และ cotinine ในเส้นผม แต่ยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของความแตกต่างทางพันธุกรรมกับปริมาณการสะสมของ nicotine และ cotinine ในเส้นผม การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาแรกที่พบว่า การสะสมของ nicotine และ cotinine ในเส้นผมไม่มีความสัมพันธ์กับความแตกต่างทางพันธุกรรมของ CYP2A6 เนื่องจากในกลุ่ม normal metabolizers มีอัตราการเผาผลาญเร็ว ทำให้ nicotine ถูกเปลี่ยนไปเป็นเมแทบอไลต์ได้ไวขึ้น ส่งผลให้ระดับ nicotine ในร่างกายลดลง ดังนั้นจึงต้องมีการสูบบุหรี่เข้าไปเพื่อคงระดับนิโคตินในเลือด การที่มี nicotine เข้าสู่ร่างกายเนื่องจากการสูบบุหรี่จำนวนมาก จึงไปมีผลต่อการสะสมในเส้นผมมากตามไปด้วย ในทำนอง

เดียวกัน เมื่อมีอัตราเมแทบอลิซึมเร็ว เมแทบอลิต์ที่เกิดขึ้น คือ cotinine ก็มีมากตามไปด้วย จึงส่งผลให้ในกลุ่ม normal metabolizers พบการสะสมของระดับ cotinine ในเส้นผมมากกว่ากลุ่ม slow metabolizers ได้ (ตารางที่ 13) อย่างไรก็ตามก็อาจมีบางคนอาจไม่ได้รับ nicotine มาจากการสูบบุหรี่เพียงอย่างเดียว ปริมาณการสะสมที่เกิดขึ้นนั้น อาจเกิดจากการได้รับควันบุหรี่จากผู้อื่น ซึ่งในแต่ละคนก็มีความเป็นไปได้สูงว่าจะได้รับ nicotine ในปริมาณไม่เท่ากัน การแก้ไขข้อจำกัดนี้ควรมีการเพิ่มเกณฑ์ในการคัดเลือกอาสาสมัคร เช่น สอบถามถึงจำนวนมวนของการสูบบุหรี่ในปัจจุบัน หรือจำนวนครั้งในการสัมผัสกับควันบุหรี่ แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาในครั้งนี้สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางสำหรับดูการใช้สารเสพติดชนิดอื่นๆ ย้อนหลังได้นานเป็นสัปดาห์หรือเป็นเดือน ขึ้นอยู่กับความยาวของเส้นผม ซึ่งแตกต่างจากการตรวจวัดในเลือด เนื่องจากการใช้เลือดสามารถตรวจการใช้สารเสพติดในขณะนั้นไม่สามารถตรวจการใช้อย้อนหลังได้ และการตรวจโดยใช้เส้นผมยังมีข้อดีคือ เป็นการตรวจแบบ non-invasive คือ เป็นการตรวจแบบไม่ต้องเจ็บตัวและไม่มีอันตรายต่อร่างกาย (7)

5.6 สรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกเกี่ยวกับเภสัชจลนศาสตร์ของ nicotine, ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 โดยใช้ค่า 3HC/COT ratio และศึกษาการสะสมของเมแทบอลิต์ของ nicotine ในเส้นผมของอาสาสมัครคนไทยที่สูบบุหรี่ โดยการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความแตกต่างทางพันธุกรรมของ CYP2A6 กับเภสัชจลนศาสตร์ของ nicotine และระดับการสะสมของ nicotine และ cotinine ในเส้นผม ผลของการศึกษาพบว่าอาสาสมัครสูบบุหรี่ที่มาตรวจสุขภาพ ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ มีจีโนไทป์เป็นแบบ CYP2A6*1A/*1A มากที่สุด ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มที่มีการทำงานของเอนไซม์แบบ normal metabolizers

จากการศึกษาเกี่ยวกับเภสัชจลนศาสตร์ของ nicotine ระหว่างกลุ่ม normal metabolizers และ slow metabolizers พบว่าระดับเฉลี่ย nicotine ในพลาสมาของอาสาสมัครในกลุ่ม slow metabolizers มีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่ม normal metabolizers และมีแนวโน้มที่จะมีความสอดคล้องกับค่า 3HC/COT ratio ที่ต่ำกว่ากลุ่ม normal metabolizers นอกจากนี้พบว่าค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ของ nicotine ได้แก่ C_{max} , AUC_{0-6} และ AUC_{0-inf} ระหว่างกลุ่ม normal

metabolizers และ slow metabolizers ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่พบค่า T_{max} และ $t_{1/2}$ ของ nicotine ในกลุ่ม normal metabolizers ต่ำกว่ากลุ่ม slow metabolizers ($P = 0.019$ และ $P = 0.024$) ส่วนค่า Kel สูงกว่า ($P = 0.024$) สรุปได้ว่าในการศึกษานี้มีแนวโน้มที่เภสัชจลนศาสตร์ของ nicotine จะสัมพันธ์กับความแตกต่างทางพันธุกรรมของเอนไซม์ CYP2A6

จากการศึกษาการสะสมของระดับ nicotine และ cotinine ในเส้นผม พบว่าในกลุ่ม normal metabolizers มีแนวโน้มที่จะมีการสะสมของ nicotine และ cotinine ในเส้นผมมากกว่ากลุ่ม slow metabolizers ซึ่งไม่เป็นไปตามสมมติฐานที่ตั้งไว้ สรุปได้ว่าการสะสมของระดับ nicotine และ cotinine ในเส้นผมไม่มีความสัมพันธ์กับความแตกต่างทางพันธุกรรมของเอนไซม์ CYP2A6



รายการอ้างอิง

1. Organization WH. WHO global report on trends in prevalence of tobacco smoking 2015. 2015.
2. Mwenifumbo JC, Sellers EM, Tyndale RF. Nicotine metabolism and CYP2A6 activity in a population of black African descent: impact of gender and light smoking. *Drug Alcohol Depend.* 2007;89(1):24-33.
3. Benowitz NL, Hukkanen J, Jacob P, 3rd. Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers. *Handb Exp Pharmacol.* 2009(192):29-60.
4. Mahavorasirikul W, Tassaneeyakul W, Satarug S, Reungweerayut R, Na-Bangchang C, Na-Bangchang K. CYP2A6 genotypes and coumarin-oxidation phenotypes in a Thai population and their relationship to tobacco smoking. *Eur J Clin Pharmacol.* 2009;65(4):377-384.
5. Swan GE, Lessov-Schlaggar CN, Bergen AW, He Y, Tyndale RF, Benowitz NL. Genetic and environmental influences on the ratio of 3'hydroxycotinine to cotinine in plasma and urine. *Pharmacogenet Genomics.* 2009;19(5):388-398.
6. Tzatzarakis MN, Vardavas CI, Terzi I, Kavalakis M, Kokkinakis M, Liesivuori J, et al. Hair nicotine/cotinine concentrations as a method of monitoring exposure to tobacco smoke among infants and adults. *Hum Exp Toxicol.* 2012;31(3):258-265.
7. Al-Delaimy WK. Hair as a biomarker for exposure to tobacco smoke. *Tob Control.* 2002;11(3):176-182.
8. Hoffmann D, Hoffmann I. The Changing Cigarette: Chemical Studies and Bioassays. *J Toxicol Environ Health.* 1997;50(4):307-364.
9. Benowitz NL. Clinical pharmacology of nicotine: implications for understanding, preventing, and treating tobacco addiction. *Clin Pharmacol Ther.* 2008;83(4):531-541.

10. Benowitz NL. Nicotine addiction. *N Engl J Med*. 2010;362(24):2295-2303.
11. Jorenby DE, Hatsukami DK, Smith SS, Fiore MC, Allen S, Jensen J, et al. Characterization of tobacco withdrawal symptoms: transdermal nicotine reduces hunger and weight gain. *Psychopharmacology*. 1996;128(2):130-138.
12. Changeux JP. Nicotine addiction and nicotinic receptors: lessons from genetically modified mice. *Nat Rev Neurosci*. 2010;11(6):389-401.
13. Jensen AA, Frolund B, Liljefors T, Krogsgaard-Larsen P. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: structural revelations, target identifications, and therapeutic inspirations. *J Med Chem*. 2005;48(15):4705-4745.
14. Svensson CK. Clinical Pharmacokinetics of Nicotine. *clinical Pharmacokinetics*. 1987;12:30-40.
15. Yildiz D. Nicotine, its metabolism and an overview of its biological effects. *Toxicol*. 2004;43(6):619-632.
16. Eliopoulos C, Klein J, Koren G. Validation of self-reported smoking by analysis of hair for nicotine and cotinine. *Ther Drug Monit*. 1996;18(5):532-536.
17. Scheidweiler KB, Cone EJ, Moolchan ET, Huestis MA. Dose-related distribution of codeine, cocaine, and metabolites into human hair following controlled oral codeine and subcutaneous cocaine administration. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;313(2):909-915.
18. Oscarson M. Genetic polymorphisms in the cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) gene: implications for interindividual differences in nicotine metabolism. *Drug Metab Dispos*. 2001;29(2):91-95.
19. Tutka P, Mosiewicz J, Wielosz M. Pharmacokinetics and metabolism of nicotine. *Pharmacol Rep*. 2005;57(2):143-153.

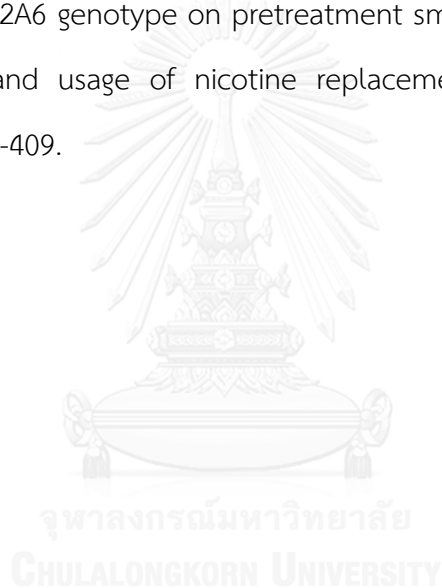
20. Lea RA, Dickson S, Benowitz NL. Within-subject variation of the salivary 3HC/COT ratio in regular daily smokers: prospects for estimating CYP2A6 enzyme activity in large-scale surveys of nicotine metabolic rate. *J Anal Toxicol.* 2006;30(6):386-389.
21. Ho MK, Mwenifumbo JC, Al Koudsi N, Okuyemi KS, Ahluwalia JS, Benowitz NL, et al. Association of nicotine metabolite ratio and CYP2A6 genotype with smoking cessation treatment in African-American light smokers. *Clin Pharmacol Ther.* 2009;85(6):635-643.
22. Dempsey D, Tutka P, Jacob P, 3rd, Allen F, Schoedel K, Tyndale RF, et al. Nicotine metabolite ratio as an index of cytochrome P450 2A6 metabolic activity. *Clin Pharmacol Ther.* 2004;76(1):64-72.
23. Guengerich FP, Wu ZL, Bartleson CJ. Function of human cytochrome P450s: characterization of the orphans. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;338(1):465-469.
24. Benowitz NL, Weitzman M, Rosenthal DG. Nicotine Addiction: Mechanisms and Consequences. *International Journal of Mental Health.* 2011;40(1):22-38.
25. Nebert DW, Russell DW. Clinical importance of the cytochromes P450. *The Lancet.* 2002;360(9340):1155-1162.
26. Bibi Z. Role of cytochrome P450 in drug interactions. *Nutr Metab (Lond).* 2008;5:1-10.
27. Jun-Tack Kwona, Miki Nakajima, Seok Chai, Yoon-Ki Yom, Hyung-Kee Kim, Hiroshi Yamazaki, et al. Nicotine metabolism and CYP2A6 allele frequencies in Koreans. *Pharmacogenetics.* 2001;11:317-323.
28. Rachel Tyndale, Vainio H. Significance of polymorphisms in CYP2A6 gene. *Department of Pharmacology and Toxicology.* 2000:1-84.

29. Malaiyandi V, Goodz SD, Sellers EM, Tyndale RF. CYP2A6 genotype, phenotype, and the use of nicotine metabolites as biomarkers during ad libitum smoking. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15(10):1812-1819.
30. Raunio H, Rautio A, Gullsten H, Pelkonen O. Polymorphisms of CYP2A6 and its practical consequences. *Br J Clin Pharmacol.* 2001;52(4):357-363.
31. Peamkrasatam S, Sriwatanakul K, Kiyotani K, Fujieda M, Yamazaki H, Kamataki T, et al. In vivo evaluation of coumarin and nicotine as probe drugs to predict the metabolic capacity of CYP2A6 due to genetic polymorphism in Thais. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2006;21(6):475-484.
32. Fukami T, Nakajima M, Sakai H, McLeod HL, Yokoi T. CYP2A7 polymorphic alleles confound the genotyping of CYP2A6*4A allele. *Pharmacogenomics J.* 2006;6(6):401-412.
33. Muliaty D, Yusuf I, Setiabudy R, Wanandi SI. CYP2A6 gene polymorphisms impact to nicotine metabolism. *Medical Journal of Indonesia.* 2010;19:46-51.
34. Apinan R, Tassaneeyakul W, Mahavorasirikul W, Satarug S, Kajanawart S, Vannaprasaht S, et al. The influence of CYP2A6 polymorphisms and cadmium on nicotine metabolism in Thai population. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2009;28(3):420-424.
35. Liu T, David SP, Tyndale RF, Wang H, Zhou Q, Ding P, et al. Associations of CYP2A6 genotype with smoking behaviors in southern China. *Addiction.* 2011;106(5):985-994.
36. Nakajima M, Kwon JT, Tanaka N, Zenta T, Yamamoto Y, Yamamoto H, et al. Relationship between interindividual differences in nicotine metabolism and CYP2A6 genetic polymorphism in humans. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;69(1):72-78.

37. Malaiyandi V, Sellers EM, Tyndale RF. Implications of CYP2A6 genetic variation for smoking behaviors and nicotine dependence. *Clin Pharmacol Ther.* 2005;77(3):145-158.
38. Emamghoreishi M, Bokaei HR, Keshavarz M, Ghaderi A, Tyndale RF. CYP2A6 allele frequencies in an Iranian population. *Arch Iran Med.* 2008;11(6):613-617.
39. Haley NJ, Hoffmann D. Analysis for nicotine and cotinine in hair to determine cigarette smoker status. *Clin Chem.* 1985;31(10):1598-1600.
40. Groner J, Wadwa P, Hoshaw-Woodard S, Hayes J, Klein J, Koren G, et al. Active and passive tobacco smoke exposure: a comparison of maternal and child hair cotinine levels. *Nicotine Tob Res.* 2004;6(5):789-795.
41. Apelberg BJ, Hepp LM, Avila-Tang E, Kim S, Madsen C, Ma J, et al. Racial differences in hair nicotine concentrations among smokers. *Nicotine Tob Res.* 2012;14(8):933-941.
42. Muhammad-Kah RS, Hayden AD, Liang Q, Frost-Pineda K, Sarkar M. The relationship between nicotine dependence scores and biomarkers of exposure in adult cigarette smokers. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2011;60(1):79-83.
43. Ariyoshi N, Takahashi Y, Miyamoto M, Umetsu Y, Daigo S, Tateishi T, et al. Structural characterization of a new variant of the CYP2A6 gene (CYP2A6*1B) apparently diagnosed as heterozygotes of CYP2A6*1A and CYP2A6*4C. *Pharmacogenetics.* 2000;10(8):687-693.
44. Heravi RE, Ramezani M, Behravan J. Association between nicotine metabolism and CYP2A6*1 and CYP2A6*4 genotypes in an Iranian population. *DNA Cell Biol.* 2010;29(7):369-373.

45. Ghosheh OA, Browne D, Rogers T, de Leon J, Dwoskin LP, Crooks PA. A simple high performance liquid chromatographic method for the quantification of total cotinine, total 3'-hydroxycotinine and caffeine in the plasma of smokers. *J Pharm Biomed Anal.* 2000;23(2-3):543-549.
46. Zimmer D. New US FDA draft guidance on bioanalytical method validation versus current FDA and EMA guidelines: chromatographic methods and ISR. *Bioanalysis.* 2014;6(1):13-19.
47. Kim SR, Wipfli H, Avila-Tang E, Samet JM, Breysse PN. Method validation for measurement of hair nicotine level in nonsmokers. *Biomed Chromatogr.* 2009;23(3):273-279.
48. Ujjin P, Satarug S, Vanavanitkun Y, Daigo S, Ariyoshi N, Yamazaki H, et al. Variation in coumarin 7-hydroxylase activity associated with genetic polymorphism of cytochrome P450 2A6 and the body status of iron stores in adult Thai males and females. *Pharmacogenetics.* 2002;12(3):241-249.
49. Nakajima M, Yoshida R, Fukami T, McLeod HL, Yokoi T. Novel human CYP2A6 alleles confound gene deletion analysis. *FEBS Lett.* 2004;569(1-3):75-81.
50. Mwenifumbo JC, Lessov-Schlaggar CN, Zhou Q, Krasnow RE, Swan GE, Benowitz NL, et al. Identification of novel CYP2A6*1B variants: the CYP2A6*1B allele is associated with faster in vivo nicotine metabolism. *Clin Pharmacol Ther.* 2008;83(1):115-121.
51. Dempsey DA, St Helen G, Jacob P, 3rd, Tyndale RF, Benowitz NL. Genetic and pharmacokinetic determinants of response to transdermal nicotine in white, black, and Asian nonsmokers. *Clin Pharmacol Ther.* 2013;94(6):687-694.
52. Garg M, Naidu R, Iyer K, R J. Bioequivalence of Two Different Nicotine Chewing Gum Formulations of Two Different Strengths (2 mg and 4 mg) in Indian Healthy Adult Human Male Smoker Subjects. *Journal of Bioequivalence and Bioavailability.* 2016;8(2):74-79.

53. West O, Hajek P, McRobbie H. Systematic review of the relationship between the 3-hydroxycotinine/cotinine ratio and cigarette dependence. *Psychopharmacology (Berl)*. 2011;218(2):313-322.
54. Schnoll RA, Patterson F, Wileyto EP, Tyndale RF, Benowitz N, Lerman C. Nicotine metabolic rate predicts successful smoking cessation with transdermal nicotine: a validation study. *Pharmacol Biochem Behav*. 2009;92(1):6-11.
55. Malaiyandi V, Lerman C, Benowitz NL, Jepson C, Patterson F, Tyndale RF. Impact of CYP2A6 genotype on pretreatment smoking behaviour and nicotine levels from and usage of nicotine replacement therapy. *Mol Psychiatry*. 2006;11(4):400-409.



รายการอ้างอิง






ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก
ข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย

 <p>คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย</p>	<p>AF 10-04/4.0</p> <p>เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย (Information sheet for research participant)</p>
--	---

ชื่อโครงการวิจัย ความสัมพันธ์ระหว่างความแตกต่างทางพันธุกรรมของ CYP2A6 กับเภสัชจลนศาสตร์ของ นิโคตินและระดับนิโคตินเมแทบอไลต์ในเส้นผมของผู้สูบบุหรี่ที่มาตรวจสุขภาพ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

ผู้ทำวิจัย

ชื่อ นางสาวขวัญเรือน เพ็ชรน้อย
ที่อยู่ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
เบอร์โทรศัพท์ 085-2902606

ผู้วิจัยร่วม


ชื่อ อาจารย์แพทย์หญิง ดร.ปาจริย์ จรรย์วิลาศกุล
ที่อยู่ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
เบอร์โทรศัพท์ 02-2564481 ต่อ 3020, 081-6134664


ชื่อ รศ.สุพิชา วิทย์เลิศปัญญา
ที่อยู่ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
เบอร์โทรศัพท์ 02-2564481 ต่อ 3017, 081-4219164

ชื่อ อาจารย์ ดร.ณภัทรวรรต บัวทอง
ที่อยู่ ภาควิชาจิตเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
เบอร์โทรศัพท์ 02-2564346, 085-0990955

เรียน ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยทุกท่าน

ท่านได้รับเชิญให้เข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้เนื่องจากท่านผ่านการตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรมของ ยีนไซโตโครมที 450 (CYP2A6) จากโครงการวิจัยเรื่อง ระดับการคดนิโคติน ภาวะซึมเศร้า ภาวะวิตกกังวล และจีโนไทป์ CYP2A6 ในผู้สูบบุหรี่ที่มาตรวจสุขภาพ ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยท่านเป็นผู้ที่มีการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครมที 450 (CYP2A6) แบบปกติ (Normal metabolizer) หรือมีการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครมที 450 (CYP2A6) แบบต่ำกว่าปกติมาก (Poor metabolizer) อย่างใดอย่างหนึ่ง ก่อนที่ท่านจะตัดสินใจเข้าร่วมในการศึกษาวิจัยดังกล่าว ขอให้ท่านอ่านเอกสารฉบับนี้อย่างถี่ถ้วน เพื่อให้ท่านได้ทราบถึง

	<p>INSTITUTIONAL REVIEW BOARD</p> <p>Faculty of Medicine, Chulalongkorn University</p> <p>IRB No. 085 / 53</p> <p>Date of Approval 21 เม.ย. 2558</p>
---	--

 <p>คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย</p>	<p style="text-align: right;">AF 10-04/4.0</p> <p style="text-align: center;">เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย (Information sheet for research participant)</p>
--	--

เหตุผลและรายละเอียดของการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ หากท่านมีข้อสงสัยใดๆ เพิ่มเติม กรุณาซักถามจากทีมงานของแพทย์ผู้ทำวิจัย ซึ่งจะเป็นผู้สามารถตอบคำถามและให้ความกระจ่างแก่ท่านได้

ท่านสามารถขอคำแนะนำในการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้จากครอบครัว เพื่อน หรือแพทย์ประจำตัวของท่านได้ ท่านมีเวลาอย่างเพียงพอในการตัดสินใจโดยอิสระ ถ้าท่านตัดสินใจแล้วว่า จะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ขอให้ท่านลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมของโครงการวิจัยนี้

เหตุผลความเป็นมา

นิโคติน (Nicotine) เป็นสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในบุหรี่ มีลักษณะคล้ายน้ำมัน ไม่มีสี และละลายได้ในน้ำ โดยนิโคตินส่วนใหญ่ถูกดูดซึมผ่านทางเยื่อของปากและถุงลมปอด เมื่อนิโคตินถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกาย จะถูกเปลี่ยนแปลงที่ตับโดยเอนไซม์ไซโตโครมที่ 450 (CYP2A6) ทำให้ได้สารทั้งที่มีฤทธิ์และไม่มีฤทธิ์อย่างรวดเร็ว โดยพบเมแทบอไลต์คือ โคทีนีน (cotinine) มากที่สุดประมาณ 90% ของเมแทบอไลต์ทั้งหมด และทรานไฮดรอกซีโคทีนีน (*trans*-3'-hydroxycotinine) อีกประมาณ 40% ซึ่งมีผลโดยตรงต่อพฤติกรรมกรรมการสูบบุหรี่ ในแต่ละคนพบว่ากระบวนการเปลี่ยนแปลงนิโคตินผ่านทางเอนไซม์ไซโตโครมที่ 450 (CYP2A6) มีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครมที่ 450 (CYP2A6) ในคนที่มีการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครมที่ 450 (CYP2A6) แบบต่ำกว่าปกติมาก มีแนวโน้มที่จะสูบบุหรี่ต่อวันน้อยกว่าคนที่มีการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครมที่ 450 (CYP2A6) แบบปกติ เนื่องจากกระบวนการเปลี่ยนแปลงนิโคตินในร่างกายเกิดขึ้นได้ช้า แสดงโดยค่าอัตราส่วนระหว่างทรานไฮดรอกซีโคทีนีนต่อโคทีนีน (*trans*-3'-hydroxycotinine/cotinine (3HC/COT) ratio) ซึ่งค่านี้เป็นค่าที่ใช้บ่งบอกถึงการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครมที่ 450 (CYP2A6) โดยคนที่มีการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครมที่ 450 (CYP2A6) แบบต่ำกว่าปกติมากจะมีค่าอัตราส่วนระหว่างทรานไฮดรอกซีโคทีนีนต่อโคทีนีน (3HC/COT ratio) ในเลือดต่ำกว่าคนที่มีการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครมที่ 450 (CYP2A6) แบบปกติ รวมถึงมีโอกาสในการเลิกสูบบุหรี่ได้ง่ายกว่าด้วย

นอกจากนิโคตินและโคทีนีนสามารถตรวจวิเคราะห์ได้จากเลือด ปัสสาวะ และน้ำลายแล้ว เส้นผมเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถตรวจวัดได้เช่นกัน เนื่องจากเส้นผมเป็นบริเวณที่นิโคตินและโคทีนีนกระจายไปถึงและสามารถใช้บ่งบอกถึงการสะสมของนิโคตินได้นานเป็นสัปดาห์หรือเดือนขึ้นอยู่กับความยาวของเส้นผม

อย่างไรก็ตาม ในประเทศไทยยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของ CYP2A6 ต่อเภสัชจลนศาสตร์ของนิโคติน และระดับนิโคตินเมแทบอไลต์ในเส้นผมของผู้สูบบุหรี่ ดังนั้นหากทราบข้อมูลดังกล่าวสามารถนำมาใช้เป็นแนวทางในการลดการสูบบุหรี่ในผู้ที่มีความต้องการเลิกบุหรี่ด้วยวิธีการต่างๆ เช่น หารสารจากธรรมชาติที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครมที่ 450 (CYP2A6) เพื่อช่วยยกระดับของนิโคตินในร่างกายให้มีความเหมาะสมของแต่ละบุคคล เพื่อช่วยยกระดับของนิโคตินในร่างกาย ซึ่งอาจส่งผลให้



INSTITUTIONAL REVIEW BOARD	
Faculty of Medicine, Chulalongkorn University	
IRB No. 085	58
Date of Approval	21 เม.ย. 2558



คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

AF 10-04/4.0

เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย
(Information sheet for research participant)

มีการสูบบุหรี่ลดลง และลดระดับความเสี่ยงในการเกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินหายใจรวมถึงโรคที่มีความเกี่ยวข้องกับการสูบบุหรี่ในผู้สูบบุหรี่ได้

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความแตกต่างทางพันธุกรรมของยีนไซโตโครมพี 450 (CYP2A6) กับเภสัชจลนศาสตร์ของนิโคตินและระดับของนิโคตินและโคทีนีนในเส้นผม

วิธีการที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย

ท่านเป็นผู้ที่มีการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครมพี 450 (CYP2A6) แบบปกติ หรือมีการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครมพี 450 (CYP2A6) แบบต่ำกว่าปกติมาอย่างใดอย่างหนึ่งจากโครงการวิจัยเรื่อง ระดับการติดนิโคติน ภาวะซึมเศร้า ภาวะวิตกกังวล และจีโนไทป์ CYP2A6 ในผู้สูบบุหรี่ที่มาตรวจสุขภาพ ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ หลังจากท่านให้ความยินยอมที่จะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยจะขอเก็บข้อมูลพื้นฐานของท่านที่สอดคล้องกับโครงการวิจัย ได้แก่ ความยาวของเส้นผมจากหนังศีรษะ และท่านต้องไม่มีประวัติรับประทานยาหรืออาหารที่มีฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำหรือยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครมพี 450 (CYP2A6) ทั้งหมดนี้เพื่อพิจารณาว่าท่านมีคุณสมบัติที่เหมาะสมที่จะเข้าร่วมในการวิจัย

หากท่านมีคุณสมบัติตามเกณฑ์คัดเข้า ผู้วิจัยจะขอเก็บตัวอย่างเส้นผมของท่านจากโคนผมบริเวณด้านหลังศีรษะจำนวน 100 มิลลิกรัม และมีเส้นผ่านศูนย์กลางของกระจุกเส้นผมราว 0.5 เซนติเมตรเพื่อวัดระดับนิโคตินและโคทีนีนในเส้นผม ทำการเก็บตัวอย่างเส้นผมโดยใช้แผ่นพลาสติกขนาดความยาว 15 เซนติเมตร กว้าง 5 เซนติเมตร และมีเส้นสีแดงห่างจากขอบของแผ่นพลาสติก 1 เซนติเมตร วิธีการเก็บคือ ใช้มือเปิดผมของอาสาสมัครบริเวณด้านหลังศีรษะ จากนั้นนำแผ่นพลาสติกที่เตรียมไว้วางลงบนเส้นผมโดยวางให้ชิดกับโคนผมและใช้กรรไกรตัดเส้นผมตรงบริเวณเส้นสีแดงบนแผ่นพลาสติก จากนั้นเก็บตัวอย่างเส้นผมลงในถุงพลาสติก และเก็บไว้ที่ลบ 80 องศาเซลเซียสจนกระทั่งนำมาวิเคราะห์ผล หลังจากนั้นท่านจะได้รับหมากฝรั่งนิโคตินขนาด 2 มิลลิกรัม และผู้วิจัยจะขอเก็บตัวอย่างเลือดของท่านโดยเจ้าหน้าที่ผู้ชำนาญในการเก็บตัวอย่างเลือดก่อนและหลังได้รับหมากฝรั่งนิโคตินตามช่วงเวลาดังนี้

- เก็บตัวอย่างเลือดปริมาตร 3 มิลลิลิตร (มากกว่าครึ่งช้อนชา) ที่เวลา 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180 และ 270 นาที เพื่อนำไปวัดเภสัชจลนศาสตร์ของนิโคติน ได้แก่ ระดับยาสูงสุดในพลาสมา (C_{max}) เวลาที่ระดับยาในพลาสมา มีค่าสูงสุด (T_{max}) และความสัมพันธ์ของพื้นที่ใต้กราฟระหว่างความเข้มข้นของนิโคตินกับเวลา (AUC_{0-270}) และที่เวลา 0, 60, 120 และ 270 นาที ขอเก็บตัวอย่างเลือดเพิ่มปริมาตร 3 มิลลิลิตร (มากกว่าครึ่งช้อนชา) เพื่อวัดระดับนิโคติน, โคทีนีน และทรานสโคโรนิกโคทีนีน




INSTITUTIONAL REVIEW BOARD

Faculty of Medicine, Chulalongkorn University

IRB No. 039 / 58

Date of Approval 21 เม.ย. 2558

 <p>คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย</p>	<p style="text-align: right;">AF 10-04/4.0</p> <p style="text-align: center;">เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย (Information sheet for research participant)</p>
--	--

ปริมาณเลือดก่อนได้รับหมากฝรั่งนิโคตินคือ 6 มิลลิเมตร (มากกว่าหนึ่งซ็อนซา) และหลังจากได้รับหมากฝรั่งนิโคตินคือ 33 มิลลิเมตร (มากกว่าหกซ็อนซา) รวมปริมาณเลือดตลอดการวิจัยคือ 39 มิลลิเมตร (เท่ากับแปดซ็อนซา) เมื่อเสร็จสิ้นการวิจัยแล้ว เมื่อตรวจวิเคราะห์เสร็จ ผู้วิจัยขอเก็บตัวอย่างชีวภาพที่เหลือไว้เพื่อการวิจัยในอนาคต และท่านจะเข้าร่วมโครงการวิจัยเป็นเวลาทั้งหมด 1 วัน

ความรับผิดชอบของอาสาสมัครผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย

เพื่อให้งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จ ผู้ทำวิจัยใคร่ขอความความร่วมมือจากท่าน โดยจะขอให้ท่านปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ทำวิจัยอย่างเคร่งครัด รวมทั้งแจ้งอาการผิดปกติต่างๆ ที่เกิดขึ้นกับท่านระหว่างที่ท่านเข้าร่วมในโครงการวิจัยให้ผู้ทำวิจัยได้รับทราบ

เพื่อความปลอดภัย ท่านไม่ควรใช้วักซิน หรือรับประทานยาอื่น จากการจ่ายยาโดยแพทย์อื่นหรือซื้อยาจากร้านขายยา ขอให้ท่านปรึกษาผู้ทำวิจัย ทั้งนี้เนื่องจากวักซิน หรือยาดังกล่าวอาจมีผลต่อหมากฝรั่งนิโคตินที่ท่านได้รับจากผู้ทำวิจัย ดังนั้นขอให้ท่านแจ้งผู้ทำวิจัยเกี่ยวกับยาที่ท่านได้รับในระหว่างที่ท่านอยู่ในโครงการวิจัย

ความเสี่ยงที่อาจได้รับ

อาจมีความเสี่ยงต่ออาสาสมัคร เช่น เสียเวลา ไม่สะดวก ไม่สบาย สูญเสียรายได้ รวมถึงความเสี่ยงต่อร่างกาย ผู้ทำวิจัยขอชี้แจงถึงความเสี่ยงและความไม่สบายที่อาจเกิดขึ้นดังนี้

มีข้อมูลที่แสดงว่าหมากฝรั่งนิโคติน อาจมีผลข้างเคียงได้บ้าง ได้แก่ เจ็บช่องปากและระคายเคืองบริเวณที่อม ปวดกราม ปากแห้ง แสบคอ แสบท้อง แสบยอดอก คลื่นไส้ เรอ สะอึก และท้องเสีย รวมถึงอาจมีอาการข้างเคียงและความไม่สบายที่ยังไม่ถูกรายงานด้วย ดังนั้นระหว่างที่อยู่ในโครงการวิจัยจะมีการติดตามดูแลสุขภาพของท่านอย่างใกล้ชิด กรุณาแจ้งผู้ทำวิจัยในกรณีที่พบอาการดังกล่าวข้างต้น หรืออาการอื่นๆ ที่พบร่วมด้วย ระหว่างที่อยู่ในโครงการวิจัย ถ้ามีการเปลี่ยนแปลงเกี่ยวกับสุขภาพของท่านขอให้ท่านรายงานให้ผู้ทำวิจัยทราบโดยเร็ว


หากท่านมีข้อสงสัยใด ๆ เกี่ยวกับความเสี่ยงที่อาจได้รับจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัยท่านสามารถสอบถามจากแพทย์ผู้ทำวิจัยได้ตลอดเวลา

ความเสี่ยงที่ได้รับจากการเจาะเลือด

ท่านอาจได้รับความเสี่ยงเพียงเล็กน้อยจากการเจ็บเนื่องจากการเจาะเลือด ข้าจากการเจาะเลือด อาการบวมบริเวณที่เจาะเลือดหรือหน้ามืด และมีโอกาสที่จะเกิดการติดเชื้อบริเวณที่เจาะเลือดพบได้น้อยมาก



INSTITUTIONAL REVIEW BOARD	
Faculty of Medicine, Chulalongkorn University	
IRB No. 015	58
Date of Approval	21 เม.ย. 2558

 <p>คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย</p>	<p style="text-align: right;">AF 10-04/4.0</p> <p style="text-align: center;">เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย (Information sheet for research participant)</p>
--	--

หากท่านมีข้อสงสัยใดๆ เกี่ยวกับความเสี่ยงที่อาจได้รับการเข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านสามารถสอบถามจากผู้วิจัยได้ตลอด 24 ชั่วโมง

ความเสี่ยงที่ไม่ทราบแน่นอน

ท่านอาจเกิดอาการข้างเคียง หรือความไม่สบาย นอกเหนือจากที่ได้แสดงในเอกสารฉบับนี้ ซึ่งอาการข้างเคียงเหล่านี้เป็นอาการที่ไม่เคยพบมาก่อน เพื่อความปลอดภัยของท่าน ควรแจ้งผู้ทำวิจัยให้ทราบทันทีเมื่อเกิดความผิดปกติใดๆ เกิดขึ้น

หากท่านมีข้อสงสัยใดๆ เกี่ยวกับความเสี่ยงที่อาจได้รับการเข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านสามารถสอบถามจากผู้ทำวิจัยได้ตลอดเวลา

หากมีการค้นพบข้อมูลใหม่ๆ ที่อาจมีผลต่อความปลอดภัยของท่านในระหว่างที่ท่านเข้าร่วมในโครงการวิจัย ผู้ทำวิจัยจะแจ้งให้ท่านทราบทันที เพื่อให้ท่านตัดสินใจว่าจะอยู่ในโครงการวิจัยต่อไปหรือจะขอถอนตัวออกจากโครงการวิจัย

ประโยชน์ที่อาจได้รับ

ท่านจะไม่ได้รับประโยชน์ใดๆ จากการเข้าร่วมในการวิจัยในครั้งนี้ แต่ผลการศึกษาที่ได้จะนำไปใช้เพื่อเป็นแนวทางในการวางแผนการรักษาสำหรับผู้ที่มีความต้องการเลิกสูบบุหรี่ โดยการใช้การรักษาด้วยวิธีการต่างๆ ที่เหมาะสมตามรายบุคคล และใช้เป็นแนวทางในการศึกษาเกี่ยวกับการเลิกสูบบุหรี่ในผู้ที่มีความต้องการเลิกสูบบุหรี่ต่อไปในอนาคต

วิธีการและรูปแบบการรักษาอื่นๆ ซึ่งมีอยู่สำหรับอาสาสมัคร

ท่านไม่จำเป็นต้องเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้เพื่อประโยชน์ในการรักษาโรคที่ท่านเป็นอยู่ เนื่องจากมีแนวทางการรักษาอื่นๆ หลายแบบสำหรับรักษาโรคของท่านได้ ดังนั้นจึงควรปรึกษาแนวทางการรักษาวิธีอื่นๆ กับแพทย์ผู้ให้การรักษาทันทีก่อนตัดสินใจเข้าร่วมในการวิจัย


ข้อปฏิบัติของท่านขณะที่ร่วมในโครงการวิจัย

ขอให้ท่านปฏิบัติดังนี้

- ขอให้ท่านให้ข้อมูลทางการแพทย์ของท่านทั้งในอดีต และปัจจุบัน แก่ผู้ทำวิจัยด้วยความสัตย์จริง
- ขอให้ท่านแจ้งให้ผู้ทำวิจัยทราบความผิดปกติที่เกิดขึ้นระหว่างที่ท่านร่วมในโครงการวิจัย
- ขอให้ท่านงดการใชยาอื่นนอกเหนือจากที่ผู้ทำวิจัยได้จัดให้ รวมถึงการรักษาอื่น ๆ เช่น การรักษาด้วยสมุนไพร การซื้อยาจากร้านขายยา



INSTITUTIONAL REVIEW BOARD	
Faculty of Medicine, Chulalongkorn University	
IRB No.	085 / 59
Date of Approval	21 เม.ย. 2559

 <p>คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย</p>	<p>AF 10-04/4.0</p> <p>เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย (Information sheet for research participant)</p>
--	---

- ขอให้ท่านแจ้งให้ผู้ทำวิจัยทราบทันที หากท่านได้รับยาอื่นนอกเหนือจากยาที่ใช้ในการศึกษา ตลอดระยะเวลาที่ท่านอยู่ในโครงการวิจัย

อันตรายที่อาจเกิดขึ้นจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัยและความรับผิดชอบของผู้ทำวิจัย/ผู้สนับสนุนการวิจัย

หากพบอันตรายที่เกิดขึ้นจากการวิจัย ท่านจะได้รับการรักษาโดยไม่เสียค่าใช้จ่าย และการลงนามในเอกสารให้ความยินยอม ไม่ได้หมายความว่าท่านได้สละสิทธิ์ทางกฎหมายตามปกติที่ท่านพึงมี

ในกรณีที่ท่านได้รับอันตรายใดๆ หรือต้องการข้อมูลเพิ่มเติมที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัย ท่านสามารถติดต่อกับผู้ทำวิจัยคือ นางสาวขวัญเรือน เพ็ชรน้อย ที่หมายเลขโทรศัพท์ 085-2902606 ได้ตลอด 24 ชั่วโมง

ค่าใช้จ่ายของท่านในการเข้าร่วมการวิจัย

ท่านจะได้รับหมากฝรั่งนิโคตินในโครงการวิจัยโดยไม่ต้องเสียค่าใช้จ่าย

ค่าตอบแทนสำหรับผู้เข้าร่วมวิจัย

ท่านจะไม่ได้รับเงินค่าตอบแทนจากการเข้าร่วมในการวิจัย แต่ท่านจะได้รับค่าเดินทางและเงินชดเชยการสูญเสียรายได้ หรือความไม่สะดวก ไม่สบาย ในการมาพบผู้วิจัยเพื่อเก็บตัวอย่างเส้นผมและตัวอย่างเลือด ท่านจะได้รับค่าเดินทางและเงินชดเชยการสูญเสียรายได้ หรือความไม่สะดวก ไม่สบาย ครั้งละ 1,500 บาท รวมทั้งหมด 1 ครั้ง

การเข้าร่วมและการสิ้นสุดการเข้าร่วมโครงการวิจัย

การเข้าร่วมในโครงการวิจัยครั้งนี้เป็นไปโดยความสมัครใจ หากท่านไม่สมัครใจจะเข้าร่วมการศึกษาแล้ว ท่านสามารถถอนตัวได้ตลอดเวลา การขอถอนตัวออกจากโครงการวิจัยจะไม่มีผลต่อการดูแลรักษาโรคของท่านแต่อย่างใด

ผู้ทำวิจัยอาจถอนท่านออกจากการเข้าร่วมการวิจัย เพื่อเหตุผลด้านความปลอดภัยของท่าน หรือเมื่อผู้สนับสนุนการวิจัยยุติการดำเนินงานวิจัย หรือ ในกรณีดังต่อไปนี้

- ท่านไม่สามารถปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ทำวิจัย
- ท่านรับประทานยาหรืออาหารที่ไม่อนุญาตให้ใช้ในการศึกษา
- ท่านตั้งครรถหรือให้หมูปุ่ระหว่างที่เข้าร่วมโครงการวิจัย
- ท่านเกิดการช้ำแข็ง หรือความผิดปกติของผลทางห้องปฏิบัติการจากการได้รับยาที่ใช้ในการศึกษา



INSTITUTIONAL REVIEW BOARD	
Faculty of Medicine, Chulalongkorn University	
IRB No. 095 / 58	Date of Approval 21 Jul 2558
Information Sheet - Nicotine, Version 2.0 Dated 05-04-15	



คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

AF 10-04/4.0

เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย
(Information sheet for research participant)

- ท่านแพทย์ที่ใช้ในการศึกษา
- ท่านต้องการปรับเปลี่ยนการรักษาด้วยยาตัวที่ไม่ได้รับอนุญาตจากการวิจัยครั้งนี้

การปกป้องรักษาข้อมูลความลับของอาสาสมัคร

ข้อมูลที่จะนำไปสู่การเปิดเผยตัวท่าน จะได้รับการปกปิดและจะไม่เปิดเผยแก่สาธารณชน ในกรณีที่ผลการวิจัยได้รับการตีพิมพ์ ชื่อและที่อยู่ของท่านจะต้องได้รับการปกปิดอยู่เสมอ โดยจะใช้เฉพาะรหัสประจำโครงการวิจัยของท่าน

จากการลงนามยินยอมของท่านผู้ทำวิจัย และผู้สนับสนุนการวิจัยสามารถเข้าไปตรวจสอบบันทึกข้อมูลทางการแพทย์ของท่านได้แม้จะสิ้นสุดโครงการวิจัยแล้วก็ตาม หากท่านต้องการยกเลิกการให้สิทธิ์ดังกล่าว ท่านสามารถแจ้งหรือเขียนบันทึกขอยกเลิกการให้คำยินยอม โดยส่งไปที่นางสาวขวัญเรือน เพ็ชรน้อย ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพระรามสี่ปทุมวัน กทม. 10330

หากท่านขอยกเลิกการให้คำยินยอมหลังจากที่ท่านได้เข้าร่วมโครงการวิจัยแล้ว ข้อมูลส่วนตัวของท่านจะไม่ถูกบันทึกเพิ่มเติม อย่างไรก็ตามข้อมูลอื่นๆ ของท่านอาจถูกนำมาใช้เพื่อประเมินผลการวิจัย และท่านจะไม่สามารถกลับมาเข้าร่วมในโครงการนี้ได้อีก ทั้งนี้เนื่องจากข้อมูลของท่านที่จำเป็นสำหรับใช้เพื่อการวิจัยไม่ได้ถูกบันทึก

จากการลงนามยินยอมของท่านแพทย์ผู้ทำวิจัยสามารถบอกรายละเอียดของท่านที่เกี่ยวกับการเข้าร่วมโครงการวิจัยให้แก่แพทย์ผู้รักษาท่านได้

การจัดการกับตัวอย่างชีวภาพที่เหลือ

ตัวอย่างชีวภาพที่ได้จากอาสาสมัคร เช่น เลือดและเส้นผมที่เหลือจากการวิจัย ผู้วิจัยขอเก็บตัวอย่างชีวภาพที่เหลือไว้เป็นเวลานาน 1 ปี เพื่อการวิจัยในอนาคต

สิทธิ์ของผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย

ในฐานะที่ท่านเป็นผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านจะมีสิทธิ์ดังต่อไปนี้

1. ท่านจะได้รับทราบถึงลักษณะและวัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้
2. ท่านจะได้รับการอธิบายเกี่ยวกับระเบียบวิธีการของการวิจัยทางการแพทย์ รวมทั้งยาและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้
3. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงความเสี่ยงและความไม่สบายที่จะได้รับจากการวิจัย
4. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงประโยชน์ที่ท่านอาจจะได้รับจากการวิจัย




INSTITUTIONAL REVIEW BOARD

Faculty of Medicine, Chulalongkorn University

IRB No. 085 / 53

Date of Approval 21 May 2558

 <p>คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย</p>	<p>AF 10-04/4.0</p> <p>เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย (Information sheet for research participant)</p>
--	---

5. ท่านจะได้รับการเปิดเผยถึงทางเลือกในการรักษาด้วยวิธีอื่น ยา หรืออุปกรณ์ซึ่งมีผลดีต่อท่านรวมทั้งประโยชน์และความเสี่ยงที่ท่านอาจได้รับ
6. ท่านจะได้รับทราบแนวทางในการรักษา ในกรณีที่พบโรคแทรกซ้อนภายหลังการเข้าร่วมในโครงการวิจัย
7. ท่านจะมีโอกาสได้ซักถามเกี่ยวกับงานวิจัยหรือขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
8. ท่านจะได้รับทราบว่ากรยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ท่านสามารถถอนตัวจากโครงการเมื่อไรก็ได้ โดยผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยสามารถถอนตัวจากโครงการโดยไม่ได้รับผลกระทบใดๆ ทั้งสิ้น
9. ท่านจะได้รับเอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยและสำเนาเอกสารยินยอมที่มีทั้งลายเซ็นและวันที่
10. ท่านมีสิทธิ์ในการตัดสินใจว่าจะเข้าร่วมในโครงการวิจัยหรือไม่ก็ได้ โดยปราศจากการใช้อิทธิพลบังคับ ช่มชู้ หรือการหลอกลวง

หากท่านไม่ได้รับการชดเชยอันควรต่อการบาดเจ็บหรือเจ็บป่วยที่เกิดขึ้นโดยตรงจากการวิจัย หรือท่านไม่ได้รับการปฏิบัติตามที่ปรากฏในเอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในการวิจัย ท่านสามารถร้องเรียนได้ที่ คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตึกอำนวยการ ชั้น 3 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทร 0-2256-4493 ต่อ 14, 15 ในเวลาราชการ

ขอขอบคุณในการร่วมมือของท่านมา ณ ที่นี้

.....



INSTITUTIONAL REVIEW BOARD	
Faculty of Medicine, Chulalongkorn University	
IRB No.	085 / 58
Date of Approval	21 เม.ย. 2558

เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการวิจัย


ความสัมพันธ์ระหว่างความแตกต่างทางพันธุกรรมของ CYP2A6 กับเภสัชจลนศาสตร์ของนิโคตินและระดับ
นิโคตินเมแทบอไลต์ในเส้นผมของผู้สูบบุหรี่ที่มาตรวจสุขภาพ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

เกณฑ์การคัดเลือกเข้า (Inclusion Criteria)	ใช่	ไม่ใช่
1. เป็นอาสาสมัครในโครงการวิจัยเรื่อง ระดับการติดนิโคติน ภาวะซึมเศร้า ภาวะวิตกกังวล และ จีโนไทป์ CYP2A6 ในผู้สูบบุหรี่ที่มาตรวจสุขภาพ ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 แบบปกติ หรือต่ำกว่าปกติมาก	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. งดสูบบุหรี่หรือใช้นิโคตินในรูปแบบอื่นเป็นเวลาอย่างน้อย 12 ชั่วโมงก่อนเข้าร่วมโครงการวิจัย	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. มีความยาวของผมจากหนังศีรษะอย่างน้อย 6 เซนติเมตร	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. สมัครใจและยินดีให้ความร่วมมือในการเก็บตัวอย่างเลือดและตัวอย่างเส้นผมในการวิจัย	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
เกณฑ์การคัดเลือกออก (Exclusion Criteria)	ใช่	ไม่ใช่
1. รับประทานยารักษาวิมโรค, ยาแก้แพ้, ยาลดความวิตกกังวล, ยารักษาโรคสะกดเงิน, ยา ต้านทานการแข็งตัวของหลอดเลือดภายในเวลา 14 วัน ก่อนเข้าร่วมโครงการวิจัย	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. รับประทานอาหารหรือดื่มเครื่องดื่มที่มีรสเปรี้ยว ได้แก่ กาแฟ, น้ำอัดลม, น้ำมะนาว, น้ำส้ม ภายในเวลา 30 นาที ก่อนเข้าร่วมโครงการวิจัย	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. มีความผิดปกติที่เกี่ยวข้องกับระบบการเคี้ยวและข้อต่อขากรรไกร	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. อยู่ในระหว่างตั้งครรภ์หรือให้นมบุตร	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. เข้าร่วมโครงการวิจัยทางคลินิกอื่นภายในเวลา 30 วัน	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>



INSTITUTIONAL REVIEW BOARD	
Faculty of Medicine, Chulalongkorn University	
IRB No.	085 / 58
Date of Approval	21 เม.ย. 2558

ภาคผนวก ข
ใบยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย

 <p>คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย</p>	<p>AF 10-05/4.0 เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัย</p>
--	--

การวิจัยเรื่อง ความสัมพันธ์ระหว่างความแตกต่างทางพันธุกรรมของ CYP2A6 กับเภสัชจลนศาสตร์ของ นิโคตินและระดับนิโคตินเมแทบอไลต์ในเส้นผมของผู้สูบบุหรี่ที่มาตรวจสุขภาพ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

วันที่ทำคำยินยอม วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้า นาย/นาง/นางสาว.....

ที่อยู่.....ได้อ่าน

รายละเอียดจากเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยวิจัยที่แนบมาฉบับวันที่..... และ
ข้าพเจ้ายินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยโดยสมัครใจ

ข้าพเจ้าได้รับสำเนาเอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยที่ข้าพเจ้าได้ลงนาม และ วันที่
พร้อมด้วยเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย ทั้งนี้ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมให้ทำการวิจัยนี้
ข้าพเจ้าได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย ระยะเวลาของการทำวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย
หรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย หรือจากยาที่ใช้ รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัย และแนวทาง
รักษาโดยวิธีอื่นอย่างละเอียด ข้าพเจ้ามีเวลาและโอกาสเพียงพอในการซักถามข้อสงสัยจนมีความเข้าใจอย่าง
แล้ว โดยผู้วิจัยได้ตอบคำถามต่าง ๆ ด้วยความเต็มใจไม่ปิดบังซ่อนเร้นจนข้าพเจ้าพอใจ

ข้าพเจ้ารับทราบจากผู้วิจัยว่าหากเกิดอันตรายใดๆ จากการวิจัยดังกล่าว ข้าพเจ้าจะได้รับการ
รักษาพยาบาลโดยไม่เสียค่าใช้จ่าย

ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะบอกเลิกเข้าร่วมในโครงการวิจัยเมื่อใดก็ได้ โดยไม่จำเป็นต้องแจ้งเหตุผล และการ
บอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้ จะไม่มีผลต่อการรักษาโรคหรือสิทธิอื่นๆ ที่ข้าพเจ้าจะพึงได้รับต่อไป


ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าเป็นความลับ และจะเปิดเผยได้เฉพาะเมื่อได้รับการ
ยินยอมจากข้าพเจ้าเท่านั้น บุคคลอื่นในนามของบริษัทผู้สนับสนุนการวิจัย และคณะกรรมการพิจารณา
จริยธรรมการวิจัยในคน อาจได้รับอนุญาตให้เข้ามาตรวจและประมวลผลข้อมูลของข้าพเจ้า ทั้งนี้จะต้องกระทำไป
เพื่อวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูลเท่านั้น โดยการตกลงที่จะเข้าร่วมการศึกษานี้ข้าพเจ้าได้
ให้คำยินยอมที่จะให้มีการตรวจสอบประวัติทางการแพทย์ของข้าพเจ้าได้

ผู้วิจัยรับรองว่าจะไม่มีการเก็บข้อมูลใดๆ เพิ่มเติม หลังจากที่ข้าพเจ้าขอยกเลิกการเข้าร่วม
โครงการวิจัยและต้องการให้ทำลายเอกสารและ/หรือ ตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบทั้งหมดที่สามารถสืบค้นถึงตัว
ข้าพเจ้าได้

ข้าพเจ้าเข้าใจว่า ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะตรวจสอบหรือแก้ไขข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าและสามารถยกเลิก
การให้สิทธิในการใช้ข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าได้ โดยต้องแจ้งให้ผู้วิจัยรับทราบ



INSTITUTIONAL REVIEW BOARD	
Faculty of Medicine, Chulalongkorn University	
IRB No. 085	58
Date of Approval	21 เม.ย. 2558

	<p>คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย</p>	<p>AF 10-05/4.0 เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัย</p>
---	--	--

ข้าพเจ้าได้ตระหนักว่าข้อมูลในการวิจัยรวมถึงข้อมูลทางการแพทย์ของข้าพเจ้าที่ไม่มีการเปิดเผยชื่อ จะผ่านกระบวนการต่างๆ เช่น การเก็บข้อมูล การบันทึกข้อมูลในแบบบันทึกและในคอมพิวเตอร์ การตรวจสอบ การวิเคราะห์ และการรายงานข้อมูลเพื่อวัตถุประสงค์ทางวิชาการ รวมทั้งการใช้ข้อมูลทางการแพทย์ในอนาคตหรือการวิจัยทางด้านเภสัชภัณฑ์ เท่านั้น

ข้าพเจ้าได้อ่านข้อความข้างต้นและมีความเข้าใจดีทุกประการแล้ว ยินดีเข้าร่วมในการวิจัยด้วยความเต็มใจ จึงได้ลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมนี้

.....ลงนามผู้ให้ความยินยอม
(.....) ชื่อผู้ยินยอมตัวบรรจง
วันที่เดือน.....พ.ศ.....

การจัดการกับตัวอย่างทางชีวภาพ

มีและขอเก็บตัวอย่างชีวภาพที่เหลือไว้เพื่อการวิจัยในอนาคต

ข้าพเจ้า ยินยอม

ไม่ยินยอม


ให้เก็บตัวอย่างชีวภาพที่เหลือไว้เพื่อการวิจัยในอนาคต

.....ลงนามผู้ให้ความยินยอม
(.....) ชื่อผู้ยินยอมตัวบรรจง
วันที่เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้าได้อธิบายถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการไม่พึงประสงค์หรือ ความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย หรือจากยาที่ใช้ รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด ให้ผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยตามนามข้างต้นได้ทราบและมีความเข้าใจดีแล้ว พร้อมลงนามลงในเอกสารแสดงความยินยอมด้วยความเต็มใจ



INSTITUTIONAL REVIEW BOARD	
Faculty of Medicine, Chulalongkorn University	
IRB No. 065 / 57	
Date of Approval: 21 Nov. 2558	

	<p>คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย</p>	<p>AF 10-05/4.0 เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัย</p>
---	--	--

.....ลงนามผู้ทำวิจัย
(.....) ชื่อผู้ทำวิจัย ตัวบรรจง
วันที่เดือน.....พ.ศ.....

.....ลงนามพยาน
(.....) ชื่อพยาน ตัวบรรจง
วันที่เดือน.....พ.ศ.....



INSTITUTIONAL REVIEW BOARD	
Faculty of Medicine, Chulalongkorn University	
IRB No.	085 / 58
Date of Approval.....	21 MAR 2558

ภาคผนวก ค
เอกสารรับรองโครงการวิจัย



COA No. 254/2015

IRB No. 085/58

คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1873 ถ.พระราม 4 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทร. 0-2256-4455 ต่อ 14, 15

เอกสารรับรองโครงการวิจัย

คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ดำเนินการให้การรับรองโครงการวิจัยตามแนวทางหลักจริยธรรมการวิจัยในคนที่เป็นมาตรฐานสากลได้แก่ Declaration of Helsinki, The Belmont Report, CIOMS Guideline และ International Conference on Harmonization in Good Clinical Practice หรือ ICH-GCP

ชื่อโครงการ : ความสัมพันธ์ระหว่างความแตกต่างทางพันธุกรรมของ CYP2A6 กับเภสัชจลนศาสตร์ของนิโคตินและระดับนิโคตินเมแทบอลิไตในเส้นผมของผู้สูบบุหรี่ที่มาตรวจสุขภาพ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

เลขที่โครงการวิจัย : -

ผู้วิจัยหลัก : นางสาววิญเฐน เพ็ชรน้อย

สังกัดหน่วยงาน : สาขาวิชาเภสัชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีทบทวน : คณะกรรมการเต็มชุด

รายงานความก้าวหน้า : ส่งรายงานความก้าวหน้าอย่างน้อย 1 ครั้ง/ปี หรือส่งรายงานฉบับสมบูรณ์หากดำเนินโครงการเสร็จสิ้นก่อน 1 ปี

เอกสารที่ได้รับการทบทวน :

1. Full protocol – Nicotine, Version 2.0 Dated 05-04-15
2. Protocol Synopsis - Nicotine, Version 2.0 Dated 05-04-15
3. Information Sheet - Nicotine, Version 2.0 Dated 05-04-15
4. Consent Form – Nicotine, Version 1.0 Dated 10-02-15
5. Curriculum Vitae
6. GCP Training
7. Inclusion – Nicotine, Version 1.0 dated 10-02-15

ลงนาม
(รองศาสตราจารย์นายแพทย์อรุณพ ใจสำราญ)

รองประธานปฏิบัติหน้าที่แทนประธาน
คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน

ลงนาม.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พญ.ประภาพรณ รัชตะปิติ)

กรรมการและเลขานุการ
คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน

วันที่รับรอง : 21 เมษายน 2558

วันหมดอายุ : 20 เมษายน 2559

ทั้งนี้ การรับรองนี้มีเงื่อนไขดังที่ระบุไว้ด้านหลังทุกข้อ (ดูด้านหลังของเอกสารรับรองโครงการวิจัย)



COA No. 254/2015

IRB No. 085/58

INSTITUTIONAL REVIEW BOARD
Faculty of Medicine, Chulalongkorn University

1873 Rama 4 Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand, Tel 662-256-4493

Certificate of Approval

The Institutional Review Board of the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, has approved the following study in compliance with the International guidelines for human research protection as Declaration of Helsinki, The Belmont Report, CIOMS Guideline and International Conference on Harmonization in Good Clinical Practice (ICH-GCP)

Study Title : The relationship between genetic variations of CYP2A6 and pharmacokinetics of nicotine and hair nicotine metabolites in cigarette smokers visiting medical check-up clinic at King Chulalongkorn Memorial Hospital.

Study Code : -

Principal Investigator : Miss Khwanrua Phetnoi

Affiliation of PI : Master of Science Program in Pharmacology, Graduate School, Chulalongkorn University.

Review Method : Full board

Continuing Report : At least once annually or submit the final report if finished.

Document Reviewed :

1. Full protocol – Nicotine, Version 2.0 Dated 05-04-15
2. Protocol Synopsis - Nicotine, Version 2.0 Dated 05-04-15
3. Information Sheet - Nicotine, Version 2.0 Dated 05-04-15
4. Consent Form – Nicotine, Version 1.0 Dated 10-02-15
5. Curriculum Vitae
6. GCP Training
7. Inclusion – Nicotine, Version 1.0 dated 10-02-15

Signature:.....

Signature:.....

(Associate Professor Unnop Jaisamrarn MD, MHS) (Assistant Professor Prapapan Rajatapiti MD, PhD)

Vice-Chairman, Acting Chairman

Member and Secretary

The Institutional Review Board

Secretary The Institutional Review Board

Date of Approval : April 21, 2015

Approval Expire Date : April 20, 2016

Approval granted is subject to the following conditions: (see back of this Certificate)



หมายเลขโครงการ 085/58

คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
1873 ถ.พระราม 4 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทร. 0-2256-4493

หนังสือรับรองเอกสารที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัย

คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ดำเนินการให้การรับรอง/รับทราบ เอกสารที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัยตามแนวทางหลักจริยธรรมการวิจัยในคนที่เป็นมาตรฐานสากลได้แก่ Declaration of Helsinki, The Belmont Report, CIOMS Guideline และ International Conference on Harmonization in Good Clinical Practice หรือ ICH-GCP

ชื่อโครงการ : ความสัมพันธ์ระหว่างความแตกต่างทางพันธุกรรมของ CYP2A6 กับเภสัชจลนศาสตร์ของนิโคตินและระดับนิโคตินเมแทบอไลต์ในเส้นผมของผู้สูบบุหรี่ที่มาตรวจสุขภาพ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์



เลขที่โครงการวิจัย : -

ผู้วิจัยหลัก : นางสาวขวัญเรือน เพ็ชรน้อย

สังกัดหน่วยงาน : สาขาวิชาเภสัชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารที่ได้รับการทบทวน :

1. โครงการวิจัย version 3.0 Dated 17-06-15
2. โครงการวิจัยฉบับย่อ version 3.0 Dated 17-06-15
3. เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย version 3.0 Dated 17-06-15

ลงนาม.....  ลงนาม..... 

(ศาสตราจารย์กิตติคุณแพทย์หญิงธาดา สืบหลินวงศ์) (ผศ.ดร.ธัญญา ทองตัน)
 ประธาน กรรมการและผู้ช่วยเลขานุการ
 คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย

วันที่รับรอง: 7 กรกฎาคม 2558

ทั้งนี้ การรับรองนี้มีเงื่อนไขดังที่ระบุไว้ด้านหลังทุกข้อ (ดูด้านหลังของเอกสารรับรองโครงการวิจัย)



Protocol Number 085/58

INSTITUTIONAL REVIEW BOARD
Faculty of Medicine, Chulalongkorn University
1873 Rama 4 Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand, Tel 662-256-4493

Approval of Documents related to Study Protocol

The Institutional Review Board of the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, has approved/acknowledge the following study in compliance with the International guidelines for human research protection as Declaration of Helsinki, The Belmont Report, CIOMS Guideline and International Conference on Harmonization in Good Clinical Practice (ICH-GCP)

Study Title : The relationship between genetic variations of CYP2A6 and pharmacokinetics of nicotine and hair nicotine metabolites in cigarette smokers visiting medical check-up clinic at King Chulalongkorn Memorial Hospital

Study Code : -

Principal Investigator : Miss Khwanrua Phetnoi

Affiliation of PI : Master of Science Program in Pharmacology,
Graduate School, Chulalongkorn University

Document Reviewed :

1. Protocol version 3.0 Dated 17-06-15
2. Protocol synopsis version 3.0 Dated 17-06-15
3. Information sheet for research participant version 3.0 Dated 17-06-15

<p>Signature  (Emeritus Professor Tada Sueblinwong MD) Chairperson The Institutional Review Board</p>	<p>Signature  (Assistant Professor Thananya Thongtan, PhD) Member and Assistant Secretary, Acting Secretary The Institutional Review Board</p>
---	---

Date of Approval : July 7, 2015

Approval granted is subject to the following conditions: (see back of this Certificate)

ภาคผนวก ง
การเตรียมสารละลาย

1. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน (Standard solution) สำหรับวัดระดับ nicotine, cotinine และ *trans*-3'-hydroxycotinine ใน plasma

สารละลายมาตรฐานที่เตรียมแล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C

1) การเตรียมสารละลายของ nicotine เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve)

เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 1000, 400, 200, 100, 40, 20, 5 ng/ml โดยทำ serial solution จากสารละลายมาตรฐานเข้มข้น 10 µg/ml แล้วนำสารมาตรฐานที่ได้ความเข้มข้นละ 10 µl spiked ลงใน mobile phase หรือ plasma ให้ได้ปริมาตรรวม 200 µl จะได้ nicotine ใน mobile phase หรือ plasma ที่ความเข้มข้น 50, 20, 10, 5, 2, 1, 0.25 ng/ml ตามลำดับ

1.1) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 10 µg/ml จาก 1,000 µg/ml (stock solution)

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก } C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (1,000 \text{ µg/ml})V_1 &= (10 \text{ µg/ml})(500 \text{ µl}) \\ V_1 &= 5 \text{ µl} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 1,000 µg/ml nicotine 5 µl และปรับปริมาตรด้วย methanol 495 µl จะได้ nicotine ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml

1.2) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 1,000 ng/ml จาก 10 µg/ml nicotine

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก } C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (10,000 \text{ ng/ml})V_1 &= (1,000 \text{ ng/ml})(1,000 \text{ µl}) \\ V_1 &= 100 \text{ µl} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 10,000 ng/ml nicotine 100 µl และปรับปริมาตรด้วย methanol 900 µl จะได้ nicotine ที่ความเข้มข้น 1,000 ng/ml

1.3) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 400 ng/ml จาก 1,000 ng/ml nicotine

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก } C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (1,000 \text{ ng/ml})V_1 &= (400 \text{ ng/ml})(900 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 360 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 1,000 ng/ml nicotine 360 μl และปรับปริมาตรด้วย methanol 540 μl จะได้ nicotine ที่ความเข้มข้น 400 ng/ml

1.4) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 200 ng/ml จาก 400 ng/ml nicotine

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก } C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (400 \text{ ng/ml})V_1 &= (200 \text{ ng/ml})(600 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 300 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 400 ng/ml nicotine 300 μl และปรับปริมาตรด้วย methanol 300 μl จะได้ nicotine ที่ความเข้มข้น 200 ng/ml

1.5) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 100 ng/ml จาก 200 ng/ml nicotine

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก } C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (200 \text{ ng/ml})V_1 &= (100 \text{ ng/ml})(500 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 250 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 200 ng/ml nicotine 250 μl และปรับปริมาตรด้วย methanol 250 μl จะได้ nicotine ที่ความเข้มข้น 100 ng/ml

1.6) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 40 ng/ml จาก 100 ng/ml nicotine

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก } C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (100 \text{ ng/ml})V_1 &= (40 \text{ ng/ml})(600 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 240 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 100 ng/ml nicotine 240 μl และปรับปริมาตรด้วย methanol 360 μl จะได้ nicotine ที่ความเข้มข้น 40 ng/ml

1.7) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 20 ng/ml จาก 40 ng/ml nicotine

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก } C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (40 \text{ ng/ml})V_1 &= (20 \text{ ng/ml})(600 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 300 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 40 ng/ml nicotine 300 μl และปรับปริมาตรด้วย methanol 300 μl จะได้ nicotine ที่ความเข้มข้น 20 ng/ml

1.8) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 5 ng/ml จาก 20 ng/ml nicotine

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก } C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (20 \text{ ng/ml})V_1 &= (5 \text{ ng/ml})(300 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 75 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 20 ng/ml nicotine 75 μl และปรับปริมาตรด้วย methanol 225 μl จะได้ nicotine ที่ความเข้มข้น 5 ng/ml

2) การเตรียมสารละลายของ cotinine เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve)

เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 6000, 3000, 1000, 200, 50, 20, 5 ng/ml โดยทำ serial solution จากสารละลายมาตรฐานเข้มข้น 1 mg/ml แล้วนำสารมาตรฐานที่ได้ความเข้มข้นละ 10 μl spiked ลงใน mobile phase หรือ plasma ให้ได้ปริมาตรรวม 200 μl จะได้ cotinine ใน mobile phase หรือ plasma ที่ความเข้มข้น 300, 150, 50, 10, 2.5, 1, 0.25 ng/ml ตามลำดับ

2.1) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 6,000 ng/ml จาก 1 mg/ml cotinine (stock solution)

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก } C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (1,000,000 \text{ ng/ml})V_1 &= (6,000 \text{ ng/ml})(1,000 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 6 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 1,000,000 ng/ml cotinine 6 μl และปรับปริมาตรด้วย methanol 994 μl จะได้ cotinine ที่ความเข้มข้น 6,000 ng/ml

2.2) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 3,000 ng/ml จาก 6,000 ng/ml cotinine

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก } C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (6,000 \text{ ng/ml})V_1 &= (3,000 \text{ ng/ml})(800 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 400 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 6,000 ng/ml cotinine 400 μl และปรับปริมาตรด้วย methanol 400 μl จะได้ cotinine ที่ความเข้มข้น 3,000 ng/ml

2.3) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 1,000 ng/ml จาก 3,000 ng/ml cotinine

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก } C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (3,000 \text{ ng/ml})V_1 &= (1,000 \text{ ng/ml})(450 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 150 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 3,000 ng/ml cotinine 150 μl และปรับปริมาตรด้วย methanol 300 μl จะได้ cotinine ที่ความเข้มข้น 1,000 ng/ml

2.4) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 200 ng/ml จาก 1,000 ng/ml cotinine

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก } C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (1,000 \text{ ng/ml})V_1 &= (200 \text{ ng/ml})(500 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 100 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 1,000 ng/ml cotinine 100 μl และปรับปริมาตรด้วย methanol 400 μl จะได้ cotinine ที่ความเข้มข้น 200 ng/ml

2.5) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 50 ng/ml จาก 200 ng/ml cotinine

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก } C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (200 \text{ ng/ml})V_1 &= (50 \text{ ng/ml})(600 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 150 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 200 ng/ml cotinine 150 μl และปรับปริมาตรด้วย methanol 450 μl จะได้ cotinine ที่ความเข้มข้น 50 ng/ml

2.6) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 20 ng/ml จาก 50 ng/ml cotinine

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก } C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (50 \text{ ng/ml})V_1 &= (20 \text{ ng/ml})(600 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 240 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 50 ng/ml cotinine 240 μl และปรับปริมาตรด้วย methanol 360 μl จะได้ cotinine ที่ความเข้มข้น 20 ng/ml

2.7) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 5 ng/ml จาก 20 ng/ml cotinine

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก } C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (20 \text{ ng/ml})V_1 &= (5 \text{ ng/ml})(300 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 75 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 20 ng/ml cotinine 75 μl และปรับปริมาตรด้วย methanol 225 μl จะได้ cotinine ที่ความเข้มข้น 5 ng/ml

3) การเตรียมสารละลายของ *trans*-3'-hydroxycotinine (3HC) เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve)

เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 4000, 2000, 1000, 200, 50, 20, 10 ng/ml โดยทำ serial solution จากสารละลายมาตรฐานเข้มข้น 1 mg/ml แล้วนำสารมาตรฐานที่ได้ความเข้มข้นละ 10 μl spiked ลงใน mobile phase หรือ plasma ให้ได้ปริมาตรรวม 200 μl จะได้ 3HC ใน mobile phase หรือ plasma ที่ความเข้มข้น 200, 100, 50, 10, 2.5, 1, 0.5 ng/ml ตามลำดับ

3.1) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 4,000 ng/ml จาก 1 mg/ml 3HC (stock solution)

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก } C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (1,000,000 \text{ ng/ml})V_1 &= (4,000 \text{ ng/ml})(1,000 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 4 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 1,000,000 ng/ml 3HC 4 μl และปรับปริมาตรด้วย methanol 996 μl จะได้ 3HC ที่ความเข้มข้น 4,000 ng/ml

3.2) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 2,000 ng/ml จาก 4,000 ng/ml 3HC

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก } C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (4,000 \text{ ng/ml})V_1 &= (2,000 \text{ ng/ml})(800 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 400 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 4,000 ng/ml 3HC 400 μl และปรับปริมาตรด้วย methanol 400 μl จะได้ 3HC ที่ความเข้มข้น 2,000 ng/ml

3.3) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 1,000 ng/ml จาก 2,000 ng/ml 3HC

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก } C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (2,000 \text{ ng/ml})V_1 &= (1,000 \text{ ng/ml})(300 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 150 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 2,000 ng/ml 3HC 150 μl และปรับปริมาตรด้วย methanol 150 μl จะได้ 3HC ที่ความเข้มข้น 1,000 ng/ml

3.4) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 200 ng/ml จาก 1,000 ng/ml 3HC

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก } C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (1,000 \text{ ng/ml})V_1 &= (200 \text{ ng/ml})(450 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 90 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 1,000 ng/ml 3HC 90 μl และปรับปริมาตรด้วย methanol 360 μl จะได้ 3HC ที่ความเข้มข้น 200 ng/ml

3.5) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 50 ng/ml จาก 200 ng/ml 3HC

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก } C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (200 \text{ ng/ml})V_1 &= (50 \text{ ng/ml})(600 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 150 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 200 ng/ml 3HC 150 μl และปรับปริมาตรด้วย methanol 450 μl จะได้ 3HC ที่ความเข้มข้น 50 ng/ml

3.6) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 20 ng/ml จาก 50 ng/ml 3HC

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก } C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (50 \text{ ng/ml})V_1 &= (20 \text{ ng/ml})(450 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 180 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 50 ng/ml 3HC 180 μl และปรับปริมาตรด้วย methanol 270 μl จะได้ 3HC ที่ความเข้มข้น 20 ng/ml

3.7) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 10 ng/ml จาก 20 ng/ml 3HC

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก } C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (20 \text{ ng/ml})V_1 &= (10 \text{ ng/ml})(300 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 150 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 20 ng/ml 3HC 150 μl และปรับปริมาตรด้วย methanol 150 μl จะได้ 3HC ที่ความเข้มข้น 10 ng/ml

4) การเตรียมสารละลายของ nicotine-D₄ เพื่อใช้เป็น internal standard ของ nicotine เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 300 ng/ml จากสารละลายมาตรฐานเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ (100,000 ng/ml)

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก } C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (100,000 \text{ ng/ml})V_1 &= (300 \text{ ng/ml})(1,000 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 3 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 100 $\mu\text{g/ml}$ nicotine-D₄ 3 μl และปรับปริมาตรด้วย methanol 997 μl จะได้ nicotine-D₄ ที่ความเข้มข้น 300 ng/ml

5) การเตรียมสารละลายของ cotinine-D₃ เพื่อใช้เป็น internal standard ของ cotinine

เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 2,500 ng/ml จากสารละลายมาตรฐานเข้มข้น 100 µg/ml (100,000 ng/ml)

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก } C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (100,000 \text{ ng/ml})V_1 &= (2,500 \text{ ng/ml})(1,000 \text{ µl}) \\ V_1 &= 25 \text{ µl} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 100 µg/ml cotinine-D₃ 25 µl และปรับปริมาตรด้วย methanol 975 µl จะได้ cotinine-D₃ ที่ความเข้มข้น 2,500 ng/ml

6) การเตรียมสารละลายของ *trans*-3'-hydroxycotinine-D₃ (3HC-D₃) เพื่อใช้เป็น internal standard ของ 3HC

เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 2,500 ng/ml จากสารละลายมาตรฐานเข้มข้น 100 µg/ml (100,000 ng/ml)

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก } C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (100,000 \text{ ng/ml})V_1 &= (2,500 \text{ ng/ml})(1,000 \text{ µl}) \\ V_1 &= 25 \text{ µl} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 100 µg/ml 3HC-D₃ 25 µl และปรับปริมาตรด้วย methanol 975 µl จะได้ 3HC-D₃ ที่ความเข้มข้น 2,500 ng/ml

2. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน (Standard solution) สำหรับวัดปริมาณการสะสมของ nicotine และ cotinine ในเส้นผม

สารละลายมาตรฐานที่เตรียมแล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C

1) การเตรียมสารละลายของ nicotine เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve)

เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 100000, 10000 และ 100 ng/ml โดยทำ serial solution จากสารละลายมาตรฐานเข้มข้น 1 mg/ml แล้วนำสารมาตรฐานที่ได้ spiked ลงในเส้นผมที่ได้มาจากคนที่ไม่สูบบุหรี่ (blank ของเส้นผม)หนัก 50 mg เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.25, 1, 2, 5, 10, 20, 50 และ 100 ng/mg

1.1) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 100,000 ng/ml จาก 1 mg/ml (stock solution)

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก } C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (1,000,000 \text{ ng/ml})V_1 &= (100,000 \text{ ng/ml})(500 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 50 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 1 mg/ml nicotine 50 μl และปรับปริมาตรด้วย methanol 450 μl จะได้ nicotine ที่ความเข้มข้น 100,000 ng/ml

1.2) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 10,000 ng/ml จาก 100,000 ng/ml nicotine

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก } C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (100,000 \text{ ng/ml})V_1 &= (10,000 \text{ ng/ml})(2,000 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 200 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 100,000 ng/ml nicotine 200 μl และปรับปริมาตรด้วย methanol 1,800 μl จะได้ nicotine ที่ความเข้มข้น 10,000 ng/ml

1.3) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 100 ng/ml จาก 10,000 ng/ml nicotine

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก } C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (10,000 \text{ ng/ml})V_1 &= (100 \text{ ng/ml})(2,000 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 20 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 10,000 ng/ml nicotine 20 μl และปรับปริมาตรด้วย methanol 1,980 μl จะได้ nicotine ที่ความเข้มข้น 100 ng/ml

1.4) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 0.25 ng/mg จาก 100 ng/ml nicotine

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก } \frac{100 \text{ ng/ml} \times V}{1,000 \mu\text{l} \times 50 \text{ mg}} &= 0.25 \text{ ng/mg} \\ V &= 125 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 100 ng/ml nicotine 125 μl เติมลงในเส้นผมหนัก 50 mg จะได้สารละลายมาตรฐาน nicotine เข้มข้น 0.25 ng/mg

1.5) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 1 ng/mg จาก 100 ng/ml nicotine

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก } \frac{100 \text{ ng/ml} \times V}{1,000 \mu\text{l} \times 50 \text{ mg}} &= 1 \text{ ng/mg} \\ V &= 500 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 100 ng/ml nicotine 500 μl เติมลงในเส้นผมหนัก 50 mg
จะได้สารละลายมาตรฐาน nicotine เข้มข้น 1 ng/mg

1.6) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 2 ng/mg จาก 10,000 ng/ml nicotine

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก } \frac{10,000 \text{ ng/ml} \times V}{1,000 \mu\text{l} \times 50 \text{ mg}} &= 2 \text{ ng/mg} \\ V &= 10 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 10,000 ng/ml nicotine 10 μl เติมลงในเส้นผมหนัก 50 mg
จะได้สารละลายมาตรฐาน nicotine เข้มข้น 2 ng/mg

1.7) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 5 ng/mg จาก 10,000 ng/ml nicotine

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก } \frac{10,000 \text{ ng/ml} \times V}{1,000 \mu\text{l} \times 50 \text{ mg}} &= 5 \text{ ng/mg} \\ V &= 25 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 10,000 ng/ml nicotine 25 μl เติมลงในเส้นผมหนัก 50 mg
จะได้สารละลายมาตรฐาน nicotine เข้มข้น 5 ng/mg

1.8) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 10 ng/mg จาก 10,000 ng/ml nicotine

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก } \frac{10,000 \text{ ng/ml} \times V}{1,000 \mu\text{l} \times 50 \text{ mg}} &= 10 \text{ ng/mg} \\ V &= 50 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 10,000 ng/ml nicotine 50 μl เติมลงในเส้นผมหนัก 50 mg
จะได้สารละลายมาตรฐาน nicotine เข้มข้น 10 ng/mg

1.9) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 20 ng/mg จาก 10,000 ng/ml nicotine

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก} \quad \frac{10,000 \text{ ng/ml} \times V}{1,000 \mu\text{l} \times 50 \text{ mg}} &= 20 \text{ ng/mg} \\ V &= 100 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 10,000 ng/ml nicotine 100 μl เติมลงในเส้นผมหนัก 50 mg จะได้สารละลายมาตรฐาน nicotine เข้มข้น 20 ng/mg

1.10) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 50 ng/mg จาก 100,000 ng/ml nicotine

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก} \quad \frac{100,000 \text{ ng/ml} \times V}{1,000 \mu\text{l} \times 50 \text{ mg}} &= 50 \text{ ng/mg} \\ V &= 25 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 100,000 ng/ml nicotine 25 μl เติมลงในเส้นผมหนัก 50 mg จะได้สารละลายมาตรฐาน nicotine เข้มข้น 50 ng/mg

1.11) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 100 ng/mg จาก 100,000 ng/ml nicotine

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก} \quad \frac{100,000 \text{ ng/ml} \times V}{1,000 \mu\text{l} \times 50 \text{ mg}} &= 100 \text{ ng/mg} \\ V &= 50 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 100,000 ng/ml nicotine 50 μl เติมลงในเส้นผมหนัก 50 mg จะได้สารละลายมาตรฐาน nicotine เข้มข้น 100 ng/mg

2) การเตรียมสารละลายของ cotinine เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve)

เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 10000 และ 100 ng/ml โดยทำ serial solution จากสารละลายมาตรฐานเข้มข้น 1 mg/ml แล้วนำสารมาตรฐานที่ได้ spiked ลงในเส้นผมที่ได้มาจากคนที่ไม่สูบบุหรี่ (blank ของเส้นผม) หนัก 50 mg เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.15, 0.25, 1, 2, 5, 10, 20 และ 30 ng/mg

2.1) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 10,000 ng/ml จาก 1 mg/ml (stock solution)

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก } C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (1,000,000 \text{ ng/ml})V_1 &= (10,000 \text{ ng/ml})(1,000 \text{ }\mu\text{l}) \\ V_1 &= 10 \text{ }\mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 1 mg/ml cotinine 10 μl และปรับปริมาตรด้วย methanol 990 μl จะได้ cotinine ที่ความเข้มข้น 10,000 ng/ml

2.2) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 100 ng/ml จาก 10,000 ng/ml cotinine

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก } C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (10,000 \text{ ng/ml})V_1 &= (100 \text{ ng/ml})(3,000 \text{ }\mu\text{l}) \\ V_1 &= 30 \text{ }\mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 10,000 ng/ml cotinine 30 μl และปรับปริมาตรด้วย methanol 2,970 μl จะได้ cotinine ที่ความเข้มข้น 100 ng/ml

2.3) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 0.15 ng/ml จาก 100 ng/ml cotinine

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก } \frac{100 \text{ ng/ml} \times V}{1,000 \text{ }\mu\text{l} \times 50 \text{ mg}} &= 0.15 \text{ ng/mg} \\ V &= 75 \text{ }\mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 100 ng/ml cotinine 75 μl เติมลงในเส้นम्मหนัก 50 mg จะได้สารละลายมาตรฐาน cotinine เข้มข้น 0.15 ng/mg

2.4) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 0.25 ng/ml จาก 100 ng/ml cotinine

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก } \frac{100 \text{ ng/ml} \times V}{1,000 \text{ }\mu\text{l} \times 50 \text{ mg}} &= 0.25 \text{ ng/mg} \\ V &= 125 \text{ }\mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 100 ng/ml cotinine 125 μl เติมลงในเส้นम्मหนัก 50 mg จะได้สารละลายมาตรฐาน cotinine เข้มข้น 0.25 ng/mg

2.5) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 1 ng/ml จาก 100 ng/ml cotinine

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก} \quad \frac{100 \text{ ng/ml} \times V}{1,000 \mu\text{l} \times 50 \text{ mg}} &= 1 \text{ ng/mg} \\ V &= 500 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 100 ng/ml cotinine 500 μl เติมลงในเส้นम्मหนัก 50 mg
จะได้สารละลายมาตรฐาน cotinine เข้มข้น 1 ng/mg

2.6) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 2 ng/ml จาก 10,000 ng/ml cotinine

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก} \quad \frac{10,000 \text{ ng/ml} \times V}{1,000 \mu\text{l} \times 50 \text{ mg}} &= 2 \text{ ng/mg} \\ V &= 10 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 10,000 ng/ml cotinine 10 μl เติมลงในเส้นम्मหนัก 50 mg
จะได้สารละลายมาตรฐาน cotinine เข้มข้น 2 ng/mg

2.7) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 5 ng/ml จาก 10,000 ng/ml cotinine

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก} \quad \frac{10,000 \text{ ng/ml} \times V}{1,000 \mu\text{l} \times 50 \text{ mg}} &= 5 \text{ ng/mg} \\ V &= 25 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 10,000 ng/ml cotinine 25 μl เติมลงในเส้นम्मหนัก 50 mg
จะได้สารละลายมาตรฐาน cotinine เข้มข้น 5 ng/mg

2.8) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 10 ng/ml จาก 10,000 ng/ml cotinine

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก} \quad \frac{10,000 \text{ ng/ml} \times V}{1,000 \mu\text{l} \times 50 \text{ m}} &= 10 \text{ ng/mg} \\ V &= 50 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 10,000 ng/ml cotinine 50 μl เติมลงในเส้นम्मหนัก 50 mg
จะได้สารละลายมาตรฐาน cotinine เข้มข้น 10 ng/mg

2.9) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 20 ng/ml จาก 10,000 ng/ml cotinine

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก} \quad \frac{10,000 \text{ ng/ml} \times V}{1,000 \mu\text{l} \times 50 \text{ m}} &= 20 \text{ ng/mg} \\ V &= 100 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 10,000 ng/ml cotinine 100 μl เติมลงในเส้นผมหนัก 50 mg จะได้สารละลายมาตรฐาน cotinine เข้มข้น 20 ng/mg

2.10) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 30 ng/ml จาก 10,000 ng/ml cotinine

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก} \quad \frac{10,000 \text{ ng/ml} \times V}{1,000 \mu\text{l} \times 50 \text{ mg}} &= 30 \text{ ng/mg} \\ V &= 150 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 10,000 ng/ml cotinine 150 μl เติมลงในเส้นผมหนัก 50 mg จะได้สารละลายมาตรฐาน cotinine เข้มข้น 30 ng/mg

3) การเตรียมสารละลายของ nicotine-D₄ เพื่อใช้เป็น internal standard ของ nicotine

เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 3,000 ng/ml จากสารละลายมาตรฐานเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ (100,000 ng/ml)

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก} \quad C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (100,000 \text{ ng/ml})V_1 &= (3,000 \text{ ng/ml})(500 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 15 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 100 $\mu\text{g/ml}$ nicotine-D₄ 15 μl และปรับปริมาตรด้วย methanol 485 μl จะได้ nicotine-D₄ ที่ความเข้มข้น 3,000 ng/ml

4) การเตรียมสารละลายของ cotinine-D₃ เพื่อใช้เป็น internal standard ของ cotinine

เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 5,000 ng/ml จากสารละลายมาตรฐานเข้มข้น 100 µg/ml (100,000 ng/ml)

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก } C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (100,000 \text{ ng/ml})V_1 &= (5,000 \text{ ng/ml})(500 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 25 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 100 µg/ml cotinine-D₃ 25 µl และปรับปริมาตรด้วย methanol 475 µl จะได้ cotinine-D₃ ที่ความเข้มข้น 5,000 ng/ml

3. การเตรียมเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ในการแยกสาร

เตรียม 0.2 mM Ammonium acetate จากสารละลาย 1 mM Ammonium acetate

1) การเตรียม 1 mM Ammonium acetate ปริมาตร 1,000 ml (MW = 77.08)

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก } N &= \frac{g}{MW} = \frac{CV}{1,000} \\ \frac{g}{77.08} &= \frac{(1 \times 10^{-3} \text{ M})(1,000 \text{ ml})}{1,000} \\ 1,000 \text{ g} &= \frac{(1 \times 10^{-3} \text{ M})(1,000 \text{ ml})(77.08)}{1,000} \\ g &= 0.07708 \end{aligned}$$

ดังนั้น ชั่ง Ammonium acetate 0.07708 g หรือ 77.08 mg ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 1,000 ml

2) การเตรียม 0.2 mM Ammonium acetate จากสารละลาย 1 mM Ammonium acetate ปริมาตร 1,000 ml

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก } C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (1 \text{ mM})V_1 &= (0.2 \text{ mM})(1,000 \text{ ml}) \\ V_1 &= 200 \text{ ml} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 1 mM Ammonium acetate 200 ml และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 800 ml จะได้ 0.2 mM Ammonium acetate

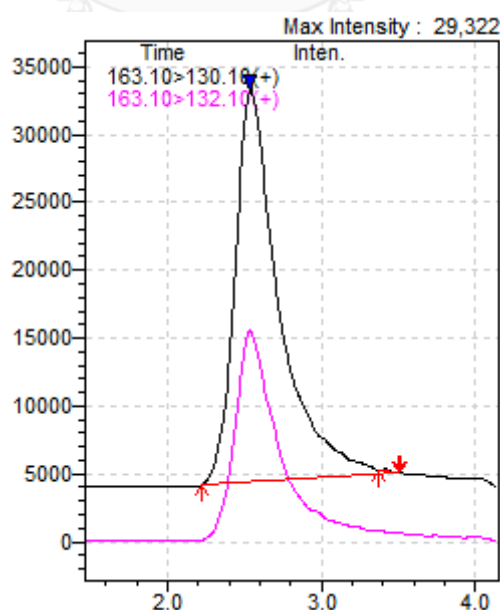
ภาคผนวก จ

การประเมินความน่าเชื่อถือของการวิเคราะห์

1. ผลการทดสอบความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ความเข้มข้นของ nicotine, cotinine และ *trans*-3-hydroxycotinine ในพลาสมา

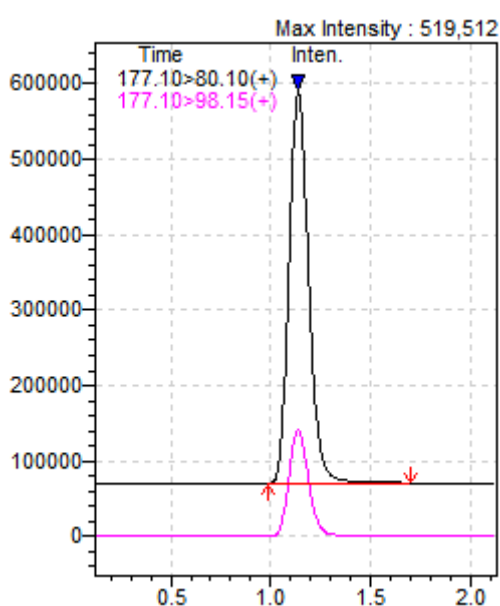
1.1 การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ (Specificity/Selectivity)

ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์แสดงได้จากโครมาโตแกรม (chromatogram) พบว่า retention time ของ nicotine อยู่ระหว่าง 2.3 ± 0.5 นาที ซึ่ง nicotine มีมวลต่อประจุเท่ากับ 163.10 m/z เมื่อเกิดการแตกตัวในระบบ MS/MS ทำให้ได้ไอออนตัวหลัก (major product ion) ที่มีมวลต่อประจุเท่ากับ 130.10 m/z (โครมาโตแกรมเส้นสีดำ) และแตกตัวได้ไอออนที่มีมวลต่อประจุเท่ากับ 132.10 m/z (โครมาโตแกรมเส้นสีชมพู) ซึ่งใช้เป็น reference product ion เมื่อวิเคราะห์หา nicotine เครื่องจะทำการตรวจวัดตัวที่เป็น major product ion กับ reference product ion ของ nicotine เท่านั้น (ภาพที่ 21)



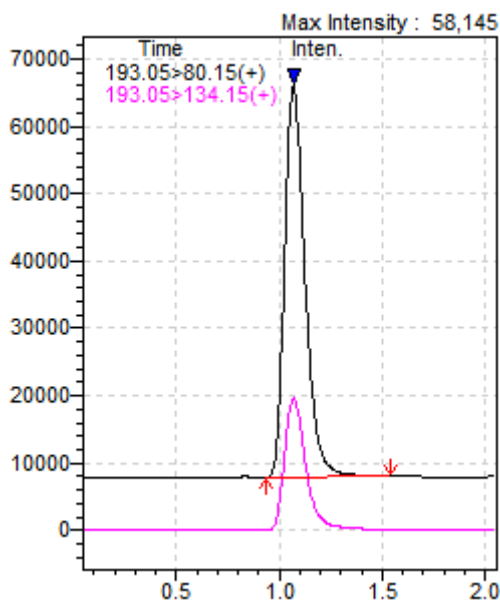
ภาพที่ 21 แสดงโครมาโตแกรมของ nicotine ในพลาสมา

cotinine มี retention time อยู่ระหว่าง 1.1 ± 0.5 นาที ซึ่ง cotinine มีมวลต่อประจุเท่ากับ 177.10 m/z เมื่อเกิดการแตกตัวในระบบ MS/MS ทำให้ได้ไอออนตัวหลัก (major product ion) ที่มีมวลต่อประจุเท่ากับ 80.10 m/z (โครมาโตแกรมเส้นสีดำ) และแตกตัวได้ไอออนที่มีมวลต่อประจุเท่ากับ 98.15 m/z (โครมาโตแกรมเส้นสีชมพู) ซึ่งใช้เป็น reference product ion เมื่อวิเคราะห์หา cotinine เครื่องจะทำการตรวจวัดตัวที่เป็น major product ion กับ reference product ion ของ cotinine เท่านั้น (ภาพที่ 22)



ภาพที่ 22 แสดงโครมาโตแกรมของ cotinine ในพลาสมา

trans-3-hydroxycotinine (3HC) มี retention time อยู่ระหว่าง 1.0 ± 0.5 นาที ซึ่ง 3HC มีมวลต่อประจุเท่ากับ 193.05 m/z เมื่อเกิดการแตกตัวในระบบ MS/MS ทำให้ได้ไอออนตัวหลัก (major product ion) ที่มีมวลต่อประจุเท่ากับ 80.15 m/z (โครมาโตแกรมเส้นสีดำ) และแตกตัวได้ไอออนที่มีมวลต่อประจุเท่ากับ 134.15 m/z (โครมาโตแกรมเส้นสีชมพู) ซึ่งใช้เป็น reference product ion เมื่อวิเคราะห์หา 3HC เครื่องจะทำการตรวจวัดตัวที่เป็น major product ion กับ reference product ion ของ 3HC เท่านั้น (ภาพที่ 23)



ภาพที่ 23 แสดงโครมาโตแกรมของ *trans*-3'-hydroxycotinine ในพลาสมา

1.2 การวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ nicotine, cotinine และ *trans*-3'-hydroxycotinine ในพลาสมาที่วิธีนี้สามารถวัดได้ (Lower limit of quantification, LLOQ)

ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ nicotine, cotinine และ *trans*-3'-hydroxycotinine ที่สามารถวิเคราะห์ได้ คือ 0.25 ng/ml, 0.25 ng/ml และ 0.5 ng/ml ตามลำดับ

ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ nicotine ที่ LLOQ มีค่าความถูกต้อง (accuracy) ของค่า LLOQ คือ 109.200%, 109.867% และ 98.133% ตามลำดับ และมีค่าความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ (precision) ซึ่งแสดงด้วยค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation, %CV) ของค่า LLOQ คือ 1.099%, 3.737% และ 8.573% ตามลำดับ

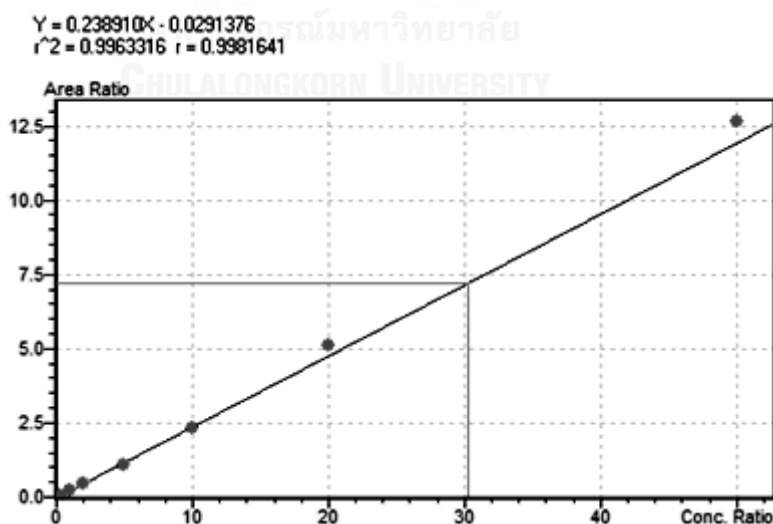
ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ cotinine ที่ LLOQ มีค่าความถูกต้อง (accuracy) ของค่า LLOQ คือ 93.733%, 108.800% และ 100.667% ตามลำดับ และมีค่าความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ (precision) ซึ่งแสดงด้วยค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation, %CV) ของค่า LLOQ คือ 10.947%, 2.047% และ 16.059% ตามลำดับ

ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ *trans*-3'-hydroxycotinine ที่ LLOQ มีค่าความถูกต้อง (accuracy) ของค่า LLOQ คือ 85.067%, 105.733% และ 112.933% ตามลำดับ และมีค่าความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ (precision) ซึ่งแสดงด้วยค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation, %CV) ของค่า LLOQ คือ 1.565%, 9.439% และ 3.170% ตามลำดับ

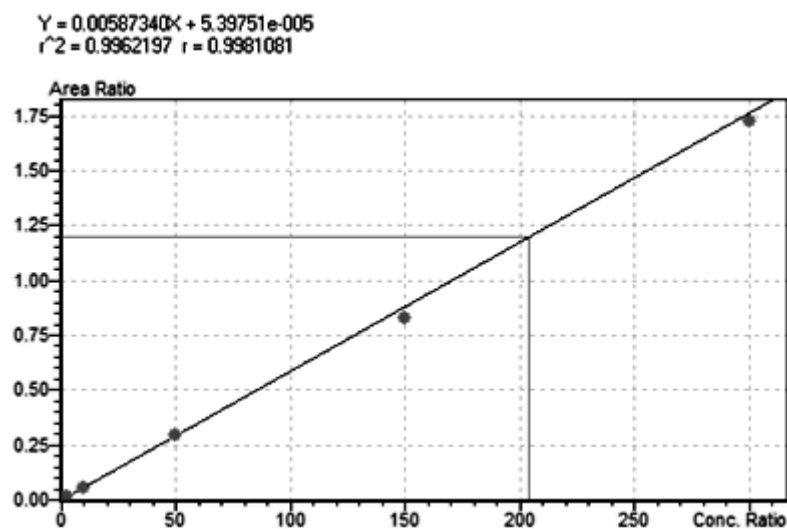
ซึ่งจากผลที่ได้พบว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ nicotine, cotinine และ *trans*-3'-hydroxycotinine ที่สามารถวิเคราะห์ได้นั้นมีค่า %accuracy อยู่ในช่วง 80-120% และ %CV ไม่เกิน 20% แสดงว่าวิธีวิเคราะห์มีความเที่ยงตรงและความถูกต้องเชื่อถือได้

1.3 ค่าความเป็นเส้นตรง (Linearity/Standard calibration curve)

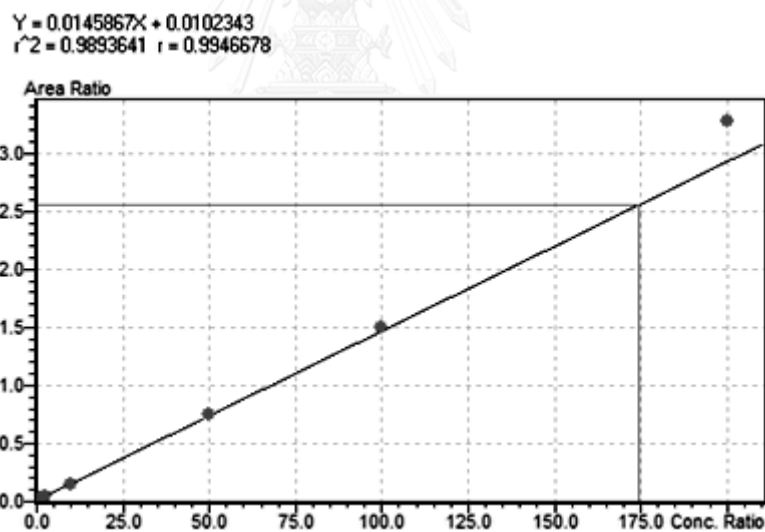
กราฟมาตรฐานของ nicotine, cotinine และ *trans*-3'-hydroxycotinine มีลักษณะเป็นเส้นตรงโดยวิเคราะห์จากสมการ $Y = ax + b$ เมื่อ Y เป็นค่า area ratio และ x เป็นค่าความเข้มข้นของ nicotine, cotinine และ *trans*-3'-hydroxycotinine และได้ค่า coefficient of determination (R^2) ของ nicotine, cotinine และ *trans*-3'-hydroxycotinine เท่ากับ 0.996, 0.996 และ 0.989 ตามลำดับ (ภาพที่ 21-23) จากผลที่ได้พบว่า ค่า R^2 มีค่าเข้าใกล้ 1 แสดงว่าค่าความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ของแต่ช่วงระดับความเข้มข้นไม่เกินจากความเข้มข้นที่เติมลงไป 15%



ภาพที่ 24 กราฟมาตรฐานของ nicotine ในพลาสมา



ภาพที่ 25 กราฟมาตรฐานของ cotinine ในพลาสมา



ภาพที่ 26 กราฟมาตรฐานของ *trans*-3'-hydroxycotinine ในพลาสมา

1.4 ค่าความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy) และความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ (Precision)

ค่าความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ nicotine, cotinine และ *trans*-3'-hydroxycotinine ภายในวันเดียวกัน (Intra-day precision) และต่างวันกัน (inter-day precision) โดยใช้ความเข้มข้น

ของสารที่วิเคราะห์ 3 ระดับ ได้แก่ ต่ำ (LQC), กลาง (MQC), สูง (HQC) ในช่วงระดับความเข้มข้นของกราฟมาตรฐาน ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและต่างวันกันมีค่า %accuracy อยู่ในช่วง 85-115% และมีความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์แสดงด้วยค่า %CV ไม่เกิน 15% แสดงว่าวิธีวิเคราะห์มีความเที่ยงตรงและความถูกต้องเชื่อถือได้ (ตารางที่ 15-20)

ตารางที่ 15 ความถูกต้องและเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ nicotine ในวันเดียวกัน (Intra-day)

Nicotine (ng/ml)	Measured value					Accuracy (%accuracy)	Precision (%CV)
	1	2	3	Average	SD		
LQC (0.75 ng/ml)	0.711	0.704	0.674	0.696	0.020	92.844	2.823
MQC (15 ng/ml)	14.360	13.381	14.757	14.166	0.708	94.440	4.999
HQC (30 ng/ml)	30.817	30.371	31.479	30.889	0.557	102.963	1.805

ตารางที่ 16 ความถูกต้องและเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ cotinine ในวันเดียวกัน (Intra-day)

Cotinine (ng/ml)	Measured value					Accuracy (%accuracy)	Precision (%CV)
	1	2	3	Average	SD		
LQC (0.75 ng/ml)	0.671	0.808	0.810	0.763	0.080	101.733	10.443
MQC (100 ng/ml)	97.056	92.320	95.107	94.828	2.380	94.828	2.510
HQC (200 ng/ml)	188.387	184.144	180.830	184.454	3.788	92.227	2.054

ตารางที่ 17 ความถูกต้องและเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ *trans*-3'-hydroxycotinine (3HC) ในวันเดียวกัน (Intra-day)

3HC(ng/ml)	Measured value					Accuracy (%accuracy)	Precision (%CV)
	1	2	3	Average	SD		
LQC (1.5 ng/ml)	1.382	1.597	1.576	1.518	0.119	101.222	7.807
MQC (75 ng/ml)	77.277	76.937	76.445	76.886	0.418	102.515	0.544
HQC (150 ng/ml)	150.322	136.848	144.690	143.953	6.767	95.969	4.701

ตารางที่ 18 ความถูกต้องและเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ nicotine ในต่างวันกัน (Inter-day)

Nicotine (ng/ml)	Measured value					Accuracy (%accuracy)	Precision (%CV)
	Day 1	Day 2	Day 3	Average	SD		
LQC (0.75 ng/ml)	0.696	0.778	0.750	0.741	0.041	98.844	5.578
MQC (15 ng/ml)	14.166	15.641	16.547	15.451	1.202	103.008	7.777
HQC (30 ng/ml)	30.889	29.861	32.166	30.972	1.155	103.240	3.728

ตารางที่ 19 ความถูกต้องและเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ cotinine ในต่างวันกัน (Inter-day)

Cotinine (ng/ml)	Measured value					Accuracy (%accuracy)	Precision (%CV)
	Day 1	Day 2	Day 3	Average	SD		
LQC (0.75 ng/ml)	0.763	0.854	0.821	0.813	0.046	108.385	5.689
MQC (100 ng/ml)	94.828	103.103	104.563	100.831	5.250	100.831	5.207
HQC (200 ng/ml)	184.454	205.554	220.779	203.595	18.242	101.798	8.960

ตารางที่ 20 ความถูกต้องและเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ *trans*-3'-hydroxycotinine (3HC) ในต่างวันกัน (Inter-day)

3HC (ng/ml)	Measured value					Accuracy (%accuracy)	Precision (%CV)
	Day 1	Day 2	Day 3	Average	SD		
LQC (1.5 ng/ml)	1.518	1.679	1.664	1.620	0.089	108.030	5.477
MQC (75 ng/ml)	76.886	80.008	77.657	78.184	1.626	104.245	2.080
HQC (150 ng/ml)	143.953	165.558	156.341	155.284	10.841	103.523	6.982

1.5 ประสิทธิภาพการคืนกลับของการสกัด (Recovery of extraction)

ประสิทธิภาพของวิธีการสกัด nicotine, cotinine และ *trans*-3'-hydroxycotinine ในพลาสมา แสดงด้วยค่าร้อยละการคืนกลับ (%Recovery) ที่ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ 3 ระดับ ได้แก่ ต่ำ (LQC), กลาง (MQC), สูง (HQC) ในช่วงระดับความเข้มข้นของกราฟมาตรฐาน

ผลของการคืนกลับที่ได้จากการสกัดสารในพลาสมา แสดงในตารางที่ 21-23 ค่าเฉลี่ยร้อยละการคืนกลับของ nicotine อยู่ในช่วง 66.604% - 78.832% สำหรับ cotinine อยู่ในช่วง 58.645% - 82.250% และ *trans*-3'-hydroxycotinine อยู่ในช่วง 43.408% - 59.506%

ตารางที่ 21 แสดงประสิทธิภาพของวิธีการสกัด nicotine และ nicotine-D₄ (internal standard)

Nicotine (ng/ml)	Area under the curve (mean ± SD)		%Recovery
	Solution	Plasma	
LQC (0.75 ng/ml)	77,142 ± 4,818	58,020 ± 7,636	75.213
MQC (15 ng/ml)	639,836 ± 8,282	426,157 ± 23,507	66.604
HQC (30 ng/ml)	1,554,111 ± 11,508	1,225,131 ± 37,272	78.832

Nicotine-D ₄ (ng/ml)	Area under the curve (mean ± SD)		%Recovery
	Solution	Plasma	
15 ng/ml	792,647 ± 9,451	528,093 ± 26,006	66.624

ตารางที่ 22 แสดงประสิทธิภาพของวิธีการสกัด cotinine และ cotinine-D₃ (internal standard)

Cotinine (ng/ml)	Area under the curve (mean ± SD)		%Recovery
	Solution	Plasma	
LQC (0.75 ng/ml)	20,225 ± 1,957	11,861 ± 2,922	58.645
MQC (100 ng/ml)	1,642,039 ± 60,664	1,210,685 ± 28,618	73.731
HQC (200 ng/ml)	3,161,209 ± 77,237	2,600,098 ± 64,139	82.250

Cotinine-D ₃ (ng/ml)	Area under the curve (mean ± SD)		%Recovery
	Solution	Plasma	
125 ng/ml	3,508,174 ± 145,335	2,609,911 ± 82,403	74.395

ตารางที่ 23 แสดงประสิทธิภาพของวิธีการสกัด *trans*-3'-hydroxycotinine (3HC) และ *trans*-3'-hydroxycotinine-D₃ (internal standard)

3HC (ng/ml)	Area under the curve (mean ± SD)		%Recovery
	Solution	Plasma	
LQC (1.5 ng/ml)	11,160 ± 762	4,844 ± 450	43.408
MQC (75 ng/ml)	264,364 ± 5,965	131,112 ± 4,279	49.595
HQC (150 ng/ml)	493,749 ± 37,346	293,811 ± 15,649	59.506

3HC-D ₃ (ng/ml)	Area under the curve (mean ± SD)		%Recovery
	Solution	Plasma	
125 ng/ml	260,286 ± 6,923	135,861 ± 1,569	52.197

1.6 ความคงตัวของสารหลังจากการสกัด (Post-preparative stability)

ความคงตัวของสารหลังจากการสกัด nicotine, cotinine และ *trans*-3'-hydroxycotinine ในพลาสมา หาได้จากการเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารที่เตรียมขึ้นและทำการวิเคราะห์ทันที (T = 0 hr.) กับสารเดิมที่วางไว้ใน auto sampler ที่อุณหภูมิ 5 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (T = 24 hr.) และคำนวณค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น

ผลของร้อยละการเปลี่ยนแปลงของ nicotine, cotinine และ *trans*-3'-hydroxycotinine แสดงในตารางที่ 22-24 พบว่า nicotine ที่ความเข้มข้น 0.75 ng/ml และ 30 ng/ml มีค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลง คือ -3.086 และ 2.821 ตามลำดับ ส่วน cotinine ที่ความเข้มข้น 0.75 ng/ml และ 200 ng/ml มีค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลง คือ 3.472 และ -2.646 ตามลำดับ และ *trans*-3'-hydroxycotinine ที่ความเข้มข้น 1.5 ng/ml และ 150 ng/ml มีค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลง คือ -1.707 และ 0.889 ตามลำดับ โดยผลการวิเคราะห์ที่ได้ผ่านเกณฑ์การยอมรับที่กำหนดไว้ว่า ค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงที่วิเคราะห์ได้ต้องมีค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงไม่เกิน ± 15% (ตารางที่ 24-26)

ตารางที่ 24 แสดงร้อยละการเปลี่ยนแปลงของ nicotine

Nicotine (ng/ml)	Sample no.	Measured value (ng/ml)		%Change
		T = 0 hr.	T = 24 hr.	
Low (0.75 ng/ml)	1	0.764	0.793	-3.086
	2	0.757	0.670	
	3	0.812	0.798	
	Mean ± SD	0.778 ± 0.030	0.754 ± 0.073	
	%CV	3.850	9.620	
HQC (30 ng/ml)	1	29.743	31.804	2.821
	2	30.154	29.997	
	3	29.686	30.309	
	Mean ± SD	29.861 ± 0.255	30.703 ± 0.966	
	%CV	0.855	3.146	

ตารางที่ 25 แสดงร้อยละการเปลี่ยนแปลงของ cotinine

Cotinine (ng/ml)	Sample no.	Measured value (ng/ml)		%Change
		T = 0 hr.	T = 24 hr.	
Low (0.75 ng/ml)	1	0.855	0.954	3.472
	2	0.802	0.787	
	3	0.906	0.911	
	Mean ± SD	0.854 ± 0.052	0.884 ± 0.087	
	%CV	6.087	9.809	
HQC (200 ng/ml)	1	205.216	199.331	-2.646
	2	203.522	196.816	
	3	207.923	204.196	
	Mean ± SD	205.554 ± 2.220	200.114 ± 3.752	
	%CV	1.080	1.875	

ตารางที่ 26 แสดงร้อยละการเปลี่ยนแปลงของ *trans*-3'-hydroxycotinine (3HC)

3HC (ng/ml)	Sample no.	Measured value (ng/ml)		%Change
		T = 0 hr.	T = 24 hr.	
Low (1.5 ng/ml)	1	1.572	1.657	-1.707
	2	1.847	1.898	
	3	1.618	1.396	
	Mean \pm SD	1.679 \pm 0.147	1.650 \pm 0.251	
	%CV	8.773	15.213	
HQC (150 ng/ml)	1	167.675	162.652	0.889
	2	162.496	164.180	
	3	166.504	174.260	
	Mean \pm SD	165.558 \pm 2.716	167.031 \pm 6.307	
	%CV	1.640	3.776	

จากผลการทดสอบความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ความเข้มข้นของ nicotine, cotinine และ *trans*-3'-hydroxycotinine ในพลาสมา พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะเจาะจง, ความถูกต้องแม่นยำ, ความเที่ยงตรง และมีประสิทธิภาพในการสกัด ดังนั้น วิธีวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาขึ้นนี้มีความเหมาะสมและน่าเชื่อถือ และสามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ความเข้มข้นของ nicotine, cotinine และ *trans*-3'-hydroxycotinine ในพลาสมาเพื่อใช้ในการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของนิโคตินได้

2. ผลการทดสอบความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ความเข้มข้นของ nicotine และ cotinine ในเส้นผม

2.1 การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ (Specificity/Selectivity)

ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์แสดงได้จากโครมาโตแกรม (chromatogram) พบว่า retention time ของ nicotine อยู่ระหว่าง 1.5 ± 0.5 นาที ซึ่ง nicotine มีมวลต่อประจุเท่ากับ 163.10 m/z เมื่อเกิดการแตกตัวในระบบ MS/MS ทำให้ได้ไอออนตัวหลัก (major product ion) ที่มีมวลต่อประจุเท่ากับ 130.10 m/z และแตกตัวได้ไอออนที่มีมวลต่อประจุเท่ากับ 132.10 m/z ซึ่ง

ใช้เป็น reference product ion เมื่อวิเคราะห์หา nicotine เครื่องจะทำการตรวจวัดตัวที่เป็น major product ion กับ reference product ion ของ nicotine เท่านั้น

cotinine มี retention time อยู่ระหว่าง 1.1 ± 0.5 นาที ซึ่ง cotinine มีมวลต่อประจุเท่ากับ 177.10 m/z เมื่อเกิดการแตกตัวในระบบ MS/MS ทำให้ได้ไอออนตัวหลัก (major product ion) ที่มีมวลต่อประจุเท่ากับ 80.10 m/z และแตกตัวได้ไอออนที่มีมวลต่อประจุเท่ากับ 98.15 m/z ซึ่งใช้เป็น reference product ion เมื่อวิเคราะห์หา cotinine เครื่องจะทำการตรวจวัดตัวที่เป็น major product ion กับ reference product ion ของ cotinine เท่านั้น

2.2 การวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ nicotine และ cotinine ในเส้นผมที่วิธีนี้สามารถวัดได้ (Lower limit of quantification, LLOQ)

ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ nicotine และ cotinine ที่สามารถวิเคราะห์ได้ คือ 0.25 ng/mg และ 0.15 ng/mg ตามลำดับ

ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ nicotine ที่ LLOQ มีค่าความถูกต้อง (accuracy) ของค่า LLOQ คือ 93.733%, 103.046% และ 107.707% ตามลำดับ และมีค่าความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ (precision) ซึ่งแสดงด้วยค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation, %CV) ของค่า LLOQ คือ 6.412%, 1.860% และ 3.233% ตามลำดับ

ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ cotinine ที่ LLOQ มีค่าความถูกต้อง (accuracy) ของค่า LLOQ คือ 95.407%, 92.500% และ 107.975% ตามลำดับ และมีค่าความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ (precision) ซึ่งแสดงด้วยค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation, %CV) ของค่า LLOQ คือ 5.131%, 6.052% และ 2.220% ตามลำดับ

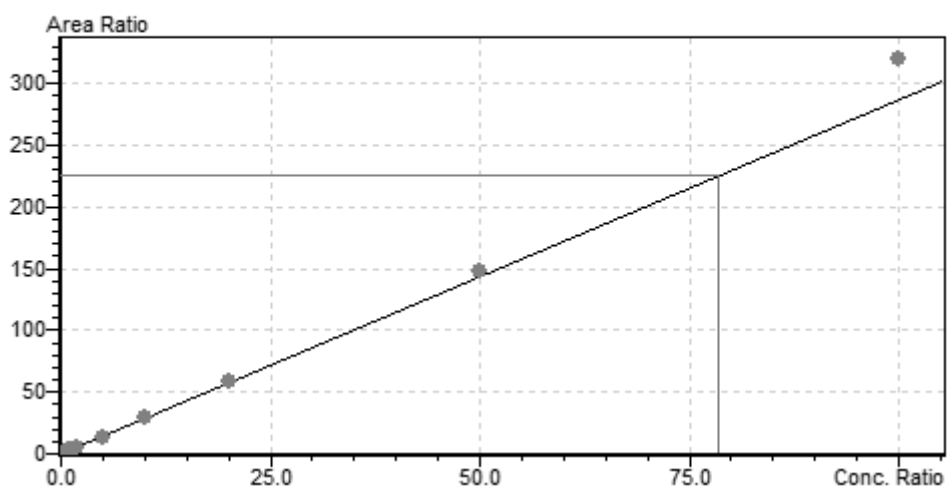
ซึ่งจากผลที่ได้พบว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ nicotine และ cotinine ที่สามารถวิเคราะห์ได้นั้นมีค่า %accuracy อยู่ในช่วง 80-120% และ %CV ไม่เกิน 20% แสดงว่าวิธีวิเคราะห์มีความเที่ยงตรงและความถูกต้องเชื่อถือได้

2.3 ค่าความเป็นเส้นตรง (Linearity/Standard calibration curve)

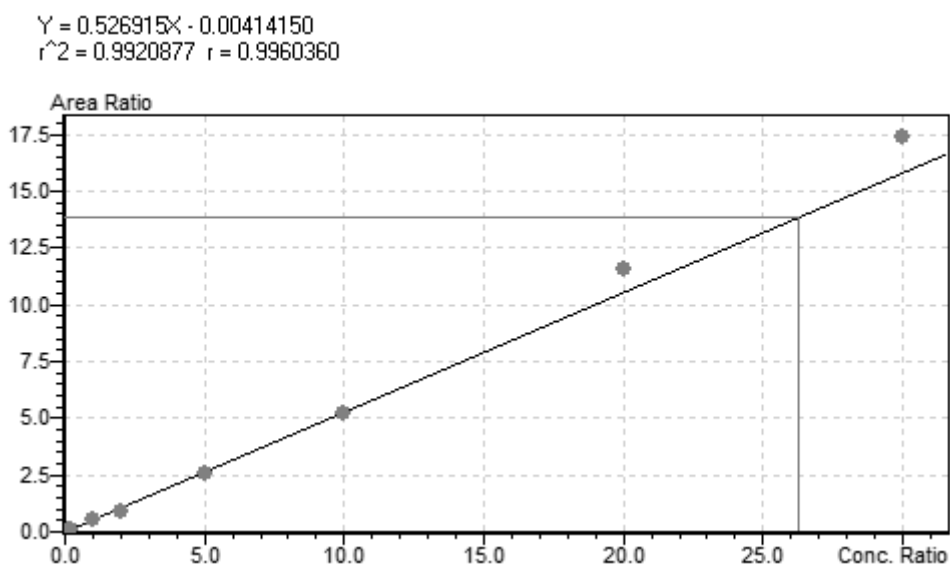
กราฟมาตรฐานของ nicotine และ cotinine มีลักษณะเป็นเส้นตรงโดยวิเคราะห์จากสมการ $Y = ax + b$ เมื่อ Y เป็นค่า area ratio และ x เป็นค่าความเข้มข้นของ nicotine และ cotinine และได้ค่า coefficient of determination (R^2) ของ nicotine และ cotinine เท่ากับ 0.994 และ 0.992 ตามลำดับ (ภาพที่ 24-25) จากผลที่ได้พบว่า ค่า R^2 มีค่าเข้าใกล้ 1 แสดงว่าค่าความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ของแต่ละช่วงระดับความเข้มข้นไม่เกินจากความเข้มข้นที่เติมลงไป 15%

$$Y = 2.86725X + 0.0656704$$

$$r^2 = 0.9941598 \quad r = 0.9970756$$



ภาพที่ 27 กราฟมาตรฐานของ nicotine ในเส้นผม



ภาพที่ 28 กราฟมาตรฐานของ cotinine ในเส้นผม

2.4 ค่าความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy) และความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ (Precision)

ค่าความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ nicotine และ cotinine โดยใช้ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ 3 ระดับ ได้แก่ ต่ำ (LQC), กลาง (MQC), สูง (HQC) ในช่วงระดับความเข้มข้นของกราฟมาตรฐาน ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์อยู่ในช่วง 85-115% และมีความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์แสดงด้วยค่า %CV ไม่เกิน 15% แสดงว่าวิธีวิเคราะห์มีความเที่ยงตรงและความถูกต้องเชื่อถือได้ (ตารางที่ 27-28)

ตารางที่ 27 ความถูกต้องและเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ nicotine

Nicotine (ng/ml)	Measured value					Accuracy (%accuracy)	Precision (%CV)
	1	2	3	Average	SD		
LQC (0.75 ng/mg)	0.731	0.651	0.674	0.696	0.045	93.733	6.412
MQC (30 ng/mg)	31.056	30.281	31.404	30.914	0.575	103.046	1.860
HQC (75 ng/mg)	80.333	83.586	78.421	80.780	2.611	107.707	3.233

ตารางที่ 28 ความถูกต้องและเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ cotinine

Cotinine (ng/ml)	Measured value					Accuracy (%accuracy)	Precision (%CV)
	1	2	3	Average	SD		
LQC (0.45 ng/mg)	0.404	0.440	0.727	0.703	0.022	95.407	5.131
MQC (9 ng/mg)	7.871	8.867	8.237	8.325	0.504	92.500	6.052
HQC (25 ng/mg)	27.355	27.324	26.302	26.994	0.599	107.975	2.220

จากผลการทดสอบความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ความเข้มข้นของ nicotine และ cotinine ในเส้นผม พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีความจำเพาะเจาะจง, ความถูกต้องแม่นยำ, ความเที่ยงตรง และมีประสิทธิภาพในการสกัด ดังนั้น วิธีวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาขึ้นนี้มีความเหมาะสมและน่าเชื่อถือ และสามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ความเข้มข้นของ nicotine และ cotinine ในเส้นผมได้

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ นางสาวขวัญเรือน เพ็ชรน้อย

ปัจจุบันเป็นนิสิตในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเภสัชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สำเร็จการศึกษาปริญญาตรี หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ชีวการแพทย์ จากมหาวิทยาลัยรังสิต เมื่อปีการศึกษา 2554

การฝึกอบรม

พ.ศ. 2554 ฝึกงานในหน่วยวิจัยเพื่อความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง (Centex Shrimp) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

พ.ศ. 2557 Training on the Use of Laboratory Animals of Scientific Purposes, Chulalongkorn University, Thailand

พ.ศ. 2557 Training of Good Clinical Practice for Biomedical Research (GCP Training), Mahidol Learning Center, Mahidol University, Thailand

พ.ศ. 2558 Genomic Medicine and Novel Cancer Therapy: Challenges and Opportunities, the pharmacological and Therapeutic Society of Thailand, Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University, Thailand

พ.ศ. 2558 Standard course in clinical trials and GCP training program 2015, Faculty of Medicine Chulalongkorn University, Thailand

พ.ศ. 2559 The 13th Asia Pacific Federation of Pharmacologist Meeting “New Paradigms in Pharmacology for Global Health”, The Berkeley Hotel Pratunam, Bangkok, Thailand

การตีพิมพ์เผยแพร่

พ.ศ. 2557 Thampayak I, Pradermwong K, Sukkumee V, Phetnoi K and Suwannasual U. Antioxidant and Antibacterial Effects of Water Extracts of Aegle marmelos, Musa eumusa and Piper nigrum. The 2nd Academic Science and Technology Conference (ASTC 2014), Mar 21, Miracle Grand Convention Hotel, Thailand

พ.ศ. 2558 Phetnoi K, Chariyavilaskul P, Buathong N and Wittayalertpanya S. CYP2A6 allele Frequencies in Thai Smokers attending the Medical Check-up Clinic at King Chulalongkorn Memorial Hospital. Proceedings of the 37th Congress on Pharmacology of Thailand Meeting (2015)

พ.ศ. 2559 Buathong N, Kalayasiri R, Chaliyavilaskul P, Phetnoi K and Ratananupong T. Association of cytochrome P450 2A6 polymorphism, anxiety, and environmental factors with cigarette smoking by Thai adults. Asian Biomedicine. 2016;10(2)

