Original Articles/นิพนธ์ต้นฉบับ

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง Caffeine และ Dextromethorphan ที่ระดับความเข้มข้นสูงโดย Human Liver Microsomes

ชรินทร สีด้วง[1], ชัยรัตน์ มานะเสถียรกิจ[1], พ.บ., Dr.med (พิษวิทยา), ว.ว. (นิติเวชศาสตร์), ชัชวิน ระงับภัย[1], พบ., ว.ว.(นิติเวชศาสตร์), วรวีร์ ไวยวุฒิ[2], พ.บ., Dr.med., อ.ว.(นิติเวชศาสตร์)

[1] ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

[2] สถาบันนิติวิทยาศาสตร์ กระทรวงยุติธรรม

บทคัดย่อ

Dextromethorphan เป็นยาที่มีโครงสร้างเป็นอนุพันธ์ isomer แบบ dextro-rotatory ของยาแก้ปวดกลุ่ม opioid หลังการรับประทานยาในมนุษย์ ยา dextromethorphan จะเกิดปฏิกิริยา demethylation โดยเอนไซม์ cytochrome P450 ทาง CYP2D6 ไปเป็น dextrorphan ในปัจจุบันยา dextromethorphan นิยมนำมาใช้เป็นยารักษาอาการไอ เนื่องจากมีฤทธิ์ยับยั้งศูนย์การไอ medullary ในสมองส่วนกลาง โดยการใช้ยา dextromethorphan ในช่วงระดับการรักษา ไม่มีผลทำให้เกิดอาการเคลิบเคลิ้มมีความสุข ลดอาการเจ็บปวด หรือเกิดอาการพิษอื่นๆ แต่อย่างไรก็ตามมีการนำยา dextromethorphan มาใช้ในทางที่ผิดเพื่อหวังผลในการเคลิบเคลิ้มมีความสุข โดยพบว่าการใช้ยา dextromethorphan ที่ขนาดยามากกว่า 360 mg ร่วมกับยาที่เสพติดอื่น เช่น กระท่อม หรือยานอนหลับ ทำให้เกิดอาการเคลิบเคลิ้มมีความสุข หรือช่วยลดอาการเจ็บปวดได้ ซึ่งในประเทศไทยพบจำนวนผู้ใช้ยาในทางที่ผิดเพิ่มมากขึ้น ซึ่งบางส่วนเกี่ยวข้องกับการเสียชีวิต นอกจากนี้พบว่านิยมใช้ยา dextromethorphan ร่วมกับ caffeine เนื่องจาก caffeine มีฤทธิ์กระตุ้นให้เกิดอาการสดชื่น กระปรี้กระเปร่า และสามารถหาซื้อได้ง่าย เนื่องจากเป็นส่วนประกอบในเครื่องดื่มหลายชนิด โดยในการศึกษานี้จะทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยา dextromethorphan และ caffeine ในหลอดทดลอง โดยสกัด dextromethorphan และเมตาบอไลท์คือ dextrorphan โดยใช้หลักการ solid phase extraction และตรวจวัดปริมาณโดยเทคนิค gas chromatography และ mass spectrometer

จากผลการการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยา dextromethorphan และ caffeine ในหลอดทดลองพบว่ากระบวนการเปลี่ยนแปลงยา dextromethorphan (0.1-5.0 μg/mL) ถูกยับยั้งอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) โดย caffeine (10-100 μg/mL) แต่ไม่มีผลกับเมตาบอไลท์คือ dextrorphan จึงสรุปได้ว่าพิษวิทยาของการใช้ยาร่วมกันระหว่าง dextromethorphan กับ caffeine ที่ระดับความเข้มข้นสูง อาจส่งผลให้ปริมาณยา dextromethorphan สามารถอยู่ในรูปที่ไม่เปลี่ยนแปลงในร่างกายมนุษย์ยาวนานขึ้น

คำสำคัญ: Dextromethorphan, Dextrorphan, ในหลอดทดลอง

Corresponding Author: ชรินทร สีด้วง
ภาควิชานิติเวชศาตร์ คณะแพทยศาตร์ ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

บทนำ

Dextromethorphan เป็นอนุพันธ์ของโคเดอีน ซึ่งมีฤทธิ์ต่อระบบประสาทหลายอย่าง เช่น ปิดกั้น NMDA receptor, neuronal nicotinic receptor, เพิ่มปริมาณสารสื่อสมอง serotonin และกระตุ้น sigma receptor[1] ยา dextromethorphan ผลิตขึ้นเพื่อเป็นยาแก้ไอ ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในรูปยาเม็ดและยาน้ำเชื่อม ขนาดยาที่ใช้ในการรักษาคือ 15-30 มิลลิกรัม ทุก 6-8 ชั่วโมง ซึ่งขนาดยาสูงสุดต่อวัน คือ 120 มิลลิกรัม[2] ในขนาดยาปกติจะไม่มีผลทำให้เกิดอาการเคลิ้มสุข ลดอาการปวดหรือความเป็นพิษโดยผลข้างเคียงของการรับประทานยาเกินขนาด ได้แก่ คลื่นไส้ อาเจียน วิงเวียนศีรษะ ง่วงซึม กล้ามเนื้อทำงานไม่ประสานกันหรือแข็งเกร็ง กล้ามเนื้อกระตุก พูดไม่ชัด ม่านตาขยาย เคลิบเคลิ้ม หัวใจเต้นเร็ว ความดันโลหิตสูง มึนงง ประสาทหลอน กระวนกระวาย สั่น ชัก ปวดศีรษะ สูญเสียความทรงจำ หมดสติ กดการหายใจ และอาจถึงแก่ชีวิตได้ อาการผิดปกติทางประสาทมักเกิดขึ้น หลังจากรับประทานยาไปแล้ว 15-60 นาที และอาการจะคงอยู่ประมาณ 6 ชั่วโมง[1]

Dextromethorphan เป็นสาเหตุของการติดยาทางจิตใจ แต่ไม่ทำให้ติดทางร่างกาย อย่างไรก็ดีพบรายงานการติดยาและทำให้เกิดอาการอยากยาจากการใช้ยาโดยวิธีสูดผงทางจมูกเป็นเวลานานประมาณ 2-3 เดือน ผลของ dextromethorphan ในระยะยาวต่อจิตใจยังไม่ทราบแน่ชัด แต่มีรายงานว่ามีผู้กินยา dextromethorphan 1,500 mg ในครั้งเดียว จะมีอาการประสาทหลอนเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงหลังจากกินยา จากนั้นตามด้วยอาการซึมเศร้า อยากฆ่าตัวตาย และนอนไม่หลับ เมื่อหยุดยาอาการจะหายไปและพบ

รายงานในผู้ป่วยอีกรายหนึ่งที่กินยาน้ำเชื่อมแก้ไอที่มียา dextromethorphan เป็นเวลา 8 ปี และเริ่มมีอาการประสาทหลอน แต่อาการนี้จะหายไปอย่างรวดเร็วเมื่อหยุดยา[1]

เนื่องจากมีผลทำให้เกิดอาการเคลิ้มสุข การใช้ยา dextromethorphan ในทางที่ผิดจึงเพิ่มมากขึ้น โดยรูปแบบการใช้ยาจะขึ้นกับความพึงพอใจของผู้ใช้ เช่น ยาแก้ไอชนิดเม็ดผสมกับน้ำอัดลม หรือการนำยาแก้ไอชนิดเม็ดไปบดเป็นผงและบรรจุในแคปซูล โดยการแพร่ระบาดของการใช้ dextromethorphan ในทางที่ผิดมีมากในหลายประเทศ เช่น สหรัฐอเมริกา สวีเดน ออสเตรเลีย เยอรมนี แคนนาดา เป็นต้น[3] สำหรับในประเทศไทย พบการแพร่ระบาดอย่างมากในพื้นที่ 5 จังหวัดชายแดนภาคใต้ โดยรู้จักกันในชื่อของ วันทูคอล 4x100, 8x100 และ 10x100 ซึ่งนิยมใช้กันในรูปของยาน้ำแก้ไอผสมกับน้ำอัดลม โซดา น้ำต้มใบกระท่อม ยากันยุงชนิดขด สารฟลูออเรสเซนต์ เหล้าแห้ง และยากล่อมประสาทเป็นต้น[4]

การใช้ยาร่วมกันหลายชนิดอาจทำให้เกิดปฏิสัมพันธ์ของยา ทำให้เกิดพิษต่อร่างกาย โดยทั่วไปการศึกษาปฏิสัมพันธ์ของยาจะศึกษาที่ระดับของการใช้รักษาปกติ อย่างไรก็ตาม การศึกษาปฏิสัมพันธ์ของยาที่ระดับการรักษาปกติจะให้ข้อมูลไม่เพียงพอสำหรับยาที่ใช้เป็นยาเสพติด เนื่องจากขนาดยาที่ใช้เป็นยาเสพติดจะใช้ยาในปริมาณสูง ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาในงานวิจัยนี้คือ เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง caffeine และ dextromethorphan ที่ระดับความเข้มข้นสูงโดย human liver microsomes โดยจะทำการตรวจวัดปริมาณของ dextromethorphan และ dextrorphan ซึ่งเป็นเมตาบอไลท์หลักของ dextromethorphan โดยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิทรี (Gas Chromatography-Mass Spectrometry) ซึ่งผลของงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับการตรวจทางนิติพิษวิทยา

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง caffeine และ dextromethorphan ที่ระดับความเข้มข้นสูงโดย human liver microsomes
2. เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจ dextromethorphan และ dextrorphan โดยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิทรี (Gas Chromatography-Mass Spectrometry)

วิธีการศึกษา

ศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่าง caffeine และ dextromethorphan ที่ระดับความเข้มข้นสูงโดย human liver microsomes ในหลอดทดลอง (*in vitro* experiment)

วิธีการวิจัย

1. Enzyme assay

ผสมสารในอัตราส่วนตามตารางที่ 1 ลงใน microcentrifuge tubes ขนาด 1.5 mL โดยในแต่ละหลอดจะประกอบด้วย 0.1 M โพแทสเซียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.4, 10 mM NADPH, dextromethorphan (0.1-5.0 μg/mL), caffeine (0-100 μg/mL) โดยมีปริมาตรรวม คือ 500 μL

ตารางที่ 1 ส่วนผสมของสารในแต่ละหลอดทดลอง

No caffeine					
Final Conc. of DEX (µg/mL)	From stock (µg/mL)	Used (µL)	Phosphate buffer (µL)	NADPH (µL)	HLM (µL)
0.1	1.0	50	387	50	13
1.0	20	25	412	50	13
3.0	20	75	362	50	13
5.0	20	125	312	50	13

Each test reaction has 10 µg/mL caffeine						
Final Conc. of DEX (µg/mL)	From stock (µg/mL)	Used (µL)	Stock 200 µg/mL caffeine (µL)	Phosphate buffer (µL)	NADPH (µL)	HLM (µL)
0.1	1.0	50	25	362	50	13
1.0	20	25	25	387	50	13
3.0	20	75	25	337	50	13
5.0	20	125	25	287	50	13

Each test reaction has 100 µg/mL caffeine						
Final Conc. of DEX (µg/mL)	From stock (µg/mL)	Used (µL)	Stock 200 µg/mL caffeine (µL)	Phosphate buffer (µL)	NADPH (µL)	HLM (µL)
0.1	1.0	50	250	137	50	13
1.0	20	25	250	162	50	13
3.0	20	75	250	112	50	13
5.0	20	125	250	62	50	13

* HLM = Human liver microsomes

จากนั้นนำไป preincubate ที่ 37°C 5 นาที โดยปฏิกิริยาจะเริ่มต้นเมื่อเติม human liver microsomes 0.25 mg หลังจากเติม human liver microsome แล้ว inclubate ต่อไปอีก 60 นาทีพร้อมเขย่าที่ความเร็ว 250 rpm โดยปฏิกิริยาจะหยุดเมื่อเติม 100 µL acetonitrile ที่ประกอบด้วย internal standard (dextromethorphan-d3) 0.5 µg/mL จากนั้นนำไป vortex แล้วนำไปสกัดโดยเทคนิค solid phase extraction ด้วยเครื่อง automated SPE workstation

2. วิธีการสกัด

โดย cartridge (Waters: Oasis MCX cartridge 3 cc/60 mg) จะถูกปรับสภาพให้พร้อมใช้งานด้วย เมทานอล 2 mL, น้ำกลั่น 2 mL จากนั้นตัวอย่างจะถูกเติมลงใน cartridge แล้วเติม น้ำกลั้น 3 mL, 0.1 M HCl 3 mL, 5% เมทานอลในน้ำ 2 mL เพื่อเป็นการล้างตัวอย่าง จากนั้น cartridge จะถูกทำให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน 10 นาที dextromethorphan และเมตาบอไลท์ จะถูก elute โดย 2% แอมโมเนียม ไฮดรอกไซด์ในเอทิลอะซิเตท 4 mL ส่วน caffeine จะถูก elute โดย อะซิโตน : คลอโรฟอร์ม (1:1) 4 mL จากนั้นนำ elutent ที่ได้ไประเหยแห้ง แล้วละลายกลับด้วยเมทานอล 100 µL ก่อนจะนำไปตรวจหาปริมาณสารด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์

3. เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิทรี

เครื่องที่ใช้คือ Agilent 5975C โดยใช้คอลัมน์ DB-5 GC column (30 m x 250 µm, film thickness 0.25 µm) แก๊ส flow rate 15.9 mL/min โหมด split ratio 10:1 อุณหภูมิที่ injector และ interface เท่ากับ 250°C และ 280°C ตาม

ลำดับ โดยใช้ program temperature เริ่มจากอุณหภูมิ 120°C 1 นาที, เพิ่มขึ้นด้วยอัตรา 60°C/นาที จนถึงอุณหภูมิ 200°C จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิจนถึง 280°C ด้วยอัตรา 10°C/นาที, injection volume เท่ากับ 1 µl และ total run time เท่ากับ 10.3 นาที

Mass spectra แสกนในช่วง 40-300 m/z และ electron impact ionization energy เท่ากับ 70 eV สำหรับการตรวจวัดปริมาณสารจะเลือกใช้ selective ion monitoring (SIM) mode และ ions ที่ m/z 82, 109, 194 สำหรับ caffeine, m/z 59, 150, 271 สำหรับ dextromethorphan, m/z 189, 200, 257 สำหรับ dextrorphan และ m/z 62, 153, 274 สำหรับ dextromethorphan-d3 (IS)

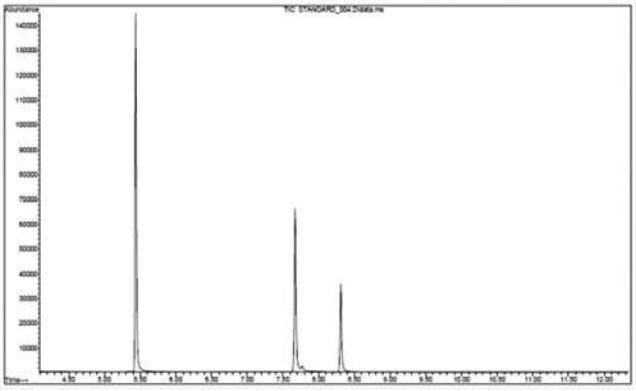
4. สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์

วิเคราะห์โดย SPSS Statistics version 18.0 โดย Descriptive statistics: Mean, standard deviation และหาความแตกต่างระหว่าง 2 กลุ่มโดย two-way ANOVA

ผลการศึกษา

1. Chromatographic separation

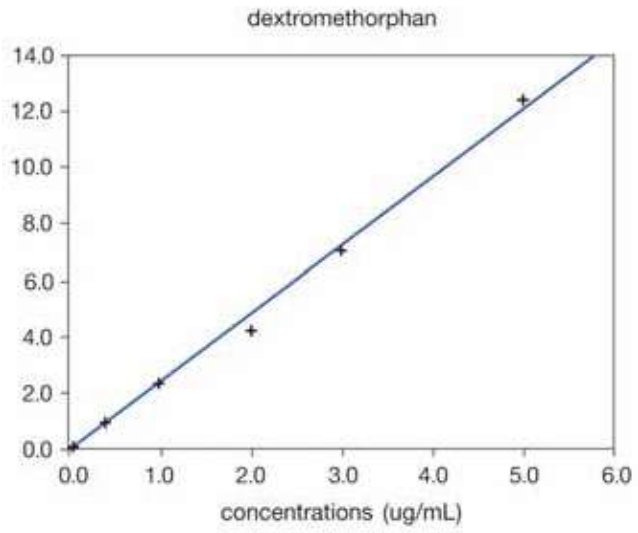
จาก total run time ที่ 10.33 นาที retention time ของ caffeine จะอยู่ที่ 5.42 นาที, dextromethorphan และ internal standard (dextromethorphan-d3) อยู่ที่ 7.64 นาที และ dextrorphan อยู่ที่ 8.30 นาที



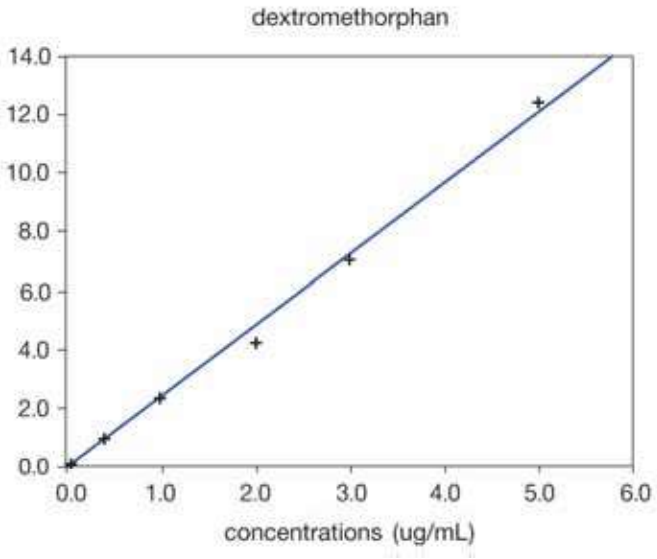
รูปที่ 1 SIM GC/MS chromatogram of standard mixture

2. Calibration and linearity

ระดับความเข้มข้นที่ใช้คือ 0, 0.05, 0.4, 1.0, 2.0, 3.0 และ 5.0 µg/mL ซึ่งมี internal standard 0.5 µg/mL โดย regression equation สำหรับ dextromethorphan คือ y = 1.21x (รูปที่ 2) regression equation สำหรับ dextrorphan คือ y=0.921x (รูปที่ 3 โดยมีค่า correlation coefficient (R2) = 0.996 and 0.995 ตามลำดับ



รูปที่ 2 Calibration curve of dextromethorphan



รูปที่ 3 Calibration curve of dextrorphan

3. Percent Recovery

ตารางที่ 2 The percent recovery at concentration 1.0 μg/mL

	% recovery			
Compound	**1**	**2**	**3**	**Mean ± SD**
Dextromethorphan	84.13	85.61	86.72	85.48 ± 1.30
Dextrorphan	80.57	83.74	83.21	82.51 ± 1.70

ตารางที่ 3 The percent recovery at concentration 4.0 μg/mL

	% recovery			
Compound	**1**	**2**	**3**	**Mean ± SD**
Dextromethorphan	85.50	86.01	86.56	86.02 ± 0.53
Dextrorphan	88.32	78.98	84.82	84.04 ± 4.72

4. *In vitro* interaction

ตารางที่ 4 ผลของ caffeine ต่อ dextromethorphan ในหลอดทดลองโดย human liver

	rate (ng/ml - *min^{-1} *mg^{-1} protein)			
	0 ng/mL caffeine	**10^4 ng/mL caffeine**	**10^5 ng/mL caffeine**	**total**
Dextromethorphan (10^2 ng/ml)				
Dextromethorphan	2.84 ± 0.077	2.09 ± 0.888	1.78 ± 0.965	2.24 ± 0.810
Dextromethorphan (10^3 ng/ml)				
Dextromethorphan	19.69 ± 2.621	17.96 ± 0.888	13.11 ± 5.426	16.92 ± 4.242
Dextromethorphan ($3x10^3$ ng/ml)				
Dextromethorphan	59.16 ± 3.212	56.31 ± 5.011	54.31 ± 4.707	56.59 ± 4.341
Dextromethorphan ($5x10^3$ ng/ml)				
Dextromethorphan	79.82 ± 9.195	52.00 ± 3.666	47.16 ± 5.475	59.66 ± 16.281
total	40.38 ± 32.248	32.09 ± 23.987	29.09 ± 23.464	33.85 ± 26.536

ตารางที่ 5 Tests of Between-Subjects Effects Dependent Variable: dextromethorphan

Source	**Type III Sum of Squares**	**df**	**Mean Square**	**F**	**Sig.**	**Partial Eta Squared**
Corrected Model	24196.342[a]	11	2199.667	117.637	.000	.982
Intercept	41254.123	1	41254.123	2206.249	.000	.989
Conc.	22224.581	3	7408.194	396.186	.000	.980
caffeine	820.579	2	410.289	21.942	.000	.646
Conc. * caffeine	1151.182	6	191.864	10.261	.000	.720
Error	448.770	24	18.699			
Total	65899.236	36				
Corrected Total	24645.112	35				

[a]. R Squared = .982 (Adjusted R Squared = .973)

จากตารางที่ 5 ผลของความเข้มข้นของ dextromethorphan และ caffeine ต่อ อัตราการลดลงของ dextromethorphan คำนวณโดย two-way ANOVA พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของ dextromethorphan ต่างกัน มีผลต่ออัตราการลดลงของ dextromethorphan ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P <0.0001) และที่ความเข้มข้นของ caffeine ต่างกันมีผลต่ออัตราการลดลงของ dextromethorphan ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P <0.0001)

ความสัมพันธ์ระหว่างผลของความเข้มข้นของ dextromethorphan และ caffeine ต่ออัตราการลดลงของ dextromethorphan พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ F (6, 24) =10.261, P <0.0001

จากตารางที่ 6 แสดงถึงความแตกอย่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P <0.0001) ของการลดลงของ dextromethorphan ที่ระดับความเข้มข้นของ dextromethorphan ที่แตกต่างกัน แต่ที่ระดับความเข้มข้นที่ 3 คือ $3x10^3$ ng/mL และระดับความเข้มข้นที่ 4 คือ $5x10^3$ ng/mLไม่แตกต่างกัน (P=0.873)

จากตารางที่ 7 แสดงถึงมีความแตกอย่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P <0.0001) ของการลดลงของ dextromethorphan ที่ระดับความเข้มข้นของ caffeine ที่แตกต่างกัน แต่ที่ระดับความเข้มข้นที่ 2 คือ 10^4 ng/mL ng/mL และระดับความเข้มข้นที่ 3 คือ 10^5 ng/mL ไม่แตกต่างกัน (P =0.307)

ตารางที่ 6 Multiple Comparisons of dextromethorphan by Bonferroni (concentration levels of dextromethorphan)

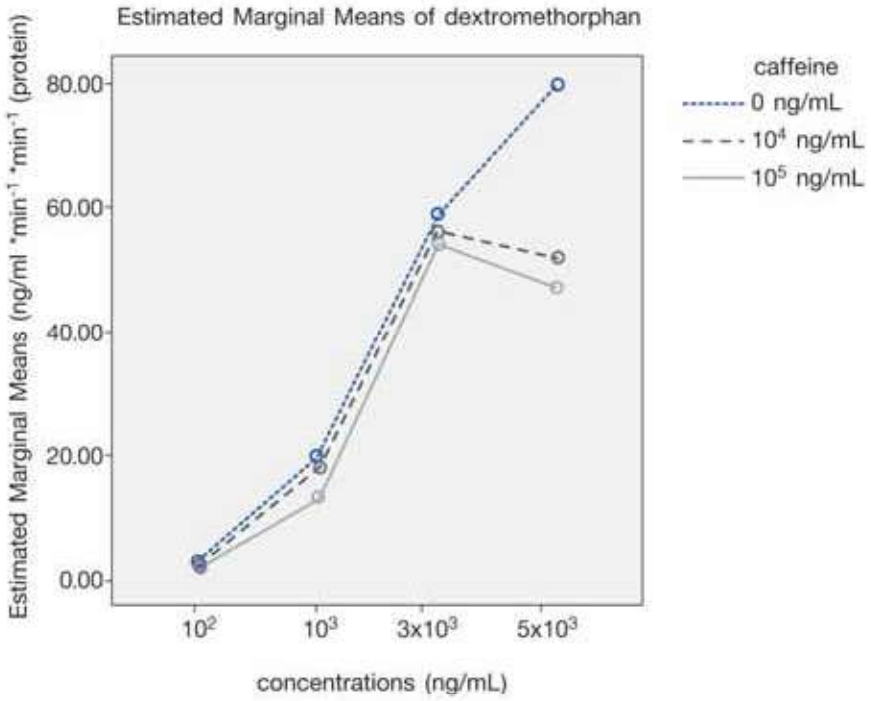
(I) conc.	(J) conc.	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1. 10^2	2. 10^3	-14.6815*	2.03845	.000	-20.5422	-8.8207
	3. $3x10^3$	-54.3556*	2.03845	.000	-60.2163	-48.4948
	4. $5x10^3$	-57.4222*	2.03845	.000	-63.2830	-51.5615
2. 10^3	3. $3x10^3$	-39.6741*	2.03845	.000	-45.5348	-33.8133
	4. $5x10^3$	-42.7407*	2.03845	.000	-48.6015	-36.8800
3. $3x10^3$	4. $5x10^3$	-3.06670	2.03845	.873	-8.9274	2.7941

Based on observed means.
The error term is Mean Square (Error) = 18.699.
* The mean difference is significant at the 0.05 level.

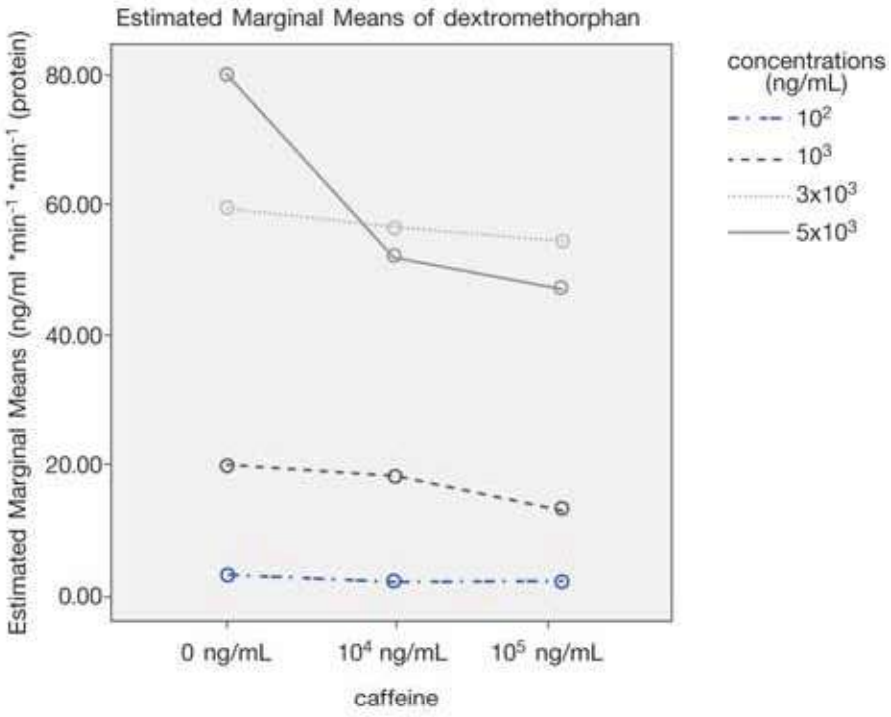
ตารางที่ 7 Multiple Comparisons of dextromethorphan by Bonferroni (concentration levels of caffeine)

(I) caffeine	(J) caffeine	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1. 0 ng/ml	2. 10^4 ng/ml	8.2889*	1.76535	.000	3.7455	12.8323
	3. 10^5 ng/ml	11.2889*	1.76535	.000	6.7455	15.8323
2. 10^4 ng/ml	3. 10^5 ng/ml	3.00000	1.76535	.307	-1.5434	7.5434

Based on observed means.
The error term is Mean Square (Error) = 18.699.
* The mean difference is significant at the 0.05 level.



รูปที่ 4 *Estimate marginal means of dextromethorphan of caffeine concentrations and concentrations of dextromethorphan*



รูปที่ 5 *Estimate marginal means of dextromethorphan of dextromethorphan concentrations and concentrations of caffeine*

จากภาพที่ 4 แสดงถึงแนวโน้มของการเพิ่มขึ้นของอัตราการลดลงของ dextromethorphan เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ dextromethorphan

ที่ความเข้มข้นของ caffeine เท่ากับ 10^4 และ 10^5 ng/mL ไม่มีความแตกต่างกันของแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของอัตราการลดลงของ dextromethorphan ที่ความเข้มข้นของ dextromethorphan เท่ากับ $3x10^3$ และ $5x10^3$ ng/mL.

จากภาพที่ 5 แสดงถึงแนวโน้มอัตราการลดลงของ dextromethorphan เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ caffeine โดยที่ความเข้มข้นของ dextromethorphan เท่ากับ $3x10^3$ และ $5x10^3$ ng/mL ไม่มีความแตกต่างกันของแนวโน้มอัตราการลดลงของ dextromethorphan ที่ความเข้มข้นของ caffeine เท่ากับ 10^4 and 10^5 ng/mL.

ตารางที่ 8 ผลของ caffeine ต่อ dextrorphan ในหลอดทดลองโดย human liver

	rate (ng/ml - *min^{-1} *mg^{-1} protein)			
	0 ng/mL caffeine	**10^4 ng/mL caffeine**	**10^5 ng/mL caffeine**	**total**
Dextromethorphan (102 ng/ml)				
Dextrorphan	3.47 ± 0.278	3.69 ± 0.539	3.47 ± 1.041	3.56 ± 0.611
Dextromethorphan (103 ng/ml)				
Dextrorphan	17.82 ± 2.740	18.31 ± 0.601	17.91 ± 1.735	18.01 ± 1.665
Dextromethorphan (3x103 ng/ml)				
Dextrorphan	26.58 ± 0.539	29.24 ± 1.952	28.93 ± 0.581	28.25 ± 1.644
Dextromethorphan (5x103 ng/ml)				
Dextrorphan	32.04 ± 6.043	30.31 ± 7.785	31.02 ± 6.549	31.13 ± 5.964
total	19.99 ± 11.614	20.39 ± 11.718	20.33 ± 11.795	20.24 ± 11.371

ตารางที่ 9 Test of Between-Subjects Effects Dependent Variable: dextrorphan

Source	**Type III Sum of Squares**	**df**	**Mean Square**	**F**	**Sig.**	**Partial Eta Squared**
Corrected Model	4211.939[a]	11	382.904	29.306	.000	.931
Intercept	14743.356	1	14743.356	1128.403	.000	.979
conc	4194.137	3	1398.046	107.001	.000	.930
caffeine	1.127	2	.563	.043	.958	.004
conc * caffeine	16.675	6	2.779	.213	.969	.050
Error	313.576	24	13.066			
Total	19268.871	36				
Corrected Total	4525.515	35				

[a]. R Squared = 0.931 (Adjusted R Squared = 0.899)

ตารางที่ 10 Multiple Comparisons of dextrorphan by Bonferroni (concentration levels of dextromethorphan)

(I) conc.	(J) conc.	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1. 10^2	2. 10^3	-14.4593*	1.70396	.000	-19.3583	-9.5602
	3. $3x10^3$	-24.6963*	1.70396	.000	-29.5953	-19.7972
	4. $5x10^3$	-27.5704*	1.70396	.000	-32.4694	-22.6713
2. 10^3	3. $3x10^3$	-10.2370*	1.70396	.000	-15.1361	-5.3380
	4. $5x10^3$	-13.1111*	1.70396	.000	-18.0102	-8.2121
3. $3x10^3$	4. $5x10^3$	-2.87411	1.70396	.628	-7.7731	2.0250

Based on observed means.
The error term is Mean Square (Error) = 13.066.
* The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ 11 Multiple Comparisons of dextrorphan by Bonferroni (concentration levels of caffeine)

(I) caffeine	(J) caffeine	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1. 0 ng/ml	2. 10^4 ng/ml	-.4000	1.47567	1.000	-4.1979	3.3979
	3. 10^5 ng/ml	-.3444	1.47567	1.000	-4.1423	3.4534
2. 10^4 ng/ml	3. 10^5 ng/ml	-.0556	1.47567	1.000	-3.7423	3.8534

Based on observed means.
The error term is Mean Square (Error) = 13.066

จากตารางที่ 9 ผลของความเข้มข้นของ dextromethorphan และ caffeine ต่อ อัตราการเกิดขึ้นของ dextrorphan คำนวณโดย two-way ANOVA พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของ dextromethorphan ต่างกัน มีผลต่ออัตราการเกิดขึ้นของ dextrorphan ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P <0.0001) และที่ความเข้มข้นของ caffeine ต่างกันไม่มีผลต่ออัตราการเกิดของ dextrorphan (P <0.958)

และที่ความสัมพันธ์ระหว่างผลของความเข้มข้นของ dextromethorphan และ caffeine ต่ออัตราการเกิดขึ้นของ dextrorphan พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ F (6, 24) = 0.213, P = 0.969

จากตารางที่ 10 แสดงถึงความแตกอย่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P <0.0001) ของการเกิดขึ้นของ dextrorphan ที่ระดับความเข้มข้นของ dextromethorphan ที่แตกต่างกัน แต่ที่ระดับความเข้มข้นที่ 3 คือ $3x10^3$ ng/mL และระดับความเข้มข้นที่ 4 คือ $5x10^3$ ng/mL ไม่แตกต่างกัน (P = 0.628)

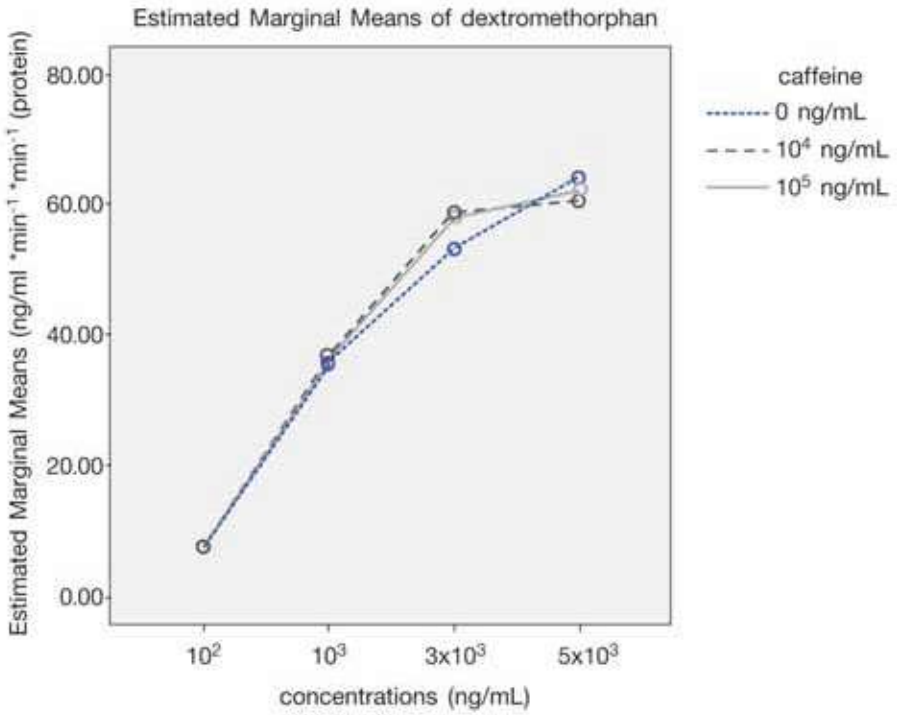
จากตารางที่ 11 แสดงถึงไม่มีความแตกอย่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P =1.000) ของการเกิดขึ้นของ dextrorphan ที่ระดับความเข้มข้นของ caffeine ที่แตกต่างกัน

ภาพที่ 6 แสดงถึงแนวโน้มของการเพิ่มขึ้นของอัตราการเกิดของ dextrorphan เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ dextromethorphan

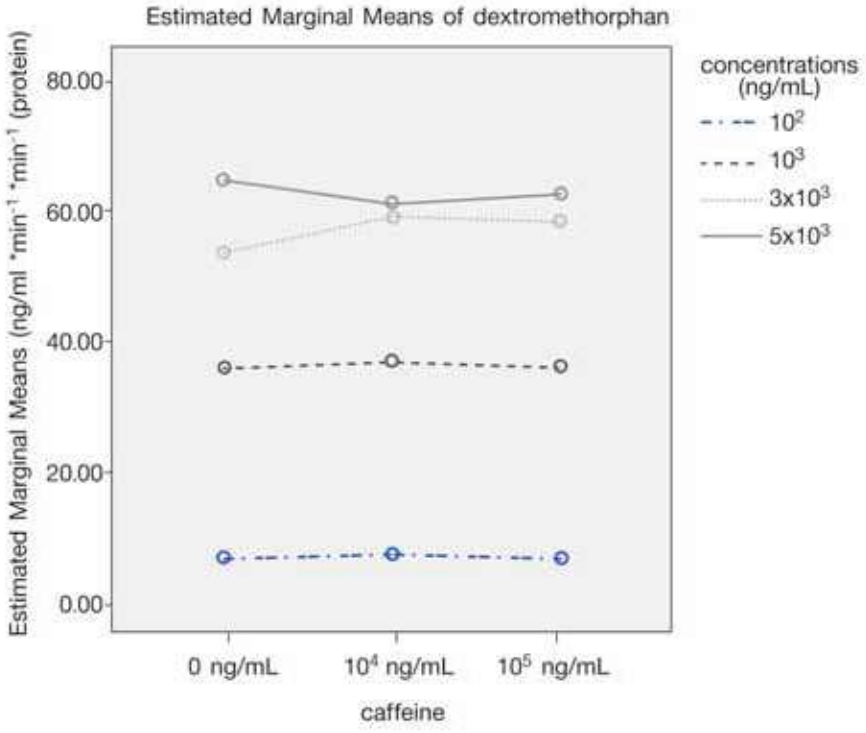
ที่ความเข้มข้นของ caffeine เท่ากับ 10^4 และ 10^5 ng/mL ไม่มีความแตกต่างกันของแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของอัตราการเกิดของ dextrorphan ที่ความเข้มข้นของ dextromethorphan เท่ากับ $3x10^3$ และ $5x10^3$ ng/mL.

ภาพที่ 7 แสดงถึงแนวโน้มอัตราการเกิดขึ้นของ dextrorphan เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ caffeine ซึ่งจากภาพไม่มีแนวโน้มของอัตราการเกิดขึ้นของ dextrorphan

ที่ความเข้มข้นของ dextromethorphan เท่ากับ $3x10^3$ และ $5x10^3$ ng/mL ไม่มีความแตกต่างกันของแนวโน้มอัตราการเกิดของ dextrorphan ที่ความเข้มข้นของ caffeine เท่ากับ 10^4 and 10^5 ng/mL.



รูปที่ 6 *Estimate marginal means of dextrorphan of caffeine concentrations and concentrations of dextromethorphan*



รูปที่ 7 *Estimate marginal means of dextrorphan of dextromethorphan concentrations and concentrations of caffeine*

อภิปรายผล

เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิทรี เป็นเทคนิคที่นิยมใช้กันอย่างมากในงานนิติเวชศาสตร์[5-10] และถือเป็นวิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจวิเคราะห์[11] โดยในการศึกษานี้ โครมาโตรแกรมแสดงถึงความสามารถในการแยกสารที่ต้องการวิเคราะห์เป็นอย่างดี

สำหรับการหาปริมาณของสารในการทดลอง ช่วงที่ใช้วิเคราะห์คือ 0 to 5.0 μg/mL โดยกราฟมาตรฐานทั้ง dextromethorphan และ dextrorphan มีค่าเป็นเส้นตรง โดยมีค่า linear regression coefficients ซึ่งมีค่ามากกว่า 0.995

ในการหาค่า percent recovery ของ dextromethorphan และ dextrorphan จากเทคนิคการสกัดแบบ solid phase extractionโดยใช้cartridge ชนิด mixed-mode polymeric sorbent: cation-exchange and reversed-phase (Waters Oasis®: MCX) ได้ค่า % recovery ที่ความเข้มข้น 1.0 μg/m เท่ากับ 85.48±1.30 และ 82.51±1.70 (ตารางที่ 2) ส่วนที่ความเข้มข้น 4.0 μg/m ได้ค่า % recovery เท่ากับ 86.02±0.53 และ 84.04±4.72 ตามลำดับ (ตารางที่ 3) เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาก่อนหน้าของ Yawney[12] พบว่าค่า % recovery ที่ได้มีค่าไม่แตกต่างกัน

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง caffeine และ dextromethorphan ที่ใช้ร่วมกัน ถูกศึกษาในเด็ก ที่ความเข้มข้นในระดับที่ใช้ในการรักษา (dextromethorphan 30 mg และ caffeine 25-46 mg) ซึ่งจากผลการวิจัยพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างเด็กกลุ่มที่ใช้ dextromethorphan เพียงอย่างเดียวกับเด็กกลุ่มที่ใช้ caffeine ร่วมด้วย[13] ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ โดยในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ศึกษาที่ความเข้มเข้นของ dextromethorphan และ caffeine ในระดับสูง (dextromethorphan 0.1-5.0 μg/mL และ caffeine 0-100 μg/mL) ซึ่งจากผลการวิจัยพบว่า dextromethorphan ถูกยับยั้งอัตราการเมตาบอไลท์โดย caffeine อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P <0.0001) (ตารางที่ 5) อย่างไรก็ตาม caffeineไม่มีผลต่อ dextrorphan ซึ่งเป็นเมตาบอไลท์หลักของ dextromethorphan (P = 0.958) (ตารางที่ 9)

การศึกษาความสัมพันธ์ของยาในหลอดทดลอง (*in vitro*) โดยใช้ human liver microsomes ที่ระดับความเข้มข้นสูงพบว่าอัตราการเมตาบอไลท์ของ dextromethorphan จะลดลงเมื่อมีการใช้ยาร่วมกับ caffeine ซึ่งเป็นสารที่พบได้ทั่วไปในเครื่องดื่มหลายชนิด จากผลการศึกษาถ้ามีการใช้ยาร่วมกันจะทำให้ dextromethorphan อยู่ในร่างกายมนุษย์ยาวนานขึ้นในระดับความเข้มข้นสูงซึ่งอาจก่อให้เกิดพิษต่อร่างกาย

ข้อเสนอแนะ

ในการตรวจวัดปริมาณ dextromethorphan และ dextrorphan ซึ่งเป็นเมตาบอไลท์หลักของ dextromethorphan ควรมีการตรวจวัดปริมาณ 3-methoxymorphinan และ 3-hydroxymorphinan ซึ่งเป็นเมตาบอไลท์ของ dextromethorphan เพิ่มเติม เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของยาทั้งสองชนิดว่ามีความสัมพันธ์อย่างไรใน pathway อื่น ที่นอกเหนือจาก dextrorphan หรือไม่

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์ โดยได้รับการสนับสนุนจากภาควิชานิติเวชศาสตร์ รวมถึงเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการนิติพิษวิทยาและนิติซีโรโลยี คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดี ซึ่งงานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากทุนวิทยานิพนธ์บัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล และทุนอุดหนุนบางส่วนจากสมาคมศิษย์เก่าบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

เอกสารอ้างอิง

1. ยาแก้ไอ dextromethorphan และการนำไปใช้ในทางที่ผิด [database on the Internet]. Available from: http://www.pharmacy.mahidol.ac.th/knowledge/files/0005.pdf.
2. Schwartz RH. Adolescent Abuse of Dextromethorphan. Clini Pediatr 2005;44:565-8.
3. Elora Hilmas P, Resident PP, Hospital JH. Adolescent Dextromethorphan Abuse Toxalert Maryland Poison Center 2001;18(1).
4. กศ., หนังสือวิทยาการสู่วิทยากรยาเสพติด เพื่อนวิทยากร ปีที่ 10 ฉบับที่ 3 มิถุนายน - กันยายน 2551: สำนักงาน ป.ป.ส.
5. Hasegawa C, Kumazawa T, Uchigasaki S, Lee XP, Sato K, Terada M, et al. Determination of dextromethorphan in human plasma using pipette tip solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. Anal Bioanal Chem 2011;401:2215-23.
6. Bagheri H, Es-haghi A, Rouini MR. Sol-gel-based solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry determination of dextromethorphan and dextrorphan in human plasma. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2005;818:147-57.
7. Statheropoulos M, Tzamtzis N, Mikedi K. Short column gas chromatography-mass spectrometry and principal component analysis for the identification of coeluted substances in doping control analysis. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1998;706:245-51.
8. Xu YX, Shen L, Zhang CJ. [Analysis of dextromethorphan and its metabolites in human urine by using gas chromatography-mass spectrometry]. Yao Xue Xue Bao 1993;28:156-9.
9. Baumann P, Jonzier-Perey M. GC and GC-MS procedures for simultaneous phenotyping with dextromethorphan and mephenytoin. Clin Chim Acta 1988;171:211-22.
10. Koppel C, Tenczer J, Ibe K. Urinary metabolism of dextromethorphan in man. Arzneimittelforschung 1987;37:1304-6.
11. PauP BD, Holler JM, Lyons TP, Past MR. Stable Isotopes as Valid Components for Identification of Drugs in Biological Specimens. Analyt Toxicol 2007;31:447-52.
12. Yawney J. Development of a General Screening Method for Acidic, Neutral, and Basic Drugs from Whole Blood Using the Oasis HLB® Columns and the Oasis MCX® Columns: University of Manitoba; 2001.
13. Evans WE, Relling MV, Petros WP, Meyer WH, Mirro J, Jr., Crom WR. Dextromethorphan and caffeine as probes for simultaneous determination of debrisoquin-oxidation and N-acetylation phenotypes in children. Clin Pharmacol Ther 1989;45:568-73.

Original Articles/นิพนธ์ต้นฉบับ

A Study of the *in Vitro* Interaction between Caffine and Dextromethorphan at High Concentrations Using Human Liver Microsomes

Seeduang C,[1] Manasatienkij C,[1] Dr.Med., Rangabphai C, MD.[1], Waiyawuth W, MD.[2]

[1] *Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University*

[2] *Central Institute of Forensic Science, Ministry of Justice*

Abstract

Dextromethorphan is a dextro-rotatory isomer of synthetical opioid levorphanol. In humans, it is mainly demethylated into dextrorphan after ingestation, by cytochrome P450 via CYP2D6 activity. Dextromethorphan is clinically used as a cough suppressant and exhibits its effect by depressing the medullary cough center in the mid brain. In therapeutic dosage, the drug has no effect on euphoria, pain relief, and also other unwanted toxicities. Unfortunately, dextromethorphan is presently used as an illicit party drug because of its euphoric effect. Dextromethorphan, when used at a dosage over 360 mg in combination with other creative drugs such as Kratom and other sedative drugs, causes the experiences of euphoria and pain relief. The number of abusers has reportedly been increasing in Thailand, and also has been related to several intoxicated deaths. In Thailand, dextromethorphan has been popularly used in a combination with caffeine because caffeine is normally a component in refreshments. In this study, Dextromethorphan and its main metabolite (dextrorphan) were extracted via in vitro reactions by mixed-mode (cation-exchange and reversed-phase) solid phase extraction and measured by gas chromatography and mass spectrometer.

In vitro interaction between dextromethorphan and caffeine was analysed to define its relationship. Metabolization of dextromethorphan (0.1-5.0 μg/mL) was significantly inhibited ($p < 0.001$) by caffeine (10-100 μg/mL) but not for its main metabolite, dextrorphan. These results suggest that toxicology of the coexistence of dextromethorphan and a high concentration of caffeine presence produces longer and stronger effects in the human body because the unchanged form of dextromethorphan remains long term while there is a high level of caffeine.

Key Words: Dextromethorphan / Dextrorphan / *In Vitro* Experiment

Corresponding Author: Seeduang C.

Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University