บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. ผลการวิเคราะห์หาปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนในน้ำนมคนโดยวิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์

1.1 ผลการศึกษาโดยวิธีที่ดัดแปลงจากบริษัทแนะนำ

ศึกษาโดยใช้แอนติบอดี และสารติดฉลากปริมาณ ½ ของที่บริษัทแนะนำ ปรากฏว่าได้กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์มอร์ฟีนดังรูปที่ 5 ซึ่งให้ความแตกต่างของการรวมตัวที่ปริมาณของมอร์ฟีนระหว่าง 0.125 และ 4 นาโนกรัมต่อหลอดทดลอง ประมาณ 48% จึงได้ใช้สภาวะเช่นเดียวกับการศึกษานี้ในการศึกษาต่อ ๆ ไป

1.2 ผลการศึกษาเปรียบเทียบกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานในบัสสาวะและสารมาตรฐานในบัฟเฟอร์

จากรูปที่ 6 เห็นได้ว่ากราฟมาตรฐาน เมื่อใช้สารมาตรฐานในบัสสาวะมีลักษณะเหมือนและเกือบขนานกับกราฟมาตรฐานเมื่อใช้สารมาตรฐานในบัฟเฟอร์ และกราฟมาตรฐานเมื่อใช้สารมาตรฐานในบัฟเฟอร์ให้ความแตกต่างของการรวมตัวที่ปริมาณมอร์ฟีนระหว่าง 0.125 และ 4 นาโนกรัมต่อหลอดทดลองประมาณ 50% ในการศึกษาต่อไป จึงเลือกใช้แต่กราฟมาตรฐานซึ่งใช้สารละลายมาตรฐานในบัฟเฟอร์ เพื่อเปรียบเทียบอิทธิพลของสารต่าง ๆ

1.3 ผลการศึกษาอิทธิพลของน้ำนมต่อกราฟมาตรฐาน

การศึกษานี้เป็นการศึกษาขั้นต้นที่จะทดสอบว่าน้ำนมมีอิทธิพลเพียงไร ต่อการรวมตัวของมอร์ฟีนและแอนติบอดี จากรูปที่ 7 แสดงว่าน้ำนมเพียง 50 ไมโครลิตร มีอิทธิพลอย่างมากต่อลักษณะของกราฟมาตรฐาน ในการศึกษาต่อไป จึงได้ศึกษาโดยการใช้สารละลายอินทรีย์สกัดมอร์ฟีนจากน้ำนมเสียก่อน แล้วจึงทดสอบอิทธิพลของสารที่ใช้สกัดคือคลอโรฟอร์ม ในขณะเดียวกันก็ศึกษาเพื่อทดสอบความสามารถของคอลัมน์เซฟาเดกซ์ LH-20 ในการขจัดสิ่งเจือปนด้วย

1.4 ผลการหาตำแหน่ง ^{3}H-มอร์ฟีนที่ ออกจากคอลัมน์และอายุการใช้งานของคอลัมน์

จากการศึกษาโดยใช้มอร์ฟีนผ่านคอลัมน์เซฟาเดกซ์ LH-20 และชะ ^{3}H -มอร์ฟีนออกจากคอลัมน์ด้วยสารละลายผสม คลอโรฟอร์ม :นอร์มอลเฮพเทน: เมทิลแอลกอฮอล์ : น้ำ ในอัตราส่วน 500:500:75:3 โดยปริมาตร พบว่าในช่วงแรก ๆ ไม่มีมอร์ฟีนผ่านออกจาก

คอลัมน์เลย มอร์ฟีนถูกชะออกมาในช่วงระหว่าง 16-29 ลูกบาศก์เซนติเมตร (รูปที่ 8) และโดยปกติการใช้คอลัมน์เซฟาเดกซ์ในการแยกสารนั้น สามารถนำคอลัมน์นั้นมาใช้ใหม่ได้ จึงได้ทดสอบอายุการใช้งานของคอลัมน์ จากรูปที่ 8 แสดงว่าคอลัมน์แต่ละอันมีอายุการใช้งานได้อย่างน้อย 4 เดือน

1.5 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของเซฟาเดกซ์ LH-20 ในการขจัดสิ่งเจือปนในคลอโรฟอร์มและน้ำนม

จากการศึกษาเพื่อทดสอบอิทธิพลของคลอโรฟอร์มและคลอโรฟอร์มที่สกัดมอร์ฟีนจากน้ำนมคนปกติที่มีผลต่อกราฟมาตรฐาน ดังรูปที่ 9 แสดงว่าคลอโรฟอร์มเพียงอย่างเดียวมีอิทธิพลน้อยมากต่อกราฟมาตรฐาน แต่เมื่อสกัดน้ำนมด้วยคลอโรฟอร์มจะมีอิทธิพลต่อกราฟมาตรฐาน จึงได้ทดลองประสิทธิภาพของคอลัมน์เซฟาเดกซ์ LH-20 ในการขจัดสิ่งเจือปนที่มีอยู่ในคลอโรฟอร์มและคลอโรฟอร์มที่สกัดน้ำนม ปรากฏว่าคอลัมน์เซฟาเดกซ์ LH-20 สามารถกำจัดอิทธิพลของสิ่งเจือปนที่มาจากคลอโรฟอร์ม และน้ำนมที่มีต่อกราฟมาตรฐานได้ ในการวิเคราะห์มอร์ฟีนในน้ำนม จึงใช้วิธีสกัดมอร์ฟีนจากน้ำนมก่อนด้วยคลอโรฟอร์ม แล้วใช้คอลัมน์เซฟาเดกซ์ LH-20 กำจัดสิ่งเจือปน แล้วจึงนำไปหาปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีน โดยวิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์เซฟาเดกซ์ LH-20 ในการกำจัดสิ่งเจือปน เมื่อใช้คลอโรฟอร์มสกัดน้ำนม 0.5, 1.0 และ 2.0 ลูกบาศก์เซนติเมตร และนำไปผ่านคอลัมน์เซฟาเดกซ์ พบว่าเซฟาเดกซ์ที่ใช้สามารถขจัดสิ่งเจือปนได้หมด (รูปที่ 10) ดังนั้นในการวิเคราะห์น้ำนมตัวอย่าง สามารถจะใช้น้ำนมในการวิเคราะห์ตั้งแต่ 0.5 ถึง 2.0 ลูกบาศก์เซนติเมตร

FIG. 5 STANDARD CURVE OF URINE MORPHINE RADIOIMMUNOASSAY

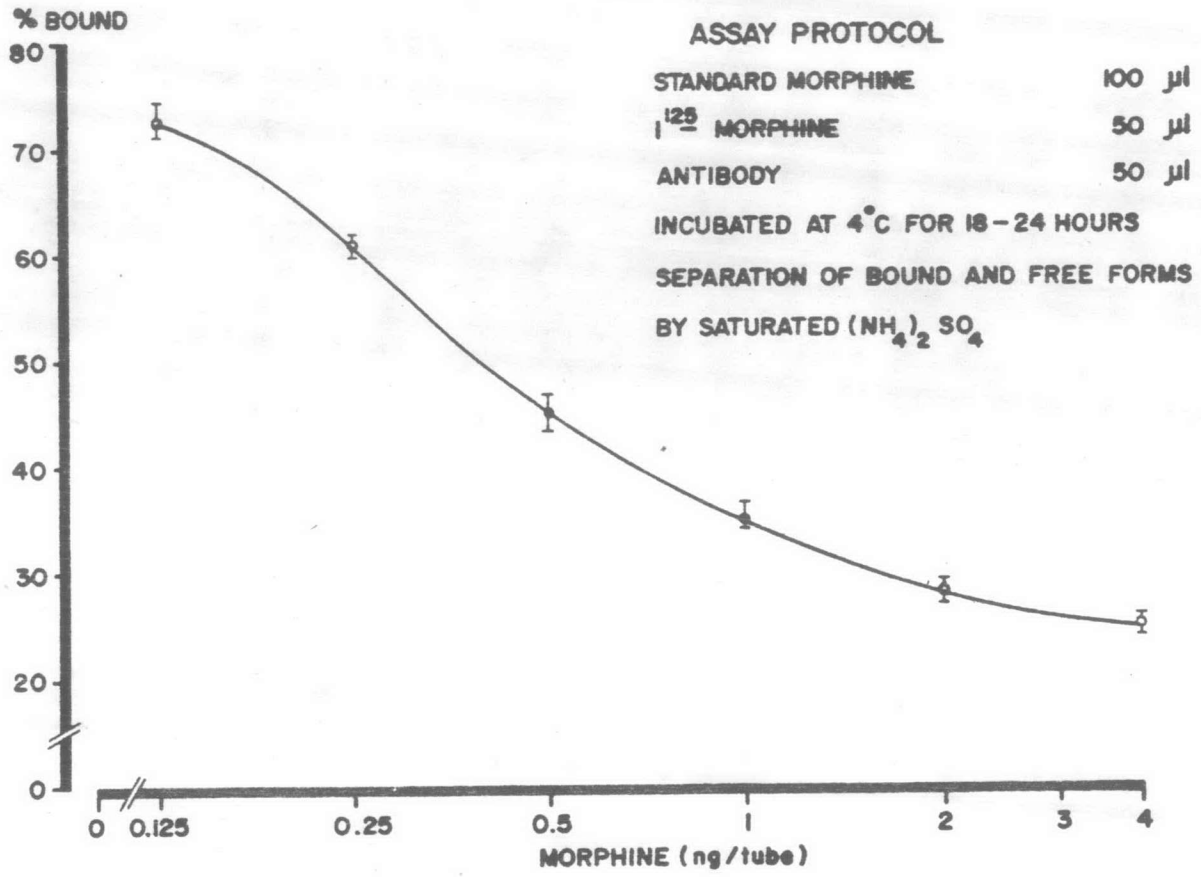
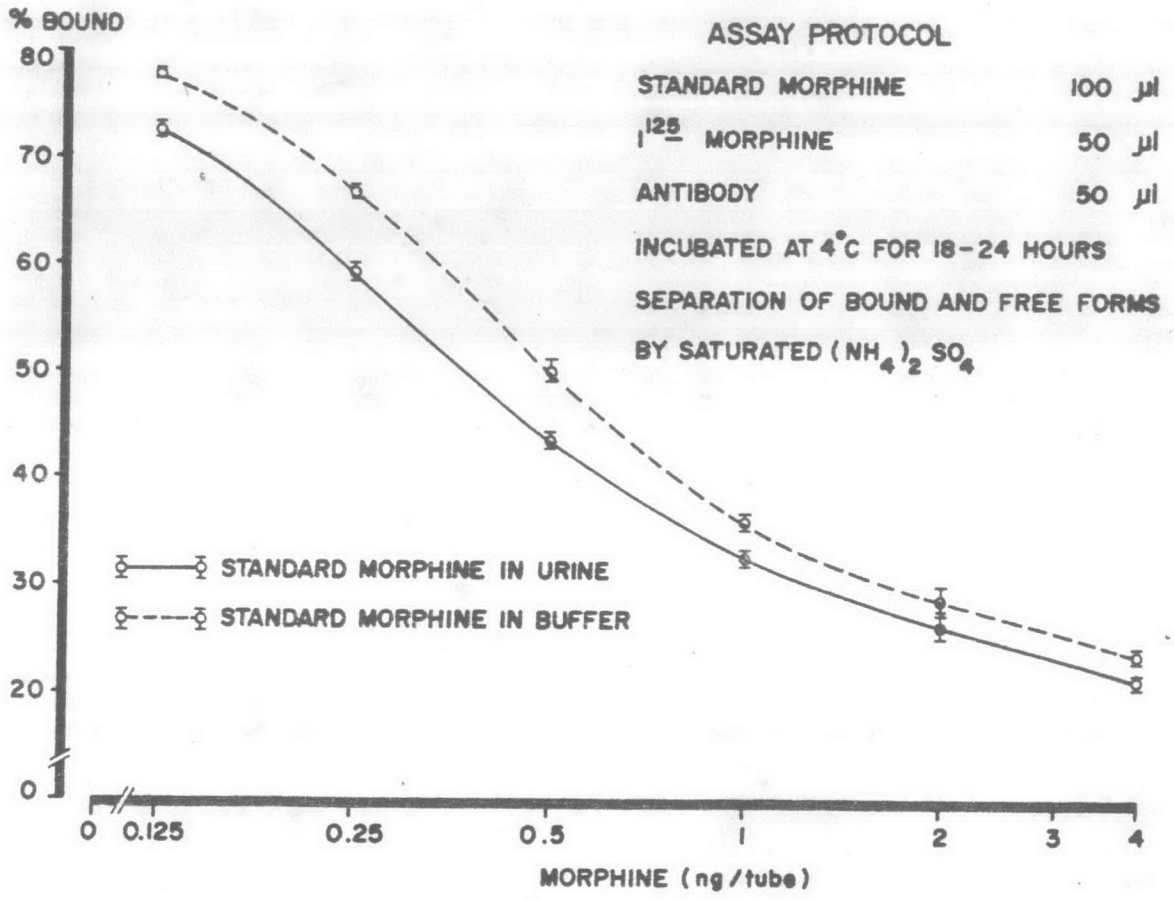


FIG. 6 STANDARD CURVE OF MORPHINE RADIOIMMUNOASSAY



I1660898

FIG. 7 EFFECT OF MILK ON STANDARD CURVE OF MORPHINE RADIOIMMUNOASSAY

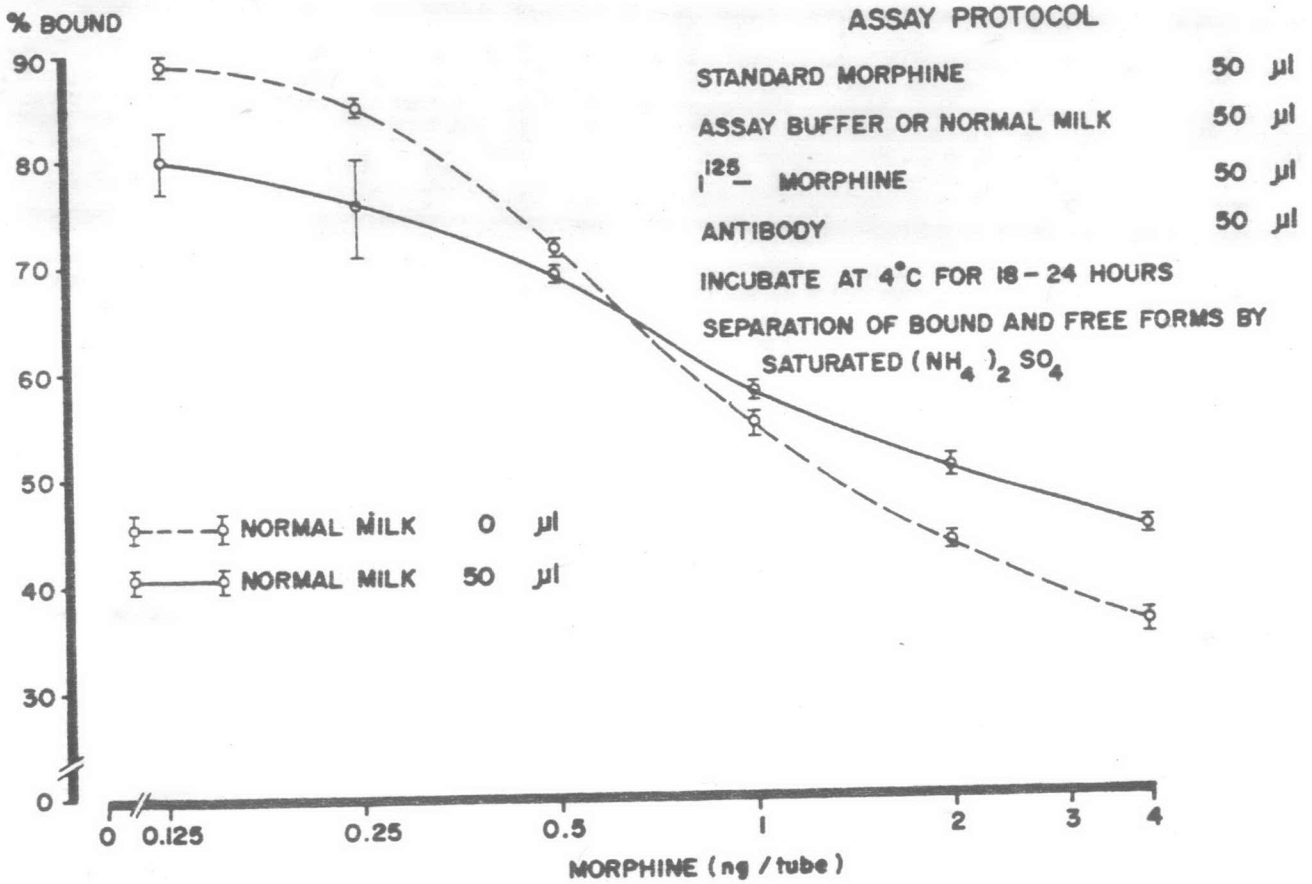


FIG.8 PROFILE OF THE SEPARATION OF MORPHINE BY SEPHADEX LH-20

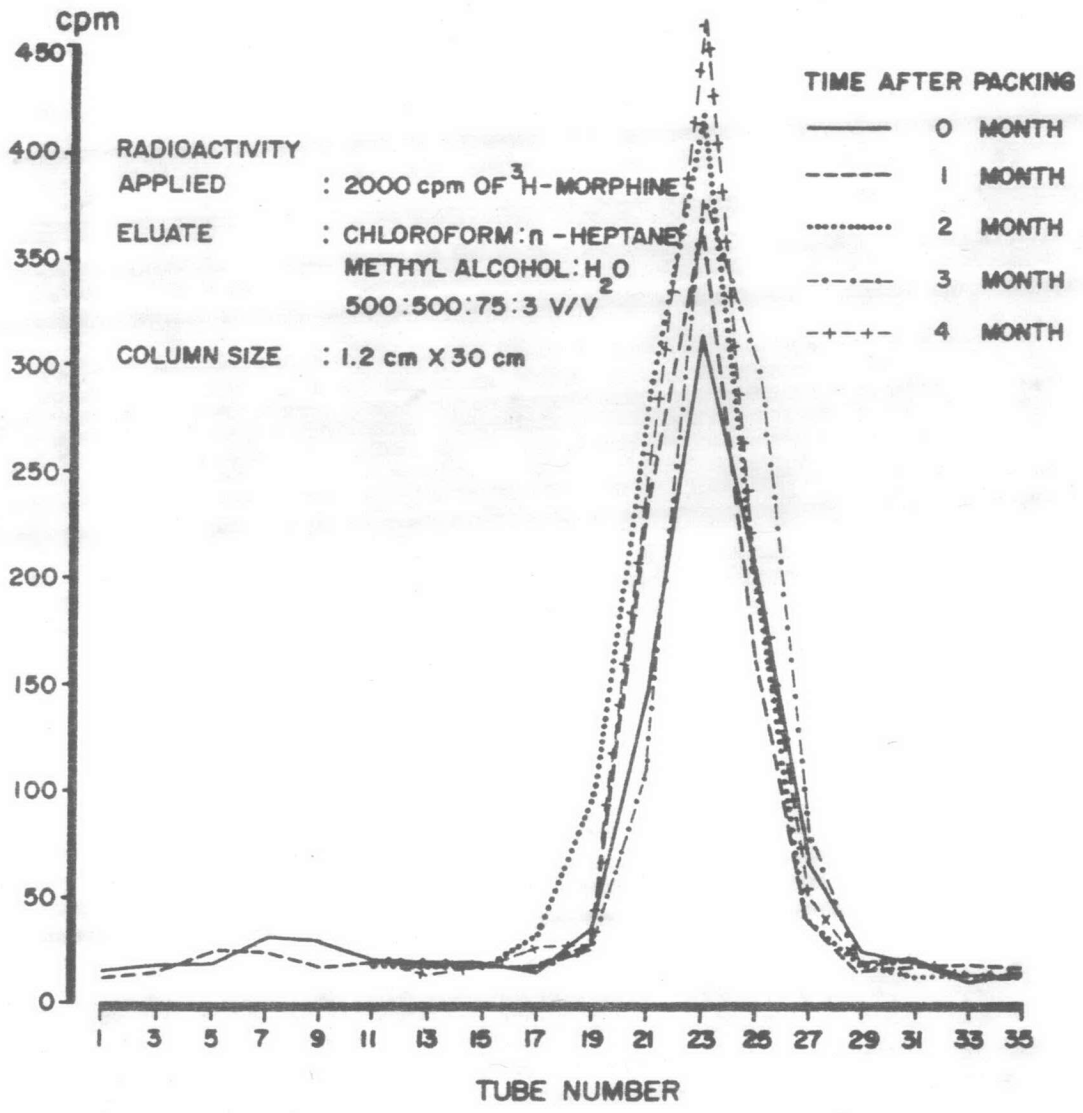


FIG.9 EFFECT OF SOLVENT AND MILK ON STANDARD CURVE OF MORPHINE RADIOIMMUNOASSAY

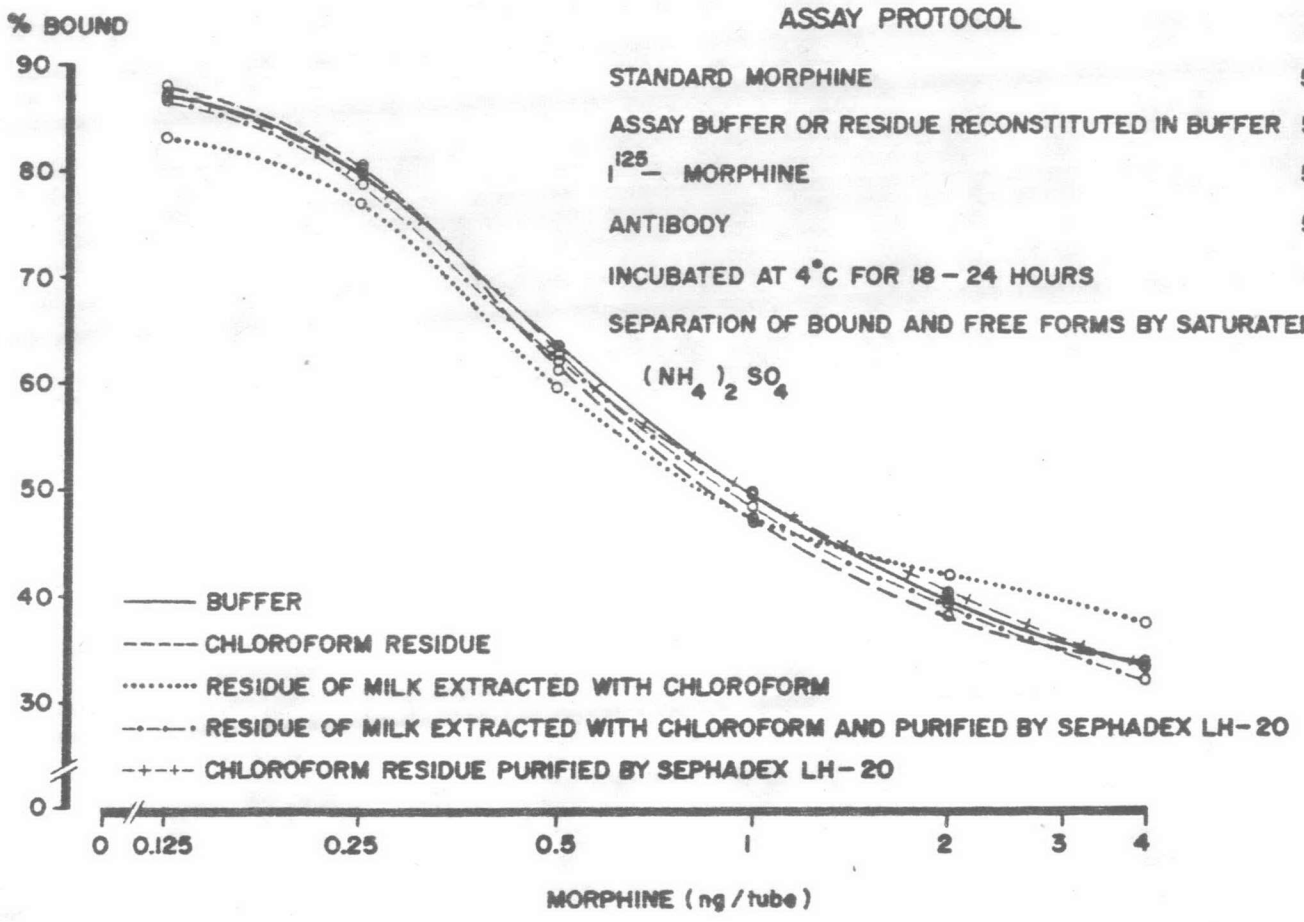
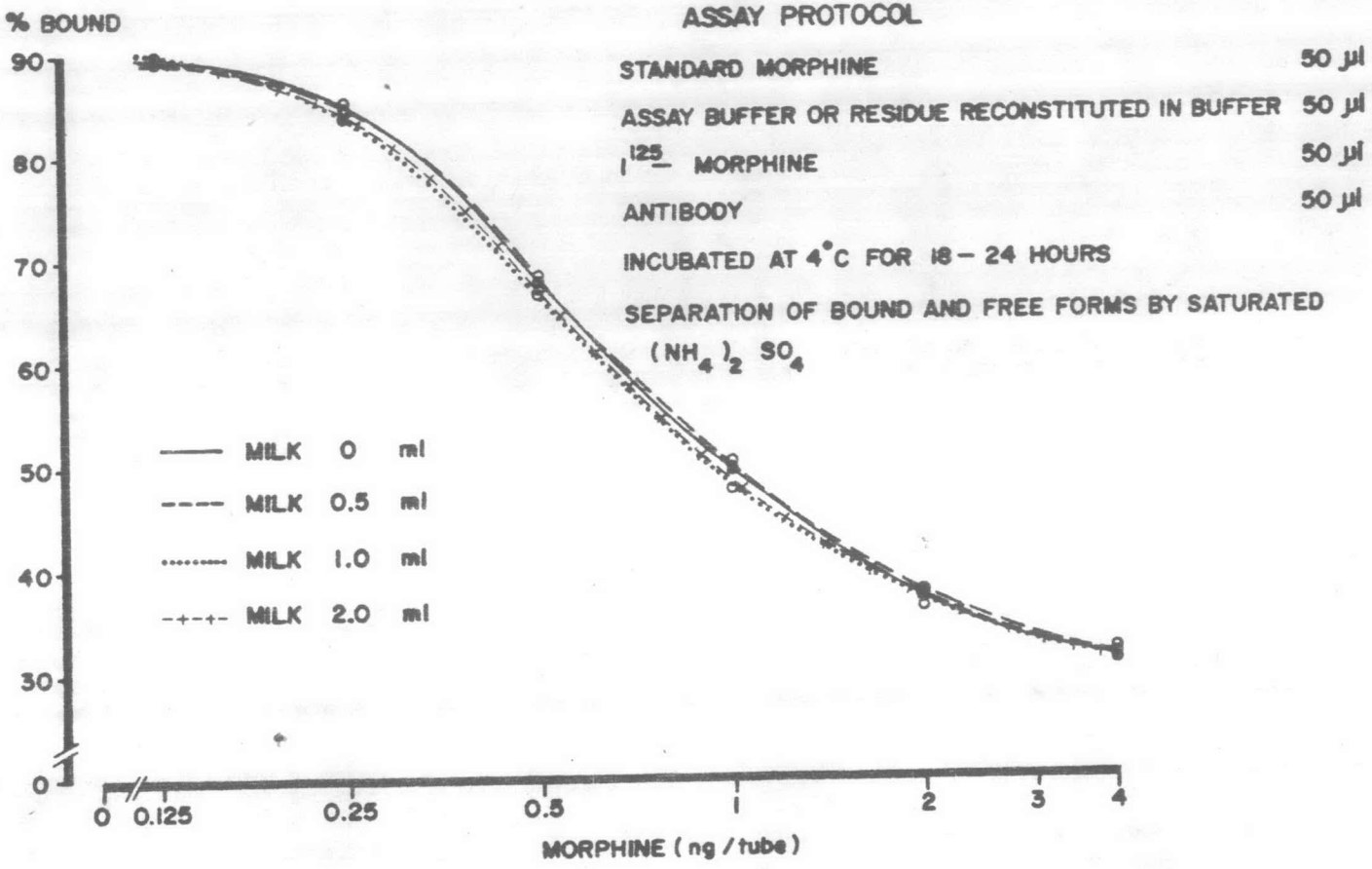


FIG. 10 STANDARD CURVE OF MORPHINE RADIOIMMUNOASSAY IN HUMAN MILK



1.6 ผลการทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธีทดลอง

1.6.1 ความจำเพาะของแอนติบอดี

รูปที่ 11 แสดงผลการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดี ซึ่งศึกษาในห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยยาเสพติด สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เห็นได้ว่าแอนติบอดีที่ใช้มีความจำเพาะสูง มีปฏิกิริยาข้ามชนิดสูงสุดกับโคเดอีน

1.6.2 ความไว ความแม่นยำ และความถูกต้องของการวิเคราะห์

จากการศึกษาความเชื่อถือได้ของวิธีวิเคราะห์ เมื่อใช้มอร์ฟีนมาตรฐาน 0.125-4 นาโนกรัมต่อหลอดทดลอง ได้ความไวของวิธีการวิเคราะห์เป็น 0.3 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตรของน้ำนม หรือ 0.06 นาโนกรัมต่อหลอดทดลอง (รูปที่ 12) สำหรับการทดสอบความแม่นยำของการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้นของมอร์ฟีนเป็น 10,15 และ 25 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ได้ค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนภายในการทดลองเดียวกันเป็น 5.1, 5.3 และ 6.6 ตามลำดับ และระหว่างการทดลองเป็น 7.5,6.0 และ 6.2 ตามลำดับ ค่าความถูกต้องของการวิเคราะห์ระหว่างร้อยละ 95.6 ถึง 98.3 (ตารางที่ 6 และ 7)

ตารางที่ 6 ความแม่นยำของการวิเคราะห์อนุพันธ์มอร์ฟีนในน้ำนมด้วยวิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์

Assay Variance	morphine concentration (ng/cm^3)		
	10	15	25
Within assay			
$\bar{X}$ (n=3)	10.0	14.8	24.7
SD	0.5	0.8	1.6
%CV	5.1	5.3	6.6
Between assay			
$\bar{X}$ (n=3)	9.9	14.2	24.6
SD	0.7	0.9	1.5
%CV	7.5	6.0	6.2

ตารางที่ 7 ความถูกต้องของการวิเคราะห์อนุพันธ์มอร์ฟีนในน้ำนมด้วยวิธีราดิโอ-อิมมิวโนแอสเสย์

Morphine added* (ng/cm^3)	Morphine measured (ng/cm^3)	Percentage recovery
10	9.9	98.0
15	14.2	95.6
25	24.6	98.3

* n = 3

FIG. 11 SPECIFICITY OF MORPHINE ANTIBODY

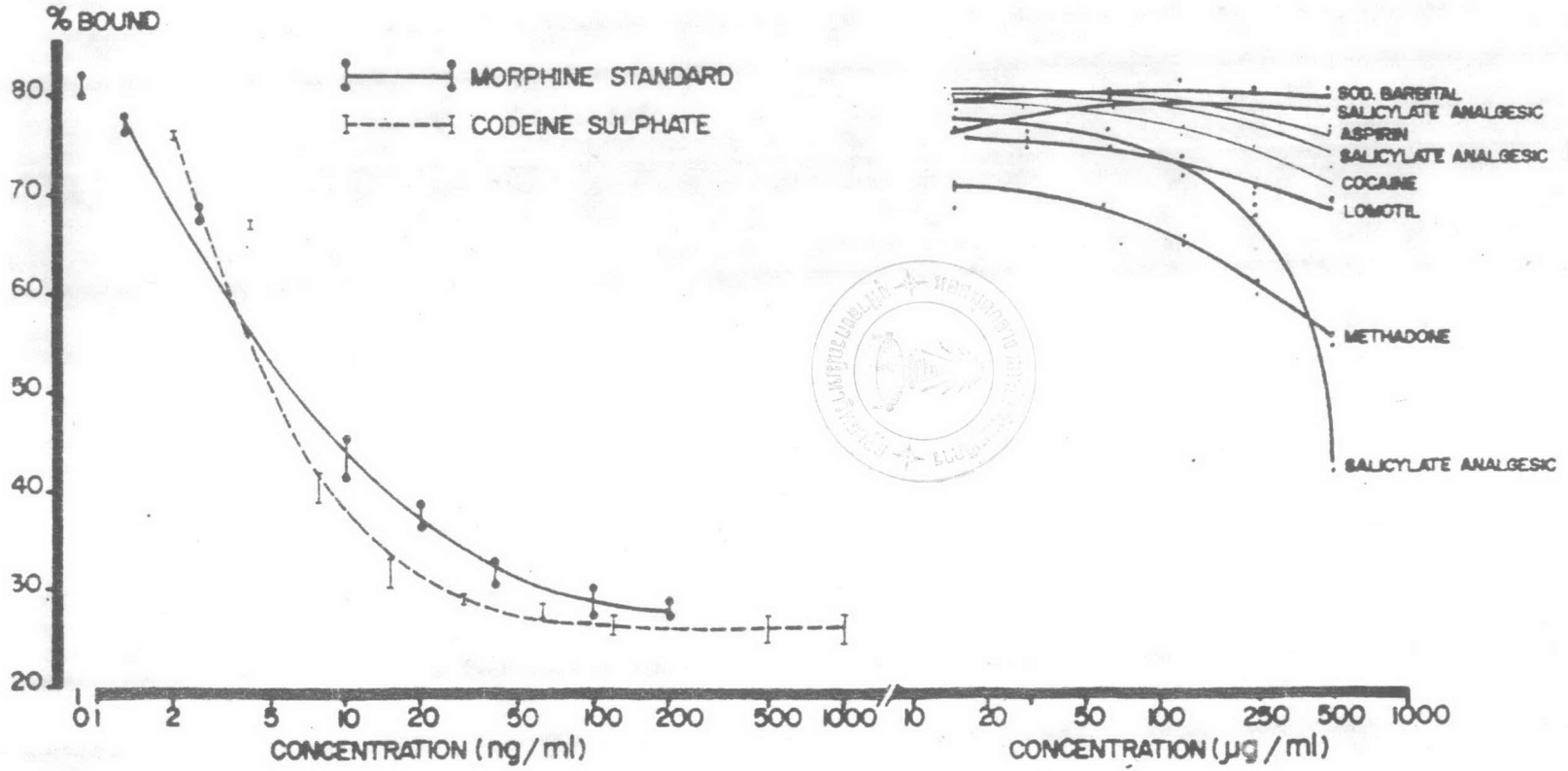
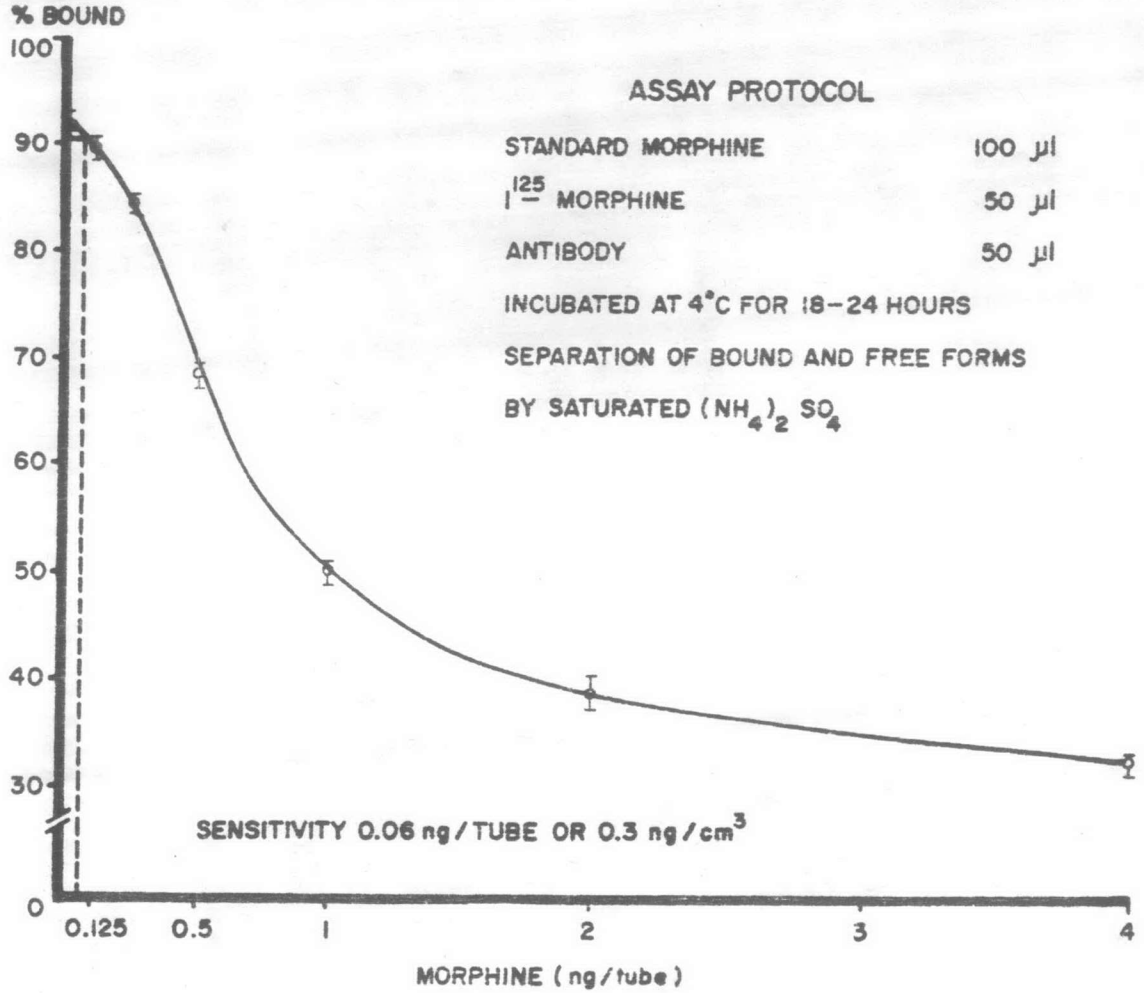


FIG. 12 STANDARD CURVE OF MORPHINE RADIOIMMUNOASSAY IN HUMAN MILK



1.7 ผลการวิเคราะห์ปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนในน้ำนมคนโดยวิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์

จากผลการหาปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีน ในน้ำนมสตรีชาวเขาที่ใช้สารประเภทฝิ่น 4 ราย และสตรีที่ใช้เฮโรอีน 1 ราย พบว่าปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนในน้ำนมมีค่าสูงสุดถึง 243 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร สำหรับในรายที่ 4 เก็บน้ำนมในวันเดียวกัน พบปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนในน้ำนมที่เก็บแต่ละครั้ง 3 ครั้ง มีค่าแตกต่างกัน คือ 56, 243 และ 109 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนในน้ำนมสตรีที่ติดยาเสพติด 5 ราย

รายที่	ครั้งที่เก็บ	วันที่	เวลา	ปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีน (นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร)
1	1	1 กค.22	8.00 น.	9
	2	1 กค.22	13.00 น.	24
2	1	-	-	0
	2	-	-	0
	3	-	-	0
3	1	28 พค.22	-	29
	2	28 พค.22	-	29
4	1	5 กค.22	-	56
	2	5 กค.22	-	243
	3	5 กค.22	-	109
	4	6 กค.22	-	44
5	1	25 กค.22	14.45 น.	38

\- ไม่ทราบวันและเวลาที่เก็บ
รายที่ 1-4 เป็นน้ำนมสตรีชาวเขาติดฝิ่น
รายที่ 5 เป็นน้ำนมสตรีที่ติดเฮโรอีน

1.8 ผลการวิเคราะห์ปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนในน้ำนมคนเปรียบเทียบกับในปัสสาวะโดยวิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์

การศึกษารูปแบบการขับถ่ายอนุพันธ์มอร์ฟีนในน้ำนมเปรียบเทียบกับในปัสสาวะในคนไข้ที่ใช้เฮโรอีนเบอร์ 4 ที่ได้รับการรักษาด้วยเมทาโดน เพื่ออดยา (รูปที่ 13) พบว่า

ระดับอนุพันธ์มอร์ฟีนในน้ำนมและในปัสสาวะก่อนการรักษาเป็น 292 และ39,375 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ตามลำดับ ระหว่างการรักษาระดับอนุพันธ์มอร์ฟีนในน้ำนมกับในปัสสาวะแปรตามกัน คือ ถ้าระดับอนุพันธ์มอร์ฟีนในปัสสาวะสูงระดับอนุพันธ์มอร์ฟีนในน้ำนมก็จะสูงด้วย มีข้อน่าสังเกต คือ ระดับอนุพันธ์มอร์ฟีนทั้งในน้ำนมและปัสสาวะมีค่าสูงต่ำสลับกันอยู่ตลอดช่วงการรักษาทั้ง 26 วัน ตั้งแต่วันที่ 20 ของการรักษาเป็นต้นไป ระดับอนุพันธ์มอร์ฟีนทั้งในน้ำนมและในปัสสาวะมีค่าสูงเกือบจะเท่ากับก่อนการรักษา จนกระทั่งวันที่ 26 ของการรักษาคนไข้หยุดรักษาและกลับไปใช้เฮโรอีนอีก ระดับอนุพันธ์มอร์ฟีนในน้ำนมและในปัสสาวะในระยะนี้สูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเจน ก่อนที่คนไข้จะกลับไปรักษาอีกเป็นครั้งที่ 2 พบว่าระดับอนุพันธ์มอร์ฟีนในน้ำนมและในปัสสาวะขึ้นสูงถึง 855 และ 165,312 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อรักษาครั้งที่ 2 ระดับอนุพันธ์มอร์ฟีนทั้งในน้ำนมและในปัสสาวะค่อย ๆ ลดลง แต่สังเกตได้ว่าระดับอนุพันธ์มอร์ฟีนในน้ำนมระหว่างการรักษาครั้งที่ 2 ค่อนข้างต่ำกว่าการรักษาครั้งแรก หลังจากวันที่ 12 ของการรักษาครั้งที่ 2 คนไข้หยุดไป 2 วัน ปรากฏว่าระดับอนุพันธ์มอร์ฟีนในน้ำนมและในปัสสาวะสูงขึ้นอีก วันสุดท้ายของการรักษาระดับอนุพันธ์มอร์ฟีนในปัสสาวะขึ้นสูงถึง 262,500 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ขณะที่ระดับอนุพันธ์มอร์ฟีนในน้ำนมเป็น 78 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร จากการติดตามผลการรักษา โดยวิธีนี้พอจะสรุปได้ว่าปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนในน้ำนมและในปัสสาวะให้ผลโดยเฉลี่ยแปรตามกัน

2. ผลการวิเคราะห์ปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนในข้าวสารโดยวิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์

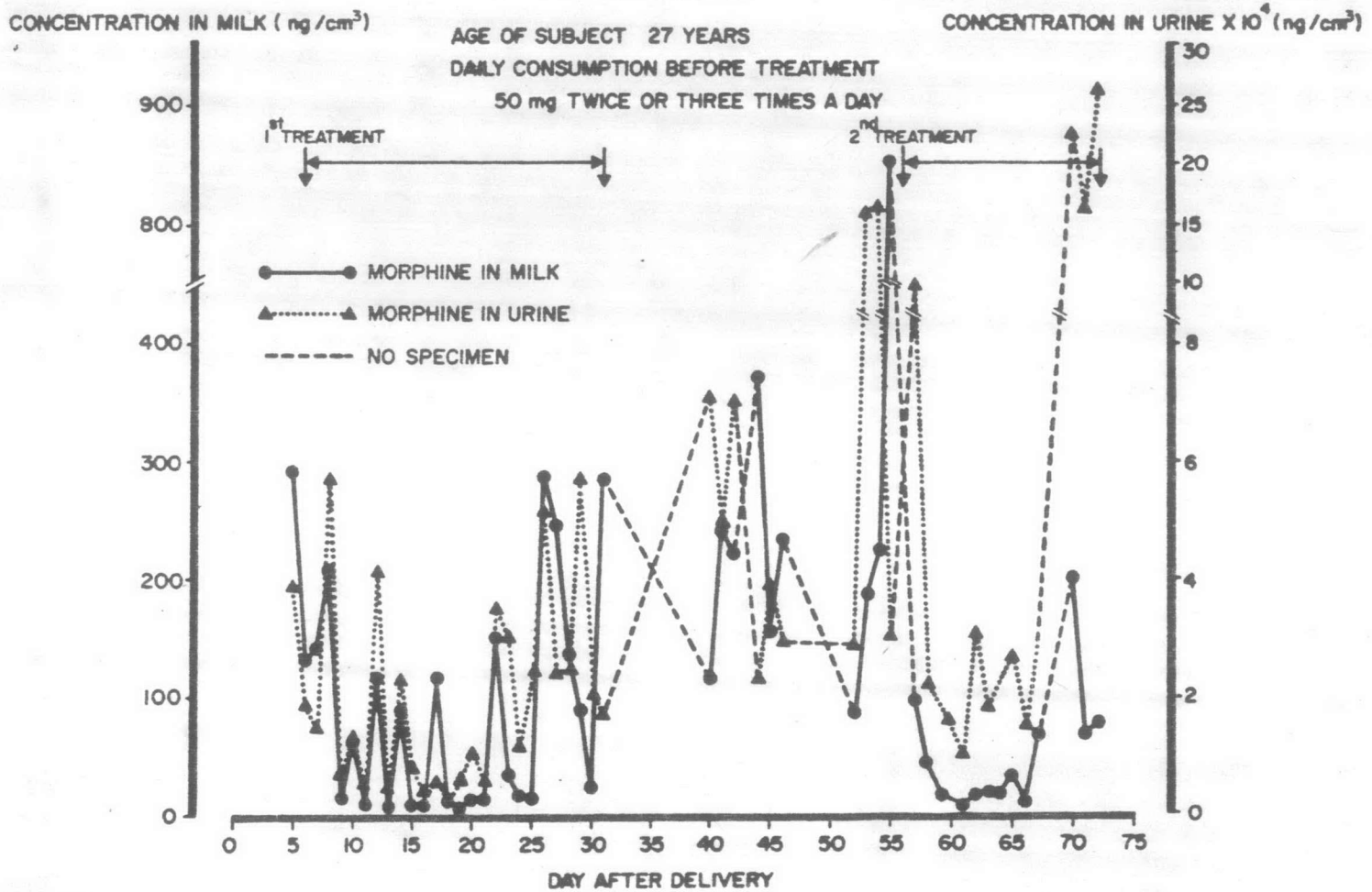
จากการวิเคราะห์ข้าวสารปกติ ไม่พบอนุพันธ์มอร์ฟีน แต่ในข้าวสารตัวอย่างพบอนุพันธ์มอร์ฟีนเพียงเล็กน้อย มีค่าอยู่ระหว่าง 0.43 ถึง 2.5 นาโนกรัมต่อข้าวสาร 1 กรัม (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 ปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนในข้าวสารปกติ และข้าวสารตัวอย่าง

ข้าวสาร	ปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีน (นาโนกรัมต่อข้าวสาร 1 กรัม)
ข้าวสารปกติ	-
ข้าวสารตัวอย่างที่ 1	0.43
ข้าวสารตัวอย่างที่ 2	2.5
ข้าวสารตัวอย่างที่ 3	0.45
ข้าวสารตัวอย่างที่ 4	1.72
ข้าวสารตัวอย่างที่ 5	2.25
ข้าวสารตัวอย่างที่ 6	2.47

- = ตรวจไม่พบ

FIG. 13 EXCRETION PROFILE OF MORPHINE LIKE SUBSTANCE IN MILK AND URINE OF A HEROIN ADDICTED WOMAN



3. ผลการวิเคราะห์ปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนในเมล็ดฝิ่นโดยวิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์

เมื่อนำตัวอย่างเมล็ดฝิ่นไปวิเคราะห์หาปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีน พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 2,162 ถึง 6,118 นาโนกรัมต่อเมล็ดฝิ่น 1 กรัม (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 ปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนในเมล็ดฝิ่น

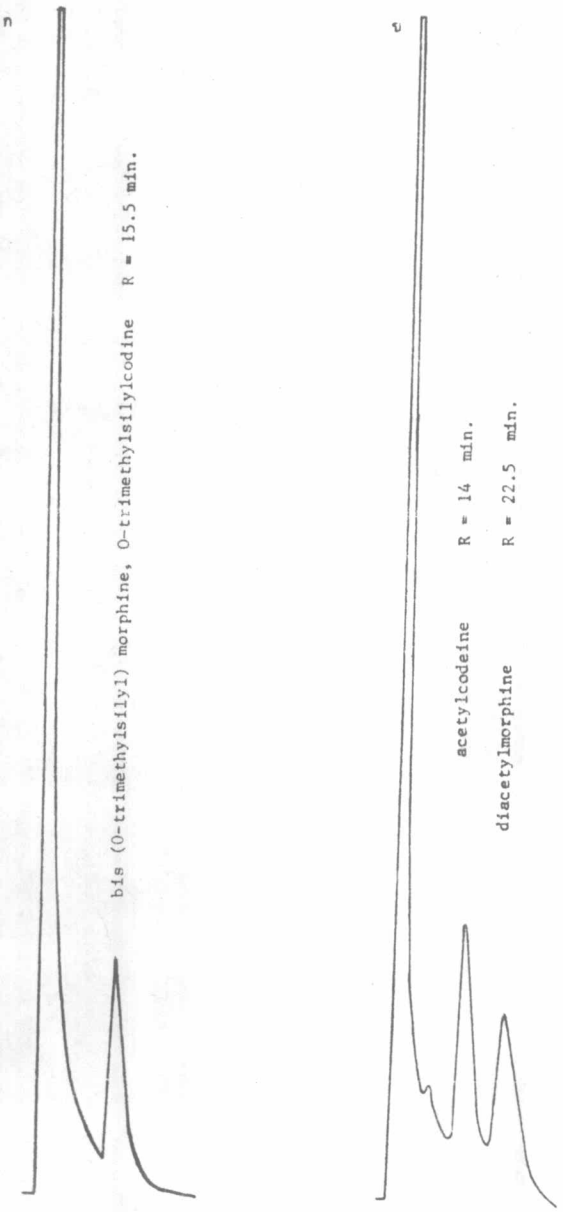
ตัวอย่างเมล็ดฝิ่น	ปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีน (นาโนกรัมต่อเมล็ดฝิ่น 1 กรัม)
1	5,000
2	4,737
3	2,162
4	6,118

4. ผลการวิเคราะห์มอร์ฟีนและโคเดอีนในเมล็ดฝิ่น และข้าวสารโดยวิธีแกสโครมาโตกราฟฟี

ในรายงานนี้แสดงผลการศึกษา ความสามารถของคอลัมน์ 3 ชนิด ในการวิเคราะห์อนุพันธ์มอร์ฟีนและโคเดอีน 2 ชนิด โดยใช้ดีเทคเตอร์ 2 แบบ เริ่มจากการหาสภาวะที่เหมาะสมของคอลัมน์ 3 ชนิด เมื่อใช้ดีเทคเตอร์แบบ FID เพื่อวิเคราะห์อนุพันธ์แบบอะเซทิลเลชั่นและซิลิเลชั่น เมื่อได้คอลัมน์ที่เหมาะสมแล้ว จึงนำคอลัมน์นี้ไปศึกษาเปรียบเทียบการใช้ดีเทคเตอร์แบบ FID และ TSD แล้วจึงนำคอลัมน์และสภาวะที่เหมาะสมไปใช้วิเคราะห์มอร์ฟีนและโคเดอีนในเมล็ดฝิ่นและข้าวสาร

4.1 ผลการศึกษาเพื่อหาชนิดของคอลัมน์ และสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์มอร์ฟีนและโคเดอีน

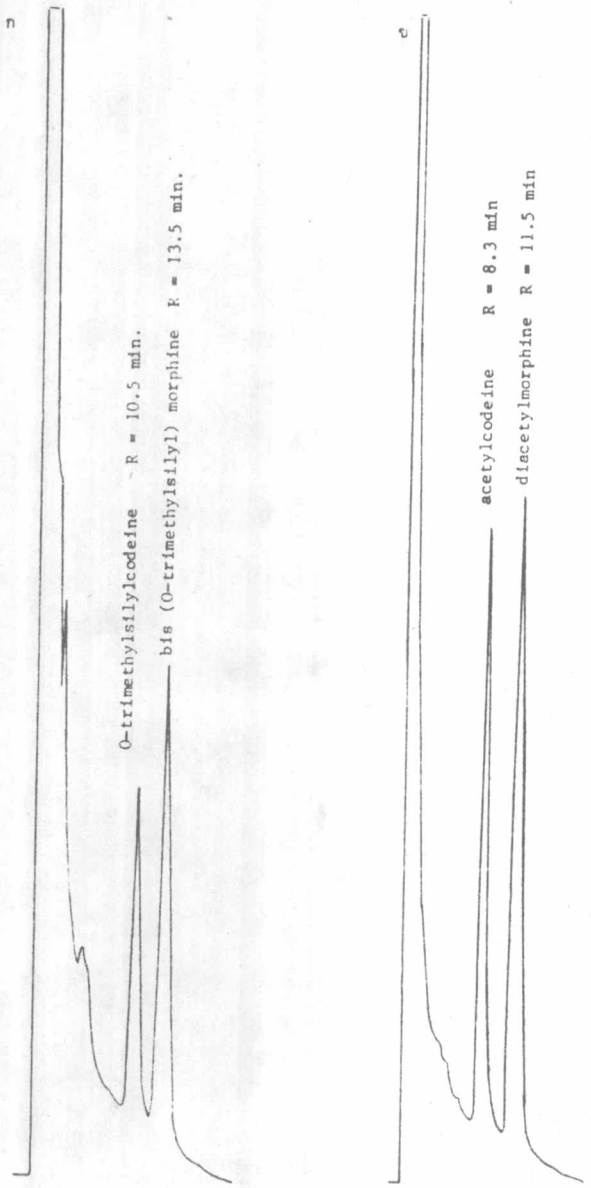
ผลการวิเคราะห์อนุพันธ์แบบอะเซทิลเลชั่น และซิลิเลชั่นของมอร์ฟีนและโคเดอีนด้วยคอลัมน์ 3 ชนิด โดยใช้ดีเทคเตอร์แบบ FID ในสภาวะที่เหมาะสมสำหรับคอลัมน์และอนุพันธ์แต่ละชนิด ได้โครมาโตแกรม ดังรูปที่ 14,15,16 ปรากฏว่าคอลัมน์ที่บรรจุด้วย 3% SE-30 บน Gas Chrom Z ขนาด 100-120 mesh ให้ peak อนุพันธ์ของมอร์ฟีนและโคเดอีนแคบ มี symmetry และ peak ของอนุพันธ์ 2 ชนิด ทั้งของมอร์ฟีนและโคเดอีนแยกกันอย่างชัดเจน นอกจากนี้ค่า retention time จากการใช้คอลัมน์นี้มีค่าน้อยกว่าเมื่อใช้คอลัมน์อีก 2 ชนิด (ตารางที่ 11) เมื่อใช้คอลัมน์นี้ไปวิเคราะห์อนุพันธ์แบบอะเซทิลเลชั่นของมอร์ฟีนและโคเดอีน เปรียบเทียบการใช้ดีเทคเตอร์แบบ FID กับ TSD ปรากฏว่าได้โครมาโตแกรม ดังรูปที่ 17 เห็นได้ว่าการใช้ TSD ให้ผลการแยกคล้ายกับการใช้ FID แต่ retention time เมื่อใช้ TSD จะนานกว่าเมื่อใช้ FID เล็กน้อย (ตารางที่ 12) ในการทดลองต่อไป ได้ใช้คอลัมน์และสภาวะนี้ในการวิเคราะห์อนุพันธ์ของมอร์ฟีนและโคเดอีนในสารตัวอย่าง โดยใช้ดีเทคเตอร์ทั้ง 2 แบบ



รูปที่ 14 โครมาโตแกรมแสดงอนุพันธ์แบบซิลิเลชั่น (ก) และอะเซทิลเลชั่น (ข) ของมอร์ฟีนและโคเดอีนโดยใช้คอลัมน์ 3% OV-17 บน Chromosorp WHP (80-100 mesh)

สารตัวอย่าง มอร์ฟีน 175 นาโนกรัม และโคเดอีน 85 นาโนกรัม ผ่านการสกัดตามวิธีในข้อ 9.1 เตรียมอนุพันธ์แบบซิลิเลชั่น (ข้อ 9.6.2) และอะเซทิลเลชั่น (ข้อ 9.6.1)

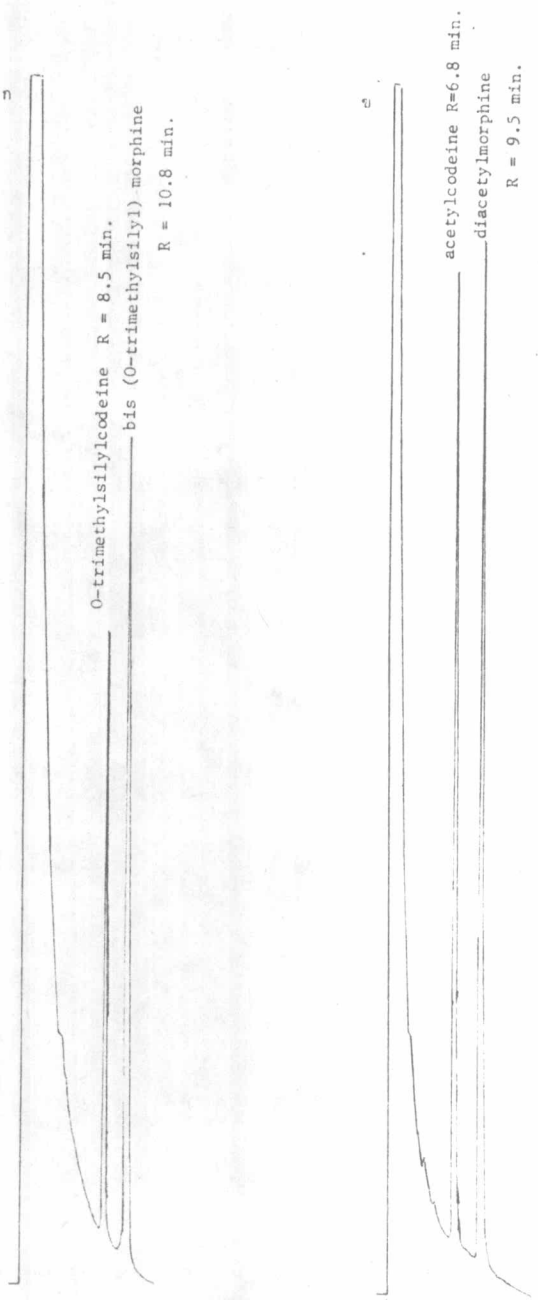
Chart Speed	0.1 ซม.ต่อนาที	Carrier Gas	ไนโตรเจน 30 มล.ซม.ต่อนาที
Attenuation	32×10^{-12}	อุณหภูมิคอลัมน์	รูป ก. 230°C รูป ข.240°C
ขนาดคอลัมน์	คอลัมน์แก้วขนาด 2ม. x 2มม.	อุณหภูมิอินเจคเตอร์	260°C
Column Packing	3% OV-17 บน Chromosorp WHP (80-100 mesh)	อุณหภูมิดีเทคเตอร์	280°C
		ชนิดดีเทคเตอร์	FID



รูปที่ 15 โครมาโตแกรมแสดงอนุพันธ์แบบซิลิเลชั่น (ก) และอะเซทิลเลชั่น (ข) ของมอร์ฟีนและโคเดอีนโดยใช้คอลัมน์ 5% OV-101 บน Chromosorb GHP (100-120 mesh)

สารตัวอย่าง มอร์ฟีน 175 นาโนกรัม และโคเดอีน 85 นาโนกรัม ผ่านการสกัดตามวิธีในข้อ 9.1 เตรียมอนุพันธ์แบบซิลิเลชั่น (ข้อ 9.6.2) และอะเซทิลเลชั่น (ข้อ 9.6.1)

Chart Speed	0.2 ซม.ต่อนาที	Carrier Gas	ไนโตรเจน 30 ลบ.ซม.ต่อนาที
Attenuation	32×10^{-12}	อุณหภูมิคอลัมน์	รูป ก.210°C รูป ข.220°C
ขนาดคอลัมน์	คอลัมน์สเตนเลสขนาด 2 ม. x 2 มม.	อุณหภูมิอินเจคเตอร์	260°C
Column Packing	5% OV-101 บน Chromosorb GHP (100-120 mesh)	อุณหภูมิดีเทคเตอร์	280°C
		ชนิดดีเทคเตอร์	FID



รูปที่ 16 โครมาโตแกรมแสดงอนุพันธ์แบบซิลิเลชั่น (ก) และอะเซทิลเลชั่น (ข) ของมอร์ฟีนและโคเดอีนโดยใช้คอลัมน์ 3% SE-30 บน Gas Chrom Z (100-120 mesh)

สารตัวอย่าง มอร์ฟีน 175 นาโนกรัมและโคเดอีน 85 นาโนกรัม ผ่านการสกัดตามวิธีในข้อ 9.1 เตรียมอนุพันธ์แบบซิลิเลชั่น (ข้อ 9.6.2) และอะเซทิลเลชั่น (ข้อ 9.6.1)

Chart Speed	0.2 ซม.ต่อนาที	Carrier Gas	ไนโตรเจน 30 ลบ.ซม.ต่อนาที
Attenuation	32×10^{-12}	อุณหภูมิคอลัมน์	รูป ก. 210°C รูป ข. 220°C
ขนาดคอลัมน์	คอลัมน์แก้วขนาด 2ม. x 2 มม.	อุณหภูมิอินเจคเตอร์	260°C
Column Packing	3% SE-30 บน Gas Chrom Z (100-120 mesh)	อุณหภูมิดีเทคเตอร์	280°C
		ชนิดดีเทคเตอร์	FID

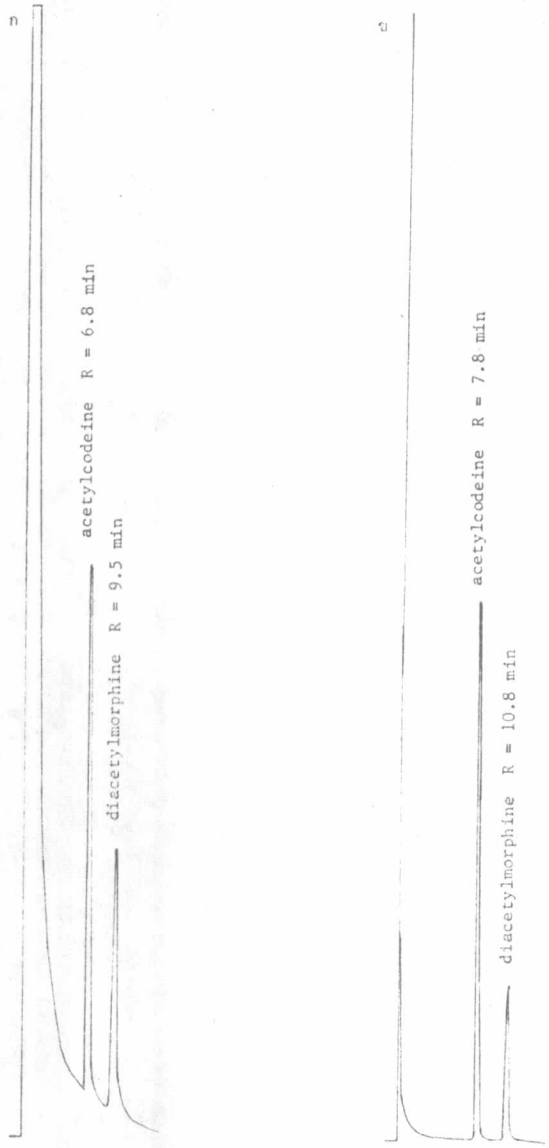
ตารางที่ 11 Retention time ของอนุพันธ์แบบอะเซทิลเลชั่นและซิลิเลชั่นของมอร์ฟีนและโคเดอีน

ชนิดคอลัมน์	คอลัมน์แก้วขนาด 2ม.x 2มม. 3% OV-17 บน Chromosorp WHP (80-100 mesh)		คอลัมน์สเตนเลส 0.5 ม.x 2 มม. 5% OV-101 บน Chromosorp GHP (100-120 mesh)		คอลัมน์แก้วขนาด 2 ม.x 2 มม. 3% SE-30 บน Gas Chrom Z (100-120 mesh)	
วิธีเตรียมอนุพันธ์	อะเซทิลเลชั่น	ซิลิเลชั่น	อะเซทิลเลชั่น	ซิลิเลชั่น	อะเซทิลเลชั่น	ซิลิเลชั่น
อุณหภูมิคอลัมน์ (องศาเซลเซียส)	240	230	210	200	220	210
Retention time (นาที)						
อนุพันธ์ของโคเดอีน	14	15.5	8.3	10.5	6.8	8.5
อนุพันธ์ของมอร์ฟีน	22.5	15.5	11.5	13.5	9.5	10.8

อนุพันธ์ของโคเดอีนโดยอะเซทิลเลชั่น คือ acetylcodeine
อนุพันธ์ของโคเดอีนโดยซิลิเลชั่น คือ O-trimethylsilylcodeine
อนุพันธ์ของมอร์ฟีนโดยอะเซทิลเลชั่น คือ diacetylmorphine
อนุพันธ์ของมอร์ฟีนโดยซิลิเลชั่น คือ bis-(O-trimethylsilyl) morphine

ตารางที่ 12 Retention time ของอนุพันธ์แบบอะเซทิลเลชั่นของมอร์ฟีนและโคเดอีน

ชนิดคอลัมน์	คอลัมน์แก้วขนาด 2 ม. x 2 มม. 3% SE-30 บน Gas Chrom Z (100-120 mesh)	
ชนิดดีเทคเตอร์	FID	TSD
Retention time (นาที)		
acetylcodeine	6.8	7.8
diacetylmorphine	9.5	10.8



รูปที่ 17 โครมาโตแกรมของอนุพันธ์ แบบอะเซทิลเลชั่นของมอร์ฟีนและโคเดอีน เปรียบเทียบระหว่างดีเทคเตอร์ FID, (ก) และ TSD (ข)

สารตัวอย่าง รูป ก. มอร์ฟีนและโคเดอีนอย่างละ 100 นาโนกรัม รูป ข. มอร์ฟีนและโคเดอีนอย่างละ 50 นาโนกรัม ผ่านการสกัดตามข้อ 9.1 เตรียมอนุพันธ์แบบซิลิเลชั่น (ข้อ 9.6.2) และอะเซทิลเลชั่น (ข้อ 9.6.1)

Chart Speed	0.2 ซม.ต่อนาที	Carrier Gas	ไนโตรเจน 30 ลบ.ซม.ต่อนาที
Attenuation	รูป ก. 64×10^{-12}	อุณหภูมิคอลัมน์	$220^{\circ}C$
	รูป ข. 32×10^{-12}	อุณหภูมิอินเจคเตอร์	$260^{\circ}C$
ขนาดคอลัมน์	คอลัมน์แก้วขนาด 2ม. x2มม.	อุณหภูมิดีเทคเตอร์	$280^{\circ}C$
Column Packing	3% SE-30 บน Gas Chrom Z (100-120 mesh)	ชนิดดีเทคเตอร์	รูป ก. FID รูป ข. TSD

4.2 ผลการวิเคราะห์มอร์ฟีนและโคเดอีนในเมล็ดฝิ่น

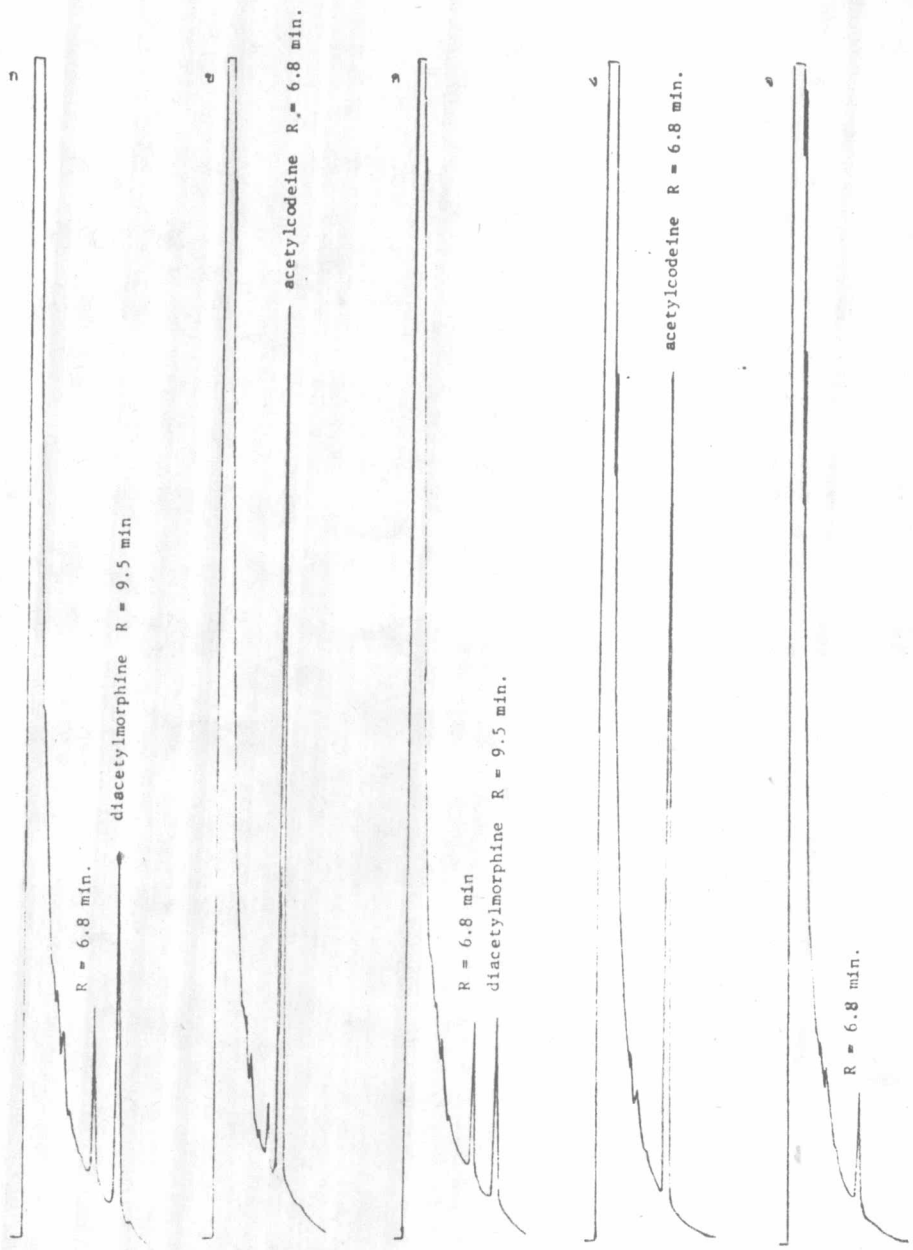
4.2.1 ผลการวิเคราะห์สารจากเมล็ดฝิ่นที่ทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี ก่อนเตรียมอนุพันธ์โดย อะเซทิลเลชั่น เมื่อใช้ดีเทคเตอร์แบบ FID และ TSD

ผลการวิเคราะห์สารจากเมล็ดฝิ่น 4 ตัวอย่างเมื่อสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม และทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยใช้วิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี เตรียมอนุพันธ์โดยอะเซทิลเลชั่น และวิเคราะห์ด้วยดีเทคเตอร์แบบ FID, เปรียบเทียบกับ TSD ได้โครมาโตแกรมดังรูปที่ 18 และ 19 ตามลำดับ จะเห็นว่า เมื่อใช้ FID แบลงค์ให้ peak มีค่า retention time เท่ากับ acetylcodeine คือ 6.8 นาที แต่ peak ค่อนข้างต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับ peak ของ acetylcodeine ในสารตัวอย่างและสารมาตรฐาน เมื่อใช้ TSD ในแบลงค์มี peak ที่ retention time 5.3 นาที แต่ไม่ตรงกับตำแหน่งของ acetylcodeine หรือ diacetylmorphine นอกจากนี้จะเห็นว่า เมื่อใช้ FID peak ของตัวทำละลายกว้างกว่าเมื่อใช้ TSD แต่อย่างไรก็ตาม สามารถใช้ดีเทคเตอร์ ทั้ง 2 แบบ เพื่อวิเคราะห์มอร์ฟีนและโคเดอีนเชิงคุณภาพในเมล็ดฝิ่นได้

4.2.2 ผลการวิเคราะห์สารจากเมล็ดฝิ่นที่ทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธี Back extraction ก่อนเตรียมอนุพันธ์ โดยอะเซทิลเลชั่นและซิลิเลชั่น เมื่อใช้ดีเทคเตอร์แบบ FID

เมื่อสกัดเมล็ดฝิ่นด้วยคลอโรฟอร์มและทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธี back extraction แล้ววิเคราะห์เปรียบเทียบอนุพันธ์แบบอะเซทิลเลชั่นและซิลิเลชั่น ได้โครมาโตแกรม ดังรูปที่ 20 และ 21 ตามลำดับ เห็นได้ว่าการเตรียมอนุพันธ์ทั้ง 2 แบบ ให้รูปแบบของโครมาโตแกรมที่มี peak ของสิ่งเจือปนติดกับ peak อนุพันธ์ของมอร์ฟีนและ peak ตัวทำละลายของอนุพันธ์แบบอะเซทิลเลชั่น แคบกว่าตัวทำละลายของอนุพันธ์แบบซิลิเลชั่น อนุพันธ์แบบอะเซทิลเลชั่นให้แบลงค์ที่มี peak ตรงกับ acetylcodeine peak นี้ไม่ปรากฏในแบลงค์เมื่อเตรียมอนุพันธ์โดยซิลิเลชั่น แต่จะพบ peak เล็ก ๆ ที่ตรงกับ Bis - (O-trimethylsilyl) morphine แทน อย่างไรก็ตาม สามารถใช้การเตรียมอนุพันธ์ทั้ง 2 แบบ เพื่อวิเคราะห์มอร์ฟีนและโคเดอีนเชิงคุณภาพในเมล็ดฝิ่นได้

เมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์สารจากเมล็ดฝิ่น ที่ทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟีและวิธี back-extraction จากรูปที่ 18 และ 20 พบว่าการทำให้สารที่สกัดได้บริสุทธิ์ทั้ง 2 วิธี ให้ผลไม่แตกต่างกันในการวิเคราะห์มอร์ฟีนและโคเดอีนเชิงคุณภาพในเมล็ดฝิ่น วิธีแรกมีข้อดีกว่า คือ สามารถกำจัด peak ของสิ่งเจือปนที่ติดกับ peak ของ diacetylmorphine ได้



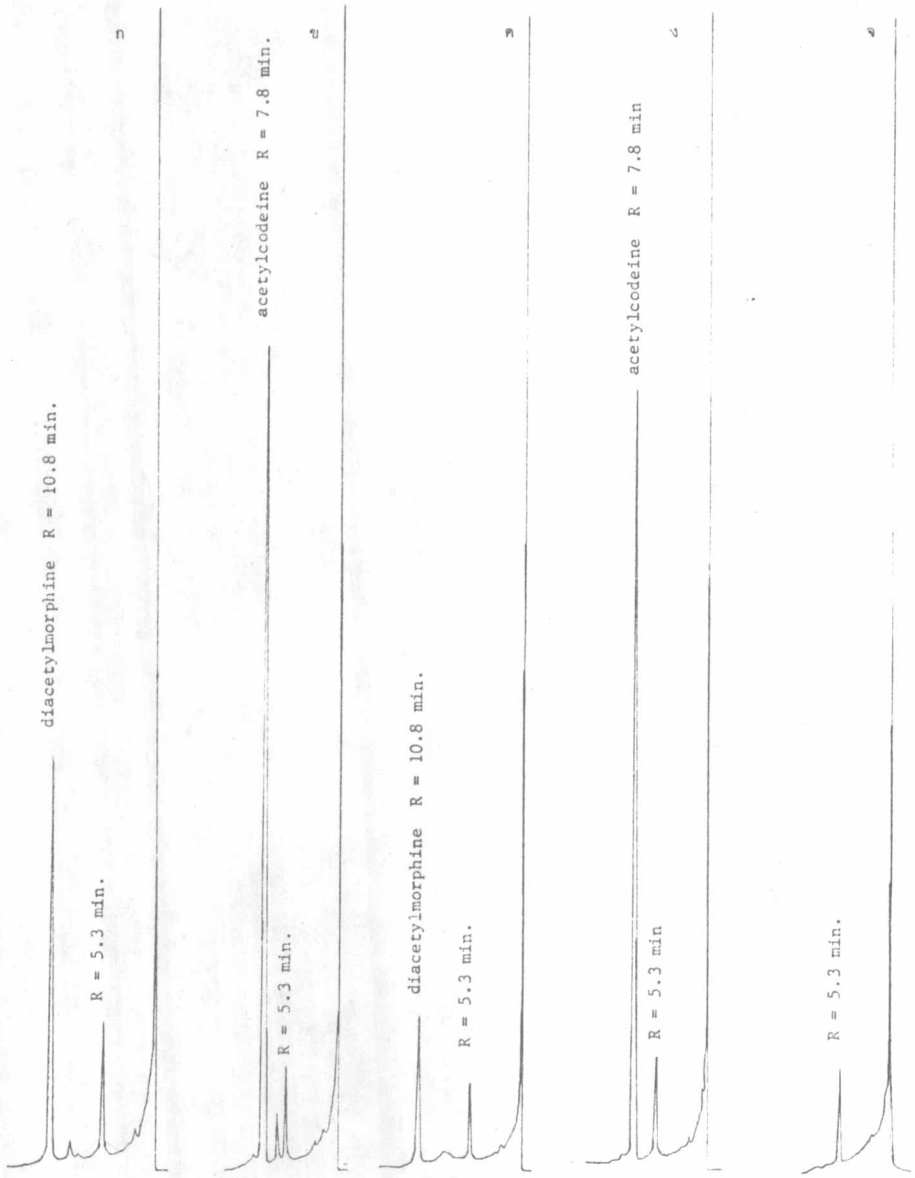
รูปที่ 18 โครมาโตแกรม แสดงผลการวิเคราะห์สารจากเมล็ดฝิ่น ที่ทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี และเตรียมอนุพันธ์แบบอะเซทิลเลชั่น เมื่อใช้ดีเทคเตอร์ FID

สารตัวอย่าง (ก,ข) สกัดเมล็ดฝิ่น (ข้อ 9.2.2) ทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี (ข้อ 9.4) เตรียมอนุพันธ์โดยวิธีอะเซทิลเลชั่น (ข้อ 9.6.1)

สารมาตรฐาน (ค,ง) มอร์ฟีน 100 นาโนกรัม และโคเดอีน 100 นาโนกรัม ผ่านขั้นตอนในข้อ 9.4 และ 9.6.1

แบลงค์ (จ) จากข้อ 9.4

Chart Speed	0.2 ซม./นาที	Carrier Gas	ไนโตรเจน 30 มล./นาที
Attenuation	32×10^{-12}	อุณหภูมิคอลัมน์	220°C
ขนาดคอลัมน์	คอลัมน์แก้วขนาด 2 ม. x 2มม.	อุณหภูมิอินเจคเตอร์	260°C
Column Packing	3% SE-30 บน Gas Chrom Z (100-120 mesh)	อุณหภูมิดีเทคเตอร์	280°C
		ชนิดดีเทคเตอร์	FID



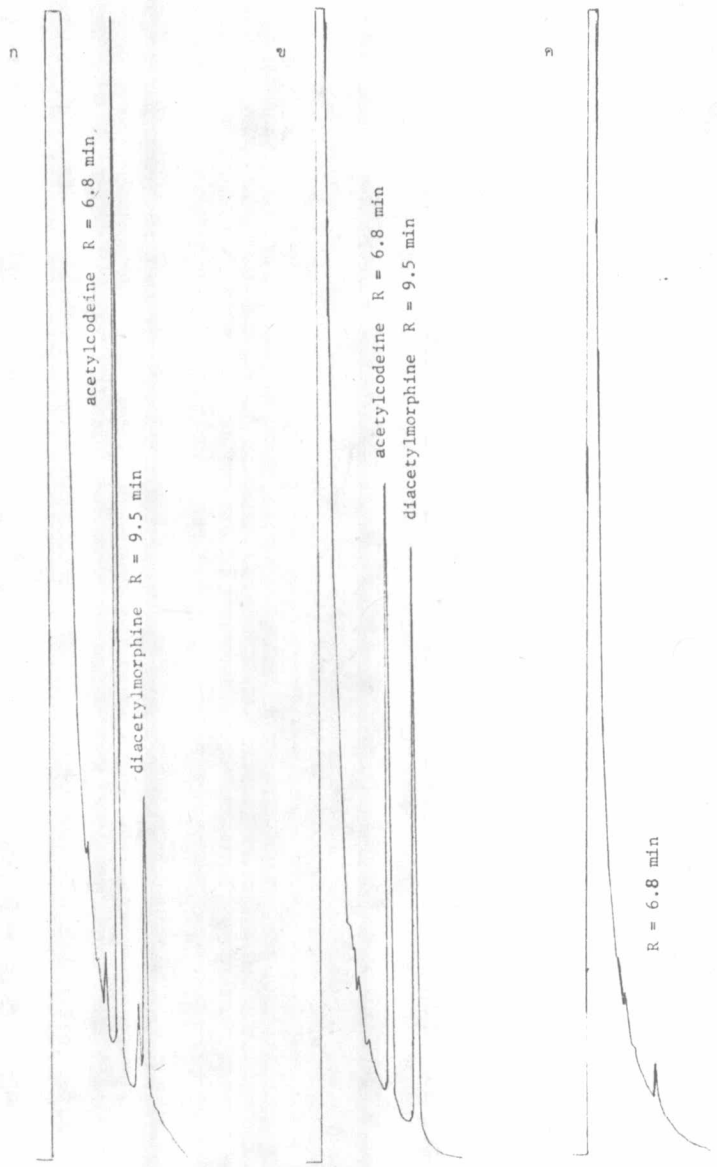
รูปที่ 19 โครมาโตแกรมแสดงผลการวิเคราะห์สารจากเมล็ดฝิ่นที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี และเตรียมอนุพันธ์แบบอะเซทิลเลชั่น เมื่อใช้ดีเทคเตอร์ TSD

สารตัวอย่าง (ก,ข) สกัดเมล็ดฝิ่น (ข้อ 9.2.2) ทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี (ข้อ 9.4) เตรียมอนุพันธ์โดยวิธีอะเซทิลเลชั่น (ข้อ 9.6.1)

สารมาตรฐาน (ค,ง) มอร์ฟีน 100 นาโนกรัม โคเดอีน 100 นาโนกรัม ผ่านขั้นตอนในข้อ 9.4 และ 9.6.1

แบลงค์ (จ) จากข้อ 9.4

Chart Speed	0:2 ซม.ต่อนาที	Carrier Gas	ไนโตรเจน 30 ลบ.ซม.ต่อนาที
Attenuation	32×10^{-12}	อุณหภูมิคอลัมน์	$220^{\circ}C$
ขนาดคอลัมน์	คอลัมน์แก้วขนาด 2 ม. x 2มม.	อุณหภูมิอินเจคเตอร์	$260^{\circ}C$
Column Packing	3% SE-30 บน Gas Chrom Z (100-120 mesh)	อุณหภูมิดีเทคเตอร์	$280^{\circ}C$
		ชนิดดีเทคเตอร์	TSD
		Bead current	3.0



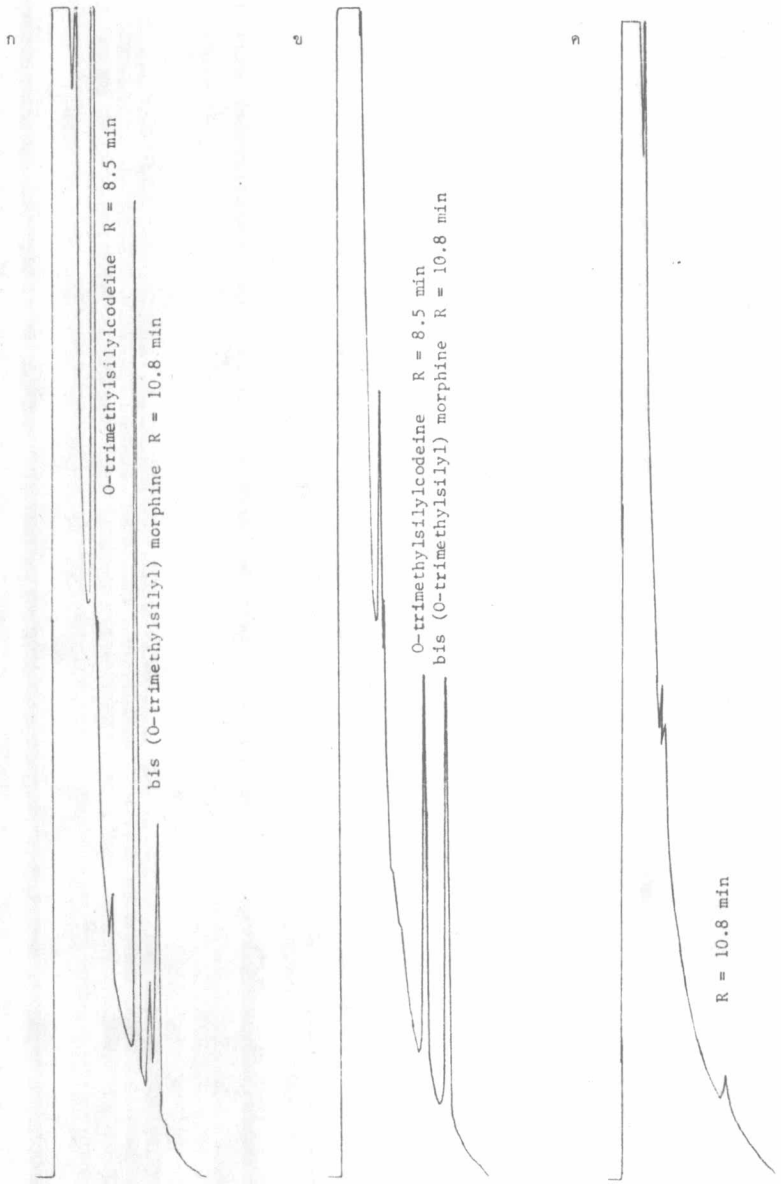
รูปที่ 20 โครมาโตแกรมแสดงผลการวิเคราะห์สารจากเมล็ดฝิ่นที่ทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธี Back-extraction และเตรียมอนุพันธ์แบบอะเซทิลเลชั่น

สารตัวอย่าง (ก) สกัดเมล็ดฝิ่น (ข้อ 9.2.2) ทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี Back-extraction (ข้อ 9.5) เตรียมอนุพันธ์ด้วยวิธีอะเซทิลเลชั่น (ข้อ 9.6.1)

สารมาตรฐาน (ข) มอร์ฟีน 200 นาโนกรัม โคเดอีน 100 นาโนกรัม ผ่านขั้นตอนในข้อ 9.5 และ 9.6.1

แบลงค์ (ค) จากข้อ 9.5

Chart Speed	0.2 ซม.ต่อนาที	Carrier Gas	ไนโตรเจน 30 ลบ.ซม.ต่อนาที
Attenuation	32×10^{-12}	อุณหภูมิคอลัมน์	$220^{\circ}C$
ขนาดคอลัมน์	คอลัมน์แก้วขนาด 2 ม. x 2มม.	อุณหภูมิอินเจคเตอร์	$260^{\circ}C$
Column Packing	3% SE-30 บน Gas Chrom Z (100-120 mesh)	อุณหภูมิดีเทคเตอร์	$280^{\circ}C$
		ชนิดดีเทคเตอร์	FID



รูปที่ 21 โครมาโตแกรมแสดงผลการวิเคราะห์สารจากเมล็ดฝิ่นที่ทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี Back-extraction และเตรียมอนุพันธ์แบบซิลิเลชั่น

สารตัวอย่าง (ก) สกัดเมล็ดฝิ่น (ข้อ 9.2.2) ทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี Back-extraction (ข้อ 9.5) เตรียมอนุพันธ์โดยวิธีซิลิเลชั่น (ข้อ 9.6.2)

สารมาตรฐาน (ข) มอร์ฟีน 200 นาโนกรัม โคเดอีน 100 นาโนกรัม ผ่านขั้นตอนในข้อ 9.5 และ 9.6.2

แบลงค์ (ค) จากข้อ 9.5

Chart Speed	0.2 ซม.ต่อนาที	Carrier Gas	ไนโตรเจน 30 ลบ.ซม.ต่อนาที
Attenuation	32×10^{-12}	อุณหภูมิคอลัมน์	$220^{\circ}C$
ขนาดคอลัมน์	คอลัมน์แก้วขนาด 2 ม. x 2 มม.	อุณหภูมิอินเจคเตอร์	$260^{\circ}C$
Column Packing	3% SE-30 บน Gas Chrom Z (100-120 mesh)	อุณหภูมิดีเทคเตอร์	$280^{\circ}C$
		ชนิดดีเทคเตอร์	FID

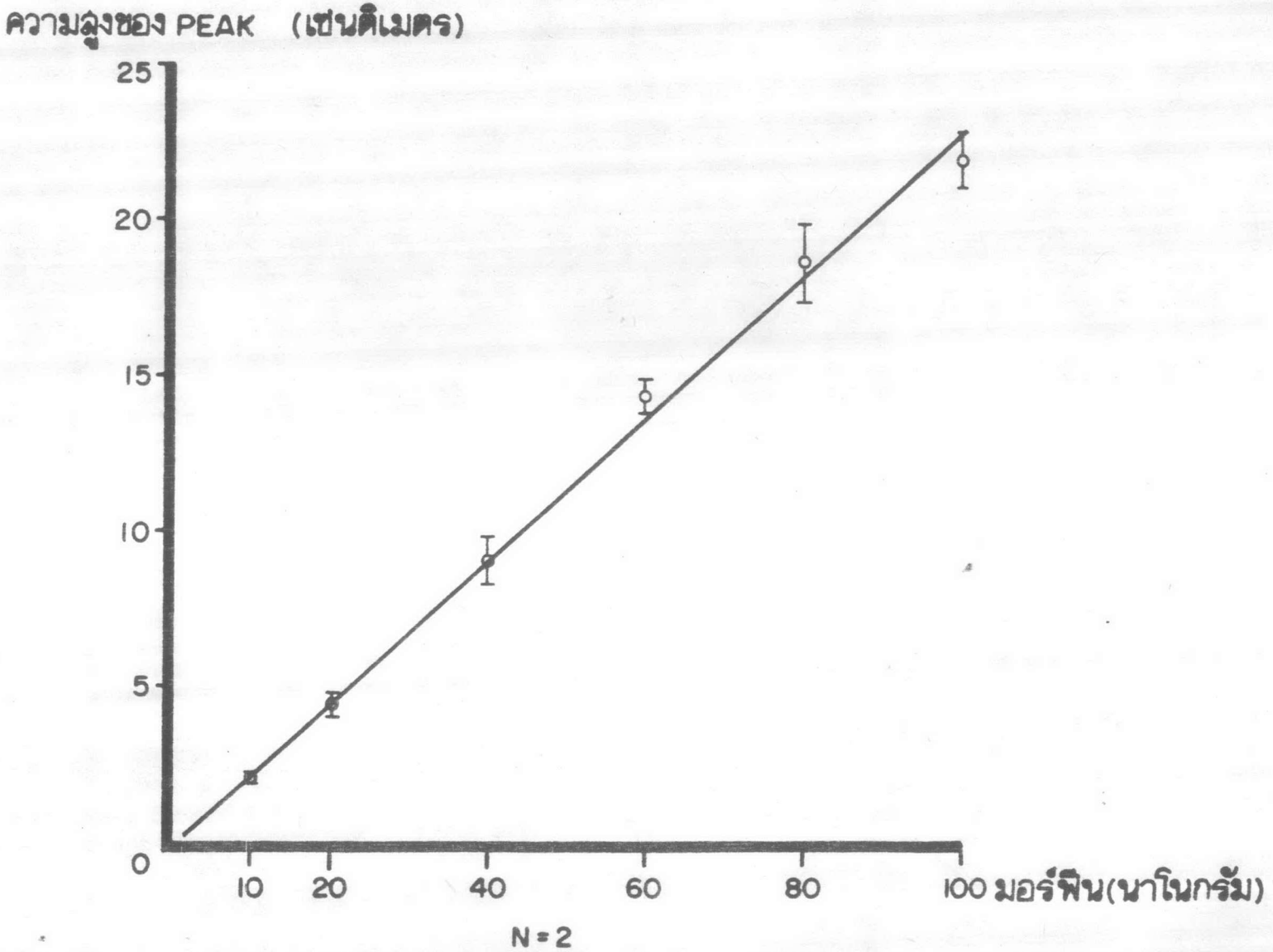
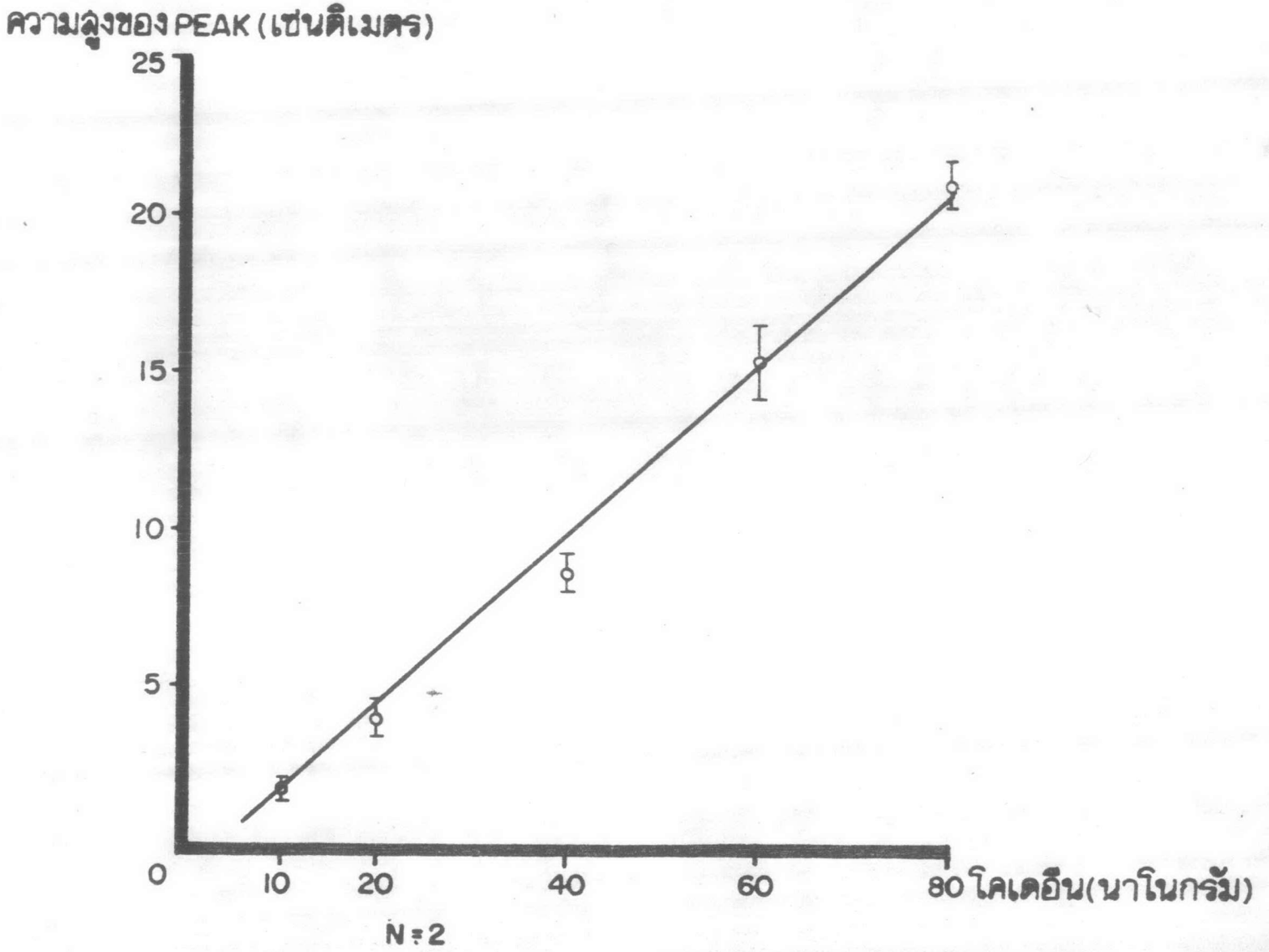
4.3 ผลการวิเคราะห์มอร์ฟีนและโคเดอีนกึ่งปริมาณในข้าวสาร และเมล็ดฝิ่น โดยวิธีแกสโครมาโตกราฟฟี

ผลการวิเคราะห์ข้าวสารเปรียบเทียบ และข้าวสารตัวอย่าง 4 ตัวอย่าง ให้ผลการวิเคราะห์เหมือนกัน คือไม่พบมอร์ฟีนและโคเดอีน (ตารางที่ 13) สำหรับเมล็ดฝิ่น 4 ตัวอย่าง วิเคราะห์โดยการทำให้สารที่สกัดได้บริสุทธิ์ 2 วิธีคือ ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี และ back extraction นำไปเตรียมอนุพันธ์ โดยวิธีอะเซทิลเลชั่นและซิลิเลชั่น วิเคราะห์โดยใช้ดีเทคเตอร์ FID และ TSD ให้ผลการวิเคราะห์เหมือนกันคือ พบมอร์ฟีนและโคเดอีน เมื่อนำสารจากเมล็ดฝิ่นที่ทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธี back extraction เตรียมอนุพันธ์ด้วยวิธีอะเซทิลเลชั่น ไปอ่านค่าปริมาณมอร์ฟีนและโคเดอีนจากกราฟมาตรฐานในรูปที่ 22 และ 23 ตามลำดับ พบว่าเมล็ดฝิ่นมีมอร์ฟีนมากกว่า 250 และโคเดอีนมากกว่า 1,000 นาโนกรัมต่อเมล็ดฝิ่น 1 กรัม (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 13 แสดงผลการวิเคราะห์มอร์ฟีนและโคเดอีนกึ่งปริมาณของเมล็ดฝิ่นและข้าวสาร โดยวิธีแกสโครมาโตกราฟฟี

สารตัวอย่าง	ปริมาณสาร (นาโนกรัมต่อสารตัวอย่าง 1 กรัม)	
	มอร์ฟีน	โคเดอีน
ข้าวสารตัวอย่างที่ 1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
เมล็ดฝิ่นตัวอย่างที่ 1	> 600	> 1,000
2	> 600	> 1,000
3	> 250	> 1,000
4	> 1,000	> 1,000

รูปที่ 22 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์มอร์ฟีนด้วยวิธีแกสโครมาโตกราฟฟี่



รูปที่23 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์โคเดอีนด้วยวิธีแกสโครมาโตกราฟฟี่