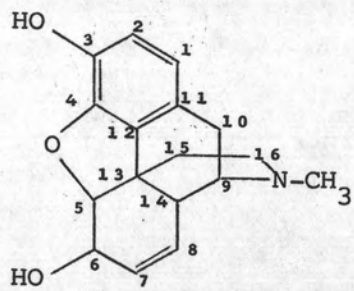
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

การสำรวจ การวิจัยอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง และทฤษฎี

2.1 เฮโรอีน (Heroin)

เฮโรอีนเป็นอนุพันธ์กึ่งสังเคราะห์ของมอร์ฟีน (ภาพที่ 3) มอร์ฟีนเป็นสารสำคัญที่มีอยู่ใน โอเปียม (Opium) ได้จากยางแห้งจากฝักดิบของฝิ่นที่มีชื่อว่า *Papaver somniferum* Linn (9)

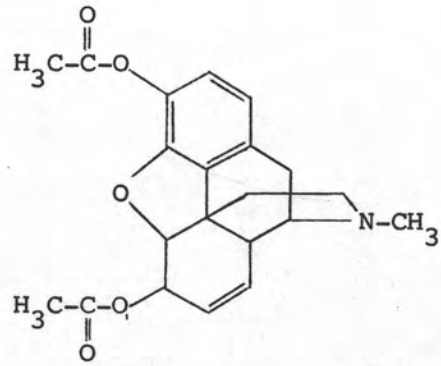


ภาพที่ 3 แสดงสูตรโครงสร้างของมอร์ฟีน (9)

<u>ชื่อ</u> Heroin, Acetomorphine, Diacetylmorphine, 3,6-diacetylmorphine, Diamorphine (21)

<u>ชื่อทางเคมี</u> 3,6-Diacetoxy-7, 8-dehydro-4, 5-epoxy-N-methylmorphinan (21)

<u>สูตรโครงสร้างทางเคมี</u> มีลักษณะดังนี้



ภาพที่ 4 แสดงสูตรโครงสร้างของเฮโรอีน (9)
น.น. โมเลกุล เท่ากับ 369.4

ลักษณะเป็นผลึกสีขาว จุดหลอมเหลวประมาณ 170°C ถูกไฮโดรไลส์ได้อย่างรวดเร็วในสภาวะที่เป็นด่าง คุณสมบัติการละลายคือ 1:7000 ในน้ำ 1:31 ในเอธิลแอลกอฮอล์ 1:100 ในอีเธอร์ และ 1:1.5 ในคลอโรฟอร์ม (21)

ทางที่ได้รับเข้าสู่ร่างกาย

มีรายงานว่า ในหมู่ผู้ติดเฮโรอีนนิยมฉีดเฮโรอีนเข้าทางเส้นเลือดมากที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่า อาจได้รับเข้าสู่ร่างกายโดยวิธีอื่น ๆ ได้แก่ การฉีดเข้ากล้าม การฉีดใต้ผิวหนัง การสูบเข้าทางลมหายใจ หรือการกินโดยผสมในอาหารหรือเครื่องดื่ม เป็นต้น (9,22)

การดูดซึม

เฮโรอีนถูกดูดซึมอย่างรวดเร็วเมื่อให้โดยวิธีฉีด จากการทดลองพบว่า เมื่อฉีดเฮโรอีนเข้าใต้ผิวหนังแก่หนูถีบจักร ในขนาด 37.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เฮโรอีนจะถูกดูดซึมจากบริเวณที่ฉีดอย่างน้อย 80% ในเวลา 15 นาที(23) แต่ถ้าให้เฮโรอีนทางปาก การดูดซึมจะเกิดขึ้นอย่างไม่แน่นอน พบว่าการให้เฮโรอีนทางปากแก่สัตว์หลายชนิด เวลาที่เฮโรอีนเริ่มออกฤทธิ์ไม่สม่ำเสมอ ต่างกับเมื่อได้รับโดยการฉีดใต้ผิวหนัง โดยทั่วไปเมื่อได้รับเฮโรอีนทางปากจะเริ่มออกฤทธิ์ภายในเวลา 20-30 นาที (8)

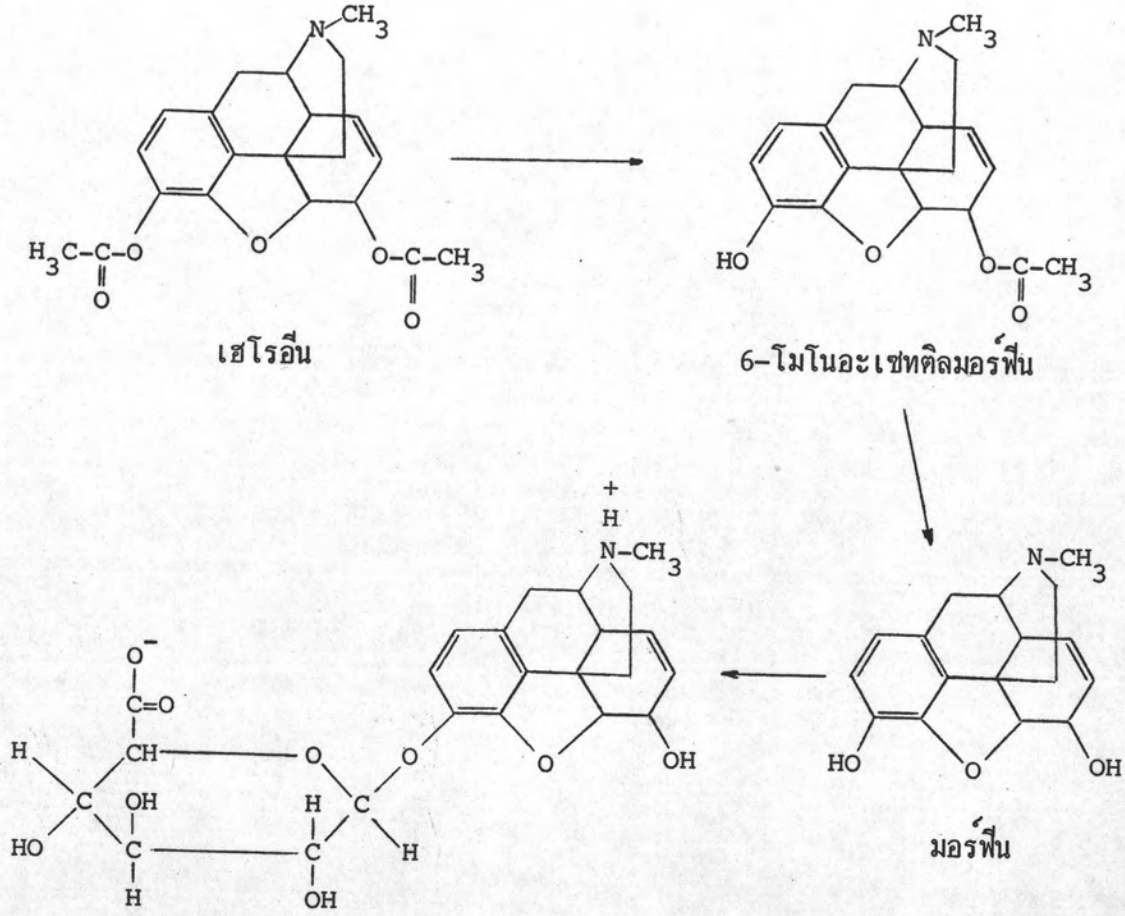
การกระจายตัว

เฮโรอีนเป็นสารซึ่งแตกตัวเป็นอิออนน้อยในพีเอช (pH) ของร่างกาย เนื่องจากเฮโรอีนมีค่า pKa = 7.83 (เทียบกับมอร์ฟีนซึ่งมีค่า pKa = 9.85) และเนื่องจากเฮโรอีนละลายได้ดีในไขมัน จึงทำให้เฮโรอีนถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้เร็ว ทั้งยังผ่านเข้า Blood Brain Barrier ได้ง่าย (9)

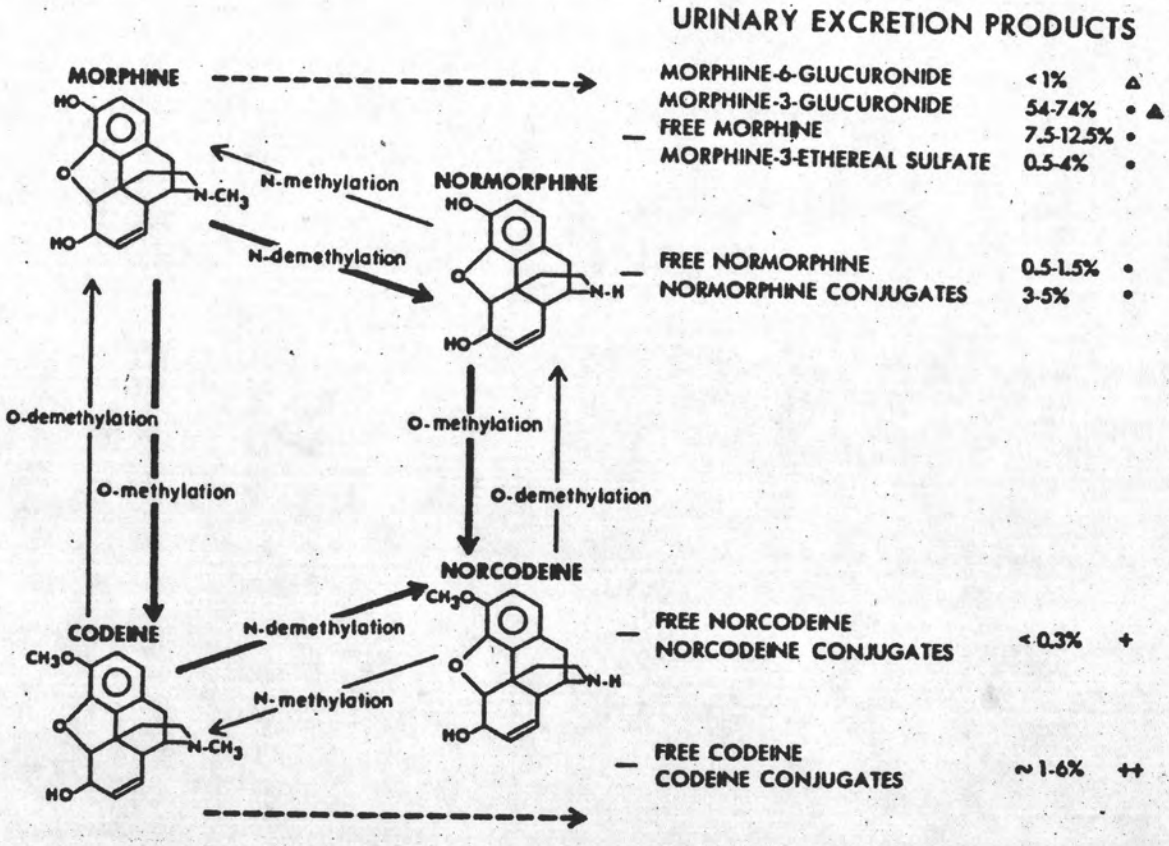
เมตาบอลิสม

เฮโรอีนถูกเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่อยู่ในกระแสโลหิต โดยปฏิกิริยาดีอะเซทติลเลชั่น (Deacetylation) เป็น 6-โมโนอะเซทติลมอร์ฟีน (6-monoacetylmorphine) หลังจากนั้น 6-โมโนอะเซทติลมอร์ฟีน จะถูกเปลี่ยนแปลงต่อไปโดยปฏิกิริยาดีอะเซทติลเลชั่นเป็นมอร์ฟีน โดยปฏิกิริยาหลังเกิดขึ้นในตับเป็นส่วนใหญ่ (8,9,23,24) จากการเปรียบเทียบความสามารถของเนื้อเยื่ออวัยวะต่าง ๆ ในการเกิดปฏิกิริยาดีอะเซทติลเลชั่นเฮโรอีน พบว่า ปฏิกิริยานี้เกิดขึ้นในตับมากที่สุด รองลงมาคือในไต สมอง และซีรั่ม ตามลำดับ (25,26)

มอร์ฟีนที่เกิดขึ้นจะถูกเปลี่ยนแปลงต่อไปในตับ โดยปฏิกิริยากลูคิวโรนิเดชั่น (Glucuronidation) ได้ มอร์ฟีน-3 กลูคิวโรไนด์ (morphine-3 glucuronide) เป็นส่วนใหญ่ (27,28,29) มอร์ฟีน-6 กลูคิวโรไนด์ (morphine-6 glucuronide) เป็นส่วนน้อยมาก (30) และอาจพบ มอร์ฟีน-3 อีเธอร์เรียลซัลเฟต (morphine-3 ethereal sulfate) จากปฏิกิริยาการสร้าง มอร์ฟีน-3 อีเธอร์เรียลซัลเฟต ได้บ้างเล็กน้อย (31) สารเมตาโบไลท์เหล่านี้ละลายในน้ำได้ดี จึงทำให้ขับถ่ายทางปัสสาวะและน้ำดีดีขึ้น อย่างไรก็ตาม ยังมีบางส่วนของมอร์ฟีนที่ถูกเปลี่ยนแปลงในตับโดยปฏิกิริยา ออกซิเดชั่น (Oxidative Biotransformation) ได้นอร์มอร์ฟีน (Normorphine) ก่อน ซึ่งต่อไปจะถูกเปลี่ยนแปลงโดยปฏิกิริยากลูคิวโรนิเดชั่น ได้ นอร์มอร์ฟีน-3 กลูคิวโรไนด์ (normorphine-3 glucuronide)(9,31)



ภาพที่ 5 แสดงปฏิกิริยาเมตาบอลิสมของเฮโรอีน (8)



ภาพที่ 6 แสดงการเปลี่ยนแปลงที่เป็นไปได้ของมอร์ฟีนในร่างกาย ปริมาณที่พบจากการขับถ่ายทางปัสสาวะที่แสดงได้จาก Δ = Oguri และคณะ (32) . = Yeh (31,33) + = Boerner และคณะ (34) ++ = Boerner & Abbott (35)

การขับถ่าย

สารเมตาโบไลท์ของเฮโรอีนจะถูกขับถ่ายออกจากร่างกายโดยทางปัสสาวะเป็นส่วนใหญ่ สารเมตาโบไลท์ดังกล่าว ได้แก่ มอร์ฟีนอิสระ (Free morphine)และ มอร์ฟีนคอนจูเกต (conjugated morphine) (10,36,37,38,39) มอร์ฟีนคอนจูเกตที่พบเป็นส่วนใหญ่ คือ มอร์ฟีน-3 กลูคิวโรไนด์ ส่วนสารเมตาโบไลท์อื่น ๆ ที่พบเป็นส่วนน้อย ได้แก่ 6-โมโนอะเซทติลมอร์ฟีนอิสระ 6-โมโนอะเซทติลมอร์ฟีนคอนจูเกต (10,39) นอร์มอร์ฟีนอิสระ นอร์มอร์ฟีนคอนจูเกต (39) มอร์ฟีน-6 กลูคิวโรไนด์ และ มอร์ฟีน-3 อีเธอร์เรียล-ซัลเฟต (40) นอกจากนี้เฮโรอีนบางส่วนอาจถูกขับถ่ายทางปัสสาวะโดยไม่ถูกเปลี่ยนแปลง พบจำนวนเล็กน้อยในช่วง 2 ชั่วโมงแรกหลังจากได้รับเฮโรอีนได้ (10,39)

ปริมาณของสารเมตาโบไลท์ที่พบในปัสสาวะ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของขนาดเฮโรอีนที่ได้รับ แสดงในตารางที่ 1

2.2 การหาปริมาณสารเมตาโบไลท์ของเฮโรอีนในปัสสาวะ

2.2.1 เอนซัยม์มัลติพลายอิมมูโนแอสเสเทคนิค

เป็นวิธีการทางอิมมูโน (Immunoassay) ชนิดที่ระบบมีส่วนประกอบสม่ำเสมอ (Homogeneous system) กล่าวคือมีการเชื่อม (Label) สารที่ต้องการตรวจด้วยเอนซัยม์ ได้เป็น สารเชื่อมกับเอนซัยม์ (Enzyme Labeled drug) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นแอนติเจน และมีความสามารถในการย่อยสับสเตรทได้ สารเชื่อมกับเอนซัยม์เมื่อจับกับแอนติบอดี้ ชนิดที่ต่อต้านต่อสารนั้น เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนซึ่งเกิดจากขบวนการอิมมูโน (Immune Complex) แล้ว จะทำให้เอนซัยม์ที่เชื่อมอยู่บนสารนั้นหมดประสิทธิภาพ ไม่สามารถย่อยสับสเตรทได้อีกต่อไป จากหลักการนี้และการวัดความเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงของสับสเตรทในระบบ จะสามารถวิเคราะห์ปริมาณสารที่ต้องการตรวจได้

ในการวัดประสิทธิภาพของเอนซัยม์ในการย่อยสับสเตรทของสารเชื่อมกับเอนซัยม์อิสระที่เหลือในปฏิกิริยานี้ ไม่ต้องแยกสารประกอบเชิงซ้อนซึ่งเกิดจากขบวนการอิมมูโนออก ต่างกับวิธีการทางอิมมูโนชนิดที่ระบบมีส่วนประกอบไม่สม่ำเสมอ (Heterogeneous system) เช่น RIA ซึ่งต้องการขั้นตอนการแยก สารประกอบเชิงซ้อน

ตารางที่ 1 แสดงผลการวิจัยหาชนิด และปริมาณของสารเมตาโบไลท์ในปัสสาวะหลังจากได้รับเฮโรอีน

ผู้ทำการวิจัยและปีที่ทำการวิจัย	ปริมาณของสารเมตาโบไลท์ที่พบในปัสสาวะคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของขนาดเฮโรอีนที่ได้รับ				
	มอร์ฟีนอิสระ	มอร์ฟีนคอนจูเกต	6-โมโนอะเซทติลมอร์ฟีนอิสระ	เฮโรอีน	นอร์มอร์ฟีนอิสระรวมกับนอร์มอร์ฟีนคอนจูเกต
Oberst (1941)(36)	5.8	43.5			
Oberst (1943)(37)	6.4	50.9			
Elliot และคณะ (1971)(10)	4.2	38.3	1.31	0.13	
Yeh และคณะ (1976)(39)	7.7	55.0	0.90		4.8
	7.2	53.3	1.70	0.05	2.8

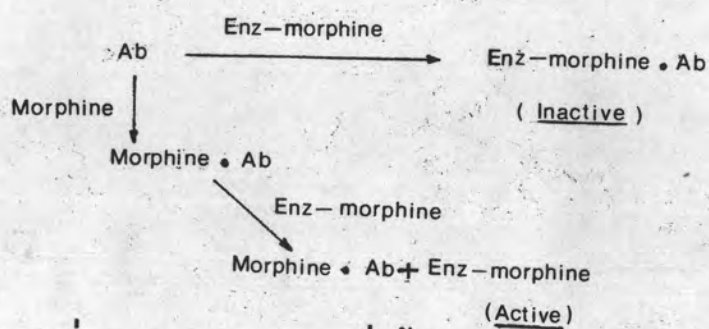
(หมายเหตุ Yeh และคณะ ทำการวิจัย 2 กลุ่มการทดลอง กลุ่มการทดลองแรกเก็บปัสสาวะทุก 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน กลุ่มการทดลองที่ 2 เก็บปัสสาวะทุก 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)

ซึ่งเกิดจากขบวนการอิมมูโน ออกจากสารที่เชื่อมกับสารกัมมันตภาพรังสี (Radioactive isotope labeled drug) อิสระ ที่เหลืออยู่ในระบบเมื่อการทำปฏิกิริยาสิ้นสุด เนื่องจากสารทั้ง 2 ต่างก็มีคุณสมบัติเป็นสารกัมมันตภาพรังสีเหมือนกันอยู่ (17,41)

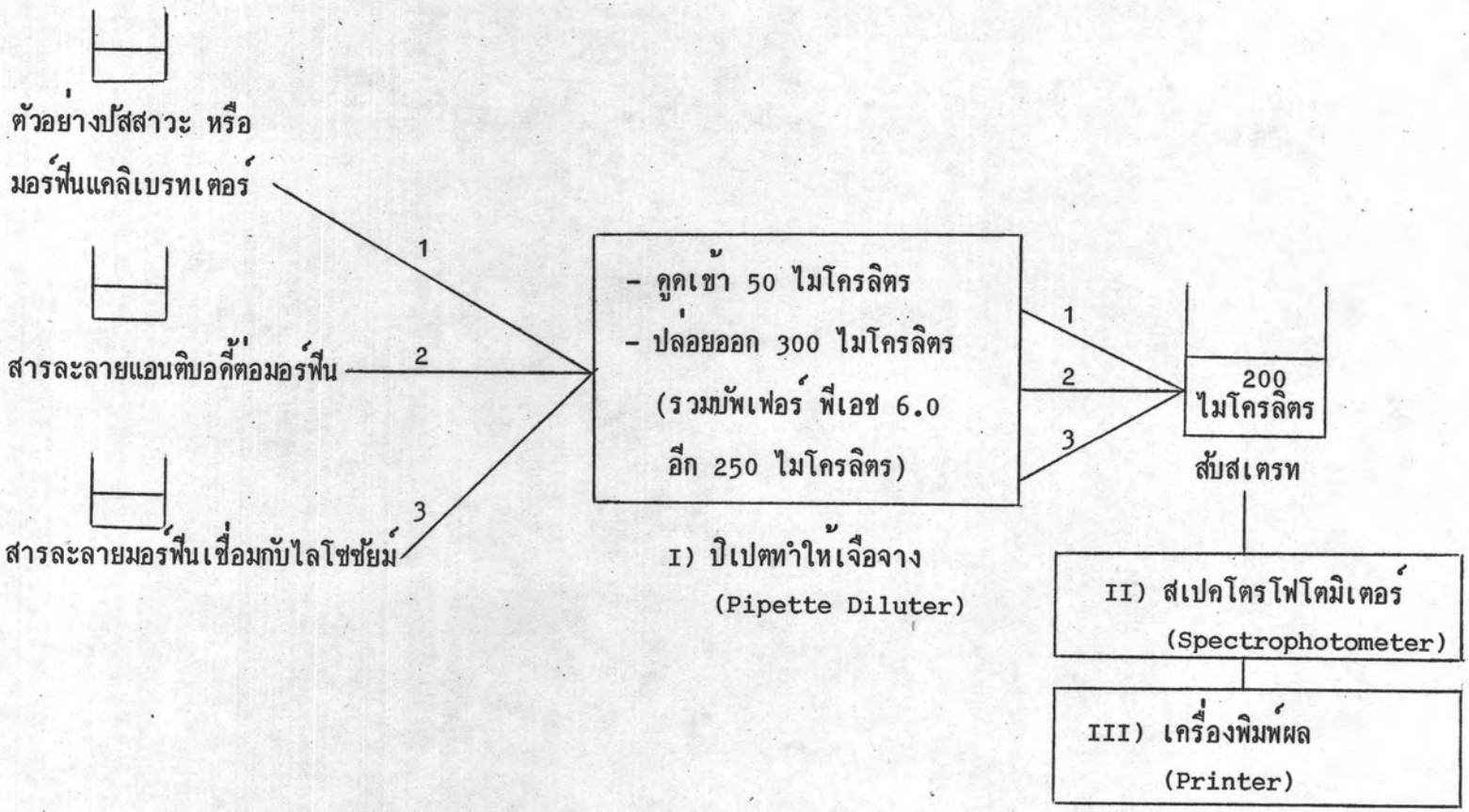
เรียกเทคนิคการวิเคราะห์นี้ว่า Enzyme Multiplied Immunoassay Technique (20,41,42,43) Enzyme Immunoassay (44,45) หรือ Homogeneous Enzyme Immunoassay (17,46) ส่วนคำว่า EMIT เป็นชื่อทางการค้าที่บริษัท Syva นำเทคนิคนี้มาใช้ในการวิเคราะห์สารชนิดต่าง ๆ จากชีววัตถุ (47,48) มีนักวิจัยทางด้านนี้หลายท่าน นิยมเรียกวิธีนี้อย่างสั้น ๆ เพื่อความสะดวกว่า EMIT (17,20, 41,42,43,44,45,46)

หลักการของ EMIT สำหรับวิเคราะห์สารกลุ่มโอพิเอทในปัสสาวะ

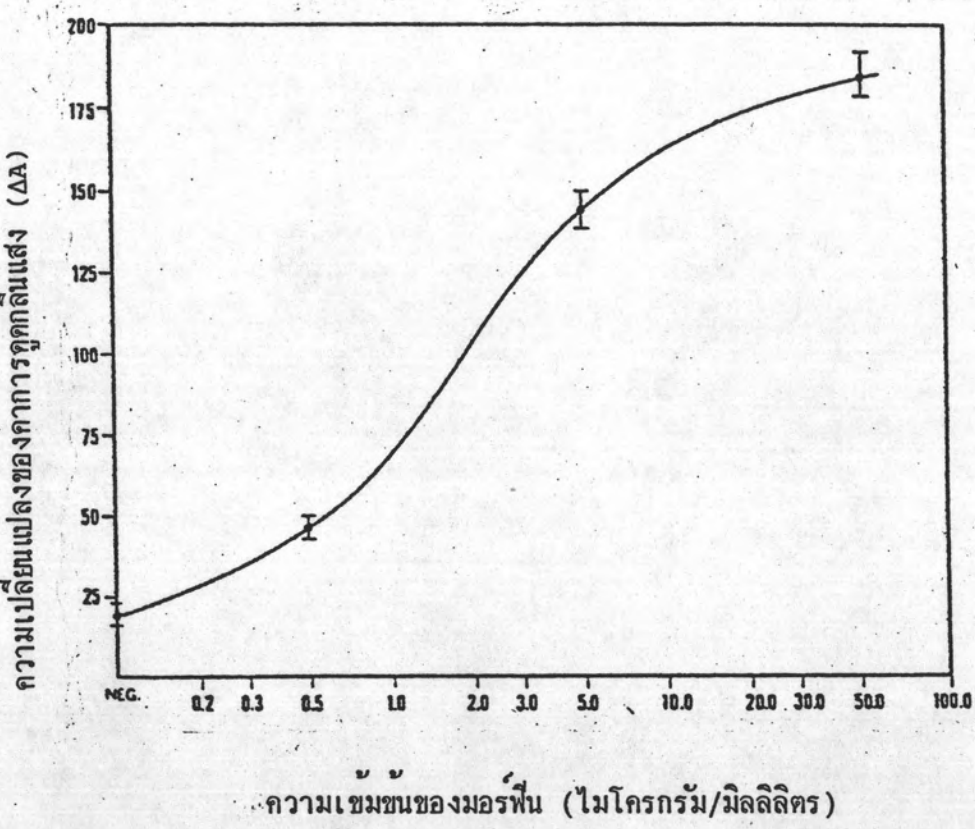
EMIT เป็นวิธีการทางอิมมูโนอย่างหนึ่งซึ่งนำมาใช้ในการวิเคราะห์สารกลุ่มโอพิเอทในปัสสาวะ ทำได้โดยเชื่อมเอนซัยม์ไลโซซัยม์ กับมอร์ฟีน ได้ มอร์ฟีนเชื่อมกับไลโซซัยม์ (Lysozyme Labeled morphine) ซึ่งมีความสามารถในการย่อยผนังเซล (cell wall) ของแบคทีเรียชนิด *Micrococcus luteus* แล้วทำให้เซลแตก (lysis) ได้ ปกติถ้าในระบบไม่มีมอร์ฟีน มอร์ฟีนเชื่อมกับไลโซซัยม์ ที่เติมลงไปในจำนวนจำกัด จะทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี้ชนิดที่ต่อต้านต่อมอร์ฟีนซึ่งเติมลงไปในจำนวนจำกัดเช่นกัน เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนซึ่งเกิดจากขบวนการอิมมูโน ทำให้ไลโซซัยม์ที่เชื่อมอยู่กับมอร์ฟีนไม่มีประสิทธิภาพในการย่อยสับสเตรท (ในที่นี้ใช้ *Micrococcus luteus* เป็นสับสเตรท) เข้าใจว่า การเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนทำให้เกิดความเกะกะ (Steric) เป็นเหตุให้สับสเตรทเข้ามาจับกับเอนซัยม์ที่บริเวณที่เกิดปฏิกิริยา (Active site) ไม่ได้ เมื่อเติมตัวอย่างปัสสาวะที่มีมอร์ฟีนหรือสารประกอบที่มีสูตรโครงสร้างคล้ายมอร์ฟีนมากลงไป มอร์ฟีนในตัวอย่างปัสสาวะจะไปแย่ง มอร์ฟีนเชื่อมกับไลโซซัยม์ในการจับกับ แอนติบอดี้ ทำให้มีมอร์ฟีนเชื่อมกับไลโซซัยม์อิสระเหลืออยู่ในระบบ และสามารถย่อยสับสเตรทได้ มีผลให้คุณสมบัติในการดูดกลืนแสงของระบบแตกต่างไปจากเดิม ความเปลี่ยนแปลงของการดูดกลืนแสงจะสอดคล้องกันกับ ความเข้มข้นของมอร์ฟีนหรือสารประกอบที่มีสูตรโครงสร้างคล้ายกับมอร์ฟีน ที่มีอยู่ในตัวอย่างปัสสาวะ (17)



ภาพที่ 7 แสดงปฏิกิริยาที่ใช้อธิบายหลักการของวิธี EMIT ในการวิเคราะห์สารกลุ่มโอพิเอทในปัสสาวะ (Ab = แอนติบอดี้, Enz-morphine = มอร์ฟีนที่มีการเชื่อมกับเอนซัยม์, Enz-morphine.Ab และ Morphine.Ab เป็นสารประกอบเชิงซ้อนซึ่งเกิดจากขบวนการอิมมูโน)(17)



ภาพที่ 8 แสดงขั้นตอนวิธีการและส่วนประกอบสำคัญของ EMIT ในการตรวจสารกลุ่มโอพิเอทในปัสสาวะ (17)



ภาพที่ 9 แสดงกราฟมาตรฐานของมอร์ฟีน ระหว่างความเข้มข้นของมอร์ฟีนในปัสสาวะ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) กับ ความเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสง (ΔA) ที่ตรวจโดยวิธี EMIT (17)

009109

i 17694243

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้ EMIT ในการวิเคราะห์สารกลุ่มโอพิเอทในปัสสาวะ

EMIT เป็นวิธีการทางอิมมูโนอย่างหนึ่งที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์สารกลุ่มโอพิเอทในปัสสาวะ (17,20) ภายหลังวิธี RIA (15,16) มีผู้รายงานว่าวิธี RIA แม้ว่าจะเป็นวิธีที่มีความไวสูงสุด สามารถตรวจสารกลุ่มโอพิเอทในปัสสาวะได้ถึง 30-60 นาโนกรัม/มิลลิลิตร แต่มีข้อเสียที่ต้องใช้เวลาในการวิเคราะห์ประมาณ 1-2 ชั่วโมงต่อหนึ่งตัวอย่าง ขั้นตอนการแยกสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดจากขบวนการอิมมูโนมักเป็นสาเหตุทำให้วิธีการนี้ยุ่งยากกว่าวิธี EMIT อีกทั้งต้องการเทคนิคความชำนาญสูง ต้องเกี่ยวข้องกับสารกัมมันตภาพรังสีระหว่างการวิเคราะห์ ส่วนวิธี EMIT มีความไวในการตรวจสารกลุ่มโอพิเอทต่ำกว่าวิธี RIA คือตรวจได้ต่ำสุด 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แต่มีข้อดีที่ใช้เวลาในการวิเคราะห์เพียง 1 นาทีต่อหนึ่งตัวอย่าง ไม่ต้องการเทคนิคความชำนาญเป็นพิเศษ และไม่ต้องเกี่ยวข้องกับสารกัมมันตภาพรังสีอีกด้วย (17,20)

มีผู้วิจัยหาความไวสูงสุดของวิธี EMIT ในการตรวจสอบกลุ่มโอพิเอทในปัสสาวะ พบว่าวิธี EMIT ซึ่งใช้เอนซัยม์ชนิดไลโซซัยม์ สามารถตรวจมอร์ฟีนในปัสสาวะในความเข้มข้นต่ำที่สุดถึง 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ด้วยระดับความเชื่อมั่นเกินกว่า 95% (17)

การวิจัยหาความจำเพาะเจาะจงของวิธี EMIT ในการตรวจสารกลุ่มโอพิเอทในปัสสาวะ มีรายงานว่าวิธี EMIT ขาดความจำเพาะเจาะจง (Absolute Specificity) เช่นเดียวกับวิธีการทางอิมมูโนอื่น ๆ (เช่น RIA, HI)(20) กล่าวคือ วิธี EMIT ที่ใช้วิเคราะห์สารกลุ่มโอพิเอทในปัสสาวะ จะเกิดปฏิกิริยาตอบสนองกับสารชนิดต่าง ๆ ในกลุ่มโอพิเอทได้หลายชนิด และสารบางชนิดที่มีสูตรโครงสร้างทางเคมีต่างกับสารกลุ่มโอพิเอท ด้วยความสามารถต่าง ๆ กัน (ตารางที่ 2) โคดีอีน (Codeine) เป็นสารชนิดเดียวที่เกิดปฏิกิริยาตอบสนองต่อวิธี EMIT มากกว่ามอร์ฟีน ส่วนเฮโรอีนและมอร์ฟีน-3 กลูคิวโรไนด์มีปฏิกิริยาตอบสนองต่อวิธี EMIT น้อยกว่ามอร์ฟีน เดกซ์โตรเมทโธรฟาน (Dextromethorphan) และคลอร์โปรมาซีน (Chlorpromazine) ซึ่งเป็นยาที่ใช้กันทั่วไปในการรักษาทางคลีนิค เป็นยาแก้ไอและยากล่อมประสาท ตามลำดับ เมื่อมีเป็นจำนวนมาก ๆ ในปัสสาวะก็มีปฏิกิริยาตอบสนอง เช่นกัน อย่างไรก็ดี มีรายงานว่า ยาทั้งสองนี้ในขนาดที่ใช้ในการรักษาจะไม่รบกวนการวิเคราะห์สารกลุ่มโอพิเอทในปัสสาวะโดยวิธี EMIT เมื่อใช้ค่าความ

เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นค่าตัดสิน (Cut off value)(17)

ความเชื่อถือได้ของวิธี (Assay Reliability) มีผู้ศึกษาความแม่นยำของวิธี EMIT ในการวิเคราะห์มอร์ฟีนที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบว่า ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นของมอร์ฟีนที่วิเคราะห์ได้โดยวิธี EMIT เป็น 0.49 ± 0.025 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน = 5.02% จำนวนตัวอย่าง = 15)(17) และ 0.45 ± 0.057 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน = 12.7% จำนวนตัวอย่าง = 20)(45) ที่ความเข้มข้น 3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ได้ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของมอร์ฟีนเท่ากับ 2.98 ± 0.28 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน = 9.39% จำนวนตัวอย่าง = 15)(17) ความแม่นยำของการวิเคราะห์มอร์ฟีนในปัสสาวะด้วยวิธี EMIT โดยผู้ทำการทดลองและห้องปฏิบัติการต่างกัน ให้ผลที่สอดคล้องกันและมีความแม่นยำเป็นที่น่าพอใจ (17)

มีรายงานว่า โซเดียมคลอไรด์ ที่เติมลงในปัสสาวะในความเข้มข้นเกินกว่า 50 กรัม/ลิตร จะรบกวนการวิเคราะห์มอร์ฟีนในปัสสาวะโดยวิธี EMIT โดยทำให้ผลการวิเคราะห์ผิดพลาดไปในทางลบ (false negative) เข้าใจว่า การเพิ่มความแรงของการแตกตัว (ionic strength) ทำให้อิออนที่มากเกินไปไปออยู่ตรงจุดที่เกิดปฏิกิริยาของเอนซัยม์รบกวนการเกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนซัยม์กับสับสเตรท นอกจากนี้ พีเอช ของปัสสาวะตัวอย่างก็มีผลต่อการวิเคราะห์โดยวิธี EMIT ด้วย (49)

ไลโซซัยม์ในปัสสาวะ (Endogenous lysozyme) เป็นสาเหตุสำคัญอีกประการหนึ่ง ที่ทำให้ผลการวิเคราะห์มอร์ฟีนในปัสสาวะโดยวิธี EMIT ได้ผลผิดพลาดไปในทางบวก (false positive) มีรายงานว่า จำนวนตัวอย่าง ประมาณร้อยละ 2-4 มีไลโซซัยม์มากพอที่จะทำให้ผลการวิเคราะห์ผิดพลาดไปในทางบวกได้ (47) อย่างไรก็ดีปัญหานี้อาจลดลงได้โดยการทำ Blank สำหรับทุกตัวอย่างที่ได้ผลการวิเคราะห์เป็นบวก

2.2.2 ไฮเพอร์ฟอร์แมนส์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี่

วิธีนี้เดิมเรียกว่า ไฮเพรชเชอร์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี่ (High Pressure Liquid Chromatography) นิยมเรียกย่อ ๆ ว่า HPLC จัดเป็นลิควิดโครมาโตกราฟฟี่ชนิดคอลัมน์อีกแบบหนึ่ง เริ่มใช้ประมาณ ปี ค.ศ. 1960 หลังจากที่ลิควิดโครมา-

ตารางที่ 2 แสดงค่าความไวสัมพัทธ์ (Relative Reactivity) ของวิธี EMIT ที่มีต่อสารต่าง ๆ ในกลุ่มโอพิเอทและสารอื่น ๆ ที่ไม่อยู่ในกลุ่มโอพิเอท (20,41)

สาร	ความเข้มข้น(ก) (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ความไวสัมพัทธ์ (ข)	เอกสารอ้างอิง
Codeine	0.78	1.28	(20)
Heroin	2.4	0.42	(20)
Morphine-3 glucuronide	2.6	0.38	(20)
Normorphine	44.4	0.02	(20)
Nalorphine	15.8	0.02	(20)
Naloxone	ไม่มีปฏิกิริยาตอบสนองต่อวิธี EMIT		(20)
Dihydromorphinone (Dilaudid)	2.6	0.38	(20)
Dihydromorphine	1.8	0.55	(20)
Levorphanol	6.2	0.16	(20)
Dextromethorphan	268.0	0.004	(20)
Meperidine		0.025	(41)
Chlorpromazine		0.006	(41)
Diphenoxylate		น้อยกว่า 0.006	(41)
Cocaine		น้อยกว่า 0.001	(41)
Methadone		0.0001	(41)
Amphetamine		น้อยกว่า 0.0001	(41)
Secobarbital		น้อยกว่า 0.0001	(41)
Phenobarbital		น้อยกว่า 0.0001	(41)

หมายเหตุ ก) ความเข้มข้นของสาร (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยาตอบสนองต่อวิธี EMIT โดยสมมูลย์กับมอร์ฟีน 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ข) ความไวสัมพัทธ์ เป็นอัตราส่วนระหว่าง ความเข้มข้นของมอร์ฟีน 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร กับความเข้มข้นของสารซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยาตอบสนองต่อวิธี EMIT โดยสมมูลย์กับมอร์ฟีน 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

โตกราฟฟี่แบบอื่น ๆ ได้ถูกนำมาใช้นานแล้ว ชนิดแรกสุดคือ คอลัมน์โครมาโตกราฟฟี่ (Column Chromatography) ซึ่งนำมาใช้ตั้งแต่ ปี ค.ศ. 1903 (50)

หลักการของไฮเพอร์ฟอร์แมนส์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี่

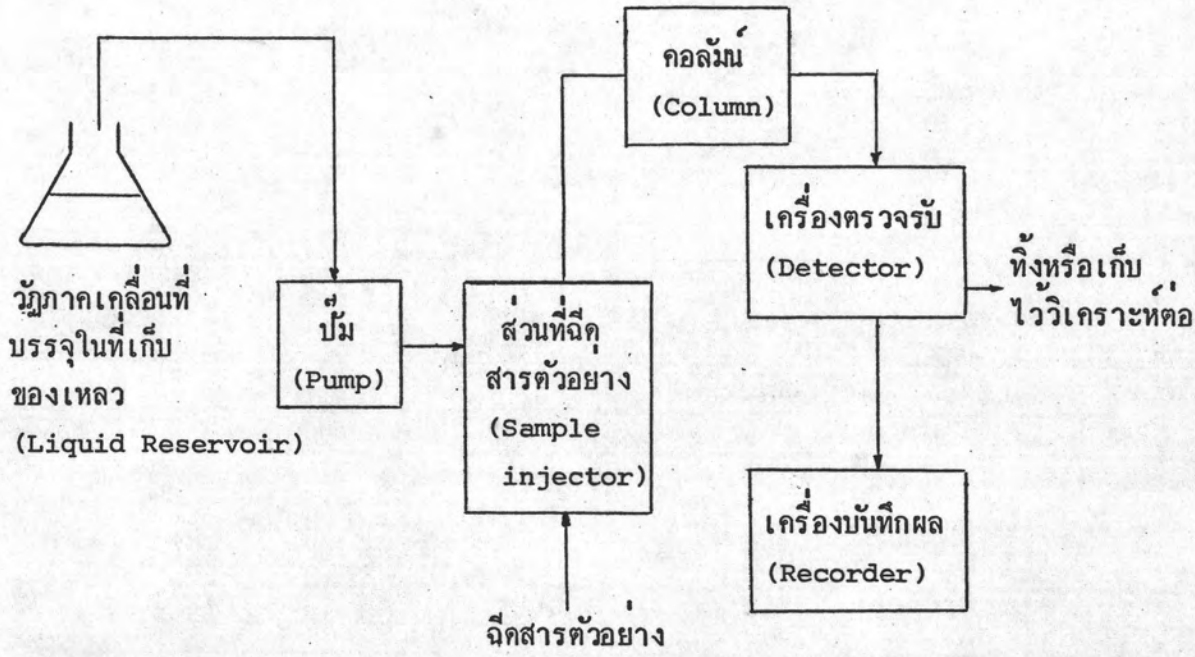
เป็นวิธีการแยกสารออกจากสารผสม โดยอาศัยหลักการกระจายตัวของสารระหว่าง 2 วัฏภาค (phase)คือวัฏภาคอยู่กับที่ (Stationary phase) ประกอบด้วยสารชนิดละเอียดมาก ซึ่งอาจเป็นของแข็ง ของเหลวเคลือบอยู่บนเม็ดของแข็ง หรือ สารที่เกิดจากการเชื่อมต่อกันโดยปฏิกิริยาทางเคมี (Bonded phase packings) ก็ได้ วัฏภาคนี้บรรจุอยู่ในคอลัมน์ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางเล็ก กับวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ซึ่งเป็นของเหลว มีหน้าที่พาสารผสมให้เคลื่อนที่ผ่านเข้าไปในคอลัมน์ โดยอาศัย ปั๊ม (pump) ควบคุมอัตราการไหล (Flow rate) ตามต้องการ ระหว่างการเคลื่อนที่ไปในคอลัมน์สารผสมจะแยกจากกันโดยอาศัยหลักการกระจายตัว และต่างเคลื่อนผ่านออกจากคอลัมน์ไปสู่ เครื่องตรวจรับ (Detector) ซึ่งมีชนิดต่าง ๆ กัน สามารถเลือกใช้ตามความเหมาะสมกับสารที่ต้องการตรวจ เครื่องตรวจรับจะแปลผลได้ แม้มีสารจำนวนน้อย แล้วส่งผลมายัง เครื่องบันทึกผล (Recorder) (50)

ส่วนประกอบสำคัญของไฮเพอร์ฟอร์แมนส์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี่ (51)

ประกอบด้วย

1. ที่เก็บของเหลว (Liquid Reservoir)
2. ปั๊ม (Pump)
3. ส่วนที่ฉีดสารตัวอย่าง (Sample injector)
4. คอลัมน์ (Column)
5. เครื่องตรวจรับ (Detector)
6. เครื่องบันทึกผล (Recorder)

ดังแสดงในภาพที่ 10



ภาพที่ 10 แสดงส่วนประกอบที่สำคัญของระบบไฮเพอร์ฟอร์แมนส์ลิควิด โครมาโตกราฟฟี่ (52)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้ HPLC ในการตรวจสารกลุ่มโอพิเอทแอลคาลอยด์

HPLC เป็นวิธีการทางโครมาโตกราฟฟีที่นำมาใช้ตรวจสารกลุ่มโอพิเอทแอลคาลอยด์ ได้แก่ มอร์ฟีน เฮโรอีน โดยตรวจจากผงยา เช่น เฮโรอีนที่ลักลอบขาย หรือจากชีววัตถุของคน เช่น ปัสสาวะ เลือด น้ำไขสันหลัง เป็นต้น แทนวิธี แก๊สโครมาโตกราฟี ซึ่งมีข้อเสียคือ ต้องใช้ความร้อนสูง เป็นสาเหตุให้เฮโรอีนสลายตัว และต้องเสียเวลาทำปฏิกิริยาการสร้างสารอนุพันธ์ (Derivatisation) เมื่อต้องการตรวจมอร์ฟีน

มีผู้นำ HPLC มาใช้ตรวจมอร์ฟีนและเฮโรอีน โดยใช้คอลัมน์ที่บรรจุ วัฏภาคอยู่กับที่ชนิดวัฏภาคปรกติ(Normal phase) เช่น ซิลิก้า (Silica) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ ที่เป็นตัวทำละลายชนิดโพลาร์ (Polar solvent)(53-56) ได้แก่ เมทธานอล : 2 นอร์มัล แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ : 1 นอร์มัล แอมโมเนียมไนเตรท (27:2:1) และใช้เครื่องตรวจรับชนิดอุลตราไวโอเล็ต (Ultraviolet Detector) ที่ความยาวคลื่น 254 และ 278 นาโนเมตร พบว่าสามารถตรวจมอร์ฟีนและเฮโรอีน ได้ต่ำสุดประมาณ 50 นาโนกรัม (53) อย่างไรก็ตาม พบว่า สภาวะที่ใช้ในการทดลองนี้ไม่สามารถแยกมอร์ฟีนกับโคดีอีน 6-โมโนอะเซทติลมอร์ฟีนกับเฮโรอีน ออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ นอกจากนี้ น้ำที่เป็นส่วนผสมในตัวทำละลายมักทำให้ซิลิก้าเสื่อมสภาพ (deactivate) ได้ และสิ่งปะปนในตัวอย่างที่มีคุณสมบัติโพลาร์จะมีผลทำให้อายุการใช้งานของคอลัมน์สั้นลง

การนำ HPLC ที่มีคอลัมน์ชนิดอิออนประจุบวก (Cation exchange column) มาใช้ในการตรวจมอร์ฟีน และเฮโรอีน (57-59) พบว่าสามารถแยกสารกลุ่มโอพิเอทได้เป็นที่น่าพอใจ แต่ประสิทธิภาพการแยกสารโดยคอลัมน์ชนิดนี้ขึ้นกับองค์ประกอบหลายอย่าง เช่น พีเอช ความแรงของอิออน (ionic strength) เป็นต้น ความสามารถในการแลกเปลี่ยนอิออนของคอลัมน์ชนิดนี้จะลดลงเมื่อใช้คอลัมน์นานประมาณ 2-3 เดือน

การใช้คอลัมน์ชนิดวัฏภาคผันกลับ (Reverse phase) ทำให้ข้อจำกัดเกี่ยวกับวัฏภาคเคลื่อนที่ลดน้อยลง มีรายงานการใช้ HPLC ที่มีคอลัมน์ชนิดนี้ในการตรวจมอร์ฟีนและเฮโรอีน (60-63) โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ต่าง ๆ เช่น อะเซทโตไนไตรล์ (Acetonitrile) กับน้ำ ในอัตราส่วนที่เหมาะสม มี แอมโมเนียมคาร์บอเนต 0.1% น้ำหนัก/ปริมาตร เป็น

บัฟเฟอร์ (60) พบว่า สภาวะที่ใช้นี้แยกเฮโรอีนและโคดีอีนไม่ดีนัก พีค (peak) ของอนุพันธ์มอร์ฟีนที่เกิดขึ้นมักมีลักษณะเป็นหาง (tail) พีเอชของแอมโมเนียมคาร์บอเนต ซึ่งเท่ากับ 8.3 เป็นพีเอชที่สูงเกินกว่า พีเอช สูงสุดของสารละลายที่ยอมให้ใช้ได้กับคอลัมน์หลายชนิด มีผู้ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ เป็น 65% อะเซทโตไนไตรล์ และ 35% บัฟเฟอร์ (0.75% สารละลายแอมโมเนียมอะซิเตท)(63) ทำให้พีเอชของวัฏภาคเคลื่อนที่ เท่ากับ 7 เหมาะที่จะใช้กับคอลัมน์ และสามารถแยกสารในกลุ่มโอพิเอทได้ดีพอ ๆ กับ คอลัมน์ชนิดวัฏภาคปรกติ อย่างไรก็ตาม สภาวะที่ใช้ในการทดลองนี้มีข้อเสียที่ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณมอร์ฟีน กับความสูงของพีค ไม่เป็นเส้นตรง ทำให้ต้องสร้างกราฟมาตรฐาน (Standard curve) ขึ้นทุกครั้งในการหาปริมาณมอร์ฟีน

เพื่อลดปัญหา วัฏภาคเคลื่อนที่ มีความเป็นด่างสูง ได้มีการนำ อิออนแพร์โครมาโตกราฟฟี่ (Ion pair chromatography) มาใช้กับคอลัมน์ชนิดวัฏภาคปรกติ และวัฏภาคผันกลับ โดยใช้สารจับคู่อิออน (Ion pairing agent) ชนิดต่าง ๆ เช่น เตตร้าบิวทิลแอมโมเนียมฟอสเฟต (Tetrabutylammonium phosphate) 0.005 โมลาร์ จำนวน 15% กับอะเซทโตไนไตรล์ 85% และใช้กับคอลัมน์ชนิดวัฏภาคปรกติ สามารถแยกสารในกลุ่มโอพิเอทได้ (64) นอกจากนี้มีผู้นำสารจับคู่อิออน เช่น มีเธนซัลโฟนิคแอซิด (Methansulfonic Acid) 0.02 โมลาร์ (65) หรือใช้ เอ็น-เฮปเทนซัลโฟนิคแอซิด (n-Heptane sulfonic Acid) 0.005 โมลาร์ (66,67) เติมลงในวัฏภาคเคลื่อนที่ ซึ่งเป็นส่วนผสมของน้ำกับอะเซทโตไนไตรล์ หรือน้ำกับเมทธานอลและใช้กับคอลัมน์ชนิดวัฏภาคผันกลับ สามารถแยกสารในกลุ่มโอพิเอทได้ดีเช่นกัน

ชนิดของเครื่องตรวจรับ (Detector) ของ HPLC ที่มีผู้นำมาใช้ตรวจสารกลุ่มโอพิเอท ได้แก่

เครื่องตรวจรับชนิดอุลตร้าไวโอเล็ต (Ultraviolet Detector) (53,59, 60,63,64,65,66,68,69,70) สามารถตรวจมอร์ฟีนได้ต่ำสุดประมาณ 50 นาโนกรัม (53)

เครื่องตรวจรับชนิดอิเล็คโตรเคมิคัล (Electrochemical Detector) (71-73) สามารถตรวจมอร์ฟีนได้ต่ำสุดประมาณ 20 พิโคกรัม (73)

เครื่องตรวจรับชนิดฟลูออเรสเซนต์ (Fluorescence Detector) (74,75) สามารถตรวจมอร์ฟีนได้ต่ำสุดประมาณ 4 นาโนกรัม (74) ถึง 10 นาโนกรัม (75)

การหาปริมาณมอร์ฟีนจากชีววัตถุ เช่น เลือด ปัสสาวะ น้ำไขสันหลัง โดยวิธี HPLC จำเป็นต้องมีขั้นตอนการแยกมอร์ฟีนจากชีววัตถุเหล่านี้ เพื่อให้ได้สารที่บริสุทธิ์เพียงพอที่จะนำมาตรวจเอกลักษณ์และหาปริมาณโดย HPLC ได้ วิธีการทำสารให้บริสุทธิ์ ได้แก่ การสกัดแยกด้วยตัวทำละลาย (Solvent Extraction)(70-75) แต่เนื่องจากวิธีนี้มีความยุ่งยากซับซ้อนอยู่ จึงมีผู้นำวิธีการทางโครมาโตกราฟฟี่มาใช้ในการแยกสารจากชีววัตถุ ได้แก่ การใช้ เรซินที่มีชื่อว่า แอมเบอร์ไลท์ เอกซ์เอดี-2 (Amberlite XAD-2)(76) เซพแพค ซี 18 (Sep-Pak C18)(77) และ คลินอีลูท ซีอี-1001 (Clin elute CE-1001)(73) เป็นต้น

มีรายงานถึงการใช้ อิออนแพร์โครมาโตกราฟฟี่ กับคอลัมน์ชนิดวัฏภาคผันกลับ และเครื่องตรวจรับชนิดอุลตร้าไวโอเล็ต ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ตรวจมอร์ฟีนและสารเมตาโบไลท์ของมอร์ฟีนจากปัสสาวะและพลาสม่า โดยแยกมอร์ฟีนและสารเมตาโบไลท์ของมอร์ฟีนออกจากปัสสาวะและพลาสม่าด้วย เซพแพค ซี 18 ก่อนนำมาตรวจด้วย HPLC พบว่าวิธีนี้สามารถแยกมอร์ฟีนและสารเมตาโบไลท์ต่าง ๆ ของมอร์ฟีนได้ดี และตรวจมอร์ฟีน และมอร์ฟีน-3 กลูคิวโรไนด์ ในปัสสาวะและพลาสม่าได้ต่ำสุดถึง 5 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของการวิเคราะห์มอร์ฟีนเมื่อความเข้มข้นของมอร์ฟีนในพลาสม่า 22 และ 223 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เท่ากับ 7.6% และ 3.8% ตามลำดับ (จำนวนตัวอย่าง = 5) กราฟมาตรฐานของมอร์ฟีนในพลาสม่าเป็นเส้นตรงระหว่างความเข้มข้น 20-100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (77)

มีผู้นำ HPLC ที่มีคอลัมน์ชนิดวัฏภาคผันกลับ และมีวัฏภาคเคลื่อนที่เป็น 25% อะเซทโตไนไตรล์ โดยมี 0.1 โมลาร์ ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) เป็นบัฟเฟอร์ ใช้เครื่องตรวจรับชนิดอุลตร้าไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร ตรวจมอร์ฟีนและโคดีอีนในปัสสาวะ โดยแยกมอร์ฟีนและโคดีอีนจากปัสสาวะด้วย แอมเบอร์ไรท์ เอกซ์เอดี-2 ร่วมกับการสกัดด้วยตัวทำละลาย ก่อนนำมาตรวจด้วย HPLC พบว่าวิธีนี้สามารถตรวจมอร์ฟีนและโคดีอีน ในปัสสาวะได้ต่ำสุด 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (76) มีรายงานว่าการใช้ HPLC ที่มีคอลัมน์ชนิดวัฏภาคผันกลับ และมีวัฏภาคเคลื่อนที่เป็น 40% เมทธานอลซึ่งมีฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.8 0.1 โมลาร์เป็นบัฟเฟอร์ ใช้เครื่องตรวจรับชนิดอุลตร้าไวโอเล็ต ที่ความยาว

คลื่น 210 นาโนเมตร ตรวจมอร์ฟีนในปัสสาวะและซีรั่ม โดยแยกมอร์ฟีนจากปัสสาวะ และซีรั่มด้วยการสกัดด้วยตัวทำละลาย ก่อนนำมาตรวจด้วย HPLC สามารถตรวจมอร์ฟีนในปัสสาวะและซีรั่มได้ต่ำสุด 50 นาโนกรัม/มิลลิลิตร กราฟมาตรฐานของมอร์ฟีนเป็นเส้นตรง ระหว่างความเข้มข้น 50-500 นาโนกรัม/มิลลิลิตร และมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของการวิเคราะห์มอร์ฟีนในซีรั่มเท่ากับ 10.99, 9.97, 3.49, 5.73 และ 0.77% เมื่อความเข้มข้นของมอร์ฟีนในซีรั่มเท่ากับ 50, 100, 150, 200 และ 500 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (จำนวนตัวอย่าง = 3)(78)

มีผู้ทำการทดลองตรวจมอร์ฟีนในปัสสาวะด้วยวิธี ทำให้เป็นสารอนุพันธ์ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารฟลูออเรสเซนต์ ก่อนที่จะผ่านเข้าคอลัมน์ (Pre-column Fluorescence Derivatisation) โดยนำมอร์ฟีนที่ผ่านการสกัดแยกจากปัสสาวะด้วยตัวทำละลายแล้ว มาทำปฏิริยาออกซิเดชั่น กับ สารละลายที่เป็นด่างของโปตัสเซี่ยมเฟอริไซยาไนด์ ได้ สูโดมอร์ฟีน (Pseudomorphine) แล้วจึงฉีดเข้าในคอลัมน์ชนิดวัฏภาคปรกติของ HPLC และมีเครื่องตรวจรับชนิดฟลูออเรสเซนต์ วิธีนี้สามารถตรวจมอร์ฟีนได้ต่ำสุด 4 นาโนกรัม และตรวจมอร์ฟีนในปัสสาวะได้ถึง 100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร โดยมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 6% (จำนวนตัวอย่าง = 20)(74)

นอกจากนี้ยังมีผู้ทำการทดลองตรวจมอร์ฟีนในปัสสาวะด้วยวิธีทำให้เป็นสารอนุพันธ์ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารฟลูออเรสเซนต์ เมื่อผ่านออกมาจากคอลัมน์แล้ว (Post-column Fluorescence Derivatisation) โดยการใช้สารละลายมอร์ฟีนซึ่งผ่านการสกัดแยกจากปัสสาวะด้วยตัวทำละลาย ฉีดเข้าในคอลัมน์ชนิดวัฏภาคผันกลับของ HPLC โดยมีปั๊มอีกตัวหนึ่งควบคุมการไหลของสารละลายที่เป็นด่างของโปตัสเซี่ยมเฟอริไซยาไนด์ ให้มาทำปฏิกิริยากับมอร์ฟีนที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ ได้เป็น สูโดมอร์ฟีน แล้ววัดด้วยเครื่องตรวจรับชนิดฟลูออเรสเซนต์ พบว่าวิธีนี้สามารถตรวจมอร์ฟีนได้ต่ำสุด 10 นาโนกรัม ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการวิเคราะห์มอร์ฟีนโดยวิธีนี้ในปัสสาวะและเลือด เท่ากับ 11% (จำนวนตัวอย่าง = 9) และ 2.9% (จำนวนตัวอย่าง = 17) ตามลำดับ (75)

การหาปริมาณมอร์ฟีนในชีววัตถุด้วยวิธี HPLC ต้องการขั้นตอนการแยกมอร์ฟีนจากชีววัตถุดังที่กล่าวมาแล้ว ในการวิจัยนี้ ใช้โดเวกซ์ 50 ดับบลิว (Dowex 50 W) ในการแยกมอร์ฟีนจากปัสสาวะ แล้วนำมาผ่านขั้นตอนการสกัดแยกด้วยตัวทำละลาย จึงขอกล่าวรายละเอียดเกี่ยวกับโดเวกซ์ 50 ดับบลิว โดยสังเขปดังนี้

โดเวกซ์ 50 ดับบลิว เป็นชื่อทางการค้าของ เรซินชนิดแลกเปลี่ยนอิออนประจุบวกที่เป็นกรดแก่ (Strongly Acid Cation Exchange Resin) ได้จากการนำ โพลีเมอร์ของสไตรีนกับไดไวนิลเบนซีน (Styrene Divinyl-benzene Copolymer) มาทำปฏิกิริยานิวเคลียร์ซัลโฟเนชั่น (Nuclear Sulfonation) ดังนั้น โดเวกซ์ 50 ดับบลิว จึงมีกลุ่มที่ใช้ในการแลกเปลี่ยนอิออน (ion active group) เป็น $-SO_3H$ (79)

<u>ปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนอิออน</u>

$$Resin - SO_3^-H^+ + Na^+ \rightleftharpoons Resin - SO_3^-Na^+ + H^+$$

$Resin - SO_3^-H^+$ คือ เรซินชนิดซัลโฟนิคแอซิด (Sulfonic Acid resin) ในรูปของไฮโดรเจน

Na^+ คือ สารละลายโซเดียม ที่ผ่านไปบนเรซิน

จากปฏิกิริยานี้โซเดียมอิออน จากสารละลายจะถูกจับไว้ที่เรซิน แลกเปลี่ยนกับไฮโดรเจนอิออนของเรซิน ทำให้ไฮโดรเจนอิออนละลายอยู่ในสารละลายแทน

เรซินชนิดแลกเปลี่ยนอิออนประจุบวก (Cation Exchange Resin) ในรูปของไฮโดรเจนหรือเป็นกรด สามารถทำให้เป็นกลางด้วยด่าง (เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์) และเรซินชนิดแลกเปลี่ยนอิออนประจุบวก ในรูปของโซเดียม หรือเป็นเกลือ สามารถเปลี่ยนกลับมาเป็นกรดด้วยการใช้กรด (เช่น กรดเกลือ) เรซินชนิดแลกเปลี่ยนอิออนประจุบวกทั้งชนิดที่เป็นกรดและเป็นเกลือ สามารถใช้ในการแลกเปลี่ยนอิออนประจุบวก (79)

หลักของการแลกเปลี่ยนอิออน

1. ปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนอิออนเป็น ปฏิกิริยาสตอยชิโอเมตริก (Stoichiometric reaction) กล่าวคือ กรัมสมมูลย์ของอิออนในสารละลายที่เรซินจับไว้จะเท่ากับกรัมสมมูลย์ของอิออนที่เรซินปล่อยลงสู่สารละลาย

2. ปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนอิออน เป็นปฏิกิริยาที่สามารถผันกลับได้ (Reversible reaction)

3. กลุ่มที่ใช้ในการแลกเปลี่ยนอิออนบนเรซินทุก ๆ กลุ่ม จะสามารถแลกเปลี่ยนอิออนกับอิออนขนาดเล็ก ๆ ได้

4. โดยทั่วไปสารใดก็ตามที่ละลายและแตกตัวได้ จะสามารถเกิดปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนอิออนได้ (79)

มีรายงานการใช้ โดเวกซ์ 50 ดับบลิว ในการแยกแอลคาลอยด์ชนิดต่าง ๆ ออกจากปัสสาวะ โดยการใช้กรดเกลือ ความเข้มข้นไม่เกิน 8 นอร์มัล เป็นตัวล้างดูดซับ (Eluent) เมื่อนำตัวล้างดูดซับที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ มาทำให้เป็นด่าง แล้วสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม จะได้สารที่บริสุทธิ์สามารถนำไปตรวจเอกลักษณ์หรือหาปริมาณต่อไป (80) พบว่า การใช้ตัวล้างดูดซับที่เป็นส่วนผสมของกรดเกลือและเอธิลแอลกอฮอล์ จะทำให้ประสิทธิภาพในการล้างดูดซับมอร์ฟีนออกจากคอลัมน์ได้ดีกว่าการใช้กรดเกลือเพียงอย่างเดียว (81)