บทที่ 3

วิธีทดลอง

1. การเตรียมสารละลายสำหรับวิเคราะห์ปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนโดยวิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์

1.1 สารละลาย ^{3}H - มอร์ฟีนสำหรับศึกษาประสิทธิภาพของการสกัดและการแยกมอร์ฟีน

นำ ^{3}H - มอร์ฟีน (22 คูรี่ ต่อมิลลิโมล) ปริมาณ 250 ไมโครคูรี่ ซึ่งละลายอยู่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 250 ไมโครลิตร มาเจือจางด้วยเอทิลแอลกอฮอล์จนปริมาตรครบ 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร จะได้ ^{3}H - มอร์ฟีน เข้มข้นประมาณ 2.5 ไมโครคูรี่ ต่อลูกบาศก์-เซนติเมตร และนำสารละลายนี้มา 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร เจือจางด้วยเอทิลแอลกอฮอล์จนปริมาตรครบ 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร จะได้สารละลายที่มี ^{3}H - มอร์ฟีน ประมาณ 0.025 ไมโครคูรี่ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร หรือ 50,000 dpm หรือ0.35 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์-เซนติเมตร เก็บสารละลายนี้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.2 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์

เตรียมบัฟเฟอร์ 0.01 โมลต่อลิตร pH 7.4 ที่มีโซเดียมเอไซด์ 0.1% โดยนำไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.01 โมลต่อลิตร (ละลาย ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.41 กรัม ด้วยน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 1 ลิตร) ปรับ pH ให้เป็น 7.4 ด้วยโซเดียมไดไฮ-โดรเจนฟอสเฟต 0.01 โมลต่อลิตร (ละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.56 กรัม ด้วยน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 1 ลิตร)

ละลายโซเดียมคลอไรด์ 9 กรัม และโซเดียมเอไซด์ 1 กรัม ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ที่เตรียมไว้ จนปริมาตรครบ 1 ลิตร

1.3 สารละลายมาตรฐานมอร์ฟีนไฮโดรคลอไรด์ 80 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร

ละลายมอร์ฟีนไฮโดรคลอไรด์ 10 มิลลิกรัมด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (จากข้อ 1.2) จนปริมาตรครบ 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร จะได้สารละลายมอร์ฟีนไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วนำสารละลายนี้มาเจือจางอีก 2 ครั้ง ๆ ละ 100 เท่า จนได้สารละลายมอร์ฟีนไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร นำสารละลายหลังสุดนี้มา 80 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมสารละลายบัฟเฟอร์จนปริมาตรครบ 100 ลูกบาศก์-เซนติเมตร จะได้สารละลายมอร์ฟีนไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 80 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร

เก็บสารละลายนี้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เมื่อต้องการใช้จึงนำสารละลายนี้ 500 ไมโครลิตร เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 500 ไมโครลิตร แล้วเจือจางแบบอนุกรมจนได้สารละลายมาตรฐานที่มีมอร์ฟีนไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 40,20,10,5,2.5,1.25 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตรตามลำดับ

1.4 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.01 โมลต่อลิตร

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม ด้วยน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำสารละลายนี้มา 1 ลูกบาศก์เซนติเมตรเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร

1.5 สารละลาย Bray's Scintillation

นำ 2,5 ไดเฟนนิลออกซาโซล 4 กรัม 1,4 - บิส -2-(4 -เมทิล-5 เฟนนิลออกซาโซล) - เบนซิน 20 มิลลิกรัม แนพทาลีน 60 กรัม มาละลายด้วยเอทิลลีนไกลคอล 20 ลูกบาศก์เซนติเมตร เมทิลแอลกอฮอล์ 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร และเติมไดออกเซนจนปริมาตรครบ 1 ลิตร

2. การเตรียมสารละลายสำหรับวิเคราะห์มอร์ฟีนและโคเดอีนทางคุณภาพโดยวิธีแกสโครมาโตกราฟฟี

2.1 สารละลายกรดเกลือ 0.1 โมลต่อลิตร

นำกรดเกลือเข้มข้น 35.4% โดยปริมาตร ความถ่วงจำเพาะ 1.18 มา 2.18 ลูกบาศก์เซนติเมตร เจือจางด้วยน้ำกลั่น จนปริมาตรครบ 250 ลูกบาศก์เซนติเมตร

2.2 สารละลายไดเมทิลไดคลอโรไซเลน 5% โดยปริมาตร

นำไดเมทิลไดคลอโรไซเลน 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร มาเติมโทลูอีนจนครบ 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร

2.3 สารละลายเดคคอน 3% โดยปริมาตร

นำเดคคอน 90 มา 3 ลูกบาศก์เซนติเมตร มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร

2.4 สารละลายมาตรฐานมอร์ฟีนไฮโดรคลอไรด์ 10 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร

ละลายมอร์ฟีนไฮโดรคลอไรด์ 10 มิลลิกรัม ด้วยสารละลายบีฟเฟอร์ (จากข้อ 1.2) จนปริมาตรครบ 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร จะได้สารละลายมอร์ฟีนไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร นำสารละลายนี้มา 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร เจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์จนมีปริมาตรครบ 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร

2.5 สารละลายมาตรฐานโคเดอีนฟอสเฟต 10 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร

ละลายโคเดอีนฟอสเฟต 10 มิลลิกรัมด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (จากข้อ 1.2) จนปริมาตรครบ 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร จะได้สารละลายโคเดอีนฟอสเฟตเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร นำสารละลายนี้มา 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร เจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ จนปริมาตรครบ 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร

3. การเตรียมสารละลายสำหรับวิเคราะห์มอร์ฟีนและโคเดอีนโดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี

3.1 สารละลายมาตรฐานมอร์ฟีนไฮโดรคลอไรด์ 1 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร

ละลายมอร์ฟีนไฮโดรคลอไรด์ 2 มิลลิกรัมด้วยเมทิลแอลกอฮอล์ 2 ลูกบาศก์เซนติเมตร

3.2 สารละลายมาตรฐานโคเดอีนฟอสเฟต 1 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร

ละลายโคเดอีนฟอสเฟต 2 มิลลิกรัมด้วยเมทิลแอลกอฮอล์ 2 ลูกบาศก์เซนติเมตร

4. การเตรียมแผ่นซิลิกาเจล

เตรียมแผ่นซิลิกาเจล ขนาด 20 x 20 เซนติเมตร หนา 0.25 มิลลิเมตร โดยใช้ซิลิกาเจล 20 กรัม ผสมกับน้ำ 40 ลูกบาศก์เซนติเมตรเขย่าให้เข้ากันดี เป็นเวลาประมาณ 30-40 วินาที เทสารผสมใส่ถาดซึ่งปรับเพื่อให้ได้ความหนาของแผ่นซิลิกาเจลเป็น 0.25 มิลลิเมตร แล้วลากถาดไปตามแผ่นแก้วที่สะอาดและแห้งด้วยความเร็วสม่ำเสมอ ทิ้งไว้ให้ซิลิกาเจลจับตัวกันอย่างน้อย 10 นาที ก่อนที่จะนำแผ่นแก้วออกจากเครื่องมือ แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และเก็บไว้ในตู้อบแห้งที่มีซิลิกาเจลสีน้ำเงิน

5. การทำให้คลอโรฟอร์มบริสุทธิ์

ใช้วิธีการกลั่นลำดับส่วน (Fractional Distillation) เก็บส่วนที่ออกจากเครื่องกลั่นที่อุณหภูมิ 60.0 องศาเซลเซียส

6. การเตรียมคอลัมน์สำหรับการวิเคราะห์โดยวิธีแกสโครมาโตกราฟฟี

6.1 การทำความสะอาดคอลัมน์

นำคอลัมน์แก้วที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางด้านใน 2 มิลลิเมตร ยาว 2 เมตร ซึ่งขดเป็นวงกลม มาล้างด้านในคอลัมน์โดยผ่านเมทิลแอลกอฮอล์และน้ำร้อนตามลำดับ โดยใช้สารละลายอย่างละประมาณ 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใช้เครื่องดูดอากาศดูดให้สารละลายแต่ละชนิดผ่านคอลัมน์ แล้วเติมเดคคอน 3% โดยปริมาตร (จากข้อ 2.3) ลงในคอลัมน์แช่ทิ้งค้างคืนไว้ แล้วล้างเดคคอนออกจนสะอาดด้วยน้ำ ทำให้คอลัมน์แห้งโดยผ่านเมทิลแอลกอฮอล์ 1 ครั้ง แล้วเป่าด้วยแกสไนโตรเจน

6.2 การซิลาไนซ์คอลัมน์

นำคอลัมน์ที่ล้างสะอาดแล้วและแห้ง มาเติมไดเมทิลไดคลอโรไซเลน 5% โดยปริมาตร (จากข้อ 2.2) ให้เต็มคอลัมน์ทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที จึงเทออก แล้วล้างคอลัมน์ด้วยเมทิลแอลกอฮอล์ ปริมาตร 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยใช้เวลาประมาณ 5 นาที แล้วเป่าให้คอลัมน์แห้งด้วยแกสไนโตรเจน

6.3 การเตรียมใยแก้ว

แช่ใยแก้วในไดเมทิลไดคลอโรไซเลน 5% โดยปริมาตร เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างในเมทิลแอลกอฮอล์ 3 ครั้ง นำใยแก้วที่ได้ไปเกลี่ยบนกระดาษกรอง เปลี่ยนกระดาษกรองหลาย ๆ ครั้ง แล้วเป่าด้วยแกสไนโตรเจนจนใยแก้วแห้ง เก็บใยแก้วที่ได้ในขวดปิดฝาสนิท ก่อนใช้นำไปอบที่ 80-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6.4 การบรรจุสารลงในคอลัมน์

นำใยแก้วที่ล้างสะอาดแล้วและแห้งใส่ปลายข้างหนึ่งของคอลัมน์ให้ได้ความยาวของใยแก้วประมาณ ½ นิ้ว แล้วต่อปลายด้านนี้เข้ากับเครื่องดูดอากาศซึ่งตั้งความดันไว้ 5-8 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ใช้สายยางสั้น ๆ ต่อปลายของคอลัมน์อีกด้านหนึ่งเข้ากับกรวยเทสารที่ต้องการจะบรรจุลงในกรวย เปิดเครื่องดูดอากาศแล้วยกขึ้นเขย่าเบา ๆ บนเครื่องเขย่าเพื่อให้สารลงไปในคอลัมน์อย่างสม่ำเสมอ ทำซ้ำ.ซ่นเดิมจนสารที่ต้องการบรรจุเกือบเต็มคอลัมน์ จึงใส่ใยแก้วเข้าที่ปลายคอลัมน์อีกด้านหนึ่ง

6.5 การเตรียมคอลัมน์สำหรับใช้งาน

นำคอลัมน์ที่เตรียมไว้จากข้อ 6.4 ไปผ่าน carrier gas เพื่อไล่ความชื้นและระเหย liquid phase ที่มากเกินพอ อุณหภูมิที่ใช้ผ่านแกสเป็นอุณหภูมิสูงสุดที่จะใช้งานหรือมากกว่าเล็กน้อย แต่ไม่เกินอุณหภูมิจำกัดที่คอลัมน์จะทนได้ การเตรียมคอลัมน์นี้ปกติใช้เวลาประมาณ 24-30 ชั่วโมง ในระหว่างที่ผ่าน carrier gas ทดสอบ base line จนได้ base line ที่เรียบพอเหมาะกับการใช้งาน

7. การวิเคราะห์หาปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนในน้ำนมคนโดยวิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์

7.1 การศึกษาโดยวิธีที่ดัดแปลงจากที่บริษัทแนะนำ

ศึกษาโดยใช้แอนติบอดี และสารติดฉลากปริมาณ ½ ของที่บริษัทแนะนำ และผสมสารต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 รายละเอียดการทำราดิโออิมมิวโนแอสเสย์ของอนุพันธ์มอร์ฟีนในปัสสาวะ

สารละลาย	หลอดทดลองและปริมาตร (ไมโครลิตร)	
	ศูนย์	มาตรฐาน
มอร์ฟีนมาตรฐานในปัสสาวะของบริษัท (40-1.25 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร)	-	100
มอร์ฟีนติดฉลาก	50	50
แอนติบอดี	50	50
ปัสสาวะคนปกติ (ที่ไม่มีมอร์ฟีน)	100	-

ผสมสารละลายให้เข้ากันดีแล้วอินคิวเบทที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เติมแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วปั่นแยกตะกอน (bound form) ออกจากน้ำใส (free form) ด้วยอัตราเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำแต่ละส่วนไปนับรังสี ด้วย Automatic Gamma Counter คำนวณหาร้อยละของการรวมตัว % bound $= \frac{\text{bound}}{\text{bound + free}}$ นำไปเขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของการรวมตัวและปริมาณมอร์ฟีน

7.2 การศึกษาเปรียบเทียบกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานในปัสสาวะและสารมาตรฐานในบัฟเฟอร์

ศึกษาโดยใช้ปริมาณสารต่าง ๆ ที่แสดงไว้ในตารางที่ 1 โดยเปรียบเทียบกราฟมาตรฐาน เมื่อใช้สารละลายมาตรฐานมอร์ฟีนไฮโดรคลอไรด์ (40-1.25 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์-เซนติเมตร) ในสารละลายบัฟเฟอร์ (จากข้อ 1.2) กับการใช้สารละลายมาตรฐานในปัสสาวะของบริษัท

7.3 การศึกษาอิทธิพลของน้ำนมต่อกราฟมาตรฐาน

ศึกษาโดยใช้ปริมาณสารต่าง ๆ ที่แสดงไว้ใน ตารางที่ 2

ตารางที่ 2 รายละเอียดการศึกษาอิทธิพลของน้ำนมต่อกราฟมาตรฐาน

สารละลาย	หลอดทดลองและปริมาตร (ไมโครลิตร)		
	ศูนย์	มาตรฐาน	น้ำนม
มอร์ฟีนมาตรฐาน (จากข้อ 1.3) (80-2.5 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร)	-	50	50
มอร์ฟีนติดฉลาก	50	50	50
แอนติบอดี	50	50	50
สารละลายบัฟเฟอร์ (จากข้อ 1.2)	100	50	-
น้ำนมคนปกติ	-	-	50

7.4 การศึกษาอิทธิพลของตัวทำละลายอินทรีย์และน้ำนมต่อกราฟมาตรฐาน

7.4.1 การเตรียมคอลัมน์เซฟาเดกซ์ LH-20 เพื่อใช้ในการทำให้สารที่สกัดได้บริสุทธิ์

เตรียมคอลัมน์เซฟาเดกซ์ LH-20 ตามวิธีของ Monk และคณะ (1975) โดยแช่เซฟาเดกซ์ LH-20 3.5 กรัม ไว้ในสารละลายผสม (คลอโรฟอร์ม : นอร์มอลเฮพเทน : เมทิลแอกอฮอล์ : น้ำ ในอัตราส่วน 500 : 500 : 75 : 3 โดยปริมาตร) 200 ลูกบาศก์เซนติเมตร ในขวดปิดฝาสนิท อย่างน้อย 24 ชั่วโมง เขย่าบ้างเป็นครั้งคราว แล้วนำไปบรรจุลงในคอลัมน์

7.4.2 การหาตำแหน่ง ^{3}H - มอร์ฟีนที่ออกจากคอลัมน์และอายุการใช้งานของคอลัมน์

นำ ^{3}H - มอร์ฟีน (จากข้อ 1.1) มา 0.1 ลูกบาศก์เซนติเมตร (ประมาณ 2,000 cpm) มาเป่าให้แห้งด้วยแกสไนโตรเจน แล้วละลายด้วยสารละลายผสมที่ใช้ในข้อ 7.4.1 ปริมาตร 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำสารละลายนี้มาหยอดลงในคอลัมน์ แล้วใช้สารละลายผสมเดิมเป็นตัวชะสารออกจากคอลัมน์ เริ่มเก็บสารที่ออกจากคอลัมน์หยดแรกลงในขวดนับรังสี ขวดละ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร 35 ขวด นำเฉพาะขวดเลขคี่ไประเหยให้แห้งในเครื่องระเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เติมสารละลาย Bray's Scintillation (จากข้อ 1.5) ขวดละ 4 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำไปนับปริมาณรังสีด้วยเครื่อง Liquid Scintillation Counter ทำการทดลองเช่นเดียวกันนี้ ทดลองห่างกันครั้งละ 1 เดือน รวม 4 เดือน

7.4.3 <u>การศึกษาอิทธิพลของสารต่าง ๆ ต่อกราฟมาตรฐาน</u>

เตรียมสารที่ใช้ทดสอบอิทธิพลที่มีต่อกราฟมาตรฐาน ดังนี้

ก. residue ของคลอโรฟอร์ม ใช้คลอโรฟอร์ม 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร ระเหยให้แห้ง

ข. residue ของน้ำนมที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม ใช้น้ำนมจากคนปกติ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมสารละลายบัฟเฟอร์ (จากข้อ 1.2) 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ปรับ pH ให้เป็นประมาณ 9 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (จากข้อ 1.4) (ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ได้จากการทดลองโดยใช้น้ำนม 2 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมสารละลายบัฟเฟอร์ 2 ลูกบาศก์เซนติเมตร ทดลองปรับ pH ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ วัด pH ด้วย pH meter จนได้ pH 9 ทำ 3 ครั้ง และหาค่าเฉลี่ยของปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ แล้วนำครึ่งหนึ่งของค่าเฉลี่ยที่ได้นี้ไปใช้ในการทดลอง) แล้วสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยการกลับหลอดทดลองไปมา 50 ครั้ง แยกชั้นคลอโรฟอร์มออกจากชั้นของน้ำนม นำชั้นคลอโรฟอร์มไประเหยให้แห้ง

ค. residue ของคลอโรฟอร์มที่ผ่านคอลัมน์เซฟาเดกซ์ ใช้คลอโรฟอร์ม 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร ระเหยให้แห้ง แล้วละลายด้วยสารละลายผสม คลอโรฟอร์ม : นอร์มอล-เฮพเทน : เมทิลแอลกอฮอล์ : น้ำในอัตราส่วน 500 : 500 : 75 : 5 โดยปริมาตร 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำไปผ่านคอลัมน์ที่เตรียมไว้ในข้อ 7.4.1 ซึ่งได้ทดสอบหาตำแหน่งมอร์ฟีน ตามวิธีในข้อ 7.4.2 แล้วทิ้งส่วนที่ผ่านจากคอลัมน์ไป 16 ลูกบาศก์เซนติเมตรแรกและเก็บส่วนต่อมารวม 13 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำไประเหยให้แห้ง

ง. residue ของน้ำนมที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์มและผ่านคอลัมน์เซฟาเดกซ์ ใช้น้ำนม 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร สกัดเช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 7.4.3 ข. นำชั้นคลอโรฟอร์มที่สกัดได้ไประเหยให้แห้ง นำไปละลายและผ่านคอลัมน์ เก็บส่วนที่ผ่านคอลัมน์ และนำไประเหยให้แห้งเช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 7.4.3 ค.

ต่อจากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ (จากข้อ 1.2) 250 ไมโครลิตรเพื่อละลายส่วนที่เหลือจากการเตรียมในข้อ 7.4.3 ก. ถึง 7.4.3 ง. เขย่าและทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที จึงนำไปทดสอบ ดังรายละเอียดในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 รายละเอียดการศึกษาอิทธิพลของสารต่าง ๆ ต่อกราฟมาตรฐาน

สารละลาย	หลอดทดลองและปริมาตร (ไมโครลิตร)		
	ศูนย์	มาตรฐาน	อิทธิพลของสารต่าง ๆ
มอร์ฟีนมาตรฐาน (จากข้อ 1.3) (80-2.5 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร)	-	50	50
มอร์ฟีนติดฉลาก	50	50	50
แอนติบอดี	50	50	50
สารละลายบัฟเฟอร์ (จากข้อ 1.2)	100	50	-
สารที่ต้องการทดสอบอิทธิพลที่มีต่อกราฟมาตรฐาน (7.4.3 ก ถึง 7.4.3 ง)	-	-	50

7.5 การวิเคราะห์หาปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนในน้ำนมคนโดยวิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์

7.5.1 การเตรียมน้ำนมเพื่อหาปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีน

นำ ^{3}H - มอร์ฟีน (จากข้อ 1.1) 0.1 ลูกบาศก์เซนติเมตร (ประมาณ 2,000 cpm) เป่าให้แห้ง เติมน้ำนม 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร และสารละลายบัฟเฟอร์ (จากข้อ 1.2) 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (20 องศาเซลเซียส) อย่างน้อย 30 นาที ปรับ pH ให้เป็นประมาณ 9 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ตามวิธีในข้อ 7.4.3 ข สกัดด้วยคลอโรฟอร์มและผ่านคอลัมน์ตามวิธีในข้อ 7.4.3 ข และ 7.4.3 ค ต่อจากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร เขย่าแล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แบ่งสารละลายนี้ 0.2 ลูกบาศก์เซนติเมตร เพื่อวัดประสิทธิภาพการสกัด โดยเติมสารละลาย Bray's Scintillation (จากข้อ 1.5) 4 ลูกบาศก์เซนติเมตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปนับปริมาณรังสีด้วยเครื่อง Liquid Scintillation Counter สารละลายที่เหลืออีก 0.1 x 2 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำไปทำราดิโออิมมิวโนแอสเสย์ ตามวิธีในข้อ 7.5.2

7.5.2 การวิเคราะห์หาปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนในน้ำนมคน

ศึกษาโดยใช้ปริมาณสารต่าง ๆ ที่แสดงไว้ในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 รายละเอียดการวิเคราะห์หาปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนในน้ำนมคน

สารละลาย	หลอดทดลองและปริมาตร (ไมโครลิตร)	
	ศูนย์	สารตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน
สารตัวอย่าง (7.5.1) หรือมอร์ฟีนมาตรฐาน 40-1.25 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร (จากข้อ 1.3)	-	100
มอร์ฟีนติดฉลาก	50	50
แอนติบอดี	50	50
สารละลายบัฟเฟอร์ (จากข้อ 1.2)	100	-

ผสมสารละลายให้เข้ากันดีแล้วอินคิวเบทที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เติมแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วปั่นแยกตะกอนออกจากน้ำใสด้วยอัตราเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำแต่ละส่วนไปนับรังสีด้วย Automatic Gamma Counter คำนวณหาร้อยละของการรวมตัว % bound $= \frac{\text{bound}}{\text{bound + free}}$ นำไปเขียนกราฟมาตรฐาน แสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของการรวมตัว และปริมาณมอร์ฟีน นำค่าร้อยละของการรวมตัวของสารตัวอย่าง ไปอ่านค่าปริมาณมอร์ฟีนจากกราฟมาตรฐาน

7.5.3 การคำนวณหาปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีน

ก. การคำนวณประสิทธิภาพการสกัด

สมมุติให้ ^{3}H - มอร์ฟีน ที่เติมลงในน้ำนมก่อนการวิเคราะห์ a cpm
สารตัวอย่างที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว 0.2 ลูกบาศก์เซนติเมตร มีรังสี b cpm
" " 0.5 " " " $\frac{b}{2} \times 5$ cpm

∴ ปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนที่สกัดได้ คิดเป็นร้อยละ $\frac{5b}{2a} \times 100 = c$

ข. การคำนวณปริมาณมอร์ฟีน

สารตัวอย่างที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว 0.1 ลูกบาศก์เซนติเมตร อ่านปริมาณจากกราฟมาตรฐานได้ d นาโนกรัม
" " 0.5 " " " " 5d นาโนกรัม

ปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนที่สกัดได้ c นาโนกรัม มาจากอนุพันธ์มอร์ฟีนเริ่มต้น 100 นาโนกรัม
" " 5d " " " $\frac{100}{c}$ x 5d = X นาโนกรัม

ถ้าใช้น้ำนม 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร
น้ำนมจะมีความเข้มข้นของอนุพันธ์มอร์ฟีน X นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร

7.6 <u>การทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธีวิเคราะห์</u>

7.6.1 <u>ความจำเพาะ (Specificity) ของแอนติบอดี</u>

แอนติบอดีที่ใช้เป็นแอนติบอดีจากบริษัทที่ได้ทดสอบความจำเพาะแล้วในห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยยาเสพติด สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จึงไม่ได้ทดสอบซ้ำอีก

7.6.2 <u>ความไว (Sensitivity) ของวิธีวิเคราะห์</u>

ทำราดิโออิมมิวโนแอสเสย์ของสารมาตรฐานความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ตามตารางที่ 4 ข้อ 7.5.2 ทำการทดลองซ้ำกัน 10 ครั้ง แล้วหาความไวของวิธีวิเคราะห์ ตามวิธีของ Abraham (1974) โดยคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่จุดที่ไม่มีความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน ที่ระดับความเชื่อถือได้ ร้อยละ 95 ที่จุดนี้ว่ามีความเข้มข้นเท่าใด ความเข้มข้นที่ได้จะเป็นความเข้มข้นน้อยที่สุดที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐานหรือความไวของวิธีวิเคราะห์

7.6.3 <u>ความแม่นยำ (Precision) ของวิธีวิเคราะห์</u>

ใช้น้ำนมตัวอย่างจากคนปกติ ที่เติมสารละลายมอร์ฟีนมาตรฐานลงในน้ำนมให้มีความเข้มข้นของมอร์ฟีนเป็น 3 ระดับ คือ 10,15 และ25 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 7.5.1 ถึง 7.5.3 โดยทำการทดลองทั้ง 3 ระดับ ความเข้มข้นระดับละ 3 ตัวอย่าง ในวันเดียวกัน (Within Assay) และทำเปรียบเทียบกัน (Between Assay) 3 วัน

7.6.4 <u>ความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีวิเคราะห์</u>

นำผลจากการทดลองในข้อ 7.6.3 ไปหาค่าความถูกต้องดังนี้
ถ้าความเข้มข้นของมอร์ฟีน 10 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตรวัดได้X นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร
" " 100 " " " $\frac{X}{10}$ x 100 = 10X "

∴ Recovery ของวิธีวิเคราะห์คิดเป็นร้อยละ 10X

8. <u>การวิเคราะห์หาปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนในปัสสาวะโดยวิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์</u>

ศึกษาโดยใช้ปริมาณสารต่าง ๆ ที่แสดงไว้ในตารางที่ 5 ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้อยู่ในห้องปฏิบัติการ ศูนย์วิจัยยาเสพติด สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 รายละเอียดการวิเคราะห์หาปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนในปัสสาวะ

สารละลาย	หลอดทดลองและปริมาตร (ไมโครลิตร)		
	ศูนย์	สารตัวอย่าง	สารมาตรฐาน
มอร์ฟีนมาตรฐานในปัสสาวะของบริษัท (40-1.25 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร) (เจือจางตามวิธีในข้อ 1.3)	-	-	100
ปัสสาวะคนปกติ	110	100	10
สารตัวอย่าง	-	10	-
มอร์ฟีนติดฉลาก	50	50	50
แอนติบอดี	50	50	50

ผสมสารละลายให้เข้ากันดี แล้วอินคิวเบทที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เติมแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วปั่นแยกตะกอนออกจากน้ำใสด้วย อัตราเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำแต่ละส่วนไปนับรังสีด้วย Automatic Gamma Counter คำนวณหาร้อยละของการรวมตัว

$$\% \text{ bound} = \frac{\text{bound}}{\text{bound + free}}$$

นำไปเขียนกราฟมาตรฐาน แสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของการรวมตัว และปริมาณมอร์ฟีน นำค่าร้อยละ ของการรวมตัวของสารตัวอย่าง ไปอ่านค่าปริมาณมอร์ฟีนจากกราฟมาตรฐาน

9. การวิเคราะห์มอร์ฟีนและโคเดอีนในเมล็ดฝิ่นและข้าวสารโดยวิธีแกสโครมาโตกราฟฟี

การวิเคราะห์มอร์ฟีนและโคเดอีนในเมล็ดฝิ่นและข้าวสารนั้น จำเป็นจะต้องสกัดสารด้วยตัวทำละลาย และทำให้สารที่สกัดได้บริสุทธิ์ขึ้นโดยกรรมวิธีอย่างหนึ่งอย่างใดก่อนจะนำไปวิเคราะห์ ในวิทยานิพนธ์นี้ ได้เลือกวิธีนำเมล็ดฝิ่นหรือข้าวสารมาสกัดด้วยน้ำและคลอโรฟอร์ม นำสารที่ได้ส่วนหนึ่งไปวิเคราะห์อนุพันธ์มอร์ฟีนโดยวิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์ โดยไม่มีการเตรียมอนุพันธ์ ส่วนที่เหลือนำไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธี back extraction หรือวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี ต่อจากนั้นจึงนำสารที่ได้ไปวิเคราะห์มอร์ฟีนและโคเดอีนด้วยวิธีแกสโครมาโตกราฟฟีโดยวิธีวิเคราะห์อนุพันธ์จากอะเซทิลเลชั่น หรือซิลิเลชั่น

9.1 การสกัดมอร์ฟีนและโคเดอีนจากสารละลายมาตรฐาน

นำสารละลายมอร์ฟีนมาตรฐาน (จากข้อ 2.4) และสารละลายโคเดอีนมาตรฐาน (จากข้อ 2.5) อย่างละ 0.5 - 2.0 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตามความเหมาะสมของแต่ละการทดลองมาเติมโซเดียมไบคาร์บอเนตจนอิ่มตัว แล้วสกัดด้วยคลอโรฟอร์มบริสุทธิ์ 5 ลูกบาศก์เซนติเมตรด้วยเครื่องเขย่า (Vortex-Genie) นาน 1 นาที แยกชั้นคลอโรฟอร์ม เพื่อนำไประเหยในเครื่องระเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ก่อนที่ชั้นคลอโรฟอร์มจะแห้ง ล้างข้างหลอดแก้วด้วยเมทิลแอลกอฮอล์ประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ระเหยจนแห้ง แล้วนำไปเตรียมอนุพันธ์ (ตามข้อ 9.6)

9.2 การสกัดมอร์ฟีนและโคเดอีนจากสารตัวอย่าง

9.2.1 ข้าวสาร

นำตัวอย่างข้าวสารและข้าวสารเปรียบเทียบอย่างละ 60 กรัม มาสกัดด้วยน้ำ 60 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยใช้เครื่องเขย่า (Shaker) เป็นเวลา 30 นาที แยกชั้นน้ำไปปั่นด้วยความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที และนำส่วนใสไปปรับ pH ให้เป็น 9 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลต่อลิตร แล้วสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม 30 ลูกบาศก์เซนติเมตร การสกัดทำโดยกลับหลอดทดลองไปมา 50 ครั้ง แยกชั้นคลอโรฟอร์ม นำคลอโรฟอร์มนี้ 5 ลูกบาศก์เซนติเมตรไประเหยให้แห้ง แล้วนำไปวิเคราะห์หาอนุพันธ์มอร์ฟีนโดยวิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์ นำคลอโรฟอร์มที่เหลือไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี แล้วจึงวิเคราะห์มอร์ฟีนและโคเดอีนโดยวิธีแกสโครมาโตกราฟฟี

9.2.2 เมล็ดฝิ่น

ร่อนเมล็ดฝิ่นเพื่อกำจัดชิ้นส่วนของกระเปาะหรือสิ่งเจือปนอื่น ๆ แล้วบดให้แตกด้วยโกร่งบดยา สกัดเมล็ดฝิ่น 25 กรัม ด้วยน้ำ 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยใช้เครื่องเขย่า (Shaker) เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นด้วยความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 50 นาที แยกส่วนใสมาเติมโซเดียมไบคาร์บอเนตจนอิ่มตัว แล้วสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร การสกัดทำโดยกลับหลอดทดลองไปมา 50 ครั้ง แยกชั้นน้ำทิ้ง เติมแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟตลงในชั้นคลอโรฟอร์มเพื่อกำจัดน้ำ แยกชั้นคลอโรฟอร์มมากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 เพื่อแยกโซเดียมซัลเฟตออก ปรับปริมาตรของคลอโรฟอร์มที่กรองได้ให้เป็น 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำคลอโรฟอร์มนี้ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ไประเหยให้แห้งแล้วนำไปวิเคราะห์หาอนุพันธ์มอร์ฟีน โดยวิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์ คลอโรฟอร์มที่เหลือแบ่งเป็น 3 ส่วนเท่า ๆ กัน นำส่วนหนึ่งไประเหยให้แห้งและทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี และอีก 2 ส่วน ทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี back extraction แล้วนำไปวิเคราะห์มอร์ฟีนและโคเดอีนโดยวิธีแกสโครมาโตกราฟฟี

9.3 การวิเคราะห์หาปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนโดยวิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์

ละลายสารตัวอย่างที่สกัดได้ จากข้อ 9.2.1 และ 9.2.2 ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (จากข้อ 1.2) 1.0 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วนำไปวิเคราะห์โดยวิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์ ตามวิธีในข้อ 7.5.2

9.4 การทำให้สารที่สกัดได้บริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี

นำตัวอย่างที่สกัดได้จากข้อ 9.2.1 และ 9.2.2 มาละลายด้วยเมทิลแอลกอฮอล์ แล้วหยดลงบนแผ่นซิลิกาเจลให้เป็นแถบแคบ ๆ ตามแนวนอนยาวประมาณ 2 เซนติเมตร ให้แต่ละแถบห่างกันพอสมควร ที่ริมแผ่นซิลิกาเจลทั้ง 2 ด้าน หยดสารละลายมอร์ฟีนมาตรฐาน (จากข้อ 3.1) รวมกับสารละลายโคเดอีนมาตรฐาน (จากข้อ 3.2) อย่างละ 10 ไมโครลิตร นำแผ่นซิลิกาเจลนี้ไปวางในแทงค์ที่บรรจุสารละลายผสม (เบนซีน ไดออกเซน เอทิลแอลกอฮอล์ และ แอมโมเนีย ในอัตราส่วน 50 : 40 : 5 : 5 โดยปริมาตร) 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร ซึ่งเตรียมไว้ล่วงหน้า และทิ้งไว้ให้สมดุลย์แล้ว รอจนกระทั่งระดับของตัวทำละลายขึ้นสูงประมาณ 12 เซนติเมตรจากจุดเริ่มต้น จึงนำแผ่นซิลิกาเจลออกจากแทงค์ทิ้งไว้ให้ตัวทำละลายระเหยจนหมด นำไปส่องใต้รังสีเหนือม่วงที่ 254 และ 366 นาโนเมตร มอร์ฟีนและโคเดอีนจะปรากฏเป็นสีดำ ขูดซิลิกาเจลส่วนที่คาดว่าเป็น มอร์ฟีน โคเดอีน สารมาตรฐานมอร์ฟีนและโคเดอีน และบริเวณซิลิกาเจลที่ตรงกับสารมาตรฐานปริมาณเท่า ๆ กับสารมาตรฐาน เติมน้ำ 2 ลูกบาศก์เซนติเมตร และเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.01 โมลต่อลิตร 2 หยดผสมให้เข้ากัน แล้วสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม 5 ลูกบาศก์เซนติเมตรด้วยเครื่องเขย่า (Vortex-Genie) นาน 1 นาที แยกชั้นคลอโรฟอร์มเพื่อนำไประเหยในเครื่องระเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ก่อนที่ชั้นคลอโรฟอร์มจะแห้งล้างข้างหลอดแก้วด้วยเมทิลแอลกอฮอล์ประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ระเหยจนแห้ง แล้วนำไปเตรียมอนุพันธ์โดยวิธีอะเซทิลเลชั่น ตามวิธีในข้อ 9.6.1

9.5 การทำให้สารที่สกัดได้บริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธี back-extraction

นำตัวอย่างที่สกัดได้จากข้อ 9.2.2 16 ลูกบาศก์เซนติเมตร, แบลงค์ (คลอโรฟอร์ม 16 ลูกบาศก์เซนติเมตร) และสารละลายมอร์ฟีนมาตรฐาน (จากข้อ 3.1) 20 ไมโครลิตร รวมกับสารละลายโคเดอีนมาตรฐาน (จากข้อ 3.2) 10 ไมโครลิตรในคลอโรฟอร์ม 16 ลูกบาศก์เซนติเมตร รวม 3 หลอด เติมกรดเกลือ 0.1 โมลต่อลิตร 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ทุกหลอดเขย่าด้วยเครื่องเขย่า (Vortex-Genie) นาน 1 นาที ดูดชั้นคลอโรฟอร์มทิ้ง เติมโซเดียมไบคาร์บอเนตลงในชั้นกรดจนอิ่มตัว เติมคลอโรฟอร์ม 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร และเขย่าด้วยเครื่องเขย่านาน 1 นาที แยกชั้นคลอโรฟอร์มจากแต่ละหลอดและแบ่งเป็น 2 ส่วนเท่า ๆ กัน แล้วนำไประเหยในเครื่องระเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ก่อนที่ชั้นคลอโรฟอร์มจะแห้ง ล้างข้างหลอดแก้วด้วยเมทิลแอลกอฮอล์ประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ระเหยจนแห้ง นำส่วนหนึ่งไปเตรียมอนุพันธ์ โดยวิธีอะเซทิลเลชั่น ตามวิธีในข้อ 9.6.1 และอีกส่วนหนึ่งเตรียมอนุพันธ์ ตามวิธีในข้อ 9.6.2

9.6 การเตรียมอนุพันธ์ของมอร์ฟีนและโคเดอีน

9.6.1 การเตรียมอนุพันธ์โดยวิธีอะเซทิลเลชั่น (Acetylation)

นำสารมาตรฐาน (จากข้อ 9.1) หรือสารตัวอย่างที่สกัดได้ (จากข้อ 9.4 และ 9.5) มาเติมอะซีติกแอนไฮไดรด์ 0.2 ลูกบาศก์เซนติเมตร และไพริดีน 0.1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน นำไปอุ่นที่ 60 องศาเซลเซียส ในเครื่องระเหยเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ต่อจากนั้นระเหยสารละลายที่เหลืออยู่ให้แห้งภายใต้ความดันต่ำที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ละลายอนุพันธ์ที่เตรียมได้ด้วยเอทิลอะซีเตท 50 ไมโครลิตร เพื่อนำไปฉีดเข้าเครื่องแกสโครมาโตกราฟ โดยใช้ 0.5 ไมโครลิตร

9.6.2 การเตรียมอนุพันธ์โดยวิธีซิลิเลชั่น (Silylation)

นำสารมาตรฐาน (จากข้อ 9.1) หรือสารตัวอย่างที่สกัดได้ (จากข้อ 9.5) มาเติม N,O บิส (ไตรเมทิลซิลิล)อะเซตาไมด์ (BSA) 50 ไมโครลิตร นำไปอุ่นที่ 60 องศาเซลเซียส ในตู้อบเป็นเวลา 30 นาที นำสารละลายที่ได้ไปฉีดเข้าเครื่องแกสโครมาโตกราฟ โดยใช้ 0.5 ไมโครลิตร

9.7 การศึกษาเพื่อหาชนิดของคอลัมน์ และสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์มอร์ฟีนและโคเดอีนโดยวิธีแกสโครมาโตกราฟฟี

ศึกษาโดยใช้คอลัมน์ดังต่อไปนี้

ก. คอลัมน์แก้ว เส้นผ่าศูนย์กลางด้านใน 2 มิลลิเมตร ยาว 2 เมตร บรรจุด้วย 3% OV-17 บน Chromosorp WHP (80-100 mesh)

ข. คอลัมน์สเตนเลส เส้นผ่าศูนย์กลางด้านใน 2 มิลลิเมตร ยาว 50 เซนติเมตร บรรจุด้วย 5% OV-101 บน Chromosorp GHP (100-120 mesh)

ค. คอลัมน์แก้วเส้นผ่าศูนย์กลางด้านใน 2 มิลลิเมตรยาว 2 เมตร บรรจุด้วย 3% SE-30 บน Gas Chrom Z (100-120 mesh)

หาสภาวะที่เหมาะสมโดยทดลองเปลี่ยนแปลงค่าของปัจจัยต่อไปนี้ ตามความจำเป็น คือ อัตราการไหล (flow rate) ของแกสไนโตรเจน ไฮโดรเจนและอากาศ อุณหภูมิของคอลัมน์ อินเจคเตอร์ และดีเทคเตอร์ โดยใช้ดีเทคเตอร์แบบ Flame Ionization Detector (FID) สารที่ใช้ทดสอบชนิดของคอลัมน์ใช้อนุพันธ์แบบอะเซทิลเลชั่น และซิลิเลชั่นของมอร์ฟีนและโคเดอีนมาตรฐาน โดยฉีดอนุพันธ์ของสารมาตรฐานที่เตรียมได้ลงในคอลัมน์ทั้ง 3 ชนิด ในสภาวะต่าง ๆ เพื่อเลือกคอลัมน์ที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์มอร์ฟีนและโคเดอีนในสารตัวอย่าง นำคอลัมน์ที่เลือกได้ ไปศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์อนุพันธ์แบบอะเซทิลเลชั่น เพื่อเปรียบเทียบการใช้ดีเทคเตอร์ แบบ FID และ Thermionic Specific Detector (TSD) นำคอลัมน์และสภาวะที่เหมาะสมที่ได้ เมื่อใช้ดีเทคเตอร์แบบ FID และ TSD ไปวิเคราะห์มอร์ฟีนและโคเดอีนในสารตัวอย่าง

9.8 การวิเคราะห์มอร์ฟีนและโคเดอีนในเมล็ดฝิ่น และข้าวสารโดยวิธีแกสโครมาโตกราฟฟี

9.8.1 ข้าวสาร

สกัดข้าวสารด้วยน้ำและคลอโรฟอร์ม ตามวิธีในข้อ 9.2.1 นำไปทำให้บริสุทธิ์ขั้นด้วยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี แล้วเตรียมอนุพันธ์ด้วยวิธีอะเซทิลเลชั่น (ข้อ 9.6.1) นำอนุพันธ์ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยวิธีแกสโครมาโตกราฟฟี โดยใช้คอลัมน์และสภาวะที่ได้จากข้อ 9.7 ด้วยดีเทคเตอร์ทั้ง 2 แบบ คือ FID และ TSD

9.8.2 เมล็ดฝิ่น

สกัดเมล็ดฝิ่นด้วยน้ำและคลอโรฟอร์ม ตามวิธีในข้อ 9.2.2 และแบ่งไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้น 2 วิธีคือ วิธี back-extraction (ข้อ 9.5) และวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี (ข้อ 9.4) สารที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีแรก แบ่งไปเตรียมอนุพันธ์ 2 วิธีคือ วิธีอะเซทิลเลชั่น และวิธีซิลิเลชั่น ส่วนสารที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีหลัง นำไปเตรียมอนุพันธ์ด้วยวิธีอะเซทิลเลชั่นอย่างเดียว นำอนุพันธ์ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยวิธีแกสโครมาโตกราฟฟี โดยใช้คอลัมน์และสภาวะที่ได้จากข้อ 9.7 ศึกษาโดยใช้ดีเทคเตอร์ทั้ง 2 แบบ คือ FID และ TSD นำค่าความสูงของ peak อนุพันธ์ของมอร์ฟีนและโคเดอีนในเมล็ดฝิ่นเมื่อทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี back-extraction และเตรียมอนุพันธ์ด้วยวิธีอะเซทิลเลชั่น ไปอ่านค่าปริมาณมอร์ฟีนและโคเดอีน จากกราฟมาตรฐานในข้อ 9.8.3

9.8.3 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์มอร์ฟีนและโคเดอีนด้วยวิธีแกสโครมาโตกราฟฟี

นำสารละลายมาตรฐานมอร์ฟีนไฮโดรคลอไรด์ในเมทิลแอลกอฮอล์ 5 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร มา 2 1.6 1.2 0.8 0.4 และ 0.2 ลูกบาศก์เซนติเมตร และสารละลายโคเดอีนฟอสเฟตในเมทิลแอลกอฮอล์ 5 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตรมา 1.6 1.2 0.8 0.4 และ 0.2 ลูกบาศก์เซนติเมตร ระเหยให้แห้ง และเตรียมอนุพันธ์ด้วยวิธีอะเซทิลเลชั่น ตามวิธีในข้อ 9.6.1 นำอนุพันธ์ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยวิธีแกสโครมาโตกราฟฟี สร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ความสูงของ peak และปริมาณมอร์ฟีนและโคเดอีน

9.8.4 การคำนวณปริมาณมอร์ฟีนหรือโคเดอีนในเมล็ดฝิ่น

สกัดเมล็ดฝิ่น 25 กรัม ด้วยคลอโรฟอร์ม 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำชั้นคลอโรฟอร์ม 16 ลูกบาศก์เซนติเมตร ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี back-extraction นำครึ่งหนึ่งคือ 8 ลูกบาศก์เซนติเมตร ไปเตรียมอนุพันธ์ด้วยวิธีอะเซทิลเลชั่น ละลายอนุพันธ์เป็น 50 ไมโครลิตร นำไปฉีดเข้าเครื่องแกสโครมาโตกราฟฟี โดยใช้ 0.5 ไมโครลิตร

สมมุติอ่านปริมาณมอร์ฟีน หรือโคเดอีน จากกราฟมาตรฐานได้ X นาโนกรัม

สารละลายอนุพันธ์ที่ใช้ 0.5 ไมโครลิตร มีมอร์ฟีนหรือโคเดอีน X นาโนกรัม

สารละลายอนุพันธ์ทั้งหมด 50 ไมโครลิตร มีมอร์ฟีนหรือโคเดอีน $\frac{X}{0.5} \times 50 = 100X$ นาโนกรัม

คลอโรฟอร์มที่นำไปเตรียมอนุพันธ์ 8 ลูกบาศก์เซนติเมตร มีมอร์ฟีนหรือโคเดอีน 100X นาโนกรัม

คลอโรฟอร์มที่ใช้สกัดทั้งหมด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร มีมอร์ฟีนหรือโคเดอีน $\frac{100}{8} \times 25$ นาโนกรัม

∴ ปริมาณมอร์ฟีนหรือโคเดอีนต่อเมล็ดฝิ่น 1 กรัม เป็น $\frac{100X}{8} \times \frac{25}{25} = \frac{100X}{8}$ นาโนกรัม