

การเปรียบเทียบวิธีการตรวจวิเคราะห์หม้อพื้นในปัสสาวะ
ระหว่างวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนส์ลิควิดโครมาโตกราฟี กับ
แอนซีเอ็มมัลติฟลายอิมมูโนแอสเสเทคนิค



ร้อยตำรวจตรี หญิง สมทรง ต้นทเทศธรรม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาเภสัชวิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2528

ISBN 974-564-640-7

009109

117694213

COMPARISON OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF MORPHINE
IN URINE BETWEEN HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY
AND ENZYME MULTIPLIED IMMUNOASSAY TECHNIQUE



Pol.Sub.Lt. Somsong Tuntaterdtum

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacology

Department of Pharmacology

Graduate School

Chulalongkorn University

1985

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การเปรียบเทียบวิธีการตรวจวิเคราะห์มอร์ฟินในปัสสาวะ ระหว่าง
วิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนส์ลิกวิดโครมาโตกราฟี กับ เอนซัยม์มัลติพลาย

อิมมูโนแอสเสเทคนิค

โดย

รอยตำรวจตรี หญิง สมทรง ตันตเทอดธรรม

ภาควิชา

เภสัชวิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษา

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พาลาก สิงห์เสนี

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ สมพูล กฤตลักษณ์



บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบัณฑิต

สุประคิษฐ์ บุณาค

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุประคิษฐ์ บุณาค)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

วิไลลักษณ์ อิ่มอุคม ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. วิไลลักษณ์ อิ่มอุคม)

พาลาก สิงห์เสนี กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พาลาก สิงห์เสนี)

สมพูล กฤตลักษณ์ กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ สมพูล กฤตลักษณ์)

พ.อ.อ.หญิง ปวีณา ทัศนวิทย์ กรรมการ
(พันตำรวจเอก หญิง ปวีณา ทัศนวิทย์)

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเปรียบเทียบวิธีการตรวจวิเคราะห์มอร์ฟีนในปัสสาวะ ระหว่างวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนส์ลิควิดโครมาโตกราฟี กับ เอนไซม์มัลติพลาายอิมมูโนแอสเสเทคนิค
ชื่อ นิสิต	ร้อยตำรวจตรี หญิง สมทรง ต้นทเทอชธรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พาลาก สิงทเสนี
อาจารย์ที่ปรึกษารวม	รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ สมพูล กฤตลักษณ์
ภาควิชา	เภสัชวิทยา
ปีการศึกษา	2527



บทคัดย่อ

วิธี EMIT และวิธี HPLC เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจวิเคราะห์มอร์ฟีน การวิจัยนี้ ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการตรวจวิเคราะห์มอร์ฟีนระหว่างวิธีทั้งสองเพื่อหาวิธีที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์มอร์ฟีนในปัสสาวะของผู้ติดยาเสพติด เมื่อนำตัวอย่างปัสสาวะจากผู้ป่วยที่เสพยาเฮโรอีนมาตรวจวิเคราะห์ปริมาณมอร์ฟีนด้วยวิธี EMIT และวิธี HPLC ทั้งกรณีผ่านและไม่ผ่านการไฮโครไลส์ปัสสาวะด้วยกรด พบว่า ผลการวิเคราะห์ที่ตรวจโดยวิธี EMIT มีค่าสูงกว่าเมื่อตรวจโดยวิธี HPLC นอกจากนี้ การตรวจด้วยวิธี EMIT ยังสามารถตรวจพบมอร์ฟีนในตัวอย่างปัสสาวะที่เก็บหลังจากการเสพยาครั้งสุดท้ายได้เป็นเวลานานกว่าด้วย ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างผลการวิเคราะห์ที่ตรวจโดยวิธี EMIT และวิธี HPLC ที่ผ่านการไฮโครไลส์ด้วยกรด เท่ากับ 0.7639 ด้วยระดับนัยสำคัญ 0.05 สำหรับปัสสาวะที่เก็บครั้งแรกคือเก็บหลังจากได้รับเฮโรอีนครั้งสุดท้ายประมาณ 2 ชั่วโมง พบว่าผลการวิเคราะห์ที่ตรวจโดยวิธี EMIT มีค่าต่ำกว่าเมื่อตรวจโดยวิธี HPLC เป็นอย่างมาก เมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณมอร์ฟีนในปัสสาวะผู้ป่วยระหว่างวิธีทั้งสองแล้ว ได้นำข้อมูลความเหมาะสมด้านอื่น ๆ มาประกอบเพื่อประเมินความเหมาะสมของวิธี EMIT และวิธี HPLC ในการใช้ตรวจวิเคราะห์มอร์ฟีนในห้องปฏิบัติการ

Thesis Title Comparison of Quantitative Determination of Morphine
 in Urine Between High Performance Liquid
 Chromatography and Enzyme Multiplied Immunoassay
 Technique

Name Pol.Sub.Lt. Somsong Tuntaterdtum

Thesis Advisor Assistant Professor Palap Sinhaseni, Ph.D.

Co Thesis Advisor Associate Professor Sompool Kritalugsana, M.D.

Department Pharmacology

Academic Year 1984

ABSTRACT

EMIT and HPLC methods are widely used for quantitative determination of morphine. The methods are comparatively studied for selecting the better methodology to determine morphine in urine of drug addicts. Urine samples of heroin addicts were collected and analysed by EMIT and HPLC. Urine samples were both hydrolysed and non-hydrolysed by acid prior to be analysed by HPLC. The analytical results obtained by using EMIT were higher than that by HPLC. Urine samples collected at a longer period after the last heroin injection could still be detected for morphine by EMIT but not by HPLC. The correlation coefficient between the results detected by EMIT and HPLC, for urine samples which were acid hydrolysed, were 0.7639 at the level of significance of 0.05. The quantitative analytical results of the urine samples, collected about two hours after heroin injection which were detected by EMIT, were much lower than those detected by HPLC. The acquired results were evaluated including other variable

parameters such as cost, time, etc. in order to select the more appropriate method for quantitative determination of morphine in urine.



กิติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณสำหรับความกรุณาอย่างสูงสุดของอาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พาลาภ สิงหเสนี ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ สมพูน กฤตลักษณ์ ผู้อำนวยการศูนย์พิษวิทยาศีรีราช คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล อาจารย์ผู้ประสานงาน พันตำรวจเอก หดิ่ง ประจันต์ ทินกร ณ อยุธยา ผู้กำกับ کارงานพิษวิทยา สถาบันนิติเวชวิทยา สำนักงานแพทย์ใหญ่ กรมตำรวจ ที่กรุณาให้คำแนะนำ ความรู้ และความช่วยเหลือแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ เป็นอย่างดี ตลอดระยะเวลาการศึกษา การวิจัย และการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเป็นผลสำเร็จ

ขอกราบขอบพระคุณ นายแพทย์ ธงไชย อินทูลักษณ์ ผู้อำนวยการโรงพยาบาลธัญญรักษ์ และแพทย์หญิง จินตรา อุ่นเอกลาก ที่กรุณาให้ความสะดวกในการเก็บตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยมาใช้ในงานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ พลตำรวจตรี นายแพทย์ ไพฑูรย์ หลิมรัตน์ ผู้บังคับการสถาบันนิติเวชวิทยา สำนักงานแพทย์ใหญ่ กรมตำรวจ และ พันตำรวจเอก หดิ่ง ประจันต์ ทินกร ณ อยุธยา ที่กรุณาให้ความสะดวกในการใช้เครื่องมือและสถานที่ในการดำเนินการวิจัย อีกทั้งขอขอบคุณ ร้อยตำรวจตรี หดิ่ง สุภาพร ไชยพงษ์ ที่กรุณาให้ความสะดวกในการปฏิบัติการทางห้องทดลองตลอดระยะเวลาในการวิจัย

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร และศูนย์วิจัยยาเสพติด สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในการวิเคราะห์ปริมาณโอพิเอทในตัวอย่างปัสสาวะด้วยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเส

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ทุกท่านในภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาช่วยเหลือ ให้คำแนะนำต่าง ๆ จนกระทั่งงานวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จ ลุล่วงไปด้วยดี



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ช
สารบัญ	ซ
สารบัญตาราง	ณ
สารบัญภาพ	ญ
คำย่อ	ฉ
บทที่	
1. บทนำ	1
2. การสำรวจการวิจัยอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องและทฤษฎี	6
3. เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการ	27
4. ผลการทดลอง	46
5. วิจัย และสรุปผล	65
เอกสารอ้างอิง	73
ภาคผนวก	85
ประวัติผู้เขียน	87

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงผลการวิจัยหาชนิด และปริมาณของสารเมตาโบไลต์ในปัสสาวะ หลังจากได้รับเฮโรอีน	12
2	แสดงค่าความไวสัมพัทธ์ (Relative Reactivity) ของวิธี EMIT ที่มีต่อสารต่าง ๆ ในกลุ่มโอพิเอทและสารอื่น ๆ ที่ไม่อยู่ในกลุ่มโอพิเอท	18
3	แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงในช่วงเวลา 40 วินาที (ΔA) ที่ความเข้มข้นของมอร์ฟีนมาตรฐานต่าง ๆ ในปัสสาวะคนปกติ เพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานมอร์ฟีน โดยวิธี EMIT	52
4	แสดงเปอร์เซ็นต์ที่ได้อาร์คีนของมอร์ฟีน เมื่อสกัดแยกด้วยตัวทำละลาย เปรียบเทียบการทำให้เป็นด่างที่พีเอช 8.5 ด้วยด่างชนิดต่าง ๆ	54
5	แสดงเปอร์เซ็นต์ที่ได้อาร์คีนของมอร์ฟีน เมื่อใช้โคเวกซ์ 50 คัมบลิว ตามด้วยการสกัดแยกด้วยตัวทำละลาย เป็นขั้นตอนการทำสารให้ บริสุทธิ์ก่อนนำมาตรวจปริมาณด้วยวิธี HPLC	55
6	แสดงความแม่นยำของวิธี EMIT ในการวิเคราะห์ปริมาณมอร์ฟีน มาตรฐานในปัสสาวะคนปกติ	56
7	เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณมอร์ฟีนในปัสสาวะคนปกติ ระหว่างวิธี HPLC เมื่อไม่ผ่านการไฮโครไลสด้วยกรด และ ผ่านการไฮโครไลสด้วยกรด และวิธี EMIT	57
8	แสดงประวัติและพฤติกรรมกรมการเสพยาเสพติดเฮโรอีนของผู้ป่วย 5 ราย ซึ่งเก็บปัสสาวะมาเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณมอร์ฟีน ระหว่างวิธี HPLC และวิธี EMIT	58

ตารางที่

หน้า

9	แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณมอร์ฟีนในปัสสาวะผู้ป่วยลำดับที่ 1 ระหว่างวิธี EMIT และวิธี HPLC (เมื่อไม่ผ่านการไฮโคร-ไลส์ด้วยกรดและเมื่อผ่านการไฮโครไลส์ด้วยกรด)	59
10	แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณมอร์ฟีนในปัสสาวะผู้ป่วยลำดับที่ 2 ระหว่างวิธี EMIT และวิธี HPLC (เมื่อไม่ผ่านการไฮโคร-ไลส์ด้วยกรดและเมื่อผ่านการไฮโครไลส์ด้วยกรด)	60
11	แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณมอร์ฟีนในปัสสาวะผู้ป่วยลำดับที่ 3 ระหว่างวิธี EMIT และวิธี HPLC (เมื่อไม่ผ่านการไฮโคร-ไลส์ด้วยกรดและเมื่อผ่านการไฮโครไลส์ด้วยกรด)	61
12	แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณมอร์ฟีนในปัสสาวะผู้ป่วยลำดับที่ 4 ระหว่างวิธี EMIT และวิธี HPLC (เมื่อไม่ผ่านการไฮโคร-ไลส์ด้วยกรดและเมื่อผ่านการไฮโครไลส์ด้วยกรด)	62
13	แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณมอร์ฟีนในปัสสาวะผู้ป่วยลำดับที่ 5 ระหว่างวิธี EMIT และวิธี HPLC (เมื่อไม่ผ่านการไฮโคร-ไลส์ด้วยกรดและเมื่อผ่านการไฮโครไลส์ด้วยกรด)	63
14	แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณมอร์ฟีนในปัสสาวะผู้ป่วย 5 ราย ระหว่างวิธี EMIT และวิธี HPLC กรณีผ่านการไฮโครไลส์ด้วยกรด ซึ่งจะนำมาใช้คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ และทดสอบการเปรียบเทียบข้อมูลเป็นคู่	64

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงจำนวนผู้เข้ารับการรักษาการติดสารเสพติดในสถานพยาบาล ผู้ติด สารเสพติดทั่วประเทศ ระหว่าง พ.ศ. 2515-2524	4
2	แสดงเปอร์เซ็นต์ของผู้เข้ารับการรักษาการติดสารเสพติดชนิด ต่าง ๆ ในสถานพยาบาลทั่วประเทศ ระหว่าง พ.ศ. 2522-2524	5
3	แสดงสูตรโครงสร้างของมอร์ฟีน	6
4	แสดงสูตรโครงสร้างของเฮโรอีน	7
5	แสดงปฏิกิริยาเมตาบอลิซึมของเฮโรอีน	9
6	แสดงการเปลี่ยนแปลงที่เป็นไปได้ของมอร์ฟีนในร่างกาย	10
7	แสดงปฏิกิริยาที่ใช้อธิบายหลักการของวิธี EMIT ในการวิเคราะห์สาร กลุ่มโอพิเอทในปัสสาวะ	13
8	แสดงขั้นตอนวิธีการและส่วนประกอบสำคัญของวิธี EMIT ในการตรวจ สารกลุ่มโอพิเอทในปัสสาวะ	14
9	แสดงกราฟมาตรฐานของมอร์ฟีนโดยวิธี EMIT	15
10	แสดงส่วนประกอบที่สำคัญของระบบไฮเพอร์ฟอร์แมนส์ลิกวิดโครมาโต- กราฟฟี	20
11	แสดงคอลัมน์ประยุกต์จากปิเปตขนาด 10 มิลลิลิตร เพื่อบรรจุโคเวกซ์ 50 คัมบลิว	29
12	แสดงกราฟมาตรฐานของมอร์ฟีน โดยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนส์ลิกวิด โครมาโตกราฟฟี	51
13	แสดงกราฟมาตรฐานของมอร์ฟีน โดยวิธีเอนไซม์มัลติฟลายอิมมูโน แอสเสเทคนิค	53

ภาพที่

หน้า

14

แสดงพีคของมอร์ฟินจากตัวอย่างปัสสาวะ ตรวจโดยวิธี HPLC วัดที่ความยาวคลื่นแสง 254 และ 280 นาโนเมตร เทียบกับมอร์ฟินมาตรฐาน

86



คำย่อ

- HPLC = High Performance Liquid Chromatography
- EMIT = Enzyme Multiplied Immunoassay Technique
- RIA = Radioimmunoassay