ศักยภาพ ของHPLC ด้วย เครื่องตรวจวัดชนิด photodiode array ในทางนิติพิษวิทยา

Potential of high-performance liquid chromatography with photodiode array detection in forensic toxicology

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้นำเสนอศักยภาพและข้อจำกัดของ high-performance liquid chromatography-photodiode array ในการวิเคราะห์ตัวอย่างทางชีววิทยา ที่แตกต่างกันและในการตรวจพิสูจน์สาร unknows วิธีการที่ดีที่ถูกต้องที่ใช้ในการวิเคราะห์พิษวิทยาทาง clinic และทางนิติวิทยาศาสตร์ การวิเคราะห์สารพิษชนิดเดียวหรือมากกว่าหนึ่งชนิดสำคัญสำหรับการตรวจพิสูจน์สารพิษ ,สาเหตุของความเป็นพิษ โดยส่วนใหญ่แล้วใช้วิธีง่ายๆ และรวดเร็วที่เรียว่า " general unknown screening" ซึ่งครอบคลุมถึงยาและสารเคมีที่มีอันตรายส่วนใหญ่ มีรายงานในเอกสารแสดงให้เห็นว่าการใช้ HPLC ช่วยวิเคราะห์ทางพิษวิทยาได้อย่างเป็นระบบ พบว่าทั้งวัสดุ packing column และองค์ประกอบของ eluent มีความสำคัญต่อ intra- and interlaboratory มีรายงานว่าการใช้ columns HPLC ต่างชนิดกันจะช่วยเพิ่มความสามารถในการแยกสาร ข้อดีของการใช้ photodiode array เป็นตัวตรวจวัด เมื่อเปรียบเทียบกับการวัด UV ทั่วไป มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการใช้ HPLC วิเคราะห์ทางพิษวิทยา ข้อมูล spectram ใน libraries บนเครื่อง และโปรแกรมที่ใช้สืบค้นเป็นอุปกรณ์สำคัญในกระบวนการตรวจพิสูจน์สาร unknown ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาประเด็นต่างๆ ข้างต้นในตัวอย่างจริงจำนวนหนึ่ง ได้แก่ trazodone และ dothiepin, azide, chloroquine และ cocaine, ซึ่งเราพบว่าการใช้ HPLC - photodiode array จะเป็นประโยชน์อย่างมากในการวิเคราะห์ทางพิษวิทยาอย่างเป็นระบบ

1.บทนำ

ความยากของการวิเคราะห์ของเหลวในร่างกาย (เช่น เลือด ปัสสาวะ ของเหลวในท้อง เนื้อเยื่อ เป็นต้น) เพื่อระบุสาร unknown ที่เป็นพิษที่ให้ได้นั้นเป็นงานที่ท้าทายทางด้านนิติพิษวิทยา ในปัจจุบันจำนวนของสารประกอบที่มีรายงานอยู่ในงานวิจัยที่เกี่ยวข้องมีมากกว่า 7 ล้าน ชนิด สารประกอบแต่ละชนิดนั้นเป็นไปได้ที่จะเป็นสารพิษเฉียบพลัน ดังนั้น การวิเคราะห์ทางเคมีอย่างสมเหตุสมผลจะ เรียกว่า การวิเคระห์ทางพิษวิทยาอย่างเป็นระบบ (STA) มีความจำเป็นสำหรับการบ่งชี้และการพิจารณาสารประกอบของความเป็นพิษได้

ความสำเร็จของ STA โดยมากขึ้นอยู่กับคุณภาพของระบบการวิเคราะห์ที่ใช้ จำนวนของเทคนิคการวิเคราะห์ เช่น TLC , GC, HPLC และ ความหลากหลายของ immunoassay tests เป็นความสามารถของนักพิษวิทยา ซึ่งสามารถทำงานได้ทั้งสองระบบ(on-line และ off-line) ด้วยเครื่องตรวจวัดที่มีความสามารถสูง เช่น MS และ FTIR สำหรับ GC และ fast-scanning หรือ photodiode array (DAD) และ MS - HPLC

ในการอธิบายโดยสรุปจะมุ่งไปที่ HPLC- DAD ไม่เพียงแต่ศักยภาพเท่านั้น แม้แต่อันตรายของการรวมตัว ก็จะนำมาวิจารณ์ด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำไปเทียบกับความสามารถในการประยุกต์ใน STA ส่วน HPLC – DAD ซึ่งใช้เป็นเครื่องมือในการคัดกรองหา general unknown ซึ่งครอบคลุมตัวยามากมายและสารพิษที่เป็นไปได้ แต่ควรจะมีการเลือก ความไว และความน่าเชื่อถือ การสำรวจของงานวิจัยที่เกี่ยวข้องในสาขา (field) นี้ ถูกนำเสนอในงานวิจัยนี้ และบางการวิเคราะห์จะถูกนำมาเปรียบเทียบและประยุกต์ในกรณีที่เกิดขึ้นจริงจำนวนหนึ่ง

2.การประยุกต์ของการแยกของเหลวสำหรับ STA

2.1 Column packing materials

2.1.1 Underivatized silica

การใช้ Underivatized silica เป็น stationary phase สำหรับการแยกตัวยาพื้นฐานจำนวนหนึ่งได้อธิบายไว้ใน ปี 1975 [1] และ 1984 [2] หลังจากนั้นผู้วิจัยคนอื่นได้หาค่า retention ของตัวยาพื้นฐานบนความแตกต่างของ silica packing โดยการแยกสารประกอบที่ไม่ปกติออกมา ซึ่งเทียบกับ methanol และammonium nitrate ความแตกต่างของยี่ห้อของ silica และ แม้ความแตกต่างของกลุ่มทดลองของบางยี่ห้อของ silica packing บ่อยครั้งจะพบค่า retention แตกต่างกันในยาพื้นฐาน [3] จากผลที่ผ่านมาของพื้นฐานขั้นต้น ของกลไก retentionในการดูดกลืนโครมาโตรกราฟี [4] ข้อจำกัดจำนวนหนึ่งต้องทำให้สำเร็จก่อน retention time ออกมา หรือปัจจัยปริมาณ สามารถหาได้ใน one single laboratory หรือ different laboratories วิธีนี้ข้อจำกัดของโครโมโตกราฟี(บางกลุ่มทดลองของบางยี่ห้อ packing , ส่วนประกอบของสาร eluent ควบคุมโดยอุณหภูมิ) ควรจะกำหนดอย่างแน่นอนและทำตามอย่างเคร่งครัด แม้ว่าภายใต้ข้อจำกัดของ reverse-phase กราฟของ retention time จะเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย อย่างไรก็ตามอิทธิพลของระบบการดูดกลืนจะมีมากขึ้น ตามข้อจำกัดที่กำหนดการประยุกต์ของการดูดกลืนของ STA ค่อนข้างจำกัด

2.1.2 Bonded-phase packing material

Bonded-phase โครโมโตกราฟี และโดยเฉพาะอย่างยิ่งใน reverse-phrase บน octyl หรือ Octa decylsilica ซึ่งเป็นเทคนิคที่นิยมใช้ใน STA ในหลายงานวิจัยไปได้อธิบายความสามารถในการประยุกต์ของ packing กับนิติพิษวิทยา [5-11] มีสองงานวิจัยที่เปรียบเทียบความแตกต่างของ packing [7,10] และความแข็งแรงที่มีอิทธิพลของหน้าที่ free silanol บน retention ของยาที่แตกต่างกัน ดังนั้นผลกระทบของ silanol สามารถลดการเปลี่ยนแปลงค่า pH ของสาร eluent หรือโดยการปรับปรุงด้วยการเพิ่ม amine ทางเลือกหนึ่ง เครื่องจักรมากมายผลิต column ออกสู่ตลาดและอ้างถึงผลกระทบของ silanol และจัดให้สามารถมี retention times มากขึ้นอีก โดยส่วนใหญ่จะได้รับธาตุ โลหะจาก silica จะช่วยและยับยั้งการเคลื่อนไหวของ free silanol โดยครอบคลุมวิธีการมากมาย อย่างไรก็ตามจะเป็นการเข้าใจในเรื่องของ reverse phrase ของ โครโมโคไตกราฟีอีกด้วย แม้ว่าขอบเขตจะน้อยกว่าในโครโมโตกราฟี บน underivatize silica

ส่วนประกอบของ mobile phase ค่า pH ไอออนิกที่แข็งแรงและอุณหภูมิ มีอิทธิพลกับ retention ของยา อีกทางเลือกหนึ่ง polymetric stationary phrase ก็ถูกแนะนำด้วย การกำจัดความแปรผัน intra – and interlaboratory ดังงานของ Bogusz [12] และ De Zeeuw [13] ได้เสนอเกี่ยวกับการแทนที่ retention ปฐมภูมิ (retention times ,ปัจจัยปริมาณ) ด้วย retention ทุติยภูมิ เช่น ความสัมพันธ์ของ retention times และค่าดัชนี retention ความคิดรวบยอดนี้สามารถให้ผลลัพธ์ในข้อมูลretention ที่เชื่อถือได้ภายใน one single laboratory และแม้ว่าในการพัฒนาของข้อมูล data base ของค่า retention ของการใช้ interlaboratory

ค่าดัชนี retention (RI-Values) เทียบกับอ้างอิงที่เป็นกลางในความเป็นเนื้อเดียวกัน (alkane-2-oneas,alkyl-arylketones and 1-nitroalkanes) ยังคงไวต่อค่าแปรผันเพียงน้อยในข้อจำกัดของกราฟอ้างอิงที่เป็นกลางในความเป็นเนื้อเดียวกัน แต่ความประพฤติแตกต่างจากยาซึ่งสัมพันธ์กับทางพิษวิทยา ต่อมากลายเป็นความเข้าใจของการแยกค่าสหสัมพันธ์มาตรฐาน จะใช้สำหรับยาที่เป็นกรด/กลาง และสำหรับยาพื้นฐาน เทียบกับ การสังเกตของ Bogusz and Wu [14] ที่ถูกพัฒนาตัวมาตรฐานของ HPLC-DAD บน Column RP-18 สำหรับ Chromatographic และการชี้บ่งว่ามีสารพิษเกิน 200 ชนิด พวกเขาใช้บางข้อจำกัดของ Chromatographic ยาสำหรับกรดและยามาตรฐาน (เช่น Gradien elution ด้วยการผสม acetonitrile และ triethylammonium phosphate buffer pH 3.0) รวมกับ 1-nitroalkane เป็นดัชนี retention วัดและบอกจำนวนของยา ที่เห็นได้ชัดนั้น ความเป็นกรด pH จะซ่อนปฏิกริยา Ionization ของกลุ่ม silanol ขณะที่ amine modifiers แก้ไข Chromatographic ของยาพื้นฐาน

ในความพยายามที่จะกำจัด chromatographic ที่เป็นปัญหาของ Silanal ที่เหลืออยู่ และยับยั้งปัญหาของเครื่องมือที่จะทำให้เกิดการรวมกันของ buffer salt ใน eluent , พวกเราได้พัฒนา การแยก HPLC ที่เกี่ยวกับพิษมากกว่า 200 ชนิด โดยใช้ข้อจำกัดที่แตกต่างของ Chromatographic [15] alumina packing ถูกเคลือบด้วย polybutadiene ทำให้ถูก eluted ในระบบ Gradien ด้วยการผสมของ methanol และน้ำ ที่ทั้งสองบรรจุด้วย 0.0125 M NaOH การฝังตัวของ silanol functions บน packing ใหม่ (Aluspher RP-Select B from Merck, Darmstadt,Germany) ทำให้เข้าใจกลไก retention ได้ง่าย การกำจัดจำเป็นต้องอาศัย amine modifiers และจะถูกยับยั้งทำให้ดูดกลืนเหมือนเดิมไม่ได้ ในทางเดียวกัน aluminium oxide ดีเท่ากับการเคลือบด้วย polybutadiene จะคงที่จาก pH 2 – 12 ค่านี้เป็นยาพื้นฐานสามารถให้ chromatographed ภายใต้ข้อจำกัดของ alkaline ในการลดยาที่รุนแรงลงใน peakท้ายๆ การเคลือบด้วย polybutadiene จะให้ packing มีลักษณะเฉพาะตัวแบบไม่ชอบน้ำ สามารถเปรียบเทียบ stationary phase ของ reverse phase แน่นอนว่า eluent ที่ pH สูงจะให้ผล retention ต่ำของสารประกอบที่พา phenolic มา (เช่น มอร์ฟีน) หรือกรด carboxylic (เช่น benzoylecgonine) ดังนั้น สารประกอบตัวหลังต้องแยกอีกวิธีหนึ่ง ใน silica packing ด้วย end-capping ที่มีลักษณะเฉพาะเหนือกว่า ได้แก่ Hypersil BDS C18 column (Alltech,Deerfield,IL,USA) [16] columnถูกชะด้วยสารผสม 0.045 M ammonium acetate ใน 80%HPLC-grade water ,10% methanol + 10% acetonitrile เป็นตัวทำละลาย A และ 0.045 M ammonium acetate. ใน 40% methanol 40% acetonitrile

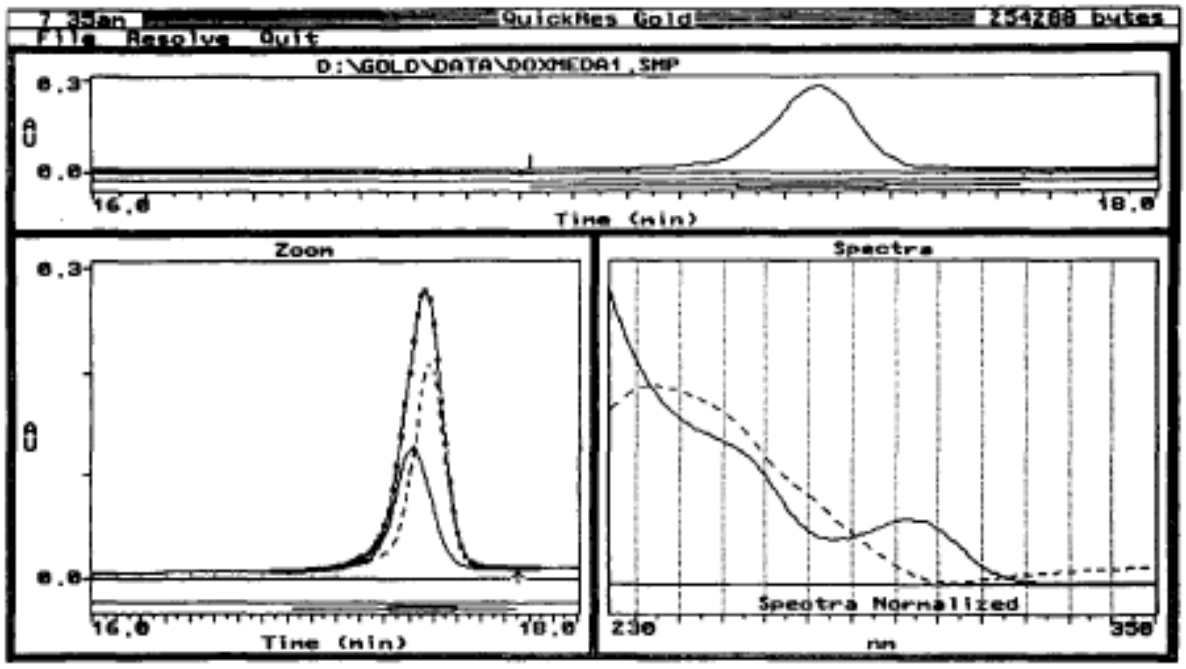
20%HPLC-grade water เป็นตัวทำละลาย B พวกเราใช้เส้นตรงใน gradient จาก 100 - 47.2 % สาร A ประมาณ 20 นาที ขณะที่น้ำเสียระบายออกด้วย เครื่องตรวจวัดชนิด photodiode arrayต่อมาทำทฤษฎีนี้เป็นรูปแบบที่สมบูรณ์ เพราะสารประกอบจำนวนมากทำการแยกไม่ได้ภายใต้ข้อจำกัดของ alkaline ที่แข็งแรง (อนุพันธุ์ฝิ่น กรด และ benzoylecgonine) ซึ่งจะ eluted ได้ดี peak แหลมและตัวเลขสูง ภายใต้สภาวะกรด วิธีนี้การชะแยกร่วมกันของสารประกอบที่มีจำนวนมากในสารตั้งต้น นั่นจะทำให้ chromatographed เหลือน้อยที่สุด

ในทางคล้ายกันการใช้ระบบ column ที่ต่างกัน (และขบวนการสกัดต่างกัน) ในการวิเคราะห์ “ยามากมายที่เกินขนาด” กรณีนี้อธิบายได้โดย Koves[10] รายละเอียดของระบบ reversed phase (Supelcosil LC-DP, LiCharospher 100 RP-8, APEX ODS & Nova-Pak Phenyl) ที่ค่อนข้างจะเฉพาะทั้งหมดของ column แบบ isocratic , แท้จริงแล้วเหมาะกับขนาดของความมีขั้วและในเวลาเดียวกันจะการพิจารณาถึงต้นกำเนิดยาและเมทาบอลิซึ่ม ระบบทั้งหมดจะยกเว้นระบบ gradient

2.2 Photodiode array detection

ตั้งแต่ยุค 80 ช่วงแรกๆ จะมีการแนะนำเครื่องตรวจวัดการดูดกลืนแสงชนิด diode-array และ fast-scaning ได้มาจาก chromatographic ที่เป็นข้อมูล spectral ของ UV ซึ่งถูกเสนอขอบเขตใหม่ในการวิเคราะห์ข้อมูล HPLC ทำให้พบประโยชน์ของการประยุกต์ในการวิเคราะห์ทางพิษวิทยาอย่างเป็นระบบ การรวมกันนี่ทำให้เห็นความสามารถที่แตกต่างของกราฟ retention ซึ่งข้อมูล spectral จะแสดงกราฟทั้งหมดที่น่าเชื่อถือ เพิ่มขึ้นของทฤษฎี HPLC [17] เหมาะที่สุดกับมาตรฐานอ้างอิง spectra จะถูกเก็บในฐานข้อมูล บอกชื่อ parameter ของ retention เพื่อบอกขีดจำกัดในการค้นหา parameter ในแต่ละ retention [18]

การชะออกร่วมกันของ สอง(หรือมากกว่า)สารประกอบที่เหลือเพียงเล็กน้อยสำหรับกรณีใหญ่ที่ผิดพลาดในการวิเคราะห์ ข้อสรุปความผิดพลาดทำให้เกิดการสอดแทรกการชะออกร่วมกันของสารประกอบที่เลียนแบบ UV spectrum ที่ทราบสารประกอบ หรือ เมื่อการชะออกร่วมกันของสารประกอบสองชนิดให้ผลใน UV spectrum ที่ไม่ตรงกับใน library. ดังนั้นก่อนที่จะทำการทดลองจะต้องค้นที่ library มันเป็นสิ่งจำเป็นที่จะต้องตรวจสอบ peak สำหรับความบริสุทธิ์ที่สนใจ สิ่งนี้สามารถใช้เป็นคู่มือเปรียบเทียบ UV spectra ในตำแหน่งที่แตกต่างกันของ peak หรือเลือกใช้เพียงบางเครื่องมืออัตโนมัติที่จะระบุ peak ที่บริสุทธิ์ (โดยใช้เส้นแนวระดับใต้ peak ที่ตรงกับส่วนประกอบของสาร) ระบบที่ซับซ้อนของสารที่มากกว่าสองชนิดในการชะออกร่วมกัน , การให้ผล UV spectrum ที่เฉพาะเจาะจง และในการที่จะระบุแต่ละสารประกอบ (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 ตัวอย่างของการลดการขดงอ. ด้านบน : cochromatography **ของสองสารประกอบที่** 17.4 **นาที ด้านล่างซ้าย** : **บางอนุภาคที่แสดง** medazepam (58%) **และ** doxepin (42%) **ด้านล่างขวา** : **สร้างใหม่ด้วย** UV spectrum **ของ** medazepam **และ** doxepin

3. การประยุกต์ใช้ HPLC ใน STA

การประยุกต์ใช้และศักยภาพของ HPLC ใน STA ในงานวิจัยนี้จะยกตัวอย่างโดยกรณีศึกษา สำหรับรายละเอียดมากเกินอธิบายถึงงานวิจัยต้นฉบับ

3.1 กรณีศึกษาที่1 : ความร้ายแรงของ trazodone และ dothiepin เป็นพิษ

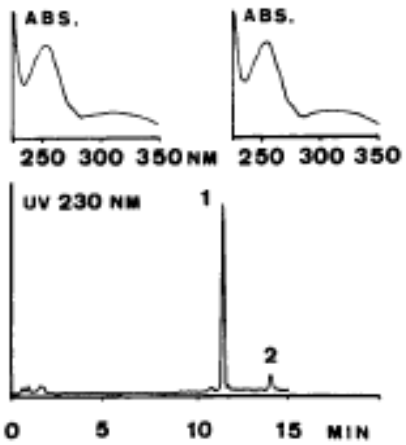
พบหญิงสาววัย 22 ปี ตายที่ริมตลิ่งคลอง ชันสูตรศพภายใน 24 ชั่วโมง พบเลือดคั่งทุกอวัยวะเด่นชัด พร้อมกันก็พบอาการบวมน้ำ ของปอด ขณะที่ผ่าตัดกล้ามเนื้อหลังด้านหลังจะรับรู้ได้ว่ามีกลิ่น ผลการชันสูตรศพ ไม่ได้พบอะไรเด่นชัด ไม่พบสาเหตุการตาย ตัวอย่างระยะเวลาหลังตายจะนำมาจาก เลือด น้ำปัสสาวะ ของเหลวในท้อง ตับและไต สำหรับวิเคราะห์ทางพิษยา[19]

ในขบวนการ STA น้ำปัสสาวะจะใช้คัดกรอง opioids, cannabinoids, amphetamines, methaqualone, methadone, cocaine, propoxyphene, phencyclidine,benzodiazepines, barbiturates, tricyclic antidepressants,acetaminophen, salicylates และ caffeine การใช้สารเนื้อเดียวกัน วิธีทดสบทางอิมมูโนอย่างหนึ่งที่ใช้เอนไซม์ (EMIT). LSD, Fentanyl and cotinine ถูกทดสอบวิธีตรวจจับการมีหรือไม่มีของไอโซโทปบางชนิด (RIA). TLC ถูกใช้สำหรับคัดกรองทั้งหมดทุกกระบวนการอธิบายโดย Sunshine [20] ในทางเดียวกันการสกัดจะเตรียมจากเลือด ,

ของเหลวในท้องและน้ำปัสสาวะโดยวิธี liquid-liquid extraction โดยใช้ n-hexaneethylacetate (7:3, v/v).นำกลับมาละลายอีกในตัวทำละลาย และฉีดเข้าระบบ HPLC-DAD การแยกแบบ Reversed-phase ด้วย Chromspher C_8 column (10×0.3 cmI.D., 5 ~m) โดยใช้ MeOH-$H_2$0 (ที่มี 0.125% isopropylamine) เป็นระบบ gradient 30:70 - 75:25 (v/v) ภายใน 15 นาที

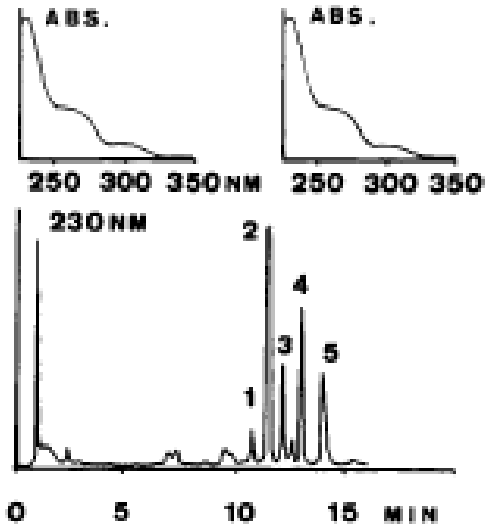
การตรวจคัดกรองวิธี EMIT สำหรับน้ำปัสสาวะ พบ amphetamines, benzodiazepines, opioids, tricyclic antidepressants และ caffeine แน่ชัด ในตัวอย่างเลือดจะพบ benzodiazepines และtricyclic antidepressants ในการวิเคราะห์ TLC สารมาตราฐานไม่ได้ระบุว่าพบ dothiepin แต่ จุดของสารเรื่องพบของเหลวทั้งหมดที่ทำทดลอง ภายใต้สภาวะ alkaline โดยทั่วไป HPLC-DAD ที่ออกมาก่อนจะชี้บอกสสารประกอบในเลือด (รูปที่ 2) และน้ำปัสสาวะ เป็น trazodone เทียบกับ UV spectrum การชะออกร่วมกันของสารมาตรฐาน จะเป็นการระบุที่แน่ชัด ดังนั้นการที่พบ dothiepin (รูปที่ 3) ทำให้ระบุยืนยัน opiate และ benzodiazepins (EMIT ผลบวก) เป็น codeine , lorazepam และ nordiazepam ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ด้วย HPLD-DAD ทำให้เข้าใจ(ผลบวก) ได้มาจากการวิเคราะห์ amphetaminesโดย EMIT ให้"ผลบวกปลอม" นำกลับมาทำปฏิกิริยา ด้วย β-phenylethylamine และ tryptamine, มักพบสองสารประกอบนี้โดยบังเอิญ เป็นผลให้ขบวนการล้มเหลว

ผู้วิจัยหาจุดเด่นของ RP-HPLC มาพูดถึงข้อดี ในการตรวจวัดของ metabolites ในกรณีภาวะเป็นพิษ ในกรณีที่นำเสนอ จะพบ peak ที่เหมือนกับ UV ของ dotheipin ออกมาที่ นาทีที่ 4 ก่อน ปฏิกริยา oxidation ของ สารมาตรฐาน dothepin ไม่รุนแรง (ใช้ H_2O_2) และฉีดในระบบ HPLC ซึ่ง peak การให้ผลการ chromatograp ร่วมกันด้วยสาร unknown UV spectra ของ dotheipin และ dotheipin sluphoxide จะแสดงในรูปที่ 4 นอกจากนี้ การตรวจหา ประกอบด้วย MS ที่จะระบุสารประกอบของ dotheipin sluphoxide โดยธรรมชาติแล้วจะเกิด metabolite ของ dotheipin

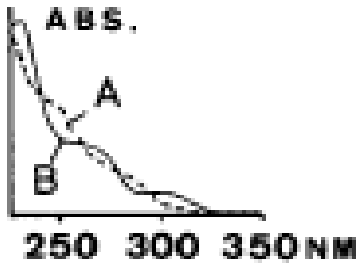


รูปที่ 2 HPLC-DAD (**ที่** 230 nm) **ของการสกัดตัวอย่างเลือด การระบุ** peak : 1) trazodone **และ** 2) dotheipin **ด้านซ้ายบน** : UV spectrum (225-350 nm) **ของ** pack 1: **ด้านบนขวา** UV spectrum **ของสารมาตรฐาน** trazodone **จาก** UV spectrum of trazodone standard. Reproduced from J. Anal. Toxicol. by permission of Preston Publications, a division of Preston Industries, [19].

ผลของ STA ทำให้เข้าใจชัดเจนในการระบุ ว่า trazodone และ dotheipin เป็นเหตุทำให้ตาย ในการใช้ HPLC เป็นบทบาทสำคัญ ไม่เพียงจะระบุยืนยันสารพิษแต่บางกระบวนการ , จะขยายความด้วย internal standardization และ calibration สามารถเปรียบเทียบปริมาณของค่าที่กำหนดของการเสียชีวิตจากการได้รับสารเกินขนาด



รูปที่ 3 HPLC-DAD (**ที่** 230 nm) **ของตัวอย่างการสกัดน้ำปัสสาวะ** peak **ระบุ** : 1) dotheipin sluphoxide , 2) trazodone 3) metabolites **ของ** nordiazepam **และ** lorazepam 4) metabolite **ของ** diazepam **และ** 5) dotheipin **ด้านบนซ้าย** UV spectrum (225-350 nm) **ของ** peak 5 **ด้านบนขวา** UV spectrum **ของสารมาตรฐาน** dotheipin **จาก** J. Anal. Toxicol. by permission of Preston Publications, a division of Preston Industries, [19].



รูปที่ 4 **ตำแหน่ง** A) UV spectrum (225-350 nm) **ของ** peak **ที่** 1 **ในรูปที่** 3 **ระบุว่าเป็น** dotheipin sulfoxide **และ** B) UV spectrum (225-350 nm) **ของ** peak **ที่** 5 **ในรูปที่** 3 **ระบุว่าเป็น** dotheipin

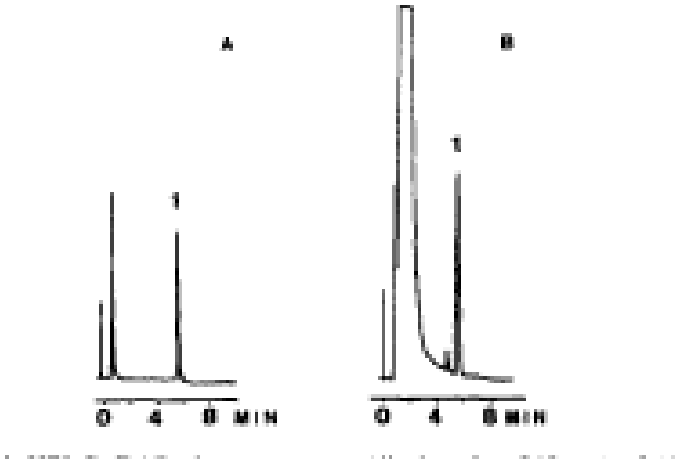
3.2 กรณีศึกษาที่ 2 ; การตายด้วย Azide

พบเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการสาว อายุ 25 ปี ปราศจากเครื่องแสดงชีพ ที่ห้องเปลี่ยนเสื้อคลุม ก็นำส่งโรงเรียนพยาบาลของมหาวิทยาลัย ทำการช่วยชีวิตเต็มความสามรถ และให้ยากระตุ้นหัวใจ ระบบกรองของเสียหยุดชะงัก หล่อนเสียชีวิต หลังจากเข้าโรงพยาบาล 35 นาที ทำการวิเคราะห์เลือดทันที พบภาวะเลือดเป็นกรด การตรวจอวัยวะภายใน พบปอดทั้งสองบวมน้ำและมีของเหลวคั่ง ปอดทั้งสองข้างมีสีน้ำตาลและเลือดก็สีน้ำตาล พบเลือดไหลในกระเพาะ และพบว่าเป็นแผลเรื้อรังแต่ไม่มีกลิ่นพิเศษ พบภาวะเป็นพิษของผู้ต้องสงสัยและระยะหลังตาย นำไปเข้ากระบวนการ STA [21]

พร้อมกันนั้นห้องปฏิบัติการของผู้วิจัยก็ทำตามกระบวนการ โดยทดสอบแบบกว้างๆ สำหรับ สารระเหย และยา ทำตามขบวนการทางกลุ่มตัวอย่างของระยะเวลาหลังตาย ร่วมกับการวิเคราะห์เครื่อง headspace GC , EMIT, RIA ,TLC และGC-MS (ดูที่กรณีศึกษา 1 ส่วนที่ 3.1) ยิ่งไปกว่านั้น เลือด ,ของเหลวในท้องและ ไต ลักษณะเหมือนกัน จึงนำไปทดสอบHPLC หายาพื้นฐาน ทฤษฎีนี้จะใช้เทียบการสกัดภายใต้สภาวะ alkaline และวิเคราะห์ แบบ RP-HPLC โดย Aluspher RP-B phase แบบ gradient ด้วย methanol และน้ำ ที่ทั้งสองจะบรรจุ 0.0125 M NaOH [15]. มันน่าทึ่งที่พบผลการทดสอบทั้งหมดทางพิษวิทยาเป็นลบ แม้ว่าผลทางพยาธิวิทยาจะนำไปสู่การหาความผิดทางอาญาบอกว่าเป็นการฆ่าตัวตายโดยใช้สารเกินขนาด แม้ว่าการตรวจหาหลักฐานทุกชิ้นจะเกี่ยวกับบีกเกอร์ที่บรรจุ ทางพยาธิสภาพระบุและให้ผลบวก ด้วยการทดสอบสีของ ferricchloride [22] ในการเริ่มต้นหา azide

ปริมาณการวิเคราะห์ azide ในทุกตัวอย่างของทางชีววิทยา เป็นการยืนยันเทียบกับ precolumn ด้วย 3,5-di-nitrobenzyol chloride ตามด้วยระบบ isocratic HPLC [21] ผู้วิจัยใช้ Ultrasphere ODS column (15 ×0.46 cm I.D., 5 μm) ด้วย mobile phase ของ 1:1 (v/v) acetonitrile และ น้ำ. การตรวจวัดโดย DAD ใช้ความยาวคลื่น 240 และ 254 nm. การเตรียมสารตัวอย่าง ประกอบด้วย การเจือจางในสารละลาย K_2CO_3 และ acetonitrile ปรับให้ได้ pH 5 ด้วย 3,5-dinitrobenzoyl chloride และ ตั้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เลือด ,น้ำดี , ของเหลวในท้อง, ตับและไต ทั้งหมดพบ azide ปริมาณเข้มข้น. ตัวอย่าง chromatogram แสดงในรูปที่ 5 สามารถเห็น, 3,5-dinitrobenzoyl azide เป็นข้อดีของ chromatographed ที่ใช้ในระบบ reversed- phase packing การระบุ peak azide ใน chromatogram ของที่มาจากระยะเวลาหลังตาย ส่วนใหญ่จะเทียบกับ retention โดยจะเปรียบเทียบกับสาร azide มาตรฐาน ข้อมูล sprectral โดย DAD จะใช้ในกรณีที่มีสิ่งสำคัญเพียงเล็กน้อย ซึ่งมันจะโดดเด่นมากแบบลักษณะเฉพาะเป็นเครื่องแสดงสาร อย่างไรก็ตาม ยังคงเป็นประโยชน์ในการหาค่าของ peak บริสุทธิ์ ถ้ายังต้องการลดการขดงอของ peak

กรรีศึกษาใหม่ อธิบายความสามารถของเครื่อง HPLC แสดงถึง azide ที่มีปฏิกิริยาหลังจากเติม ferricchloride หรือ cerium (VI)ammonium nitrate และ จะทำปฏิกิริยากับสีได้ดี มีแนวโน้มเป็นผลบวกปลอม แม้ว่ากรณีของสารอนินทรีย์ sodium azide salt , HPLC ถูกจัดให้เป็นเครื่องมือที่มีความน่าเชื่อถือสูง มีความไว และมีความเฉพาะเจาะจง บางตำแหน่งเวลาของกรณีศึกษานี้ จะเป็นข้อจำกัดของ “general unknown screening” อย่างไรก็ตามจำนวนของยาและสารพิษที่ซ่อนอยู่ในกระบวนการที่มีจำนวนมากในผู้ที่ได้สารพิษทางเคมี และทางเคมีเชิงฟิสิกส์



รูปที่ 5 HPLC-DAD chromatograms (m 240 nm) **ของ** A) **เป็นการเจือจางน้ำดี** ; peak 1 (Rt **ที่** 5.70 **นาที**) : 3,5-dinitrobenzoyl azide : **ระดับ** azide 1283 - μg/ml : B) **ไม่ได้เจือจาง** 5- μg/ml sodium azide standard; peak 1 (Rt: 5.65 **นาที**): 3,5-dinitrobenzoyl azide. **จาก** J. Anal. Toxicol. by permission of Preston Publications, a division of Preston Industries, [21].

3.3 **กรณีศึกษาที่** 3 **การฆ่าตัวตายแบบคาดไม่ถึง โดย** Chloroquine

พบหญิงสาวใหญ่ อายุ 40 ปี จากประวัติพบว่ามีปัญหาทางร่างกาย นอนเสียชีวิตข้างถนน ใกล้กับบริเวณรถที่เกิดอุบัติเหตุ จากสภาพแวดล้อมสันนิษฐานว่า หญิงสาวน่าจะอยู่ในสภาพมึนเมาขณะขับรถ โดยนำตัวอย่างเลือดมาหาระยะเวลาหลังจากการเสียชีวิต เพื่อวิเคราะห์ทางพิษวิทยา และทำการผ่าชันสูตรศพเพื่อคัดกรองหาสารระเหยและยาในตัวอย่างเลือด จากผลการทดสอบไม่พบอะไร จึงนำตัวอย่างเลือดไปเข้าเครื่อง HPLC หาตัวอย่างพื้นฐาน [15] พบ Peak ที่ระบุว่าเป็น Chloroquine และผลการหา UV โดยด้วยตัวตรวจวัดชนิด DAD พบ Chloroquine จะระบุยืนยันได้โดยการใช้ GC การตรวจวัด nitrogen-phosporus และ MS เป็นการหาปริมาณโดยการใช้ขบวนการ HPLC-DAD ใน Quinina ซึ่งจะถูกใช้เป็น Internal standard ซึ่งได้มาจากความเข้มข้นของ Chloroquine 3.1 μg/ml

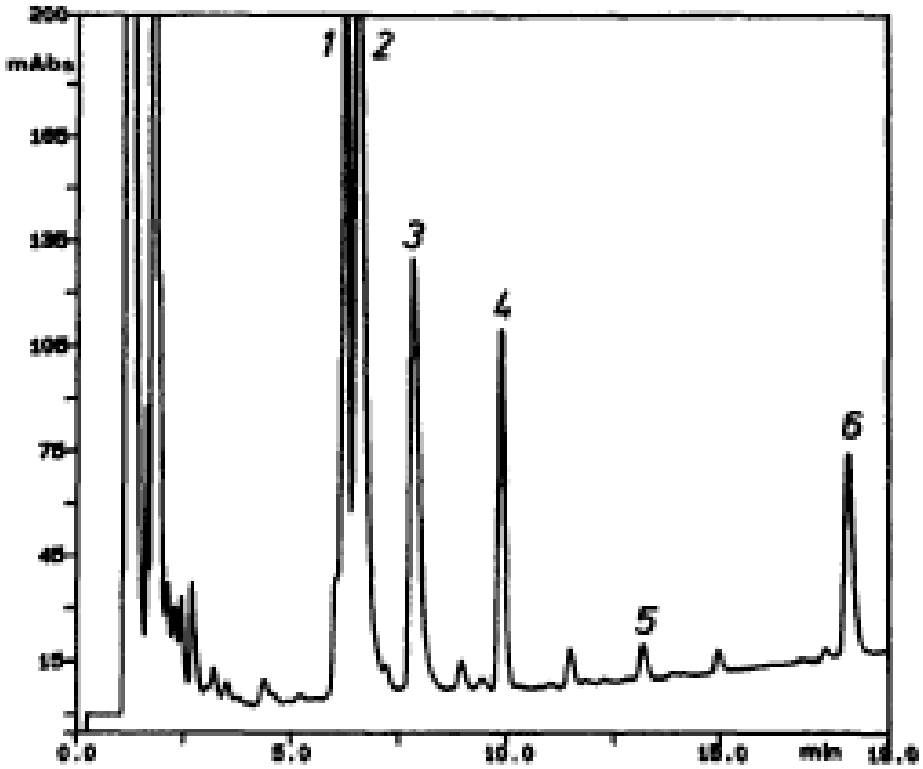
Chloroquine เป็นสารตั้งต้นที่ใช้ยับยั้งป้องกันโรคการติดเชื้อมาลาเรีย แม้ว่ามาลาเรียจะมีการระบาดเฉพาะพื้นที่ แต่นักท่องเที่ยวจำนวนมากก็ต้องการสั่งจ่ายยาต้านมาลาเรีย ทำให้ผู้วิจัยเริ่มมีความไม่แน่ใจ และประหลาดใจที่พบ Chloroquine เกินขนาด เกินความเหมาะสม

ในกรณีศึกษานี้ HPLC-DAD ช่วยแก้ปัญหาทางนิติวิทยาศาสตร์ได้อย่างทันท่วงที

3.4 กรณีศึกษาที่ 4 Cocaine , กลุ่มยาให้โทษและหลักฐานทางนิติวิทยาศาสตร์

หลายคำถามที่มาจากห้องปฏิบัติการนิติวิทยาศาสตร์ว่าควรจัดให้มีหลักฐานของการใช้ยาต้องห้าม ในกรณีของเด็กผู้ชายรายหนึ่งถูกฟ้องร้องว่าค้ายา และทำให้สงสัยว่าเค้าใช้สารโคเคนต้องห้าม ตัวอย่างปัสวะให้ผลร่วมกับสารที่ใช้วิเคราะห์ภูมิคุ้มกันเป็นผลบวกของ Cocaine และ amphetamines โดยทั่วไปแล้วจะยอมรับผลบวกของสารที่ใช้วิเคราะห์ภูมิคุ้มกันเป็นการยืนยันการวิเคราะห์ทางนิติวิทยาศาสตร์จะบอกสารเคมีที่โดดเด่น ซึ่งเกิดขึ้นภายในเนื้อเยื่อ โดยสัมพันธ์กันกับอาหาร และสุดท้ายของการรักษาด้วยสารเชิงซ้อนทางชีววิทยา ซึ่งมันจะทำให้เข้าใจถึงความแตกต่างเฉพาะบุคคล สิ่งนี้มันท้าทายความสามารถด้วยการใช้ GC-MS เป็นทางเลือก อย่างไรก็ตามสำหรับปริมาณที่ชี้วัดการวิเคราะห์ด้วย HPLC-DLD ของ Cocaine [16]

ตัวอย่างน้ำปัสสาวะจะสกัดโดย solid-phase สองกลไก ด้วยการสกัดสารตั้งต้นแบบมีขั้ว และแบบประจุ (Varian Bond Elut Certify, Varian, Harbor City, CA, USA) ขบวนการนี้เหมาะสมกับ Cocaine และ Metabolites, cocaethylene และ benzoylecgonine โดยภาพรวมของการหาปริมาณของ 2 internal standards ด้วยโครงสร้างที่คล้ายคลึงกันของ Benzoylecgonine (carboxylic acid) และ 2 esters จะถูกใช้เป็น Cocaine และ cocaethylene กระบวนการแยกจะใช้ Hypersil BDS C18 column (15x0.46 cm I.D., 5 μg/ml การใช้ mobile phase เป็นสารละลาย ammonium acetate 0.045 M ใน HPLC-grade water (80%), methanol (10%) และ acetonitrile (10%) (สารละลาย A) และใน methanol (40%), acetonitrile (40%) และ HPLC-grade water (20%) (สารละลาย B). ความแตกต่างที่สำคัญในลักษณะเฉพาะของ retention ในความแตกต่างของสารประกอบที่ต้องการ gradient elution จาก 100% A ถึง 47.2% A ภายใน 19 นาที. ตัวตรวจวัดชนิด diode array ถูกตั้งให้สะสม spectra ทั้งหมด 21 ms มากกว่า 220-400 nm ความยาวคลื่น 230 nm (ความถี่วิทยุ 4-nm). รูปที่ 6, ผลของ chromatogram แสดงข้อมูล Retention time ร่วมกับการเปรียบเทียบ spectral ของสาร unknowns ด้วย library spectra ที่ระบุ cocaine และ metabolites.



รูปที่ 6 HPLC-DAD trace (**ที่** 230 nm) **ของการสกัดน้ำปัสสาวะ** Peak **ระบุ**: (1) benzoylecgonine; (2) 3,4-methylenedioxy methamphetamine (XTC); (3) 3,4-methylenedioxy ethylamphetamine (EVA); (4) (I.S. j) 2'-methylbenzoylecgonine; (5) cocaine; (6) (I.S.2) 2'-methylcocaine

มันคือสิ่งสำคัญ libraries เป็น "home-made", spectra ใช้เปรียบเทียบกับ การฉีดสารมาตรฐาน ภายใต้ บางสภาวะของ chromatographic นี่เป็นสิ่งที่ถูกต้องแน่นอนของสารพิษที่มีหมู่ functional groups เพราะว่าสำคัญมีอิทธิพลกับ spectrum เป็น ผล pH, ซึ่งแนวทางนั้นจะขึ้นอยู่กับ chromatographic ขององค์ประกอบของสาร eluent ค่าสหสัมพันธ์ของอัตราส่วน peak area กับมาตรฐานที่เห็นของระดับ benzoylecgonine 10.5 μg/ml น้ำปัสสาวะและ unmetabolized cocaine 1.4 μg/ml ยิ่งไปกว่านั้น การพินิจวิเคราะห์ chromatogram และการประเมินผลด้วย UV spectraเป็นขบวนการอัตโนมัติใน chromatography softwareสมัยใหม่ , เป็นที่จะบอกใบ้ได้สมบูรณ์ถึง การสืบสวนหาตัวยา บาง peaks เล็กๆ สามารถระบุได้ว่าเป็น 3,4- methylenedioxy methamphetamine (MDMA, "XTC") และ3,4-methylenedioxy ethylamphetamine (MDEA, "EVA"), ดังเช่นการขยายความถึงผลบวก EMIT ของ amphetaminesนความจริงแล้ว การรวมกันไม่สามารถทำให้ตกใจสงสัย เพราะว่าชนิดของกลุ่มยาให้โทษ มีความถี่ ที่พบมากจึงเรียกได้ว่าคัดกรอง "recreational drug abuse" scene. กรณีศึกษานี้จะยกตัวอย่างบทบาทหลักของ HPLC-DAD ภายใน STA ที่จะแสดงสิ่งที่สนใจ ที่สามารถเป็นไปได้, เหมาะสมสำหรับการคัดกรองหาปริมาณการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง ยกเว้นการเตรียมสารตัวอย่าง และ การทำให้เกิดสารอนุพันธ์ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นข้อจำกัดในเครื่อง GC.

4. **สรุปผล**

การระบุสารพิษที่ทำให้เกิดภาวะเป็นพิษ ,ไม่ว่าจะเป็นทางด้าน clinical หรือด้านนิติวิทยาศาสตร์ ล้วนแต่เป็นงานยากที่ท้าทายความสามารถ ดังที่กล่าวไปแล้ว ผลที่ได้ทำให้มองเห็นชัดเจน ครอบคลุมความสัมพันธ์ของยา และสารพิษ ทำให้เป็นสิ่งที่ต้องการ และสามารถให้ผลน่าเชื่อถือ วัตถุประสงค์นี้ นำเสนอข้อดีมากมายของ HPLC-DAD ทั้งด้านความเฉพาะเจาะจง ความไว รวดเร็ว และทนทาน โดยข้อมูลทำให้เกิดการเปรียบเทียบทั้ง retention และ การดูดกลืน spectra ของการ eluting เอกลักษณ์ทางเคมี ผลที่ได้ในการระบุกำลังที่ราคาประหยัด ใช้กันแพร่หลาย หาได้ง่ายทั้งห้องปฏิบัติการมากมายในโรงพยาบาล ในทางเดียวกัน ,ดังที่กล่าวไปแล้ว ตัวอย่างจะแสดงความสามารถที่มากมายในการประยุกต์ใช้ในหลายแขนง และศักยภาพที่ดีเยี่ยมของการหาปริมาณ . การพัฒนาเทคโนโลยีไปอย่างรวดเร็วของตัวตรวจวัดชนิด DAD ระบบ computer และ software และ HPLC packing ทำคุณภาพการคำนวณได้เพิ่มมากขึ้นในรายงานที่มีการใช้ HPLC-DAD ในระบบ STA. ช่วงการใช้ HPLC-MS น่าเป็นไปได้ที่จะสนับสนุน HPLC ซึ่งจะพัฒนาต่อไป ถ้าเลือกไม่ดีกว่า GC-MS.