สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

บทที่ 4

อภิปรายผลและสรุปผลการวิจัย

4.1 อภิปรายผลการทดลอง

4.1.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสเปกโทรเมตรี (GC/MS) เพื่อตรวจวัดระดับความเข้มข้นของ 6-MAM และมอร์ฟีนในเส้นผมและเลือด

ในการศึกษานี้ได้ใช้เครื่องมือแก๊สโครมาโทรกราฟฟี-แมสสเปกโทรเมตรี(GC/MS) ซึ่งมีความสามารถในการตรวจวิเคราะห์หาสารในระดับต่ำๆ ได้ และเป็นเครื่องมือที่มีอยู่ในภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ ซึ่งการตรวจวิเคราะห์หา 6-MAM และมอร์ฟีนด้วย GC/MS ในงานวิจัยนี้ได้ใช้โปรแกรมอุณหภูมิของ Lewis RJ. et al. [68] โดยได้ทำการปรับปรุงเล็กน้อย คือ ทำการตั้ง delay time เพื่อจะเก็บ mass สารตั้งแต่เวลา 10.5 นาทีเป็นต้นไป เพื่อลดพีคที่รบกวนสาร 6-MAM ที่ปรากฏก่อนหน้านี้ และจากผลการทดลองพบว่าสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ในครั้งนี้สามารถแยกสารออกจากกัน โดยพบพีค 6-MAM ที่ RT 10.84 นาที และพบพีคมอร์ฟีนกับพีค MOR-d_3 ที่ RT 10.47 นาที เทียบกับที่รายงานไว้ของ Lewis RJ. จะมีความแตกต่างกัน คือ พบพีค 6-MAM ที่ RT 7.67 นาที และพบพีคมอร์ฟีน ที่ RT 8.08 นาที

1) การวิเคราะห์การเก็บข้อมูลแบบ scan mode

การวิเคราะห์การเก็บข้อมูลแบบสแกนเป็นการเก็บข้อมูลแบบกว้างๆ เพื่อให้ได้ข้อมูลลักษณะของสารนั้นๆ เหมาะสำหรับกรณีที่ยังไม่ทราบข้อมูล [72] ในการทดลองครั้งนี้ได้ตั้งค่าสแกน 6-MAM และมอร์ฟีนในช่วง 40-500 amu. สามารถสแกนพบ 6-MAM ที่ RT 10.84 นาที และมีการแตกตัวของไอออนที่สำคัญซึ่งสามารถบ่งชี้ถึงเอกลักษณ์ของสารได้ คือ 207, 399, 340, 287 m/z และมีพื้นที่ใต้พีคของไอออน คือ 27,728 54,921 34,880 และ 21,384 m/z ตามลำดับ สแกนพบมอร์ฟีนที่ RT 10.46 นาที และมีการแตกตัวของไอออน คือ 236, 401, 414, 429 m/z และมีพื้นที่ใต้พีคของไอออน คือ 42,328, 20,728 32,008 และ 67,199 ตามลำดับ สแกนพบ MOR-d_3 ที่ RT 10.46 นาที และมีการแตกตัวของไอออน คือ 207, 239, 417, 404, 432 m/z และมีพื้นที่ใต้พีคของไอออน คือ 14,208 50,592 34,488 22,184 และ 84,040 ตามลำดับ (ตามรูป 3-1- 3-4) เปรียบเทียบกับรายงานของ Balikova MA. et al. [46] ที่ตั้งค่าสแกน 6-MAM และมอร์ฟีนในช่วง 45-550 amu. และพบว่า 6-MAM มีการแตกตัวของไอออน คือ 399, 340, 324, 287 และ 204 m/z มอร์ฟีนมี

การแตกตัวของไอออน คือ 429, 414 401, 324 และ 236 m/z ส่วน MOR-d_3 มีการแตกตัวของไอออน คือ 432, 417, 404 m/z ซึ่งโดยส่วนมากจะสอดคล้องกับผลการทดลองในครั้งนี้ ดังนั้นการวิเคราะห์แบบ scan mode ทำให้ได้สเปคตรัมและค่า RT ของสาร และสามารถใช้ทำการวิเคราะห์แบบ SIM mode ซึ่งเป็นเทคนิคการเก็บข้อมูลเฉพาะไอออนที่สนใจซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของสารที่ทำการศึกษา [53] ข้อดีของการใช้ SIM คือ ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการวิเคราะห์หาเชิงปริมาณเหมาะกับการวิเคราะห์หาสารที่มีปริมาณน้อยในตัวอย่างที่ทำการศึกษาและมีความไวในการตรวจวัดสูง

2) การวิเคราะห์การเก็บข้อมูลแบบ SIM mode

การเก็บข้อมูลแบบ SIM mode ได้ทำตามวิธีของ Balikova MA. et al. [46] โดยเลือกการวิเคราะห์ข้อมูลแบบ SIM mode คือ 6-MAM เลือกใช้ไอออน 399 เป็น target ion และไอออน 340, 287 เป็น qualifier ion ส่วนมอร์ฟีนเลือกใช้ไอออน 429 เป็น target ion และไอออน 236, 414 เป็น qualifier ion และMOR-d_3 เลือกใช้ไอออน 432 เป็น target ion และไอออน 417 เป็น qualifier ion ส่วนไอออน 239 เมื่อตั้งค่าการวิเคราะห์แล้วให้พีคที่รบกวนมากจึงไม่นำมาใช้ในการศึกษานี้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ya-Hsueh W. *et. al.* [26] ที่ตั้งค่าการเก็บข้อมูลแบบ SIM Mode 6-MAM เลือกใช้ไอออน 399 เป็น target ion และ ไอออน 340, 287 เป็น qualifier ion ส่วนมอร์ฟีนเลือกใช้ไอออน 429 เป็น target ion และไอออน 236, 414 เป็น qualifier ion

ในการทดลองพบว่าเมื่อตั้งค่า SIM mode ตามตาราง 3-2 สามารถแยก 6-MAM มอร์ฟีน และ MOR-d_3 ออกจากกันได้ โดยพบพีค 6-MAM ที่ RT 10.84 นาที พบพีคมอร์ฟีนที่ RT 10.47 นาทีและพบพีค MOR-d_3 ที่ RT 10.46 นาที (ตามตาราง 3-2) และมีพีครบกวนน้อย (ตามรูป 3-5 ถึง 3-8)

4.1.2 การสร้างกราฟมาตรฐานของ 6-MAM และมอร์ฟีน

ในการทดลองนี้การสร้างกราฟมาตรฐานของสารทั้ง 2 ชนิดต้องสร้างกราฟมาตรฐานแยกจากกันเพราะจากการทดลองเบื้องต้นพบว่า stock solution ของ 6-MAM สามารถสลายเป็นมอร์ฟีนได้ทำให้มีผลรบกวนการสร้างกราฟมาตรฐาน เมื่อนำไปคำนวณระดับของมอร์ฟีนจากสิ่งส่งตรวจหากนำมาทำการวิเคราะห์ร่วมกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Dienes-Nagy A. et al. [73] ที่รายงานว่า stock solution ของ 6-MAM สามารถสลายตัวเป็นมอร์ฟีนได้ 10% สาเหตุเพราะ 6-MAM ไม่เสถียรในสารละลายบัฟเฟอร์ จึงแนะนำให้สร้างกราฟมาตรฐาน 6-MAM และมอร์ฟีนแยกออกจากกัน อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีค่าของสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มากกว่า 0.99 ดังนั้น

การสร้างกราฟมาตรฐานของ 6-MAM และมอร์ฟีนแยกออกจากกัน จึงมีความน่าเชื่อถือได้ในการคำนวณปริมาณสารแต่ละชนิด

1) การสร้างกราฟมาตรฐานของ 6-MAM และมอร์ฟีน ในเส้นผม

ทำการศึกษากราฟมาตรฐานของ 6-MAM ในเส้นผม พบว่ามีค่าความเป็นเส้นตรงที่ระดับความเข้มข้น 0.5-5 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมของเส้นผม จากช่วงความเป็นเส้นตรงมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.994 (รูป 3-9) และเมื่อทำการศึกษากราฟมาตรฐานของมอร์ฟีนในเส้นผม พบว่ามีค่าความเป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้น 0.5-10 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมของเส้นผม จากช่วงความเป็นเส้นตรงมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.997 (รูป 3-10) ซึ่งวิธีนี้มีค่าความเป็นเส้นตรงและค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ไม่แตกต่างกับวิธีการวิเคราะห์ 6-MAM และมอร์ฟีนในเส้นผมของ Balikova MA. et al. [46] ที่พบว่ากราฟมาตรฐานของ 6-MAM มีค่าความเป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้น 0-20 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมของเส้นผมจากช่วงความเป็นเส้นตรงมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.995 และมอร์ฟีนมีค่าความเป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้น 0-20 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมของเส้นผม จากช่วงความเป็นเส้นตรงมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.999

2) การสร้างกราฟมาตรฐานของ 6-MAM และมอร์ฟีน ในเลือด

เมื่อทำการศึกษากราฟมาตรฐานของ 6-MAM ในเลือด พบว่ามีค่าความเป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้น 5-100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากช่วงความเป็นเส้นตรงมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.998 (รูป 3-11) ซึ่งวิธีนี้มีค่าความเป็นเส้นตรงและค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ไม่แตกต่างกับวิธีการวิเคราะห์ 6-MAM ในเลือดที่มีรายงานไว้ของ Dienes-Nagy A. et al. [73] ที่กราฟมาตรฐานของ 6-MAM มีค่าความเป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้น 1-500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากช่วงความเป็นเส้นตรงมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.997 และกราฟมาตรฐานของมอร์ฟีนพบว่ามีค่าความเป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้น 5-1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นช่วงความเข้มข้นที่นิยมทำในหลายงานวิจัย [74-75] และจากช่วงความเป็นเส้นตรงมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.999 (รูป 3-12)

4.1.3 ข้อมูลกลุ่มตัวอย่างที่ทำการศึกษาและประวัติการใช้ยาและสารเสพติดประเภทเฮโรอีน

ในการศึกษานี้ได้เลือกกลุ่มตัวอย่างจากประชากรที่ไม่มีประวัติการเสพเฮโรอีนเป็นกลุ่มควบคุมซึ่งส่วนใหญ่ คือ นักศึกษาและบุคลากรในภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ช่วงอายุจึงอยู่ระหว่าง 22-40 ปี ซึ่งไม่แตกต่างกับกลุ่มผู้เสพติดเฮโรอีนที่เป็นสมาชิกบ้านโอโซน ที่มีช่วงอายุระหว่าง 19-49 ปี ซึ่งส่วนใหญ่เป็นวัยรุ่นและวัยหนุ่มสาว เช่นเดียวกัน

ส่วนกลุ่มผู้เสียชีวิตจากการเสพเฮโรอีนเกินขนาดมีช่วงอายุระหว่าง 32-77 ปี และกลุ่มผู้บำบัดรักษาโรคด้วยมอร์ฟีนซึ่งเป็นผู้ป่วยที่ได้รับมอร์ฟีนเพื่อการระงับปวด มีช่วงอายุ 41-74 ปี ซึ่งมีช่วงอายุสูงกว่า 2 กลุ่มแรก เนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้มิได้ควบคุมตัวแปรเรื่องอายุและจากธรรมชาติของแต่ละกลุ่มก็อาจจะแตกต่างกัน เช่น ผู้ป่วยมะเร็งที่ป่วยมานานก็อาจมีอายุสูงกว่า เป็นต้น ข้อมูลแสดงดังตาราง 3-3

4.1.4 การเตรียมตัวอย่างเส้นผมและเลือดก่อนการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC/MS

เนื่องจากมีข้อจำกัดของปริมาณเส้นผมของผู้บำบัดรักษาโรคด้วยมอร์ฟีนมีจำนวนน้อย บางรายก็ไม่สามารถเก็บได้ ทำให้การวิเคราะห์ในครั้งนี้ต้องลดปริมาณเส้นผมตัวอย่างลงจากที่จะต้องใช้ 50 มิลลิกรัมตามวิธีของ Balikova M A. et al. [46] เหลือเพียง 20 มิลลิกรัม ซึ่งข้อจำกัดของการใช้ตัวอย่างเส้นผมอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ได้ค่าต่ำสุดในการวิเคราะห์ 6-MAM และมอร์ฟีนอยู่ที่ความเข้มข้น 0.5 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม เพราะฉะนั้นในการทดลองนี้ค่าที่มากกว่าค่าความเข้มข้น 0.5 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม จะรายงานว่ามีการตรวจพบ 6-MAM และมอร์ฟีนในเส้นผมและถือว่าเป็นผู้เสพเฮโรอีน ซึ่งเป็นไปตามแนวทางของ SFTA (Société Française de Toxicologie Analytique décembre) [44] ซึ่งกำหนดค่า cut-off 6-MAM และมอร์ฟีนอยู่ในระดับความเข้มข้น 0.5 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม

การศึกษาในครั้งนี้ได้เลือกใช้สารละลาย Soerensen buffer pH 7.4 เป็นสารที่ใช้สกัด 6-MAM และมอร์ฟีนในเส้นผมเช่นเดียวกับการศึกษาของ Balikova MA. et al. [46] ซึ่งรายงานว่าสารสกัดดังกล่าวไม่ทำให้ 6-MAM สลายไปในขั้นตอนการสกัด และการทดลองนี้ได้ปรับปรุงเทคนิคการสกัดในเส้นผมของ Balikova MA. et al. คือ จากที่ใช้เทคนิคการทำลายโครงสร้างเส้นผมด้วยคลื่นเสียง (sonication) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ซึ่งใช้ระยะเวลาที่สั้น แต่ได้เปลี่ยนมาใช้การเพิ่มเวลาในการ incubation ด้วยสารละลาย Soerensen buffer pH 7.4 ในเส้นผม โดยใช้ตู้อบลมร้อนซึ่งเป็นอุปกรณ์ที่มีในห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง [44] ซึ่งสามารถสกัด 6-MAM และมอร์ฟีนในเส้นผมได้เช่นกัน อย่างไรก็ตามเทคนิคสกัดนี้จะต้องตั้งสารสกัดทิ้งไว้ให้เย็น และพยายามดูดน้ำสกัดออกจากเส้นผมให้ได้มากที่สุดก่อนที่จะนำไปสกัดด้วยเทคนิค solid-phase extraction (SPE) ต่อไป

สำหรับเทคนิคที่ทำให้สารสกัดสะอาดก่อนเข้าสู่การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC/MS ได้ใช้เทคนิค SPE ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ใช้ SPE ชนิด stationary phase แบบ mixed-phase ประกอบด้วย reversed phase และ cation exchange เนื่องจากมีงานของ Bogusz M J et al. [71] สนับสนุนว่าการใช้ SPE แบบ mixed-phase SPE สามารถสกัด 6-MAM และมอร์ฟีนในเลือดได้มีประสิทธิภาพที่ดี และปัจจุบันมีงานวิจัยที่ใช้เทคนิคนี้ในเส้นผม [76, 77] ในการทดลองครั้งนี้พบว่า การสกัดด้วย SPE

แบบ mixed-phase ควรใส่สาร solvent ให้ต่อเนื่องในทุกขั้นตอน (ขั้นตอนการปรับสภาพ ขั้นตอนการสกัดด้วย SPE ขั้นตอนการเติมสารตัวอย่างและขั้นตอนการชะล้างสิ่งสกปรก) คือ เมื่อใส่ solvent ชนิดแรกลงไปในคอลัมน์ SPE ให้สังเกตหากปริมาณ solvent เหลือปริมาณที่น้อยให้เติม solvent ตัวที่สองลงไปทันที หากปล่อย SPE แห้ง จะส่งผลทำให้เกิดฟองอากาศขึ้น โดยเฉพาะขั้นตอนการสกัดเลือดจะเห็นได้ชัดเจน ซึ่งทำให้เกิดความสกปรกในเครื่อง SPE Vacuum และเกิดการปนเปื้อนในขั้นตอนชะสารตัวอย่างออกมาได้ และเทคนิคการสกัดด้วย SPE มีข้อเสนอแนะเพิ่มเติม คือ ควรเตรียมสารละลายผสมที่ใช้ในขั้นตอน elute ใหม่ทุกครั้ง คือ dichloromethane: 2-propanol: 25% NH_4OH ในการสกัดเส้นผมและ dichloromethane: 2-propanol: 25 % NH_3 ในการสกัดเลือด เนื่องจากการทดลองเบื้องต้นพบว่าหากไม่ใช้สารละลายผสมที่เตรียมใหม่ เมื่อทำการวิเคราะห์พบว่าพื้นที่ใต้กราฟของ 6-MAM และมอร์ฟีนลดลงเป็นอย่างมากและไม่สามารถตรวจพบ Internal standard ดังนั้นจึงควรเตรียมสารละลายผสมใหม่ทุกครั้ง

ในการเพิ่มความไวในการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC/MS มักจะอาศัยการทำอนุพันธ์ (derivatization) [56] ในการศึกษานี้ ใช้สาร MSTFA+1%TMCS เป็นสาร derivatization โดยสารอนุพันธ์นี้จะมาแทนที่ไฮโดรเจน ทำให้อนุพันธ์ที่ได้มีคุณสมบัติความเป็นขั้วต่ำ ระเหยง่าย สามารถเพิ่มความไวในการวิเคราะห์ได้ สอดคล้องกับรายงานของ Balikova M A. et al. [78] พบว่าการใช้ปฏิกิริยาการทำอนุพันธ์นี้ ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการวิเคราะห์หากลุ่ม opiate ในเลือดของผู้ที่เสียชีวิตจากการเสพเฮโรอีนได้หลายชนิด อย่างไรก็ตามการใช้เทคนิคนี้ต้องทำภายใต้ flow nitrogen และระมัดระวังในเรื่องของความชื้นซึ่งมีผลในการเกิดปฏิกิริยา silylation [56]

4.1.5 การตรวจวิเคราะห์หาระดับความเข้มข้นของ 6-MAM และมอร์ฟีนในกลุ่มตัวอย่าง

1) ระดับความเข้มข้นของ 6-MAM และมอร์ฟีนในเส้นผมของกลุ่มตัวอย่าง

เมื่อทำการศึกษาระดับความเข้มข้นของ 6-MAM และมอร์ฟีนในเส้นผมและจำนวนการตรวจพบของกลุ่มตัวอย่างทั้ง 4 กลุ่ม พบว่ากลุ่มควบคุม (negative control) จำนวน 10 ราย ตรวจไม่พบ 6-MAM และมอร์ฟีนในเส้นผม แสดงให้เห็นว่าไม่เกิดผลบวกเทียม (false positive) จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีการนี้

ระดับความเข้มข้นมอร์ฟีนในเส้นผมของผู้เสพติดเฮโรอีนในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าใน 24 ราย ตรวจพบมอร์ฟีนในเส้นผมเพียง 4 ราย คิดเป็นร้อยละ 16.67 ระดับความเข้มข้นของมอร์ฟีนที่ตรวจพบ คือ 2.02-7.54 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม ซึ่งค่ามอร์ฟีนที่ตรวจพบอยู่ในช่วงความเข้มข้นตามรายงานวิจัยของ Wietechal R. et al. [79] ที่ตรวจพบความเข้มข้น มอร์ฟีนในเส้นผมของผู้เสพเฮโรอีนอยู่ที่ 0.3-32.5 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม

สำหรับระดับความเข้มข้นของ 6-MAM ในเส้นผมของกลุ่มนี้ ตรวจพบ 5 ราย และความเข้มข้นที่ตรวจพบตั้งแต่ 0.63-3.48 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม ซึ่งมีค่าใกล้เคียงการศึกษาของ Wietechal R. et al. [79] ที่ตรวจพบความเข้มข้น 6-MAM ในเส้นผมของผู้เสพเฮโรอีนอยู่ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.6-2.4 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม ส่วนการที่ตรวจพบ 6-MAM และมอร์ฟีนในเส้นผมของผู้เสพติดเฮโรอีนได้น้อยราย สาเหตุเนื่องมาจากการยอมรับว่าใช้เฮโรอีนในกลุ่มผู้เสพติดเฮโรอีนนั้น อาศัยแค่การสัมภาษณ์โดยมิได้ทำการตรวจหาจากปัสสาวะ ดังนั้นเมื่อทำการตรวจหาสารเสพติดในเส้นผม ปรากฏว่ามีการตรวจพบ 6-MAM เพียงร้อยละ 20.83 มอร์ฟีนร้อยละ 16.67 ทั้งนี้อาจเกิดจากการให้ข้อมูลที่ไม่จริง หรือ เสพเฮโรอีนปริมาณที่ต่ำมากจนไม่สามารถตรวจพบได้ในเส้นผม และมีงานวิจัยของ Khosrou A. et al. [80] ให้ข้อแนะนำว่าข้อดีของการใช้ปัสสาวะทดสอบเบื้องต้นร่วมกับเส้นผมนั้น สามารถตรวจพบมอร์ฟีนในเส้นผมผู้ติดยาทุกราย และงานวิจัยนี้สามารถตรวจพบ 6-MAM ในเส้นผมได้มากกว่ามอร์ฟีนเช่นเดียวกับงานวิจัยของ Kauert G. et al. [81] ซึ่งได้รายงานว่าการที่ตรวจพบ 6-MAM ในเส้นผมผู้เสพติดเฮโรอีนได้มากกว่า สาเหตุอาจมาจาก 6-MAM มีความเป็นขั้วน้อยทำให้สะสมในเส้นผมได้ดีกว่ามอร์ฟีนซึ่งมีความเป็นขั้วสูง

เมื่อศึกษาถึงระดับความเข้มข้นของมอร์ฟีนในเส้นผมของผู้เสพเฮโรอีนเกินขนาดจนเสียชีวิตจำนวน 8 ราย ที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยเทคนิค Immonoassay ในปัสสาวะและให้ผลบวกกับมอร์ฟีน รวมทั้งนิติแพทย์ได้สรุปว่าเป็นการเสียชีวิตจากการได้รับสารกลุ่มเฮโรอีนเกินขนาดนั้น ตรวจพบมอร์ฟีนในเส้นผม 6 ราย คิดเป็นร้อยละ 75 ความเข้มข้นของมอร์ฟีนที่พบมีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.65-2.91 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม ซึ่งพบในระดับความเข้มข้นที่สูงกว่างานของ Kronstrand R. *et al.* [67] ซึ่งตรวจพบความเข้มข้นมอร์ฟีนในเส้นผมมีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.3-1.3 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผมในกลุ่มของผู้เสพเฮโรอีนเกินขนาด

สำหรับระดับความเข้มข้นของ 6-MAM ในเส้นผมของผู้เสียชีวิตจากการเสพเฮโรอีนเกินขนาด ตรวจพบค่าความเข้มข้นของ 6-MAM ตั้งแต่ 0.61-2.97 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วงเดียวกันกับการศึกษาของ Kronstrand R. et al. [67] ที่ตรวจพบความเข้มข้น 6-MAM ในเส้นผมอยู่ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.3-7.4 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม

ในกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับมอร์ฟีนเพื่อการระงับปวด จำนวน 12 รายไม่สามารถเก็บเส้นผมได้ 1 รายและไม่สามารถเก็บเลือดได้ 1 ราย ตรวจพบค่าความเข้มข้นของมอร์ฟีนตั้งแต่ 0.60-3.84 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม มีค่า 95% CI เท่ากับ 1.44-3.66 จากรายงานระดับความเข้มข้นของมอร์ฟีนในผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยาในกลุ่มมอร์ฟีน พบว่าจะมีระดับความเข้มข้นของมอร์ฟีนในเส้นผมอยู่ในช่วง 0.68-3.28 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม [82] ในกลุ่มผู้บำบัดรักษาโรคด้วยมอร์ฟีนนั้นตรวจไม่พบ 6-MAM ซึ่งเปลี่ยนแปลงมาจากเฮโรอีนจึงไม่พบในผู้ป่วย

2) ศึกษาเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของ 6-MAM และมอร์ฟีนในเส้นผมของกลุ่มตัวอย่าง

เมื่อนำค่าเฉลี่ยความเข้มข้นระดับมอร์ฟีนที่ตรวจพบในเส้นผมของกลุ่มตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่มมาเปรียบเทียบกัน พบว่าระดับความเข้มข้นมอร์ฟีนที่ตรวจพบในผู้เสพติดเฮโรอีนมีระดับมากที่สุด รองลงมาคือผู้บำบัดรักษาโรคด้วยมอร์ฟีน และผู้เสียชีวิตจากการเสพเฮโรอีนเกินขนาด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Tagliaro F. et al. [64] พบว่าระดับความเข้มข้นมอร์ฟีนที่ตรวจพบของผู้เสพติดเฮโรอีนมีระดับมากที่สุดและผู้เสียชีวิตจากการเสพเฮโรอีนเกินขนาดมีระดับที่น้อยที่สุด อย่างไรก็ตามเมื่อนำระดับความเข้มข้นมอร์ฟีนในกลุ่มตัวอย่างไปทดสอบทางสถิติ พบว่าระดับความเข้มข้นมอร์ฟีนที่ตรวจพบในเส้นผมไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ค่า p = 0.471) ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยของ Tagliaro F. et al. [64] คือ ระดับความเข้มข้นมอร์ฟีนที่ตรวจพบในเส้นผมของกลุ่มตัวอย่างมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

3) ระดับความเข้มข้นของ 6-MAM และมอร์ฟีนในเลือดของกลุ่มตัวอย่าง

การศึกษานี้ได้ทำการศึกษาระดับความเข้มข้นของ 6-MAM และมอร์ฟีนจากในเลือดเฉพาะกลุ่มผู้เสียชีวิตจากการเสพเฮโรอีนเกินขนาดและกลุ่มผู้บำบัดรักษาโรคด้วยมอร์ฟีน พบว่าในเลือดของผู้เสียชีวิตจากการเสพเฮโรอีนเกินขนาดตรวจพบมอร์ฟีนได้ทุกราย คิดเป็นร้อยละ 100 มีระดับความเข้มข้นของมอร์ฟีนในเลือดอยู่ในช่วง 72.26-1,245.88 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Geresta M J. et al. [83] ที่ตรวจพบระดับความเข้มข้นของมอร์ฟีนในเลือดของบุคคลผู้เสพเฮโรอีนเกินขนาดและเสียชีวิตเฉียบพลันได้ปริมาณที่สูง คือ มีความเข้มข้นตั้งแต่ 100-2,800 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ Monforte J. et al. [84] รายงานว่าความเข้มข้นของมอร์ฟีนที่ทำให้เกิดพิษอยู่ที่ระดับประมาณ 240 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรขึ้นไป ซึ่งผลการทดลองที่ได้ระดับความเข้มข้นของกลุ่มส่วนมากอยู่ในช่วงนี้ ส่วนในกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับมอร์ฟีนเพื่อการระงับความปวดตรวจพบความเข้มข้นของมอร์ฟีนในเลือดตั้งแต่ 9.77-41.89 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งระดับที่พบนั้นยังอยู่ในช่วงระดับที่ใช้ในการรักษาของผู้ป่วยคือ ในช่วง 80-120 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร [85]

เมื่อศึกษาถึงระดับความเข้มข้นของ 6-MAM ในเลือดของผู้เสพเฮโรอีนเกินขนาดจนเสียชีวิตตรวจพบ 6-MAM ได้ 5 ราย และตรวจพบความเข้มข้นของ 6-MAM ในเลือดตั้งแต่ 2.93-49.74 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งมีค่าอยู่ในช่วงที่ทำการศึกษาของรายงาน Wynan J. et al. [86] ที่ตรวจพบความเข้มข้นของ 6-MAM ในเลือดตั้งแต่ 1 - 98 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

4) ศึกษาเปรียบเทียบระดับ 6-MAM และมอร์ฟีนในเลือดของกลุ่มตัวอย่าง

สำหรับในเลือดพบว่าความเข้มข้นของมอร์ฟีนที่ตรวจพบในกลุ่มผู้บำบัดรักษาโรคด้วยมอร์ฟีนมีความเข้มข้นในระดับที่ต่ำกว่าความเข้มข้นระดับมอร์ฟีนในเลือดของผู้เสียชีวิตจากการเสพเฮโรอีนเกินขนาดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสันนิษฐานว่าในกลุ่มผู้ป่วยได้รับปริมาณมอร์ฟีนจากแพทย์ในระดับที่ค่อนข้างต่ำเพื่อให้เกิดความปลอดภัย (ระดับที่ใช้ในการรักษาของผู้ป่วยคือ ในช่วง 80-120 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร [85]) และผู้ป่วยส่วนมากได้รับมอร์ฟีนเข้าสู่ร่างกายโดยการรับประทานส่งผลให้มอร์ฟีนบางส่วนถูกทำลายที่ตับ เมื่อเทียบกับผู้เสียชีวิตจากการเสพเฮโรอีนเกินขนาดได้รับผ่านการฉีดเข้าเส้นเลือดดำส่งผลให้ออกฤทธิ์ทันที

5) ศึกษาหาความสัมพันธ์ มอร์ฟีนในเส้นผมและเลือดของกลุ่มตัวอย่าง

จากผลการศึกษาในครั้งนี้ ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างมอร์ฟีนในเส้นผมและเลือดของกลุ่มผู้บำบัดรักษาโรคด้วยมอร์ฟีนและในกลุ่มผู้เสียชีวิตจากการเสพเฮโรอีนเกินขนาดสอดคล้องกับงานวิจัยของ Tagliaro F.et al. [64] ที่ตรวจไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างมอร์ฟีนในเส้นผมและเลือดของผู้เสียชีวิตจากการเสพเฮโรอีนเกินขนาดเช่นกัน อย่างไรก็ตามอาจเป็นไปได้ว่าจำนวนตัวอย่างในกลุ่มทดลองในงานวิจัยครั้งนี้ใช้จำนวนน้อยเกินไป รวมทั้งกลุ่มตัวอย่างที่เลือกมานั้นค่อนข้างหายาก เช่น กลุ่มตัวอย่างผู้เสียชีวิต กลุ่มผู้บำบัดรักษาโรคด้วยมอร์ฟีนอย่างน้อย 3 เดือน เป็นต้น

อย่างไรก็ตามระดับความเข้มข้นของมอร์ฟีนที่ตรวจพบในเส้นผมของผู้บำบัดรักษาโรคด้วยมอร์ฟีน มีระดับที่สูงมากกว่าในกลุ่มผู้เสียชีวิตจากการเสพเฮโรอีนเกินขนาดแม้ว่าจะไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ สาเหตุเนื่องมาจากในกลุ่มของผู้บำบัดรักษาโรคด้วยมอร์ฟีนได้รับยาในการระงับปวดมาต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 3 เดือน ส่งผลให้มีมอร์ฟีนสะสมในเส้นผมมาโดยตลอด แสดงให้เห็นว่าเส้นผมให้ข้อมูลประวัติการได้รับยาย้อนหลังได้ดี ในขณะที่เลือดตรวจพบระดับความเข้มข้นมอร์ฟีนที่สูงในกลุ่มผู้เสียชีวิตจากการเสพเฮโรอีนเกินขนาดแสดงให้เห็นว่าข้อมูลในเลือดบ่งบอกถึงความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน เมื่อประยุกต์ใช้ผลการตรวจในเส้นผมที่ให้ข้อมูลประวัติการเสพย้อนหลังร่วมกับการตรวจในเลือดที่ให้ข้อมูลแบบเฉียบพลัน จะเป็นประโยชน์ในการอธิบายถึงสาเหตุการเสียชีวิตของผู้เสพเฮโรอีนว่าจะมีการใช้เฮโรอีนมาก่อนการเสียชีวิตหรือไม่ตัวอย่าง เช่น

- การเสียชีวิตของ รายที่ HO 012 และ HO 015 จากผลการตรวจพบอนุพันธ์ที่ยืนยันการเสพเฮโรอีนได้ในเลือด คือ 6-MAM และตรวจพบปริมาณมอร์ฟีนที่สูงในเลือด คือ รายที่ HO 012 ตรวจพบมอร์ฟีน เท่ากับ 1,245.88 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร รายที่ HO 015 ตรวจพบมอร์ฟีนเท่ากับ 396.13 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแสดงถึงความเป็นพิษที่เฉียบพลัน นอกจากนี้ประวัติใน

ที่เกิดเหตุพบเข็มฉีดยาร่วมกับผงขาวจึงทำให้เป็นข้อมูลสนับสนุนว่ามีการใช้สารในกลุ่มเฮโรอีนจริง (รายละเอียดภาคผนวก ค) ส่วนเส้นผมของผู้เสียชีวิตนั้นตรวจพบ 6-MAM และมอร์ฟีนได้ จึงสันนิษฐานว่ามีการใช้สารเสพติดเฮโรอีนมาในช่วง 3 เดือน ก่อนที่เสียชีวิตและอาจเกิดภาวะดื้อต่อสารเสพติด ส่งผลให้ผู้เสียชีวิตอาจจะเพิ่มปริมาณการเสพเฮโรอีนมากกว่าเดิมจึงตรวจพบทั้ง 6-MAM และมอร์ฟีนในปริมาณสูงในเลือด จนเป็นเหตุให้เสียชีวิต

- การเสียชีวิตของรายที่ HO 014 ตรวจพบมอร์ฟีนในเลือดแต่ไม่สามารถตรวจพบ 6-MAM และมอร์ฟีนในเส้นผม แสดงว่าอาจจะไม่มีการเสพเฮโรอีนต่อเนื่องในช่วง 3 เดือน การตรวจไม่พบ 6-MAM และมอร์ฟีนในเส้นผมอาจสันนิษฐานว่าผู้เสพไม่มีภาวะดื้อต่อสารเมื่อได้รับปริมาณเฮโรอีนเกินขนาดส่งผลให้เสียชีวิต และเนื่องจากตรวจพบสารเสพติดหลายชนิดในเลือด เช่น benzodiazepine bromasepam cocain อาจเป็นปัจจัยช่วยเสริมให้เสียชีวิต

- การเสียชีวิตของรายที่ HO 017, HO 018 ตรวจพบระดับความเข้มข้นของมอร์ฟีนในเลือดสูงและ 6-MAM ในเลือดได้ และตรวจพบ 6-MAM และมอร์ฟีนในเส้นผม จึงช่วยยืนยันว่ามีการใช้สารเฮโรอีนมาต่อเนื่องเช่นกันและใน 2 ราย มีการตรวจพบแอลกอฮอล์ในเลือด ดังนั้นสาเหตุของการเสียชีวิตน่าจะมาจากการใช้สารเฮโรอีนร่วมกับการดื่มสุรา

4.2 สรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้พบว่าเทคนิคการสกัดด้วย Soerensen buffer pH 7.4 ในเส้นผมและเทคนิคการสกัดด้วย 0.05 M borate buffer pH 8.5 ในเลือด ร่วมกับการใช้ SPE (Mix phase) และการทำ derivatization ด้วย MSTFA+1%TMCS ร่วมกับการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC/MS สามารถตรวจใช้ได้กับตัวอย่างจริง และใช้เป็นอีกแนวทางเลือกในวิเคราะห์หาอนุพันธ์เฮโรอีนในเส้นผมและเลือดที่ยังไม่แพร่หลายในห้องปฏิบัติการในประเทศไทย ข้อดีของเทคนิคนี้ คือ สารสกัดเตรียมง่ายและเป็นสารที่มีอยู่ทั่วไปในห้องปฏิบัติการ ส่วนข้อเสียของเทคนิค คือมีความยุ่งยากต้องใช้เวลาในการทำ SPE และการทำ derivatization ของสาร

เมื่อนำเทคนิคต่าง ๆ นี้ไปใช้ในกลุ่มตัวอย่างจริงสามารถตรวจและหาระดับความเข้มข้นของ 6-MAM และมอร์ฟีน ในเส้นผมของกลุ่มผู้เสพติดเฮโรอีนและกลุ่มผู้เสียชีวิตจากการเสพเฮโรอีนเกินขนาด ส่วนกลุ่มผู้บำบัดรักษาโรคด้วยมอร์ฟีนสามารถตรวจพบเพียงมอร์ฟีน แต่ตรวจไม่พบ 6-MAM และสามารถตรวจวิเคราะห์มอร์ฟีนในเลือดของกลุ่มผู้บำบัดรักษาโรคด้วยมอร์ฟีน กลุ่มผู้เสียชีวิตจากการเสพเฮโรอีนเกินขนาด โดยในกลุ่มผู้เสียชีวิตจากการเสพเฮโรอีนเกินขนาดนั้นสามารถตรวจพบ 6-MAM ในเลือดร่วมด้วยได้

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่ากลุ่มผู้เสียชีวิตจากการเสพเฮโรอีนเกินขนาดกับกลุ่มผู้เสพติดเฮโรอีน ระดับความเข้มข้นของ 6-MAM ที่ตรวจพบในเส้นผมไม่มีระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนระดับความเข้มข้นของมอร์ฟีนที่ตรวจพบในเส้นผมของกลุ่มตัวอย่าง 3 กลุ่ม พบว่าไม่มีระดับความเข้มข้นของมอร์ฟีนที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน

เมื่อทำการศึกษาระดับความเข้มข้นของมอร์ฟีนในเลือดของกลุ่มผู้เสียชีวิตจากการเสพเฮโรอีนเกินขนาดจะตรวจพบในระดับที่สูงกว่ากลุ่มผู้บำบัดรักษาโรคด้วยมอร์ฟีน ซึ่งระดับความเข้มข้นของมอร์ฟีนที่ตรวจพบในสองกลุ่มตัวอย่างมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสามารถตรวจ 6-MAM ในเลือดของกลุ่มผู้เสียชีวิตจากการเสพเฮโรอีนเกินขนาดในขณะที่กลุ่มผู้บำบัดรักษาโรคด้วยมอร์ฟีนไม่สามารถตรวจพบ 6-MAM ซึ่งเป็นอนุพันธ์ที่ช่วยระบุว่าได้รับเฮโรอีนมา

ข้อเสนอแนะจากการทดลองนี้ควรเพิ่มกลุ่มตัวอย่างในการทดลองให้มีจำนวนมากขึ้นเพื่อจะศึกษาความแตกต่างของระดับ 6-MAM และมอร์ฟีนในแต่ละกลุ่มและเพื่อให้สามารถศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสาร 6-MAM และมอร์ฟีนในเส้นผมกับในเลือดได้ดียิ่งขึ้น อย่างไรก็ตามระดับความเข้มข้นของมอร์ฟีนในเส้นผมร่วมกับเลือด สามารถประยุกต์ใช้ในการพิจารณาถึงสาเหตุตายเนื่องจากการเสพเฮโรอีนเกินขนาดได้