

DERIVATISASI MORFIN MENGGUNAKAN DANSIL KLORIDA UNTUK  
MENINGKATKAN KEPEKAAN DETEKSI MORFIN PADA METODE KLT-  
SPEKTROFOTODENSITOMETER

L.P. Ari Chandrayani, N.P. Linda L., I.N.K. Widjaja

Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana

ABSTRACT

Fluorescence detection could be used for enhance the sensitivity of morphine detection by TLC-Spectrophotodensytometry. Morfin is a compound that fluoresces intrinsically incapable. ence, morphine was derivatized using dansyl chloride. Morphine was derivatized by two methods, derivatization in solution and overspotting method. The derivatization reaction was kept at pH 9 and 450 C for 20 minute. The ratio between dansyl chloride and analyte concentration was 6:1. The derivatization result was separated from the interference using TLC. The TLC method was using Al-TLC silica G60 plate as a stationary phase and etyl acetate : methanol : amonia (85:10:5) as the mobile phase. The dansyl derivative was detected at eks 365 nm and K540 filter for fluoresece.

Derivatization of morphine-dansyl chloride capable to enhancing the sensitivity of morphine detection using TLC-Spectrophotodensytometry. Derivatization in solution and overspotting method took the same time in procedure but they gave different sensitivity. Derivatization in solution method gave more quantity than derivatization of overspotting.

Keywords : morphine, dansyl chloride, derivatization, in solution, overspotting

PENDAHULUAN

Berdasarkan Laporan Narkoba Dunia dari UNODC (2005) terdapat 15.900.000 orang penyalahguna NAPZA (Narkotika, Psikotropika dan Zat Adiktif) golongan opiat di dunia. Untuk mencegah efek yang fatal pada penyalahgunaan obat golongan opiat maka diperlukan deteksi dini pemakaiannya dengan menganalisis adanya opiat pada plasma manusia (Rang, et al., 2007). Golongan opiat yang paling banyak disalahgunakan di dunia adalah heroin (UNODC, 2005). Deteksi adanya heroin dalam plasma sulit untuk dilakukan karena heroin sangat mudah terhidrolisis (Moffat, et al., 2005). Morfin merupakan salah satu metabolit heroin yang dapat digunakan untuk mendeteksi penyalahgunaan heroin. Seseorang yang telah menggunakan heroin sebanyak 5 mg secara intravena pada plasmanya akan terdapat morfin dengan kadar 0,035 ng/ $\mu$ L setelah 25 menit (Baselt, 2002). Penggunaan kromatografi lapis tipis (KLT) -

Spektrofotodensitometer dengan limit deteksi 106,24 ng/spot dan limit kuantitasi 345,08 ng/spot (Primaningrum, 2009) tidak mampu untuk mendeteksi morfin pada kadar tersebut. Dengan demikian diperlukan peningkatan kepekaan deteksi misalnya dengan penggunaan detektor fluoresensi ataupun dengan pengubahan struktur kimia untuk membentuk suatu senyawa berfluoresensi. Beberapa reagen yang dapat digunakan untuk mengubah suatu senyawa menjadi berfluoresensi yaitu fluorescamin, dansil klorida dan OPA (o-phthaldialdehyde). Dansil klorida mampu menderivatisasi senyawa yang memiliki gugus amin primer, gugus amin sekunder, imidazol dan fenol (Sayed, et al.,2010). Selain itu senyawa derivat yang terbentuk dengan dansil klorida lebih stabil dibandingkan dengan senyawa derivat dari fluorescamin dan OPA (o-phthaldialdehyde) (Lajtha, et al.,2007). Morfin dapat bereaksi dengan dansil klorida karena morfin mengandung gugus fenol. Derivatisasi morfin

menggunakan dansil klorida dapat dilakukan di dalam larutan pada kondisi pH 9,0 disertai pemanasan pada suhu 450 C selama 20 menit (Barret, et al., 1991). Morfin dapat juga diderivatisasi dengan dansil klorida menggunakan metode overspotting (Wintersteiger, 1981). Data-data mengenai derivatisasi morfin dengan metode overspotting dalam kondisi yang sama seperti derivatisasi morfin dalam larutan sampai saat ini belum tersedia sehingga tidak dapat diketahui ada tidaknya perbedaan hasil reaksi yang diperoleh. Oleh karena itu, untuk meningkatkan kepekaan deteksi analit pada penggunaan instrumen KLT-Spektrofotodensitometer ini selain dilakukan derivatisasi morfin dalam larutan juga akan dilakukan derivatisasi morfin dengan metode overspotting.

#### METODE PENELITIAN

##### Bahan :

Bahan kimia dan pelarut yang digunakan mempunyai derajat kemurnian pro analisis dari Merck-Germany yaitu metanol, amonia pekat (25%), aseton, etilasetat dan natrium karbonat. Fase diam yang digunakan adalah plat AL-TLC silika G 60 dari Merck, Darmstadt, Jerman. Senyawa standar yang digunakan yaitu morfin hidroklorida diperoleh dari Badan Pengawas Obat dan Makanan RI, Cabang Denpasar dan dansil klorida diperoleh dari Fluka-Sigma Aldrich

##### Alat :

Alat yang digunakan meliputi alat-alat gelas yang umum digunakan dalam laboratorium analisis, aluminium foil, tabung effendrof, timbangan analitik (AND GR-200), pengaduk ultrasonik (Branson 1510), bejana kromatografi Twin Trough Chamber 10 x 10 cm (Camag-Switzerland), pipet volume (1; 2; 5 dan 10 mL), pipet tetes, pipet mikro 2  $\mu$ L (Camag-Switzerland) dan Nanomat 4 (Camag-Switzerland), universal indikator dari Merck, oven (Memmert), Lampu UV 254 dan 366 nm (Camag-Switzerland), dan

Spektrofotodensitometer TLC scanner 3 (Camag-Switzerland).

##### Prosedur :

###### 1. Pembuatan Larutan

Dibuat larutan stok morfin HCl 1 mg/mL dan dansil klorida 2 mg/mL dalam aseton. Dari larutan stok tersebut dibuat larutan baku kerja morfin HCl 100 ng/ $\mu$ L, morfin HCl 20 ng/ $\mu$ L, dansil klorida 600 ng/ $\mu$ L, dan dansil klorida 100 ng/ $\mu$ L. Larutan buffer karbonat pH 9,0 dibuat dari Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> yang dilarutkan dalam air bebas CO<sub>2</sub> dan disesuaikan pHnya dengan HCl 0,1 N.

###### 2. Penyiapan Sistem Kromatografi

###### A. Penyiapan fase diam

Plat Al-TLC Silika G60 dipotong sesuai dengan ukuran yang diperlukan. Sebelum digunakan plat dicuci atau dilusi dengan metanol, selanjutnya diaktifkan pada suhu 1200 C selama 30 menit di dalam oven.

###### B. Penyiapan fase gerak TE

Dibuat fase gerak sistem TE dengan mencampurkan etil asetat: metanol: amonia 25% (85:10:5), dimasukkan ke labu ukur dan dikocok sampai homogen (Moffat et al., 2005).

###### 3. Derivatisasi Morfin dengan Dansil Klorida

###### A. Derivatisasi dalam larutan

Analit (morfin HCl) dengan tertentu dimasukkan ke dalam tabung effendrof kemudian ditambahkan 2 L larutan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 9,0 dan juga ditambahkan dansil klorida dengan perbandingan jumlah 6:1 terhadap analit. Campuran dihomogenkan dengan menggunakan pengocok ultrasonik selama 20 menit dengan temperatur 450 C (Barret, et al., 1991)

###### B. Derivatisasi dalam plat (Metode Overspotting)

Analit (morfin HCl) dengan jumlah tertentu ditotolkan pada plat fase diam. Larutan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 9,0 sebanyak 2  $\mu$ L ditotolkan di atas spot morfin hidroklorida dan dansil klorida dengan jumlah 6:1 terhadap analit kemudian ditotolkan di atas spot Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 9,0. Plat dipanaskan dalam oven pada suhu 450 C selama 20 menit.

#### 4. Penentuan linieritas, LOD dan LOQ

##### A. Penentuan Linieritas Morfin Hidroklorida

Pada plat Al-TLC Silika G 60 ukuran 9 x 10 cm ditotolkan larutan morfin dengan rentang konsentrasi 25 ng/spot – 300 ng/spot. Plat dielusi menggunakan sistem fase gerak TE hingga jarak 90 mm dari tepi bawah plat dengan pengembangan vertikal di dalam chamber yang telah dijenuhkan. Plat dikeringkan pada suhu 800 C selama 10 menit. Kromatogram dibaca dibawah TLC-Scanner 3 pada 210 nm. Dari data kromatogram dibuat kurva yang menyatakan hubungan antara konsentrasi dengan luas area. Ditentukan persamaan dari garis tersebut dalam  $y = bx + a$ . Sebagai parameter adanya hubungan linier digunakan koefisien korelasi (r) pada analisis regresi linier  $y = bx + a$ .

##### B. Penentuan Linieritas Senyawa Derivat Dansil Klorida-Morfin Hidroklorida

Pada plat Al-TLC Silika G 60 ukuran 9 x 10 cm ditotolkan larutan morfin dengan rentang konsentrasi 25 ng/spot – 300 ng/spot yang telah diderivatisasi dengan dansil klorida baik dengan metode overspotting (dalam plat) maupun dalam larutan. Plat dielusi menggunakan sistem fase gerak TE hingga jarak 90 mm dari tepi bawah plat dengan pengembangan vertikal di dalam chamber yang telah dijenuhkan. Plat dikeringkan pada suhu 800 C selama 10 menit. Untuk pendeteksian secara kualitatif, plat dilihat di bawah sinar UV 366 nm. Kromatogram dibaca dibawah TLC-Scanner 3, pengukuran absorpsi pada 365 nm dan pengukuran fluoresensi pada 365 nm filter K540. Dari data kromatogram yang diperoleh kemudian dibuat suatu kurva yang menyatakan hubungan antara konsentrasi dengan luas area. Ditentukan persamaan dari garis tersebut dalam  $y = bx + a$ . Sebagai parameter adanya hubungan linier digunakan koefisien korelasi (r) pada analisis regresi linier  $y = bx + a$ .

#### 5. Penentuan Jumlah Morfin yang Bereaksi

Pada plat Al-TLC Silika G 60 ukuran 3 x 10 cm ditotolkan larutan morfin dan morfin yang telah diderivatisasi dengan dansil klorida baik

dengan metode overspotting (dalam plat) maupun dalam larutan pada konsentrasi yang sama dengan konsentrasi morfin yang tidak diderivatisasi. Plat dielusi menggunakan sistem fase gerak TE hingga jarak 90 mm dari tepi bawah plat dengan pengembangan vertikal di dalam chamber yang telah dijenuhkan. Plat dikeringkan pada suhu 800 C selama 10 menit. Plat dilihat di bawah sinar UV 366 nm. Kromatogram dibaca dibawah TLC-Scanner 3 pada pengukuran absorpsi 210 nm. Dari data kromatogram yang diperoleh ditentukan persentase perbandingan AUC tersebut.

#### HASIL DAN PEMBAHASAN

Derivatisasi suatu senyawa dengan dansil klorida memerlukan adanya buffer pada pH basa untuk menyangga suasana asam yang ditimbulkan oleh HCl (hasil sampingan derivatisasi). Pada suasana asam gugus dimetilamino pada dansil derivatif akan terprotonasi dan menyebabkan menurunnya efisiensi fluoresensi dari dansil derivatif (Blau and Halket, 2000). Pemanasan diperlukan untuk meningkatkan kecepatan reaksi derivatisasi. Penggunaan konsentrasi dansil klorida yang lebih tinggi dibandingkan konsentrasi analit dikarenakan pada suasana basa, buffer akan berkompetisi dengan analit untuk bereaksi dengan dansil klorida. Reaksi antara buffer dengan dansil klorida dapat menghidrolisis dansil klorida sehingga terbentuk dansil hidroksil yaitu gugus  $SO_2Cl$  pada dansil klorida berubah menjadi gugus sulfonat ( $SO_3H$ ). Adanya dansil hidroksil mengakibatkan menurunnya jumlah analit yang terderivatisasi karena analit tidak mampu bereaksi dengan dansil hidroksil (Blanco et al, 2000).

Sistem KLT yang digunakan adalah fase gerak sistem TE dan fase diam plat AL-TLC silika G 60 (Moffat et al, 2005). Fase gerak TE mampu memisahkan senyawa derivat dansil-morfin dari pengotor dengan baik yang ditinjau dari resolusi yang dihasilkan yaitu nilai resolusi yang dihasilkan pada penggunaan sistem fase gerak TE 1.

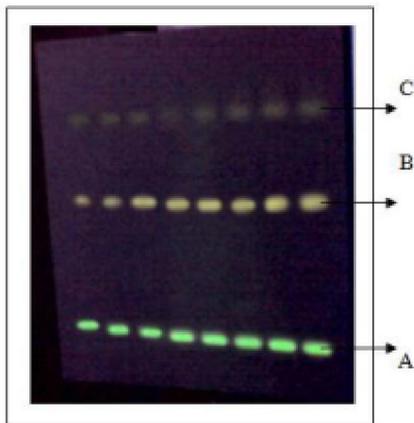
Tabel 4.1 Nilai Rs senyawa hasil derivat dengan pengganggu hasil pemisahan dengan fase gerak TE (85:10:5). Fase diam AL-TLC Silika G 60.

Senyawa	d		Dansil klorid	Morfin	Hasil derivat	Dansil Hidroksil
	d	W	9	30	56	83
	d	W	6	6	8	9
Dansil klorid	9	6		3,5	6,714	9,867
Morfin	30	7			3,714	7,067
Hasil derivat	56	8				3,176
Dansil Hidroksil	83	9				

Keterangan :

d = nilai hRf maksimum masing-masing senyawa

W = hRf akhir – hRf awal



Gambar. 4.1 Plat Hasil Derivatisasi Senyawa Morfin dengan Dansil Klorida

Keterangan :

(A) dansil klorida , (B) senyawa derivat dansil-morfin dan (C) dansil hidroksil.

Tabel 4.2 LOD dan LOQ senyawa morfin dan senyawa morfin setelah derivatisasi dansil klorida baik dalam larutan maupun overspotting.

	Morfin		Larutan				Overspotting			
	Absorpsi		Absorpsi		Fluoresensi		Absorpsi		Fluoresensi	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ
Mean	31,04	103,47	19,24	64,14	16,38	54,65	22,45	74,68	17,70	59,00

Dansil klorida memiliki pendaran warna hijau sedangkan dansil hidroksil memiliki pendaran berwarna kuning. Secara teoritis, dansil klorida yang berikatan dengan gugus fenol, maka akan terbentuk spot yang berwarna jingga (Blau dan Halket, 2000). Untuk itu, pendaran plat hasil derivat dansil-morfin dilihat di bawah lampu UV 366 nm untuk mengetahui ada tidaknya reaksi derivatisasi.

Dari hasil pindaian plat hasil derivat dansil-morfin pada TLC Scanner 3, diketahui bahwa senyawa derivat dansil-morfin memiliki AUC paling besar apabila dipindai pada panjang gelombang eksitasi 365 nm dengan filter K540 pada pengukuran fluoresensi.

Perbedaan kepekaan deteksi pada pengukuran derivatisasi morfin, diketahui dengan uji ANOVA satu arah. Hasil Uji ANOVA satu arah yang dilanjutkan dengan Post Hoc Tests Multiple Comparisons diperoleh nilai Significant (Sig.) < 0,05

maka kesimpulan yang diperoleh nilai LOD LOQ yang dihasilkan dari proses derivatisasi morfin dengan dansil klorida baik dalam larutan maupun metode overspotting memiliki nilai yang berbeda bermakna dibandingkan LOD LOQ senyawa morfin sebelum diderivatisasi. Nilai rerataan LOD dan LOQ senyawa derivat dansil-morfin memiliki nilai yang lebih kecil dibandingkan nilai rerataan LOD dan LOQ senyawa morfin. Oleh karena itu, dapat disimpulkan proses derivatisasi morfin dengan dansil klorida dapat meningkatkan kepekaan deteksi senyawa morfin pada instrumen KLT-Spektrofotodensitometer.

**PENENTUAN EFISIENSI WAKTU Pengerjaan DERIVATISASI DAN TINGKAT SENSITIVITAS HASIL REAKSI MORFIN DENGAN DANSIL Klorida BILA Dilakukan dalam bentuk Larutan dan Padatan (OVERSPOTTING).**

Tabel 4.3 Waktu pengerjaan dari derivatisasi morfin menggunakan dansil klorida di dalam larutan dan metode overspotting.

Larutan	Rerataan	Overspotting	Rerataan
Pemipetan Larutan ke Effendrof	5 menit	Pengaturan Alat	37 menit
Penggocokkan	20 menit	Penotolan	20 menit
Penotolan	32 menit	Pemanasan Plat	20 menit
Elusi	15 menit	Elusi	15 menit
Penguapan Pelarut	10 menit	Penguapan Pelarut	10 menit
Pengaturan Alat	15 menit	Deteksi: Absorbsi Fluoresensi	10 menit 21 menit
Deteksi : Absorbsi Fluoresensi	10 menit 21 menit		
TOTAL	128 menit	TOTAL	133 menit

Untuk mengetahui perbedaan efisiensi waktu pengerjaan yang diperoleh antara derivatisasi morfin dalam larutan dibandingkan overspotting maka perlu dilakukan perbandingan waktu pengerjaan masing-masing proses. Pengujian secara statistik uji-t dua sampel bebas dilakukan untuk mengetahui perbedaan data yang dihasilkan berbeda bermakna atau tidak. Hasil yang diperoleh yaitu p-value yang dihasilkan adalah 0,241. Nilai p-value tersebut lebih besar dari  $\alpha = 0,05$ . Oleh karena itu, dapat dinyatakan waktu pengerjaan yang diperlukan untuk derivatisasi menggunakan metode overspotting tidak berbeda dibandingkan metode dalam larutan.

Perbedaan nilai sensitivitas antara metode derivatisasi dalam larutan ataupun overspotting diketahui dengan cara membandingkan nilai LOD, LOQ serta nilai slope dari masing-masing metode derivatisasi.

Tabel. 4.4 LOD dan LOQ senyawa morfin setelah derivatisasi dansil klorida dalam larutan dan overspotting

Plat	Larutan		Overspotting	
	Absorpsi	Fluoresensi	Absorpsi	Fluoresensi
1	$y = 8,923x + 526,6$ $r = 0,998$	$y = 1,759x + 190,8$ $r = 0,999$	$y = 2,943x + 463,1$ $r = 0,997$	$y = 1,705x + 280,3$ $r = 0,998$
2	$y = 7,393x + 421,9$ $r = 0,997$	$y = 4,379x + 355,2$ $r = 0,998$	$y = 2,552x + 411,2$ $r = 0,996$	$y = 2,152x + 140,8$ $r = 0,998$
3	$y = 7,976x + 587,1$ $r = 0,998$	$y = 3,908x + 371,8$ $r = 0,998$	$y = 4,724x + 255,8$ $r = 0,996$	$y = 3,8x + 222,3$ $r = 0,998$
LOD	19,243	16,382	22,405	17,701
LOQ	64,144	54,646	74,683	59,004

Untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan yang bermakna dari hasil yang diperoleh pada derivatisasi dalam larutan dibandingkan metode overspotting dari segi nilai LOD, LOQ serta slope maka dilakukan pengujian secara statistik yaitu dengan uji ANOVA satu arah. Hasil Uji ANOVA satu arah untuk nilai LOD dan LOQ senyawa derivat dansil-morfin diperoleh nilai Significant (Sig.)  $0,140 > 0,05$ . Kesimpulan yang diperoleh yaitu nilai LOD dan LOQ senyawa derivat dansil-morfin yang diderivatisasi dalam larutan tidak berbeda bermakna dengan nilai LOD dan LOQ senyawa derivat dansil-morfin yang diderivatisasi dengan metode overspotting.

Hasil Uji ANOVA satu arah nilai slope persamaan regresi senyawa derivat dansil-morfin yang dilanjutkan dengan Post Hoc Tests Multiple Comparisons diperoleh nilai Significant (Sig.)  $< 0,05$ . Kesimpulan yang diperoleh bahwa nilai slope senyawa derivat dansil-morfin yang diderivatisasi dalam larutan dibandingkan nilai slope senyawa derivat dansil-morfin yang diderivatisasi dengan metode overspotting baik pada pengukuran absorpsi maupun fluoresensi memiliki perbedaan yang bermakna.

Nilai rerataan slope senyawa derivat dansil-morfin yang diderivatisasi dalam larutan memiliki nilai yang lebih besar dibandingkan nilai rerataan slope senyawa derivat dansil-morfin yang diderivatisasi

dengan metode overspotting baik pada pengukuran absorpsi maupun fluoresensi. Oleh karena itu, dapat disimpulkan proses derivatisasi dalam larutan dapat memberikan sensitivitas yang lebih baik dibandingkan proses derivatisasi dalam metode overspotting. Pengukuran hasil derivatisasi dalam larutan dapat memberikan nilai slope yang tinggi atau lebih sensitif karena perbedaan jumlah morfin yang terderivatisasi.

Untuk mengetahui persentase morfin yang bereaksi dengan dansil klorida maka dibandingkan jumlah AUC morfin yang tidak diderivatisasi dengan AUC morfin sisa setelah diderivatisasi dengan dansil klorida baik dalam larutan maupun dengan metode overspotting.

Perbedaan persentase morfin yang terderivatisasi dapat disebabkan perbedaan jumlah morfin yang kontak dengan dansil klorida. Pada metode dalam larutan, jumlah morfin yang kontak dengan dansil klorida lebih banyak dibandingkan dengan metode overspotting karena selama proses derivatisasi dilakukan pengocokan terlebih dahulu reagen dansil klorida, buffer natrium karbonat serta morfin dengan ultrasonik sedangkan pada overspotting masing-masing larutan hanya ditumpuk dalam bentuk totolan sehingga tidak seluruh morfin telah diderivatisasi oleh dansil klorida terutama pada konsentrasi yang tinggi.

No	Larutan			Overspotting		
	AUC morfin	AUC morfin sisa	Persenta (%)	AUC morfin	AUC morfin sisa	Persenta (%)
1	2050,8	1301,2	37	1915,9	1815,9	5
2	2042,9	1281,9	37	2079,0	1868,7	10
3	2048,9	1590,4	22	1914,6	1823,6	5
Rerataan			32			7

#### KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka dapat ditarik kesimpulan yaitu:

1. Derivatisasi morfin dengan dansil klorida dapat meningkatkan kepekaan deteksi morfin pada penggunaan KLT-Spektrofotodensitometer.
2. Proses derivatisasi di dalam larutan ataupun overspotting memerlukan waktu pengerjaan yang tidak berbeda bermakna dan tingkat sensitivitas derivatisasi di dalam larutan lebih baik dibandingkan hasil derivatisasi dengan metode overspotting.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Barrett, D. A., A. C. E. Jones., N. Rutter., P. N. Shaw dan S. S. Davis. 1991. Morphine Kinetics After Diamorphine Infusion In Premature Neonates. *Br. J. clin. Pharmac.* 32:31-37.
- Baselt, R. C. 2002. *Disposition of Toxic Drugs and Chemical in Man 6th Edition.* United State of America: Biomedical Publications
- Foster City. P. 504. Blanco, C.C, A.S. Carretero, S.F. Peinado dan A.F. Gutiérrez. 2000. Spectrofluorimetric Determination of Methyl Paraben in Pharmaceutical Preparations by Means of its Dansyl Chloride Derivative. *Mikrochim Acta*, 134:107-111.
- Blau, K. and J. M. Halket. 2000. *Handbook of Derivatives for Chromatography Second Edition.* United State of America: John Wiley and Sons, Inc. PP. 180-181
- Lajtha, A., G. B. Baker, S. Dunn and A. Holt. 2007. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology 3rd Edition.* USA: Springer Science. P. 28.
- Moffat, A. C., O. David and W. Brian. 2005. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons In Pharmaceuticals, Body Fluids and Post-Mortem Material 3rd edition Book 2.* London: Pharmaceutical Press. PP. 324, 403, 1303
- Primaningrum, I. A. S. 2009. Uji Skrining dan Determinasi Senyawa Morfin dalam Darah Menggunakan Metode TLC/HPTLC Spektrofotodensitometri (skripsi). Bukit Jimbaran: Jurusan Farmasi Fakultas MIPA Universitas Udayana
- Rang, H.P., M. M. Dale., J. M. Ritter and R. J. Flower. 2007. *Rang and Dale's Pharmacology 6th Edition.* Amsterdam: Elsevier. P. 601
- Sayed, L.E., A.Fattah, T.A. Mohamed, and E.A. Taha. 2010. Spectrofluorimetric Determination of Carvedilol in Dosage Form and Spiked Human Plasma Through Derivatization with 1 Dimethylaminonaphthalene-5-Sulphonyl Chloride. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly.* 16 (1): 31-38
- United Nations: Office Drugs and Crime. 2005. *World Drug Report Volume 1*

(cited 2011 April, 12) Available from:  
URL:[http://www.unodc.org/pdf/WDR\\_2005/volume\\_1\\_web.pdf](http://www.unodc.org/pdf/WDR_2005/volume_1_web.pdf)

an In Situ Reaction on Chromatographic  
Plates with Dansyl Chloride. Analyst,  
107: 459-461

Wintersteiger, R. 1981. Determination of  
Morphine and Morphine-6-nicotinate by