บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

การวิจัยนี้ได้พยายามเตรียมน้ำยาสำเร็จรูปบางอย่างที่จำเป็นสำหรับการวิเคราะห์มอร์ฟีนในปัสสาวะโดยวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์ เช่น สารละลายแขวนลอยไมโครคอคคัสลูเทียส มอร์ฟีนที่ติดฉลากด้วยไลโซไซม์ และสารละลายมาตรฐานของมอร์ฟีน เป็นต้น ทั้งนี้เพื่อลดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ นอกจากนี้ยังได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวให้มีความไว ความถูกต้องและความเชื่อถือได้สูง ตลอดจนมีความสะดวกรวดเร็วเหมาะสำหรับห้องปฏิบัติการทั่วไปโดยเปรียบเทียบกับวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์

การเลี้ยงไมโครคอคคัสลูเทียสเพื่อให้ได้เซลล์จำนวนมากสำหรับใช้ในเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์ทำได้ง่าย เช่น ถ้าเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวประมาณ 4 ลิตรโดยใช้เครื่องหมักภายในเวลาประมาณ 11 ชั่วโมง จะได้เซลล์ประมาณ 7 กรัม ซึ่งจะพอสำหรับใช้ในเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์ประมาณ 35,000 หลอดทดลอง ซึ่งนับว่าได้เซลล์จำนวนสูงมาก นอกจากนั้นการเก็บเซลล์โดยการทำให้แห้งขณะแข็งยังสามารถเก็บเซลล์ไว้ใช้ได้นานประมาณ 20 ปี (Pelczar และ Reid, 1958)

ในการวิเคราะห์อนุพันธ์มอร์ฟีนโดยวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์ จำเป็นต้องติดฉลากมอร์ฟีนด้วยเอนไซม์ ซึ่งในการวิจัยครั้งนี้ใช้ไลโซไซม์ การติดฉลากมอร์ฟีนด้วยไลโซไซม์ทำได้โดยการคอนจูเกตมอร์ฟีนเข้ากับไลโซไซม์ ทั้งนี้มอร์ฟีนจะต้องมีหมู่คาร์บอกซิลิคเพื่อใช้เชื่อมกับหมู่อะมิโนที่ตำแหน่งแอฟซีลอน (ϵ-NH_2) ของไลซีนในไลโซไซม์ การทำมอร์ฟีนให้มีหมู่คาร์บอกซีลิคก็โดยการทำเอสเทอริฟิเคชั่น (esterification) โดยอาศัยหมู่ไฮดรอกซี่ที่มีอยู่ในโมเลกุลของมอร์ฟีนฟรีเบส ซึ่งมีอยู่ 2 หมู่คือหมู่ที่เป็นฟีโนลิค (ตำแหน่ง C_3) และหมู่ที่เป็นแอลกอฮอลิค (ตำแหน่ง C_6) เมื่อให้มอร์ฟีนทำปฏิกิริยากับซัคซินิคแอนไฮไดรด์ในไพริดีนน่าจะเกิดเอสเทอริฟิเคชั่นทั้งสองตำแหน่ง แต่จากการพิสูจน์สูตรโครงสร้างของสารที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาดังกล่าวโดยวิธีอุลตราไวโอเลตสเปคโตรสโคปี และด้วยสารละลายโฟลินฟีนอลรีเอเยนต์ ปรากฏว่าสารที่เกิดขึ้นยังคงมีหมู่ไฮดรอกซี่ที่เป็นฟีโนลิคอยู่ แสดงว่าเกิดปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นที่ตำแหน่ง

C_6 คือได้มอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนตคล้ายกับที่ Simon และคณะ (1972)และ Wainer และคณะ (1972) เคยเตรียมได้ เหตุผลของการเกิดเอสเทอริฟิเคชั่นที่ตำแหน่ง C_6 ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่ Simon และคณะ (1972) ได้เสนอว่าครั้งแรกจะเกิดปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นทั้งสองตำแหน่ง แต่ตำแหน่ง C_3 เมื่อเกิดปฏิกิริยาแล้วจะถูกไฮโดรไลด์ได้ง่าย ซึ่งเขาพิสูจน์โดยการทดลองต้ม 3,6-ไดอะเซติลมอร์ฟีนในน้ำกลั่นหรือให้ทำปฏิกิริยากับไฮดรอกซีลามิน (hydroxylamine) ปรากฏว่าได้ 6-อะเซติลมอร์ฟีน

มอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนตที่เตรียมได้มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 232-237 องศาเซลเซียส ซึ่งนับว่าจุดหลอมเหลวมีช่วงกว้างกว่าที่ Simon และคณะ (1972) เตรียมได้ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 237-239 องศาเซลเซียส แต่ก็สอดคล้องกับที่ Wainer และคณะ (1972) เตรียมได้ ซึ่งเขารายงานว่ามีจุดหลอมเหลวสูงกว่า 200 องศาเซลเซียส การที่จุดหลอมเหลวของมอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนตที่เตรียมได้มีช่วงกว้างเนื่องจาก ณ ความร้อนจุดนี้ มอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนตเกิดการสลายตัว (decompose) (Wainer และคณะ 1972, Simon และคณะ, 1972) แต่อาจเนื่องจากการตกผลึกในเอทิลแอลกอฮอล์ (60%) ทำให้ผลึกของมอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนตอาจมีความชื้นอยู่ด้วย เมื่อทดสอบมอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนตที่เตรียมได้โดยโครมาโตกราฟฟีชนิดผิวบางโครมาโตแกรมที่ได้ปรากฏเป็นจุดเดียว และมีค่า Rf ต่างจากมอร์ฟีนฟรีเบสหรือมอร์ฟีนไฮโดรคลอไรด์ซึ่งเป็นสารตั้งต้นคือ 0.13, 0.65, 0.66 ตามลำดับ แสดงว่าสารที่ทดสอบมีความบริสุทธิ์และไม่ใช่มอร์ฟีนฟรีเบสหรือมอร์ฟีนไฮโดรคลอไรด์และจากการพิสูจน์โครงสร้างของสารที่เตรียมได้เปรียบเทียบกับสารตั้งต้นโดยวิธีอินฟราเรดสเปคโตรสโคปีและนิวเคลียแมคเนติครีโซแนนสเปคโตรสโคปีพิสูจน์ได้ว่าสารที่เตรียมได้เป็นมอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนต และเมื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของมอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนตโดยวิธีแมสสเปคโตรสโคปีพบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 385 ซึ่งตรงกับการคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลจากสูตรโครงสร้างแสดงว่าสารที่เตรียมได้คือมอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนต

ปฏิกิริยามิกซ์แอนไฮไดรด์เป็นปฏิกิริยาที่นิยมใช้ในการคอนจูเกตสารต่าง ๆ เข้ากับโปรตีน ซึ่งปฏิกิริยาจะเกิดได้ดีในสภาพที่ปราศจากความชื้นและที่อุณหภูมิต่ำ (Erlanger และคณะ 1959, Comoglio และ Celada, 1976, Osterman และคณะ, 1979, Hayashi และ Yamamoto, 1982) ดังนั้นการคอนจูเกตมอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนตกับไลโซไซม์ โดยวิธีมิกซ์แอนไฮไดรด์ สารเคมีต่าง ๆ และมอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนตจะต้องมีความชื้นน้อยที่สุดหรือไม่มีความชื้นเลย ตลอดจนเครื่องแก้วต่าง ๆ ต้องอบไล่ความชื้นก่อน การคอนจูเกตมอร์ฟีนกับไลโซไซม์

โดยวิธีมิกซ์แอนไฮไดรด์ ใช้มอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนตทำปฏิกิริยากับไอโซบิวทิลคลอโรฟอร์เมท โดยมีไตรบิวทิลลามีนเป็นตัวจับกรดไฮโดรคลอริคที่เกิดขึ้น ปฏิกิริยานี้ใช้ไดออกเซนเป็นตัวทำละลายและให้ทำปฏิกิริยาที่ 10 องศาเซลเซียส การที่ไม่ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่ำกว่านี้แม้ว่าปฏิกิริยานี้จะเกิดได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ เนื่องจากไดออกเซนจะกลายเป็นของแข็งได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส การคอนจูเกตมอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนตกับไลโซไซม์ในการวิจัยนี้พบว่าอัตราส่วนจำนวนโมลที่เหมาะที่สุดคือ ไลโซไซม์ : มอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนต : ไอโซบิวทิลคลอโรฟอร์เมท เท่ากับ 1:8:20 ที่ pH 8.5 ให้ร้อยละของแอคติวิตีที่ลดลงเมื่อถูกจับด้วยแอนติบอดี (% inhibition) เท่ากับ 50.39 ซึ่งลดลงน้อยกว่าเมื่อใช้มอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกตของบริษัท Syva ซึ่งมีร้อยละของแอคติวิตีที่ลดลงเท่ากับ 69.11 และน้อยกว่าของ Rubenstein และคณะ (1972) ซึ่งใช้คาร์บอกซีเมทิลมอร์ฟีนคอนจูเกตกับไลโซไซม์ โดยใช้อัตราส่วนจำนวนโมลไลโซไซม์ : คาร์บอกซีเมทิลมอร์ฟีนเท่ากับ 1:8 ได้ค่าร้อยละของแอคติวิตีที่ลดลงเท่ากับ 98 การที่ได้ค่าร้อยละของแอคติวิตีที่ลดลงต่างกันอาจเนื่องจากตำแหน่งและจำนวนโมเลกุลของมอร์ฟีนที่ติดอยู่บนโมเลกุลของเอนไซม์แตกต่างกัน (Rowley และคณะ, 1975) อย่างไรก็ตามในการวิจัยครั้งนี้ไม่ได้ทำการทดลองหาจำนวนมอร์ฟีนที่ติดอยู่บนโมเลกุลของไลโซไซม์ Rubenstein และคณะ (1972) รายงานว่าในการคอนจูเกตคาร์บอกซิลเมทิลมอร์ฟีนกับไลโซไซม์ จำนวนโมเลกุลของมอร์ฟีนโดยเฉลี่ย 4 โมเลกุลจะติดอยู่บน 1 โมเลกุลของไลโซไซม์ ซึ่งเขาหาจำนวนโมเลกุลของมอร์ฟีนโดยใช้แมกเนติกเซอคูลาร์ไดโครอิซึมสเปคโตรสโคปี (magnetic circular dichroism spectroscopy) โมเลกุลของไลโซไซม์ซึ่งมีไลซีนอยู่ 6 ตำแหน่งจะมีเพียง 4 ตัวเท่านั้นที่สามารถเกิดคอนจูเกชั่นได้ (Rubenstein และคณะ 1972)

สาเหตุของการที่แอนติบอดีต่อมอร์ฟีนจับกับมอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกตแล้วทำให้ยับยั้งแอคติวิตีของไลโซไซม์ยังไม่ทราบแน่ชัด Schneider และคณะ (1973) ตั้งสมมุติฐานว่าเมื่อแอนติบอดีไปจับกับมอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกตจะไปขัดขวางบริเวณเร่งของเอนไซม์ ทำให้สับสเตรทซึ่งเป็นสารโมเลกุลใหญ่พวกเปปติโดไกลแคนไม่สามารถเข้าใกล้บริเวณเร่งของเอนไซม์ได้

เมื่อนำมอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกตที่เตรียมได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานของมอร์ฟีนเปรียบเทียบกับมอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกตของบริษัท Syva ในช่วงความเข้มข้นของมอร์ฟีนมาตรฐานต่ำกว่า 900 นาโนกรัม/มิลลิลิตรปัสสาวะ ปรากฏว่ากราฟมาตรฐานทั้งสองเป็นเส้นตรงเกือบขนานกัน ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงสร้างกราฟมาตรฐานของมอร์ฟีนในช่วงความเข้มข้นของมอร์ฟีน 180-900 นาโนกรัม/มิลลิลิตรปัสสาวะ โดยใช้ความเข้มข้นของมอร์ฟีนมาตรฐานต่าง ๆ กันและ

มีความถี่ของความเข้มข้นมากกว่าที่บริษัท Syva ได้รายงานไว้ เพื่อให้สามารถนำมาใช้สำหรับหาปริมาณของอนุพันธ์มอร์ฟีนในปัสสาวะได้ ในขณะที่วิธีวิเคราะห์ของบริษัท Syva สามารถวัดปริมาณของอนุพันธ์มอร์ฟีนในปัสสาวะได้เพียงแบบกึ่งปริมาณ (Semiquantitative) เท่านั้น ทั้งนี้เนื่องจากทางบริษัทไม่ได้สร้างกราฟมาตรฐานของมอร์ฟีนให้ละเอียด เขาใช้มอร์ฟีนมาตรฐานเพียงสองความเข้มข้นเท่านั้นคือ 300 และ 5000 นาโนกรัม/มิลลิลิตรปัสสาวะ และกำหนดให้ตัวอย่างปัสสาวะที่อ่านผลได้ความเข้มข้นของมอร์ฟีนสูงกว่า 500 นาโนกรัม/มิลลิลิตรปัสสาวะให้แปรผลการวิเคราะห์เป็นบวก ถ้าความเข้มข้นของมอร์ฟีนที่อ่านได้ต่ำกว่า 500 นาโนกรัม/มิลลิลิตรปัสสาวะให้แปรผลการวิเคราะห์เป็นลบ

วิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์ใช้การติดฉลากด้วยเอนไซม์ และติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยการวัดแอคติวิตีของไลโซไซม์ ดังนั้น pH และความเข้มข้นอิออน (ionic strength) ของสารละลายตลอดจนอุณหภูมิจึงมีความสำคัญต่อแอคติวิตีของไลโซไซม์ ในการตรวจวิเคราะห์อนุพันธ์มอร์ฟีนในปัสสาวะครั้งนี้ใช้ทริสมาลีเอตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.025 โมล/ลิตร pH 6.0 โดยคำนึงถึง pH ที่เหมาะสมที่สุด (optimum pH) ของไลโซไซม์และเป็น pH ที่ไม่ทำให้การจับกันระหว่างแอนติเจน-แอนติบอดีลดลง (อยู่ในช่วง pH6-7) (Scharpe และคณะ, 1976) ปัสสาวะที่เก็บไว้นานอาจมีแบคทีเรียหรือเชื้อราเกิดขึ้น ซึ่งอาจทำให้ pH เปลี่ยนแปลง จึงควรปรับ pH ของปัสสาวะให้อยู่ในช่วง 5.5-8.0 (Broughton และ Ross, 1975) ด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 1 โมล/ลิตรหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 1 โมล/ลิตรก่อนทำการวิเคราะห์ แต่ในการตรวจวิเคราะห์ปัสสาวะชาวไทยภูเขาในการวิจัยนี้ได้เจือจางปัสสาวะชาวไทยภูเขา 10-500 เท่าด้วยปัสสาวะของคนปกติซึ่งมี pH อยู่ในช่วง 5.5-6.5 ดังนั้นจึงไม่จำเป็นต้องปรับ pH ของปัสสาวะชาวไทยภูเขาก่อนทำการวิเคราะห์

อุณหภูมิก็มีผลต่อแอคติวิตีของไลโซไซม์ จากการทดลองของ Broughton และ Ross (1975) พบว่าการเพิ่มอุณหภูมิมีผลทำให้แอคติวิตีของไลโซไซม์เพิ่มขึ้นด้วย และพบว่าอุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียสไลโซไซม์จะมีแอคติวิตีสูงสุด แต่การวิจัยนี้ใช้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในการวัดแอคติวิตีของไลโซไซม์ตามวิธีของ Schneider และคณะ (1973) เนื่องจากที่อุณหภูมิสูงโอกาสที่ไลโซไซม์จะสูญเสียสภาพมีได้มากขึ้น และต้องการจะเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับของบริษัท Syva ซึ่งกำหนดให้ใช้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

การวัดแอคติวิตีของไลโซไซม์โดยการวัดความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 436 นาโนเมตรที่เวลา 10 และ 50 วินาทีนับจากเวลาเริ่มต้น อาจใช้นาฬิกาจับเวลาที่มีเข็มวินาทีในการจับเวลาแทนเครื่อง Timer-Printer ของบริษัท Syva ก็ได้ จากนั้นจึงคำนวณแอคติวิตีของไลโซไซม์จากความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ลดลงในช่วงเวลา 40 วินาที การเริ่มต้นวัดความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ 10 วินาที มีจุดประสงค์เพื่อรอให้สารละลายอยู่ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมเสียก่อน (thermal equilibrium) (Schneider, และคณะ 1973) และการเลือกวัดแอคติวิตีของไลโซไซม์ในช่วงเวลา 40 วินาทีก็เพื่อวัดแอคติวิตีของไลโซไซม์ที่อัตราเร็วเริ่มต้น (initial velocity)

การตรวจวิเคราะห์อนุพันธ์มอร์ฟีนในปัสสาวะด้วยวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์โดยใช้มอร์ฟีนติดฉลากด้วยไลโซไซม์ อาจมีข้อผิดพลาดถ้ามีไลโซไซม์อยู่ในตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ (Schneider และคณะ,1974) ดังนั้นในการวิเคราะห์จำเป็นต้องทำแบลงค์ด้วยเพื่อนำไปหักออกจากค่าแอคติวิตีของไลโซไซม์ที่วัดได้ในตัวอย่างปัสสาวะ สำหรับการวิจัยนี้ได้เจือจางตัวอย่างปัสสาวะชาวไทยภูเขา 10-500 เท่าด้วยปัสสาวะคนปกติก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์ ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ไลโซไซม์ในตัวอย่างปัสสาวะที่เจือจางแล้วนั้นพบว่ามีแอคติวิตีของไลโซไซม์ต่ำมาก (ΔOD_{436}/40 วินาที)x1000 เท่ากับ 2-7 จึงไม่จำเป็นต้องนำแอคติวิตีดังกล่าวไปหักออกจากค่าแอคติวิตีที่วัดได้จากตัวอย่างปัสสาวะของชาวไทยภูเขา ซึ่งทางบริษัท Syva ให้ถือว่าถ้าแอคติวิตีที่วัดได้ในหลอดแบลงค์ต่ำกว่า 10 ให้ตัดทิ้งได้ ในกรณีที่มีไลโซไซม์จำนวนมากอยู่ในตัวอย่างที่จะวิเคราะห์สามารถหลีกเลี่ยงได้โดยการติดฉลากด้วยเอนไซม์ตัวอื่น เช่น Gorodetzky และ Kullberg (1974) วิเคราะห์ปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนในน้ำลาย โดยใช้มอร์ฟีนที่ติดฉลากด้วยมาเลทดีไฮโดรจีเนส (malate dehydrogenase) แทนเนื่องจากในน้ำลายมีไลโซไซม์อยู่มาก นอกจากนี้ในการวิเคราะห์อนุพันธ์มอร์ฟีนด้วยวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์ยังต้องคำนึงถึงตัวยับยั้ง (inhibitors) ของไลโซไซม์ด้วย ซึ่งได้แก่กรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิค (deoxyribonucleic acid) กรดไรโบนิวคลีอิค (ribonucleic acid) กรดไฮยาลูโรนิค (hyaluronic acid) กลูตามิลโพลีเปปไทด์ (glutamyl polypeptide) และนิวโมคอคคัสโพลีแซคคาไรด์ (pneumococcus polysaccharide) (Skarnes และ Watson, 1955) โคโพลีเมอร์ของกรดกลูตามิค (glutamic acid) กับไธโรซิน (tyrosine) หรือกับเฟนนิลอะลานิน (phenylalanine) หรือกับลิวซีน (leucine) (Sela และ Steiner,1963) เฮปาริน (heparin) (Kerby

และ Eadie, 1953) แคทไอโอนิค ดีเทอร์เจน (cationic detergent) (Hayashi และคณะ, 1968) เป็นต้น ตัวยับยั้งของไลโซไซม์ส่วนใหญ่ล้วนเป็นสารที่ละลายน้ำได้ดี Slightom (1978) จึงใช้วิธีสกัดมอร์ฟีนออกจากตัวอย่างเลือด น้ำดีหรือเนื้อเยื่อด้วยสารละลายอินทรีย์ก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์ปริมาณมอร์ฟีนโดยวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์ ซึ่งตัวยับยั้งจะไม่ถูกสกัด แต่ในการวิจัยนี้ไม่ได้ทดสอบตัวอย่างปัสสาวะที่ใช้ศึกษาว่ามีตัวยับยั้งเหล่านี้หรือไม่ อย่างไรก็ตามถ้าในปัสสาวะมีตัวยับยั้งเหล่านี้ ปริมาณของมอร์ฟีนที่วัดได้น่าจะน้อยกว่าปกติ (false negative)

วิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์ที่ได้พัฒนาขึ้นนี้มีความไวค่อนข้างสูง คือมีความไวเท่ากับ 180 นาโนกรัม/มิลลิลิตรปัสสาวะซึ่งสูงกว่าวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์ที่ Mule และคณะ (1974) และ Brattin และ Sunshine (1973) เคยรายงานไว้ ซึ่งมีความไวเพียง 400 นาโนกรัม/มิลลิลิตรปัสสาวะ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ปรากฏว่าวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยกำลังศึกษาอยู่มีความไวสูงกว่ามากคือมีความไวเท่ากับ 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตรปัสสาวะ อย่างไรก็ตามวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์ที่พัฒนาได้ก็มีความไวมากพอที่จะใช้วัดปริมาณของอนุพันธ์มอร์ฟีนในตัวอย่างปัสสาวะได้ ความไวของวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์นอกจากจะขึ้นกับค่า Ka (affinity constant) ของแอนติบอดีต่อมอร์ฟีนเช่นเดียวกับวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์แล้ว ยังขึ้นกับเอนไซม์ที่ใช้ติดฉลากด้วย (Pesce และคณะ, 1978) เอนไซม์ที่ใช้ติดฉลากแต่ละตัวจะทำให้ความไวของวิธีวัดแตกต่างกัน Rowley และคณะ (1975) ติดฉลากมอร์ฟีนด้วยมาเลทดีไฮโดรจีเนส (malate dehydrogenase) โดยใช้ออกซาโลอะซีติกแอซิด (oxaloacetic acid) เป็นสับเสตรท และเอ็นเอดีเอช (NADH) เป็นโคเอนไซม์ จะทำให้มีความไวมากกว่าการติดฉลากด้วยไลโซไซม์ถึง 1000 เท่า

ในการวิจัยครั้งนี้ได้ใช้แอนติบอดีต่อมอร์ฟีนของบริษัท Syva ซึ่งแอนติบอดีที่ใช้มีปฏิกิริยาข้ามชนิดกับอนุพันธ์และเมตาโบไลท์ของมอร์ฟีน เช่นมอร์ฟีน-3-กลูคิวโรไนด์ และโคเดอีนค่อนข้างสูง โดยปกติการตรวจวิเคราะห์สารต่าง ๆ ต้องการความจำเพาะสูง แต่การที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างของมอร์ฟีนและเมตาโบไลท์ของมอร์ฟีนในการตรวจวิเคราะห์มอร์ฟีนเป็นข้อดีของวิธีนี้ คือทำให้สามารถวัดและรายงานผลเป็นอนุพันธ์มอร์ฟีนรวมกัน (WHO Technical Report Series 556, 1974) แอนติบอดีที่ใช้ในเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ให้ปฏิกิริยาข้ามชนิดสูงสุดกับโคเดอีน และมอร์ฟีน-3-กลูคิวโรไนด์เช่นกัน โดยเฉพาะโคเดอีนให้

ร้อยละของปฏิกิริยาข้ามชนิดมากกว่า 100 ในการวิจัยครั้งนี้จึงเป็นการวัดรวมทั้งมอร์ฟีนและอนุพันธ์ของมอร์ฟีนด้วย ซึ่งเป็นข้อดีของทั้งสองวิธี เนื่องจากมอร์ฟีนส่วนใหญ่จะถูกขับออกมาในปัสสาวะในรูปของมอร์ฟีนกลูคิวโรไนด์ประมาณร้อยละ 90 (Way และ Adler, 1961, Schneider และคณะ, 1973)

วิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์ที่พัฒนาได้มีความแม่นยำพอใช้ได้คือ มีค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนภายในการทดลองเดียวกันเป็น 7.42 และ 11.25 ที่ความเข้มข้นของอนุพันธ์มอร์ฟีน 238 และ 792.8 นาโนกรัม/มิลลิลิตรปัสสาวะตามลำดับ และได้ค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนในต่างการทดลองกันเป็น 9.09 และ 12.44 ที่ความเข้มข้นของอนุพันธ์มอร์ฟีน 239 และ 706 นาโนกรัม/มิลลิลิตรปัสสาวะตามลำดับ จะสังเกตุเห็นว่าที่ความเข้มข้นสูงจะมีความแม่นยำต่ำกว่าที่ความเข้มข้นต่ำ ทั้งภายในการทดลองเดียวกันและต่างการทดลองกัน ดังนั้นในการวิเคราะห์ปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนในตัวอย่างปัสสาวะจึงพยายามเจือจางตัวอย่างให้อยู่ในช่วงความเข้มข้นต่ำ ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนในการทดลองเดียวกันที่เป็นที่ยอมรับกันส่วนใหญ่จะมีค่าอยู่ในช่วง 3 ถึง 8 และสำหรับต่างการทดลองกันอยู่ในช่วง 8 ถึง 20 (Chard, 1978) อย่างไรก็ตามความแม่นยำของวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์-อิมมิวโนแอสเสย์นี้ใกล้เคียงกับของวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ ซึ่งมีค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนในการทดลองเดียวกันเป็น 9.06, 4.30 และ 7.33 ที่ความเข้มข้นของอนุพันธ์มอร์ฟีน 26.92, 52.12 และ 106.14 นาโนกรัม/มิลลิลิตรปัสสาวะตามลำดับ (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) และในต่างการทดลองกันเป็น 10.69, 9.39 และ 8.72 ที่ความเข้มข้นของอนุพันธ์มอร์ฟีน 25.36, 49.50 และ 105.72 นาโนกรัม/มิลลิลิตรปัสสาวะ (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบความแม่นยำของวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์ที่พัฒนาโดย Schneider และคณะ 1973 ซึ่งมีร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนในการทดลองเดียวกันเป็น 5.0 และ 9.4 ที่ความเข้มข้นของอนุพันธ์มอร์ฟีน 500,3,000 นาโนกรัม/มิลลิลิตรปัสสาวะตามลำดับ จะเห็นได้ว่าความแม่นยำของวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์ที่พัฒนาได้น้อยกว่าที่ Schneider และคณะพัฒนาได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น

ความแม่นยำของการวัดปริมาณสารโดยวิธีอิมมิวโนแอสเสย์ ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น คุณสมบัติของรีเอเจนต์ วิธีการและการทำการทดลอง เป็นต้น (Chard, 1978)

ในการวิจัยนี้ได้พยายามควบคุมปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้ด้วย เช่น สารละลายบัฟเฟอร์จะเตรียมแล้วใช้ภายใน 2 สัปดาห์ เนื่องจากการเก็บสารละลายบัฟเฟอร์ไว้นาน ๆ อาจมีแบคทีเรียหรือราเกิดขึ้น ซึ่งจะมีผลทำให้ความเป็นกรดเป็นด่างตลอดจนความเข้มข้นของไอออนเปลี่ยนแปลงและมีผลต่อแอคติวิตีของไลโซไซม์ สารละลายแขวนลอยไมโครคอคคัสลูเทียสก็เช่นกันได้เตรียมและใช้ภายใน 1 สัปดาห์ เนื่องจากการเก็บไว้นานอาจทำให้จำนวนแบคทีเรียลดลงเนื่องจากเกิดการแตกทำลาย สารละลายมาตรฐานของมอร์ฟีนได้เตรียมไว้เพียงพอสำหรับใช้ตลอดการวิจัย เนื่องจากถ้ามีการเตรียมสารละลายมาตรฐานใหม่ทุกครั้ง แต่ละครั้งอาจมีความถูกต้องไม่เท่ากัน อนึ่งขั้นตอนของการวิเคราะห์ปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนโดยวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิว-โนแอสเสย์ ลำดับในการตวงสารละลายต่าง ๆ จะต้องเหมือนกัน และระยะเวลาในการตวงสารละลายต่าง ๆ ได้พยายามทำให้ใกล้เคียงกันที่สุดโดยเฉพาะระยะเวลาหลังจากเติมมอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกตจนกระทั่งเริ่มจับเวลาสำหรับอ่านค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงจะต้องเท่ากันทุกการทดลอง และไม่ควรเกิน 15 วินาที นอกจากนี้ในแต่ละการทดลองยังได้วัดปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนในปัสสาวะตัวอย่างที่ใช้เป็นตัวควบคุมคุณภาพด้วย ซึ่งมีอยู่ 2 ตัวอย่างคือตัวอย่างปัสสาวะที่มีความเข้มข้นของอนุพันธ์มอร์ฟีนต่ำและสูง ถ้าการทดลองใดวัดปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนในตัวอย่างปัสสาวะที่ใช้ควบคุมคุณภาพแตกต่างจากค่าเฉลี่ย ±2 เท่าของความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ±2SD) จะถือว่าผลการทดลองครั้งนั้นใช้ไม่ได้

วิธีศึกษาความถูกต้องของวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์วิธีหนึ่ง ก็คือการดูรีคอฟ-เวอรี่ของปริมาณมอร์ฟีนมาตรฐานที่เติมลงในตัวอย่างปัสสาวะ ซึ่งปรากฏว่าได้ค่า % recovery อยู่ในช่วง 82.09-95.97 และความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณมอร์ฟีนที่เติมลงไปกับปริมาณมอร์ฟีนที่วัดได้พบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด คือมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.97 ซึ่งตามทฤษฎีควรเท่ากับ 1.0 การที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ไม่เท่ากับ 1.0 อาจเนื่องจากข้อผิดพลาดทางวิธีการทดลอง (methodology) และการทำการทดลอง (operation) (Chard, 1978) อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ซึ่งมีค่า % recovery อยู่ในช่วง 98-102.5 จะเห็นว่าความถูกต้องของวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์น้อยกว่าวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์

จากการวัดปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนในปัสสาวะของชาวไทยภูเขาที่ใช้และติดฝิ่นจำนวน 60 ตัวอย่างด้วยวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์โดยใช้น้ำยาสำเร็จรูปที่เตรียมขึ้นเปรียบเทียบกับวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ซึ่งวิเคราะห์โดยศูนย์วิจัยยาเสพติด สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พบว่าปริมาณมอร์ฟีนที่วัดได้ในปัสสาวะโดยทั้งสองวิธีนี้มีค่าใกล้เคียงกัน และมีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด คือมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.94 แสดงให้เห็นว่าวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์สามารถนำมาใช้แทนวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ได้

จากการเปรียบเทียบวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์กับวิธีเรดิโออิมมิวโนแอส-เสย์ พบว่าวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว และไม่ต้องมีขั้นตอนของการแยกแอนติเจน-แอนติบอดีคอมเพล็กซ์ออกจากแอนติเจนอิสระ สามารถวิเคราะห์ได้ประมาณ 100-150 ตัวอย่างใน 8 ชั่วโมง หรือใช้เวลาเฉลี่ยในการวิเคราะห์ต่อตัวอย่างประมาณ 3-4 นาที และถ้าวิเคราะห์เพียงตัวอย่างเดียวจะใช้เวลาประมาณ 1-2 นาทีเท่านั้น เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้ถึง 200-250 ตัวอย่างใน 8 ชั่วโมงหรือใช้เวลาเฉลี่ยในการวิเคราะห์ต่อตัวอย่างประมาณ 1-2 นาที แต่ถ้าวิเคราะห์เพียงตัวอย่างเดียวจะต้องใช้เวลา 2-2½ ชั่วโมงจึงจะได้ผลการทดลอง ดังนั้นวิธีเอนไซม์มัลติ-ไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์จึงมีประโยชน์มากสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ต้องการผลรวดเร็ว เช่น ตัวอย่างจากคนไข้ฉุกเฉินที่ใช้ยาเกินขนาด เป็นต้น เมื่อคิดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์อนุพันธ์-มอร์ฟีนในปัสสาวะต่อตัวอย่างจะต้องสิ้นค่าใช้จ่ายประมาณ 50 สตางค์โดยคิดจากค่าสารละลายต่าง ๆ ที่เตรียมขึ้นเองรวมทั้งต้นทุนการผลิตแอนติบอดีต่อมอร์ฟีนด้วย ในขณะที่การวิเคราะห์ต่อตัวอย่างด้วยน้ำยาสำเร็จรูปของบริษัท Syva จะต้องสิ้นค่าใช้จ่ายประมาณ 32 บาท และเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ซึ่งใช้น้ำยาสำเร็จรูปของบริษัท Roche Diagnostics (โดยใช้น้ำยาเพียงหนึ่งในสี่ของที่บริษัทแนะนำ) จะสิ้นค่าใช้จ่ายต่อตัวอย่างประมาณ 5 บาท 50 สตางค์ จะเห็นได้ชัดเจนว่าการเตรียมน้ำยาสำหรับวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์ขึ้นใช้เองสามารถลดค่าใช้จ่ายได้มากถึงประมาณ 60 เท่าเมื่อเทียบกับการใช้น้ำยาสำเร็จรูปของบริษัท Syva และประมาณ 10 เท่าเมื่อเทียบกับการวัดโดยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์โดยใช้น้ำยาสำเร็จรูปของบริษัท Roche Diagnostics

ปัจจุบันวิธีโฮโมจีเนียสเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์ได้พัฒนาไปมาก นอกจากจะติดฉลากสารที่จะวิเคราะห์หรือแอนติเจนด้วยเอนไซม์ยังมีการติดฉลากสารที่จะวิเคราะห์ด้วยสับสเตรทของเอนไซม์ที่ใช้ (Wong และคณะ, 1979) นอกจากนี้อาจติดฉลากสารที่จะวิเคราะห์ด้วยแอนติบอดีต่อเอนไซม์ที่ใช้ หรือติดฉลากสารที่จะวิเคราะห์ด้วยอินฮิบิเตอร์หรือรีเซพเตอร์ (receptor) ของเอนไซม์ที่ใช้ก็ได้ (Ngo และ Lenhoff, 1980) จะเห็นได้ว่าวิธีโฮโมจีเนียสเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์เป็นวิธีที่น่าสนใจสำหรับการวิเคราะห์สาร

โดยทั่วไปและกำลังมีการพัฒนากันอย่างกว้างขวาง การศึกษาครั้งนี้ย่อมเป็นแนวทางสำหรับผู้ที่ต้องการพัฒนาวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์ในการตรวจวิเคราะห์สารต่าง ๆ ได้

โดยสรุปในการวิจัยครั้งนี้ได้เตรียมน้ำยาสำหรับเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์บางอย่างได้แก่ สารละลายแขวนลอยไมโครคอคคัสลูเทียส มอร์ฟีนที่ติดฉลากด้วยไลโซไซม์และสารละลายมาตรฐานมอร์ฟีน สำหรับใช้วิเคราะห์ปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนในปัสสาวะ ซึ่งวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์ที่พัฒนาได้มีความถูกต้องและความเชื่อถือได้พอสมควรและใกล้เคียงกับวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยกำลังศึกษาอยู่ นอกจากนี้ปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนในปัสสาวะของชาวไทยภูเขาที่ใช้และติดผิ่นจำนวน 60 ตัวอย่าง ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยทั้งสองวิธีดังกล่าวข้างต้นมีค่าใกล้เคียงกันมาก ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์ที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนโดยใช้น้ำยาที่เตรียมขึ้นมาเองสามารถใช้แทนวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ได้โดยเฉพาะถ้ามีจำนวนตัวอย่างน้อย ๆ น่าจะใช้วิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์ หรือสามารถใช้แทนวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโน-แอสเสย์ที่วิเคราะห์โดยใช้น้ำยาของบริษัท Syva ได้โดยสามารถลดค่าใช้จ่ายได้อย่างมากมาย งานวิจัยนี้จะส่งผลทำให้สถาบันหรือหน่วยงานต่าง ๆ ที่ต้องการวิเคราะห์อนุพันธ์มอร์ฟีนสามารถนำไปใช้ได้ โดยไม่มีข้อจำกัดในเรื่องค่าใช้จ่ายและเครื่องมือที่มีราคาแพงอีกต่อไป

อย่างไรก็ตามเนื่องจากมีเวลาจำกัด ในการศึกษาครั้งนี้จึงไม่ได้เตรียมแอนติบอดี-ต่อมอร์ฟีนขึ้นใช้เอง ซึ่งน่าจะได้ศึกษากันต่อไป เป็นที่คาดหมายว่าการสร้างแอนติบอดีต่อมอร์ฟีนน่าจะเป็นไปได้ไม่ยาก เมื่อพิจารณาดูจากลักษณะโครงสร้างของโมเลกุลของมอร์ฟีน ถ้าสามารถสร้างแอนติบอดีต่อมอร์ฟีนได้อีกอย่างนั่นก็หมายความว่าสามารถสร้างน้ำยาที่จำเป็นสำหรับเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์ได้ครบถ้วน ซึ่งย่อมเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่องานวิเคราะห์ดังได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย