บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการเลี้ยงไมโครคอคคัสลูเทียสในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (L-Broth)

ได้ทดลองเลี้ยงไมโครคอคคัสลูเทียสในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวในเครื่องหมัก ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (ตามรายละเอียดในข้อ 3.1.3.2 หน้า 25) และติดตามดูการเจริญเติบโตของไมโครคอคคัสลูเทียสที่เวลาต่าง ๆ กัน ปรากฏว่า ระยะแรกคือ ช่วงเวลาประมาณ 5-6 ชั่วโมง เป็นช่วงแลกเฟส (lag phase) ซึ่งเป็นช่วงที่แบคทีเรียปรับตัวให้เข้ากับภาวะแวดล้อมใหม่ เริ่มมีการสังเคราะห์สารต่าง ๆ สำหรับการเจริญเติบโต หลังจากนั้นจึงเริ่มเข้าลอกเฟส (log phase) ซึ่งเป็นระยะที่เซลล์ของแบคทีเรียเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วโดยการแบ่งตัวแบบทวีคูณ และเมื่อเลี้ยงเซลล์ไปได้ประมาณ 11 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงลอกเฟสตอนปลาย เซลล์จะเจริญเติบโตเต็มที่และมีจำนวนเซลล์มากที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 9 หน้า 38 ดังนั้นจึงได้เก็บเซลล์สำหรับไว้ใช้ในเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์หลังจากที่เลี้ยงเซลล์ได้ประมาณ 11 ชั่วโมง โดยการทำให้แห้งขณะแข็ง ซึ่งปรากฏว่าได้เซลล์ประมาณ 7 กรัม

4.2 ผลการเตรียมมอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนต

ในการเตรียมมอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนต โดยใช้มอร์ฟีนทำปฏิกิริยากับซัคซินิคแอนไฮไดรด์ในไพริดีน ดังรายละเอียดในข้อ 3.1.4.1 หน้า 27 ได้มอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนตมีลักษณะเป็นผลึกสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 232-237 องศาเซลเซียส หนัก 0.3020 กรัม ซึ่งคิดเป็น % yield เท่ากับ 26.12%

4.2.1 ผลการทดสอบความบริสุทธิ์ของมอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนต

เมื่อนำมอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนตที่เตรียมได้ตามรายละเอียดในข้อ 3.1.4.1 หน้า 27 ไปทดสอบความบริสุทธิ์โดยโครมาโตกราฟฟีชนิดผิวบาง ตามรายละเอียดในข้อ 3 ของภาคผนวก โดยใช้ตัวทำละลายผสม (solvent system) 2 ชนิด คือ ชนิดที่หนึ่งประกอบด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ ไดออกเซน เบนซิน และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ในอัตราส่วน

40:5:50:5 (โดยปริมาตร) ชนิดที่สองประกอบด้วย เอทธิลอะซีเตต เมธิลแอลกอฮอล์ และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ในอัตราส่วน 85:10:5 (โดยปริมาตร) จากโครมาโตแกรม (chromatogram) ที่ได้ พบว่ามอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนตที่เตรียมได้ไม่มีมอร์ฟีนฟรีเบสหรือมอร์ฟีนไฮโดรคลอไรด์ปนอยู่ เนื่องจากในโครมาโตแกรมปรากฏเป็นจุด (spot) เดียว และมีค่า Rf ต่างจากของมอร์ฟีนฟรีเบส และมอร์ฟีนไฮโดรคลอไรด์ ดังแสดงในตารางที่ 3 หน้า 39

4.2.2 ผลการพิสูจน์สูตรโครงสร้างของมอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนต

เมื่อนำมอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนตที่เตรียมได้ไปวิเคราะห์สูตรโครงสร้างโดยวิธีอุลตราไวโอเลตสเปคโตรสโคปี (Ultraviolet spectroscopy) อินฟราเรดสเปคโตร-สโคปี (infrared spectroscopy) ซึ่งการวิเคราะห์ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นิวเคลียแมคเนติครีโซแนนสเปคโตรสโคปี (nuclear magnetic resonance spectroscopy) และแมสสเปคโตรสโคปี (mass spectro-scopy) ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยมหิดล โดยวิเคราะห์เปรียบเทียบกับมอร์ฟีนฟรีเบส ได้ผลดังนี้

การวิเคราะห์โดยใช้อุลตราไวโอเลตสเปคโตรสโคปี ปรากฏว่ามอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนตและมอร์ฟีนฟรีเบส ซึ่งละลายอยู่ในเอทิลแอลกอฮอล์มีความสามารถในการดูดกลืน-แสงสูงสุด (maximum absorbance) ที่ความยาวคลื่นแสง 285 และ 284 นาโนเมตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 10 หน้า 40 แสดงว่าสารทั้ง ๒ ชนิดนี้มีฟีโนลิคริง (phenolic ring) อยู่ (Simon และคณะ 1972) ซึ่งสนับสนุนโดยผลการทดสอบด้วยสารละลายโฟลินฟีนอลรีเอเยนต์ (Folin phenol reagent) ตามรายละเอียดข้อ 2 ของภาคผนวก ซึ่งปรากฏว่าสารทั้ง 2 ชนิดนี้ให้ผลเป็นบวก

การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างโดยอินฟราเรดสเปคโตรสโคปี เป็นวิธีการหาหมู่ในสูตรโครงสร้าง (functional group) ที่มีคุณสมบัติในการดูดกลืนอินฟราเรด (infrared absorption) เช่น หมู่ไฮดรอกซี (-OH) หมู่คาร์บอกซิลิค (-COOH) และหมู่คาร์บอนิล ($-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-$) เป็นต้น อินฟราเรดสเปคตรา (infrared spectra) ของมอร์ฟีนฟรีเบส และมอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนต แสดงไว้ในรูปที่ 11 และ 12 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบคุณสมบัติในการดูดกลืนอินฟราเรดของมอร์ฟีนฟรีเบส และมอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนตแล้วได้ผลดัง

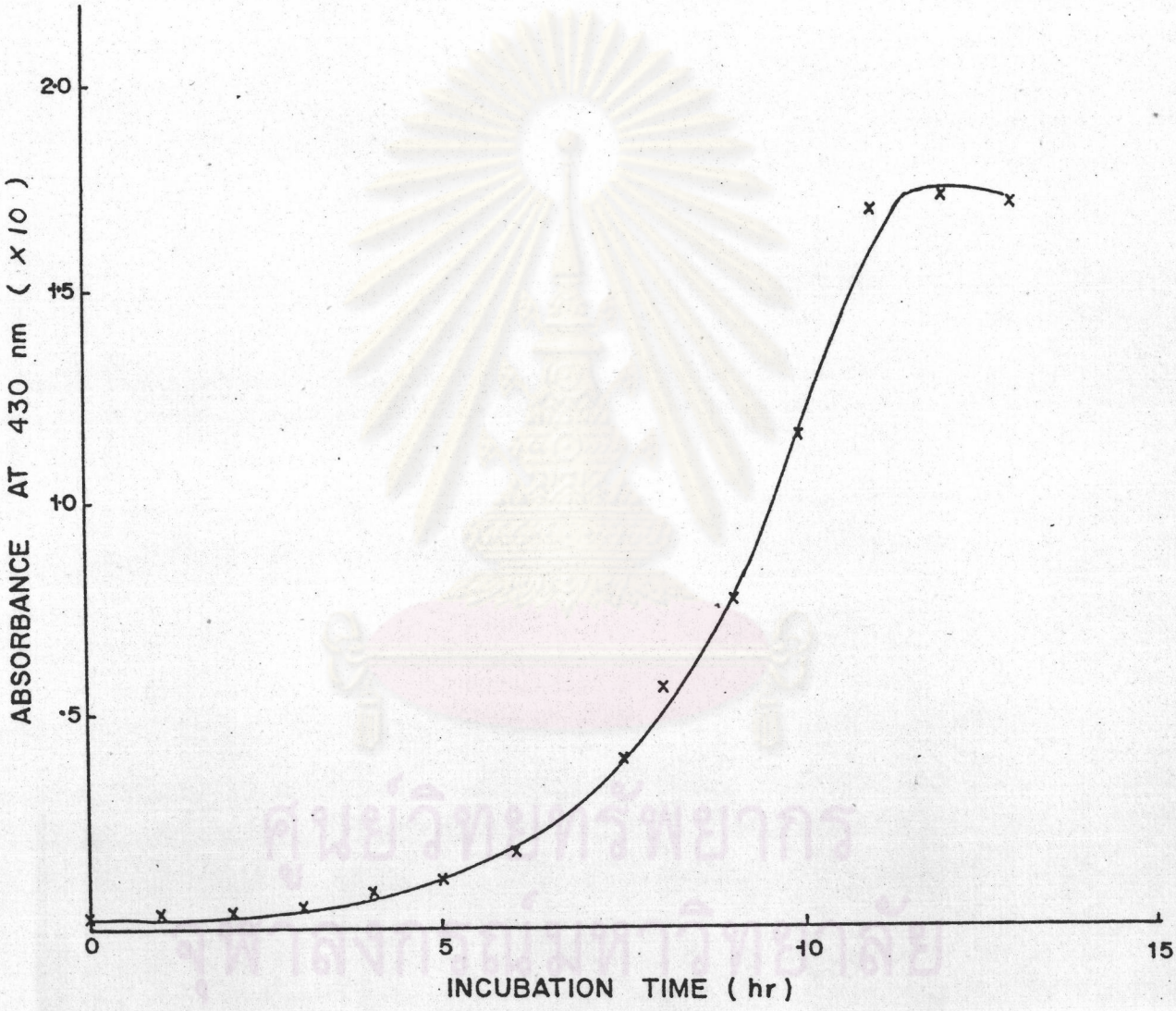
แสดงในตารางที่ 4 หน้า 43 ซึ่งจะเห็นได้ว่าสารทั้งสองมีคุณสมบัติในการดูดกลืนอินฟราเรดแตกต่างกัน และที่เห็นได้ชัดก็คือ มอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนตมีหมู่คาร์บอนิล (-C-) แต่มอร์ฟีนฟรีเบสไม่มี

การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างโดยนิวเคลียแมคเนติครีโซแนนซ์สเปคโตรสโคปี เป็นวิธีที่ใช้พิสูจน์ยืนยันสูตรโครงสร้างและความบริสุทธิ์ของสารที่เตรียมได้ นิวเคลียแมคเนติค-รีโซแนนสเปคตรา (nuclear magnetic resonance spectra) ของมอร์ฟีนฟรีเบส และมอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนต ได้แสดงไว้ในรูปที่ 13 และ 14 ตามลำดับ ซึ่งเป็นการยืนยันสูตรโครงสร้างและความบริสุทธิ์ของมอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนตที่เตรียมได้

การวิเคราะห์โดยแมสสเปคโตรสโคปี (mass spectroscopy) เป็นวิธีที่ใช้สำหรับหาน้ำหนักโมเลกุลของสาร ซึ่งจากแมสสเปคตรัม (mass spectrum) ของมอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนต แสดงให้เห็นว่ามีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 385

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 9 ลักษณะการเจริญเติบโตของไมโครคอคคัสลูเทียสในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (L- Broth)



ตารางที่ 3 ค่า Rf ของอนุพันธ์มอร์ฟีนและสารที่นำมาทดสอบที่ได้จากโครมาโตกราฟฟีชนิดผิวบาง

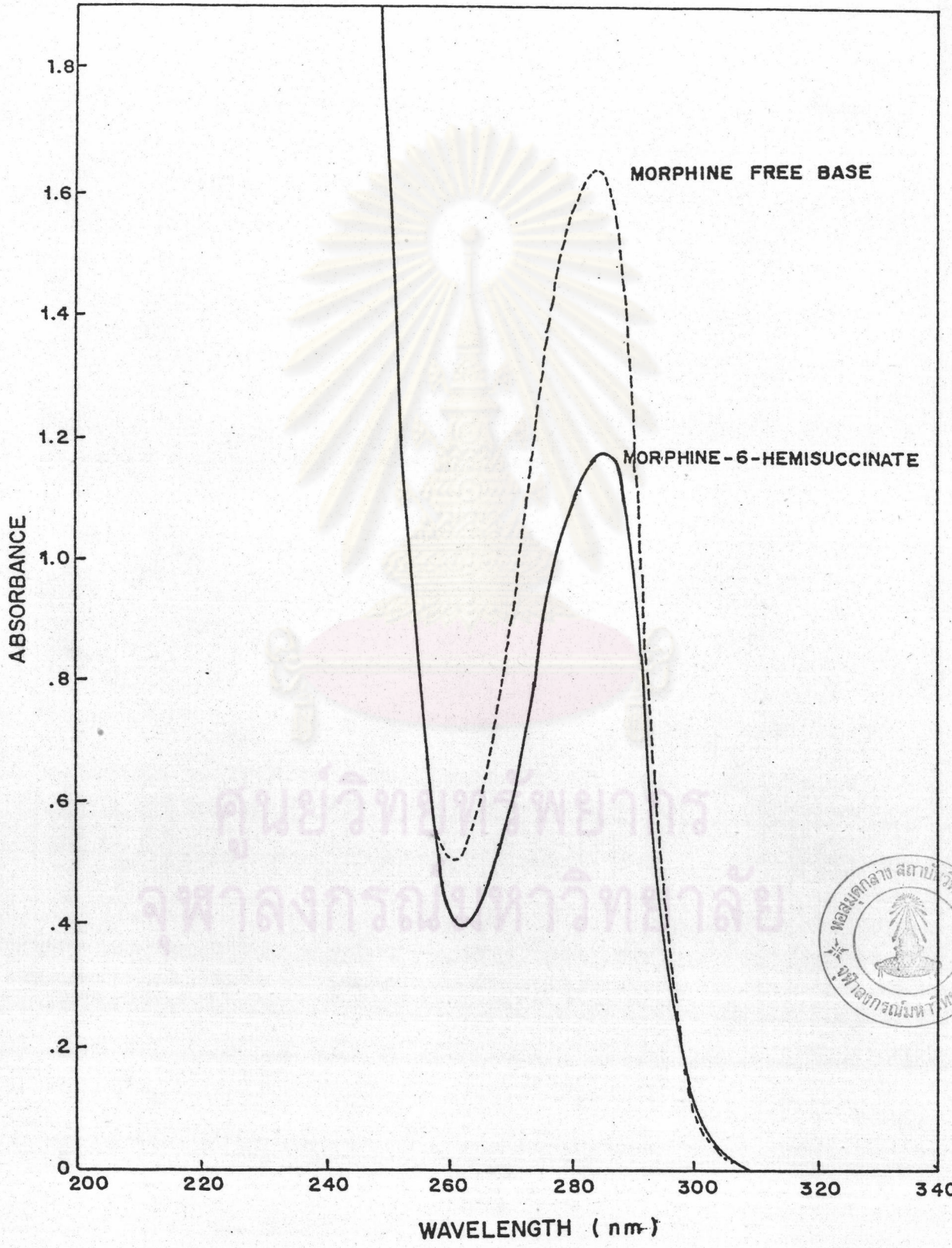
Tested compound	Rf values	
	Solvent system I	Solvent system II
Morphine-6-hemisuccinate	0.13	0 (origin)
Morphine free base	0.65	0.28
Morphine hydrochloride	0.66	0.26

Solvent system I = ตัวทำละลายผสมที่ประกอบด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ ไดออกเซน เบนซิน และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ในอัตราส่วน 40:5:50:5 (โดยปริมาตร)

Solvent system II = ตัวทำละลายผสมที่ประกอบด้วยเอทธิลอะซีเตต เมธิลแอลกอฮอล์ และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ในอัตราส่วน 85:10:5 (โดยปริมาตร)

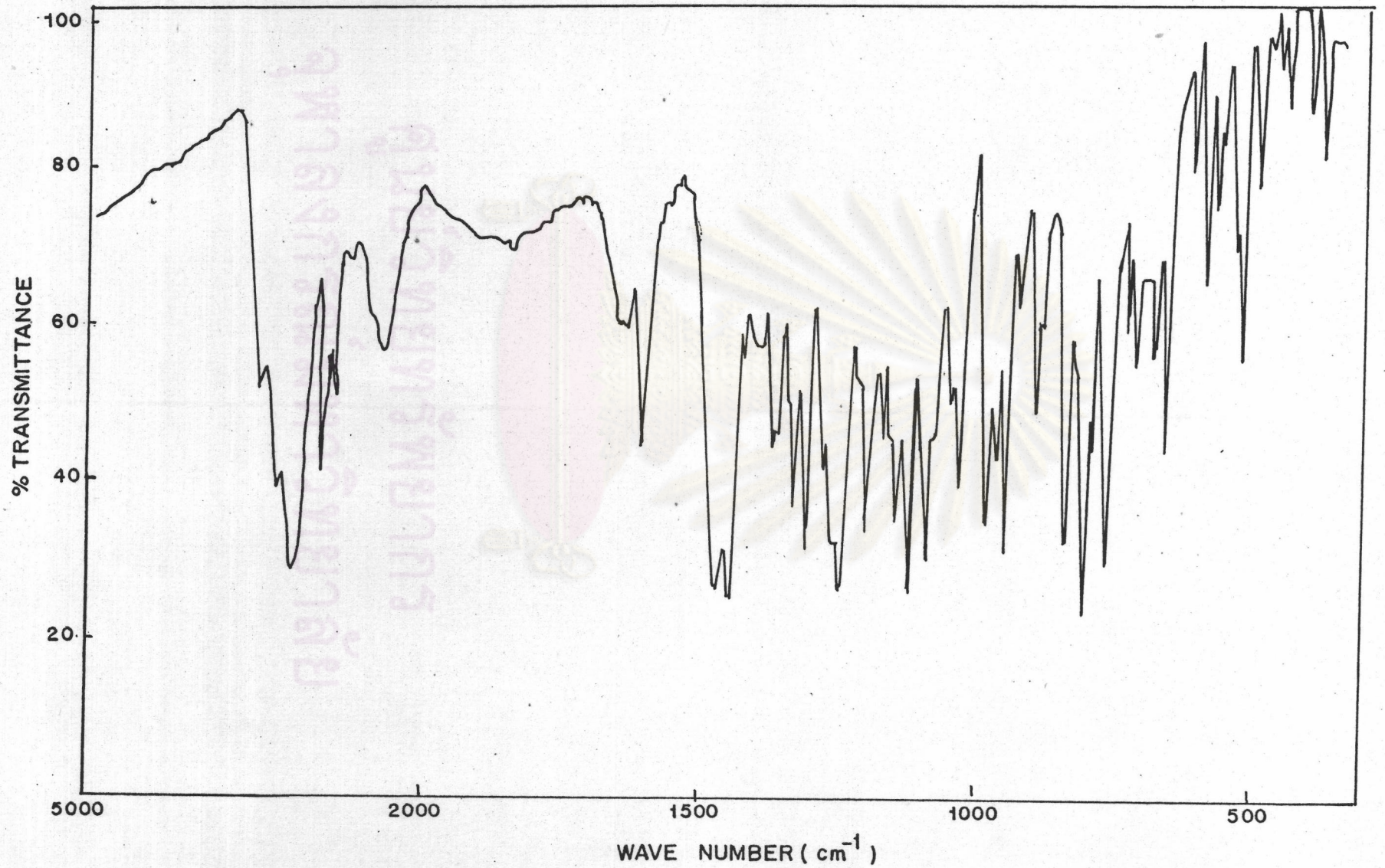
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 10 อุลตราไวโอเลตสเปคตรัมของมอร์ฟีนฟรีเบส และ มอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนต

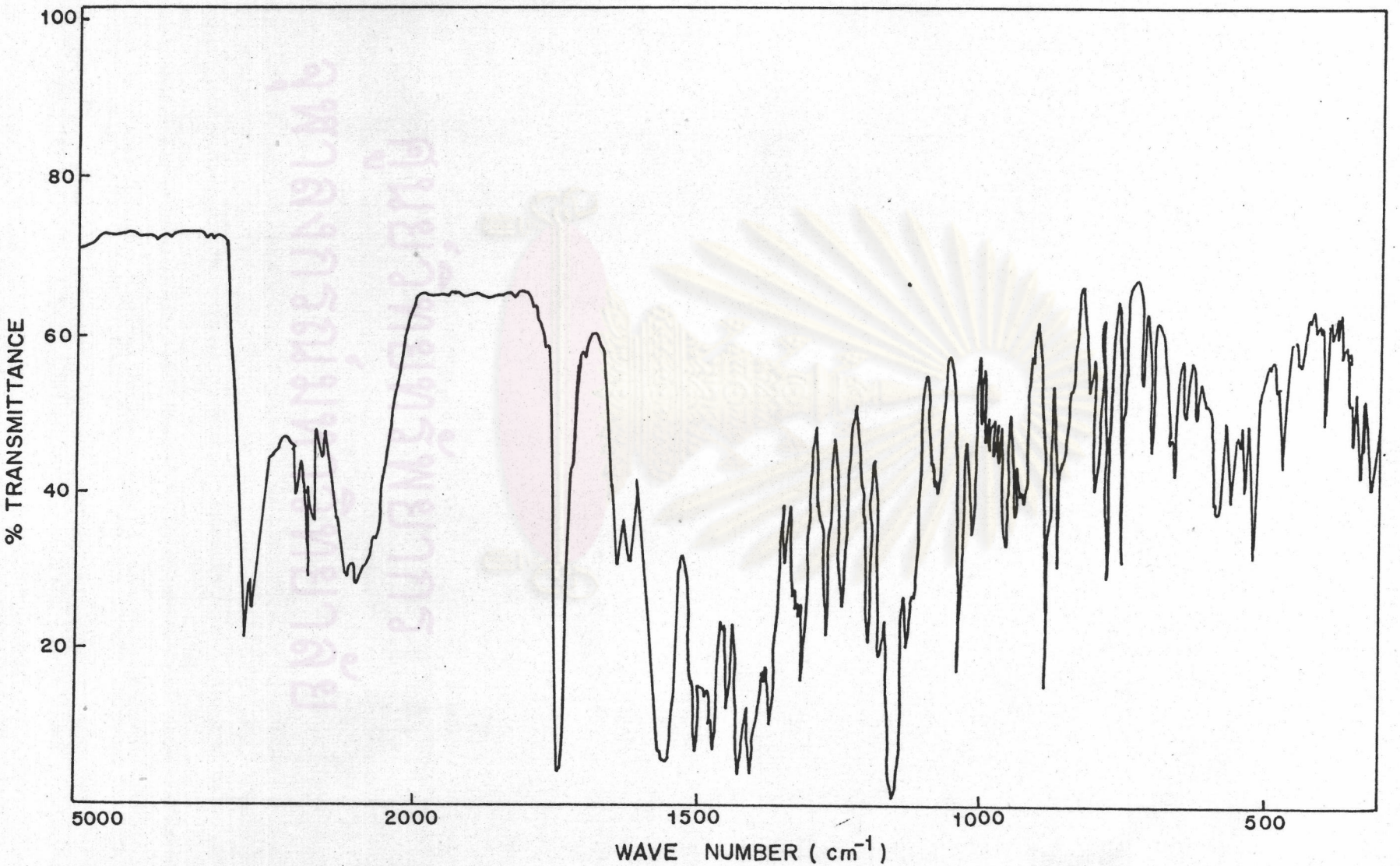


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 11 อินฟราเรดสเปคตรัมของมอร์ฟีนฟรีเบส



รูปที่ 12 อินฟราเรดสเปคตรัมของมอร์ฟีน – 6 – เฮมิซัคซิเนต



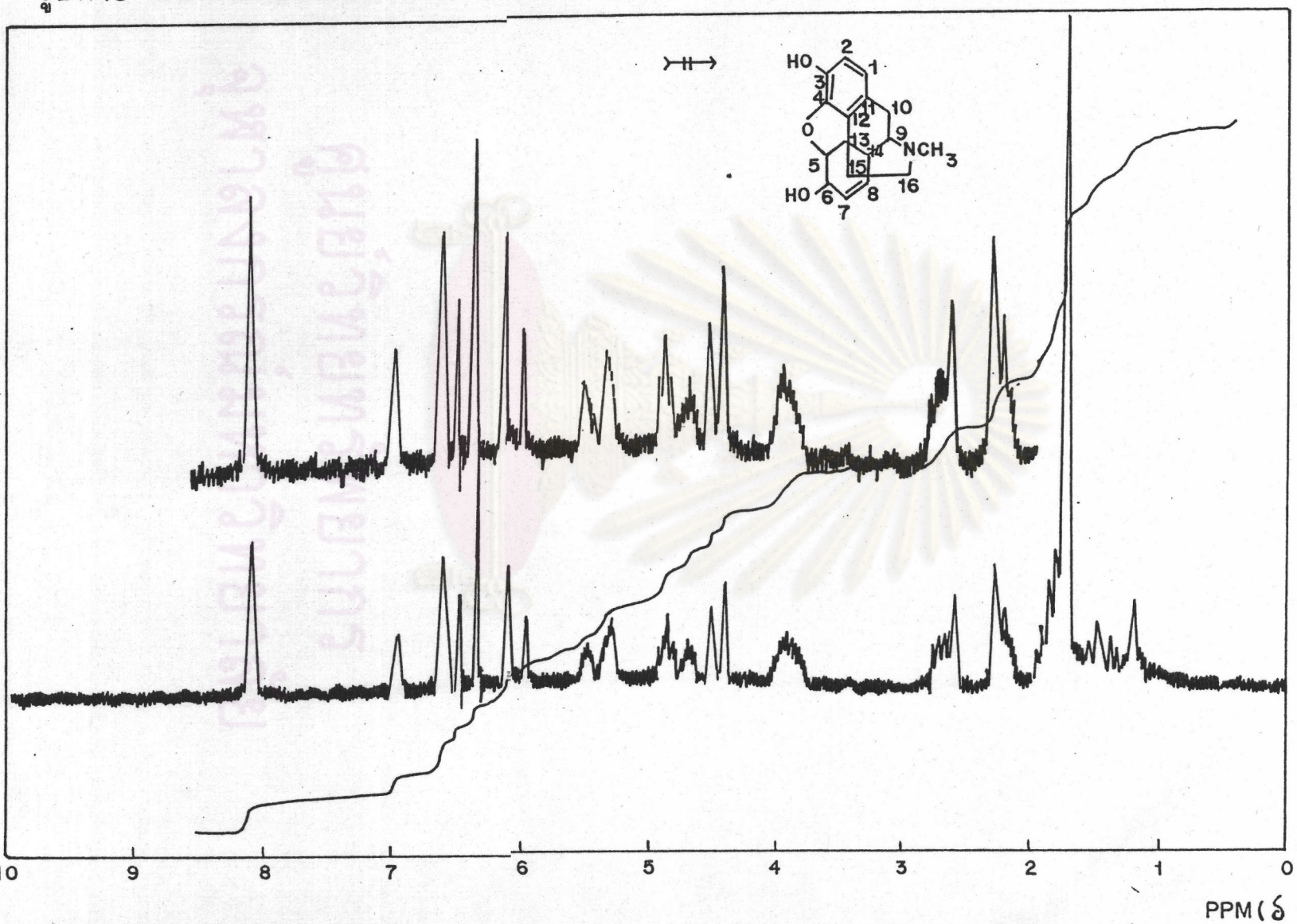
ตารางที่ 4 การเปรียบเทียบคุณสมบัติในการดูดกลืนอินฟราเรดของมอร์ฟีนฟรีเบสและมอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนต

Morphine free base			Morphine-6-hemisuccinate		
Significant frequencies (νmax^{KBr}) cm^{-1}		Inferences	Significant frequencies (νmax^{KBr}) cm^{-1}		Inferences
3180	(broad)	O-H stretching	3485	(broad)	O-H stretching
2920,2840,2800	(strong)	C-H stretching	2920	(weak)	C-H stretching
			1740	(strong)	C=O stretching
1600,1480,1450	(strong)	aromatic ring vibrating and C=C stretching	1560,1500,1430	(strong)	aromatic ring vibrating and C=C stretching
1250	(broad)	C-O stretching	1155	(strong)	C-O stretching
1120,1090	(strong)	C-O stretching	1040	(medium)	C-O stretching

รูปที่ 13 นิวเคลียแมคเนติครีโซแนนซ์สเปคตรัมของมอร์ฟีนฟรีเบส

^{1}H-NMR (Pyridine-D_5) δ (ppm) : 1.1-1.6 (m,3H,H-15,H-14) 1.60-2.00 (br.S,6H,H-9,H-16,>N-CH_3); 2.1-2.3 (m,1H,H-10); 2.50-2.80 (m,1H,H-10); 3.7-4.0 (m,1H,H-6); 4.45 (dd,1H,H-5); 4.66,4.80 (dt,1H,H-8); 5.30,5.45 (dm,1H,H-7); 6.00 (d,1H,J=8HZ,H-1); 6.35 (d,1H,J=8Hz,H-2); 6.56,6.90 และ 8.05 (Pyridine-D_5)

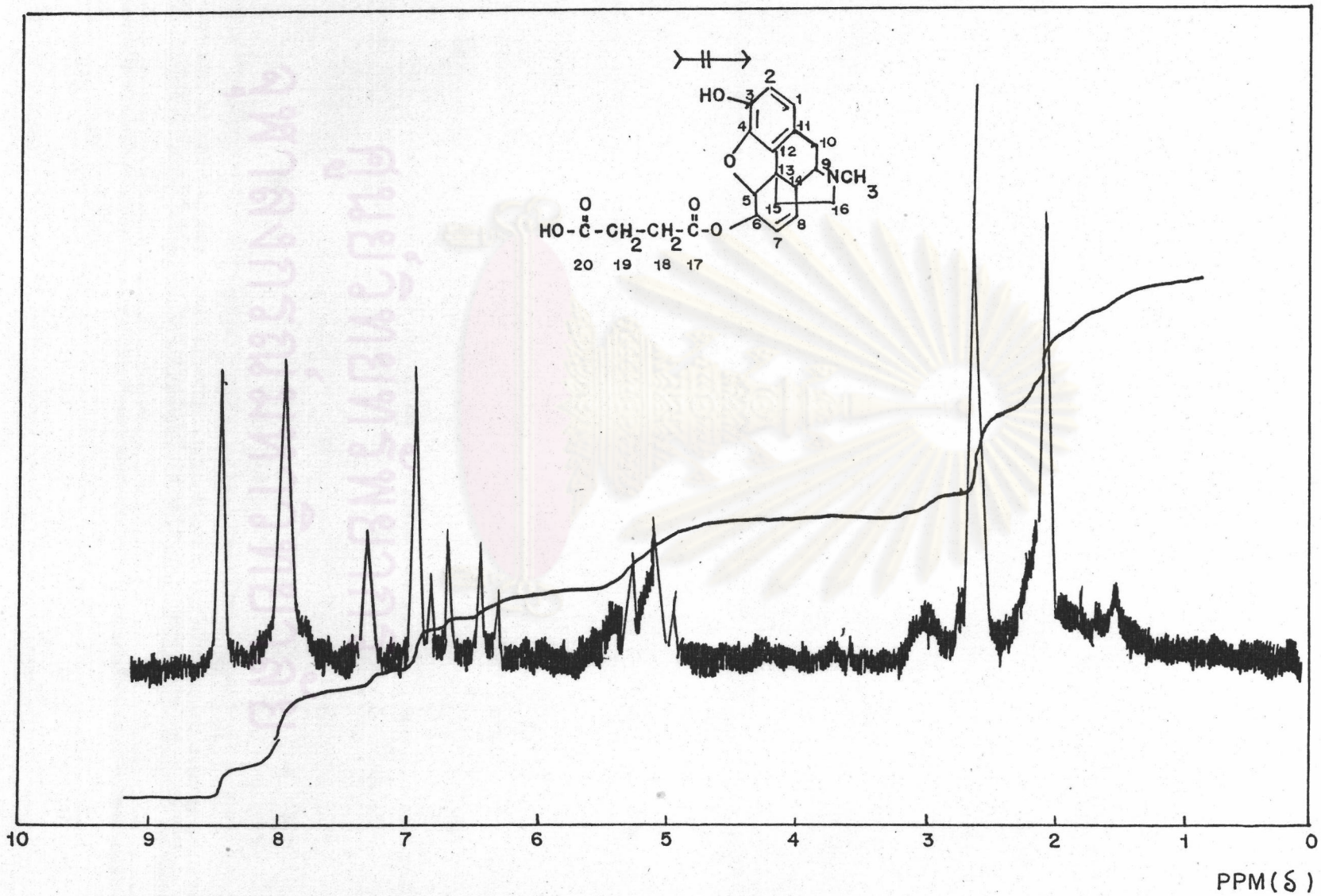
รูปที่ 13 นิวเคลียแมคเนติครีโซแนนซ์สเปคตรัมของมอร์ฟีนฟรีเบส



รูปที่ 14 นิวเคลียแมคเนติครีโซแนนซ์สเปคตรัมของมอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนต

^{1}H-NMR (Pyridine-D_5); δ (ppm) : 1.35-1.95 (m,3H,H-15,H-14) 2.00-2.30 (br.S,6H,H-9,H-16,$\rangle$N-CH_3); 2.50 (br.S,5H,H-10,H-18,H-19); 2.80-3.15 (m,1H,H-10); 4.80-5.60 (m,4H,H-8,H-7,H-6,H-5); 6.35 (d,1H,J=8Hz,H-1); 6.75 (d,1H,J=8Hz,H-2); 6.95,7.30,8.40 (Pyridine-D_5); 7.95 (br.S,H_2O)

รูปที่ 14 นีวเคลียแมคเนติครีโซแนนซ์สเปคตรัมของมอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนต



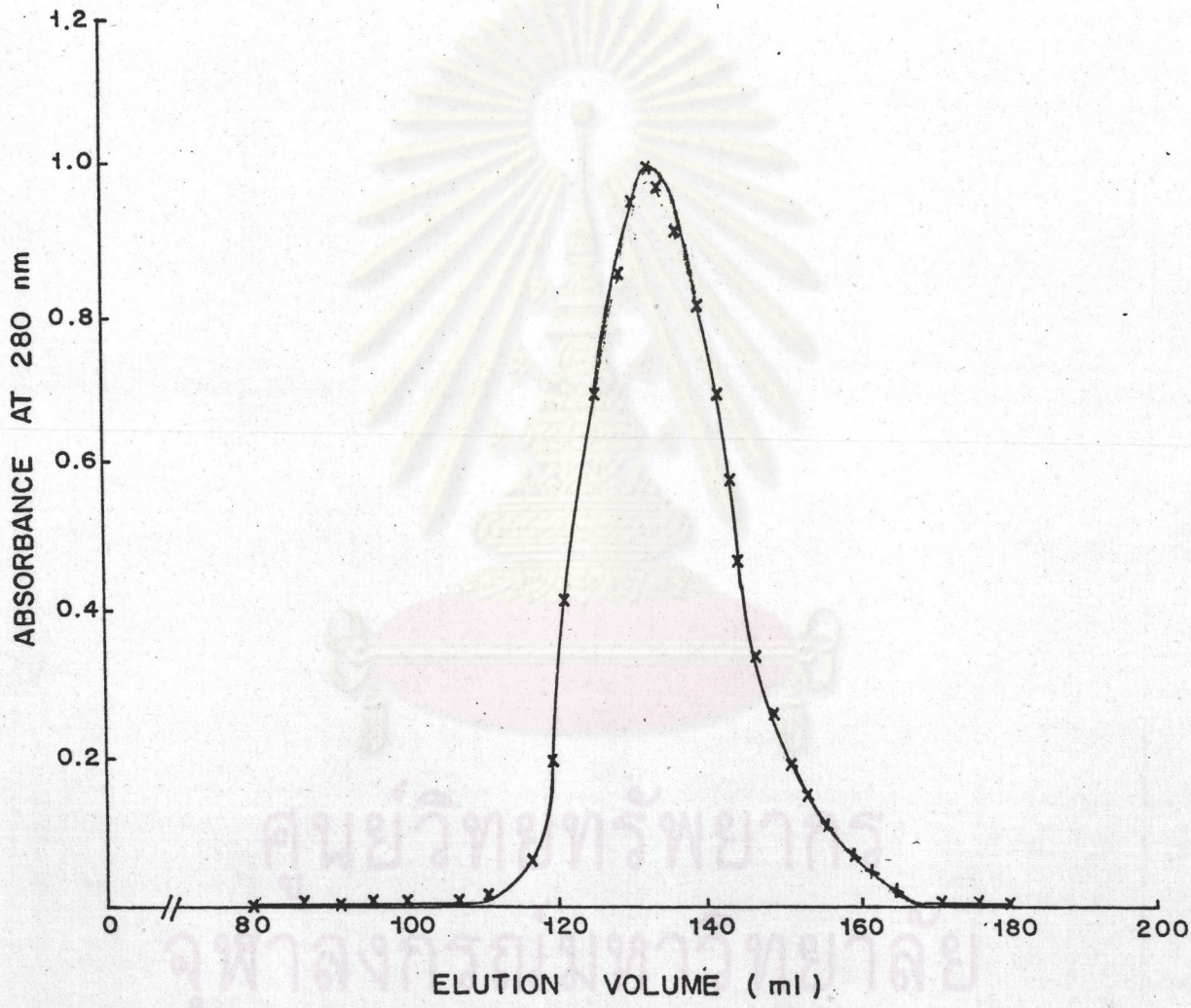
4.3 ผลการทำมอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกตให้บริสุทธิ์โดยการใช้คอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-50

จากการผ่านมอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกตที่เตรียมได้ลงในคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-50 (ตามรายละเอียดในข้อ 3.1.6 หน้า 30) ปรากฏว่าให้พีค (peak) ของการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 280 นาโนเมตรเพียงพีคเดียว ซึ่งอยู่ระหว่างหลอดที่ 120 ถึง 155 ดังแสดงในรูปที่ 15 หน้า 47

4.4 ผลการเตรียมมอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกต

ในการเตรียมมอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกตด้วยวิธีมิกซ์แอนไฮไดรด์ (ดังรายละเอียดในข้อ 3.1.4.2 หน้า 28) ได้ทดลองเปลี่ยนอัตราส่วนจำนวนโมลของไลโซไซม์ : มอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนต : ไอโซบิวทิลคลอโรฟอร์เมทต่าง ๆ กัน 4 อัตราส่วน โดยเตรียมที่ pH 8.5 หรือ pH 9.5 ดังแสดงในตารางที่ 5 หน้า 48 แล้วนำคอนจูเกตที่เตรียมได้ไปหาแอคติวิตีของไลโซไซม์ต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที (specific activity) และเปรียบเทียบแอคติวิตีของไลโซไซม์เมื่อมีและไม่มีแอนติบอดีต่อมอร์ฟีน โดยกำหนดว่าเมื่อไม่มีแอนติบอดีต่อมอร์ฟีนให้ถือว่ามีแอคติวิตีเป็น 100% แล้วคิดเป็นร้อยละของแอคติวิตีที่ลดลง (% inhibition) เมื่อมีแอนติ-บอดีต่อมอร์ฟีน ทั้งนี้โดยใช้ความเข้มข้นของมอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกต 9 ไมโครกรัมโปรตีน/หลอดทดลอง ปรากฏว่าเมื่อใช้อัตราส่วนจำนวนโมลของไลโซไซม์ : มอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนต : ไอโซบิวทิลคลอโรฟอร์เมท เท่ากับ 1:8:16 โดยทำปฏิกิริยาที่ pH 8.5 จะให้ร้อยละของแอคติวิตีที่ลดลงเป็น 41.34 เมื่อเพิ่มมอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนต โดยใช้อัตราส่วนจำนวนโมลของไลโซไซม์ : มอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนต : ไอโซบิวทิลคลอโรฟอร์เมท เท่ากับ 1:16:16 ทำปฏิกิริยาที่ pH 8.5 พบว่าให้ร้อยละของแอคติวิตีที่ลดลงเป็น 49.35 แต่เมื่อเปลี่ยน pH ของปฏิกิริยาเป็น 9.5 โดยใช้อัตราส่วนของสารตั้งต้นเท่าเดิมคือ 1:16:16 ปรากฏว่าให้ร้อยละของแอคติวิตีที่ลดลงเป็น 35.73 และเมื่อเพิ่มไอโซบิวทิลคลอโรฟอร์เมทโดยใช้อัตราส่วนจำนวนโมลของไลโซไซม์ : มอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนต : ไอโซบิวทิลคลอโรฟอร์เมท เท่ากับ 1:8:20 ทำปฏิกิริยาที่ pH 8.5 พบว่าให้ร้อยละของแอคติวิตีที่ลดลงเป็น 50.39 ดังนั้นจึงใช้มอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกตที่ให้ร้อยละของแอคติวิตีที่ลดลงเป็น 50.39 ไปใช้ในเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์

รูปที่ 15 มอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกตที่ถูกชะออกจากคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี- 50



ตารางที่ 5 ผลการเตรียมมอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกต

Reagent molar ratio (L:M6HS:isobutylchloroformate)	pH	Specific activity (ΔOD_{436}/min/mg protein)	% Inhibition
1 : 8 : 16	8.5	23,105	41.34
1 : 8 : 20	8.5	20,881	50.39
1 : 16 : 16	8.5	21,388	49.35
1 : 16 : 16	9.5	22,388	35.73

L = ไลโซไซม์

M6HS = มอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนต

4.5 ผลการเปรียบเทียบแอคติวิตีของไลโซไซม์ที่อยู่ในรูปของมอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกต เมื่อมีและไม่มีแอนติบอดีต่อมอร์ฟีน

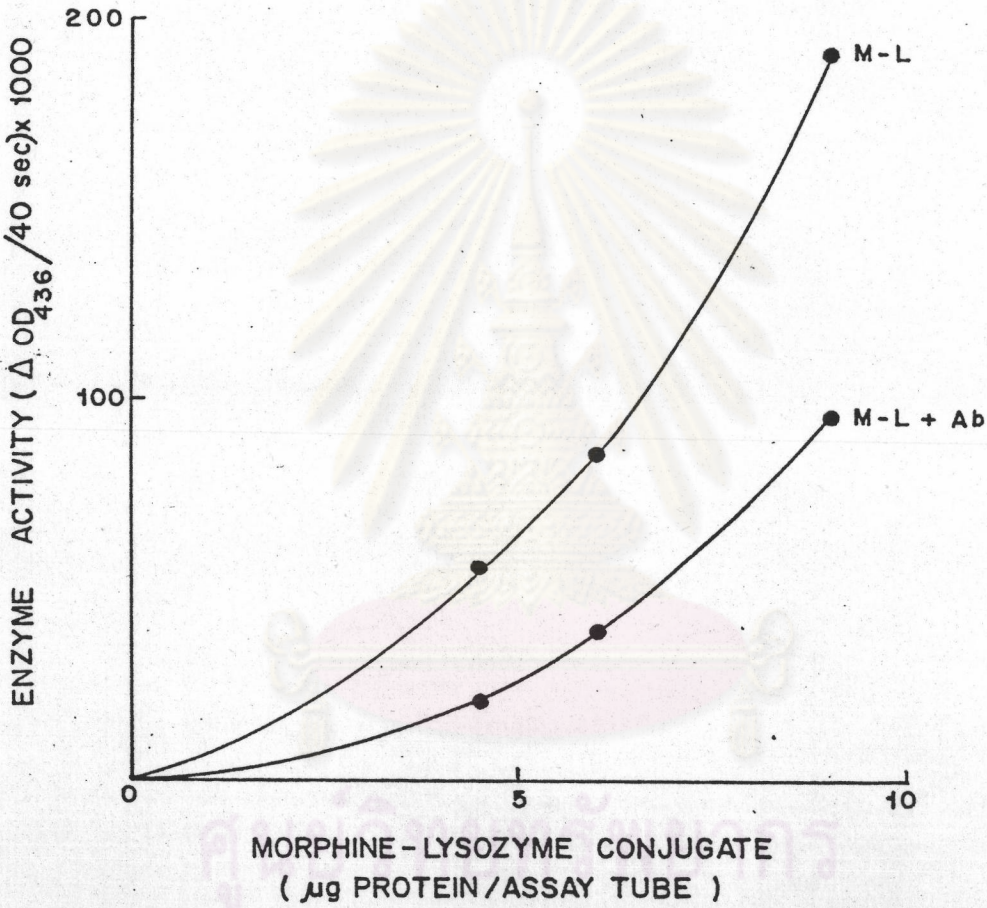
ถ้ามอร์ฟีนคอนจูเกตติดอยู่บนโมเลกุลของไลโซไซม์ในตำแหน่งที่ถูกต้อง แอคติวิตีของไลโซไซม์จะถูกยับยั้งได้เมื่อเติมแอนติบอดีต่อมอร์ฟีนลงไป ซึ่งเป็นคุณสมบัติของมอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกตที่จำเป็นสำหรับวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์

เมื่อนำมอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกตที่เตรียมได้ไปวัดแอคติวิตีของไลโซไซม์ ในขณะที่มีและไม่มีแอนติบอดีต่อมอร์ฟีน ปรากฏว่าเมื่อมีแอนติบอดีต่อมอร์ฟีนแอคติวิตีของไลโซไซม์ลดลงดังแสดงในรูปที่ 16 หน้า 50 ซึ่งถ้าใช้มอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกต 9 ไมโครกรัม/หลอดทดลอง ซึ่งเป็นปริมาณที่จะนำไปใช้ในเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์ แอคติวิตีของไลโซไซม์เมื่อมีแอนติบอดีต่อมอร์ฟีนจะถูกยับยั้งคิดเป็นร้อยละ 50.39 เมื่อเปรียบเทียบกับมอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกตที่ซื้อจากบริษัท Syva โดยเปรียบเทียบที่แอคติวิตีของไลโซไซม์ (เมื่อไม่มีแอนติบอดี) พอ ๆ กัน ปรากฏว่าเมื่อมีแอนติบอดีต่อมอร์ฟีนแอคติวิตีของไลโซไซม์จะถูกยับยั้งคิดเป็นร้อยละ 69.11 ดังแสดงในรูปที่ 17 หน้า 51

4.6 การเปรียบเทียบกราฟมาตรฐานของมอร์ฟีนที่ได้จากการใช้มอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกตที่เตรียมได้กับที่ซื้อมาจากบริษัท Syva

จากการสร้างกราฟมาตรฐานของมอร์ฟีน (ดังรายละเอียดในตารางที่ 1 หน้า 31) โดยใช้สารละลายมาตรฐานของมอร์ฟีน 15, 45 และ 135 นาโนกรัม/หลอดทดลอง ใช้มอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกตที่เตรียมขึ้นและใช้แอนติบอดีต่อมอร์ฟีนของบริษัท Syva เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของมอร์ฟีน เมื่อใช้มอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกตและแอนติบอดีต่อมอร์ฟีนของบริษัท Syva ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 18 หน้า 52 ปรากฏว่ากราฟมาตรฐานทั้งสองมีความชัน (slope) ใกล้เคียงกัน และความเข้มข้นของสารละลายมอร์ฟีนมาตรฐานมีความสัมพันธ์โดยตรงกับแอคติวิตีของไลโซไซม์ จากกราฟมาตรฐานของมอร์ฟีนพบว่าเมื่อใช้มอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกตที่เตรียมขึ้นที่ความเข้มข้นมอร์ฟีนมากกว่า 45 นาโนกรัม/หลอดทดลอง เส้นกราฟเริ่มโค้งไม่เป็นเส้นตรง ดังนั้นในการทำเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์จึงสร้างกราฟมาตรฐานของมอร์ฟีนในช่วงความเข้มข้นของมอร์ฟีน เท่ากับ 0-45 นาโนกรัม/หลอดทดลอง

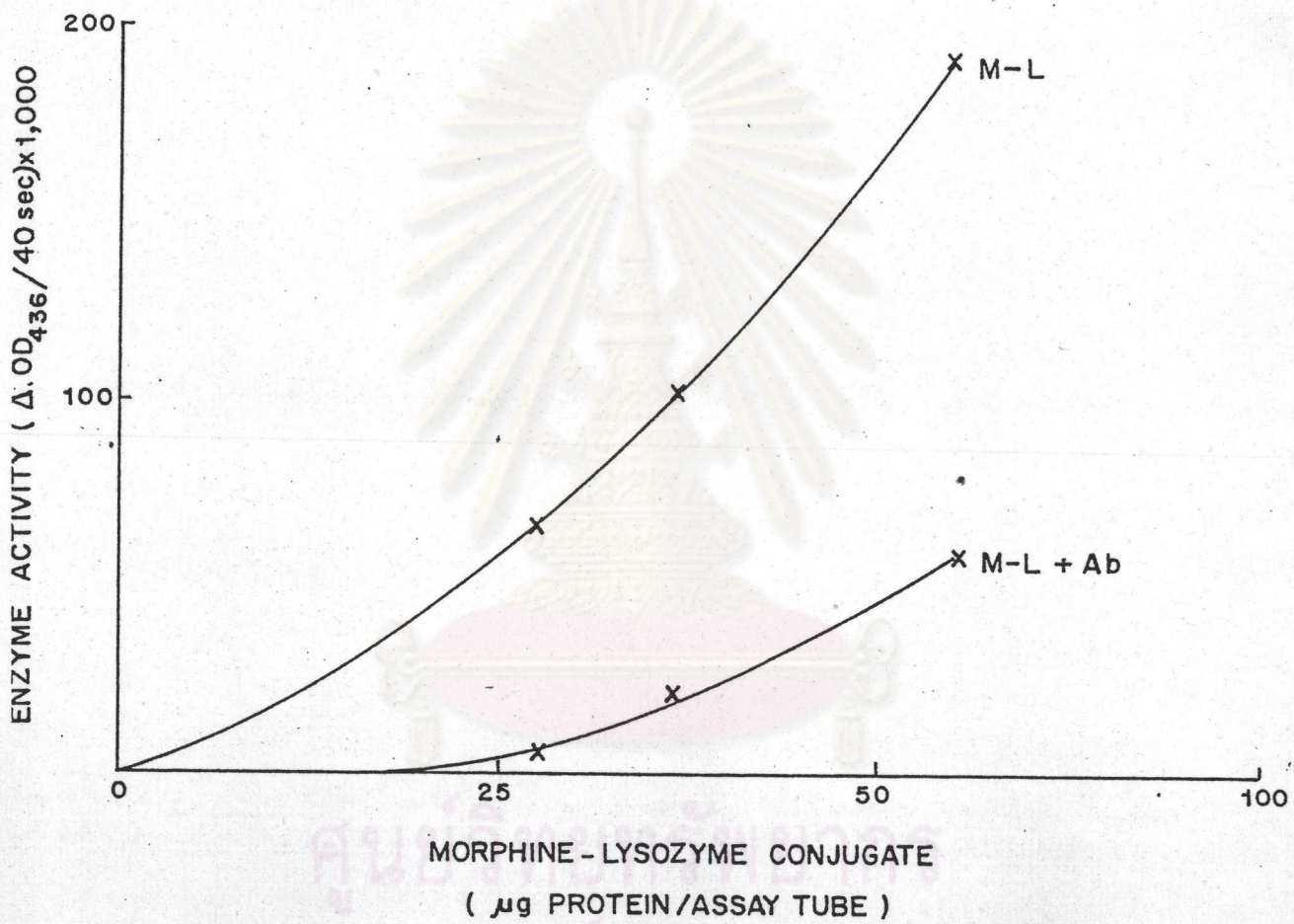
รูปที่ 16 การเปรียบเทียบแอคติวิตีของไลโซไซม์ที่อยู่ในรูปของมอร์ฟีน–ไลโซไซม์คอนจูเกตที่เตรียมขึ้นเมื่อมีและไม่มีแอนติบอดีต่อ มอร์ฟีน



M–L = มอร์ฟีน–ไลโซไซม์คอนจูเกต

M–L + Ab = มอร์ฟีน–ไลโซไซม์คอนจูเกตเมื่อมีแอนติบอดี

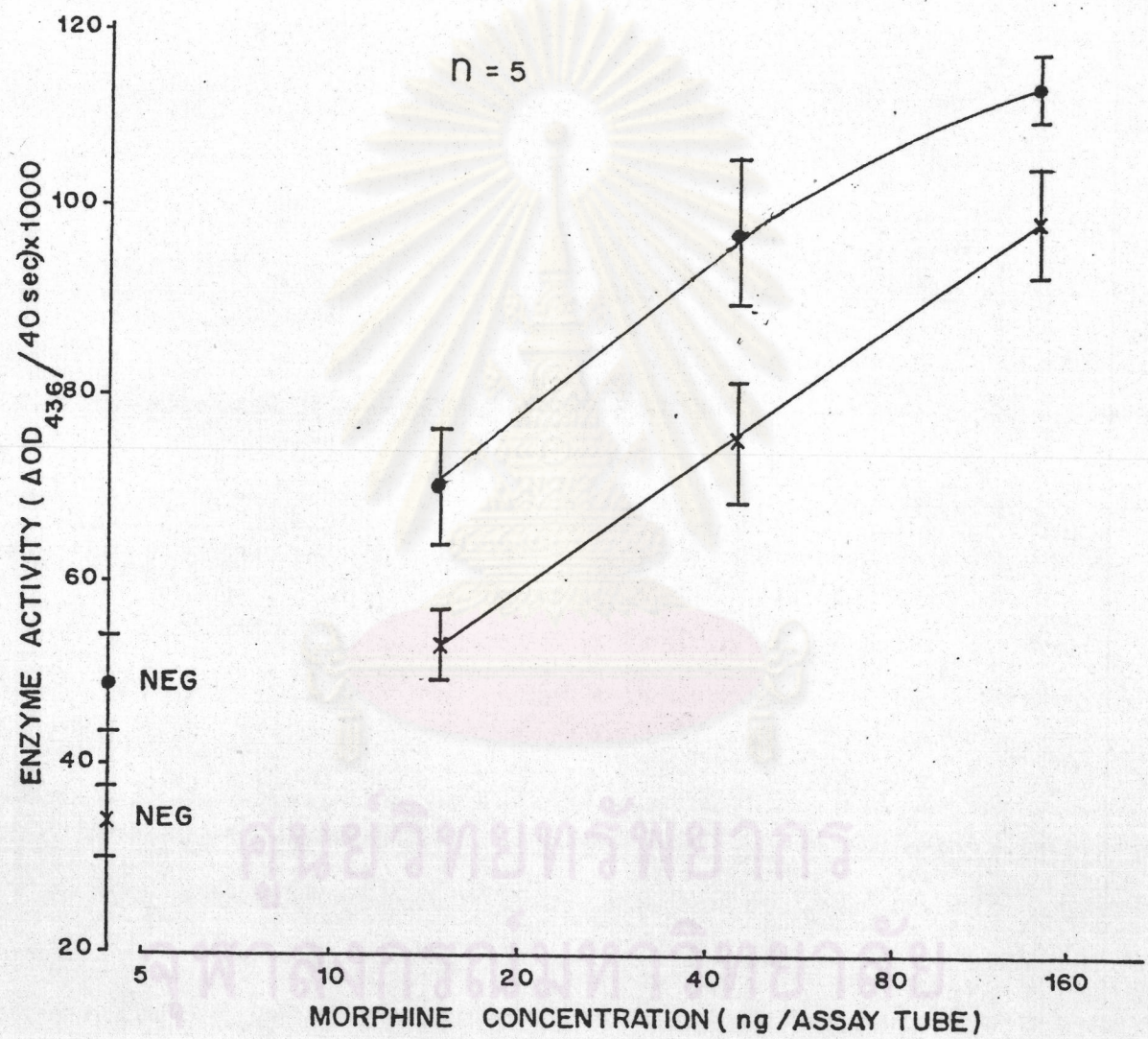
รูปที่17 การเปรียบเทียบแอคติวิตี ของไลโซไซม์ที่อยู่ในรูปของมอร์ฟีน–ไลโซไซม์คอนจูเกตของบริษัท Syva เมื่อมีและไม่มีแอนติบอดีต่อมอร์ฟีน



M-L = มอร์ฟีน–ไลโซไซม์คอนจูเกต

M-L + Ab = มอร์ฟีน–ไลโซไซม์คอนจูเกตเมื่อมีแอนติบอดี

รูปที่ 18 กราฟมาตรฐานของมอร์ฟีนเมื่อใช้มอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกต
ที่เตรียมได้ กับที่ซื้อจาก บริษัท Syva



NEG คือ หลอดที่ไม่มีมอร์ฟีนมาตรฐาน

●——● มอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกตที่เตรียมขึ้น

×——× มอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกตของบริษัท Syva

4.7 การศึกษาความไว ความจำเพาะ ความแม่นยำ และความถูกต้องของการวัดปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนในปัสสาวะด้วยวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์

4.7.1 ความไว

จากการวิเคราะห์ปริมาณมอร์ฟีนมาตรฐานด้วยวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์ในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 135 นาโนกรัมต่อหลอดทดลองตามการทดลองข้อที่ 3.2 หน้า 31 โดยทำการทดลองซ้ำกันความเข้มข้นละ 5 หลอด ได้กราฟมาตรฐาน ดังแสดงในรูปที่ 19 หน้า 55 คำนวณหาความไวของการวัดปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนตามวิธีของ Brattin and Sunshine (1974) ตามรายละเอียดในข้อ 3.4.1 หน้า 32 ได้ความไวเท่ากับ 180 นาโนกรัม/มิลลิลิตรปัสสาวะ

4.7.2 ความจำเพาะของแอนติบอดีต่อมอร์ฟีน

แอนติบอดีต่อมอร์ฟีนที่ใช้เป็นของบริษัท Syva ซึ่งทางบริษัทได้ศึกษาความจำเพาะของแอนติบอดีต่อมอร์ฟีนไว้ดังแสดงในตารางที่ 6 หน้า 56 จะเห็นได้ว่าแอนติบอดีต่อมอร์ฟีนมีความจำเพาะพอสมควร มีปฏิกิริยาข้ามชนิดสูงสุดกับนาเลอร์ฟีน (nalorphine) รองลงมาคือ มอร์ฟีนกลูคิวโรไนด์ (morphine glucuronide) โคเดอีน (codeine) ไฮโดรมอร์โฟน (hydromorphone) มีเพอริดีน (Meperidine) ออกซิโคโดน (Oxycodone) นาลอกโซน (naloxone) เดซโตรเมทอร์แฟน (dextromethorphan) คลอโปรมาซีน (chloropromazine) ตามลำดับ แต่มีปฏิกิริยาข้ามชนิดกับเมทาโดน (methadone) น้อยมาก

4.7.3 ความแม่นยำ

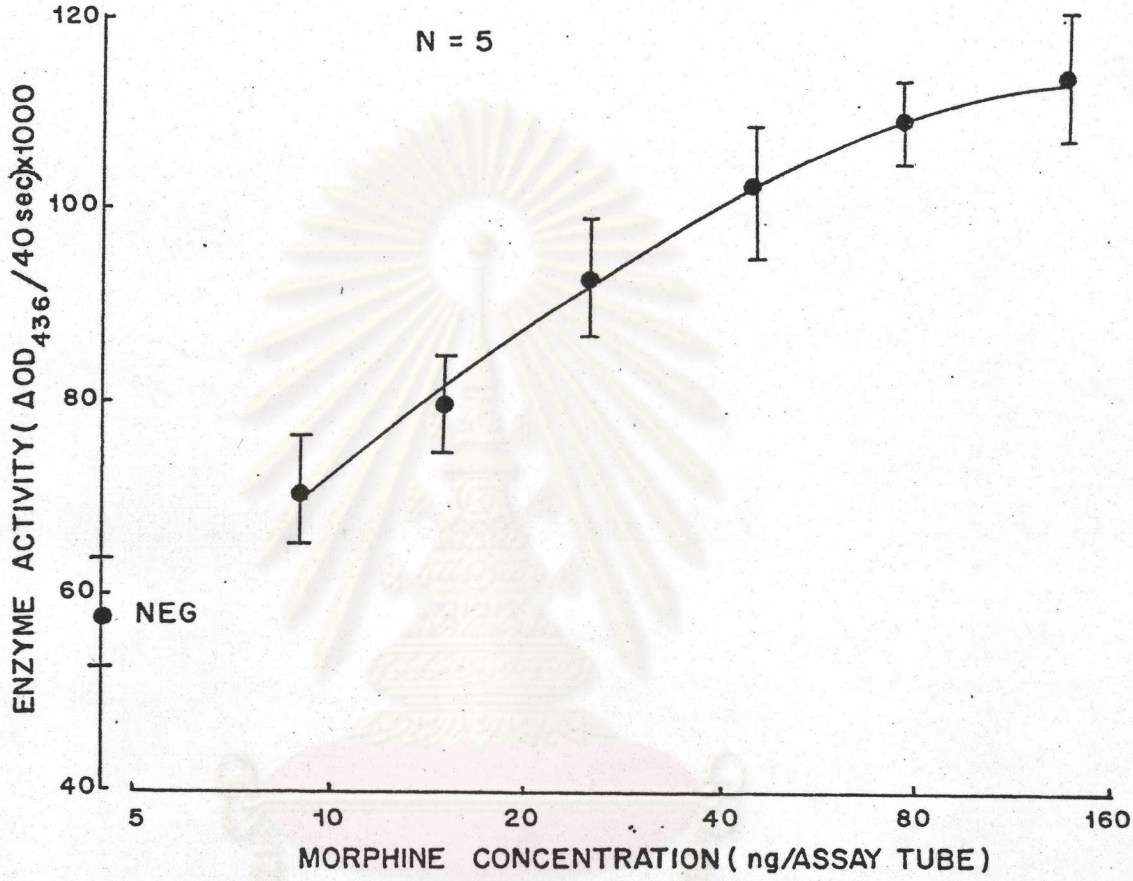
ความแม่นยำของวิธีวัดแสดงถึงความสามารถในการวัดปริมาณของสารในตัวอย่างเดียวกันในการทดลองแต่ละครั้งว่าได้ค่าใกล้เคียงกับค่าเฉลี่ยมากน้อยเพียงใด (Midgley 1969) ซึ่งความแม่นยำของวิธีวัดได้จากการคำนวณหาค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน ดังแสดงในตารางที่ 7 หน้า 57 ความแม่นยำในการทดลองเดียวกัน มีค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนเป็น 7.42 และ 11.25 ที่ความเข้มข้นของอนุพันธ์มอร์ฟีน 238 และ 792.8 นาโนกรัม/มิลลิลิตรปัสสาวะตามลำดับ ส่วนความแม่นยำในระหว่างการทดลอง มีค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนเป็น 9.09 และ 12.44 ที่ความเข้มข้นของอนุพันธ์มอร์ฟีน 239 และ 706 นาโนกรัม/มิลลิลิตรปัสสาวะตามลำดับ ดังแสดงในตารางเดียวกันนี้

4.7.4 ความถูกต้อง

ความถูกต้องของวิธีวัด แสดงถึงการวัดปริมาณของสารในตัวอย่างว่าได้ค่าใกล้เคียงกับที่มีอยู่จริงเพียงใด (Midgley, 1969) ซึ่งความถูกต้องของวิธีวัดได้แสดงด้วย % รีคอบเวอรี่ (% recovery) ดังในตารางที่ 8 หน้า 58 ได้ค่า % รีคอบเวอรี่ระหว่าง 82.09 ถึง 95.97 จะเห็นว่าปริมาณมอร์ฟีนที่เติมลงไปกับที่วัดได้มีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด โดยมีความสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient) เท่ากับ 0.97

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่19 กราฟมาตรฐานของมอร์ฟีนโดยวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์



NEG คือหลอดที่ไม่มีมอร์ฟีนมาตรฐาน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 ความจำเพาะของแอนติบอดีต่อมอร์ฟีนของบริษัท Syva

Drug	Concentration in urine giving a reading equivalent to 0.5 µg/ml morphine*
Nalorphine	≥ 2.0 µg/ml
Morphine Glucuronide	≤ 3.0 µg/ml
Codeine	≤ 3.0 µg/ml
Hydromorphone	≤ 5.0 µg/ml
Meperidine	≥ 35 µg/ml
Oxycodone	≤ 50 µg/ml
Naloxone	≥ 155 µg/ml
Dextromethorphan	≥ 175 µg/ml
Chlorpromazine	≥ 200 µg/ml
Methadone	≥ 1000 µg/ml

* เป็นรายงานของบริษัท Syva

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 ความแม่นยำของการวัดปริมาณมอร์ฟีนในปัสสาวะด้วยวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์

Morphine concentration	Within assay precision			Between assay precision		
	Mean±SD (ng morphine/ ml urine)	n	%CV	Mean±SD (ng morphine/ ml urine)	n	%CV
Low	238±0.88	10	7.42	239±1.08	6	9.09
High	792.8±4.46	10	11.25	706±4.39	6	12.44

ตารางที่ 8 ความถูกต้องของการวัดปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนในปัสสาวะโดยวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์

Morphine added (ng/ml urine)	Morphine measured (ng/ml urine)	% Recovery* (n = 5)
0	221	-
100	307	95.70
200	346	82.09
400	596	95.97
500	610	84.60

*มีสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, γ) = 0.97

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.8 <u>เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนในปัสสาวะระหว่างการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์ กับวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์</u>

ศูนย์วิจัยยาเสพติด สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มีการวิเคราะห์ปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนในปัสสาวะของชาวไทยภูเขาที่ใช้และติดฝิ่นโดยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ ซึ่งใช้น้ำยาสำเร็จรูปของบริษัท Roche Diagnostic วิธีนี้มีความไว 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตรปัสสาวะ แอนติบอดีต่อมอร์ฟีนมีปฏิกิริยาข้ามชนิดสูงสุดกับโคเดอีน (codeine) รองลงมาคือ มอร์ฟีน-3-กลูคิวโรไนด์ (morphine-3-glucuronide) และไดไฮโดรมอร์ฟีน (dihydromorphine) ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 9 หน้า 60 วิธีนี้มีความแม่นยำในการทดลองเดียวกัน ดังแสดงในตารางที่ 10 หน้า 61 โดยมีร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนเป็น 9.06, 4.30 และ 7.33 ที่ความเข้มข้นของอนุพันธ์มอร์ฟีนเท่ากับ 26.92, 52.12 และ 106.14 นาโนกรัม/มิลลิลิตรปัสสาวะ ตามลำดับ ส่วนความแม่นยำในระหว่างการทดลองมีร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน เป็น 10.69, 9.39 และ 8.72 ที่ความเข้มข้นของอนุพันธ์มอร์ฟีนเท่ากับ 25.36, 49.50 และ 105.27 นาโนกรัม/มิลลิลิตรปัสสาวะ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางเดียวกันนี้ ส่วนความถูกต้องของวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ได้แสดงด้วย % รีคอบเวอรี่ ไว้ในตางรางที่ 11 หน้า 62 ซึ่งมี % รีคอบเวอรี่ ระหว่าง 98 ถึง 102.5

ในตารางที่ 12 หน้า 63 ได้แสดงเปรียบเทียบคุณสมบัติบางอย่างของวิธีวิเคราะห์อนุพันธ์มอร์ฟีนในปัสสาวะระหว่างวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์กับวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์

ในการวิจัยครั้งนี้ได้วัดปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนในปัสสาวะของชาวไทยภูเขาที่ใช้และติดฝิ่นจำนวน 60 ตัวอย่างโดยวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์ และในตัวอย่างปัสสาวะชุดเดียวกันนี้ทางศูนย์วิจัยยาเสพติด สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้วัดปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนโดยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ด้วย ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 13 หน้า 64

เมื่อนำปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนที่วัดได้โดยทั้งสองวิธีนี้ ในแต่ละตัวอย่างปัสสาวะไปเปรียบเทียบกัน (ดังแสดงในรูปที่ 20 หน้า 65) จะเห็นว่าปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนที่วัดได้โดยวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์กับวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์มีความสัมพันธ์กัน และเมื่อวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.94

ตารางที่ 9 ความจำเพาะของแอนติบอดีต่อมอร์ฟีนของบริษัท Roche Diagnostics

Drug	Concentration of morphine giving equivalent results in the assay as measured from a standard curve (1,000 ng/ml tested compound)*
Dihydromorphine	165
Morphine-3-glucuronide	285
Meperidine HCl	0
Methadone HCl	0
Codeine	> 1000
Benzolecgonine	0
Methaqualone	0
Phencyclidine	0
Amphetamine	0
Secobarbital	0

"0" (non-crossreactive) คือค่าที่อ่านได้คิดเป็นมอร์ฟีนอิควิวาเลนซ์ (morphine equivalents) ได้ $\leq$ 10 ng/ml

*เป็นรายงานของบริษัท Roche Diagnostics

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 ความแม่นยำของการวัดปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนในปัสสาวะโดยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์*

Morphine concentration	Within assay precision			Between assay precision		
	Mean±SD (ng morphine/ ml urine)	n	%CV	Mean±SD (ng morphine/ ml urine)	n	%CV
Low	26.92±2.44	19	9.06	25.36±2.71	28	10.69
Medium	52.12±2.24	28	4.30	49.50±4.65	34	9.39
High	106.14±7.78	27	7.33	105.27±9.18	34	8.72

* เป็นรายงานของศูนย์วิจัยยาเสพติด สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 ความถูกต้องของการวัดปริมาณมอร์ฟีนในปัสสาวะโดยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์*

Morphine added (ng/ml urine)	Morphine measured (ng/ml urine)	n	%Recovery**
0	26.21	8	-
20	45.49	10	98
40	65.69	10	99
60	87.04	8	101
80	108.8	10	102.5

* เป็นรายงานของศูนย์วิจัยยาเสพติด สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

** มีสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, γ) = 0.99

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 12 การเปรียบเทียบคุณสมบัติบางอย่างของวิธีวิเคราะห์อนุพันธ์มอร์ฟีนในปัสสาวะระหว่างวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์กับวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์

Evaluation status	EMIT		RIA*
	Developed	Kit	
Sensitivity (ng/ml urine)	180	400	10
Assay/8 hr day	100-150	100-150	200-250
The amount of time needed to complete the analysis of one sample	1-2 min	1-2 min	2-2½ hr
Cost (per assay tube)	0.50 Baht	32 Baht	5.50 Baht
Sample treatment	not require	not require	not require

EMIT = เอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์

RIA = เรดิโออิมมิวโนแอสเสย์

* = เป็นรายงานของศูนย์วิจัยยาเสพติด สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 13 ปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนในปัสสาวะของชาวไทยภูเขาที่ใช้และติดฝิ่นซึ่งวิเคราะห์โดยวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์และวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์

No of urine samples	EMIT		RIA	
	Mean±SD (ng/ml urine)	Range	Mean±SD (ng/ml urine)	Range
60	82,533±91,033	1,612-320,000	95,895±111,890	1,256-403,750

รูปที่ 20 การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์อนุพันธ์มอร์ฟีนโดยวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์กับ วิธี เรดิโออิมมิวโนแอสเสย์