หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันปัญหายาเสพติดเป็นปัญหาสำคัญปัญหาหนึ่งของประเทศไทยและประเทศอื่น ๆ ทั่วโลก ซึ่งผลจากปัญหาดังกล่าวนี้ก่อให้เกิดความสูญเสียอย่างใหญ่หลวงในด้านเศรษฐกิจ เกิดการสูญเสียทรัพยากรกำลังคน ก่อปัญหาอาชญากรรม ปัญหาวัยรุ่น โสเภณี ซ่องโจร ฯลฯ ทำให้รัฐต้องสูญเสียงบประมาณเพื่อดำเนินการควบคุม ปราบปรามตลอดจนป้องกันและให้การบำบัดรักษาผู้ติดยาเสพติด ซึ่งมีผลไปถึงความมั่นคงของประเทศอันเป็นอุปสรรคสำคัญในการพัฒนาประเทศให้เจริญก้าวหน้า

ความหมายของ "ยาเสพติดให้โทษ" ตามพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ พ.ศ.2522 (คณะทำงานกลุ่มเป้าหมายบิดามารดา, 2524) หมายความว่า "สารเคมีหรือวัตถุชนิดใด ๆ ที่เมื่อเสพเข้าสู่ร่างกายไม่ว่าจะโดยรับประทาน ดม สูบ ฉีดหรือด้วยประการใด ๆ แล้วทำให้เกิดผลต่อร่างกายและจิตใจในลักษณะสำคัญ เช่น ต้องเพิ่มขนาดการเสพขึ้นเรื่อย ๆ มีอาการถอนยาเมื่อขาดยา มีความต้องการเสพทั้งทางร่างกายและจิตใจอย่างรุนแรงอยู่ตลอดเวลา และสุขภาพโดยทั่วไปจะทรุดโทรมลง กับให้รวมตลอดถึงสารเคมีที่ใช้ในการผลิตยาเสพติดให้โทษดังกล่าวด้วย" ยาเสพติดให้โทษที่แพร่หลายอยู่ในขณะนี้มีหลายชนิด ได้แก่ ฝิ่น เฮโรอีน มอร์ฟีน กัญชา แอมเฟตามีน (amphetamine) บาร์บิทูเรท (barbiturates) กระท่อม สารทำละลายชนิดระเหยได้ แอลกอฮอล์ และบุหรี่ เป็นต้น

ปัญหายาเสพติดที่ประสบกับคนไทยมีรูปแบบต่าง ๆ กัน แต่ละกลุ่มประชากรมีชนิดของยาและลักษณะของปัญหาที่แตกต่างกันไป ชาวไทยภูเขาทางภาคเหนือของประเทศไทยปลูกฝิ่นและใช้ฝิ่นเพื่อเป็นยารักษาโรคทั้งทางร่างกายและจิตใจ นอกจากนี้ยังมีทัศนคติที่ผ่อนปรนให้ใช้ฝิ่นเพื่อความสนุกสนานรื่นเริง จึงมีชาวไทยภูเขาใช้และติดฝิ่นกันมาก (จรัส สุวรรณเวลา, 2523) ชาวไทยภูเขาอาจได้รับสารประเภทฝิ่นเข้าร่างกายโดยไม่ตั้งใจ เช่น Suwanwela และคณะ (1977) รายงานว่าพบอนุพันธ์มอร์ฟีนในปัสสาวะของผู้ที่ไม่ได้สูบฝิ่นในฤดูกรีดฝิ่น และจากรายงานของ Danutra และคณะ (1978) พบอนุพันธ์มอร์ฟีนในน้ำล้างมือของชาวไทยภูเขาและในตัวอย่างข้าวสารที่ชาวไทยภูเขาใช้รับประทาน จากผลการศึกษาดังที่กล่าวมาเป็นข้อมูลที่ชี้แนะว่าชาวไทย

ภูเขาอาจได้รับสารประเภทฝิ่นจากสิ่งแวดล้อมหรือการดำเนินชีวิตประจำวัน

จากการศึกษาผลการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากผู้มารับการรักษาที่โรงพยาบาลธัญญารักษ์และผู้ที่ต้องโทษผิดพระราชบัญญัติยาเสพติดในทัณฑสถานกรุงเทพมหานคร ชี้ให้เห็นว่าปัญหายาเสพติดในปัจจุบันมีการระบาดอย่างรวดเร็ว โดยมีการระบาดสู่ประชากรผู้มีอายุน้อย ชาวชนบท และหมู่สตรี ยาเสพติดที่ใช้มีหลายชนิด เช่น เฮโรอีน มอร์ฟีน ฝิ่น กัญชา เป็นต้น (วิชัย โปษยะจินดา และวิชัย อรรถคัมภีร์, 2518; วิชัย โปษยะจินดา และคณะ, 2519) ซึ่งปัญหาที่ทำให้มีการใช้ยาเสพติดมีหลายด้านด้วยกันทั้งทางด้านเศรษฐกิจ การศึกษา และสุขภาพอนามัย นอกจากนี้เยาวชนบางกลุ่มอาจติดยาเสพติดเนื่องจากอยากลอง สภาพแวดล้อมนำไป เช่น เพื่อนแนะนำหรือความกดดันจากครอบครัว เป็นต้น (จรัส สุวรรณเวลา, 2521)

ในฝิ่นมีสารประกอบแอลคาลอยด์ (alkaloids) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของฟีแนนทรีน (phenanthrene derivative) อันได้แก่ มอร์ฟีน (morphine) โคเดอีน (codeine) และทีเบอิน (thebaine) ซึ่งออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลางและเมื่อใช้ติดต่อกันเป็นเวลานานจะเกิดการเสพติด และมีอนุพันธ์ของเบนซิลไอโซควิโนลิน (benzylisoquinoline derivative) อันได้แก่ ปาปาเวอริน (papaverine) และโนสคาพิน (noscapine) ซึ่งออกฤทธิ์ต่อกล้ามเนื้อเรียบและไม่ทำให้เกิดการเสพติด (พัน และ Wittick, 1977; สดใส อัศววิไล และคณะ, 2522)

ประเทศซูมาเรีย (Sumaria) เป็นประเทศแรกที่นำฝิ่นมาใช้เป็นยาเมื่อประมาณ 5,000 ปีมาแล้ว โดยนำมาใช้เป็นยารักษาโรคบิด ต่อมาได้แพร่หลายไปยังประเทศต่าง ๆ จนกระทั่งปี ค.ศ.1806 Frederick Serturner จึงได้ค้นพบวิธีการสกัดเอาแอลคาลอยด์ที่สำคัญออกมาจากฝิ่น และได้นำไปทดลองกับสัตว์ปรากฏว่ามันมีฤทธิ์สามารถบรรเทาความเจ็บปวดและทำให้หลับ จึงให้ชื่อสารนี้ว่ามอร์เฟียม (morphium) ซึ่งต่อมาได้เปลี่ยนชื่อเป็นมอร์ฟีน (morphine) (Ray,1978) หลังจากนั้นก็ได้มีการใช้มอร์ฟีนเป็นยาระงับความเจ็บปวดกันอย่างแพร่หลาย ต่อมาในปี ค.ศ.1874 นักวิจัยชาวอังกฤษชื่อ C.R. Wright ได้ค้นพบวิธีสังเคราะห์เฮโรอีนจากการเติมหมู่อะเซติลเข้าไปในโมเลกุลของมอร์ฟีนได้เป็นไดอะเซติลมอร์ฟีน (Lund และ Harris, 1943) และบริษัท Bayer แห่งเยอรมันได้นำมาผลิตเป็นยาออกสู่ตลาดโลกในปี ค.ศ.1898 โดยให้ชื่อทางการค้าว่าเฮโรอีน และได้ระบุสรรพคุณไว้ว่าแก้หลอดลมอักเสบ ไอเรื้อรัง หืดและวัณโรค ดังนั้นจึงมีการใช้เฮโรอีนกันอย่างแพร่หลาย (Ray, 1978) ต่อมาจึงทราบกันว่าเฮโรอีนเป็นยาเสพติดให้โทษที่ร้ายแรง เฮโรอีนเข้าสู่ประเทศไทยเมื่อปี พ.ศ.2502

และหลังจากนั้นอีก 2 ปีประเทศไทยจึงออกพระราชบัญญัติระบุให้เฮโรอีนและมอร์ฟีนเป็นยาเสพติดให้โทษ (คณะทำงานกลุ่มเป้าหมายปิดล้อมจับกุม, 2524)

มอร์ฟีนเป็นแอลคาลอยด์ที่สำคัญที่สุดของฝิ่น มีฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลางและมีฤทธิ์ต่อระบบทางเดินอาหาร (Way และ Adler, 1961) ฤทธิ์ของมอร์ฟีนต่อระบบประสาทส่วนกลางมีทั้งฤทธิ์กดและกระตุ้น ผลของการกดระบบประสาทส่วนกลางจะทำให้อาการเจ็บปวดต่าง ๆ หมดไป ทำให้ประสาทขาดการรับรู้ ความคิดอ่านช้าลง ทำให้มีความรู้สึกสบายหายกังวล มอร์ฟีนทำให้กล้ามเนื้อคลายตัวจึงทำให้ผู้ใช้ยามีความรู้สึกสบาย นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์กดศูนย์ต่าง ๆ ในระบบประสาทส่วนกลาง เช่น กดศูนย์การไอทำให้ระงับอาการไอ กดศูนย์ควบคุมอุณหภูมิในร่างกายทำให้อุณหภูมิในร่างกายลดลง และที่สำคัญที่สุดคือฤทธิ์ในการกดศูนย์ควบคุมการหายใจทำให้อัตราการหายใจลดลง ถ้าลดลงมากจะทำให้เกิดอันตรายถึงชีวิตได้ ผลของการกระตุ้นระบบประสาทส่วนกลางจะทำให้มีอาการคลื่นไส้ อาเจียร ม่านตาหรี่ ส่วนฤทธิ์ของมอร์ฟีนต่อระบบทางเดินอาหารทำให้กระเพาะอาหารและลำไส้ทำงานน้อยลง หูรูดต่าง ๆ หดตัวเล็กลงจึงทำให้เกิดอาการท้องผูก และการถ่ายบัสสาวะลำบาก เฮโรอีนมีการออกฤทธิ์ในร่างกายเช่นเดียวกับมอร์ฟีน หลังจากที่เฮโรอีนเข้าไปในร่างกายแล้วจะถูกเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วกลายเป็นโมโนอะเซติลมอร์ฟีน และในที่สุดจะได้มอร์ฟีน (Way และ Adler, 1962; สดใส อัศววิไลและคณะ, 2522)

มอร์ฟีนมีกลไกในการระงับความเจ็บปวดเหมือนกับเอนเคฟฟาลิน (enkephalin) ซึ่งเป็นสารสื่อประสาท (neurotransmitter) ตัวหนึ่ง (Nathanson และ Greengard, 1977) ปกติเมื่อเซลล์ประสาทรับสัมผัสหรือสัญญาณจากภายนอก เซลล์ประสาทจะแปลงสัญญาณต่าง ๆ ให้กลายเป็นศักย์ไฟฟ้าที่เยื่อหุ้มเซลล์ เรียกว่า ศักย์กำเนิด (generator potential) ศักย์นี้จะเร้าให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่บริเวณอื่น ๆ ของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้สัญญาณแพร่กระจายออกไปได้ กล่าวคือศักย์กำเนิดจะก่อให้เกิดการกลับขั้วไฟฟ้า (depolarization) เกิดเป็นศักย์กิริยา (action potential) ที่เยื่อหุ้มเซลล์ชั่วคราวและยังสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทำนองเดียวกันในบริเวณถัดไปเกิดสัญญาณวิ่งจากส่วนหนึ่งของเซลล์ไปยังบริเวณอื่นของเซลล์อย่างรวดเร็ว เมื่อสัญญาณวิ่งมาถึงบริเวณซิแนพส์ (synapse) นิวรอนจะส่งสัญญาณข้ามไปอีกเซลล์หนึ่งผ่านทางซิแนพส์ได้ โดยสัญญาณความต่างศักย์ไฟฟ้าจะทำให้ที่ปลายประสาท (nerve terminal) ของเซลล์แรกปล่อยสารสื่อประสาท (neurotransmitter) เช่น อะซิติลโคลีน (acetylcholine) ออกมา เมื่อสารสื่อประสาทผ่านไปยังเยื่อหุ้มเซลล์ถัดไป จะก่อให้เกิดสัญญาณทางประสาทของเซลล์นั้นต่อไป Snyder (1977) ได้เสนอกลไกการทำงานของมอร์ฟีนและ

เอนเคฟฟาลินในการลดความเจ็บปวด ดังแสดงในรูปที่ 1 หน้า 6 โดยอธิบายว่าเมื่อร่างกายได้รับความเจ็บปวด (pain) หรือตื่นเต้นกระวนกระวาย (excitation) จะมีการหลั่งเอน-เคฟฟาลินออกจากเอนเคฟฟาลินนิวรอน (enkephalin neuron) จำนวนมากกว่าปกติ เอนเคฟฟาลินจะไปจับกับรีเซพเตอร์ของผื่นซึ่งอยู่บริเวณปลายประสาทของเอกไซเททอรีนิวรอน (excitatory neuron) ใกล้ ๆ บริเวณซิแนพส์ การจับของเอนเคฟฟาลินกับรีเซพเตอร์ของผื่นนี้จะทำให้เกิดการกลับขั้วไฟฟ้าที่เยื่อหุ้มเซลล์ประสาทบริเวณนั้นชั่วคราว และมีผลทำให้การกลับขั้วไฟฟ้าสุทธิเนื่องจากสัญญาณกระตุ้นลดลง เป็นเหตุให้การหลั่งสารสื่อประสาทที่บริเวณซิแนพส์ลดลงด้วย การนำสัญญาณเข้าสู่รีซีฟวิงนิวรอน (receiving neuron) จึงลดน้อยลงทำให้ระงับความเจ็บปวดได้ ถ้าฉีดมอร์ฟีนเข้าไป มอร์ฟีนจะจับกับรีเซพเตอร์ของผื่นที่เหลือและยังว่างอยู่ ทำให้การระงับปวดได้ผลมากกว่าเดิม

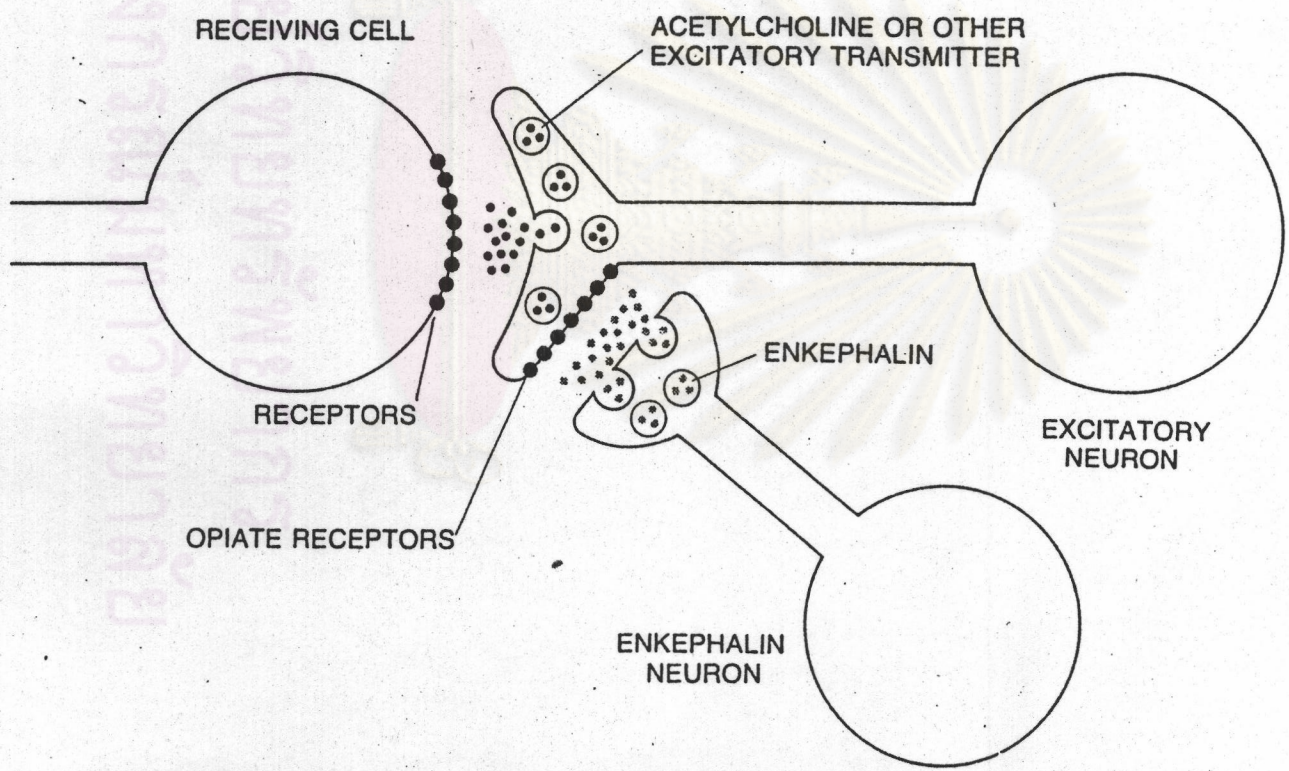
Sharma และคณะ (1975) ได้เสนอกลไกของการดื้อยาและการเกิดอาการถอนยา (withdrawal syndrome) ว่าเกี่ยวข้องกับระดับของไซคลิคเอเอ็มพี (cyclic AMP) ดังแสดงในรูปที่ 2 หน้า 7 คือ มอร์ฟีนจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอดีนีเลตไซเคลส (adenylate cyclase) ที่เยื่อเซลล์ประสาท ทำให้ระดับของไซคลิคเอเอ็มพีในเซลล์ลดลง เมื่อให้มอร์ฟีนเป็นระยะเวลาหนึ่ง เซลล์จะปรับตัวให้สร้างเอนไซม์แอดีนีเลตไซเคลสในปริมาณที่มากขึ้น เพื่อให้เซลล์มีการสร้างไซคลิคเอเอ็มพีเพิ่มขึ้นเป็นปกติ ทำให้ผลการออกฤทธิ์ของมอร์ฟีนลดน้อยลง ในภาวะการดื้อยาจึงต้องเพิ่มมอร์ฟีนมากขึ้นเพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอดีนีเลตไซเคลสที่เพิ่มมากขึ้น เมื่อหยุดให้มอร์ฟีนอย่างกระทันหันผลการยับยั้งเอนไซม์แอดีนีเลตไซเคลสของมอร์ฟีนจะหมดไป ทำให้มีปริมาณไซคลิคเอเอ็มพีสะสมในเซลล์มากเกินความต้องการ ซึ่งมีผลทำให้เกิดอาการถอนยาขึ้นคือมีอาการเริ่มจากมีน้ำหมูกน้ำตาไหล เหงื่อออก อาเจียร ปวดท้อง ท้องร่วง กล้ามเนื้อกระตุก ความดันเลือดและอัตราการเต้นของหัวใจลดลง และอาจรุนแรงจนถึงเกิดอาการชัก

อนึ่ง Snyder, 1977 ได้ตั้งสมมุติฐานเพิ่มเติมว่าอัตราการหลั่งเอนเคฟฟาลินอาจมีส่วนเกี่ยวเนื่องกับอาการการดื้อยาหรือการเสพติดมอร์ฟีนด้วย โดยเขาอธิบายว่าในภาวะปกติ รีเซพเตอร์ของผื่นจะมีเอนเคฟฟาลินมาจับอยู่บ้างเล็กน้อย มอร์ฟีนที่ฉีดเข้าไปในร่างกายจะไปจับกับรีเซพเตอร์ของผื่นที่เหลือจากการจับกับเอนเคฟฟาลิน การที่รีเซพเตอร์ของผื่นมีสารมาจับมากเกินไปจะทำให้เกิดกลไกแบบย้อนกลับบางประการต่อเอนเคฟฟาลินนิวรอน (enkephalin neuron) ทำให้นิวรอนนั้นไม่หลั่งเอนเคฟฟาลินอีกต่อไป ดังนั้นรีเซพเตอร์ของผื่นบนเอกไซเททอรีนิวรอน (excitatory

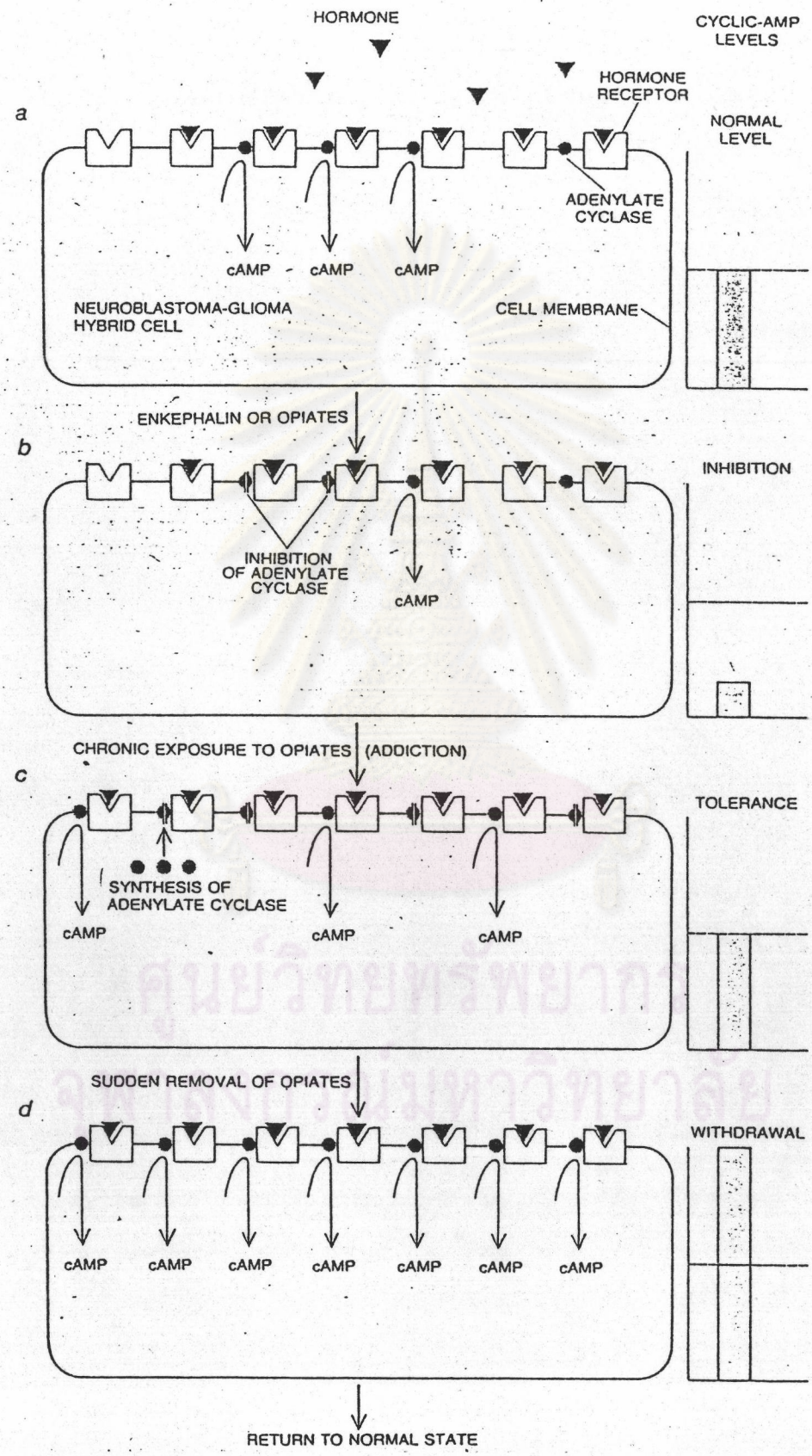
neuron) จึงมีโอกาสจับกับมอร์ฟีนมากขึ้นกว่าเดิม แต่หากหยุดการใช้มอร์ฟีนอย่างทันทีทันใด รีเซพเตอร์ของผื่นจะไม่มีทั้งเอนเคฟฟาลินหรือมอร์ฟีนไปจับ จึงทำให้เกิดอาการถอนยาขึ้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 1 กลไกการทำงานของเอนเคฟฟาลินและฝิ่น (Snyder, 1977)



รูปที่ 2 แบบจำลองของกลไกการดื้อยา (Snyder, 1977)

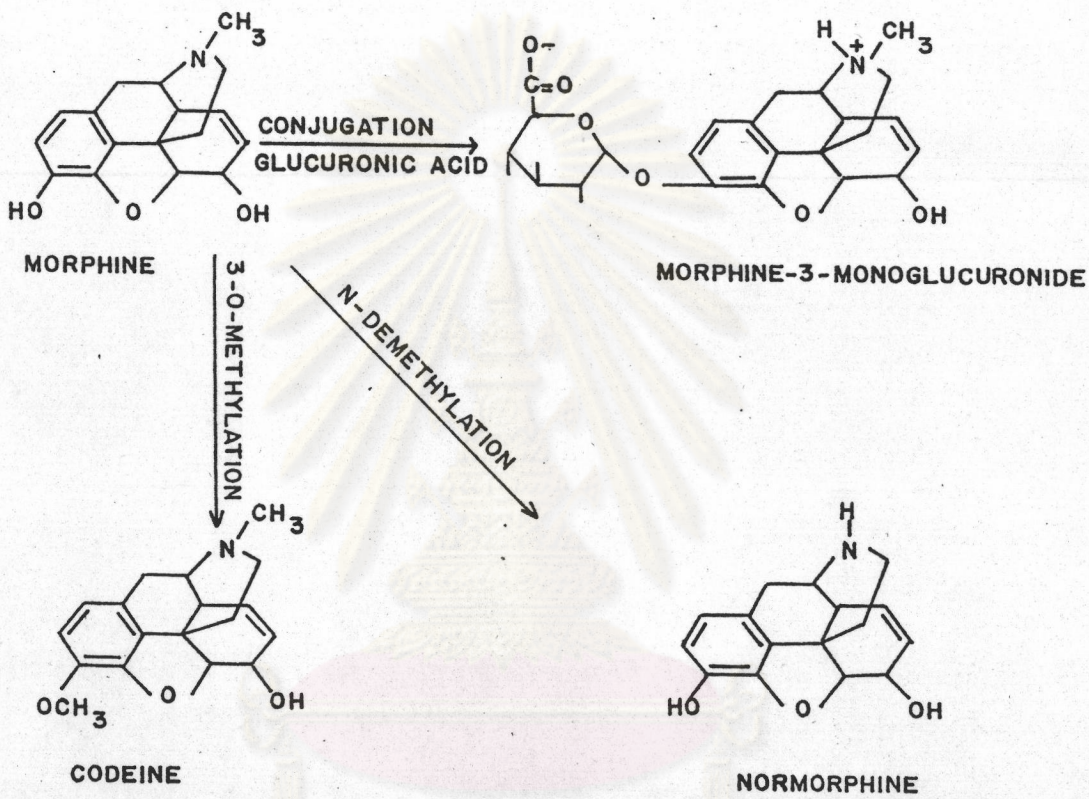


มอร์ฟีนถูกดูดซึมจากระบบทางเดินอาหารได้ไม่ดีเท่ากับการฉีด จึงนิยมใช้ฉีดเข้ากล้ามเนื้อหรือฉีดเข้าเส้นเลือด หลังจากยาซึมเข้าสู่กระแสโลหิตแล้วส่วนใหญ่ของยาจะไปอยู่ที่ไต ปอด ตับและม้าม มอร์ฟีนส่วนใหญ่จะถูกทำลายที่ตับโดยการรวมตัวกับกรดกลูคิวโรนิค (glucuronic acid) ได้เป็นมอร์ฟีน-3-กลูคิวโรไนด์ ส่วนน้อยเปลี่ยนรูปเป็นนอร์มอร์ฟีน (normorphine) ที่ตับโดยปฏิกิริยา เอ็น-ดีเมทิลเลชั่น (N-demethylation) และเปลี่ยนรูปเป็นโคเดอีน (codeine) โดยปฏิกิริยาโอ-เมทิลเลชั่น (O-methylation) ดังรูปที่ 3 หน้า 9 (Way และ Adler, 1961; Yeh และคณะ, 1977; Boerner และ Albbott, 1973) แล้วจึงถูกขับถ่ายออกมาทางไต เมื่อตรวจปัสสาวะภายหลังจากได้รับยา 24 ชั่วโมงจะพบมอร์ฟีนในรูปของอนุพันธ์กลูคิวโรไนด์ประมาณร้อยละ 90 มีส่วนน้อยที่ขับออกมาในรูปของฟรีมอร์ฟีน คือประมาณร้อยละ 7 (Way และ Adler, 1961; Clarke, 1971)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3 ขบวนการเมตาบอลิสมของมอร์ฟีนที่ตับ

(Way และ Adler,1961)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทบาทที่สำคัญในการศึกษาเกี่ยวกับลักษณะและขอบเขตของปัญหายาเสพติด ตลอดจนการพัฒนาการเก็บและวิเคราะห์ข้อมูลเกี่ยวกับระบาดวิทยาอย่างหนึ่งก็คือ การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ยาเสพติดและเมตาโบไลท์ของยาเหล่านั้นในของเหลวจากร่างกายหรือในเนื้อเยื่อการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ยาเสพติดที่มีความถูกต้อง ความแม่นยำ และมีความไวสูงย่อมเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการวินิจฉัยทางการแพทย์ การรักษาผู้ที่ใช้ยาเสพติดเกินขนาด การหาสาเหตุของการเสียชีวิต การบำบัดรักษาและติดตามผลการรักษาผู้ที่ติดยาเสพติด รวมทั้งเป็นประโยชน์ทางด้านนิติเวชวิทยาด้วย นอกจากนี้การวิเคราะห์ยาเสพติดในร่างกายและในเนื้อเยื่อยังสามารถใช้ศึกษาเกี่ยวกับเมตาบอลิสมของยาเสพติดในร่างกายหรือศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของยาเสพติดได้ด้วย (Gorodetzky, 1977) ในการวิจัยครั้งนี้จึงมีเป้าหมายที่จะพัฒนาน้ำยาสำเร็จรูป เพื่อวิเคราะห์อนุพันธ์มอร์ฟีนในปัสสาวะโดยวิธีที่มีความถูกต้องเชื่อถือได้ และเหมาะสมสำหรับหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง

วิธีวิเคราะห์มอร์ฟีนมีหลายวิธีด้วยกัน เช่น

ก. วิธีสเปคโตรโฟโตเมทรี (spectrophotometry) สามารถวัดปริมาณมอร์ฟีนในปัสสาวะที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 15-200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรปัสสาวะ (Mule, 1964) เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะต่ำ (Kupferberg และคณะ, 1964; Doedens และคณะ,1974) ในปัจจุบันไม่นิยมใช้วิธีนี้ในการวิเคราะห์มอร์ฟีนในปัสสาวะ

ข. วิธีโครมาโตกราฟฟี่ชนิดผิวบาง (thin layer chromatography) มีความไวอยู่ในช่วง 0.14-0.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรปัสสาวะ (Gorodetzky และคณะ, 1974) วิธีนี้มีความไวและความจำเพาะไม่สูงนักจึงเหมาะสำหรับการตรวจวิเคราะห์ทางคุณภาพ และเหมาะสำหรับใช้ช่วยสนับสนุนผลการวิเคราะห์โดยวิธีอื่น (Kokoski และ Mishrilal 1975; Holcomb และคณะ, 1978)

ค. วิธีแกสลิควิดโครมาโตกราฟฟี่ (gas-liquid chromatography) มีความไวสูงถึง 0.5 นาโนกรัม/มิลลิลิตรพลาสมา (Dahlstrom และ Paalzow, 1975) และเป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูง (Wallace และคณะ 1972; Fry และคณะ 1974; Slooten และ Helm, 1976)

ง. วิธีไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี่ (high performance liquid chromatography) วิธีนี้มีความไว 0.01 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรปัสสาวะ (Jane และ Tayler, 1975) และเป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูงเช่นเดียวกัน

วิธีต่าง ๆ ที่กล่าวมาข้างต้นล้วนมีความไว ความถูกต้อง และความจำเพาะค่อนข้างสูง แต่วิธีเหล่านี้ต้องผ่านขบวนการสกัดและต้องทำให้มอร์ฟีนมีความเข้มข้นขึ้นก่อนทำการวิเคราะห์ (Yeh, 1975; Stolman และ Pranitis, 1977; Predmore และคณะ, 1978) นอกจากนี้วิธีแกสลิควิดโครมาโตกราฟฟีและไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟีนั้น จำเป็นต้องทำให้มอร์ฟีนบริสุทธิ์ขึ้นก่อน และต้องเตรียมมอร์ฟีนให้อยู่ในรูปอนุพันธ์ที่เหมาะสมกับวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวด้วย ทำให้ต้องใช้เวลามากในการวิเคราะห์ต่อตัวอย่าง นอกจากนั้นวิธีการวิเคราะห์ทั้งสองวิธีนี้ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง ต้องอาศัยผู้ทดลองที่มีความชำนาญสูง และต้องใช้ตัวอย่างปัสสาวะปริมาณมาก ซึ่งยากต่อการเก็บและการเคลื่อนย้าย วิธีที่กล่าวข้างต้นจึงไม่เหมาะสำหรับการวิเคราะห์อนุพันธ์มอร์ฟีนในของเหลวจากร่างกายในห้องปฏิบัติการทั่วไป จึงได้มีผู้พัฒนาวิธีอิมมิวโนแอสเสย์ซึ่งเป็นวิธีที่ไม่ต้องผ่านขั้นตอนใด ๆ ก่อนทำการวิเคราะห์ และเป็นวิธีที่มีความไวอยู่ในช่วง 0.03-0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรปัสสาวะ (WHO Technical Report Series 556, 1974) ความจำเพาะ ความถูกต้อง และความแม่นยำสูง (Spector และ Parker, 1970) วิธีนี้มีหลักการโดยทั่วไปคือ เมื่อนำมอร์ฟีนซึ่งทำหน้าที่เป็นแอนติเจน (Ag) มาทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี (Ab) ที่มีความจำเพาะต่อมอร์ฟีน จะปรากฏแอนติเจน-แอนติบอดีคอมเพล็กซ์ (Ag.Ab) (Brattin และ Sunshine, 1973; Pesce และคณะ, 1978) ดังสมการ (1)

$$Ag + Ab \rightleftharpoons Ag.Ab \qquad (1)$$

$$K_a = \frac{[Ag.Ab]}{[Ag][Ab]}$$

เมื่อ K_a คือ equilibrium constant (ลิตร/โมล)

$[Ag]$ คือ ความเข้มข้นของแอนติเจน

$[Ab]$ คือ ความเข้มข้นของแอนติบอดี

$[Ag.Ab]$ คือ ความเข้มข้นของแอนติเจน-แอนติบอดีคอมเพล็กซ์

เมื่อเติมแอนติเจนที่ติดฉลากลงไป จะเกิดการแข่งขันกับแอนติเจนอิสระในการจับกับแอนติบอดี ดังสมการ (2)

$$Ag + Ab \rightleftharpoons Ag.Ab + Ag^{*}Ab \qquad (2)$$

Ag^{*}

เมื่อ Ag^{*} คือ แอนติเจนที่ติดฉลาก

ถ้าให้ปริมาณแอนติเจนติดฉลากและแอนติบอดีคงที่ ปริมาณแอนติเจนอิสระในสารตัวอย่างจะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับแอนติเจนติดฉลาก-แอนติบอดีคอมเพล็กซ์ที่เกิดขึ้น ทำให้หาปริมาณของแอนติเจนอิสระได้

การวิเคราะห์มอร์ฟีนด้วยวิธีอิมมิวโนแอสเสย์มีหลายวิธีด้วยกัน ซึ่งแต่ละวิธีจะแตกต่างกันที่ตัวฉลากเท่านั้น เช่น อาจติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี (Catlin และคณะ, 1973; Usategui-Gomez และคณะ, 1975; Steiner และ Spratt, 1978) เซลล์เม็ดเลือดแดง (Adler และ Liu, 1971; Adler และคณะ, 1972) หรือเอนไซม์ (Rubenstein และคณะ 1972; Schneider และคณะ, 1973; Rowley และคณะ, 1975; Rubenstein, 1978)

การตรวจวิเคราะห์มอร์ฟีนด้วยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ (radioimmunoassay) เป็นวิธีที่ใช้มอร์ฟีนติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี เช่น ^{3}H, ^{14}C และ ^{125}I เป็นต้น ซึ่งวิธีนี้รายงานครั้งแรกโดย Spector และ Parker (1970) ต่อมาวิธีนี้จึงใช้กันอย่างกว้างขวาง เป็นวิธีที่มีความไวถึงหน่วยนาโนกรัม และเป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูง แต่มีข้อเสียคือวิธีนี้จัดเป็นเฮท-เทอร์โรจีเนียสอิมมิวโนแอสเสย์ (heterogeneous immunoassay) จำเป็นต้องแยกแอนติเจน-แอนติบอดีคอมเพล็กซ์ออกจากแอนติเจนอิสระก่อนการวัดปริมาณรังสี จึงอาจทำให้เกิดข้อผิดพลาดได้ง่าย นอกจากนี้การติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีทำให้ต้องระมัดระวังในการวิเคราะห์เป็นพิเศษ และแอนติเจนติดฉลากมีอายุการใช้งานสั้น ตลอดจนต้องใช้เครื่องวัดปริมาณรังสีที่มีราคาแพง ต่อมาจึงได้มีการปรับปรุงวิธีวิเคราะห์มอร์ฟีนโดยการติดฉลากด้วยสารที่ไม่ใช่สารกัมมันตรังสี Adler และคณะ (1972) เป็นผู้ริเริ่มวิธีฮีมแอกกลูติเนชั่นอินฮิบิชั่น (hemagglutination inhibition) โดยใช้การติดฉลากด้วยเซลล์เม็ดเลือดแดง ซึ่งวิธีนี้นี้เมื่อแอนติบอดีต่อมอร์ฟีนจับกับมอร์ฟีนที่ติดฉลากด้วยเซลล์เม็ดเลือดแดงจะทำให้เกิดแอกกลูติเนชั่น (agglutination) และจะสังเกตเห็นเซลล์เม็ดเลือดแดงกระจายอยู่ในสารละลาย แต่ถ้าในตัวอย่างปัสสาวะมีมอร์ฟีนอิสระจะแข่งขันกับมอร์ฟีนติดฉลากจับกับแอนติบอดี ทำให้ยับยั้งการเกิดแอกกลูติเนชั่น ซึ่งจะสังเกตเห็นเซลล์เม็ดเลือดแดงตกตะกอนนอนก้นเป็นกลุ่ม วิธีฮีมแอกกลูติเนชั่นอินฮิบิชั่นจึงเป็นวิธีที่ง่ายและสะดวก เนื่องจากไม่ต้องมีขั้นตอนการแยกแอนติเจน-แอนติบอดีคอมเพล็กซ์ออกจากแอนติเจนอิสระ และสามารถตรวจวัดการเกิดแอกกลูติเนชั่นได้ด้วยตาเปล่า ซึ่งมีความไวอยู่ในช่วง 0.03-0.06 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรปัสสาวะ (WHO Technical Report Series 556, 1974) อย่างไรก็ตามโดยทั่วไปวิธีนี้มักจะใช้เป็นวิธีวิเคราะห์กึ่งปริมาณ (semiquantitative)

ในปี ค.ศ. 1972 Rubenstein และคณะ เป็นผู้ริเริ่มพัฒนาวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิว-โนแอสเสย์ วิธีนี้ใช้การติดฉลากด้วยเอนไซม์ มีหลักการว่าเมื่อแอนติบอดีจับกับแอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ได้เป็นแอนติเจนติดฉลาก-แอนติบอดีคอมเพล็กซ์ จะทำให้เอนไซม์หมดแอคติวิตี ดังนั้นจึงสามารถติดตามปฏิกิริยาได้โดยการวัดการเปลี่ยนแอคติวิตีของเอนไซม์ ดังสมการที่ (1) และ (2)

$$\underset{\text{(มีแอคติวิตี)}}{Ab + Ag^{E}} \rightleftharpoons \underset{\text{(ไม่มีแอคติวิตี)}}{Ag^{E}.Ab} \qquad (1)$$

$$\underset{\text{(มีแอคติวิตี)}}{Ab + Ag + Ag^{E}} \rightleftharpoons \underset{\text{(ไม่มีแอคติวิตี)}}{Ag.Ab + Ag^{E}.Ab} \qquad (2)$$

เมื่อแอนติเจนติดฉลาก (Ag^{E}) ถูกจับด้วยแอนติบอดี (Ab) ที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจน เอนไซม์จะหยุดทำงาน หากเติมสารตัวอย่างที่มีแอนติเจน (Ag) ดังกล่าวลงไป (สมการ 2) จะเกิดการแข่งขันระหว่างแอนติเจน (Ag) และแอนติเจนติดฉลาก (Ag^{E}) ในการจับกับแอนติบอดี (Ab) เป็นผลให้แอนติเจนติดฉลากจับกับแอนติบอดีได้น้อยลง แอคติวิตีของเอนไซม์ในสมการ (2) จึงสูงกว่าสมการ (1) และใช้ความสัมพันธ์นี้ในการวัดปริมาณแอนติเจนนั้นในสารตัวอย่างได้

วิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์ ถือว่าเป็นวิธีโฮโมจีเนียสเอนไซม์อิมมิวโนแอสเสย์ (homogeneous enzyme immunoassay) ไม่มีความจำเป็นต้องแยกแอนติเจน-แอนติบอดีคอม-เพล็กซ์ออกจากแอนติเจนอิสระ ซึ่งเป็นวิธีที่แตกต่างจากอิมมิวโนแอสเสย์วิธีอื่น การเลือกเอนไซม์ที่จะนำมาใช้ติดฉลากในวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์มีข้อจำกัดและมีความสำคัญ สิ่งที่จะต้องพิจารณาในการเลือกเอนไซม์ก็คือ จะต้องเป็นเอนไซม์ที่ไม่มีอยู่ในตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ และในตัวอย่างที่จะวิเคราะห์จะต้องไม่มีตัวยับยั้ง (inhibitors) หรือไม่มีสับสเตรท (substrate) ของเอนไซม์นั้นอยู่ และข้อที่สำคัญคือ เอนไซม์ที่ติดฉลากกับแอนติเจนหรือสารที่ต้องการจะวิเคราะห์เมื่อจับกับแอนติบอดีแล้ว จะต้องมีการเปลี่ยนแปลงแอคติวิตีของเอนไซม์ นอกจากนี้เอนไซม์นั้นต้องมีสเปซิฟิคแอคติวิตี (specific activity) สูง และมีความไวของปฏิกิริยาสูงด้วย (Scharpe และคณะ 1976; Schuurs และ Vanweemen, 1977; Engvall, 1980)

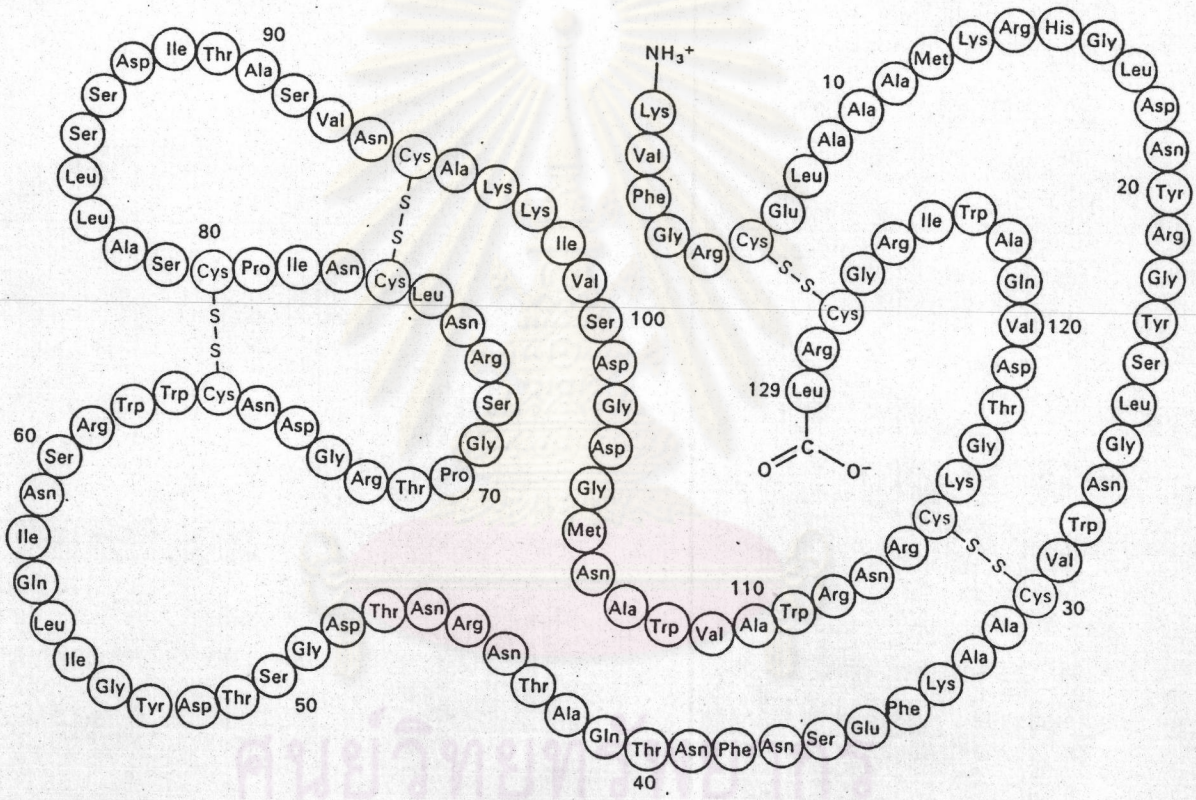
ในการวิเคราะห์มอร์ฟีนในปัสสาวะด้วยวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์ในการวิจัยครั้งนี้ เอนไซม์ที่ใช้ในการติดฉลากกับมอร์ฟีน และสับสเตรทของเอนไซม์ใช้สารเดียวกันกับของบริษัท Syva คือจะติดฉลากมอร์ฟีนด้วยไลโซไซม์ และใช้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียไมโครคอค-คัสลูเทียส (Micrococcus luteus) เป็นสับสเตรทของเอนไซม์

ไลโซไซม์เป็นโปรตีนทรงกลม (globular protein) พบมากในไข่ขาวของไก่ นอกจากนี้ยังพบในน้ำตา น้ำลาย และน้ำมูก แต่พบน้อยมากในปัสสาวะ ประกอบด้วยโพลีเปปไทด์สายเดี่ยวซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 129 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุล 13,900 มีค่า Isoelectric pH เท่ากับ 11.0 เอนไซม์นี้มีครอสลิงค์ (cross linked) โดยไดซัลไฟด์บอนซ์ (disulfide bonds) จึงเป็นเอนไซม์ที่มีความเสถียรมาก มีกรดกลูตามิคที่ตำแหน่ง 35 (glytamic residue 35) และกรดแอสปาร์ติคที่ตำแหน่ง 52(aspartic residue 52) เป็นกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ ลำดับของกรดอะมิโนของไลโซไซม์ ดังแสดงในรูปที่ 4 หน้า 15

ไลโซไซม์ เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลาย β1 → 4 ไกลโคซิดิคบอนด์ (β1 → 4 glycosidic bond) ของโปลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียกรัมบวก เปปติโดไกลแคนประกอบด้วยโปลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) และเปปไทด์ (peptide) ทำหน้าที่เป็นผนังเซลล์ที่แข็งแรง โปลีแซคคาไรด์จะประกอบด้วยน้ำตาล 2 ชนิดสลับกันเป็นสายยาวคือ เอ็น-อะเซทิลกลูโคซามิน (N-acetylglycosamine, NAG) และกรดเอ็น-อะเซทิลมิวรามิค (N-acetylmuramic acid, NAM) น้ำตาลทั้ง 2 ชนิดนี้เชื่อมต่อโดย β1 → 4 ไกลโคซิดิคบอนด์ ดังแสดงในรูปที่ 5 หน้า 16

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

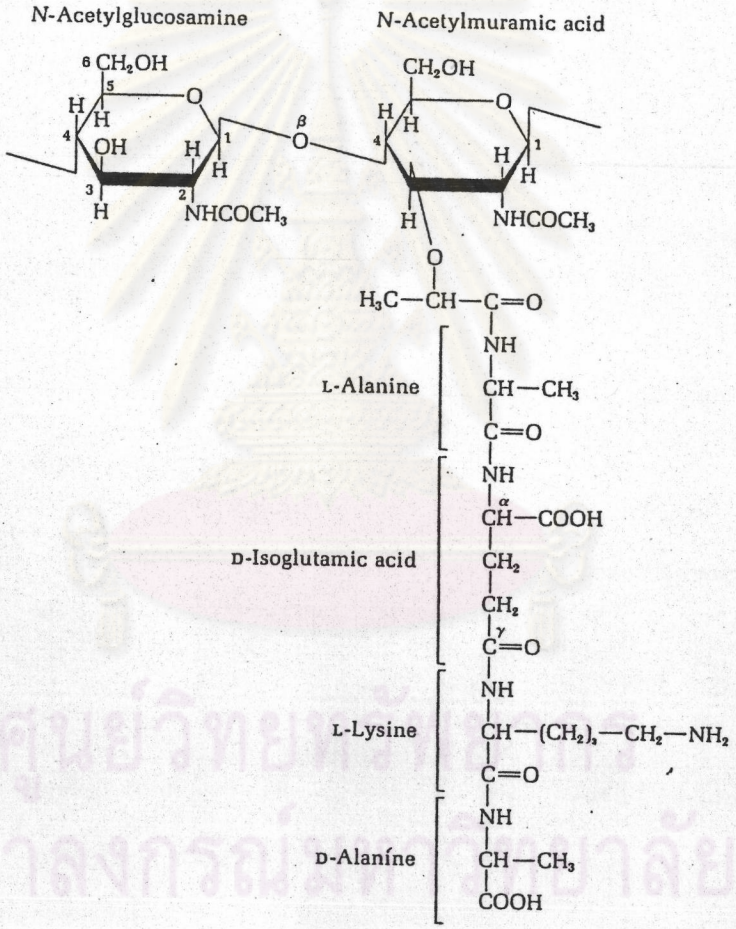
รูปที่ 4 ลำดับของกรดอะมิโนของไลโซไซม์ที่สกัดได้จากไข่ขาวของไก่
(Phillips, 1966)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

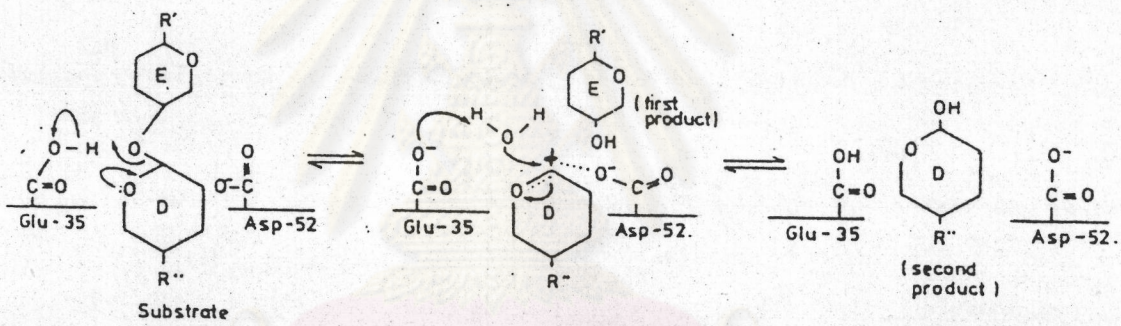
009466
i 17493420

รูปที่ 5 โครงสร้างของเปปติโดไกลแคนของผนังเซลล์แบคทีเรีย (Lehninger, 1976)



ไลโซไซม์จะเร่งปฏิกิริยาโดยการให้และรับโปรตรอนจากสับสเตรท (acid-base catalysis) (Phillips, 1966) ไลโซไซม์จะมีหมู่คาร์บอกซิลของกลูตามิคที่ตำแหน่ง 35 (glutamic residue 35) และมีหมู่คาร์บอกซิลของแอสปาร์ติคที่ตำแหน่ง 52 (aspartic residue 52) ในบริเวณเร่งที่ทำหน้าที่เป็นหมู่ที่เกี่ยวข้องกับการให้และการรับโปรตรอนจากสับสเตรท ซึ่งกลไกของปฏิกิริยาดังรูปที่ 6

รูปที่ 6 กลไกการทำงานของไลโซไซม์ที่บริเวณเร่ง (Phillips, 1966)

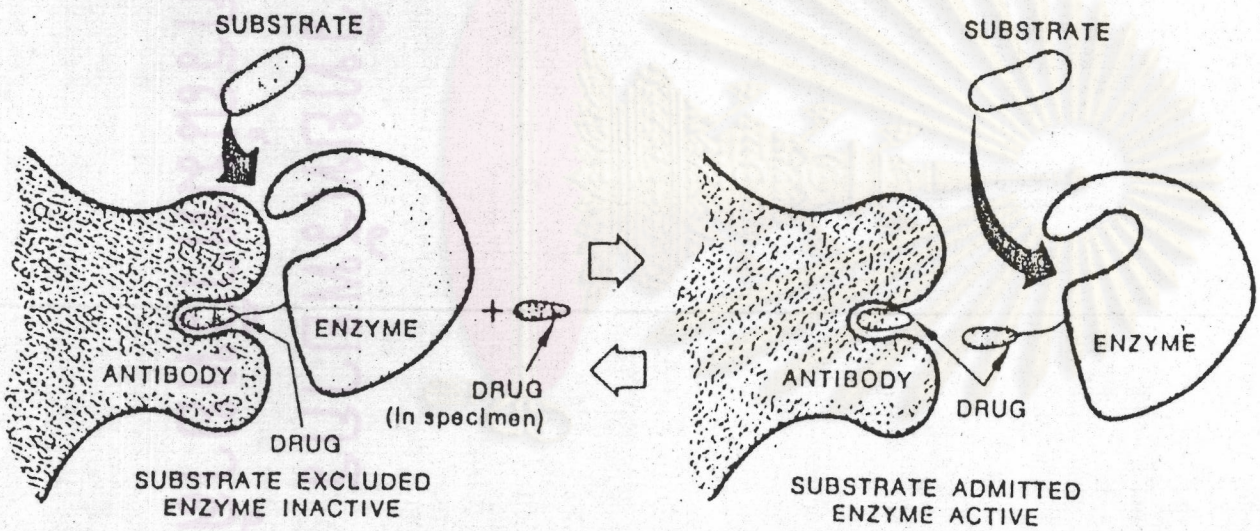


การไฮโดรไลซิสจะเกิดระหว่าง ring D คือกรดเอ็น-อะเซทิลมิวรามิค และ ring E คือเอ็น-อะเซทิลกลูโคซามิน ไฮโดรเจนอะตอมของกลูตามิคที่ตำแหน่ง 35 จะจับที่ไกลโคซิลิคออกซิเจน (glycosidic oxygen) ระหว่างน้ำตาลทั้ง 2 จากนั้น C_1 ของ ring D กลายเป็นคาร์โบเนียมอิออน (carbonium ion) ซึ่งมีความเสถียรโดยหมู่คาร์บอกซิลของแอสปาร์ติคที่ตำแหน่ง 52 ที่อยู่ใกล้เคียงกัน หลังจากนั้นไฮดรอกไซด์ไอออน (OH^-) จากโมเลกุลของน้ำจะจับที่คาร์โบเนียมไอออนซึ่งเป็นการสิ้นสุดของปฏิกิริยา

กลไกที่แอนติบอดีจับกับมอร์ฟีนที่ติดฉลากด้วยไลโซไซม์แล้วทำให้เกิดการยับยั้งแอคติวิตีของไลโซไซม์ยังไม่ทราบแน่ชัด Schneider และคณะ (1973) ตั้งสมมุติฐานว่า เมื่อแอนติบอดีจับกับมอร์ฟีนที่ติดฉลากด้วยไลโซไซม์ แอนติบอดีจะไปบังบริเวณเร่ง (active sites) ของไลโซไซม์ ทำให้สับสเตรทของไลโซไซม์ซึ่งเป็นสารโมเลกุลใหญ่ คือ เปปติโดไกลแคนของ - แบคทีเรีย ไม่สามารถเข้าไปที่บริเวณเร่งของไลโซไซม์ได้ จึงทำให้แอคติวิตีของไลโซไซม์ลดลง ดังรูปที่ 7 หน้า 19

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 7 หลักการของเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์ (Schneider และคณะ, 1973)



ถึงแม้ว่าปัจจุบันวิธีวิเคราะห์มอร์ฟีนที่ใช้กันส่วนใหญ่ คือวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ แต่เนื่องจากวิธีนี้ต้องใช้สารกัมมันตรังสีซึ่งเป็นอันตราย และต้องใช้เครื่องวัดปริมาณรังสีที่มีราคาแพง หน่วยงานของทางราชการหลายหน่วยงาน เช่น โรงพยาบาลหรือสถาบันวิจัยต่าง ๆ จึงพยายามนำวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์มาใช้ ซึ่งเป็นวิธีที่ไม่ต้องใช้สารกัมมันตรังสีและยังเป็นวิธีที่มีความถูกต้อง ความแม่นยำ และความจำเพาะใกล้เคียงกับเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ ส่วนความไวประมาณ 500 นาโนกรัม/มิลลิลิตรปัสสาวะ (WHO Technical Report Series 556, 1974) ต่ำกว่าวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็วเนื่องจากติดตามปฏิกิริยาโดยการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ สามารถวิเคราะห์ผลต่อตัวอย่างได้ภายในเวลาเพียง 1-2 นาที เนื่องจากไม่ต้องมีขั้นตอนการแยกแอนติเจนอิสระออกจากคอมเพล็กซ์ แต่ในปัจจุบันหน่วยงานที่ต้องการจะวิเคราะห์มอร์ฟีนด้วยวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์จะต้องซื้อน้ำยาสำเร็จรูปจากบริษัท Syva ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบราคาของน้ำยาสำเร็จรูปของวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์กับน้ำยาสำเร็จรูปของวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์จากบริษัท Roche Diagnostics ปรากฏว่าวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์แพงกว่าประมาณ 6 เท่า

วัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้จึงพยายามเตรียมน้ำยาสำเร็จรูปบางอย่างที่ใช้ในเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์สำหรับวิเคราะห์อนุพันธ์มอร์ฟีนในปัสสาวะ และพัฒนาวิธีการวิเคราะห์โดยใช้เครื่องมือที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการทั่วไป ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อหน่วยงานของทางราชการที่จะนำวิธีนี้ไปใช้โดยสามารถลดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ได้ เป็นการประหยัดเงินตราของประเทศตลอดจนเป็นแนวทางในการพัฒนาวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์สำหรับวิเคราะห์สารประเภทอื่น ๆ ด้วย

ขั้นตอนในการวิจัยครั้งนี้ประกอบด้วยการเตรียมสับสเตรทคือไมโครคอคคัสลูเทียส การเตรียมมอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกต และการพัฒนาวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์สำหรับวัดอนุพันธ์มอร์ฟีนในปัสสาวะ ตลอดจนศึกษาความไว ความถูกต้อง และความแม่นยำของวิธีนี้ และวิเคราะห์ปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนในปัสสาวะของชาวไทยภูเขาที่ใช้และติดฝิ่นโดยวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์ที่พัฒนาได้เปรียบเทียบกับวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์