การพัฒนาน้ำยาสำเร็จรูปเพื่อวิเคราะห์อนุพันธ์มอร์ฟีนในปัสสาวะด้วยวิธี
เอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นางสาวศุภมาส โชติเมธีภิรมย์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2527

ISBN 974-563-813-7

009466

i 17493420

Development of Enzyme Multiplied Immunoassay Technique Kit (EMIT) for the Assay of Morphine-Like Substances in Urine

Miss Supamas Chotmethepirum

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Sciences

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

1984

ISBN 974-563-813-7

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาน้ำยาสำเร็จรูปเพื่อวิเคราะห์อนุพันธ์มอร์ฟีนในปัสสาวะด้วยวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์
โดย	นางสาวศุภมาส โชติเมธีภิรมย์
ภาควิชา	ชีวเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พีรดา สิริจินตกานต์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ ดร.ปรีดา ชัยศิริ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..................................คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุประดิษฐ์ นุนนาค)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..................................ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สรรเสริญ ทรัพยโตษก)

..................................กรรมการ

(ศาสตราจารย์นายแพทย์ เทพ หิมะทองคำ)

..................................กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.วราพรรณ ด่านอุตรา)

..................................กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พีรดา สิริจินตกานต์)

..................................กรรมการ

(อาจารย์ ดร.ปรีดา ชัยศิริ)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาน้ำยาสำเร็จรูปเพื่อวิเคราะห์อนุพันธ์มอร์ฟีนในปัสสาวะด้วยวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์
ชื่อนิสิต	นางสาวศุภมาส โชติเมธีติรมย์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พีรดา สิริจินตกานต์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ ดร.ปรีดา ชัยศิริ
ภาควิชา	ชีวเคมี
ปีการศึกษา	2527

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

การศึกษาเกี่ยวกับปัญหายาเสพติดให้โทษทางหนึ่ง คือ การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ยาเสพติดและเมตาโบไลท์ของยาเหล่านั้นในของเหลวจากร่างกายด้วยวิธีที่มีความถูกต้องเชื่อถือได้และมีความไวสูง วิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์เป็นวิธีหนึ่งที่สะดวกและรวดเร็ว ไม่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง แต่ขณะนี้ยังต้องซื้อน้ำยาสำเร็จรูปซึ่งมีราคาแพงจากต่างประเทศ การวิจัยครั้งนี้ได้พัฒนาน้ำยาสำเร็จรูปดังกล่าวบางอย่าง คือ สารละลายแขวนลอยไมโครคอคคัส-ลูเทียส มอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกต สำหรับใช้ในการวิเคราะห์อนุพันธ์มอร์ฟีนในปัสสาวะ วิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์ที่พัฒนาขึ้นโดยใช้น้ำยาที่เตรียมได้มีความไว 180 นาโนกรัม/มิลลิลิตรปัสสาวะ มีความถูกต้องและความแม่นยำพอใช้ สามารถวัดได้วันละ 100-150 ตัวอย่าง โดยใช้เวลาในการวัดต่อตัวอย่าง 1-2 นาที การวิเคราะห์อนุพันธ์มอร์ฟีนในปัสสาวะโดยวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์โดยใช้น้ำยาที่เตรียมขึ้นเองสามารถลดค่าใช้จ่ายได้ประมาณ 60 เท่าของเมื่อใช้น้ำยาสำเร็จรูปจากต่างประเทศ และลดค่าใช้จ่ายได้ประมาณ 10 เท่าของเมื่อใช้วิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ แม้ว่าวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์จะมีความไวต่ำกว่าวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ แต่ก็มีความไวพอที่จะใช้วัดปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนในปัสสาวะได้ และมีความถูกต้อง ความแม่นยำใกล้เคียงกับวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ ปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนในปัสสาวะชาวไทยภูเขาที่ใช้และติดฝิ่นจำนวน 60 ตัวอย่างที่วัดโดยวิธีทั้งสองมีความสัมพันธ์กัน และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.94

ผลจากการศึกษาครั้งนี้ยังเป็นแนวทางสำหรับการพัฒนาน้ำยาสำเร็จรูปราคาถูกสำหรับวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์ที่ใช้วิเคราะห์ยาเสพติดและสารประเภทอื่น ๆ ด้วย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title	Development of Enzyme Multiplied Immunoassay Technique Kit (EMIT) for the Assay of Morphine-Like Substances in Urine
Name	Miss Supamas Chotmethepirum
Thesis Advisor	Assistant Professor Peerada Sirijintakarn, Ph.D.
Co Thesis Advisor	Dr. Preeda Chaisiri
Department	Biochemistry
Academic Year	1984

ABSTRACT

One of the essential steps to solve the problem of narcotic drugs is the development of detection method of these drugs and their metabolites in body fluids. The method should be quantitatively reliable and sensitive. Enzyme multiplied immunoassay technique was a rapid and convenient technique which does not require complicate and expensive equipments. However the reagent kit is imported at high cost. This thesis describe the preparation of *Micrococcus luteus* suspension and morphine-lysozyme conjugates for determining the morphine derivatives in urine. Using the author's own preparations, the sensitivity of enzyme multiplied immunoassay technique was 180 ng/ml of urine. The accuracy and precision of the method were acceptable. This method could assay 100-150 samples per day and each sample took only 1-2 min. Comparing this method with radioimmunoassay, it was found that the prepared enzyme multiplied immunoassay technique kit was 60 and 10 times less expensive than that of the imported enzyme multiplied immunoassay technique kit and radioimmunoassay kit respectively. Eventhough enzyme multiplied immunoassay

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

technique was less sensitive than the radioimmunoassay technique but the accuracy and precision of both methods were comparable. Study in 60 urine samples of opium-addicted hill tribes of Thailand showed high correlation of enzyme multiplied immunoassay technique and radioimmunoassay with correlation coefficient of 0.94.

This study can serve as a potential application for preparing inexpensive enzyme multiplied immunoassay technique kit for some other drugs or substances.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนใคร่ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พีรดา สิริจินดกานต์ อาจารย์ ดร.ปรีดา ชัยศิริ และรองศาสตราจารย์ ดร.วราพรรณ ด่านอุตรา เป็นอย่างยิ่งที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้านทำให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จได้ด้วยดี

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์สรรเสริญ ทรัพยโตษก ที่ได้กรุณาเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และศาสตราจารย์นายแพทย์ เทพ หิมะทองคำ ที่ได้กรุณาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณ อาจารย์อมร เพชรสม ที่ได้กรุณาช่วยอ่านผลของอินฟราเรดสเปคตรัม และนิวเคลียแมคนีติครีโซแนนซ์สเปคตรัม ขอบคุณ คุณนุ้ย แซ่โซว คุณทิวา ศิวะภิญโญยศ และเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยยาเสพติด สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือและความสะดวกในงานวิจัย

ขอบพระคุณ ภาควิชาชีวเคมี ภาควิชาเคมี ภาควิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาเคมีเทคนิค คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในเรื่องเครื่องมือต่าง ๆ ในงานวิจัย และสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ได้ให้ทุนอุดหนุนงานวิจัยนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.. ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.. จ

กิติกรรมประกาศ... ช

สารบัญตาราง.. ฎ

สารบัญภาพ.. ฎ

คำอธิบายสัญญลักษณ์และคำย่อ...................................... ฑ

บทที่

1. บทนำ... 1

2. เคมีภัณฑ์ วัสดุภัณฑ์ และเครื่องมือ............................... 21

2.1 เคมีภัณฑ์.. 21

2.2 วัสดุภัณฑ์... 22

2.3 ตัวอย่างปัสสาวะ... 22

2.4 เครื่องมือ.. 22

3. วิธีทดลอง... 24

3.1 การเตรียมสารละลายและแบคทีเรียสำหรับวิเคราะห์ปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนโดยวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์....... 24

3.1.1 สารละลายทริสมาลีเอตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.025 โมล/ลิตร pH 6.0.......... 24

3.1.2 สารละลายมาตรฐานมอร์ฟีนไฮโดรคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร............... 24

3.1.3 การเตรียมแบคทีเรียไมโครคอคคัสลูเทียส (*Micrococcus luteus*)................ 24

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หน้า

3.1.4 การเตรียมมอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกต............ 26

3.1.5 การทำมอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกตให้บริสุทธิ์โดยการไดอะไลซิส.............................. 30

3.1.6 การทำมอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกตให้บริสุทธิ์โดยการใช้คอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-50......................... 30

3.1.7 การทำมอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกตให้แห้ง......... 30

3.1.8 การเตรียมสารละลายมอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกตสำหรับใช้ในเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์...... 30

3.2 การวิเคราะห์ปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนโดยวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์.................................. 31

3.3 การวัดแอคติวิตีของไลโซไซม์ที่อยู่ในรูปของมอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกต เมื่อมีและไม่มีแอนติบอดีต่อมอร์ฟีน............ 32

3.4 การศึกษาความไว ความแม่นยำ และความถูกต้องของการวัดปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนในปัสสาวะโดยวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์.................................. 32

4. ผลการทดลอง.. 35

4.1 ผลการเลี้ยงไมโครคอคคัสลูเทียสในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (L-Broth)...................................... 35

4.2 ผลการเตรียมมอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนต.................. 35

4.3 ผลการทำมอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกตให้บริสุทธิ์ โดยการใช้คอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-50.............................. 46

4.4 ผลการเตรียมมอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกต................ 46

4.5 ผลการเปรียบเทียบแอคติวิตีของไลโซไซม์ที่อยู่ในรูปของมอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกตเมื่อมีและไม่มีแอนติบอดีต่อมอร์ฟีน......... 49

4.6 การเปรียบเทียบกราฟมาตรฐานของมอร์ฟีนที่ได้จากการใช้มอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกตที่เตรียมได้กับที่ซื้อจากบริษัท Syva.. 49

หน้า

4.7 การศึกษาความไว ความจำเพาะ ความแม่นยำ และความถูกต้องของการวัดปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนในปัสสาวะด้วยวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์.................... 53

4.8 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนในปัสสาวะระหว่างการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์กับวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์.................... 59

5. วิจารณ์ผลการทดลอง.................... 66

เอกสารอ้างอิง.................... 76

ภาคผนวก.................... 85

ประวัติผู้เขียน.................... 90

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การวิเคราะห์มอร์ฟีนด้วยวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์...........	31
2	การทดสอบแอคติวิตีของไลโซไซม์ที่อยู่ในรูปของมอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกต ระหว่างหลอดที่มีและไม่มีแอนติบอดีต่อมอร์ฟีน........................	32
3	ค่า Rf ของอนุพันธ์มอร์ฟีนและสารที่นำมาทดสอบที่ได้จากโครมาโตกราฟฟีชนิดผิวบาง..	39
4	การเปรียบเทียบคุณสมบัติในการดูดกลืนอินฟราเรดของมอร์ฟีนฟรีเบสและมอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนต..	43
5	ผลการเตรียมมอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกต..............................	48
6	ความจำเพาะของแอนติบอดีต่อมอร์ฟีนของบริษัท Syva.....................	56
7	ความแม่นยำของการวัดปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนในปัสสาวะโดยวิธีเอนไซม์-มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์...	57
8	ความถูกต้องของการวัดปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนในปัสสาวะโดยวิธีเอนไซม์-มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์...	58
9	ความจำเพาะของแอนติบอดีต่อมอร์ฟีนของบริษัท Roche Diagnostics....	60
10	ความแม่นยำของการวัดปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนในปัสสาวะโดยวิธีเรดิโอ-อิมมิวโนแอสเสย์..	61
11	ความถูกต้องของการวัดปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนในปัสสาวะโดยวิธีเรดิโอ-อิมมิวโนแอสเสย์..	62
12	การเปรียบเทียบคุณสมบัติบางอย่างของวิธีวิเคราะห์อนุพันธ์มอร์ฟีนในปัสสาวะระหว่างวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์กับวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์..	63
13	ปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนในปัสสาวะของชาวไทยภูเขาที่ใช้และติดฝิ่น ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์และวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์....	64

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	กลไกการทำงานของเอนเคฟฟาลินและฝิ่น (Snyder, 1977)	6
2	แบบจำลองของกลไกการดื้อยา (Snyder, 1977)	7
3	ขบวนการเมตาบอลิสมของมอร์ฟีนที่ตับ (Way และ Adler, 1961)	9
4	ลำดับของกรดอะมิโนของไลโซไซม์ที่สกัดได้จากไข่ขาวของไก่ (Phillips, 1966)	15
5	โครงสร้างของเปปติโดไกลแคนของผนังเซลล์แบคทีเรีย (Leninger, 1976)	16
6	กลไกการทำงานของไลโซไซม์ที่บริเวณเร่ง (Phillips, 1966)	17
7	หลักการของเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์ (Schneider และคณะ, 1973)	19
8	ปฏิกิริยาการเกิดมอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนตและมอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกต	29
9	ลักษณะการเจริญเติบโตของไมโครคอคคัสลูเทียสในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (L-Broth)	38
10	อุลตราไวโอเรตสเปคตรัมของมอร์ฟีนฟรีเบสและมอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนต	40
11	อินฟราเรดสเปคตรัมของมอร์ฟีนฟรีเบส	41
12	อินฟราเรดสเปคตรัมของมอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนต	42
13	นิวเคลียแมคเนติครีโซแนนซ์สเปคตรัมของมอร์ฟีนฟรีเบส	44
14	นิวเคลียแมคเนติครีโซแนนซ์สเปคตรัมของมอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนต	45
15	มอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกตที่ถูกชะออกจากคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-50	47
16	การเปรียบเทียบแอคติวิตีของไลโซไซม์ที่อยู่ในรูปของมอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกตที่เตรียมขึ้นเมื่อมีและไม่มีแอนติบอดีต่อมอร์ฟีน	50
17	การเปรียบเทียบแอคติวิตีของไลโซไซม์ที่อยู่ในรูปของมอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกตของบริษัท Syva เมื่อมีและไม่มีแอนติบอดีต่อมอร์ฟีน	51

รูปที่		หน้า
18	กราฟมาตรฐานของมอร์ฟีนเมื่อใช้มอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกตที่เตรียมได้กับที่ซื้อจากบริษัท Syva......................................	52
19	กราฟมาตรฐานของมอร์ฟีนโดยวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์.....	55
20	การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์อนุพันธ์มอร์ฟีนโดยวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์กับวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์.....................	65
21	กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry และคณะ....	87

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Ab = antibody

Ag = antigen

Ag^* = labeled antigen

d = doublet

EMIT = enzyme multiplied immunoassay technique

J = coupling constant

m = multiplet

M6HS = morphine-6-hemisuccinate

ml = millilitre

NADH = nicotinamide adenine dinucleotide reduced form

ng = nanogram

OD = optical density

ppm = parts per million

Rf = rate of flow in chromatography

RIA = radioimmunoassay

S = singlet

t = triplet

TLC = thin layer chromatography

μg = microgram

μl = microlitre

NEG = negative

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย