

การพัฒนาน้ำยาสำเร็จรูเพื่อวิเคราะห์อนุพันธ์มอร์ฟินในบลสสาวะด้วยวิธี  
เอนไซม์มัลติไฟล์ดอินมิวโนแอกซิเจน



นางสาวศุภมาลai โชติเมธีภิรมย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

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

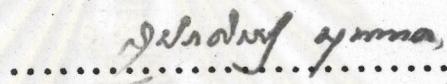
1984

ISBN 974-563-813-7

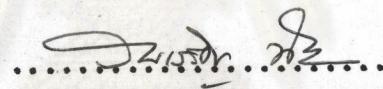
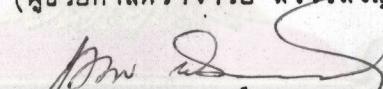
หัวขอวิทยานิพนธ์ การพัฒนาน้ำยาสำเร็จรูปเพื่อวิเคราะห์อนุพันธ์มอร์ฟินในบลสสาระด้วย  
 รีดิเอโนไซม์มอลติไฟล์ด์อิมมิวนโโนแอล เสย  
 โดย นางสาวศุภมาส โชคเบรียร์  
 ภาควิชา ชีวเคมี  
 อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พรีดา สิริจินตกานต์  
 อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ ดร.ปรีดา ชัยศิริ



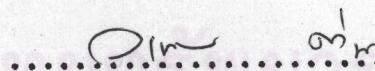
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่ง  
 ของการศึกษาตามหลักสูตรปรัชญามหาบัณฑิต

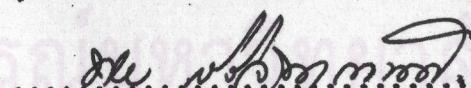
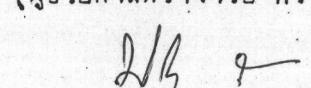
  
 ..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย  
 (รองศาสตราจารย์ ดร.สุประดิษฐ์ บุนนาค)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

  
 ..... ประธานกรรมการ  
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สรรวัฒน์ ทรัพย์โถมาก)  
  
 ..... กรรมการ

(ค่าลิดราจารย์นายแพทย์ เทพ ธรรมกองคำ)

  
 ..... กรรมการ  
 (รองศาสตราจารย์ ดร.วรารพร คำนอุตรา)

  
 ..... กรรมการ  
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พรีดา สิริจินตกานต์)  
  
 ..... กรรมการ  
 (อาจารย์ ดร.ปรีดา ชัยศิริ)

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาน้ำยาสำเร็จรูปเพื่อวิเคราะห์อนุพันธ์มอร์ฟินในปัสสาวะด้วยวิธีเอนไซม์มัลติแพล็คซิมิวโนแอลส์ເສෙය
ชื่อนิสิต	นางสาวศุภมาลai โชค เมธีธรรมย์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พีระดา สิริจินตกานต์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ ดร.พีระดา ชัยศรี
ภาควิชา	ชีวเคมี
ปีการศึกษา	2527

บทสรย่อ



การศึกษาเกี่ยวกับปัญหายาเสพติดให้โทษทางหนึ่ง คือ การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ยาเสพติดและเมตาโบไลท์ของยาเหล่านั้นในของเหลวจากร่างกายด้วยวิธีที่มีความถูกต้อง เชื่อถือได้และมีความไวสูง วิธีเอนไซม์มัลติแพล็คซิมิวโนแอลส์ເສෙය เป็นวิธีหนึ่งที่สะดวกและรวดเร็ว ไม่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง แต่จะต้องซื้อตัวอย่างต้องซื้อน้ำยาสำเร็จรูปซึ่งมีราคาแพงจากต่างประเทศ การวิจัยครั้งนี้ได้พัฒนาน้ำยาสำเร็จรูปดังกล่าวบางอย่าง คือ สารละลายhexanolอย่างไร้โครงสร้าง จุลทรรศน์ มอร์ฟิน-ໄไฮโซไซด์คอนจูเกต สำหรับใช้ในการวิเคราะห์อนุพันธ์มอร์ฟินในปัสสาวะ วิธีเอนไซม์มัลติแพล็คซิมิวโนแอลส์ເສෙයที่พัฒนาขึ้นโดยใช้น้ำยาที่เตรียมได้มีความไว 180 นาโนกรัม/มิลลิลิตรปัสสาวะ มีความถูกต้องและความแม่นยำพอใช้ สามารถวัดได้วันละ 100-150 ตัวอย่าง โดยใช้เวลาในการวัดต่อตัวอย่าง 1-2 นาที การวิเคราะห์อนุพันธ์มอร์ฟินในปัสสาวะโดยวิธีเอนไซม์มัลติแพล็คซิมิวโนแอลส์ເສෙයโดยใช้น้ำยาที่เตรียมขึ้นเองสามารถลดค่าใช้จ่ายได้ประมาณ 60 เท่าของเมื่อใช้น้ำยาสำเร็จรูปจากต่างประเทศ และลดค่าใช้จ่ายได้ประมาณ 10 เท่าของเมื่อใช้วิธีเอดิโอดิมิวโนแอลส์ເສෙය แม้ว่าวิธีเอนไซม์มัลติแพล็คซิมิวโนแอลส์ເສෙයจะมีความไวต่ำกว่าวิธีเอดิโอดิมิวโนแอลส์ເສෙය แต่ก็มีความไวพอที่จะใช้วัดปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟินในปัสสาวะได้ และมีความถูกต้อง ความแม่นยำใกล้เคียงกับวิธีเอดิโอดิมิวโนแอลส์ເສෙය ปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟินในปัสสาวะชาวไทยเชื้อชาติใช้และติดผิวหนังจำนวน 60 ตัวอย่างที่วัดโดยวิธีทั้งสองมีความสัมพันธ์กันและมีค่าสัมประสิทธิ์สัมพันธ์เท่ากับ 0.94

จากการศึกษาครั้งนี้ยังเป็นแนวทางสำหรับการพัฒนาน้ำยาสำเร็จรูปราคาถูกสำหรับวิธีเอนไซม์มัลติแพล็คซิมิวโนแอลส์ເສෙයที่ใช้วิเคราะห์ยาเสพติดและสารประเทอีน ๆ ด้วย

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

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.



กิติกรรมประกาศ

ผู้เขียนในร่องกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พรีดา สิริจินดาการด  
อาจารย์ ดร.ปรีดา ชัยศิริ และรองศาสตราจารย์ ดร.วรารพร คำนอุตรา เป็นอย่างยิ่งที่ได้  
กรุณาให้คำแนะนำและให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้านทำให้วิทยานิพนธ์สำเร็จได้ด้วยดี  
กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุรารัตน์ ทรัพย์โถก ที่ได้กรุณาเป็นประธาน  
กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และค่าลิดたりจารย์นายแพทย์ เทพ ธรรมทองคำ ที่ได้กรุณาเป็น  
กรรมการสอบวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณ อาจารย์อมร เพชรสุม ที่ได้กรุณาช่วยอ่านผลของอินฟราเรดสเปกตรัม<sup>2</sup>  
และนิวเคลียแมกนีติกเรโซโนเมเตอร์สเปกตรัม ขอบคุณ คุณนุ้ย แซ่โซ คุณทิวา ศิริภิญโญยศ และ<sup>3</sup>  
เจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยยาเสพติด สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้  
ความช่วยเหลือและความสะดวกในงานวิจัย

ขอบพระคุณ ภาควิชาชีวเคมี ภาควิชาเคมี ภาควิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาเคมีเทคนิค<sup>4</sup>  
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย<sup>5</sup>  
มหิดล ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในเรื่องเครื่องมือต่าง ๆ ในงานวิจัย และสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์  
การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ได้ให้ทุนอุดหนุนงานวิจัยนี้

ศูนย์วิทยาศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญ



หน้า

บทศัคย์อักษรไทย.....	๙
บทศัคย์อักษรอังกฤษ.....	๑
กิจกรรมประจำ.....	๑
สารบัญตาราง.....	๒
สารบัญภาพ.....	๒
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	๗
<b>บทที่</b>	
1. บทนำ.....	๑
2. เคมีภัณฑ์ วัสดุภัณฑ์ และเครื่องมือ.....	๒๑
2.1 เคมีภัณฑ์.....	๒๑
2.2 วัสดุภัณฑ์.....	๒๒
2.3 หัวอย่างปัสสาวะ.....	๒๒
2.4 เครื่องมือ.....	๒๒
3. วิธีทดลอง.....	๒๔
3.1 การเตรียมสารละลายและแบคทีเรียสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ อนุพันธ์มอร์ฟินโดยวิธีเอนไซม์มัลติเพลค็อกซ์มิวโนแอล เสย.....	๒๔
3.1.1 สารละลายทริสมาร์ส์เอตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.025 ไมล์/ลิตร pH 6.๐.....	๒๔
3.1.2 สารละลายน้ำตาลมอร์ฟินไฮโครคลอไรด์ที่มีความ เข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร.....	๒๔
3.1.3 การเตรียมแบคทีเรียในโครโคคส์ลูตีเยส ( <u>Micrococcus luteus</u> ) .....	๒๔

3.1.4 การเตรียมมอร์ฟิน-ໄลโซไซด์คอนจูเกต.....	26
3.1.5 การทำมอร์ฟิน-ໄลโซไซด์คอนจูเกตให้บริสุทธิ์โดยการ ไกอะไลซิส.....	30
3.1.6 การทำมอร์ฟิน-ໄลโซไซด์คอนจูเกตให้บริสุทธิ์โดยการใช้ คอลัมน์เซปาระเต็กซ์-50.....	30
3.1.7 การทำมอร์ฟิน-ໄลโซไซด์คอนจูเกตให้แห้ง.....	30
3.1.8 การเตรียมสารละลายนมอร์ฟิน-ໄลโซไซด์คอนจูเกต. สำหรับใช้ในเอนไซม์มัลติแพลต์อินมีวานาโนแอดส์เจย์.....	30
3.2 การวิเคราะห์ปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟินโดยวิธีเอนไซม์มัลติแพลต์ อินมีวานาโนแอดส์เจย์.....	31
3.3 การรักแดดรีดิวิติของໄลโซไซด์ที่อยู่ในรูปของมอร์ฟิน-ໄลโซไซด์ คอนจูเกต เมื่อมีและไม่มีแอนติบอดีต่อมอร์ฟิน.....	32
3.4 การศึกษาความไว ความแม่นยำ และความถูกต้องของการรักด ปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟินในปัสสาวะโดยวิธีเอนไซม์มัลติแพลต์ อินมีวานาโนแอดส์เจย์.....	32
4. ผลการทดลอง.....	35
4.1 ผลการเลี้ยงไมโครคอกส์ลูเทียลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (L-Broth) .....	35
4.2 ผลการเตรียมมอร์ฟิน-6-เอมิชัคซิเนต.....	35
4.3 ผลการทำมอร์ฟิน-ໄลโซไซด์คอนจูเกตให้บริสุทธิ์ โดยการใช้ คอลัมน์เซปาระเต็กซ์-50.....	46
4.4 ผลการเตรียมมอร์ฟิน-ໄลโซไซด์คอนจูเกต.....	46
4.5 ผลการเปรียบเทียบแดดรีดิวิติของໄลโซไซด์ที่อยู่ในรูปของมอร์ฟิน- ໄลโซไซด์คอนจูเกต เมื่อมีและไม่มีแอนติบอดีต่อมอร์ฟิน.....	49
4.6 การเปรียบเทียบกราฟมาตรฐานของมอร์ฟินที่ได้จากการใช้ มอร์ฟิน-ໄลโซไซด์คอนจูเกตที่เตรียมได้กับที่ซื้อจากบริษัท Syva..	49

4.7 การศึกษาความไว ความจำเพาะ ความแม่นยำ และความ ถูกต้องของการวัดปริมาณอนุพันธ์อิมฟีนในปัสสาวะด้วยวิธี เอนไซม์มัลติแพลต์อิมมิวโนแอกซ์เจย์.....	53
4.8 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ท่าปริมาณอนุพันธ์อิมฟีนในปัสสาวะ ระหว่างการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอนไซม์มัลติแพลต์อิมมิวโนแอกซ์เจย์ กับวิธีเรดิโอลิมมิวโนแอกซ์เจย์.....	59
5. วิจารณ์ผลการทดลอง.....	66
เอกสารอ้างอิง.....	76
ภาคผนวก.....	85
ประวัติผู้เขียน.....	90

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 การวิเคราะห์มอร์ฟินด้วยวิธีเอนไซม์มัลติเพลค็อกซ์อิมมิโนแอลส์ say.....	31
2 การทดสอบแยกตัวของไลโซไซเมทีอุ่นในรูปของมอร์ฟิน-ไลโซไซเมทคอนจูเกต ระหว่างหลอดที่มีและไม่มีแอนติบอดีต่อมอร์ฟิน.....	32
3 ค่า RF ของอนุพันธ์มอร์ฟินและสารที่นำมากทดสอบที่ได้จากโกรมาໂตกราฟี ชนิดผิวนาง.....	39
4 การเปรียบเทียบคุณสมบัติในการคุณกลืนอินฟรา เรดของมอร์ฟินฟรีเบสและ มอร์ฟิน-6-เอมิชัคชีเนต.....	43
5 ผลการเตรียมมอร์ฟิน-ไลโซไซเมทคอนจูเกต.....	48
6 ความจำเพาะของแอนติบอดีต่อมอร์ฟินของบริษัท Syva.....	56
7 ความแม่นยำของการวัดปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟินในปัสสาวะโดยวิธีเอนไซม์- มัลติเพลค็อกซ์อิมมิโนแอลส์ say.....	57
8 ความถูกต้องของการวัดปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟินในปัสสาวะโดยวิธีเอนไซม์- มัลติเพลค็อกซ์อิมมิโนแอลส์ say.....	58
9 ความจำเพาะของแอนติบอดีต่อมอร์ฟินของบริษัท Roche Diagnostics ....	60
10 ความแม่นยำของการวัดปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟินในปัสสาวะโดยวิธีเรดิโอดี- อิมมิโนแอลส์ say.....	61
11 ความถูกต้องของการวัดปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟินในปัสสาวะโดยวิธีเรดิโอดี- อิมมิโนแอลส์ say.....	62
12 การเปรียบเทียบคุณสมบัติบางอย่างของวิธีวิเคราะห์อนุพันธ์มอร์ฟินในปัสสาวะ <sup>ระหว่างวิธีเอนไซม์มัลติเพลค็อกซ์อิมมิโนแอลส์ say กับวิธีเรดิโอดี-อิมมิโนแอลส์ say ..</sup>	63
13 ปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟินในปัสสาวะของชาวไทยเชื้อชาติไทยเชื้อชาติเชิงวิเคราะห์ โดยวิธีเอนไซม์มัลติเพลค็อกซ์อิมมิโนแอลส์ say และวิธีเรดิโอดี-อิมมิโนแอลส์ say ....	64

## สารบัญรูป

ลำดับที่		หน้า
1	กลไกการทำงานของเอนเคฟฟาสินและฟีน (Snyder, 1977) .....	6
2	แบบจำลองของกลไกการต้อยา (Snyder, 1977) .....	7
3	ขบวนการเมตาบอลิสมของมอร์ฟินที่ศีบ (Way และ Adler, 1961) ....	9
4	ลำดับของกรดอะมิโนของไลโซไซม์ที่สักได้จากไข่ขาวของไก่ (Phillips, 1966) .....	15
5	โครงสร้างของเปปติโดไกลแคนของผนังเซลล์แบคทีเรีย (Leninger, 1976) .....	16
6	กลไกการทำงานของไลโซไซม์ที่บริเวณเร่ง (Phillips, 1966) ....	17
7	หลักการของเอนไซม์มัลติไฟล์ค็อกวิโนแอลสเลย์ (Schneider และคณะ, 1973) .....	19
8	ปฏิกิริยาการเกิดมอร์ฟิน-6-เอมิชัคซิเนตและมอร์ฟิน-ไลโซไซม์คอนจุเกต.	29
9	ลักษณะการเจริญเติบโตของไมโครโคคัสสูเทียสในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (L-Broth) .....	38
10	อัลตราไวโอเรตสเปกตรัมของมอร์ฟินฟรีเบสและมอร์ฟิน-6-เอมิชัคซิเนต.	40
11	อินฟราเรดสเปกตรัมของมอร์ฟินฟรีเบส.....	41
12	อินฟราเรดสเปกตรัมของมอร์ฟิน-6-เอมิชัคซิเนต.....	42
13	นิวเคลียแมค เนติคิริโซแนนซ์สเปกตรัมของมอร์ฟินฟรีเบส.....	44
14	นิวเคลียแมค เนติคิริโซแนนซ์สเปกตรัมของมอร์ฟิน-6-เอมิชัคซิเนต.....	45
15	มอร์ฟิน-ไลโซไซม์คอนจุเกตที่ถูกจะจากคลอสัมบ์เซฟาเด็กซ์-50.....	47
16	การเปรียบเทียบแอคติวิตี้ของไลโซไซม์ที่อยู่ในรูปของมอร์ฟิน-ไลโซไซม์คอนจุเกตที่เตรียมขึ้น เมื่อมีและไม่มีแอนติบอดีต่อมอร์ฟิน.....	50
17	การเปรียบเทียบแอคติวิตี้ของไลโซไซม์ที่อยู่ในรูปของมอร์ฟิน-ไลโซไซม์คอนจุเกตของบริษัท Syva เมื่อมีและไม่มีแอนติบอดีต่อมอร์ฟิน.....	51

หน้า		
รูปที่		
18	กราฟมาตรฐานของมอร์ฟินเมื่อใช้มอร์ฟิน-ไลโซไซม์กอนจุเกตที่เตรียมได้ กับพืชจากบริษัท Syva.....	52
19	กราฟมาตรฐานของมอร์ฟินโดยวิธีเอนไซม์มอลติไพล์อิมมิวนแอลสเลย์.....	55
20	การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์อนุพันธ์มอร์ฟินโดยวิธีเอนไซม์มอลติไพล์ อิมมิวนแอลสเลย์กับวิธีเรดิโอดิโออิมมิวนแอลสเลย์.....	65
21	กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณโปรดีนโดยวิธีของ Lowry และคณะ....	87

คู่นค์วิทยาลัยครุภัณฑ์  
วุฒิวัฒน์มหาวิทยาลัย

## คำย่อ



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
$\mu\text{g}$	=	microgram
$\mu\text{l}$	=	microlitre
NEG	=	negative