

ผลของเฮเทอโรโลกัสคอมบิเนชัน ระหว่างอีโอฟิลลีนติดฉลากเอ็นไซม์และอิมมูโนเจนต่อ
ความไวและความจำเพาะของการวิเคราะห์อีโอฟิลลีนโดยวิธีเอ็นไซม์อิมมูโนแอสเสย์

นางสาวสุธาสิณี พิชญวติน



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชเคมี ภาควิชาเภสัชเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2540

ISBN 974-637-634-9

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

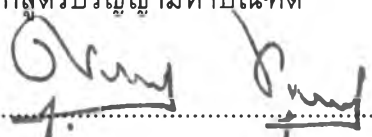
EFFECT OF HETEROLOGOUS COMBINATIONS BETWEEN ENZYME LABELED
THEOPHYLLINE AND IMMUNOGEN ON THE SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF
ENZYME IMMUNOASSAY FOR THEOPHYLLINE

MISS SUTHASINEE PITCHAYAWASIN

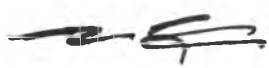
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Pharmacy in Pharmaceutical chemistry
Department of Pharmaceutical Chemistry
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 1997
ISBN 974-637-634-9

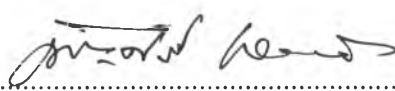
หัวข้อวิทยานิพนธ์ ผลของเฮเทอโรโลกัสคอมบิเนชันระหว่างรีโอฟิลลีนติดฉลาก
เอ็นไซม์และอิมมูโนเจนต่อความไวและความจำเพาะของการ
วิเคราะห์รีโอฟิลลีนโดยวิธีเอ็นไซม์อิมมูโนแอสเสย์
โดย นางสาวสุธาสนี พิชญวติน
ภาควิชา เกสัชเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. เพ็ญศรี ทองนพเนื้อ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ ดร. สุวรรณ หวังวีรวงศ์

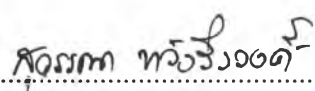
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

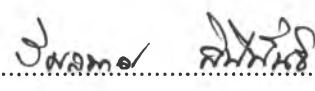

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์นายแพทย์ศุภวัฒน์ ชูติวงศ์)

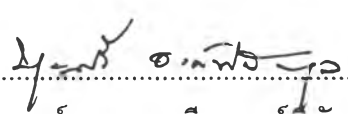
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สมเกียรติ รุจิรวรรณ)


.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.เพ็ญศรี ทองนพเนื้อ)


.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(อาจารย์ ดร. สุวรรณ หวังวีรวงศ์)


.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. วิมลมาศ ลิปิพันธ์)


.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร. บุญศรี องค์กรพัฒนกุล)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว

สุชาลินี พิชญวาทิน : ผลของเฮเทอโรโลกัส คอมบินเนชัน ระหว่างริโอฟิลลีนติดฉลากเอ็นไซม์และ
อิมมูโนเจนต่อความไวและความจำเพาะของการวิเคราะห์ริโอฟิลลีนโดยวิธีเอ็นไซม์อิมมูโนแอสเสย์
อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. เพ็ญศรี ทองนพเนื้อ, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ดร. สุวรรณ หวังวีรวงศ์,
130 หน้า. ISBN 974-637-634-9.

อนุพันธ์ริโอฟิลลีนสี่อนุพันธ์ได้ถูกสังเคราะห์ขึ้นเพื่อติดฉลากกับเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดสและเตรียม
อิมมูโนเจน อนุพันธ์ที่มีความยาวของสายโซ่คาร์บอนต่างกัน ที่ตำแหน่งที่ 7 คือ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-
dimethylxanthine (ก.) และ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (ข.) และอนุพันธ์ ที่มีความยาวของ
สายโซ่คาร์บอนต่างกัน ที่ตำแหน่งที่ 8 ของแซนทีน คือ 8-(3-carboxypropyl)-1,3 dimethylxanthine (ค.) และ
8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (ง.) คอมบินเนชันทั้ง 16 ลักษณะ ระหว่างริโอฟิลลีนติดฉลาก
เอ็นไซม์และอิมมูโนเจนของอนุพันธ์ทั้งหมดนี้ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์ริโอฟิลลีนโดยหลักการแย่งที่ใน
เอ็นไซม์อิมมูโน แอสเสย์ โดยการสร้าง logic plot ระหว่างเปอร์เซ็นต์การจับ และความเข้มข้นของริโอฟิลลีนใน
เทอมของ log ของแต่ละคอมบินเนชัน พบว่าความไวของการวิเคราะห์ในรูปแบบของความชันของเส้นกราฟภายใต้
ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงเมื่อใช้บริดจ์ เฮเทอโรโลกัสคอมบินเนชันระหว่างสารติดฉลากของอนุพันธ์ ง. กับแอนติซีรัม
ของอนุพันธ์ ค. จะดีกว่าการใช้ ไฮโมโลกัสคอมบินเนชันจากอนุพันธ์ ง. และไซท์เฮเทอโรโลกัสคอมบินเนชันระหว่าง
สารติดฉลากเอ็นไซม์ของอนุพันธ์ ง. กับแอนติซีรัมของอนุพันธ์ ข. ซึ่งมีความชันเท่ากับ 34.18, 30.84 และ
20.04 ตามลำดับ ส่วนการใช้บริดจ์และไซท์เฮเทอโรโลกัสคอมบินเนชันให้ความไวที่ต่ำที่สุด สำหรับการเกิดปฏิกิริยา
ข้ามของคาเฟอีนต่อริโอฟิลลีนพบว่า บริดจ์ เฮเทอโรโลกัสคอมบินเนชันมีความจำเพาะเจาะจงต่อ ริโอฟิลลีนดีที่สุด
เมื่อเปรียบเทียบกับคอมบินเนชันลักษณะอื่นดังกล่าวข้างต้น ดังนั้นคอมบินเนชันที่ดีที่สุดในการวิเคราะห์ริโอฟิลลีนโดย
วิธีเอ็นไซม์อิมมูโนแอสเสย์ คือ บริดจ์ เฮเทอโรโลกัสคอมบินเนชันที่ใช้สารติดฉลากเป็น 8-(4-carboxybutyl)-1,3-
dimethylxanthine กับแอนติซีรัม เป็น 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine

ภาควิชา เกสัชเคมี
สาขาวิชา
ปีการศึกษา 2540

ลายมือชื่อนิสิต
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ลายมือชื่อคณาจารย์ที่ปรึกษาอื่น ๆ

C775270 : MAJOR PHARMACEUTICAL CHEMISTRY

KEY WORD: ENZYME IMMUNOASSAY / THEOPHYLLINE / HOMOLOGOUS COMBINATION / HETEROLOGOUS COMBINATION

SUTHASINEE PITCHAYAWASIN : EFFECT OF HETEROLOGOUS COMBINATIONS BETWEEN ENZYME LABELED THEOPHYLLINE AND IMMUNOGEN ON THE SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF ENZYME IMMUNOASSAY FOR THEOPHYLLINE.

THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. PHENSRI THONGNOPNUA, Ph.D. THESIS

CO-ADVISOR : INSTRUCTOR SUWANNA VANGVERAVONG, Ph.D. 130 pp.

ISBN 974-637-634-9.

Four derivatives of theophylline were synthesized for labelling with peroxidase enzyme and preparing immunogens for theophylline. 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (A) and 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (B) contain different carbon chain at the same N-7 position while 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (C) and 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (D) contain different carbon chain at the N-8 position of xanthine structure. Sixteen combinations of enzyme-labeled theophylline and immunogens of all derivatives were utilized in theophylline analysis via competitive enzyme immunoassay. It is demonstrated that sensitivity and specificity of the analysis were dependent upon the combination studied. The log plot between the percentage binding and log theophylline concentration of each combination were established to determine the sensitivity of the method in term of slope of the plot under regression analysis. The sensitivity of the analysis from bridge heterologous combination of enzyme-labelled derivative D and antiserum from C was better than the homologous combination from D and the site heterologous combination of enzyme-labelled derivative D and antiserum from B in which the slopes of the plot were 34.18, 30.84 and 20.04, respectively. The bridge and site heterologous combinations were the worst combination studied. The cross reaction of theophylline with caffeine was also compared among these combinations. The same aforementioned bridge heterologous combination was the only one combination that specific only to theophylline. Thus the best combination for enzyme immunoassay of theophylline would be the bridge combination between 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine and antiserum from 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine

ภาควิชา.....เภสัชเคมี.....

สาขาวิชา.....-.....

ปีการศึกษา.....2540.....

ลายมือชื่อนิสิต.....*Phansri Thongnopnu*.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....*Assoc. Prof. Phansri Thongnopnu*.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....*Assoc. Prof. Phansri Thongnopnu*.....



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ ด้วยความกรุณาของ รองศาสตราจารย์ ดร. เพ็ญศรี ทองนพเนื่อ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ซึ่งได้กรุณาสละเวลาให้คำปรึกษา แนะนำ ตรวจสอบ แก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ด้วยความเอาใจใส่ และให้กำลังใจแก่ผู้ทำวิจัย ตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. สุวรรณ หวังวิรวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาแนะนำให้ความรู้ ข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์อีกทั้งยังช่วยกรุณา ตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ทุกท่านที่ได้กรุณาสละเวลา ตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คณาจารย์ภาควิชาเภสัชเคมีที่ได้กรุณาอบรมสั่งสอนให้ความรู้แก่ผู้ทำวิจัยตลอดการศึกษา ณ ที่แห่งนี้ และขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์คณะเภสัชศาสตร์ และผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่านที่ได้ให้ความกรุณาให้คำปรึกษาและให้ความช่วยเหลือแก่ผู้ทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ภาควิชาเภสัชเคมี ทุกท่านที่ได้ให้ความร่วมมือช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณภาควิชา จุลชีววิทยา และศูนย์เครื่องมือวิจัยทางเภสัชศาสตร์และห้องปฏิบัติการกลาง คณะเภสัชศาสตร์ ที่ได้ให้ความเอื้อเฟื้ออุปกรณ์ เครื่องมือ และสถานที่ สำหรับใช้ในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่ได้กรุณาให้ทุนสนับสนุนบางส่วนสำหรับการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณนิธิตา สุทธิพันธ์, คุณมาลัย ทวีโชติภัทร, คุณวลัยลักษณ์ เมธธาภัทร, คุณนิรภัทพรณ์ สุระเดช และ คุณสุทธาทิพย์ ปรัชญชริณกร

และ ขอขอบคุณ เพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ทั้งในภาควิชา และ นอกภาควิชา เภสัชเคมี ที่ได้มีส่วนช่วยเหลือ ทุกท่าน

สุดท้ายนี้ที่จะลืมเสียมิได้ ผู้ทำวิจัยต้องขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่ได้ให้ความรัก ความเข้าใจ และเป็นกำลังใจ ตลอดมา

สุธาสินี พิษณุวาทิน

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง.
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ.
กิตติกรรมประกาศ	ฉ.
สารบัญ	ช.
สารบัญตาราง	ฅ.
สารบัญรูป	ฉ.
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ท.
บทที่	
1 บทนำ	1
2 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ	5
วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี	5
วิธีการทดลอง	6
1. การสังเคราะห์หอนพ่นรีโอฟิลลีน	6
2. การเตรียมอิมมูโนเจน	10
3. การกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี	13
4. การเตรียมเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดส	15
5. การติดฉลากรีโอฟิลลีนด้วยเอ็นไซม์	16
6. การกำหนดสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา การแย่งที่ระหว่างรีโอฟิลลีนติดฉลากเอ็นไซม์ กับ ละลายสารมาตรฐานรีโอฟิลลีนในการจับกับแอนติบอดี	17
7. การศึกษาผลของเฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชัน ระหว่างรีโอฟิลลีนติดฉลากเอ็นไซม์กับอิมมูโนเจน	18
3 ผลการทดลองและวิจารณ์ผล	20
4 สรุปผล	124

หน้า

รายการอ้างอิง	126
ประวัติผู้เขียน	130

สารบัญญัตินี้

ตารางที่		หน้า
1	การกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในกระต่าย	14
2	อินฟราเรดแอบซอร์ปชัน(Infrared absorption) ของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ก.)	25
3	ค่าเคมีคัลซิฟท์(δ)จาก $^1\text{H-NMR}$ ของ 7-(3-carboxypropyl)- -1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ก.)	28
4	อินฟราเรดแอบซอร์ปชัน(Infrared absorption) ของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ข.)	31
5	ค่าเคมีคัลซิฟท์(δ)จาก $^1\text{H-NMR}$ ของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3- dimethylxanthine (อนุพันธ์ ข.)	34
6	อินฟราเรดแอบซอร์ปชัน(Infrared absorption) ของ 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ค.)	39
7	ค่าเคมีคัลซิฟท์(δ)จาก $^1\text{H-NMR}$ ของ 8-(3-carboxypropyl)- -1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ค.)	42
8	อินฟราเรดแอบซอร์ปชัน(Infrared absorption) ของ 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ง.)	47
9	ค่าเคมีคัลซิฟท์(δ)จาก $^1\text{H-NMR}$ ของ 8-(4-carboxybutyl)-1,3- dimethylxanthine (อนุพันธ์ ง.)	50
10	อินฟราเรดแอบซอร์ปชัน(Infrared absorption) ของ NHS เอสเทอร์ ของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (NHS เอสเทอร์ ของ อนุพันธ์ ก.)	55
11	ค่าเคมีคัลซิฟท์(δ)จาก $^1\text{H-NMR}$ ของ NHS เอสเทอร์ ของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (NHS เอสเทอร์ ของ อนุพันธ์ ก.)	58
12	การหาอัตราส่วนจำนวนโมลของอนุพันธ์ ก. ที่ติดบน BSA ของอิมมูโนเจน ก.	60

13	อินฟราเรดแอบซอร์ปชัน(Infrared absorption) ของ NHS เอสเทอร์ ของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (NHS เอสเทอร์ ของ อนุพันธ์ ข.)	64
14	ค่าเคมีคัลชิฟท์(δ)จาก $^1\text{H-NMR}$ ของ NHS เอสเทอร์ ของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (NHS เอสเทอร์ ของ อนุพันธ์ ข.)	67
15	การหาอัตราส่วนจำนวนโมลของอนุพันธ์ ก. ที่ติดบน BSA ของอิมมูโนเจน ข.	69
16	การหาอัตราส่วนจำนวนโมลของอนุพันธ์ ก. ที่ติดบน BSA ของอิมมูโนเจน ค.	71
17	การหาอัตราส่วนจำนวนโมลของอนุพันธ์ ก. ที่ติดบน BSA ของอิมมูโนเจน ง.	74
18	ค่าไต่เตอร์ของแอนติซีรัม ก. , ข. ,ค. และ ง.	75
19	การหาจำนวนหมู่ฟังก์ชันอะมิโนใน aminated HRP	77
20	การหาอัตราส่วนจำนวนโมลของอนุพันธ์ ก. ที่ติดบน HRP	82
21	การหาอัตราส่วนจำนวนโมลของอนุพันธ์ ข. ที่ติดบน HRP	84
22	การหาอัตราส่วนจำนวนโมลของอนุพันธ์ ค. ที่ติดบน HRP	86
23	การหาอัตราส่วนจำนวนโมลของอนุพันธ์ ง. ที่ติดบน HRP	86
24	ผลการเกิดปฏิกิริยาการแข่งขัน(competition)ระหว่าง ธีโอฟิลลีนติดฉลาก ก. และ สารละลายมาตรฐานธีโอฟิลลีน	93
25	ผลการเกิดปฏิกิริยาการแข่งขัน(competition)ระหว่าง ธีโอฟิลลีนติดฉลาก ข. และ สารละลายมาตรฐานธีโอฟิลลีน	99
26	ผลการเกิดปฏิกิริยาการแข่งขัน(competition)ระหว่าง ธีโอฟิลลีนติดฉลาก ค. และ สารละลายมาตรฐานธีโอฟิลลีน	105
27	ผลการเกิดปฏิกิริยาการแข่งขัน(competition)ระหว่าง ธีโอฟิลลีนติดฉลาก ง. และ สารละลายมาตรฐานธีโอฟิลลีน	111
28	สรุปสถานะแอนติซีรัมและสารติดฉลากที่เหมาะสมที่สุด	112
29	ไฮโมโลกัส คอมบิเนชัน ของการวิเคราะห์ธีโอฟิลลีน	114

ตารางที่		หน้า
30	บริดจ์ เฮเทอโรโลกัสคอมบิเนชันของการวิเคราะห์ธิโอฟิลลีน	116
31	ไซท์ เฮเทอโรโลกัสคอมบิเนชันของการวิเคราะห์ธิโอฟิลลีน	118
32	บริดจ์ และ ไซท์ เฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชัน ของ การวิเคราะห์ธิโอฟิลลีน.....	120
33	เปรียบเทียบผลของคอมบิเนชันลักษณะต่าง ๆ ใน การวิเคราะห์ธิโอฟิลลีน	120
34	% cross reactivity กับ คาเฟอีนระหว่างแอนติซีรัมของ ธิโอฟิลลีนกับสารติดฉลาก	122

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	ปฏิกิริยาในการสังเคราะห์อนุพันธ์ของธีโอฟิลลีน.....	21
2	UV สเปกตรัมของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3- dimethylxanthine (อนุพันธ์ ก.) ความเข้มข้น 33 มกค./มล.	23
3	IR สเปกตรัมของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ก.)	24
4	¹ H-NMR สเปกตรัมของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ก.) ใน DMSO-d ₆	26
5	¹ H-NMR สเปกตรัมของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ก.) ใน DMSO-d ₆ ขยายสเกลจาก 1.96-8.06 ppm	27
6	UV สเปกตรัมของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3- dimethylxanthine (อนุพันธ์ ข.) ความเข้มข้น 33 มกค./มล.	29
7	IR สเปกตรัมของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3- dimethylxanthine (อนุพันธ์ ข.)	30
8	¹ H-NMR สเปกตรัมของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ข.) ใน DMSO-d ₆	32
9	¹ H-NMR สเปกตรัมของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ข.) ใน DMSO-d ₆ ขยายสเกลจาก 1.38-8.09 ppm	33
10	กลไกของปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ 8-(3-carboxypropyl)-1,3- dimethylxanthine (อนุพันธ์ ค.)	36
11	UV สเปกตรัมของ 8-(3-carboxypropyl)-1,3- dimethylxanthine (อนุพันธ์ ค.) ความเข้มข้น 33 มกค./มล.	37
12	IR สเปกตรัมของ 8-(3-carboxypropyl)-1,3- dimethylxanthine (อนุพันธ์ ค.)	38
13	¹ H-NMR สเปกตรัมของ 8-(3-carboxypropyl)-1,3- dimethylxanthine (อนุพันธ์ ค.) ใน DMSO-d ₆	40
14	¹ H-NMR สเปกตรัมของ 8-(3-carboxypropyl)-1,3- dimethylxanthine (อนุพันธ์ ค.) ใน DMSO-d ₆ ขยายสเกลจาก 1.86-3.43 ppm	41

รูปที่	หน้า
15	กลไกของปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ง.) 44
16	UV สเปกตรัมของ 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ง.) ความเข้มข้น 33 มก./มล. 45
17	IR สเปกตรัมของ 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ง.) 46
18	¹ H-NMR สเปกตรัมของ 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ง.) ใน DMSO-d ₆ 48
19	¹ H-NMR สเปกตรัมของ 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ง.) ใน DMSO-d ₆ ขยายสเกลจาก 1.60-3.42 ppm 49
20	กลไกของปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ NHS เอสเทอร์ ของอนุพันธ์ ณ ตำแหน่งที่ 7 (อนุพันธ์ ก. และ ข.) 52
21	UV สเปกตรัมของ NHS เอสเทอร์ ของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (NHS เอสเทอร์ ของ อนุพันธ์ ก.) ความเข้มข้น 33 มก./มล. 53
22	IR สเปกตรัมของ NHS เอสเทอร์ ของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (NHS เอสเทอร์ ของ อนุพันธ์ ก.) 54
23	¹ H-NMR สเปกตรัมของ NHS เอสเทอร์ ของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (NHS เอสเทอร์ ของ อนุพันธ์ ก.) ใน CDCl ₃ 56
24	¹ H-NMR สเปกตรัมของ NHS เอสเทอร์ ของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (NHS เอสเทอร์ ของ อนุพันธ์ ก.) ใน CDCl ₃ ขยายสเกลจาก 1.55-7.69 ppm 57
25	UV สเปกตรัมเปรียบเทียบระหว่างอิมมูโนเจน ก. (1),อนุพันธ์(ก.) และ BSA(3) ความเข้มข้น 0.500 มก./มล. 59
26	UV สเปกตรัมของ NHS เอสเทอร์ ของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (NHS เอสเทอร์ ของ อนุพันธ์ ข.) ความเข้มข้น 33 มก./มล. 62
27	IR สเปกตรัมของ NHS เอสเทอร์ ของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (NHS เอสเทอร์ ของ อนุพันธ์ ข.) 63

รูปที่	หน้า
28	¹ H-NMR สเปกตรัมของ NHS ester ของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (NHS ester ของ อนุพันธ์ ข.) ใน CDCL ₃ 65
29	¹ H-NMR สเปกตรัมของ NHS ester ของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (NHS ester ของ อนุพันธ์ ข.) ใน CDCL ₃ ขยายสเกลจาก 1.54-7.62 ppm 66
30	UV สเปกตรัมเปรียบเทียบระหว่างอิมมูโนเจน ข. (1),อนุพันธ์(ข.) และ BSA(3) ความเข้มข้น 0.286 มก./มล. 68
31	UV สเปกตรัมเปรียบเทียบระหว่างอิมมูโนเจน ค. (1),อนุพันธ์(ค.) และ BSA(3) ความเข้มข้น 0.500 มก./มล. 70
32	UV สเปกตรัมเปรียบเทียบระหว่างอิมมูโนเจน ง. (1),อนุพันธ์(ง.) และ BSA(3) ความเข้มข้น 0.500 มก./มล. 73
33	กราฟแสดงผลการหาไตเตอร์ของแอนติซีรัม ก. , ข. ,ค. และ ง. 76
34	UV สเปกตรัม ของ aminated HRP 3.00 มก./มล. 78
35	ปฏิกิริยาเคมีในการสังเคราะห์อนุพันธ์อิโพลีลีน ณ ตำแหน่งที่ 7 ติดฉลากเอ็นไซม์ HRP 80
36	UV สเปกตรัมเปรียบเทียบระหว่างอนุพันธ์ ก. ที่ติดฉลากเอ็นไซม์ (1), อนุพันธ์ ก. (2) และ เอ็นไซม์ (3) ความเข้มข้น 3.00 มก./มล. 81
37	UV สเปกตรัมเปรียบเทียบระหว่างอนุพันธ์ ข. ที่ติดฉลากเอ็นไซม์ (1), อนุพันธ์ ข. (2) และ เอ็นไซม์ (3) ความเข้มข้น 3.00 มก./มล. 83
38	UV สเปกตรัมเปรียบเทียบระหว่างอนุพันธ์ ค. ที่ติดฉลากเอ็นไซม์ (1), อนุพันธ์ ค. (2) และ เอ็นไซม์ (3) ความเข้มข้น 3.00 มก./มล. 85
39	UV สเปกตรัมเปรียบเทียบระหว่างอนุพันธ์ ง. ที่ติดฉลากเอ็นไซม์ (1), อนุพันธ์ ง. (2) และ เอ็นไซม์ (3) ความเข้มข้น 3.00 มก./มล. 87
40	ผลของปฏิกิริยาแย่งที่ระหว่างสารติดฉลาก ก. อัตราส่วนความเจือจาง 1:100 สารละลายมาตรฐานอิโพลีลีน 89
41	ผลของปฏิกิริยาแย่งที่ระหว่างสารติดฉลาก ก. อัตราส่วนความเจือจาง 1:500 สารละลายมาตรฐานอิโพลีลีน 90
42	ผลของปฏิกิริยาแย่งที่ระหว่างสารติดฉลาก ก. อัตราส่วนความเจือจาง 1:800 สารละลายมาตรฐานอิโพลีลีน 91

รูปที่	หน้า
43	ผลของปฏิกิริยาแย่งที่ระหว่างสารติดฉลาก ก. อัตราส่วนความเจือจาง 1:1,000 สารละลายมาตรฐานธิโอฟิลลีน 92
44	ผลของปฏิกิริยาแย่งที่ระหว่างสารติดฉลาก ข. อัตราส่วนความเจือจาง 1:1,000 สารละลายมาตรฐานธิโอฟิลลีน 95
45	ผลของปฏิกิริยาแย่งที่ระหว่างสารติดฉลาก ข. อัตราส่วนความเจือจาง 1:5,000 สารละลายมาตรฐานธิโอฟิลลีน 96
46	ผลของปฏิกิริยาแย่งที่ระหว่างสารติดฉลาก ข. อัตราส่วนความเจือจาง 1:8,000 สารละลายมาตรฐานธิโอฟิลลีน 97
47	ผลของปฏิกิริยาแย่งที่ระหว่างสารติดฉลาก ข. อัตราส่วนความเจือจาง 1:10,000 สารละลายมาตรฐานธิโอฟิลลีน 98
48	ผลของปฏิกิริยาแย่งที่ระหว่างสารติดฉลาก ค. อัตราส่วนความเจือจาง 1:500 สารละลายมาตรฐานธิโอฟิลลีน 101
49	ผลของปฏิกิริยาแย่งที่ระหว่างสารติดฉลาก ค. อัตราส่วนความเจือจาง 1:800 สารละลายมาตรฐานธิโอฟิลลีน 102
50	ผลของปฏิกิริยาแย่งที่ระหว่างสารติดฉลาก ค. อัตราส่วนความเจือจาง 1:1,000 สารละลายมาตรฐานธิโอฟิลลีน 103
51	ผลของปฏิกิริยาแย่งที่ระหว่างสารติดฉลาก ค. อัตราส่วนความเจือจาง 1:5,000 สารละลายมาตรฐานธิโอฟิลลีน 104
52	ผลของปฏิกิริยาแย่งที่ระหว่างสารติดฉลาก ง. อัตราส่วนความเจือจาง 1:100 สารละลายมาตรฐานธิโอฟิลลีน 107
53	ผลของปฏิกิริยาแย่งที่ระหว่างสารติดฉลาก ง. อัตราส่วนความเจือจาง 1:500 สารละลายมาตรฐานธิโอฟิลลีน 108
54	ผลของปฏิกิริยาแย่งที่ระหว่างสารติดฉลาก ง. อัตราส่วนความเจือจาง 1:1,000 สารละลายมาตรฐานธิโอฟิลลีน 109
55	ผลของปฏิกิริยาแย่งที่ระหว่างสารติดฉลาก ง. อัตราส่วนความเจือจาง 1:4,000 สารละลายมาตรฐานธิโอฟิลลีน 110
56	กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ธิโอฟิลลีนโดยใช้ ไอโมโลกัส คอมบิเนชัน 113

รูปที่		หน้า
57	กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ธีโอฟิลลีนโดยใช้ บริดจ์ เฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชัน	115
58	กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ธีโอฟิลลีนโดยใช้ ไซท์ เฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชัน	117
59	กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ธีโอฟิลลีนโดยใช้ บริดจ์ และ ไซท์ เฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชัน	119
60	กราฟเปรียบเทียบผลของ คอมบิเนชันลักษณะต่าง ๆ ในการวิเคราะห์ ธีโอฟิลลีน	121

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

°C	องศาเซลเซียส
%	เปอร์เซ็นต์
A	absorbance
a	absorptivity
BSA	bovine serum albumin
cm	centimeter
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
HCl	hydrochloric acid
Hz	hertz
H ₂ O ₂	hydrogen peroxide
HRP	horseradish peroxidase
IR	infrared
J	coupling constant
l	litre
M	molar
mg	milligram
MW	molecular weight
N	normality
nm	nanometer
NMR	nuclear magnetic resonance
NSS	normal saline solution
OPD	O-phenylenediamine
PBS	phosphate buffer saline
PBS-T	phosphate buffer saline with tween 20
ppm	part per million
r	correlation coefficient
SC	subcutaneous

UV

ultraviolet

λ

wavelength

v/v

volume by volume

w/v

weight by volume

ϵ

molar absorptivity

บทที่ 1

บทนำ



การวิเคราะห์ด้วยวิธีอิมมูโนแอสเสย์ เป็นการวิเคราะห์ที่อาศัยหลักการของการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน (antigen) และ แอนติบอดี (antibody) วิธีอิมมูโนแอสเสย์มีชื่อเรียกได้ต่างๆตามตัววัดผลลากที่ใช้เช่น เรดิโออิมมูโนแอสเสย์ (radioimmunoassay) จะใช้สารกัมมันตรังสีเป็นตัววัดผลลาก หรือเอ็นไซม์อิมมูโนแอสเสย์ (enzyme immunoassay) ซึ่งใช้เอ็นไซม์เป็นตัววัดผลลาก เป็นต้น

ปัญหาหนึ่งของการวิเคราะห์ด้วยวิธีอิมมูโนแอสเสย์ อยู่ที่ความจำเพาะเจาะจง (specificity) ของการวิเคราะห์ โดยแอนติบอดีที่สร้างขึ้นตามปกติ ซึ่งเรียกว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดี (Polyclonal antibody) มักจะไม่ได้จำเพาะกับเฉพาะสารที่ต้องการวิเคราะห์ แต่มักจะสามารถทำปฏิกิริยากับสารอื่น ๆ ที่มีโครงสร้างคล้ายกับสารที่ต้องการ (cross reaction) ได้มีความพยายามแก้ไขปัญหของความจำเพาะเจาะจงโดยการใช้แอนติบอดีชนิดโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) ซึ่งพบว่าทำให้ความจำเพาะของการวิเคราะห์ดีขึ้น (Ferencik, 1993) แต่วิธีการเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดีมีความยุ่งยากใช้เวลานานและมีค่าใช้จ่ายสูงกว่าการทำโพลีโคลนอลแอนติบอดีมาก (Sikora and Smedly, 1984)

นอกจากนี้ได้มีความพยายามเพิ่มความจำเพาะเจาะจงของการใช้ โพลีโคลนอลแอนติบอดีด้วยการนำหลักการของเฮเทอโรโลจิสคอมบิเนชัน (heterologous combination) มาใช้โดยเฉพาะกับการทำเอ็นไซม์อิมมูโนแอสเสย์ ปกติแล้วเฮปเทน (hepten ซึ่งหมายถึงสารที่ต้องการวิเคราะห์และสามารถนำมาติดผลลากหรือเตรียมเป็น อิมมูโนเจนได้) ที่ติดผลลากด้วยเอ็นไซม์กับเฮปเทนที่เตรียมอิมมูโนเจนเป็นอนุพันธ์ตัวเดียวกัน ซึ่งจะเรียกกันว่า โฮโมโลจิส คอมบิเนชัน (Homologous combination) (Ishikawa et al., 1981) แต่ถ้าเฮปเทนที่ติดผลลากด้วยเอ็นไซม์กับเฮปเทนที่เตรียมอิมมูโนเจนเป็นอนุพันธ์ต่างกัน จะเป็น เฮเทอโรโลจิส คอมบิเนชัน (Heterologous combination) (Van Weemen, 1975) (Van Weemen and Schuurs, 1976)

เฮเทอโรโลจิสคอมบิเนชันมีได้ 3 ลักษณะ โดยถ้าเฮปแทนในการเตรียม อิมมูโนเจนเป็นอนุพันธ์ที่มีความยาวของสายโซ่ (bridge chain) ต่างกันกับเฮปแทนที่นำมา ติดฉลากด้วยเอ็นไซม์ เรียกว่า บริดจ์เฮเทอโรโลจิส คอมบิเนชัน (Bridge heterologous combination) (Van Weemen et al., 1972; 1975; Hosoda et al., 1980; 1981; 1983ก, 1983ข; 1985;1986) ถ้าเฮปแทนในการเตรียมอิมมูโนเจนเป็นอนุพันธ์ที่มี สายโซ่มาต่อ ณ ตำแหน่งที่ต่างกันกับเฮปแทนที่นำมาติดฉลากด้วยเอ็นไซม์เรียกว่าไซท์ เฮเทอโรโลจิส คอมบิเนชัน (site heterologous combination) (Van Weemen et al., 1975; Hosoda et al., 1980) ถ้าเฮปแทนในการเตรียมอิมมูโนเจนเป็นอนุพันธ์ที่มีทั้ง สายโซ่และตำแหน่งสายโซ่ที่มาต่อต่างกันกับเฮปแทนที่นำมาติดฉลากด้วยเอ็นไซม์ เรียกว่า บริดจ์และไซท์เฮเทอโรโลจิส คอมบิเนชัน (Bridge and Site heterologous combination) (Hosoda et al., 1980)

มีรายงานต่าง ๆ กล่าวถึงความพยายามใช้ หลักการของเฮเทอโรโลจิส คอมบิเนชัน เมื่อแอนติบอดีเป็นโพลีโคลนอลแอนติบอดีซึ่งพบว่าสามารถช่วยเพิ่มความไว และความจำเพาะของการวิเคราะห์เป็นการหักล้างข้อเสียของการใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดี

ตัวอย่างเช่น ในการศึกษาเฮเทอโรโลจิส คอมบิเนชันของ estrogen (Van Weemen and Schuur, 1975) โดยใช้อนุพันธ์ ณ ตำแหน่งที่ 17 ของ estradiol ($C_{18}H_{24}O_2$) พบว่า การใช้บริดจ์ เฮเทอโรโลจิส คอมบิเนชันระหว่างแอนติบอดีจาก estradiol-17-hemisuccinate ($C_{22}H_{28}O_5$) กับสารติดฉลากจาก estradiol-17-hemiglutarate ($C_{23}H_{30}O_5$) และ การใช้ไซท์เฮเทอโรโลจิส คอมบิเนชัน ระหว่างแอนติบอดี จากอนุพันธ์ ณ ตำแหน่งที่ 17 คือ estradiol-17-hemisuccinate ($C_{22}H_{28}O_5$) กับ สารติดฉลากจากอนุพันธ์ ณ ตำแหน่งที่ 11 คือ 11- α -OH-estradiol-11-hemisuccinate ($C_{22}H_{30}O_7$) พบว่าการใช้บริดจ์ เฮเทอโรโลจิส คอมบิเนชัน จะให้ความไว ของการวิเคราะห์ที่สูงที่สุด

ส่วนความจำเพาะของการวิเคราะห์ โดยการทดสอบกับ non estrogen steroid พบว่า ผลยังไม่แน่ชัดขึ้นกับชนิดของ non estrogen steroid ที่ใช้ทดสอบ แต่ปรากฏว่า การใช้บริดจ์ เฮเทอโรโลจิสคอมบิเนชันจะมีผลต่อความจำเพาะน้อยกว่า การใช้ ไซท์ เฮเทอโรโลจิส คอมบิเนชัน

หรือในการวิเคราะห์ Testosterone (Hosoda et al.,1980) โดยการศึกษา บริดจ์ เฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชันระหว่างแอนติบอดี จากอนุพันธ์ ณ ตำแหน่งที่ 4 ของ testosterone คือ แอนติซีรั่มจาก 4-O-hemiglutaroyl-4-hydroxytestosterone ($C_{24}H_{32}O_6$) และ สารติดตามจาก 4-hemisuccinoyl-4-hydroxytestosterone ($C_{23}H_{32}O_6$) , 4-(2-carboxymethylthio)testosterone ($C_{21}H_{30}O_4S$) และ 4-(carboxylethylthio) testosterone ($C_{22}H_{32}O_4S$) และการศึกษาไซท์ เฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชัน ระหว่างแอนติบอดีจากอนุพันธ์ ณ ตำแหน่งที่ 4 คือ 4-hemiglutaroyl-4-hydroxytestosterone ($C_{24}H_{32}O_6$) กับสารติดตาม จากอนุพันธ์ ณ ตำแหน่งที่ 3 คือ 3-(O-carboxymethyl)oxime ($C_{21}H_{27}NO_4$) และอนุพันธ์ ณ ตำแหน่งที่ 17 คือ 17-O-hemisuccinoyltestosterone ($C_{23}H_{32}O_5$) ผลพบว่าการใช้บริดจ์ เฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชัน จะให้ความไวของการวิเคราะห์ที่ดีที่สุด ส่วนผลของความจำเพาะเจาะจง โดยทดสอบกับ สารที่มีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงกับ testosterone 10 ชนิด พบว่าการใช้เฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชันทำให้ความจำเพาะของการวิเคราะห์ลดลง โดยการใช้ไซท์ เฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชัน มีผลต่อความจำเพาะเจาะจงมากกว่า การใช้บริดจ์ เฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชัน

นอกจากนี้ ผลของการศึกษาใน Cortisol (Hosoda et al,1981) และ 11-deoxycortisol (Hosoda et al,1983) ก็พบว่า บริดจ์ เฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชัน ให้ความไวในการ วิเคราะห์ที่ดีที่สุด

จากการศึกษา การนำเฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชันมาใช้ในการวิเคราะห์ต่าง ๆ จึงยังไม่มีข้อสรุปของการใช้แบบใดแบบหนึ่งโดยเฉพาะซึ่ง Nishikawa และคณะ ได้รายงานไว้ว่า การเลือกใช้เฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชัน ลักษณะใดยังคงต้องขึ้นกับตัวยาแต่ละตัวที่ต้องการศึกษา (Nishikawa et al., 1984)

ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาถึงลักษณะของ เฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชัน แบบต่าง ๆ โดยเลือกใช้ตัวยาริโอฟิลลีน เนื่องจากริโอฟิลลีนเป็นยาที่มีการใช้กันมานานและมีความจำเป็นต้องมี การติดตามและควบคุมระดับยา(Mcdonal,1978;Sadee et al.,1980) และยังไม่เคยมีรายงานการนำหลักการของเฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชันมาใช้กับยานี้เลย

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อเปรียบเทียบผลของเฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชันแบบต่าง ๆ ต่อการวิเคราะห์ ธิโอฟิลลีนด้วย เอ็นไซม์อิมมูโนแอสเสย์
2. เพื่อศึกษาแนวทางในการเพิ่มความไว และ ความจำเพาะเจาะจงของการวิเคราะห์ยาธิโอฟิลลีน โดยใช้หลักการของ เฮเทอโรโลกัส อิมมูโนแอสเสย์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. จะได้ทราบถึงข้อมูลของการศึกษาเฮเทอโรโลกัสคอมบิเนชันในเอ็นไซม์อิมมูโนแอสเสย์สำหรับการวิเคราะห์ยาธิโอฟิลลีน
2. จะเป็นการเพิ่มข้อมูลในการศึกษาเฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชันในอิมมูโนแอสเสย์เพื่อใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาสำหรับยาตัวอื่น ๆ ต่อไป

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1. สารเคมี

Theophylline และ 2,2-oxylbis (ethylamine) จาก Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, USA). Ethyl-4-bromobutyrate, Ethyl-5-bromovalerate, *N*-hydroxysuccinimide, Sodium borohydride, 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride, Horseradish peroxidase, Sodium metaperiodate, Trinitrobenzene sulfonic acid, Bovine Serum Albumin, 4,5-Diamino-1,3-dimethylpyrimidine-2,6-dione, Glutaric anhydride, *N,N*-dimethylaniline, Adipic acid monoethyl ester จาก Sigma Chemical Company (Montana, USA) *O*-phenylenediamine จาก Zymed Laboratories, INC (SF, USA). Complete Freund's adjuvant และ Incomplete Freund's adjuvant จาก Ditco (Detroit, Mich., USA.) Sodium acetate, Sodium bicarbonate, Sodium chloride, Sodium dihydrogenphosphate, Disodium hydrogen phosphate, Tween 20, Dimethylformamide, Ethanol, Ethyl acetate, Chloroform, Methanol, Hydrochloric acid, Sulfuric acid, Glacial acetic acid, Hydrogen peroxide, Tributylamine, Isobutyl chloroformate จาก E. Merck Damstadt, Germany. Thimerosal จาก Keck's (San Francisco, USA.)

2. สัตว์ทดลอง

กระต่ายพันธุ์ Newzealand white rabbit เพศเมีย น้ำหนัก 2.0 - 3.0 กิโลกรัม 8 ตัว จากภาควิชาสัตวบาล คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. เครื่องมือและอุปกรณ์

Ultraviolet Spectrophotometer (Spectronic'3000 Array, Milton Roy Co.) USA; Infrared Spectrophotometer, (Perkin-Elmer model FT-IR) CT, USA.; Nuclear

Magnetic Resonance Spectrophotometer (Model JNM-500, Jueol limited) Japan; Buchi Capillary Melting point apparatus (Nach Dr. Tottoli, Buchi) Switzerland; Analytical Balance (Satorious type, WRC 6001, Satorious-Werke GMBH) Germany; pH-meter (Consort pH meter electrochemical multimeter) Germany; Vortex mixer (Vortex Genei, Scientific Industries Inc.) New York, USA.; Centrifuge (Hetlich zentrifugen, EBA12) Germany; Micropipet (Socorex) USA; Microplate reader (ELISA plate reader, Bio-Rad Model 3550, Bio-Rad Laboratories) USA.; Freezed dryer (Dura-Dry) New York, USA.

วิธีการทดลอง

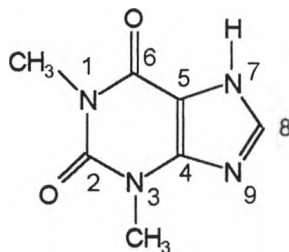
1. การสังเคราะห์อนุพันธ์ของธิโอฟิลลีน
2. การเตรียมอิมมูโนเจนของอนุพันธ์ธิโอฟิลลีน
3. การกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี
4. การเตรียมธิโอฟิลลีนติดฉลากเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดส
5. การติดฉลากธิโอฟิลลีนด้วยเอ็นไซม์
6. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดการแย่งที่ (competition) ระหว่างธิโอฟิลลีนติดฉลาก และสารละลายมาตรฐานธิโอฟิลลีน
7. การศึกษาผลของ เฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชัน ระหว่างสารติดฉลากธิโอฟิลลีนกับอิมมูโนเจน

1. การสังเคราะห์อนุพันธ์ของธิโอฟิลลีน

การสร้างอิมมูโนเจนหรือตัวติดฉลากเอ็นไซม์จากธิโอฟิลลีนต้องมีการเตรียมธิโอฟิลลีนให้สามารถจับกับหมู่อะมิโน (amino group) ของเอ็นไซม์หรือของโปรตีนในขั้นตอนเตรียมตัวติดฉลากหรืออิมมูโนเจนได้

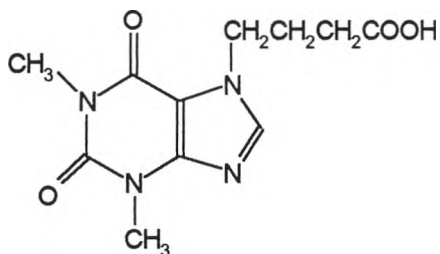
การศึกษานี้ได้เตรียมอนุพันธ์ธิโอฟิลลีน 4 ตัว ซึ่งต่างกันที่ตำแหน่งสายโซ่ (site chain) หรือความยาวของสายโซ่ (bridge chain) เพื่อเปรียบเทียบความสามารถของแอนติบอดีที่เกิดจากอนุพันธ์แต่ละตัว ตามหลักการของไซท์ เฮเทอโรโลกัส และ บริดจ์ เฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชัน โดยสูตรโครงสร้างของอนุพันธ์ของธิโอฟิลลีนจะได้แสดงต่อไปนี้

สูตรโครงสร้างของอนุพันธ์ของธีโอฟิลลีน(1,3-dimethylxanthine)

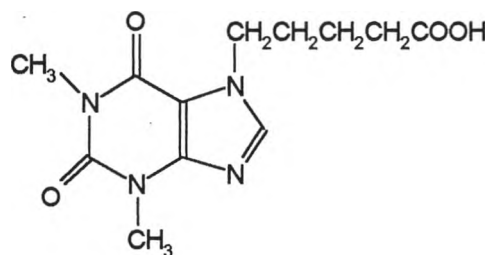


อนุพันธ์ธีโอฟิลลีนที่ต้องการสังเคราะห์

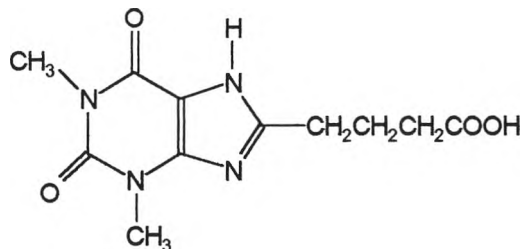
อนุพันธ์ ก. 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine



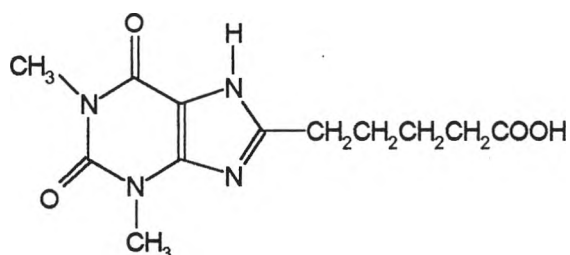
อนุพันธ์ ข. 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine



อนุพันธ์ ค. 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine



อนุพันธ์ ง. 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine



1.1 การสังเคราะห์ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ก.) (Hu and Singh, 1980)

ผสม Theophylline 18.0 กรัม (0.1 โมล) , sodium carbonate 21.5 กรัม (0.2 โมล) และ ethyl-4-bromobutyrate 39.0 กรัม (0.2 โมล) ใน dimethylformamide (DMF) 20 มิลลิลิตร แล้ว กวนที่อุณหภูมิห้องนาน 18 ชั่วโมง จากนั้น เติมน้ำและสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม นำชั้นคลอโรฟอร์มมาล้างด้วยน้ำ ระเหยคลอโรฟอร์มด้วย เครื่องกลั่นระเหยรวดเร็วภายใต้ความกดดันต่ำชนิดหมุนได้ (rotary evaporator) ได้ของเหลว คล้ายน้ำมันสีเหลือง เติม 10% HCl แล้วอุ่นให้ร้อนที่ 80-90°ซ นาน 45 นาที ล้างด้วย คลอโรฟอร์ม 2 ครั้ง จะได้อนุพันธ์ ก. ในชั้นน้ำ นำมาทำการตกผลึกซ้ำในน้ำได้ผลึกรูปเข็ม ขาวของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ก.) หนัก 15.2 กรัม คิด เป็น 57% เป็น โดยมีจุดหลอมเหลว ที่ 176-177°ซ สารที่ได้นี้จะต้องนำไปพิสูจน์สูตรโครงสร้างของอนุพันธ์ ก. โดยวิธีการทาง IR และ NMR ต่อไป

1.2 การสังเคราะห์ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ข.) (Hu and Singh, 1980)

ผสม Theophylline 18.0 กรัม (1.0 โมล), sodium carbonate 21.5 กรัม (0.2 โมล) และ Ethyl-5-bromovalerate 41.8 กรัม (0.2 โมล) ใน DMF 20.0 มิลลิลิตร แล้วกวนที่อุณหภูมิห้องนาน 18 ชั่วโมง จากนั้นเติมน้ำและสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม นำชั้นคลอโรฟอร์มมาล้างด้วยน้ำ ระเหยคลอโรฟอร์มด้วยเครื่องกลั่นระเหยรวดเร็วภายใต้ความกดดันต่ำชนิดหมุนได้ ได้ของเหลวคล้ายน้ำมันสีเหลือง เติม 10% HCl อุณหภูมิ 80-90°C นาน 45 นาที ล้างด้วยคลอโรฟอร์ม 2 ครั้ง สารที่ต้องการจะอยู่ในชั้นน้ำ นำมาทำการตกผลึกซ้ำในน้ำได้ผลึกรูปเข็มสีขาวของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ข.) หนัก 4.5 กรัม คิดเป็น 16% โดยมีจุดหลอมเหลว ที่ 108-110°C พิสูจน์สูตรโครงสร้างโดยวิธีการทาง IR และ NMR ต่อไป

1.3 การสังเคราะห์ 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ค.) (Cook et al., 1976)

รีฟลักซ์ (reflux) 4,5-diamino-1,3-dimethylpyrimidine-2,6-dione 3.3 กรัม (0.2 โมล) และ glutaric anhydride 4.5 กรัม (0.4 โมล) เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง ใน *N,N*-dimethyl aniline 30 มิลลิลิตร ภายใต้ก๊าซไนโตรเจน โดยใช้ Dean-Stark trap ดักน้ำ เติม *N,N*-dimethyl aniline อีก 20 มิลลิลิตร รีฟลักซ์ต่ออีกครั้งชั่วโมง ปล่อยให้ผสมเย็น นำมากรอง ล้างตะกอนด้วยเบนซีน ทำการตกผลึกซ้ำในน้ำ ได้ของผงตะกอนสีเหลืองอ่อน หนักของ 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ค.) 1.78 กรัม คิดเป็น 36.40% คาดว่าเป็น โดยมีจุดหลอมเหลว ที่ 232-235°C พิสูจน์สูตรโครงสร้างโดยวิธีการทาง IR และ NMR ต่อไป

1.4 การสังเคราะห์ 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ง.) (Daly et al., 1985; Kim et al., 1994)

ผสม 4,5-diamino-1,3-dimethylpyrimidine-2,6-dione 10.5 กรัม (0.06 โมล), 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide hydrochloride 11.5 กรัม (0.06 โมล) และ Adipic acid monoethyl ester 10.5 กรัม (0.06 โมล) ใน

DMF 20 มิลลิลิตร กวนของผสมที่อุณหภูมิห้องนาน 3 ชั่วโมง ได้สารละลายใสสีเหลือง นำมาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้สารละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มกับเมทานอล ในอัตราส่วน 9:1 เป็นตัวชะ (eluent) หลังจากกระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องกลั่นระเหยรวดเร็ว ภายใต้ความกดดันต่ำชนิดหมุนได้จะได้ผงตะกอนสีขาว นำตะกอนที่ได้มารีฟลักซ์ใน 2N NaOH 1 ชั่วโมง ปรับ pH สารละลายที่ได้ให้เป็นกลางด้วย 10% HCl ตั้งไว้ให้ตกผลึกที่อุณหภูมิห้อง ได้ผงตะกอนสีขาว 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine(อนุพันธ์ ง.) หนัก 0.63 กรัม คิดเป็น 4% โดยมีจุดหลอมเหลว ที่ 238-240^oซ พิสูจน์สูตรโครงสร้างโดยวิธีการทาง IR และ NMR ต่อไป

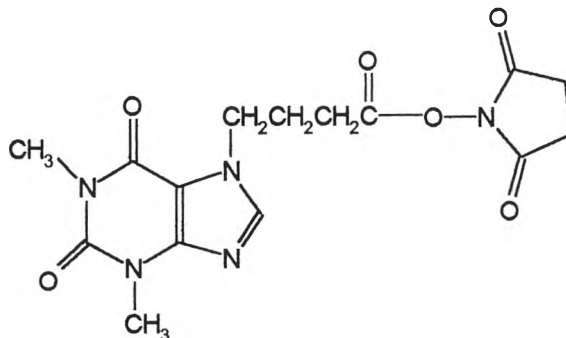
2. การเตรียมอิมมูโนเจนของอนุพันธ์อีโอฟิลีน

2.1 การเตรียมอิมมูโนเจนของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (อิมมูโนเจน ก.)

การเตรียม *N*-hydroxysuccinimide เอสเทอร์ของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine

เติม 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride 4.6 กรัม (0.02 โมล) และ *N*-hydroxysuccinimide 2.8 กรัม (0.02 โมล) ลงในสารละลายของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine 4.2 กรัม (0.02 โมล) ใน DMF 15 มิลลิลิตร ผสมที่ 0^oซ จนได้สารละลายใส แล้วนำมากวนที่ 4^oซ นาน 40 ชั่วโมง ได้ตะกอนขาวเกิดขึ้น กรอง ล้างด้วยเมทานอล ทำตะกอนให้แห้งในสุญญากาศ ได้ผงตะกอนสีขาว 3.6 กรัม คิดเป็น 62.15% ซึ่งเป็น NHS เอสเทอร์ ของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine โดยมีจุดหลอมเหลวที่ 215-216^oซ พิสูจน์สูตรโครงสร้างด้วย IR และ NMR ต่อไป

สูตรโครงสร้างของ NHS เอสเทอร์ ของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine



ค่อยๆ เติมสารละลายของ NHS เอสเทอร์ของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine 1.7 กรัม (6.0×10^{-3} โมล) ละลายใน DMF 15.0 มิลลิลิตร ลงในสารละลายของ BSA 7.0 กรัม (1.0×10^{-4} โมล) ใน 0.1 M โซเดียมคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ (pH 9.5) 40.0 มิลลิลิตร กวนเบา ๆ ที่ 4°C นาน 16 ชั่วโมง จากนั้นนำของผสมมาทำไดอะไลซิส (dialyse) ใน PBS pH 7.0 ที่ 4°C จน NHS เอสเทอร์ของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine ที่ไม่ได้จับกับ BSA หหมดไป นำของเหลวที่เหลือมาทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (freeze dry) ได้อิมมูโนเจน ก.หนัก 15.2 กรัม

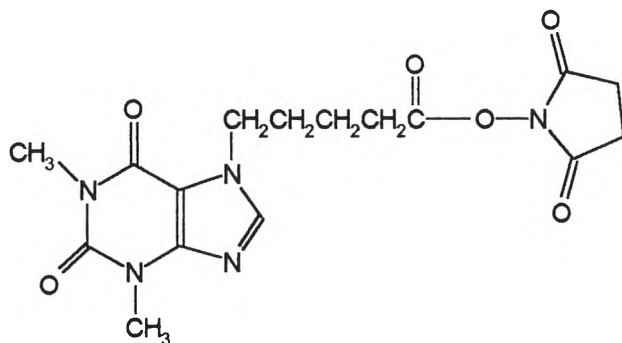
จากอิมมูโนเจน ก.ที่ได้นำไปหาจำนวนอนุพันธ์ ก.ที่ติดกับ BSA โดยหลักการทางสเปกโทรสโกปี

2.2 การเตรียมอิมมูโนเจนของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (อิมมูโนเจน ข.)

การเตรียม N-hydroxysuccinimide เอสเทอร์ของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine

เติม 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride 7.3 กรัม (3.82 มิลลิโมล) และ N-hydroxysuccinimide 0.43 กรัม (3.75 มิลลิโมล) ลงใน 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine 7.1 กรัม (0.025 โมล) ใน DMF 25.0 มิลลิลิตร ผสมกัน 0°C จนได้สารละลายใสแล้วนำมาที่ 4°C นาน 40 ชั่วโมงได้ตะกอนขาวเกิดขึ้นทำการกรองล้างด้วยเมทานอลทำตะกอนให้แห้งในสุญญากาศได้ผงตะกอนสีขาว 3.2 กรัมคิดเป็น 34.56% ซึ่งเป็น NHS เอสเทอร์ของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine โดยมีจุดหลอมเหลว ที่ 164-165°C พิสูจน์สูตรโครงสร้างโดย IR และ NMR

สูตรโครงสร้างของ NHS เอสเทอร์ ของ 7-(4-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine



ค่อยๆ เติม NHS เอสเทอร์ ของ 7-(4-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine 0.23 กรัม (0.6 มิลลิโมล) ละลายใน DMF 15.0 มิลลิลิตร สารละลายที่ได้ ลงในสารละลายของ BSA 0.70 กรัม (0.01 มิลลิโมล) ใน 0.1 M โซเดียมคาร์บอเนต บัฟเฟอร์ (pH 9.5) 40.0 มิลลิลิตร กวนเบา ๆ ที่ 4°C นาน 16 ชั่วโมง จากนั้นนำของผสมมาทำไดอะไลซิสใน PBS pH 7.0 ที่ 4°C จน NHS เอสเทอร์ ของ 7-(4-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine ที่ไม่ได้จับกับ BSA หหมดไป นำของเหลวนี้มาทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง ได้อิมมูโนเจน ข.หนัก 1.64 กรัม

จากอิมมูโนเจน ข.ที่ได้นำไปหาจำนวนอนุพันธ์ ข.ที่ติดกับ BSA โดยหลักการทางสเปคโทรสโคปี

2.3 การเตรียมอิมมูโนเจนของ 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (อิมมูโนเจน ค.)

เติม Tri-n-butylamine 1.5 มิลลิลิตร (6.0×10^{-3} โมล) ลงในสารละลาย 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine 1.6 กรัม (6.0×10^{-3} โมล) ใน DMF 60.0 มิลลิลิตร กวนจนเป็นสารละลายสีเหลืองใสแล้วทำให้เย็นที่ 4°C จากนั้นเติม Isobutyl chloroformate 1.0 มิลลิลิตร (7.6×10^{-3} โมล) และกวนให้เข้ากันที่ 4°C นาน 50 นาที ค่อย ๆ เติมของผสมที่ได้ลงในสารละลายของ BSA 7.0 กรัม (1.0×10^{-4} โมล) ใน 0.1 M โซเดียมคาร์บอเนต บัฟเฟอร์ (pH 9.5) 30.0 มิลลิลิตร และกวนของผสมนาน 4 ชั่วโมง ณ 4°C นำของผสมที่ได้มาไดอะไลซิสในน้ำจน 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine ที่ไม่ได้จับกับ BSA หหมดไป จากนั้นนำมาทำแห้งแบบเยือกแข็ง ได้อิมมูโนเจน ค.หนัก 5.5 กรัม

จากอิมมูโนเจน ค.ที่ได้นำไปหาจำนวนอนุพันธ์ ค.ที่ติดกับ BSA โดยหลักการทางสเปคโทรสโคปี

2.4 การเตรียมอิมมูโนเจนของ 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (อิมมูโนเจน ง.)

เติม Tri-n-butylamine 1.5 มิลลิลิตร (6.0×10^{-3} โมล) ลงในสารละลายของ 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine 1.7 กรัม (6.0×10^{-3} โมล) ใน DMF 60.0 มิลลิลิตร กวนจนเป็นสารละลายใส แล้วทำให้เย็นที่ 4°C จากนั้นเติม Isobutyl chloroformate 1.0 มิลลิลิตร (7.6×10^{-3} โมล) กวนให้เข้ากันที่ 4°C นาน 50 นาที ค่อย ๆ เติมของผสมที่ได้ลงในสารละลายของ BSA 7.0 กรัม (1.0×10^{-4} โมล) ใน 0.1 M โซเดียมคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ (pH 9.5) 30.0 มิลลิลิตร กวนของผสมนาน 16 ชั่วโมง ณ 4°C นำของผสมที่ได้มาไดอะไลซีในน้ำจน 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine ที่ไม่ได้จับกับ BSA หหมดไป หลังจากนั้นนำมาทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง ได้อิมมูโนเจน ง. หนัก 6.8 กรัม

จากอิมมูโนเจน ง. ที่ได้นำไปหาจำนวนอนุพันธ์ ง. ที่ติดกับ BSA โดยหลักการทางสเปคโตรสโคปี

3. การกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีสำหรับอีโอฟิลีน

การกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีใช้กระต่ายพันธุ์ Newzealand White Rabbit เพศเมีย น้ำหนัก 2.0-3.0 กิโลกรัม โดยใช้กระต่าย 2 ตัว สำหรับอนุพันธ์ 1 ตัว ทำการฉีดอิมมูโนเจนในรูปอีมีลชัน (โดยใช้ ฟรอยด์ แอดจูแวนท์) 1 มิลลิลิตร เข้าใต้ผิวหนังของกระต่าย ในช่วงเวลาต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 1 และตรวจหาการเกิดแอนติบอดีในซีรัม ภายในระยะเวลา 40-60 วัน แล้วแต่ชนิดของอิมมูโนเจน

ตารางที่ 1 ตารางการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในกระต่าย

อิมมูโนเจน ก.		อิมมูโนเจน ข.		อิมมูโนเจน ค.		อิมมูโนเจน ง.	
วัน	ความเข้มข้น (มก./มล.) ใน ฟรอยด์แอดจู แวนท์	วัน	ความเข้มข้น (มก./มล.) ใน ฟรอยด์แอดจู แวนท์	วัน	ความเข้มข้น (มก./มล.) ใน ฟรอยด์แอดจู แวนท์	วัน	ความเข้มข้น (มก./มล.) ใน ฟรอยด์แอดจู แวนท์
0*	1.0	0*	1.0	0*	2.0	0*	2.0
14	1.0	14	1.5	12	2.0	14	2.0
29	1.5	28	1.5	34	3.0	28	3.0
43	2.0	46	2.0	47	3.0	42	3.0
57	2.0	61	2.0	-	-	-	-

* : ในวันที่ 0 จะใช้ Complete Freund's Adjuvant ส่วนวันอื่น ๆ ใช้ Incomplete Freund's Adjuvant

Complete Freund's Adjuvant (mineral oil + *M. butyricum*)

Incomplete Freund's Adjuvant (mineral oil)

อิมมูโนเจน ก. = อิมมูโนเจนของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine

อิมมูโนเจน ข. = อิมมูโนเจนของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine

อิมมูโนเจน ค. = อิมมูโนเจนของ 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine

อิมมูโนเจน ง. = อิมมูโนเจนของ 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine

จากแอนติซีรัมที่ได้นำไปหาไตเตอร์ (Titer) โดยวิธี direct ELISA ใน 1 หลุมของ ไมโครเพลท เคลือบด้วยแอนติซีรัมที่เจือจางด้วย PBS-T pH 7.4 (ซึ่งมี tween 20 0.05%) ให้อยู่ระหว่าง 1:10 - 1:100,000 โดยเก็บไว้ที่ 4°C ทั้งค้างคืน ล้างแอนติซีรัมที่เหลือออก ด้วย PBS-T เดิม BSA 3% w/v ใน PBS-T pH 7.4 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ล้างออกด้วย PBS-T เดิมอีโอฟิลลีนติดฉลากเอ็นไซม์ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37°C 2 ชั่วโมง ล้างสารติดฉลากที่ไม่ได้จับกับแอนติบอดี ด้วย PBS-T เดิม OPD (O-Phenylenediamine-Hydrogen peroxide) ในซิเตรท/ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5.0 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที เดิม สารละลาย 4 N H₂SO₄ 50 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา

วัดการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร จำนวนเปอร์เซ็นต์การจับ(% Binding) ของสารติดฉลากกับแอนติซีรัมดังกล่าว

$$\% \text{ การจับ} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละสารละลายเจือจาง} \times 100}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด}}$$

สร้างเส้นกราฟที่อัตราส่วนความเจือจางต่างๆ ของแอนติซีรัมกับ %การจับที่ค่าอัตราส่วนความเจือจางที่ทำให้มีการจับของสารติดฉลากกับแอนติซีรัม 50% คือค่าไตเตอร์ (titer)ของแอนติซีรัม

การทำไตเตอร์ของแอนติซีรัมจะใช้สารติดฉลากที่มาจากอนุพันธ์เดียวกันกับ อิมมูโนเจน

4. การเตรียมเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดสเพื่อการติดฉลาก

เติมสารละลาย 50.0 มิลลิลิตร ของ 0.1 M โซเดียมเมตาเพอริโอดेट (sodium metaperiodate) ลงในสารละลายของ HRP 5.0 กรัม (1.2×10^{-4} โมล) ใน 50.0 มิลลิลิตร ของ 0.01 M โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 4.5 ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที เติม 40.0 มิลลิลิตร ของ 0.1 M ของไกลเซอรอล (glycerol) ทั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำของผสมที่ได้มาทำไดอะไลซิสใน 0.1 M ของโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 4.5 ที่ 4°C เพื่อแยกส่วนเกินของรีเอเจนต์ออกให้หมด

เติมของผสมข้างต้นใน 100.0 มิลลิลิตรของสารละลาย 1 M ของ 2,2'-oxybis (ethylamine) ใน 0.5 M โซเดียมคาร์บอเนตที่ปรับ pH เป็น 9.5 ด้วย 2 N NaOH กวนของผสมนี้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่ 4°C จากนั้นเติมสารละลายที่เตรียมใหม่ของ 1.0 M โซเดียมโบโรไฮไดรด์ (sodium borohydride) 50.0 มิลลิลิตร ทั้งไว้ 2 ชั่วโมง ที่ 4°C ไดอะไลซิสของผสมที่ได้ใน 0.1 M โซเดียมคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ pH 9.5 ที่ 4°C เพื่อแยกกรีเอเจนต์ที่เหลือออกให้หมด ของผสมที่ได้นำมาทำแห้งแบบเยือกแข็งได้ผงสีน้ำตาลหนัก 9.1 กรัม หาจำนวนหมู่อะมิโนที่จับกับ HRP โดยทำปฏิกิริยากับ Trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) แล้ววัดโดยใช้ UV spectroscopy ที่ความยาวคลื่น 354 นาโนเมตร (Wilson and Nakane, 1978)

5. การติดฉลากอิโอฟิลลีนด้วยเอ็นไซม์

5.1 การติดฉลากของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine ด้วยเอ็นไซม์ (สารติดฉลาก ก.)

ค่อยๆ เติม NHS เอสเทอร์ ของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (จากข้อ 2.1) 0.64 กรัม (1.7×10^{-3} โมล) ใน DMF 20.0 มิลลิลิตร ลงในสารละลายของ HRP (ที่เตรียมได้จากข้อ 4) 2.5 กรัม ใน 0.1 M ของโซเดียมคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ pH 9.5 25.0 มิลลิลิตร คนเบา ๆ และกวนที่ 4°C นาน 16 ชั่วโมง จากนั้นไดอะไลซ์ ใน PBS pH 7.0 เพื่อแยกส่วนที่ไม่ได้จับกับ HRP ออกไป นำของเหลวที่ได้มาทำแห้งแบบเยือกแข็งได้ผงสีน้ำตาลเบาหนัก 7.7 กรัม

นำมาทดสอบคุณสมบัติความเป็นเอ็นไซม์และหาจำนวนโมลของอิโอฟิลลีนที่ติดฉลากกับเอ็นไซม์ด้วยหลักการทางสเปคโตรสโคปี

5.2 การติดฉลากของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine ด้วยเอ็นไซม์ (สารติดฉลาก ข.)

NHS เอสเทอร์ของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (จากข้อ 2.2) 0.76 กรัม (2.0×10^{-3} โมล) ใน DMF 20.0 มิลลิลิตร ค่อย ๆ เติมลงในสารละลายของ HRP ที่เตรียมได้จากข้อ 4 1.6 กรัม ใน 20.0 มิลลิลิตร ของ 0.1 M ของโซเดียมคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ pH 9.5 คนเบา ๆ กวนที่ 4°C นาน 16 ชั่วโมง ไดอะไลซ์ ใน PBS pH 7.0 เพื่อแยกส่วนที่ไม่ได้จับกับเอ็นไซม์ออกไป นำของเหลวที่ได้มาทำแห้งแบบเยือกแข็ง ได้ผงสีน้ำตาลเบาหนัก 3.6 กรัม

นำมาทดสอบคุณสมบัติความเป็นเอ็นไซม์และหาจำนวนโมลของอิโอฟิลลีนที่ติดฉลากกับเอ็นไซม์ด้วยหลักการทางสเปคโตรสโคปี

5.3 การติดฉลากของ 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine ด้วยเอ็นไซม์ (สารติดฉลาก ค.)

เติม Tri-n-butylamine 15.0 มิลลิลิตร (0.06×10^{-3} โมล) ลงใน 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine 16.0 กรัม (0.06×10^{-3} โมล) ใน DMSO 30.0 มิลลิลิตรกวนจนเป็นสารละลายแล้วทำให้เย็นที่ 4°C ค่อยๆ เติม Isobutylchloroformate 10.0

มิลลิลิตร (0.076 โมล) กวนให้เข้ากันที่ 4°ซ เป็นเวลา 50 นาที แล้ว ค่อย ๆ เติมของผสมที่ได้ลงในสารละลายที่เย็นของเอ็นไซม์ HRP (ที่ได้จากข้อ 4) 21.0 กรัมใน 0.1 M โซเดียมคาร์บอเนต บัฟเฟอร์ pH 9.5 ปริมาณ 15.0 มิลลิลิตร กวนของผสมนี้ที่ 4°ซ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วไดอะไลซ์ใน PBS pH 7.0 เพื่อแยกส่วนที่ไม่จับกับ HRP ออกไป แล้วทำให้แห้งแบบเยือกแข็งได้ผงสีน้ำตาลเบาหนัก 3.8 กรัม

นำสารที่ได้มาทดสอบคุณสมบัติความเป็นเอ็นไซม์และหาจำนวนโมลของธิโอฟิลลีนที่ติดฉลากกับเอ็นไซม์ด้วยหลักการทางสเปคโตรสโคปี

5.4 การติดฉลากของ 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine ด้วยเอ็นไซม์ (สารติดฉลาก ง.)

เติม Tri-n-butylamine 15.0 มิลลิลิตร(0.06โมล) ลงในสารละลาย 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine 17.0 กรัม (0.06โมล) ใน DMSO 30.0 มิลลิลิตรกวนจนเป็นสารละลายแล้วทำให้เย็นที่ 4°ซ ค่อยๆ เติม Isobutylchloroformate 10.0 มิลลิลิตร (0.076โมล) กวนให้เข้ากันที่ 4°ซ เป็นเวลา 50 นาที ค่อย ๆ เติมของผสมที่ได้ลงในสารละลายที่เย็นของเอ็นไซม์ HRP (ที่ได้จากข้อ 4) 20.0 กรัมใน 0.1 M โซเดียมคาร์บอเนต บัฟเฟอร์ pH 9.5 ปริมาณ 15.0 มิลลิลิตร กวนของผสมนี้ที่ 4°ซ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วไดอะไลซ์ใน PBS pH 7.0 เพื่อแยกส่วนที่ไม่จับกับ HRP ออกไป ทำให้แห้งแบบเยือกแข็งได้ผงสีน้ำตาลเบาหนัก 31.0 กรัม

นำสารที่ได้มาทดสอบคุณสมบัติความเป็นเอ็นไซม์และหาจำนวนโมลของธิโอฟิลลีนที่ติดฉลากกับเอ็นไซม์ด้วยหลักการทางสเปคโตรสโคปี

6.การกำหนดสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาการแย่งที่ระหว่างธิโอฟิลลีนติดฉลากเอ็นไซม์กับสารละลายมาตรฐานธิโอฟิลลีนในการจับกับแอนติบอดี

จากแอนติซีรัมและสารติดฉลากของอนุพันธ์ของธิโอฟิลลีนทั้ง 4 ตัว ได้นำหลักการทางอิมมูโนแอสเสย์มาใช้ในการศึกษาการเกิดปฏิกิริยาการแย่งที่ระหว่างธิโอฟิลลีนติดฉลากเอ็นไซม์กับธิโอฟิลลีนเพื่อจับกับแอนติบอดีนั้น สภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาอาจแตกต่างกันในอนุพันธ์แต่ละตัวที่เตรียมขึ้นจึงต้องศึกษาเพื่อกำหนดสภาวะที่ปฏิกิริยาการแย่งที่เกิดและวิเคราะห์ได้ ดังนี้

เตรียมสารละลายของแอนติบอดีและรีโอฟิลลีนติดฉลากเอ็นไซม์ให้มีค่าความเข้มข้นต่างกัน 4-5 ค่า โดยใช้เทคนิคของ competitive ELISA โดยใช้สารละลายมาตรฐานรีโอฟิลลีนในความเข้มข้น 0-40 มก.ต่อลิตร สภาวะที่เหมาะสมที่เกิดปฏิกิริยาการแย่งที่จะเป็นสภาวะที่ผลการแย่งที่แปรตามค่าความเข้มข้นของรีโอฟิลลีนซึ่งประเมินจากการสร้าง logic plot ระหว่างค่าการจับของรีโอฟิลลีนกับความเข้มข้นในทอมของ log ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงที่ให้ค่าของสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) มากที่สุด จะถูกเลือกเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุด (Standefer and Saunders, 1978)

7. การศึกษาผลของเฮเทอโรโลกัสคอมบิเนชันระหว่างรีโอฟิลลีนติดฉลากเอ็นไซม์กับอิมมูโนเจน

รีโอฟิลลีนติดฉลากเอ็นไซม์ และแอนติบอดีจากอนุพันธ์ทั้ง 4 ตัว ที่มีความแตกต่างกันที่ตำแหน่งของสายโซ่หรือความยาวของสายโซ่นำมาศึกษาถึงผลของเฮเทอโรโลกัสคอมบิเนชันระหว่างสารติดฉลากรีโอฟิลลีนและแอนติบอดีต่อความไวและความจำเพาะของการวิเคราะห์ โดยศึกษาตามลักษณะต่างๆของเฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชัน 16 ลักษณะ ดังตารางต่อไปนี้

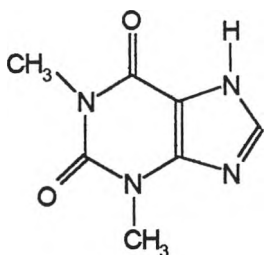
คอมบิเนชัน	สารติดฉลาก	อิมมูโนเจน
โฮโมโลกัส	ก.	ก.
	ข.	ข.
	ค.	ค.
	ง.	ง.
บริดจ์ เฮเทอโรโลกัส	ก.	ข.
	ข.	ก.
	ค.	ง.
	ง.	ค.
ไซท์ เฮเทอโรโลกัส	ก.	ค.
	ค.	ก.
	ข.	ง.
	ง.	ข.
บริดจ์และไซท์ เฮเทอโรโลกัส	ก.	ง.
	ง.	ก.
	ข.	ค.
	ค.	ข.

เช่น จากริโอฟิลลีนติดฉลากเอ็นไซม์ และแอนติบอดีของอนุพันธ์ ก. , ข. , ค. และ ง. เมื่อจับคู่ระหว่าง อนุพันธ์ ก. กับ ข. หรืออนุพันธ์ ค. กับ ง. จะเป็น บริดจ์เฮเทอโรโลกัสคอมบิเนชัน เมื่อจับคู่ระหว่างอนุพันธ์ ก. กับ ค. หรืออนุพันธ์ ข. กับ ง. จะเป็นไซท์เฮเทอโรโลกัสคอมบิเนชัน และเมื่อจับคู่ระหว่างอนุพันธ์ ก. กับ ง. หรืออนุพันธ์ ข. กับ ค. จะเป็นบริดจ์และไซท์เฮเทอโรโลกัสคอมบิเนชัน ดังตารางข้างต้น

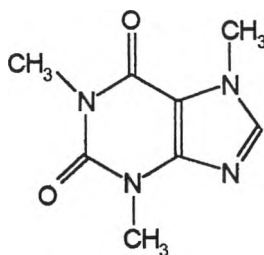
การศึกษาผลของเฮเทอโรโลกัสคอมบิเนชันแบบต่างๆ ทั้ง 16 ลักษณะ จะใช้สภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาแย่งที่ ระหว่างริโอฟิลลีนติดฉลากเอ็นไซม์กับสารละลายมาตรฐานริโอฟิลลีนในการจับกับแอนติบอดีที่ได้จากข้อ 6 และใช้เทคนิค competitive ELISA ทำนองเดียวกับข้อที่ 6 โดยใช้สารละลายมาตรฐานริโอฟิลลีนในความเข้มข้น 0-40 มก.ต่อลิตร

เฮเทอโรโลกัสคอมบิเนชันที่เหมาะสมที่สุดจะให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์(r) ที่ได้จากความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของ logic plot ระหว่างค่าการจับของริโอฟิลลีนกับความเข้มข้นของริโอฟิลลีนในเทอมของ log ที่สูงสุด โดยค่าความชัน (slope) ของเส้นกราฟจะบอกถึงความไวของการวิเคราะห์

ส่วนความจำเพาะเจาะจงของการวิเคราะห์ จะใช้คาเฟอีนเป็นสารตรวจความจำเพาะ เนื่องจากมีสูตรโครงสร้างเป็น xanthine เช่นเดียวกับริโอฟิลลีน แต่ต่างกันเพียงตำแหน่งที่ 7 โดยคาเฟอีน มีหมู่เมทิล ($-CH_3$)มาต่อ ดังแสดงในรูป



ริโอฟิลลีน



คาเฟอีน

ความจำเพาะเจาะจงของการวิเคราะห์ คำนวณได้จากเปอร์เซ็นต์ของการเกิดปฏิกิริยาข้าม (% cross reactivity) ของคาเฟอีนต่อแอนติบอดีของริโอฟิลลีน ดังสมการ

$$\% \text{ cross reactivity} = \frac{\text{มก.ของริโอฟิลลีน/ลิตร ที่ 50\% การจับ} \times 100}{\text{มก.ของคาเฟอีน/ลิตร ที่ 50\% การจับ}}$$

โดยเฮเทอโรโลกัสคอมบิเนชันที่ให้ค่า %cross reactivityต่ำที่สุดถือว่ามีความจำเพาะเจาะจงสูงหรือมากที่สุด

บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

1. การสังเคราะห์อนุพันธ์ของธีโอฟิลลีน

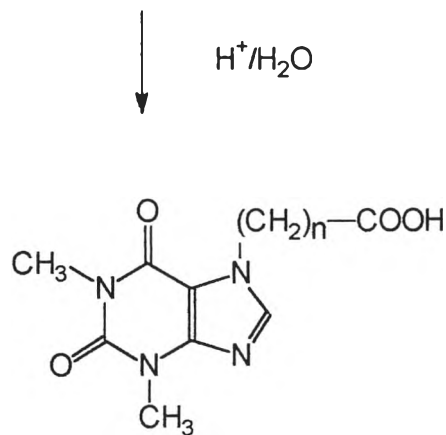
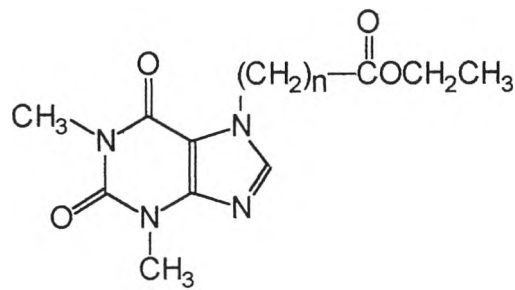
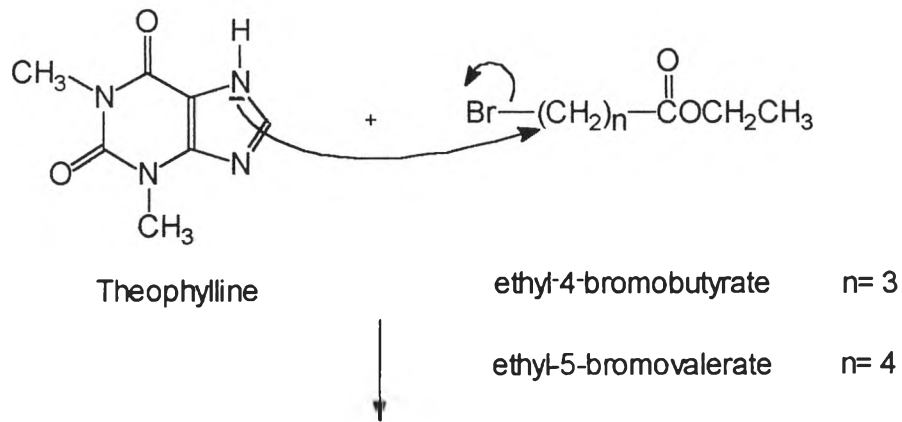
1.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์ ณ ตำแหน่งที่ 7 (อนุพันธ์ ก. และ ข.)

การสังเคราะห์ประยุกต์จากวิธีของ Hu และ Singh, 1980 โดยการทำปฏิกิริยาอัลคิลเลชัน(alkylation) ที่ไนโตรเจนตำแหน่งที่ 7 ของ ธีโอฟิลลีน ด้วย ethyl-4-bromobutyrate (อนุพันธ์ ก.) หรือ ethyl-5-bromovalerate (อนุพันธ์ ข.) ตามด้วยแอซิดไฮโดรไลซิส (acid hydrolysis) ดังแสดงในรูปที่ 1 จะได้ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ก.) หรือได้ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ข.)

อนุพันธ์ ก. มีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 273 nm ดังแสดงใน UV สเปกตรัมในรูปที่ 2 และมีค่าจำเพาะของการดูดกลืนแสง (specific absorbance, k) ที่ความเข้มข้น 1 กรัม/ลิตร เท่ากับ 38.72 ทำการยืนยันสูตรโครงสร้างของอนุพันธ์ ก. ด้วย IR สเปกตรัม ดังแสดงในรูปที่ 3 และตารางที่ 2 และ $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมในรูปที่ 4 และ 5 และค่าเคมีคัลชิฟท์ (δ) ในตารางที่ 3

ส่วนอนุพันธ์ ข. มีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 273 nm ดังแสดงใน UV สเปกตรัมรูปที่ 6 และมีค่าจำเพาะของการดูดกลืนแสง (specific absorbance, k) ที่ความเข้มข้น 1 กรัม/ลิตร เท่ากับ 30.43

ทำการพิสูจน์สูตรโครงสร้างของอนุพันธ์ ข. ด้วย IR สเปกตรัม ดังแสดงในรูปที่ 7 และตารางที่ 4 และ $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมในรูปที่ 8 และ 9 และค่าเคมีคัลชิฟท์ (δ) ในตารางที่ 5



n= 3 , 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine อนพนธ ก.

n= 4 , 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine อนพนธ ข.

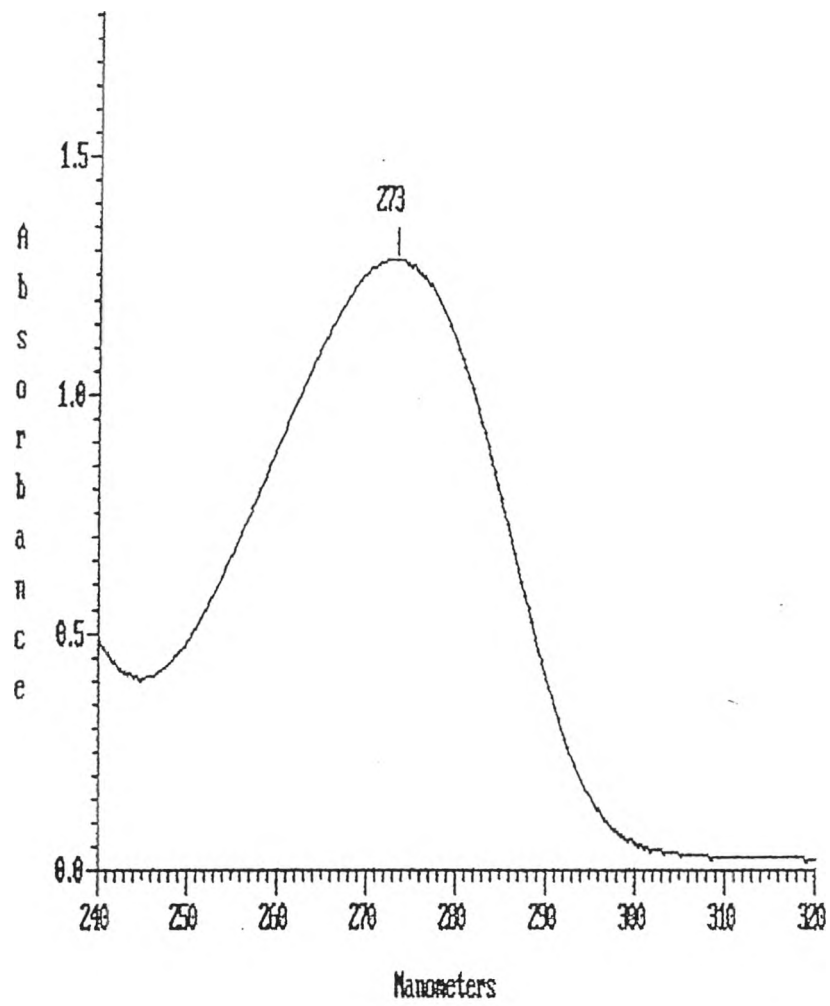
รูปที่ 1 ปฏิกริยาในการสังเคราะห์อนุพันธ์ของธีโอฟิลลีน

อนุพันธ์ ก. 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine และ

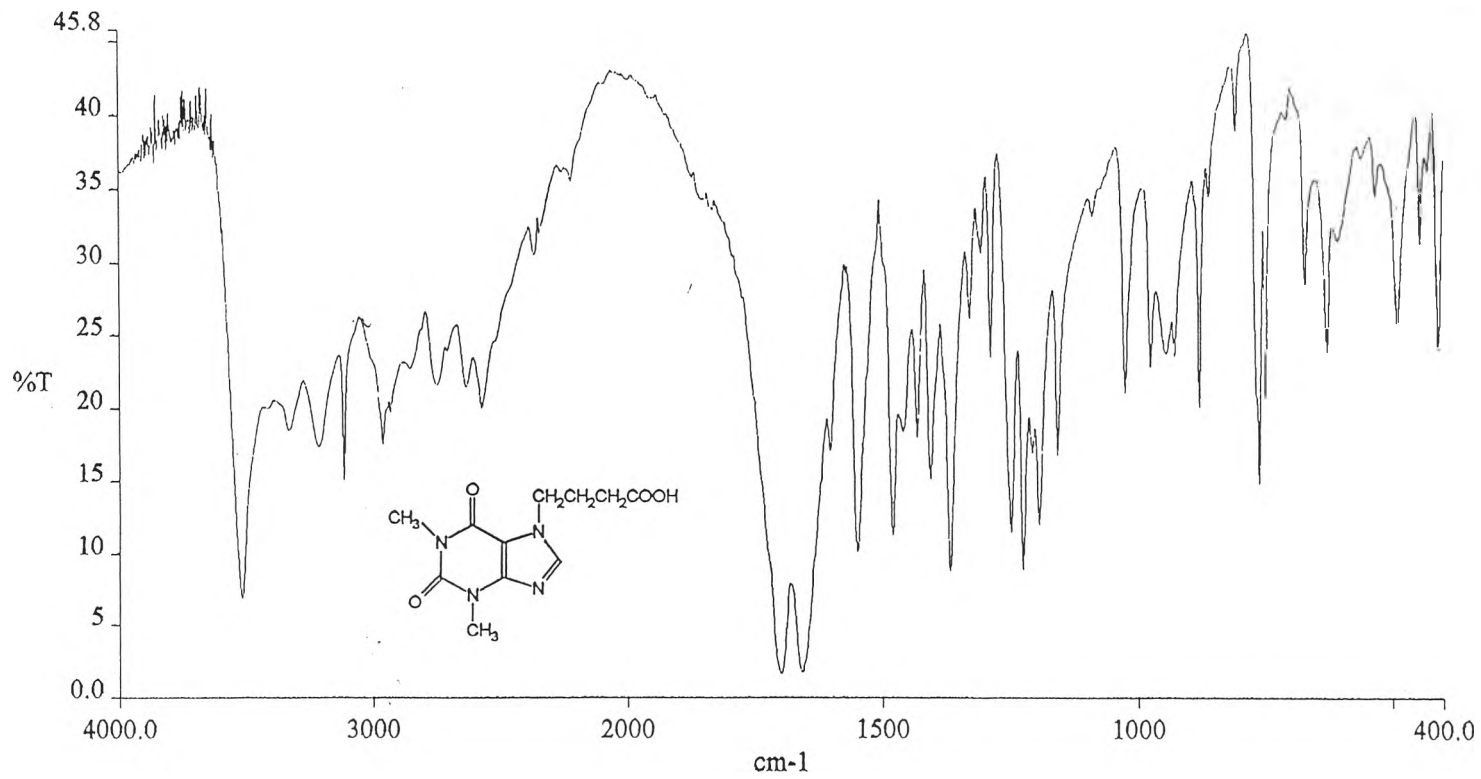
อนุพันธ์ ข. 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine

จากอนุพันธ์ ก. และ ข. ที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด ที่ 273 นาโนเมตร เท่ากัน และเท่ากับริโอฟิลลีน เนื่องจากสูตรโครงสร้างหลักของอนุพันธ์ทั้ง 2 ต่างจากริโอฟิลลีนตรงสายโซ่ที่มาต่อ ณ ตำแหน่งที่ 7 เท่านั้น จึงมีโครโมฟอร์หลักที่เหมือนกัน ดังนั้นจึงมีการดูดกลืนแสงที่ไม่ต่างกัน

ผลจาก UV และ IR สเปกตรัม ของอนุพันธ์ ก. และ ข. จะไม่มีความแตกต่างกัน สำหรับ $^1\text{H-NMR}$ ของ อนุพันธ์ ข. จะมี 2 โปรตอนของ หมู่เมทิลลีน($-\text{CH}_2$) เพิ่มขึ้นจาก $^1\text{H-NMR}$ ของ อนุพันธ์ ก. อีก 1 ตำแหน่ง



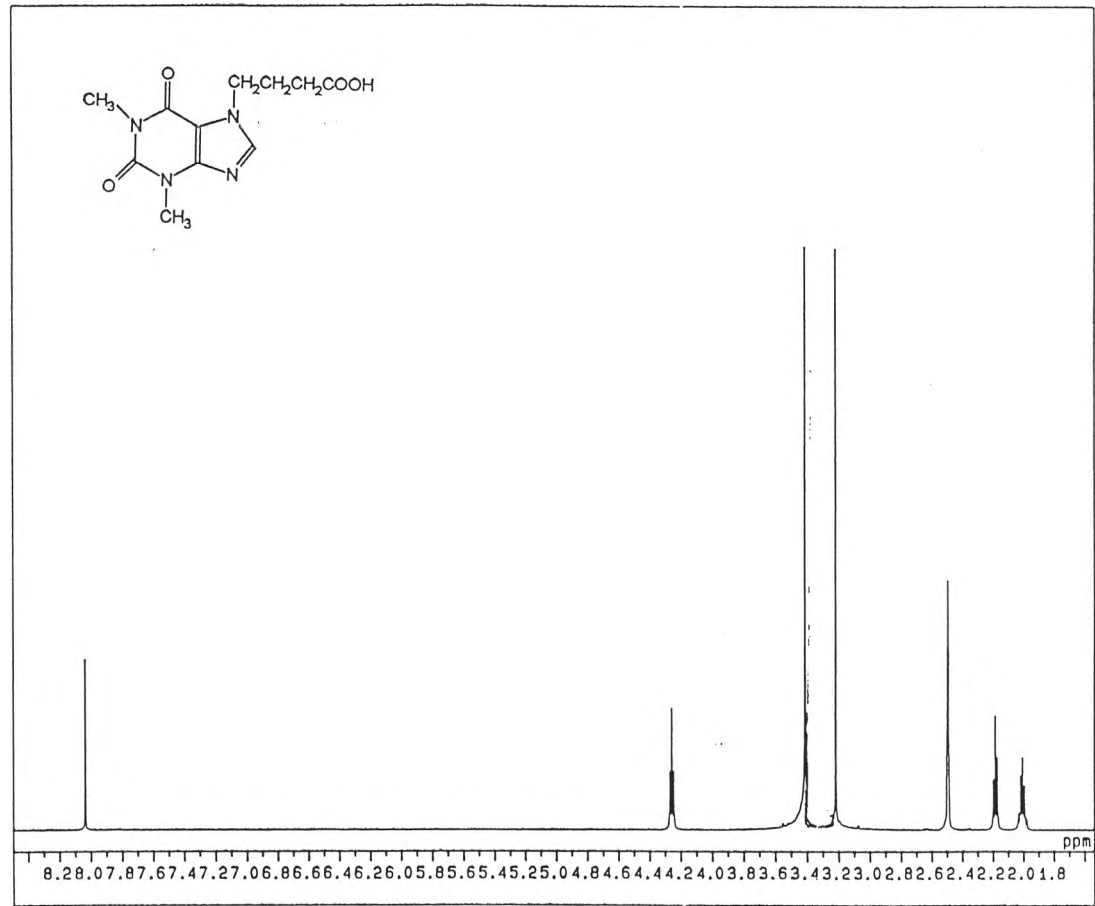
รูปที่ 2 UV สเปกตรัมของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ก.)
ความเข้มข้น 33 มคก./มล.



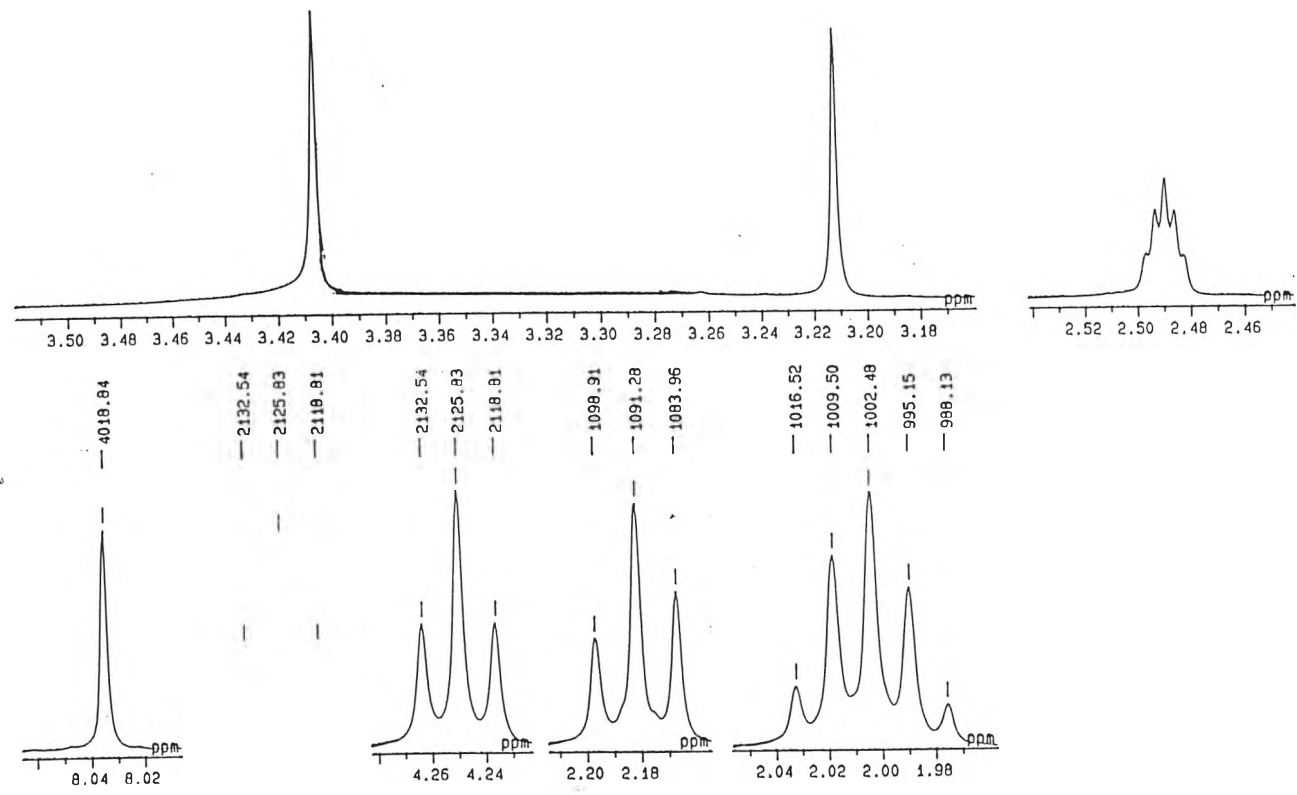
รูปที่ 3 IR สเปคตรัมของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ก.)

ตารางที่ 2 อินฟราเรดแอบซอร์ปชัน (Infrared absorption) ของ 7-(3-carboxy propyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ก.)

wave numbers (cm ⁻¹)	หมู่ฟังก์ชัน
2391-3514	VO-H
1698, 1653	VC=O, acid
1367-1479	δO-H
1248-1288	VC-N



รูปที่ 4 ¹H-NMR สเปกตรัมของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ก.) ใน DMSO-d₆

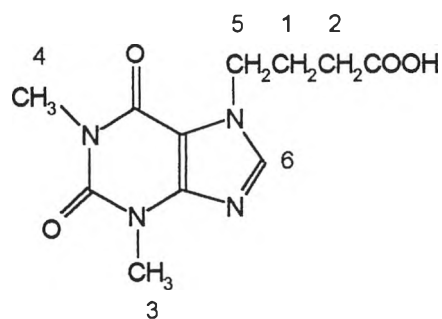


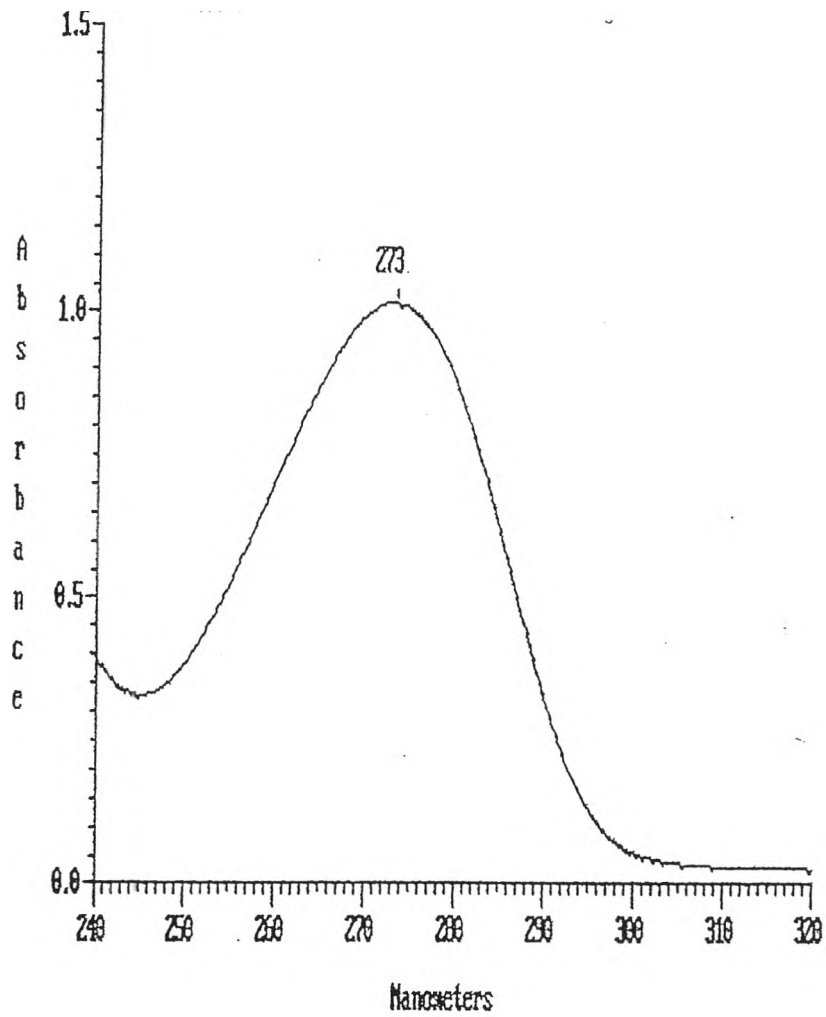
รูปที่ 5 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ก.) ใน DMSO-d_6
 (ขยายสเกลจาก 1.96-8.06 ppm)

ตารางที่ 3 ค่าเคมีคัลชิฟท์ (δ) จาก $^1\text{H-NMR}$ ของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ก.)

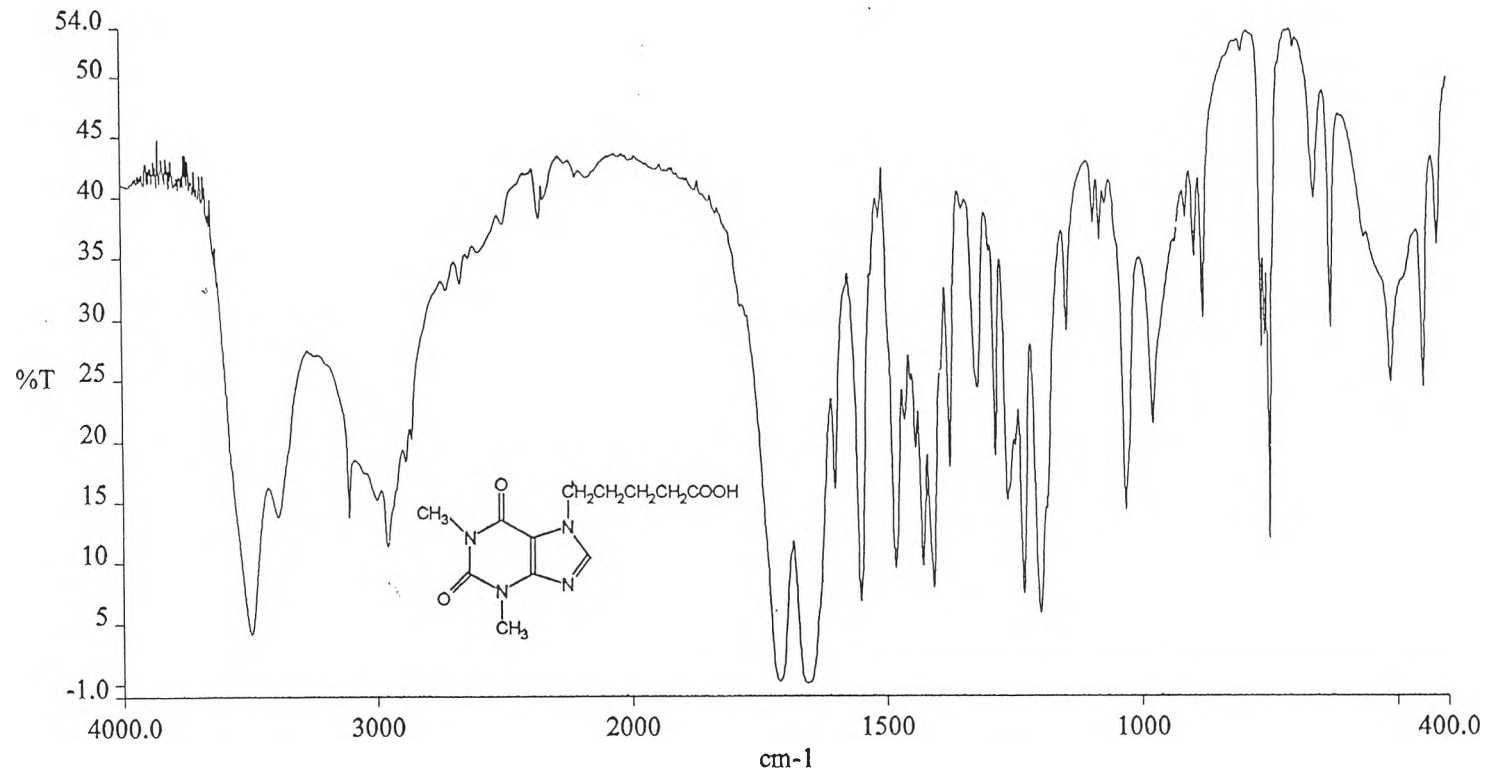
Position	Chemical shift (ppm)	Multiplicity
1	1.97-2.04	2H, m ¹⁾
2	2.16-2.20	2H, t ²⁾ , J = 7.0 Hz
3	3.21	3H, s ³⁾
4	3.41	3H, s
5	4.23-4.27	2H, t, J = 7.0 Hz
6	8.04	1H, s

- 1) m = multiplet
- 2) t = triplet
- 3) s = singlet





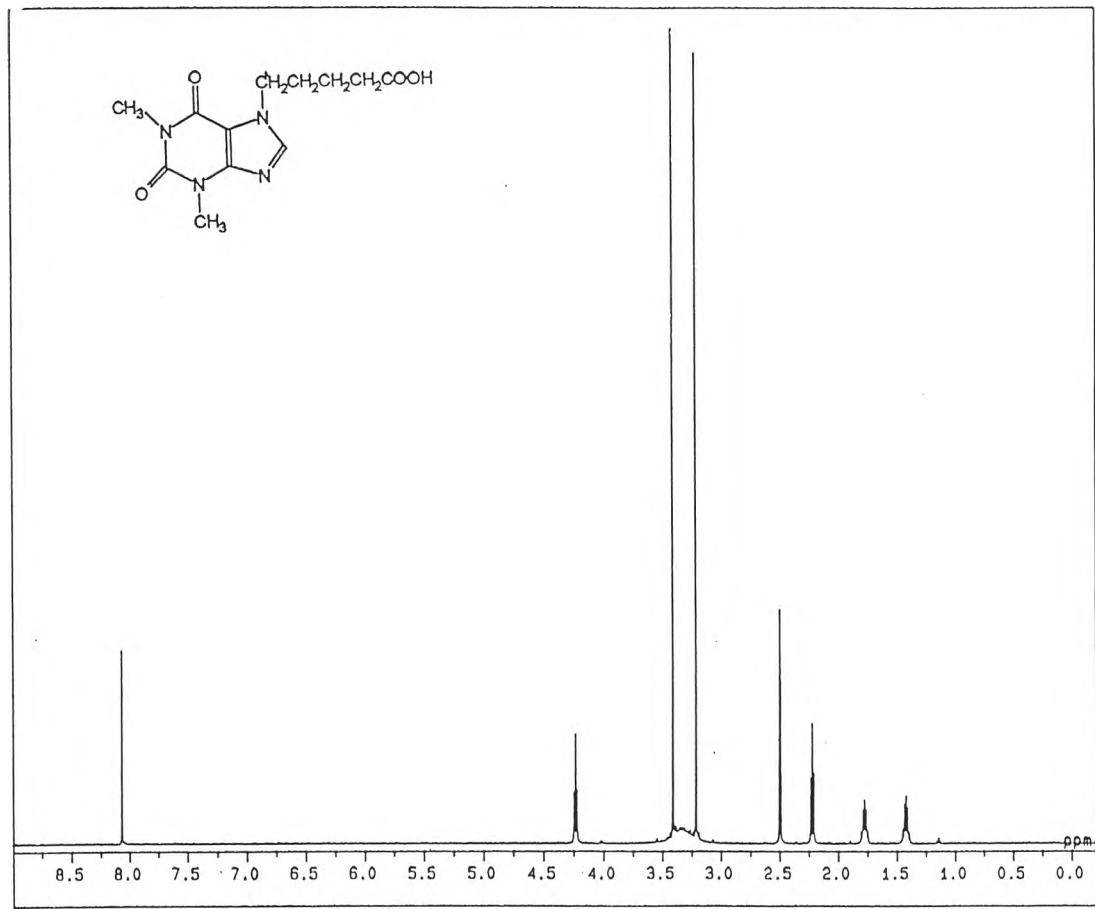
รูปที่ 6 UV สเปกตรัมของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ข.)
ความเข้มข้น 33 มคก./มล.



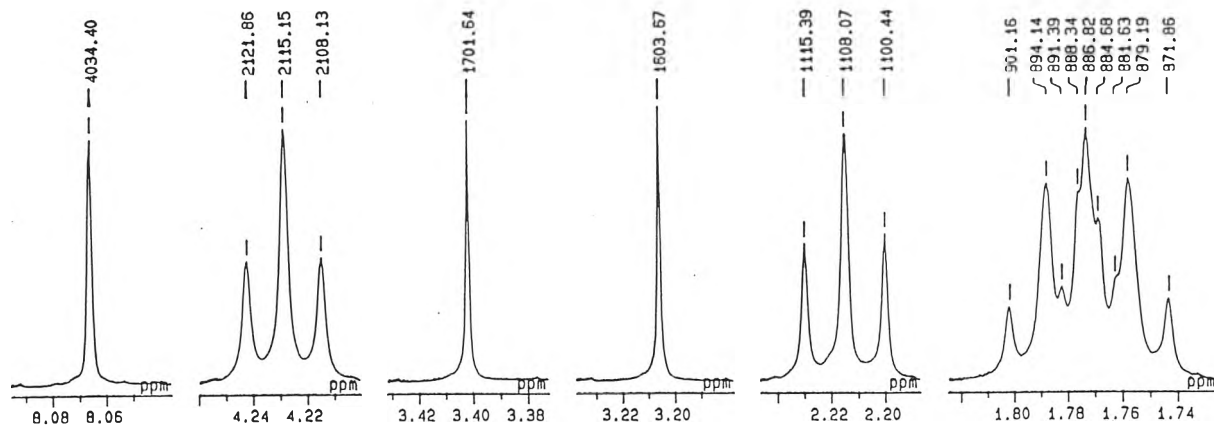
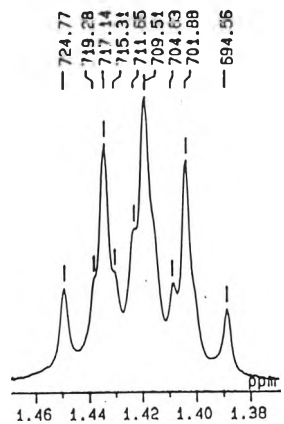
รูปที่ 7 IR สเปกตรัมของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ข.)

ตารางที่ 4 อินฟราเรดแอบซอร์ปชัน (Infrared absorption) ของ 7-(4-carboxy butyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ข.)

wave numbers (cm ⁻¹)	หมู่ฟังก์ชัน
2885-3387	VO-H
1656, 1712	VC=O, acid
1408-1482	δO-H
1263-1321	VC-N



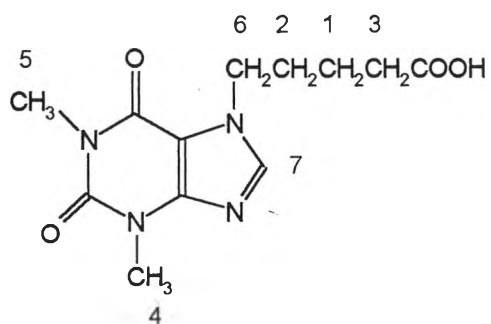
รูปที่ 8 ¹H-NMR สเปกตรัมของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ข.) ใน DMSO-d₆



รูปที่ 9 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ข.) ใน DMSO-d_6 (ขยายสเกลจาก 1.38-8.09 ppm)

ตารางที่ 5 ค่าเคมีคัลชิฟท์ (δ) จาก $^1\text{H-NMR}$ ของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ข.)

Position	Chemical shift (ppm)	Multiplicity
1	1.38-1.45	2H, m
2	1.74-1.81	2H, m
3	2.20-2.23	2H, t, J = 7.0 Hz
4	3.21	3H, s
5	3.40	3H, s
6	4.21-4.25	2H, t, J = 7.0 Hz
7	8.07	1H, s

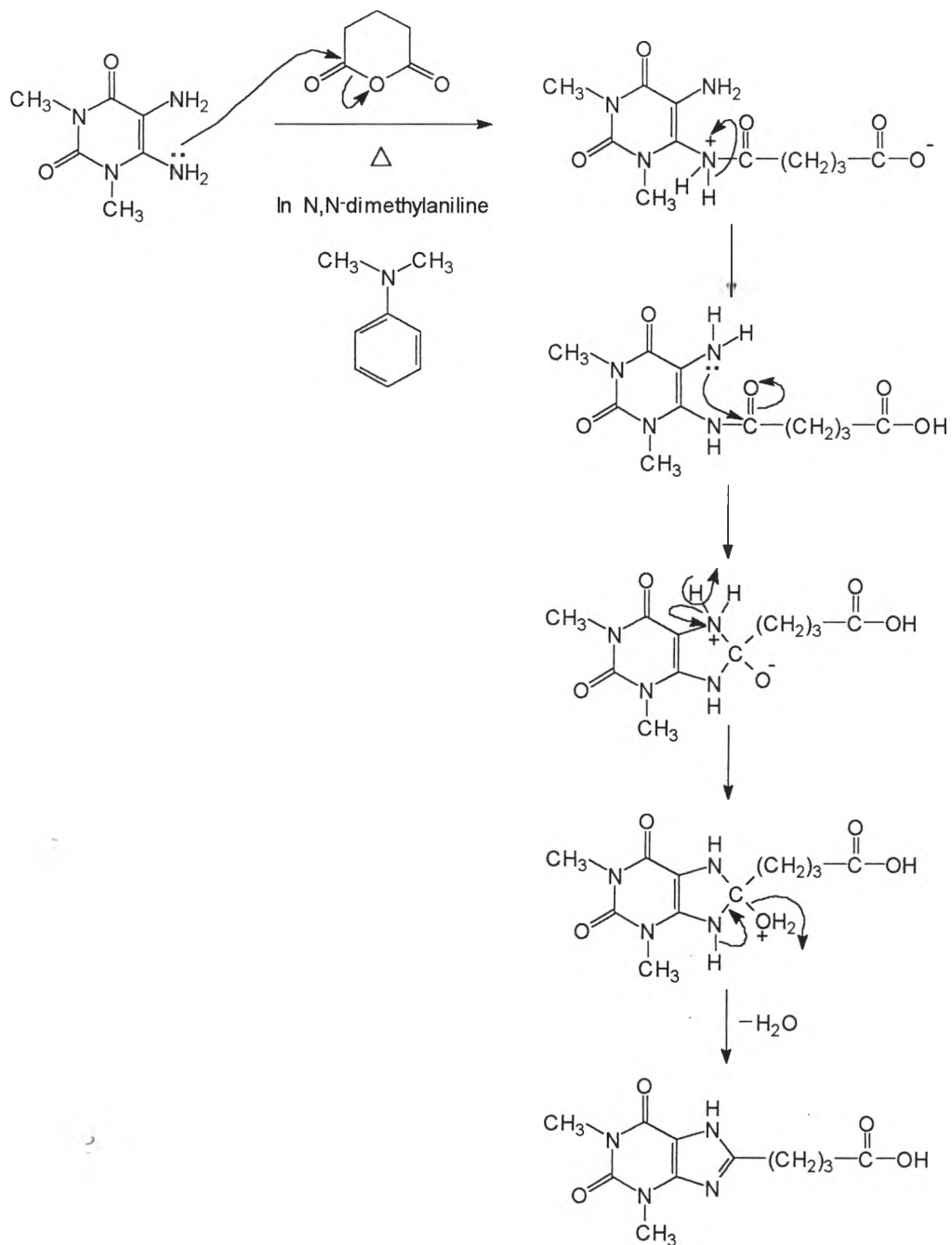


1.2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ ณ ตำแหน่งที่ 8 คือ 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ค.) (Cook et al., 1976)

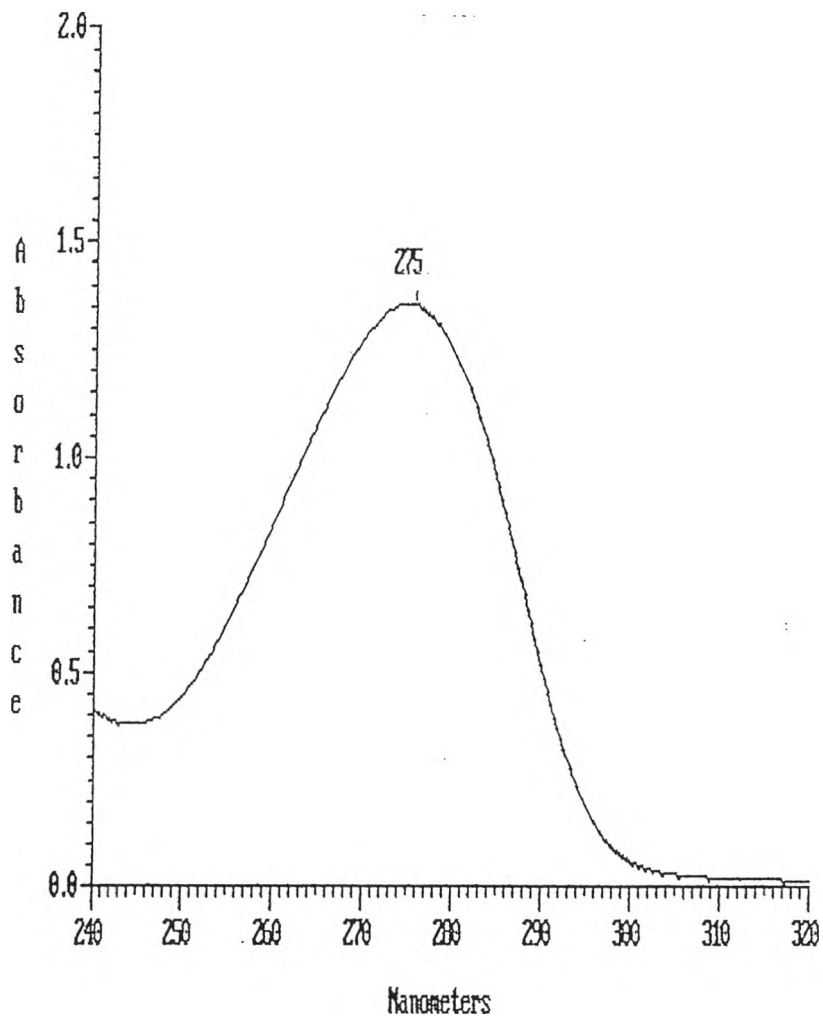
จากการสังเคราะห์อนุพันธ์ ค. ดังได้แสดงกลไกของปฏิกิริยาในรูปที่ 10 เป็นการรีฟลักซ์ 4,5-diamino-1,3-dimethylpyrimidine-2,6-dione กับ glutaric anhydride ใน *N,N*-dimethylaniline แล้วเกิดไซโคลซ์เซชัน(cyclization) จะได้ 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ค.) เป็นผงสีเหลืองอ่อน คิดเป็น 36.40% ของสารตั้งต้น มีจุดหลอมเหลว คือ 232-235^oซ

อนุพันธ์ ค. มีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 275 nm ดังแสดงใน UV สเปกตรัมในรูปที่ 11 และมีค่าจำเพาะของการดูดกลืนแสง (specific absorbance, k) ที่ความเข้มข้น 1 กรัม/ลิตร เท่ากับ 41.12

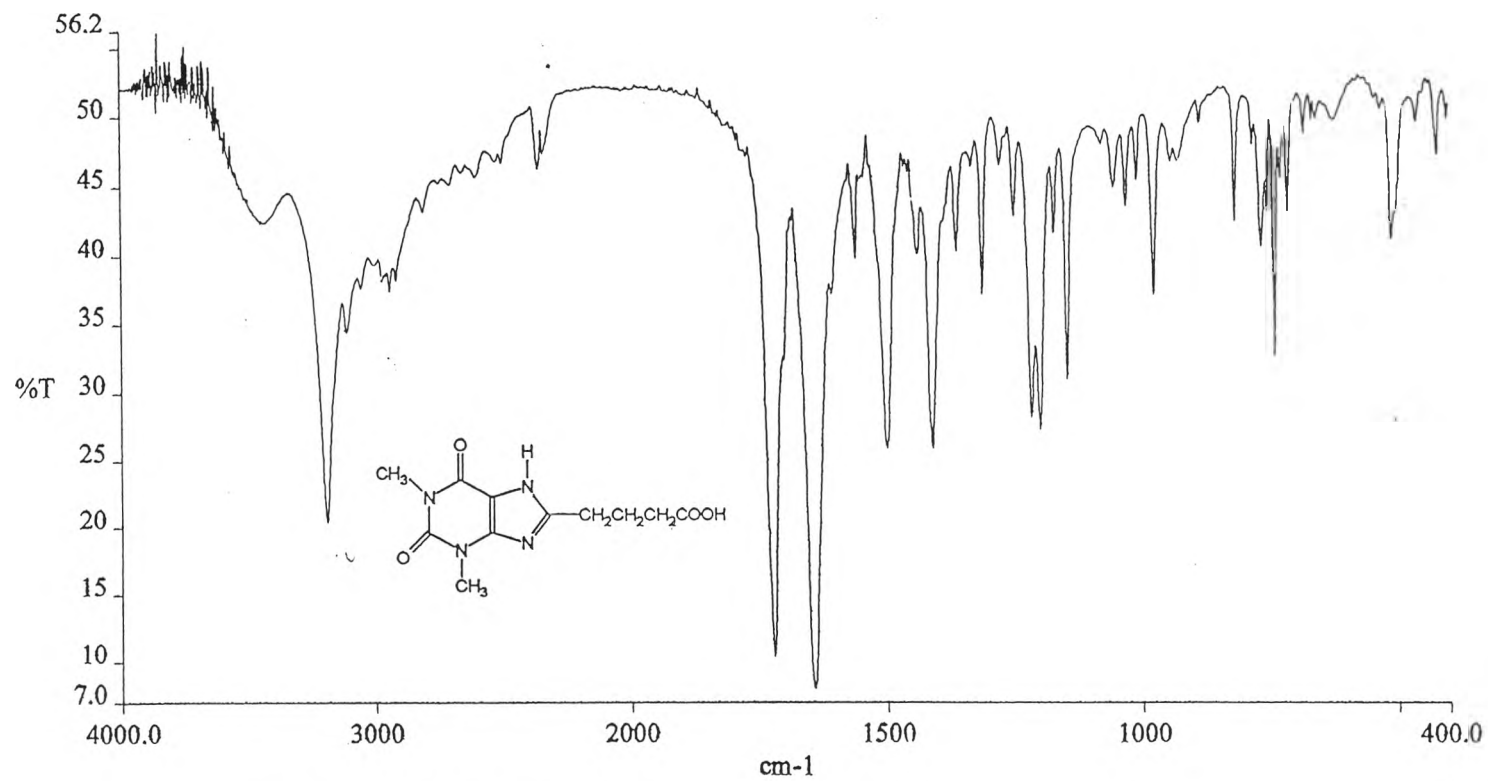
ทำการพิสูจน์สูตรโครงสร้างของอนุพันธ์ ค. ด้วย IR สเปกตรัม ดังแสดงในรูปที่ 12 และตารางที่ 6 และ ¹H-NMR สเปกตรัมในรูปที่ 13 และ 14 และค่าเคมีคัลชิฟท์ (δ) ในตารางที่ 7



รูปที่ 10 กลไกของปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethyl xanthine (อนุพันธ์ ค.)



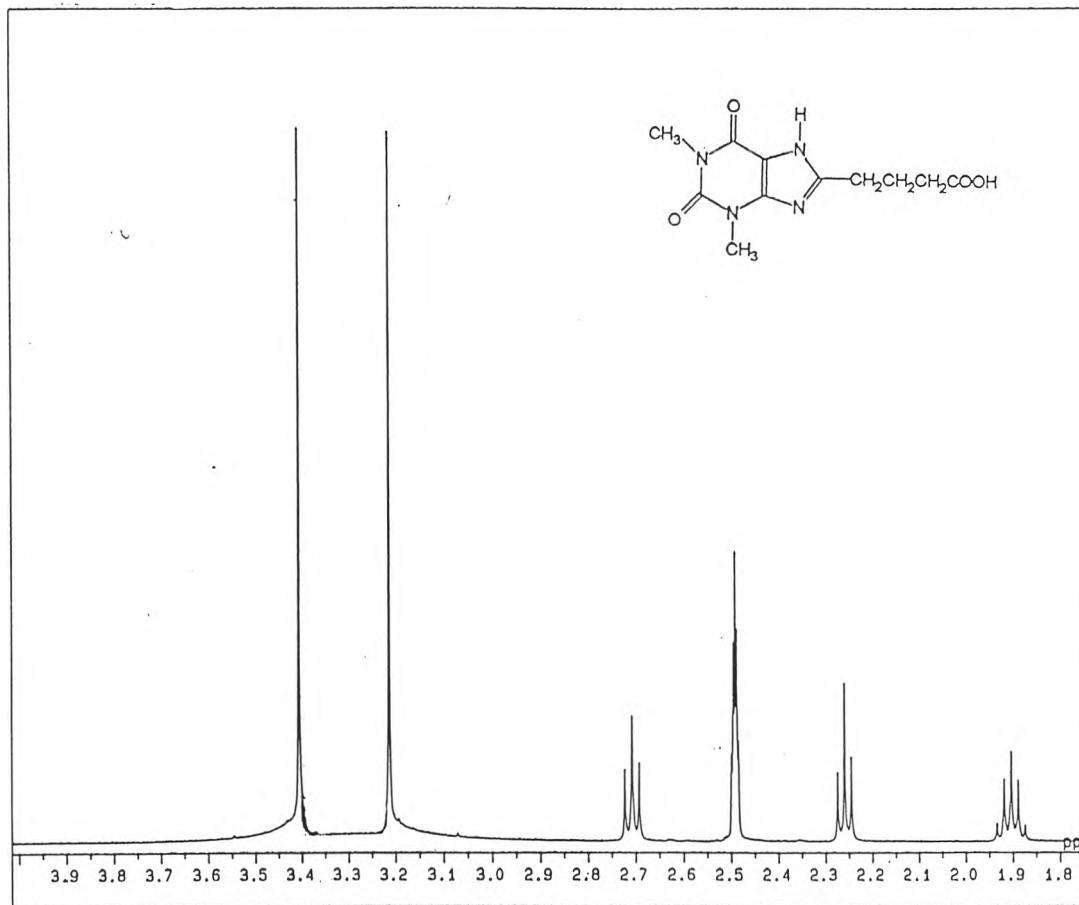
รูปที่ 11 UV สเปกตรัมของ 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ค.)
ความเข้มข้น 33 มคก./มล.



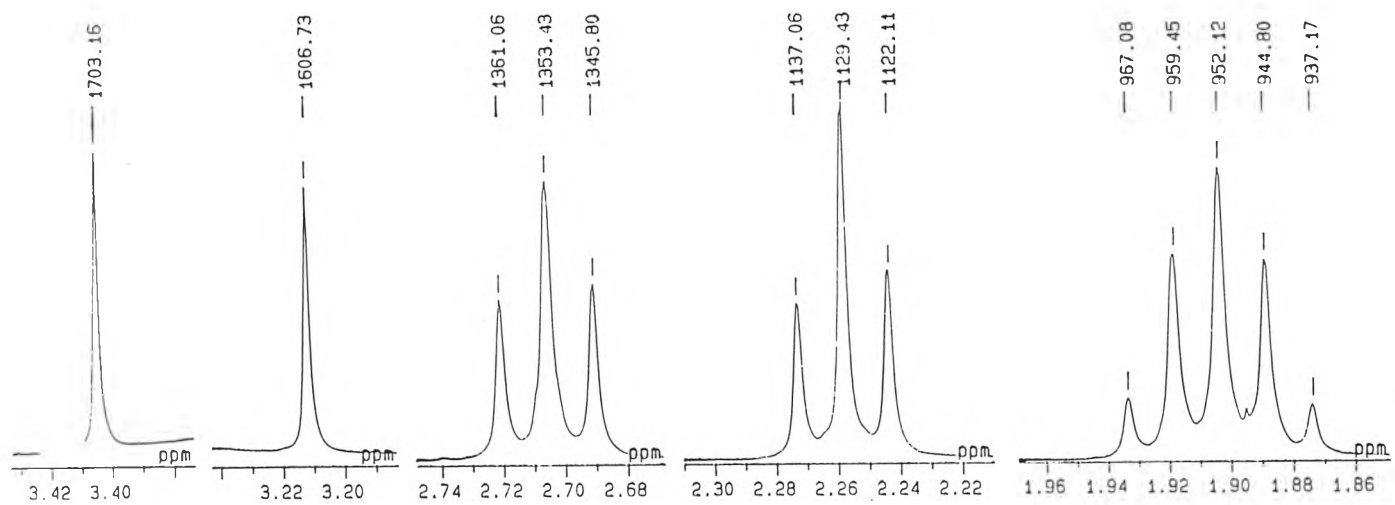
รูปที่ 12 IR สเปกตรัมของ 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ค.)

ตารางที่ 6 อินฟราเรดแอบซอพชัน (Infrared absorption) ของ 8-(3-carboxy propyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ค.)

wave numbers (cm^{-1})	หมู่ฟังก์ชัน
2811-3600	VO-H
1643, 1721	VC=O, acid
1395-1440	δ O-H
1314-1252	VC-N



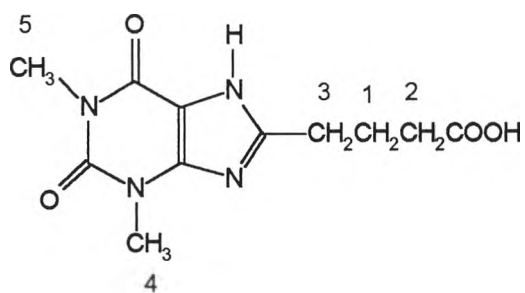
รูปที่ 13 ¹H-NMR สเปกตรัมของ 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ค.) ใน DMSO-d₆



รูปที่ 14 ^{13}C -NMR สเปกตรัมของ 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ค.) ใน DMSO-d_6
(ขยายสเกลจาก 1.86-3.43 ppm)

ตารางที่ 7 ค่าเคมีคัลชิฟท์ (δ) จาก $^1\text{H-NMR}$ ของ 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ค.)

Position	Chemical shift (ppm)	Multiplicity
1	1.85-1.94	2H, m
2	2.24-2.28	2H, t, J = 7.6 Hz
3	2.69-2.72	2H, t, J = 7.6 Hz
4	3.21	3H, s
5	3.40	3H, s



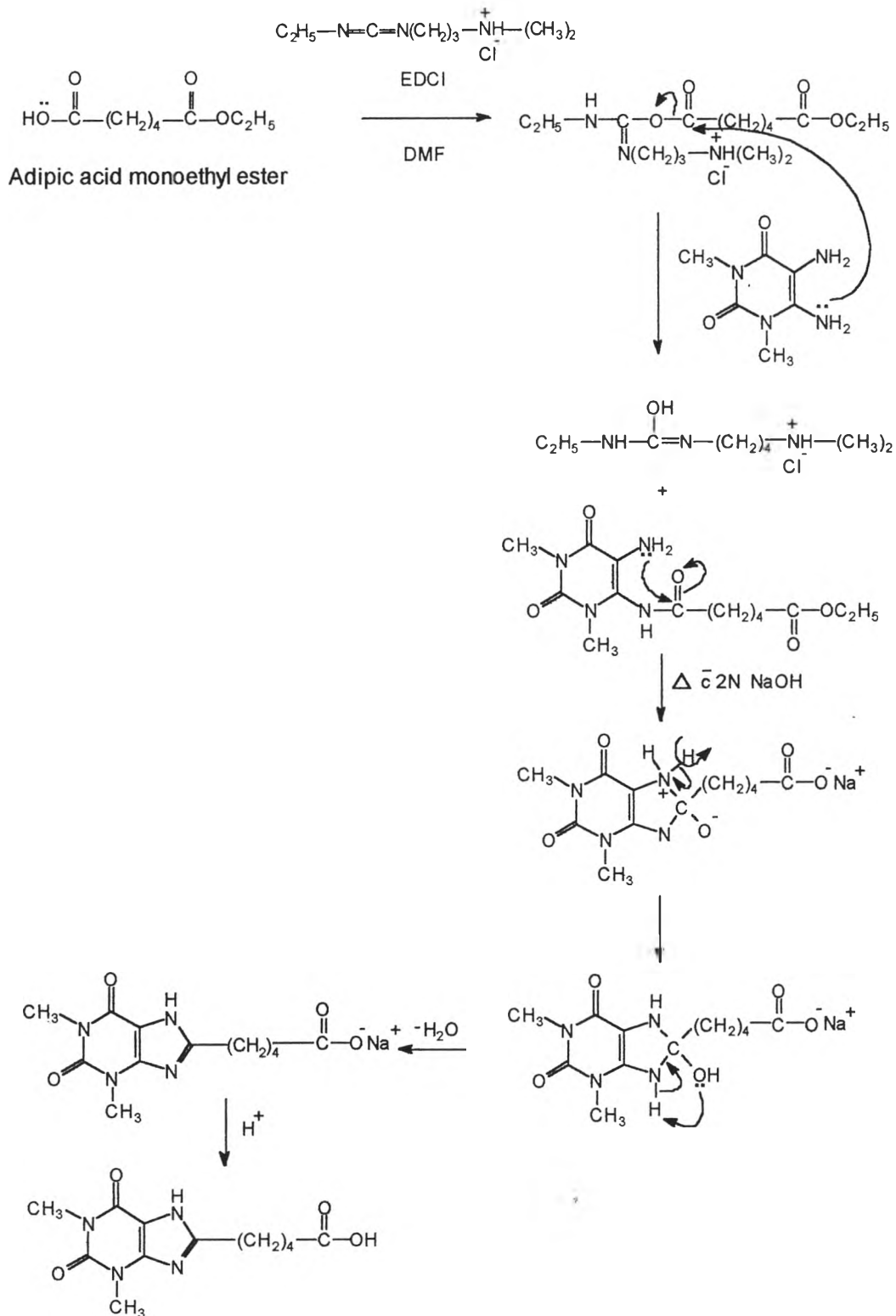
1.3 การสังเคราะห์อนุพันธ์ คือ 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ง.)

แสดงกลไกของปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุพันธ์ ง. ในรูปที่ 15 เป็นการทำปฏิกิริยาระหว่าง 4,5-diaminopyrimidine-2,6-dione กับ adipic acid monoethyl ester โดยมี EDCI เป็นสารช่วยในการเกิดปฏิกิริยา acylation จากนั้นเกิดไซโคลซ์เซชันโดยการรีฟลักซ์ใน ต่าง (Daly et al, 1985; Kim et al., 1994) จากนั้นทำให้เป็นกลาง (neutralize) ด้วย 10% HCl จะได้ 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ง.)

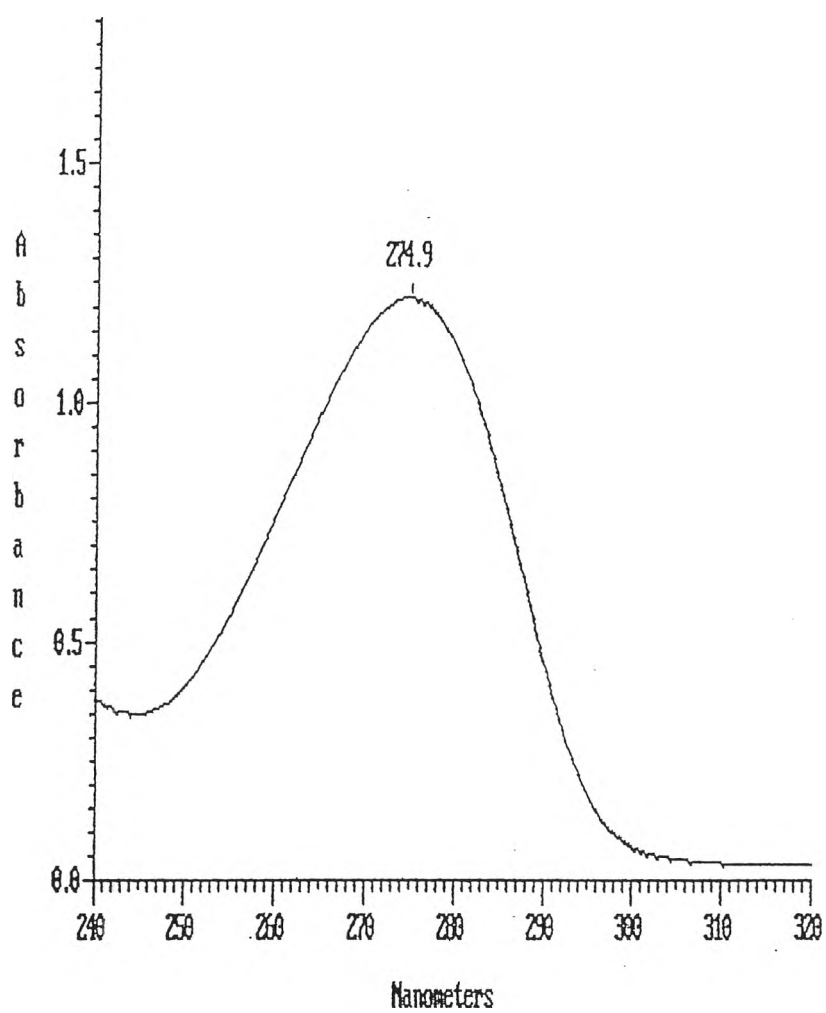
อนุพันธ์ ง. มีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 275 nm ดังแสดงใน UV สเปกตรัมในรูปที่ 16 และมีค่าจำเพาะของการดูดกลืนแสง (specific absorbance, k) ที่ความเข้มข้น 1 กรัม/ลิตร เท่ากับ 36.77

ทำการพิสูจน์สูตรโครงสร้างของอนุพันธ์ ง. ด้วย IR สเปกตรัม ดังแสดงในรูปที่ 17 และตารางที่ 8 และ $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมในรูปที่ 18 และ 19 และค่าเคมีคัลชิฟท์ (δ) ในตารางที่ 9

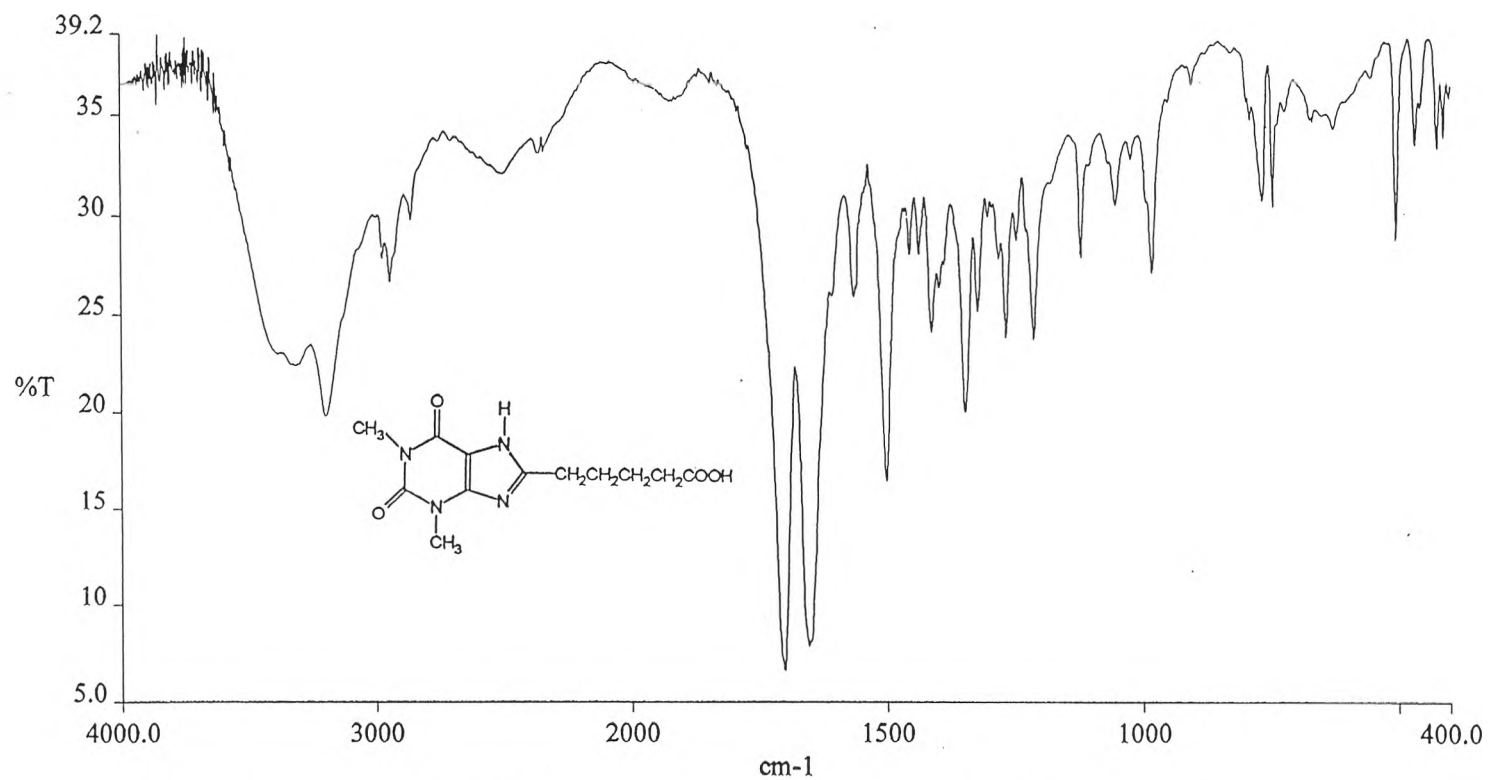
จาก UV และ IR สเปกตรัม ของอนุพันธ์ ค. และ ง. ไม่มีความแตกต่างกัน แต่จาก $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมจะเห็นว่า อนุพันธ์ ง. จะมี 2 โปรตอน ของ หมู่เมทิลลีน ($-\text{CH}_2$) ที่เพิ่มจาก ของ อนุพันธ์ ค.



รูปที่ 15 กลไกของปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethyl xanthine (อนุพันธ์ ง.)



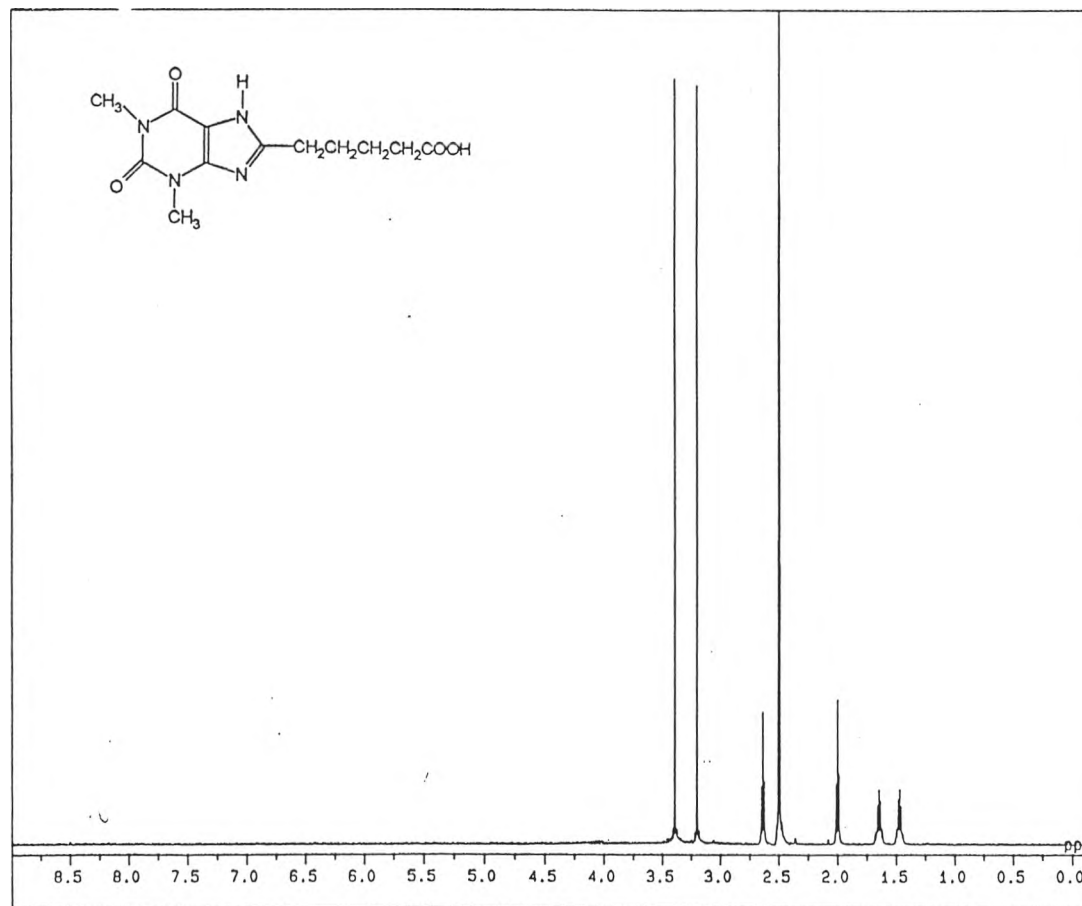
รูปที่ 16 UV สเปกตรัมของ 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ง.)
ความเข้มข้น 33 มก./มล.



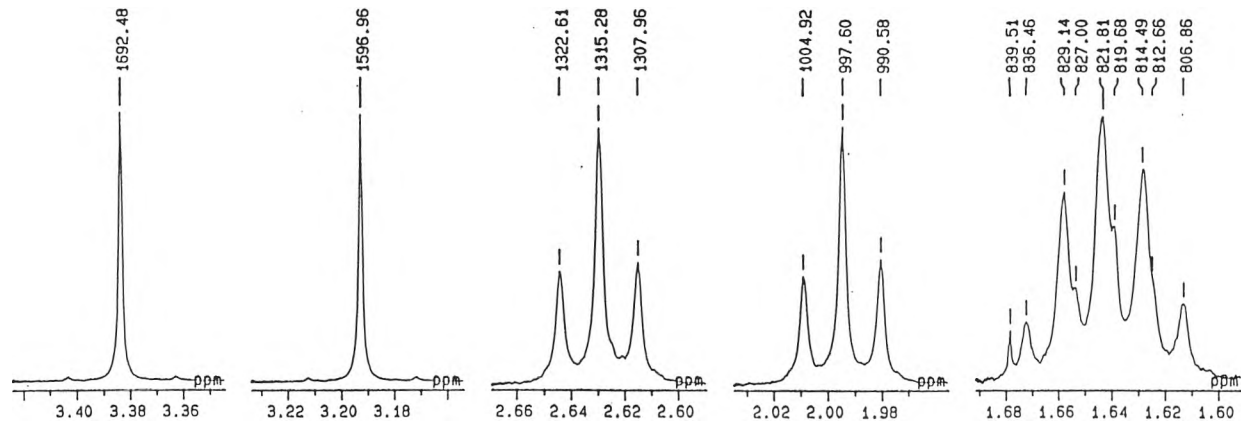
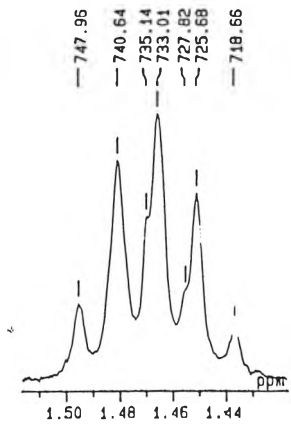
รูปที่ 17 IR สเปกตรัมของ 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ง.)

ตารางที่ 8 อินฟราเรดแอบซอร์ปชัน (Infrared absorption) ของ 8-(4-carboxy butyl)-1,3-dimethylxanthine(อนุพันธ์ ง.)

wave numbers (cm ⁻¹)	หมู่ฟังก์ชัน
3000-3400	VO-H
1654, 1702	VC=O, acid
1395-1440	δO-H
1266-1348	VC-N



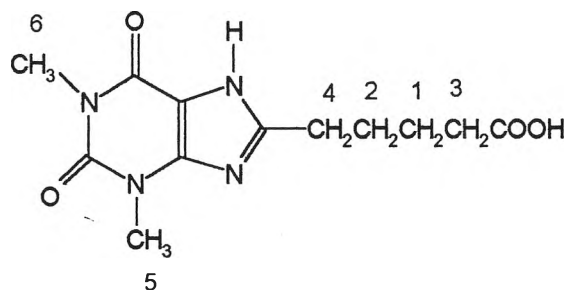
รูปที่ 18 ¹H-NMR สเปกตรัมของ 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ง.) ใน DMSO-d₆



รูปที่ 19 ¹H-NMR สเปกตรัมของ 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ง.) ใน DMSO-d₆ (ขยายสเกลจาก 1.60-3.42 ppm)

ตารางที่ 9 ค่าเคมีคัลชิฟท์ (δ) จาก $^1\text{H-NMR}$ ของ 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ง.)

Position	Chemical shift (ppm)	Multiplicity
1	1.43-1.50	2H, m
2	1.61-1.68	2H, m
3	1.98-2.01	2H, t, J = 7.3 Hz
4	2.61-2.65	2H, t, J = 7.3 Hz
5	3.19	3H, s
6	3.38	3H, s



2. การเตรียมอิมมูโนเจนของอนุพันธ์ธีโอฟิลลีน

2.1 การเตรียมอิมมูโนเจนของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (อิมมูโนเจน ก.)

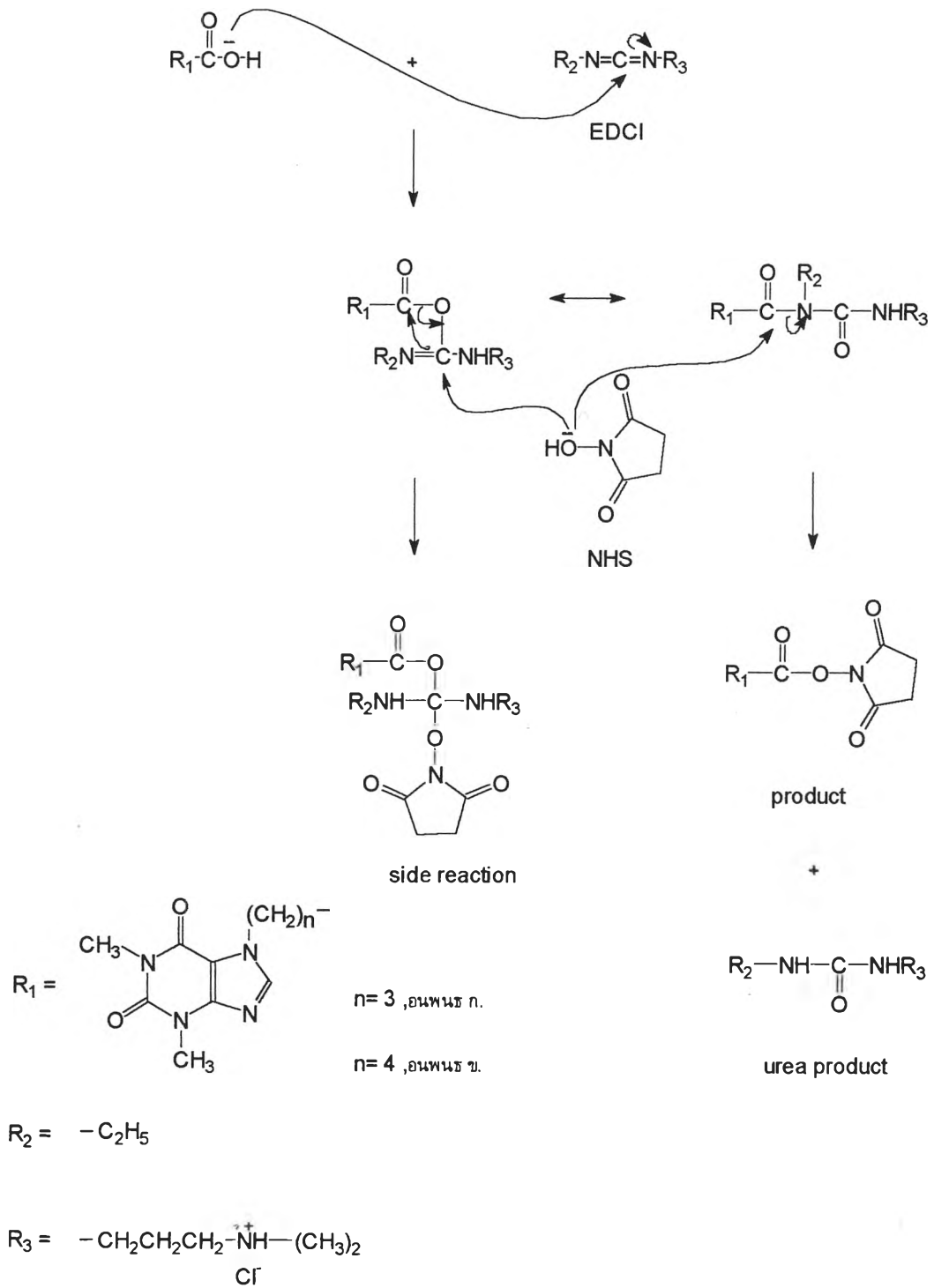
การเตรียมอิมมูโนเจนของอนุพันธ์ ก. เป็นการเกิดปฏิกิริยาคอนจูเกต ระหว่างอนุพันธ์ ก. ในรูป NHS เอสเทอร์ กับ BSA ดังแสดงในรูปที่ 20

โดย NHS เอสเทอร์ ที่ได้ สำหรับอนุพันธ์ ก. เป็นผงสีขาว คิดเป็น 62.15% ของสารตั้งต้น มีจุดหลอมเหลว 215-216^oซ มีการดูดกลืนแสงสูงสุดในช่วง UV 273 nm เช่นเดียวกับธีโอฟิลลีน ดังแสดงในรูปที่ 21 มีค่าจำเพาะของการดูดกลืนแสง (specific absorbance, k) เท่ากับ 26.44 ที่ความเข้มข้น 1 กรัม/ลิตร

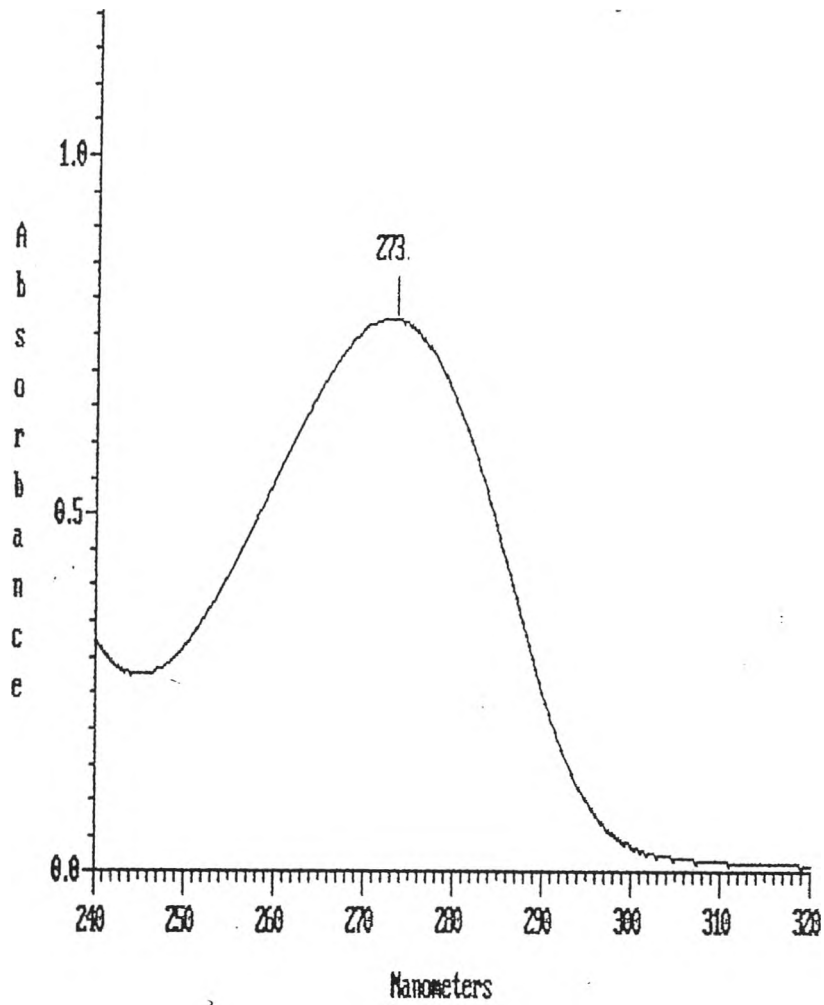
การแสดงผลของ IR สเปกตรัม ดังรูปที่ 22 และตารางที่ 10 และ ¹H-NMR สเปกตรัมดังรูปที่ 23 และ 24 และค่า เคมีลึกลับ (δ) ในตารางที่ 11

ผลการจับกันระหว่าง NHS เอสเทอร์ ของอนุพันธ์ ก. กับ BSA ได้เป็นอิมมูโนเจน ก. มีลักษณะเป็นผงสีขาว มีการดูดกลืนแสงสูงสุดในช่วง UV ที่ 275 nm ต่างไปจาก NHS เอสเทอร์ ของอนุพันธ์ ก. ดังแสดงในรูปที่ 25 จะมีค่าจำเพาะของการดูดกลืนแสงเท่ากับ 26.06 ที่ความเข้มข้น 1 กรัม/ลิตร

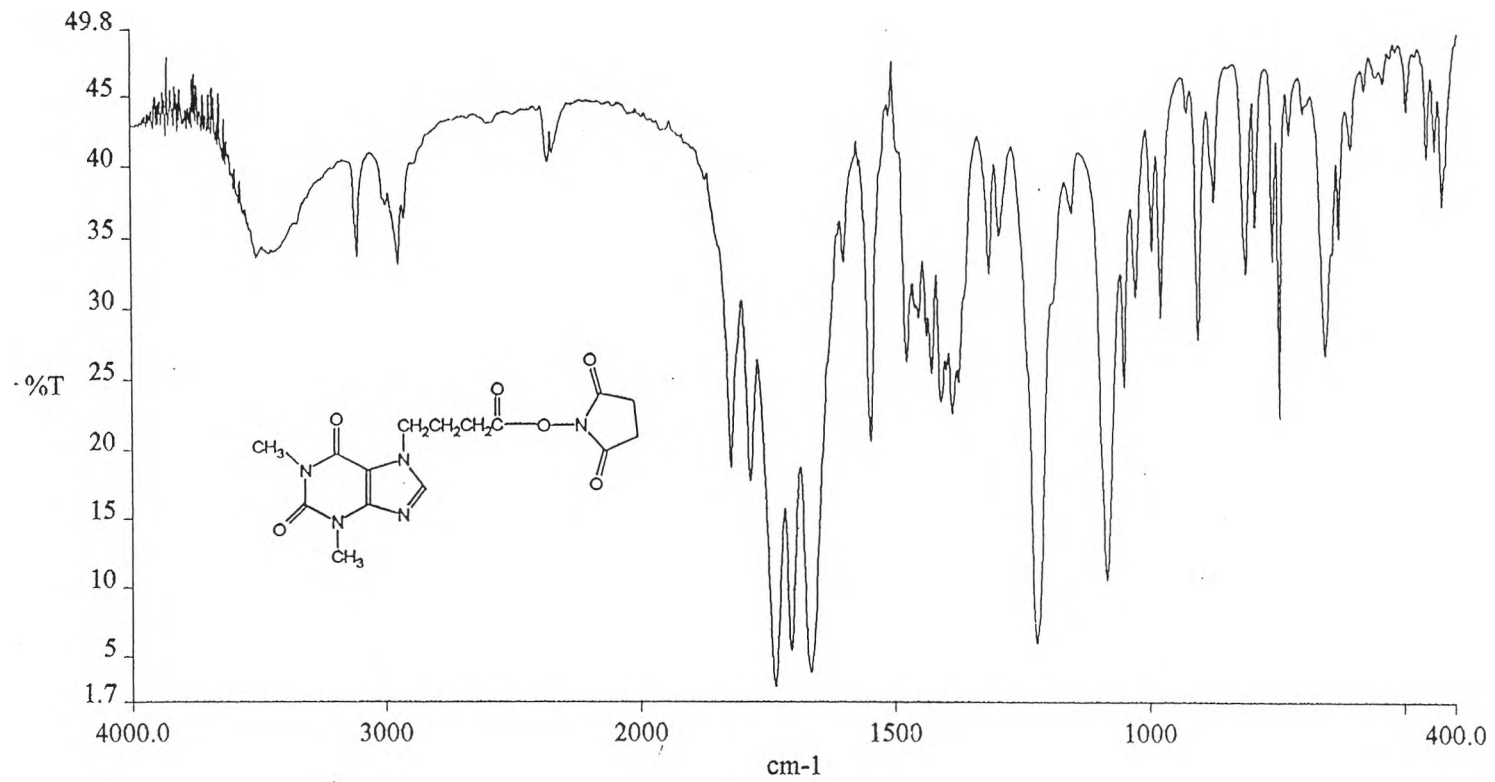
1 โมลของ BSA จับกับ NHS เอสเทอร์ของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine ประมาณ 11 โมล



รูปที่ 20 กลไกของปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ NHS เอสเทอร์ ของอนุพันธ์ ณ ตำแหน่งที่ 7 (อนุพันธ์ ก. และ ข.)



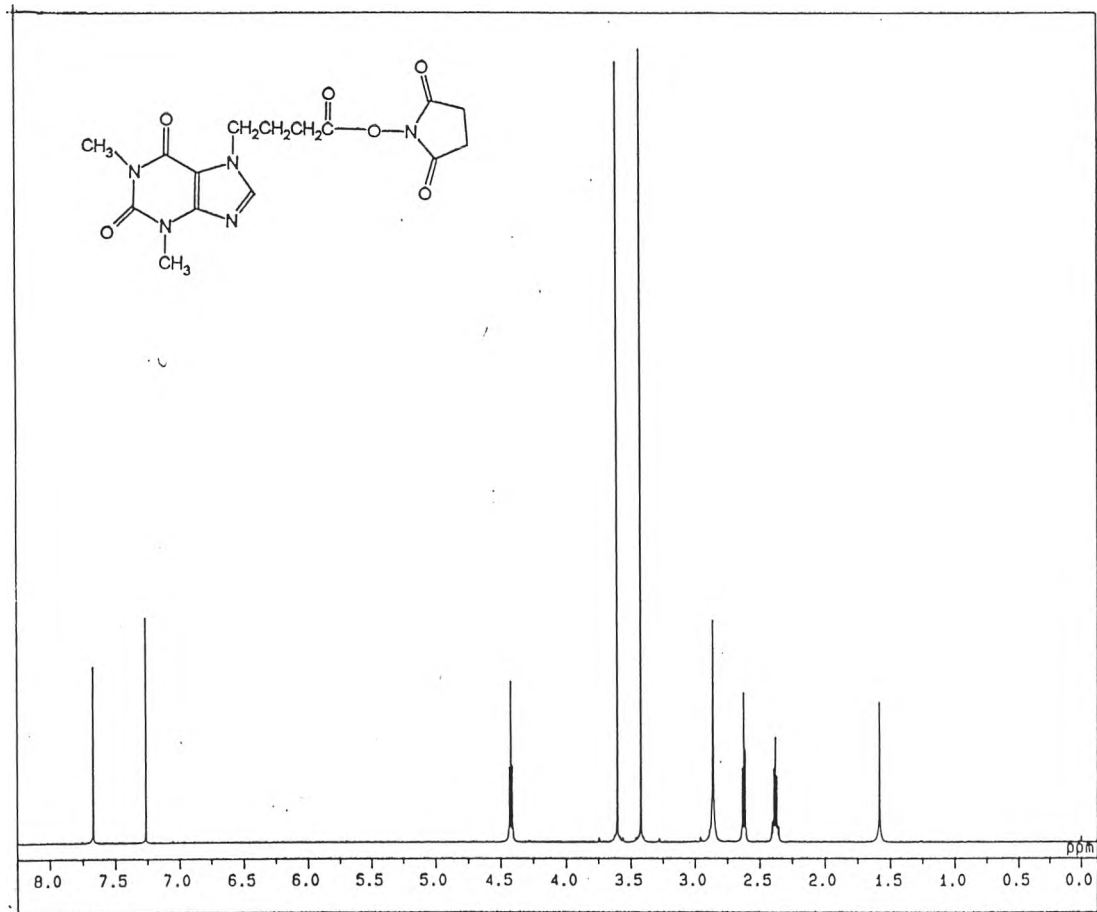
รูปที่ 21 UV สเปกตรัมของ NHS เอสเทอร์ ของ 7-(3-carboxypyril)-1,3-dimethyl xanthine (NHS เอสเทอร์ ของอนุพันธ์ ก.) ความเข้มข้น 33 มคก./มล.



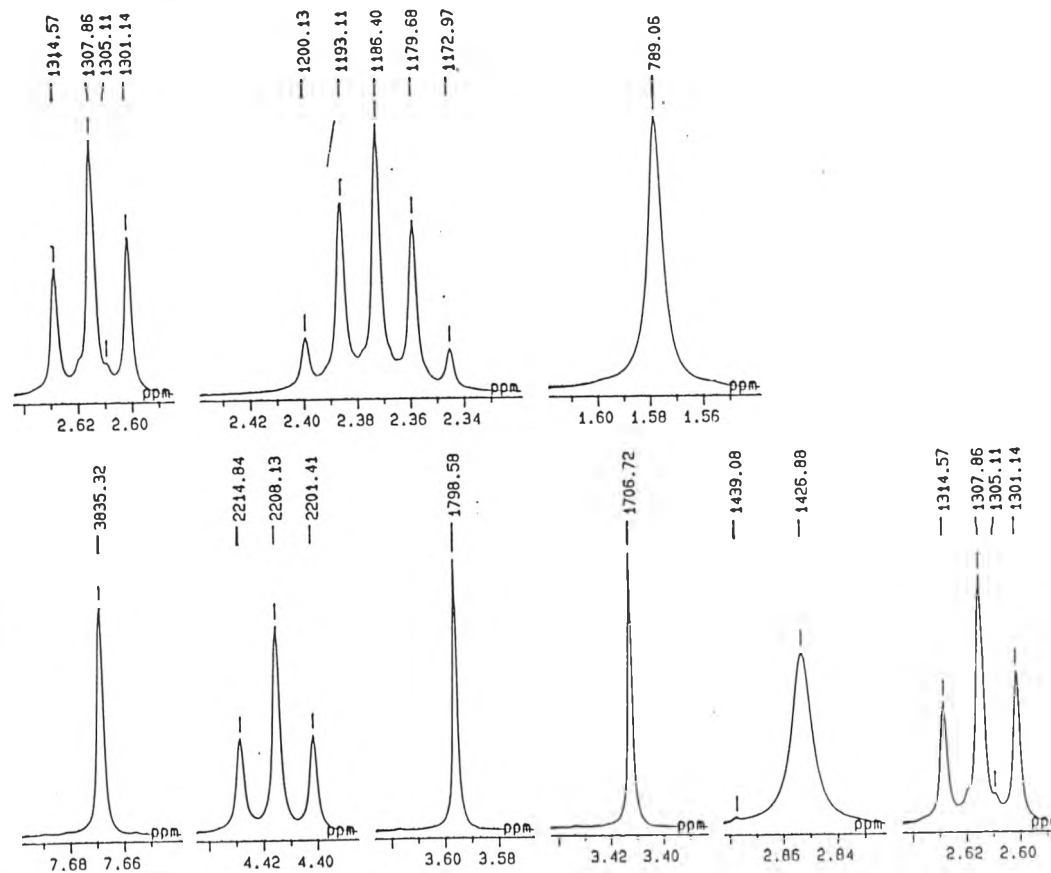
รูปที่ 22 IR สเปคตรัมของ NHS เอสเทอร์ ของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (NHS เอสเทอร์ ของอนุพันธ์ ก.)

ตารางที่ 10 อินฟราเรดแอบซอร์ปชัน (Infrared absorption) ของ NHS เอสเทอร์ของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (NHS เอสเทอร์ของอนุพันธ์ ก.)

wave numbers (cm^{-1})	หมู่ฟังก์ชัน
2947-3114	VC-H
1666-1823	VC=O, ester
1084, 1222	VC-O



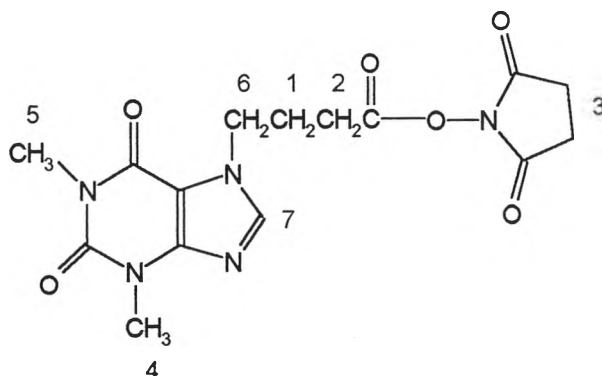
รูปที่ 23 ¹H-NMR สเปกตรัม NHS เอสเทอร์ ของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethyl xanthine (NHS เอสเทอร์ ของอนุพันธ์ ก.) ใน CDCl₃

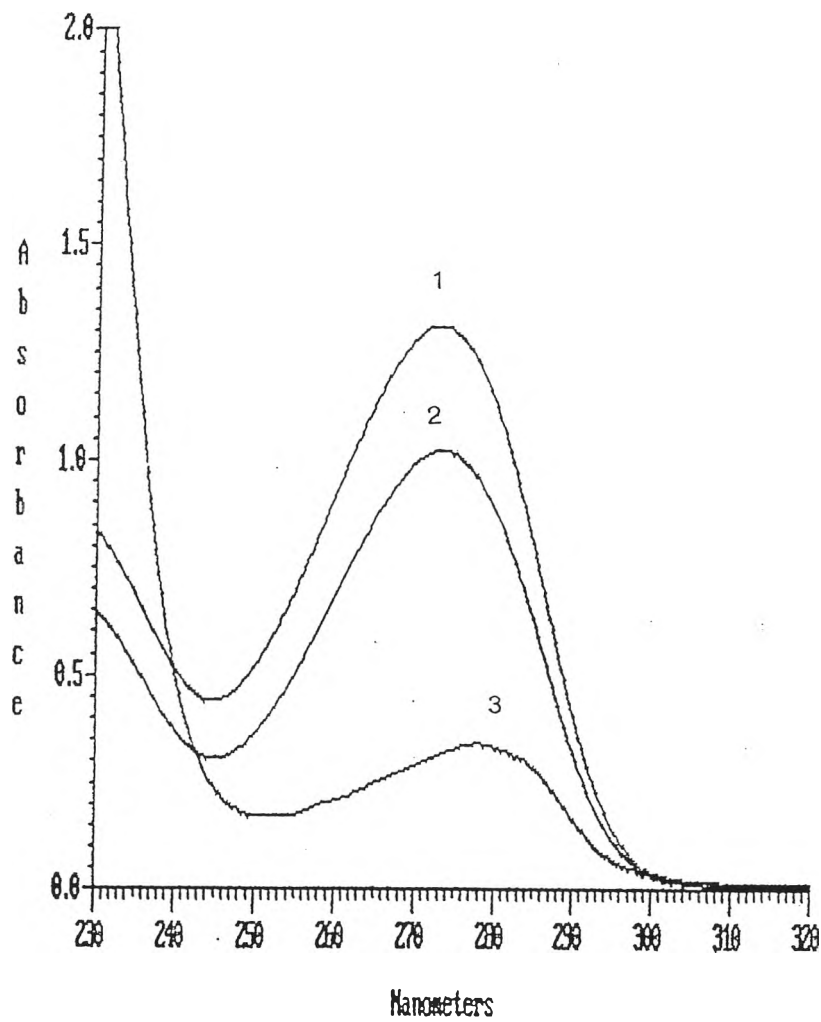


รูปที่ 24 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัม NHS เอสเทอร์ ของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethyl xanthine (NHS เอสเทอร์ ของอนุพันธ์ ก.) ใน CDCl_3
(ขยายสเกลจาก 1.55-7.69 ppm)

ตารางที่ 11 ค่าเคมีคัลชิฟท์ (δ) จาก $^1\text{H-NMR}$ ของ NHS เอสเทอร์ ของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (NHS เอสเทอร์ ของอนุพันธ์ ก.)

Position	Chemical shift (ppm)	Multiplicity
1	2.34-2.40	2H, m
2	2.60-2.63	2H, t, J = 6.7 Hz
3	2.85	4H, s
4	3.41	3H, s
5	3.60	3H, s
6	4.40-4.43	2H, t, J = 6.7 Hz
7	7.67	1H, s





รูปที่ 25 UV สเปกตรัมเปรียบเทียบระหว่างอิมมูโนเจน ก. (1), อนุพันธ์ ก. (2) และ BSA (3) ความเข้มข้น 0.500 มก./มล.

1. อิมมูโนเจน ก. คือ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine-BSA
2. อนุพันธ์ ก. คือ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine
3. BSA

ตารางที่ 12 การหาอัตราส่วนจำนวนโมลของอนุพันธ์ ก. ที่ติดบน BSA ของ อิมมูโนเจน ก.

ความเข้มข้น (มก./มล.)	Abs. 275 nm ของอิมมูโนเจน ก.	Abs. 275 nm ของ BSA	Abs. 275 nm ของอนุพันธ์ ก.	จำนวนโมลของอนุพันธ์ ก. ต่อ BSA
0.500	1.032	0.312	0.720	11.36
0.500	1.011	0.320	0.691	10.90
0.500	1.034	0.329	0.705	11.12
ค่าเฉลี่ย				11.13±0.23

อัตราส่วนจำนวนโมลของอนุพันธ์ ก. ในอิมมูโนเจน/MW อนุพันธ์ ก. ต่อ BSA = $\frac{\text{ความเข้มข้นของอนุพันธ์ ก. ในอิมมูโนเจน/MW อนุพันธ์ ก.}}{\text{ความเข้มข้นของ BSA ในอิมมูโนเจน/MW BSA}}$

ความเข้มข้นของอนุพันธ์ ก. ในอิมมูโนเจน = $\frac{\text{absorbance ของอนุพันธ์ ก.}}{\text{specific absorbance (k)}}$

2.2 การเตรียมอิมมูโนเจนของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (อิมมูโนเจน ข.)

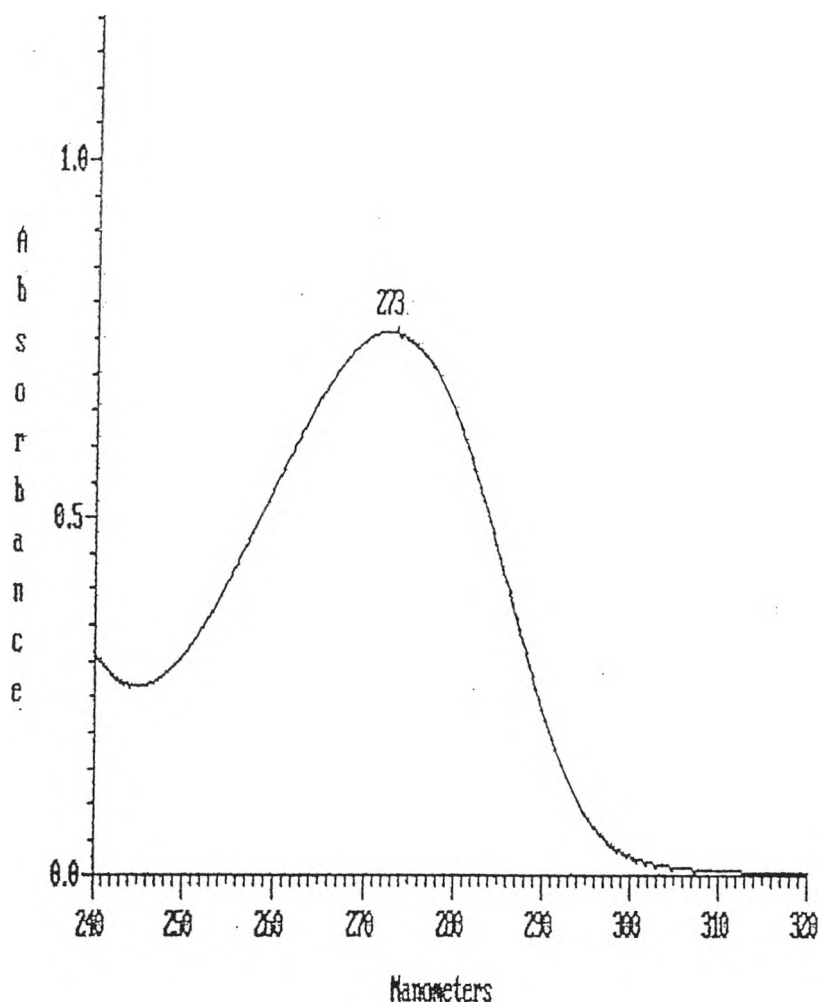
การเตรียมอิมมูโนเจน ข. เช่นเดียวกับ วิธีการเตรียมอิมมูโนเจน ก. โดยการสังเคราะห์อนุพันธ์ ข. ในรูป NHS เอสเทอร์ ก่อน จะได้ NHS เอสเทอร์ สำหรับอนุพันธ์ ข. เป็นผงสีขาว คิดเป็น 34.56% ของสารตั้งต้น มีจุดหลอมเหลว 164-165°C มีการดูดกลืนแสงสูงสุดของ UV สเปกตรัมที่ความยาวคลื่นที่ 273 nm เช่นเดียวกับธิโอฟิลีน ดังแสดงในรูปที่ 26 โดยมีค่าจำเพาะของการดูดกลืนแสง (specific absorbance, k) ที่ความเข้มข้น 1 กรัม/ลิตร เท่ากับ 25.37

การยืนยันผลของ NHS เอสเทอร์ ของอนุพันธ์ ข. ด้วย IR สเปกตรัม แสดงในรูปที่ 27 และตารางที่ 13 และ ¹H-NMR สเปกตรัมในรูปที่ 28 และ 29 และค่า เคมีดัลซิปท์ (δ) ในตารางที่ 14 ตามลำดับ

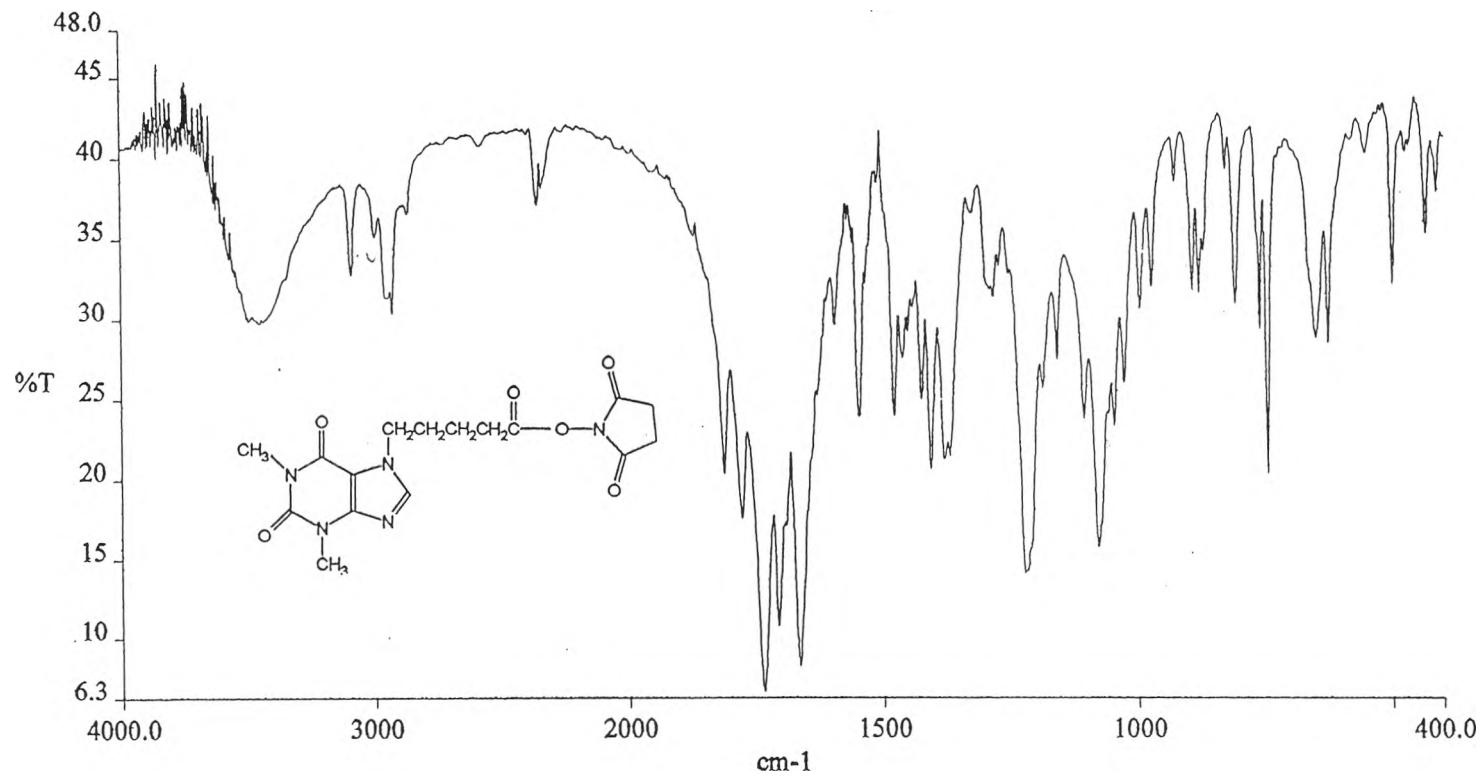
ผลการจับกันระหว่าง NHS เอสเทอร์ ของอนุพันธ์ ข. กับ BSA ได้อิมมูโนเจน ข. เป็นผงสีขาว มีการดูดกลืนแสงสูงสุดในช่วง UV ต่างจาก NHS เอสเทอร์ ของ 7-(4-

carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine เล็กน้อย คือที่ 275 nm ดังแสดงในรูปที่ 30 มีค่าจำเพาะของการดูดกลืนแสง ที่ความเข้มข้น 1 กรัม/ลิตร เท่ากับ 25.01

1 โมลของ BSA จับกับ NHS เอสเทอร์ ของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine ประมาณ 10 โมล ดังแสดงในตารางที่ 15



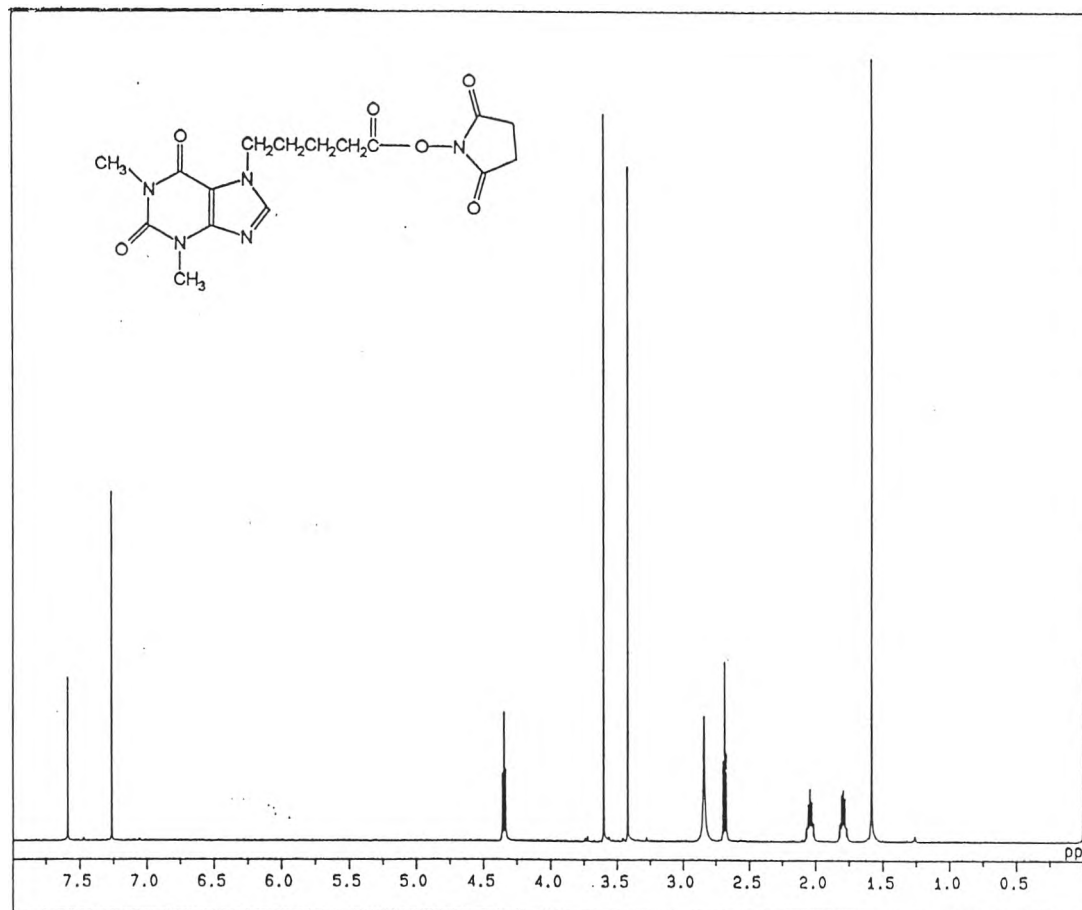
รูปที่ 26 UV สเปคตรัมของ NHS เอสเทอร์ ของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethyl xanthine (NHS เอสเทอร์ ของอนุพันธ์ ข.) ความเข้มข้น 33 มคก./มล.



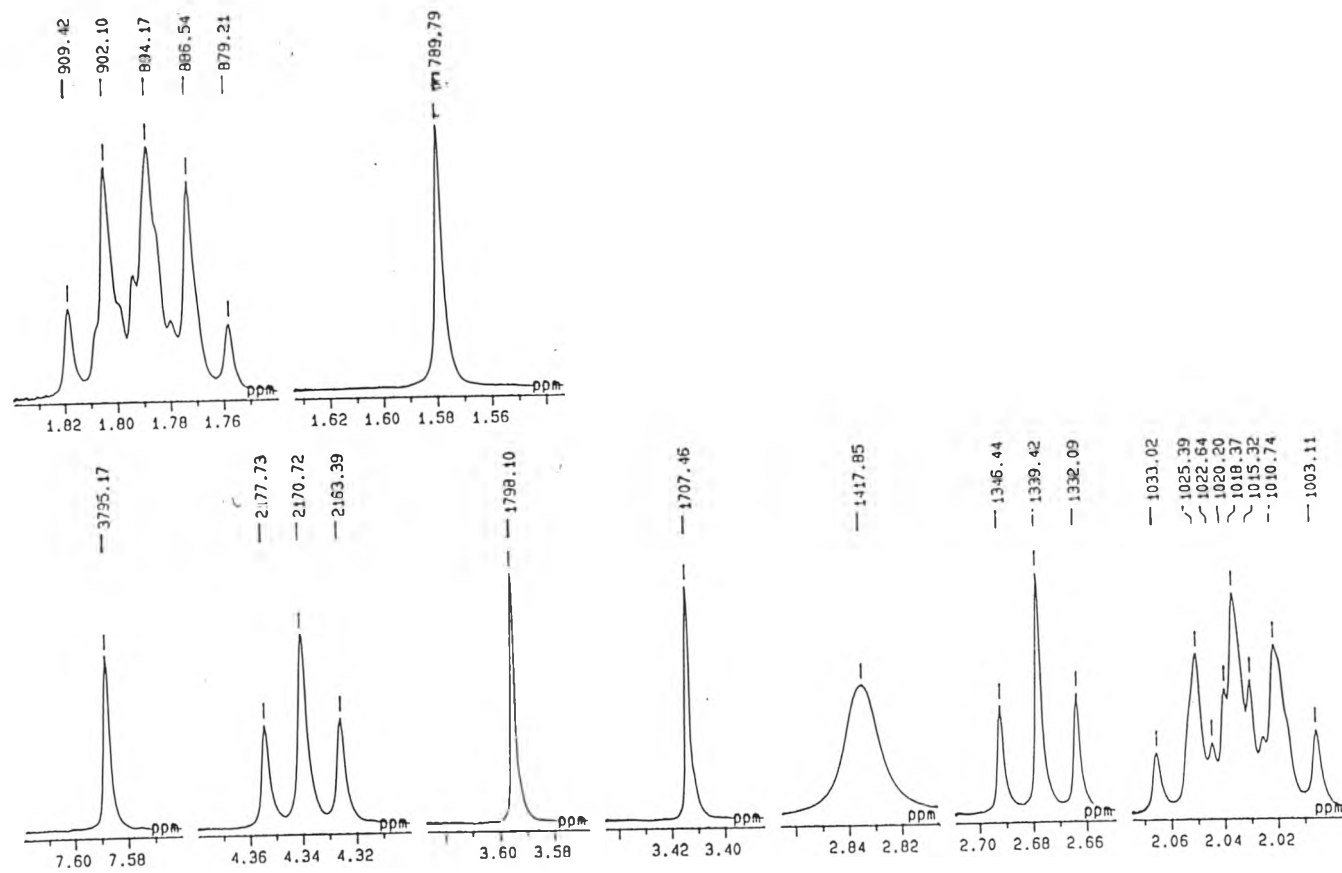
รูปที่ 27 IR สเปกตรัมของ NHS เอสเทอร์ ของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (NHS เอสเทอร์ ของอนุพันธ์ ข.)

ตารางที่ 13 อินฟราเรดแอบซอร์ปชัน (Infrared absorption) ของ NHS เอสเทอร์ ของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (NHS เอสเทอร์ ของอนุพันธ์ ข.)

wave numbers (cm ⁻¹)	หมู่ฟังก์ชัน
2900-3100	VC-H
1705-1811	VC=O, ester
1079, 1223	VC-O



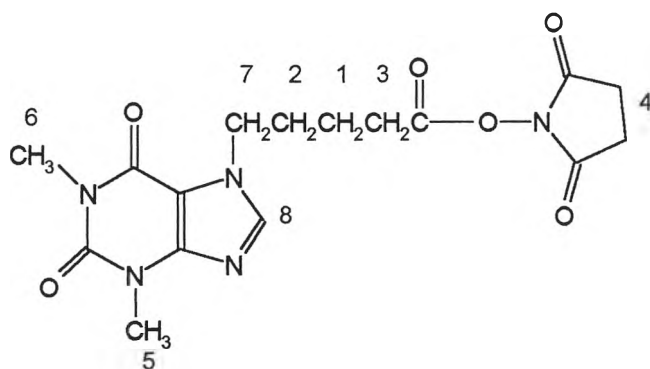
รูปที่ 28 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัม NHS เอสเทอร์ ของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethyl xanthine (NHS เอสเทอร์ ของอนุพันธ์ ข.) ใน CDCl_3

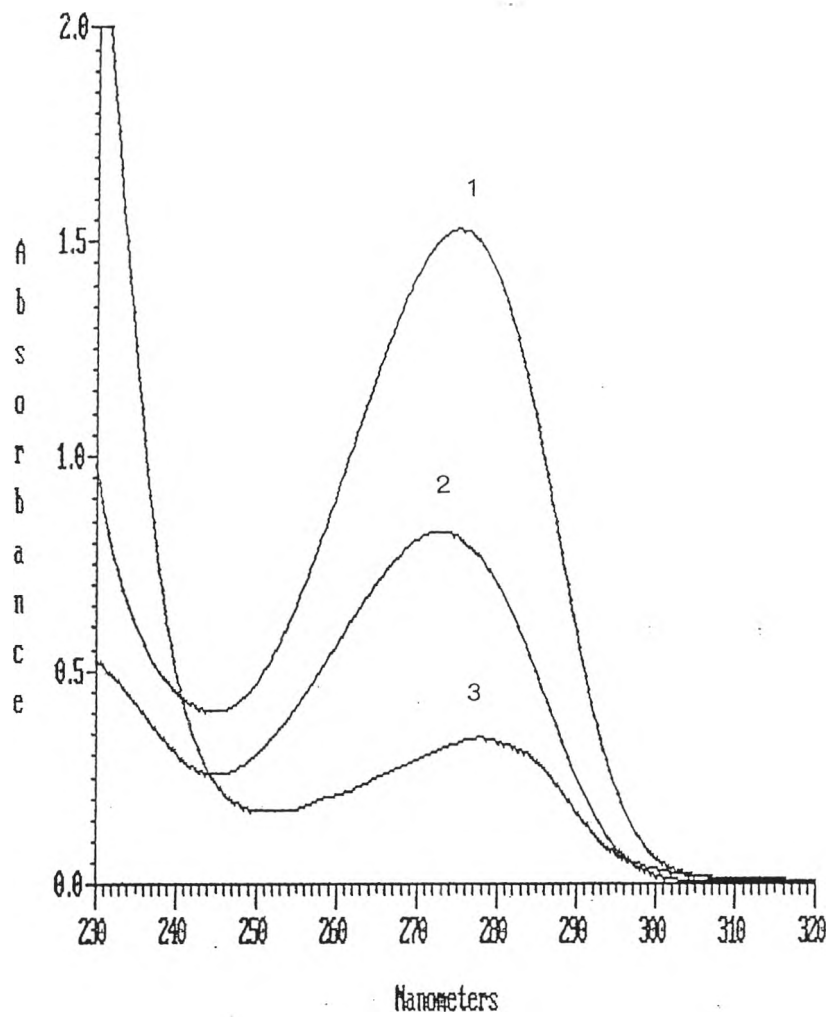


รูปที่ 29 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัม NHS เอสเทอร์ ของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethyl xanthine (NHS เอสเทอร์ ของอนุพันธ์ ข.) ใน CDCl_3
(ขยายสเกลจาก 1.54-7.62 ppm)

ตารางที่ 14 ค่าเคมีดัลซิปท์ (δ) จาก $^1\text{H-NMR}$ ของ NHS เอสเทอร์ ของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (NHS เอสเทอร์ ของอนุพันธ์ ก.)

Position	Chemical shift (ppm)	Multiplicity
1	1.75-1.82	2H, s
2	2.00-2.07	2H, m
3	2.66-2.69	2H, t, J = 7.3 Hz
4	2.83	4H, s
5	3.41	3H, s
6	3.59	3H, s
7	4.32-4.35	2H, t, J = 7.3 Hz
8	7.59	1H, s





รูปที่ 30 UV สเปกตรัมเปรียบเทียบระหว่างอิมมูโนเจน ข. (1), อนูพันธ์ ข. (2) และ BSA (3) ความเข้มข้น 0.286 มก./มล.

1. อิมมูโนเจน ข. คือ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine-BSA
2. อนูพันธ์ ข. คือ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine
3. BSA

ตารางที่ 15 การหาอัตราส่วนจำนวนโมลของอนุพันธ์ ข. ที่ติดบน BSA ของ
อิมมูโนเจน ข.

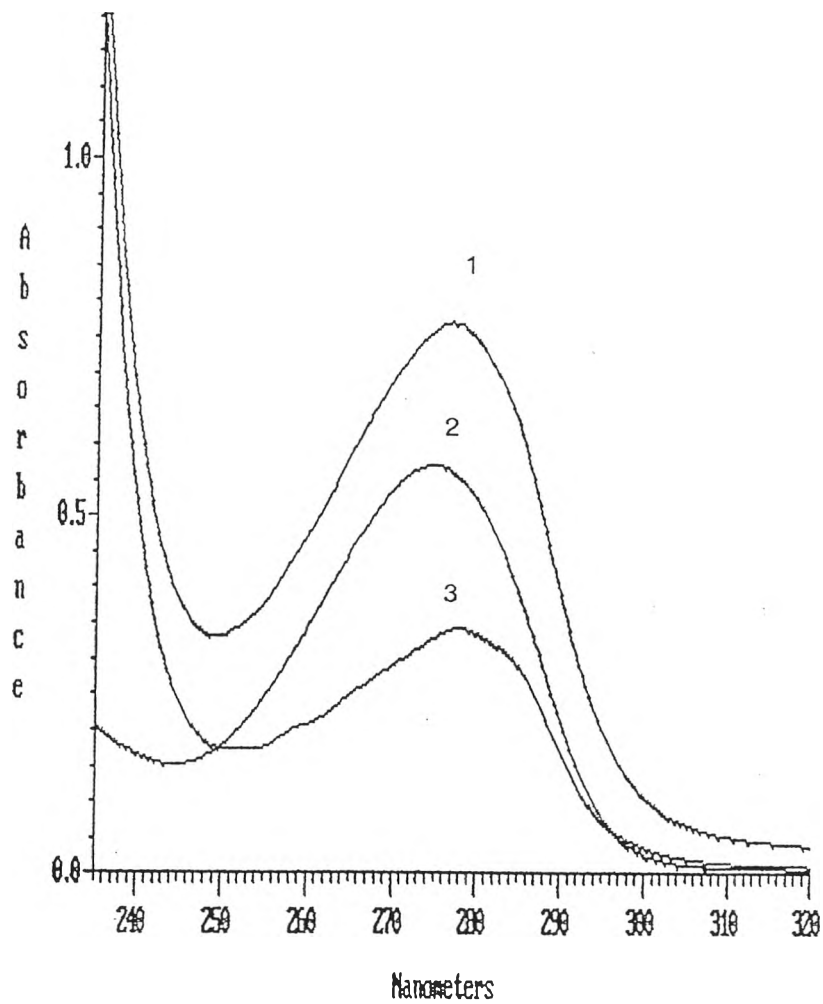
ความเข้มข้น (มก./มล.)	Abs. 275 nm ของอิมมูโนเจน ข.	Abs. 275 nm ของ BSA	Abs. 275 nm ของอนุพันธ์ ข.	จำนวนโมลของ อนุพันธ์ ข. ต่อ BSA
0.286	0.515	0.141	0.374	10.15
0.286	0.510	0.140	0.370	10.32
0.286	0.514	0.145	0.369	10.29
ค่าเฉลี่ย				10.25±0.09

อัตราส่วนจำนวนโมลของ = $\frac{\text{ความเข้มข้นของอนุพันธ์ ข. ในอิมมูโนเจน/MW อนุพันธ์ ข.}}{\text{ความเข้มข้นของ BSA ในอิมมูโนเจน/MWBSA}}$
อนุพันธ์ ข. ต่อ BSA

ความเข้มข้นของอนุพันธ์ ข. ในอิมมูโนเจน = $\frac{\text{absorbance ของอนุพันธ์ ข.}}{\text{specific absorbance (k)}}$

2.3 การเตรียมอิมมูโนเจนของ 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (อิมมูโนเจน ค.)

การเตรียมอิมมูโนเจน ค. เป็นผลจากการจับกันระหว่าง 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine กับ BSA โดยใช้ปฏิกิริยา Mixed anhydride method ได้อิมมูโนเจน ค. เป็นผงสีขาว มีการดูดกลืนแสงสูงสุดของ UV สเปกตรัมที่ความยาวคลื่น 277 nm ซึ่งต่างไปจากของอนุพันธ์ ค. เล็กน้อย ดังแสดงในรูปที่ 31 มีค่าจำเพาะของการดูดกลืนแสง (specific absorbance, k) ที่ความเข้มข้น 1 กรัม/ลิตร เท่ากับ 40.58 1 โมลของ BSA จับกับ 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine ประมาณ 12 โมล ดังแสดงในตารางที่ 16



รูปที่ 31 UV สเปกตรัมเปรียบเทียบระหว่างอิมมูโนเจน ค. (1), อนุพันธ์ ค. (2) และ BSA (3) ความเข้มข้น 0.500 มก./มล.

1. อิมมูโนเจน ค. คือ 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine-BSA
2. อนุพันธ์ ค. คือ 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine
3. BSA

ตารางที่ 16 แสดงการหาอัตราส่วนจำนวนโมลของอนุพันธ์ ค. ที่ติดบน BSA ของ อิมมูโนเจน ค.

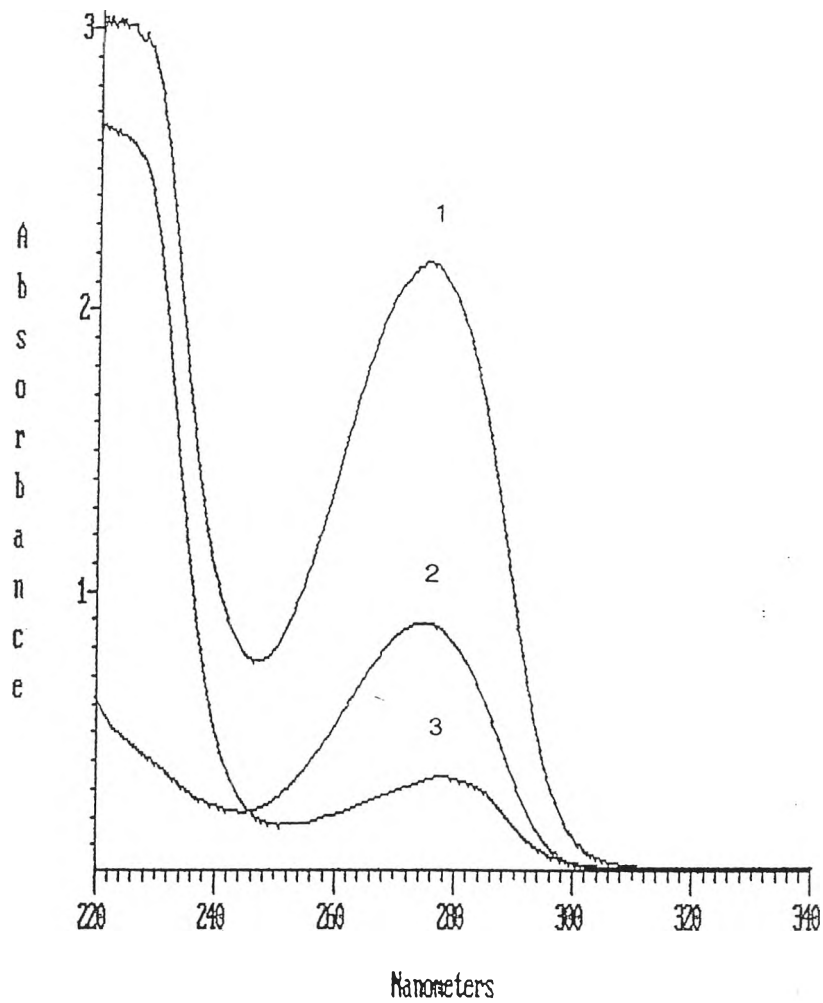
ความเข้มข้น (มก./มล.)	Abs. 275 nm ของอิมมูโนเจน ค.	Abs. 275 nm ของ BSA	Abs. 275 nm ของอนุพันธ์ ค.	จำนวนโมลของ อนุพันธ์ ค. ต่อ BSA
0.500	1.175	0.304	0.871	11.85
0.500	1.158	0.303	0.855	11.65
0.500	1.168	0.302	0.866	11.79
ค่าเฉลี่ย				11.76±0.01

อัตราส่วนจำนวนโมลของ อนุพันธ์ ค. ต่อ BSA = $\frac{\text{ความเข้มข้นของอนุพันธ์ ค. ในอิมมูโนเจน/MW อนุพันธ์ ค.}}{\text{ความเข้มข้นของ BSA ในอิมมูโนเจน/MW BSA}}$

ความเข้มข้นของอนุพันธ์ ค. ในอิมมูโนเจน = $\frac{\text{absorbance ของอนุพันธ์ ค.}}{\text{specific absorbance (k)}}$

2.4 การเตรียมอิมมูโนเจนของ 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (อิมมูโนเจน ง.)

การเตรียมอิมมูโนเจน ง. เป็นผลจากการจับกันระหว่าง 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine กับ BSA โดยใช้ปฏิกิริยา Mixed anhydride method เช่นเดียวกับการเตรียม อิมมูโนเจน ค. อิมมูโนเจน ง. มีลักษณะเป็นผงสีขาวมีการดูดกลืนแสงสูงสุดของ UV สเปกตรัมที่ความยาวคลื่น 276 nm ดังแสดงในรูปที่ 32 มีค่าจำเพาะของการดูดกลืนแสง (specific absorbance, k) ที่ความเข้มข้น 1 กรัม/ลิตรเท่ากับ 36.62 1 โมลของ BSA จับกับ 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine ประมาณ 27 โมลดังแสดงในตารางที่ 17



รูปที่ 32 UV สเปกตรัมเปรียบเทียบระหว่างอิมมูโนเจน ง. (1), อนุพันธ์ ง. (2) และ BSA (3) ความเข้มข้น 0.500 มก./มล.

1. อิมมูโนเจน ง. คือ 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine-BSA
2. อนุพันธ์ ง. คือ 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine
3. BSA

ตารางที่ 17 การหาอัตราส่วนจำนวนโมลของอนุพันธ์ ง. ที่ติดบน BSA ของ
อิมมูโนเจน ง.

ความเข้มข้น (มก./มล.)	Abs. 275 nm ของอิมมูโนเจน ง.	Abs. 275 nm ของ BSA	Abs. 275 nm ของอนุพันธ์ ง.	จำนวนโมลของ อนุพันธ์ ง. ต่อ BSA
0.500	2.173	0.337	1.836	27.97
0.500	2.171	0.339	1.832	27.91
0.500	2.165	0.330	1.835	27.95
ค่าเฉลี่ย				27.94±0.03

อัตราส่วนจำนวนโมลของ อนุพันธ์ ง. ต่อ BSA = $\frac{\text{ความเข้มข้นของอนุพันธ์ ง. ในอิมมูโนเจน/MW อนุพันธ์ ง.}}{\text{ความเข้มข้นของ BSA ในอิมมูโนเจน/MW BSA}}$

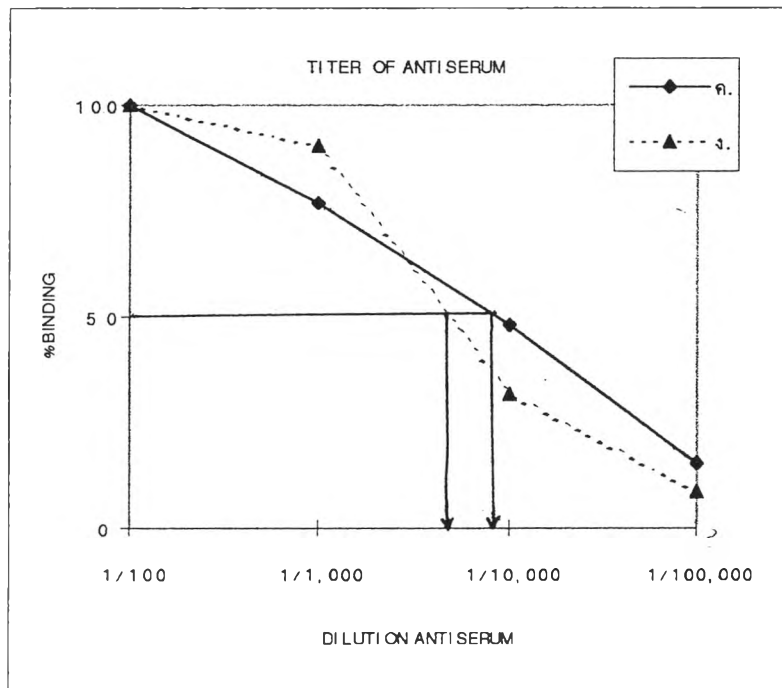
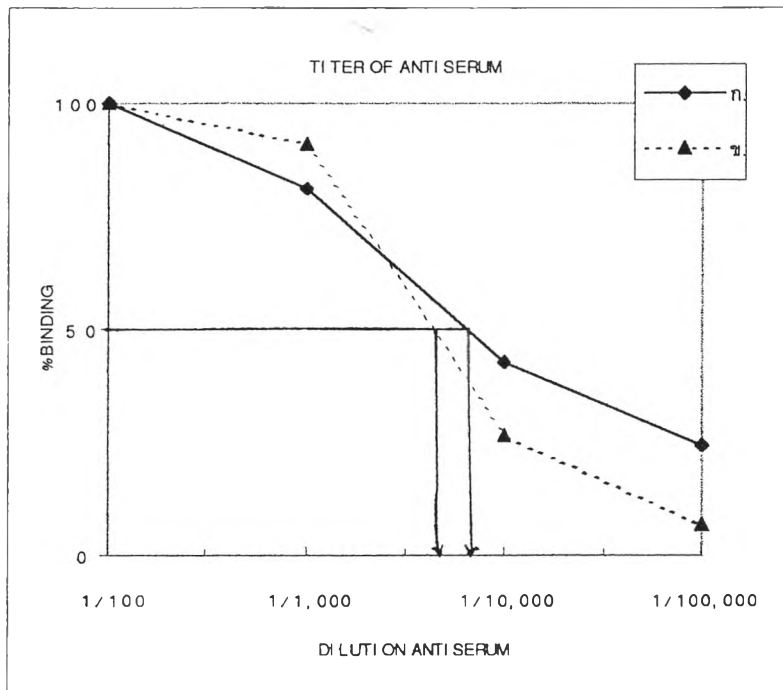
ความเข้มข้นของอนุพันธ์ ง. ในอิมมูโนเจน = $\frac{\text{absorbance ของอนุพันธ์ ง.}}{\text{specific absorbance (k)}}$

3. การกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีสำหรับอีโอฟิลลิน

การกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีด้วยอิมมูโนเจน ก. , ข. , ค. และ ง. ใช้กระต่าย 2 ตัว ต่ออิมมูโนเจน 1 ตัว ได้แอนติซีรัมซึ่งแสดงความแรงโดยค่าไตเตอร์ ดังแสดงในรูปที่ 33 และตารางที่ 18 ซึ่งถ้าแอนติบอดีมีค่าไตเตอร์สูง มีความหมายว่าแอนติบอดีนั้นมีความสามารถในการจับกับอีโอฟิลลินมาก

ตารางที่ 18 แสดงค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัม ก, ข, ค. และ ง.

อิมมูโนเจน	ค่าไตเตอร์ที่อัตราส่วน ความเจือจางของแอนติซีรัม
ก.	1:8,000
ข.	1:6,000
ค.	1:9,000
ง.	1:7,000



รูปที่ 33 กราฟแสดงผลการหาไตเตอร์ของแอนติซีรัม

I แอนติซีรัม ก. และ ข.

II แอนติซีรัม ค. และ ง.

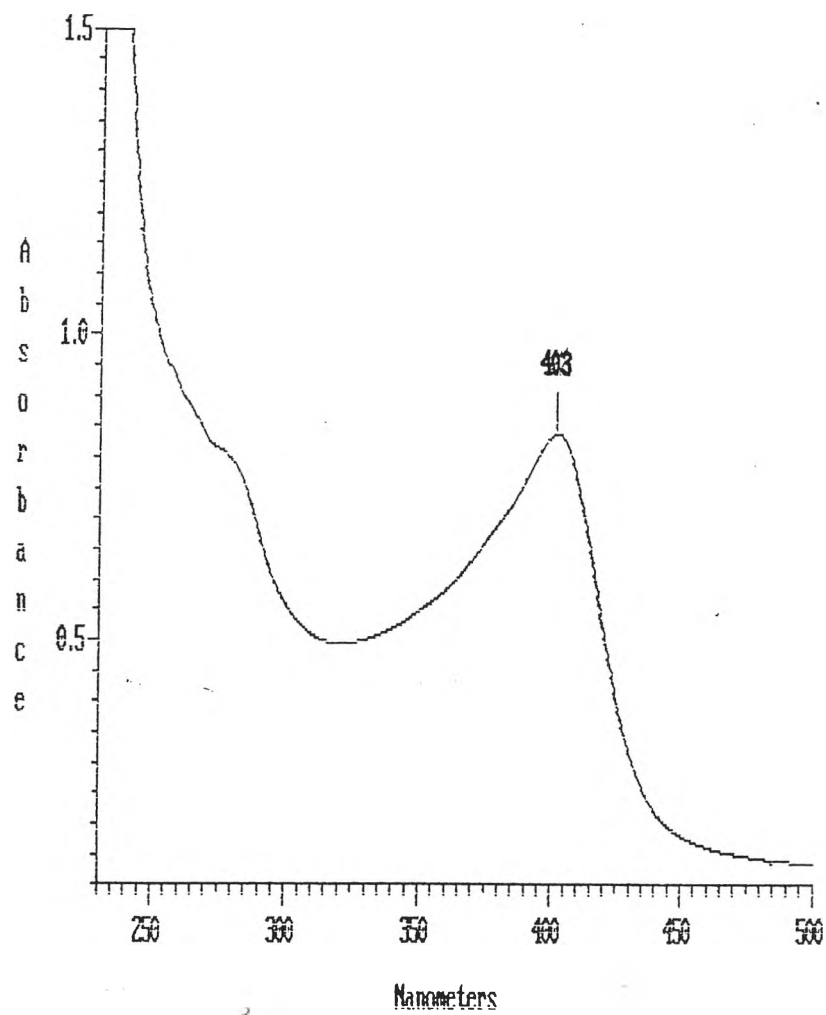
4. การติดฉลากอิโอฟิลลีนด้วยเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดส

4.1 การเตรียมเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดสเพื่อการติดฉลาก

เอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ถูกเพิ่มกลุ่มอะมิโนจะยังคงคุณสมบัติของเอ็นไซม์ โดยมีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาลอ่อนขำงเบา มีคุณสมบัติการดูดกลืนแสงสูงสุดในช่วง UV ที่ความยาวคลื่น 403 nm ซึ่งเป็นค่าการดูดกลืนแสงของเปอร์ออกซิเดส ดังแสดงในรูป 34 จำนวนอะมิโนที่เพิ่มขึ้นนี้อยู่ในอัตราส่วน 14 โมลต่อ 1 โมลของเอ็นไซม์ดังแสดงในตารางที่ 19 จำนวนอะมิโนที่เพิ่มขึ้นนี้ถือว่ามากพอ เมื่อเทียบกับที่มีในรายงานว่าควรมีหมู่อะมิโนอยู่ระหว่าง 12-18 โมลต่อ 1 โมลของเอ็นไซม์ (Litman et al., 1983; Zuketal, 1985)

ตารางที่ 19 แสดงการหาจำนวนหมู่ฟังก์ชันอะมิโนใน aminated HRP

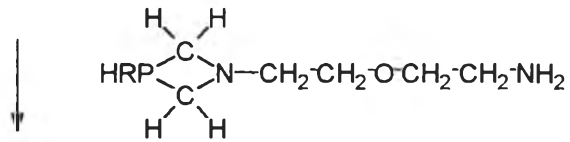
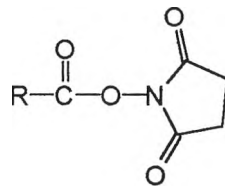
ความเข้มข้น (M)	Absorbance ที่ ความยาวคลื่น 354 nm	จำนวนหมู่ฟังก์ชันอะมิโน ต่อ 1 โมลของเอ็นไซม์
2.5×10^{-5}	0.756	14.22
2.5×10^{-5}	0.836	15.72
2.5×10^{-5}	0.736	13.84
ค่าเฉลี่ย		14.59 ± 0.99



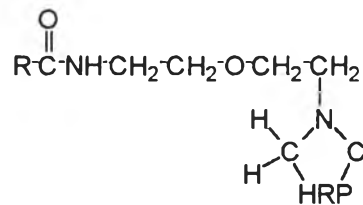
รูปที่ 34 UV สเปกตรัมของ aminated HRP 3.00 มก./มล.

4.2 การติดฉลาก 7-(3-carboxypyrpyl)-1,3-dimethylxanthine กับ เอ็นไซม์ เปอร์ออกซิเดส (สารติดฉลาก ก.)

7-(3-carboxypyrpyl)-1,3-dimethylxanthine เป็นสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กเมื่อเทียบกับเอ็นไซม์ ผลการติดฉลากด้วยเอ็นไซม์ เป็นการจับของส่วนของเอ็นไซม์กับหมู่คาร์บอนิลของริโอฟิลลีน ปฏิกริยาเคมีได้แสดงในรูปที่ 35 สารติดฉลากที่ได้แสดงคุณสมบัติการดูดกลืนแสงทั้งของริโอฟิลลีนและเอ็นไซม์ ดังแสดงในรูปที่ 36 ซึ่งสารติดฉลากที่ได้ประกอบด้วย NHS เอสเทอร์ ของ 7-(3-carboxypyrpyl)-1,3-dimethylxanthine จำนวน 8 โมลต่อ 1 โมลของ HRP ดังแสดงในตารางที่ 20

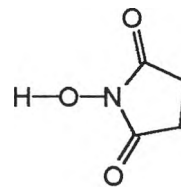


aminated HRP

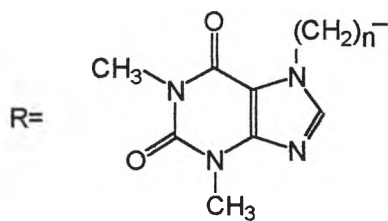


HRP labeled theophylline

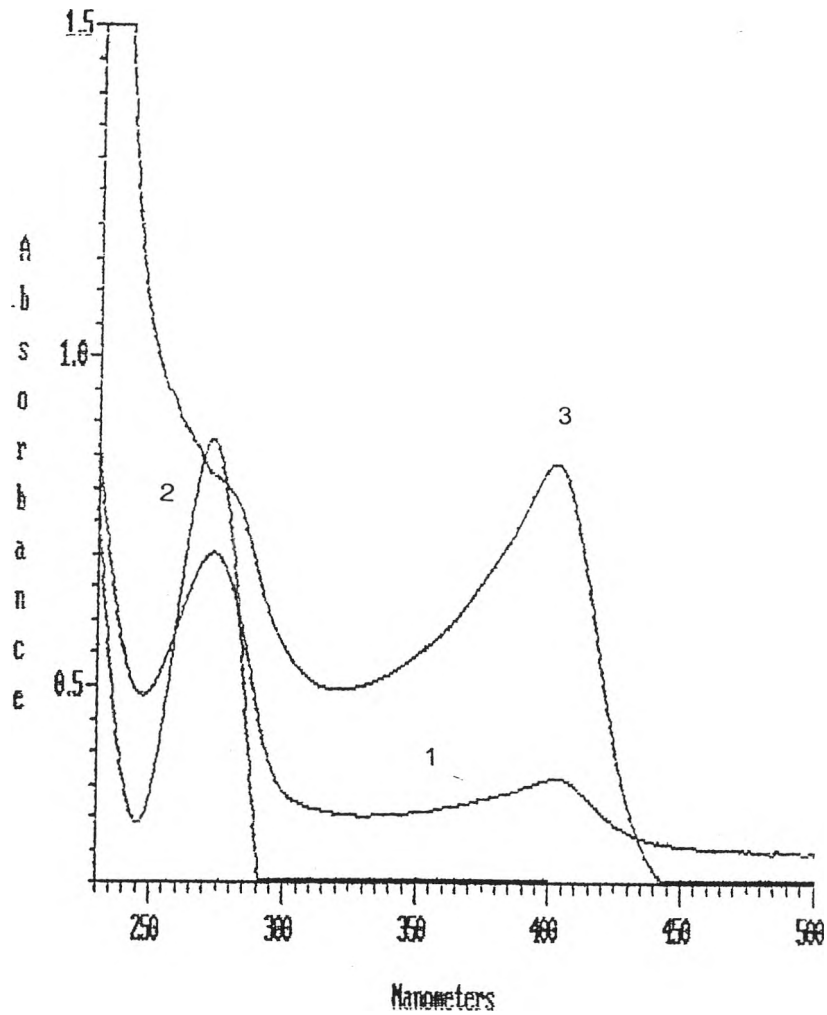
+



NHS

อนุพันธ์ ก. $n=3$ อนุพันธ์ ข. $n=4$

รูปที่ 35 ปฏิกริยาเคมีในการสังเคราะห์อนุพันธ์ไอพิลลีน ณ ตำแหน่งที่ 7 ติดฉลาก
เอ็นไซม์ HRP



รูปที่ 36 UV สเปกตรัมแสดงการเปรียบเทียบระหว่าง อนุพันธ์ ก. ที่ติดฉลากเอ็นไซม์ (1), อนุพันธ์ ก. (2) และเอ็นไซม์ (3) ความเข้มข้น 3.00 มก./มล.

1 = สารติดฉลาก ก.

2 = อนุพันธ์ ก.

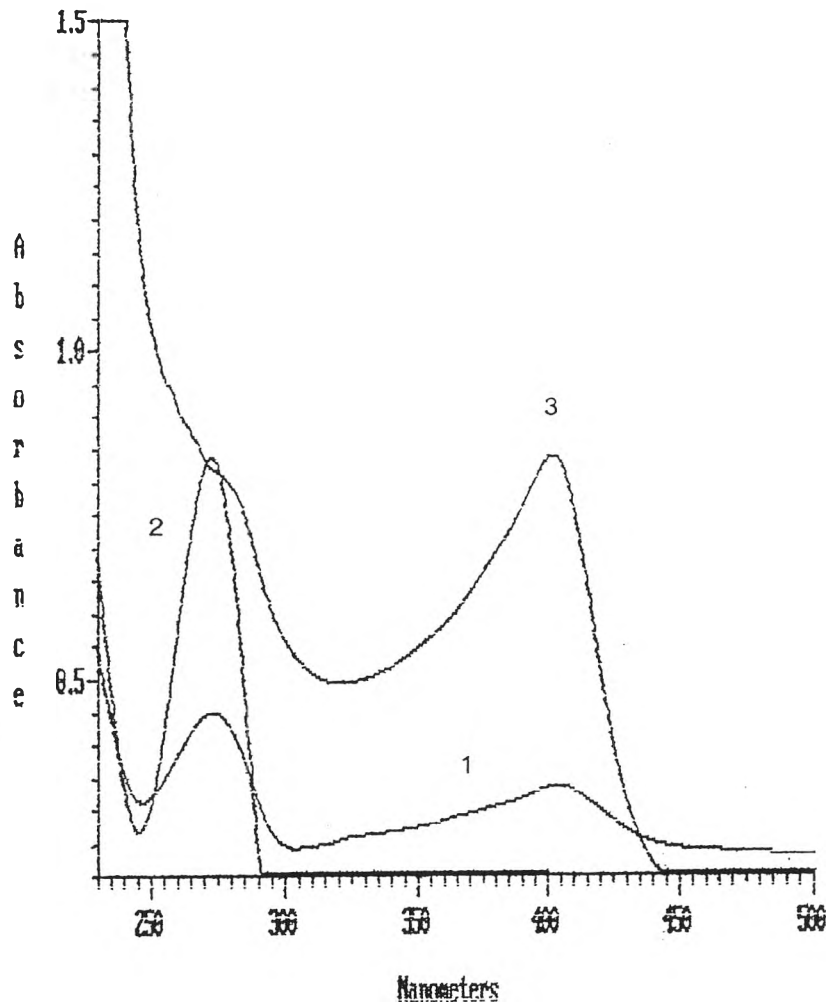
3 = aminated HRP

ตารางที่ 20 แสดงการหาอัตราส่วนจำนวนโมลของอนุพันธ์ ก. ที่ติดบน HRP

ความเข้มข้น (มก./มล.)	Absorbance ที่ 273 nm	Absorbance ที่ 403 nm	จำนวนโมลของ อนุพันธ์ ก. ต่อ HRP
3.00	0.701	0.362	8.69
3.00	0.700	0.357	8.78
3.00	0.703	0.360	8.71
ค่าเฉลี่ย			8.73 ± 0.04

4.3 การติดฉลาก 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine กับ เอ็นไซม์ เปอร์ออกซิเดส (สารติดฉลาก ข.)

การติดฉลาก 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine ด้วยเอ็นไซม์ ได้สารติดฉลากที่ได้แสดงคุณสมบัติการดูดกลืนแสงทั้งของริโอฟิลีนและเอ็นไซม์ ดังแสดงในรูปที่ 37 ซึ่งสารติดฉลากที่ได้จะประกอบด้วย NHS เอสเทอร์ ของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine จำนวน 7 โมลต่อ HRP 1 โมล ดังแสดงในตารางที่ 21



รูปที่ 37 UV สเปกตรัมแสดงการเปรียบเทียบระหว่าง อนุพันธ์ ซ. ที่ติดฉลากเอ็นไซม์ (1), อนุพันธ์ ซ. (2) และเอ็นไซม์ (3) ความเข้มข้น 3.00 มก./มล.

1 = สารติดฉลาก ซ.

2 = อนุพันธ์ ซ.

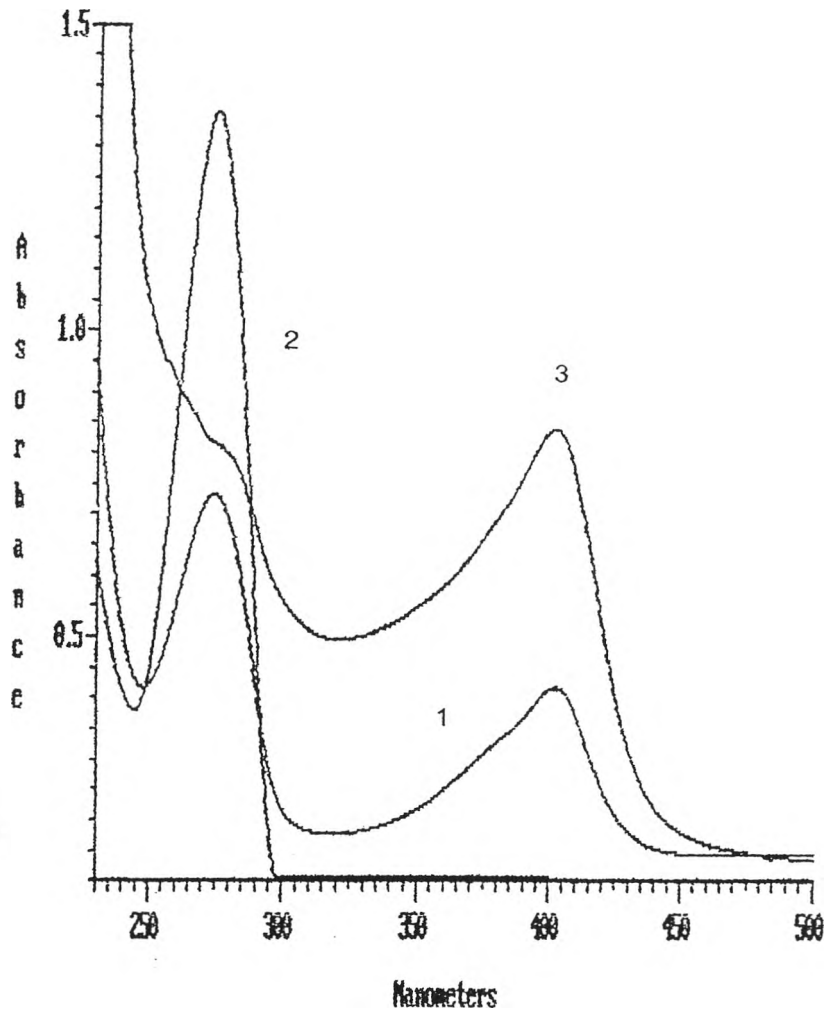
3 = aminated HRP

ตารางที่ 21 การหาอัตราส่วนจำนวนโมลของอนุพันธ์ ข. ที่ติดบน HRP

ความเข้มข้น (มก./มล.)	Absorbance ที่ 273 nm	Absorbance ที่ 403 nm	จำนวนโมลของ อนุพันธ์ ข. ต่อ HRP
3.00	1.145	0.736	7.05
3.00	1.143	0.735	7.04
3.00	1.148	0.739	7.08
ค่าเฉลี่ย			7.06 ± 0.02

4.4 การติดฉลาก 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine กับเอ็นไซม์ เปอร์ออกซิเดส (สารติดฉลาก ค.)

สำหรับ 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine ติดฉลากด้วยเอ็นไซม์โดยวิธี Mixed anhydride method ผลการติดฉลากแสดงในรูปที่ 38 ซึ่งสารติดฉลากที่ได้ประกอบด้วยอนุพันธ์ ค. จำนวน 7 โมลต่อ 1 โมล ของ HRP ดังแสดงในตารางที่ 22



รูปที่ 38 UV สเปกตรัมแสดงการเปรียบเทียบระหว่าง อนุพันธ์ ค. ที่ติดฉลากเอ็นไซม์ (1), อนุพันธ์ ค. (2) และเอ็นไซม์ (3) ความเข้มข้น 3.00 มก./มล.

1 = สารติดฉลาก ค.

2 = อนุพันธ์ ค.

3 = aminated HRP

ตารางที่ 22 การหาอัตราส่วนจำนวนโมลของอนุพันธ์ ค. ที่ติดบน HRP

ความเข้มข้น (มก./มล.)	Absorbance ที่ 275 nm	Absorbance ที่ 403 nm	จำนวนโมลของ อนุพันธ์ ค. ต่อ HRP
3.00	0.733	0.417	6.91
3.00	0.730	0.420	6.81
3.00	0.735	0.415	6.92
ค่าเฉลี่ย			6.88±0.06

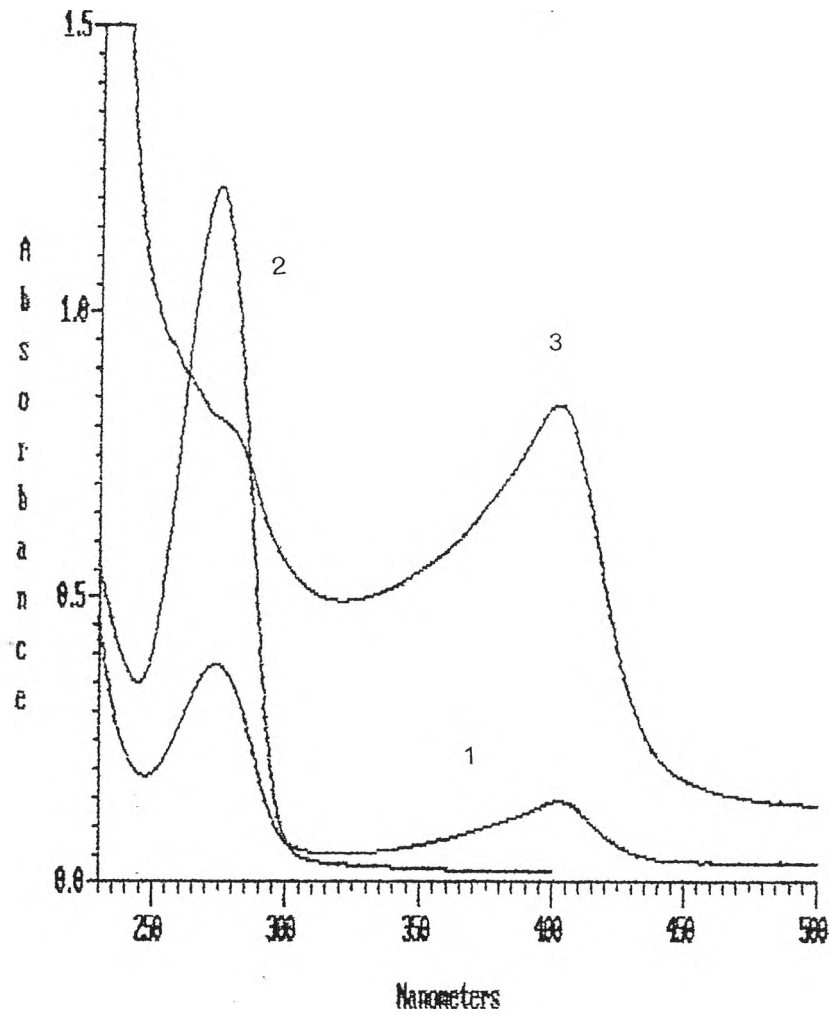
4.5 การติดฉลาก 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine กับเอ็นไซม์ เปอร์ออกซิเดส (สารติดฉลาก ง.)

ทำการเตรียมสารติดฉลาก ง. ด้วยเอ็นไซม์โดยวิธี Mixed anhydride method เช่นเดียวกับสารติดฉลาก ก. ผลการติดฉลากแสดงในรูปที่ 39 ซึ่งสารติดฉลากที่ได้ประกอบด้วย 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine จำนวน 11 โมลต่อ 1 โมล ของ HRP ดังแสดงในตารางที่ 23

ตารางที่ 23 แสดงการหาอัตราส่วนจำนวนโมลของอนุพันธ์ ง. ที่ติดบน HRP

ความเข้มข้น (มก./มล.)	Absorbance ที่ 275 nm	Absorbance ที่ 403 nm	จำนวนโมลของ อนุพันธ์ ง. ต่อ HRP
3.00	0.383	0.143	11.27
3.00	0.393	0.150	10.91
3.00	0.399	0.152	11.08
ค่าเฉลี่ย			11.09±0.18

สรุปผลการติดฉลากอิโพลีนของอนุพันธ์ต่างๆด้วยเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดสของอนุพันธ์ ก., ข., ค. และ ง. มีจำนวนโมลของอนุพันธ์ต่อ 1 โมลของ HRP คือ 8, 7, 7 และ 11 ตามลำดับ



รูปที่ 39 UV สเปกตรัมแสดงการเปรียบเทียบระหว่าง อนุพันธ์ ง. ที่ติดฉลากเอ็นไซม์ (1), อนุพันธ์ ง. (2) และเอ็นไซม์ (3) ความเข้มข้น 3.00 มก./มล.

1 = สารติดฉลาก ง.

2 = อนุพันธ์ ง.

3 = aminated HRP

5. สภาวะที่เหมาะสมในการเกิดการแย่งที่ (competition) ระหว่างธิโอฟิลลีนติดฉลาก เอ็นไซม์ กับสารละลายมาตรฐานธิโอฟิลลีนในการจับกับแอนติบอดี

ผลการเกิดปฏิกิริยาการแย่งที่ระหว่างสารติดฉลากก.กับธิโอฟิลลีนในการจับกับแอนติบอดีที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยอิมมูโนเจนในรูปของอนุพันธ์ ก. (7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine ณ ค่าอัตราส่วนความเจือจางต่าง ๆ

เมื่อใช้ซีรัมของอิมมูโนเจน ก. ที่มีอัตราส่วนความเจือจางของสารติดฉลากต่างกัน 4 ค่า คือ 1:100, 1:500, 1:800 และ 1:1,000 ตามลำดับ กับอัตราส่วนความเจือจางของแอนติซีรัม 4 ค่า คือ 1:1,000, 1:2,000, 1:5,000 และ 1:10,000

การแสดงความสัมพันธ์ของการแย่งที่กับความเข้มข้นของธิโอฟิลลีนจากกราฟมาตรฐานระหว่าง % การจับ กับความเข้มข้นของธิโอฟิลลีน นำมาสร้างกราฟ logic plot ระหว่าง % การจับกับความเข้มข้นของ ธิโอฟิลลีนในเทอมของ log ดังแสดงในรูปที่ 40-43 โดย %การจับคำนวณได้ดังสมการต่อไปนี้

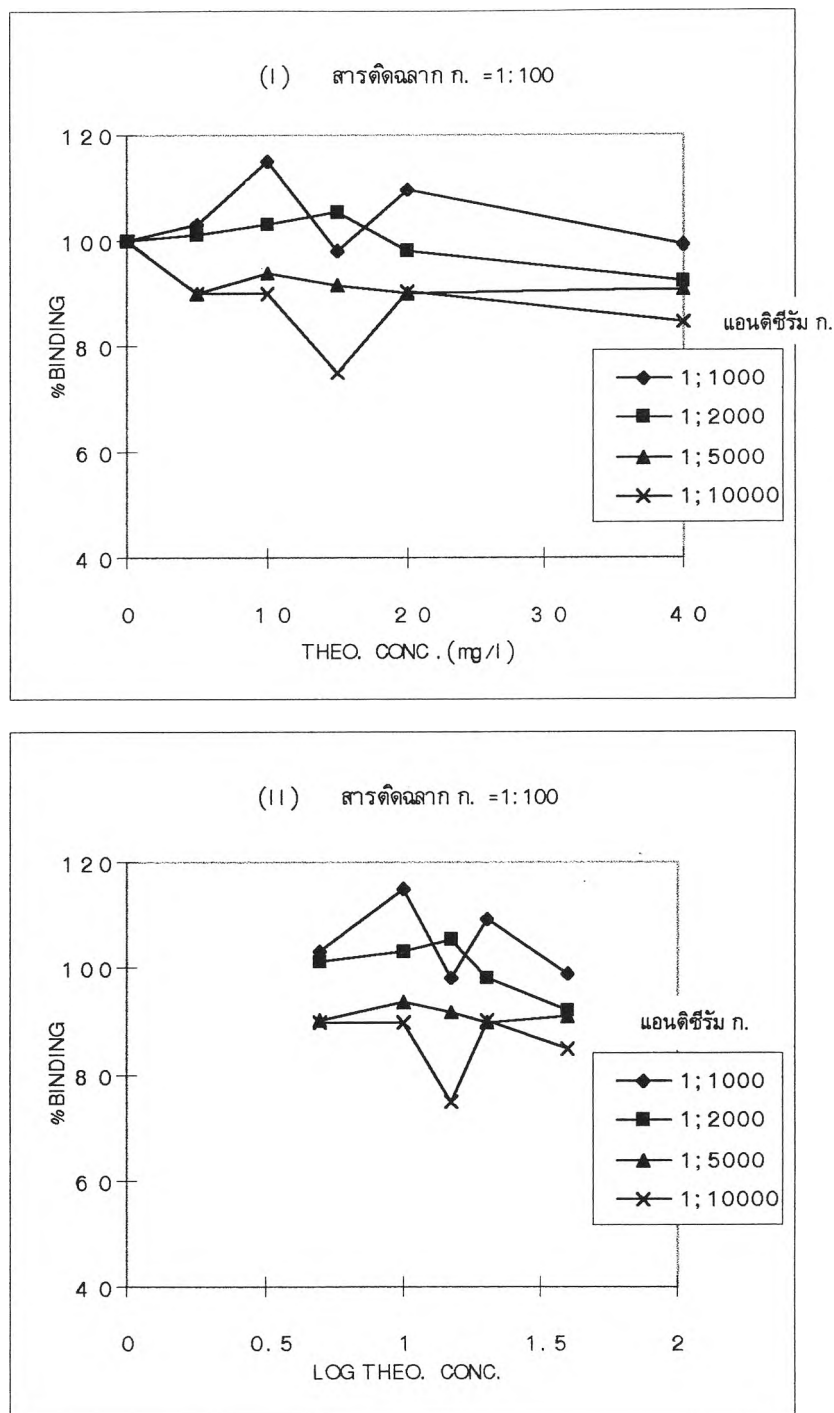
$$\% \text{การจับ} = (B/B_0) \times 100$$

B = absorbance ณ ความเข้มข้นต่าง ๆ ของ ธิโอฟิลลีน

B₀ = absorbance ณ ความเข้มข้นของ ธิโอฟิลลีน 0 มก./ลิตร

จากตารางที่ 24 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการแย่งที่กับความเข้มข้นของธิโอฟิลลีนในเชิงเส้นตรงที่ดีที่สุด (คือที่ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r)มีค่ามากที่สุด)ของอนุพันธ์ ก. คือ ที่สารติดฉลากมีอัตราส่วนความเจือจางเท่ากับ 1:1,000 และ แอนติซีรัมมีอัตราส่วนความเจือจางเท่ากับ 1:2,000 โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9470

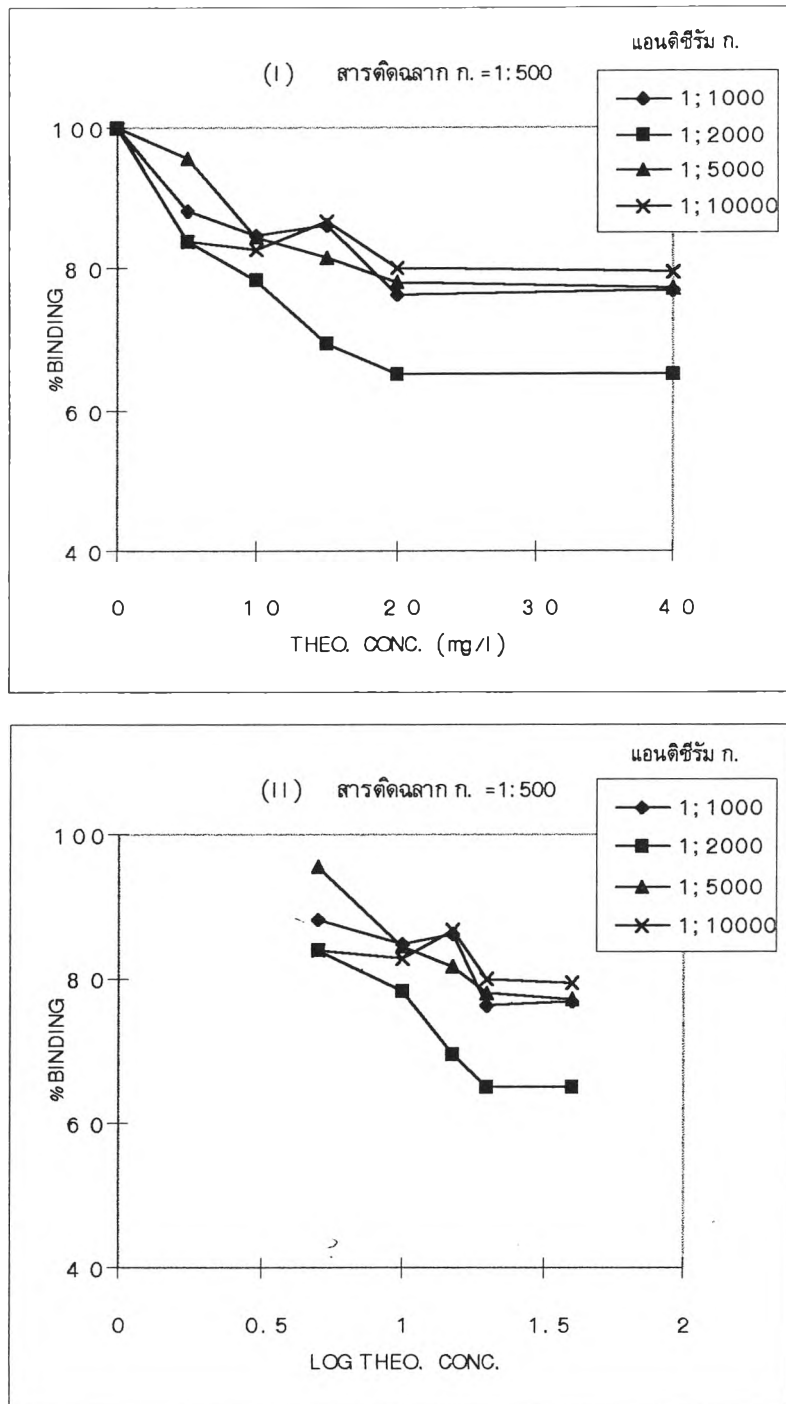
ดังนั้นสภาวะที่ได้นี้จะถูกนำไปใช้ในการศึกษาผลของเฮเทอโรโลกส์คอมบิเนชันต่อไป



รูปที่ 40 ผลของปฏิกิริยาแย่งที่ระหว่างสารติดฉลาก ก. อัตราส่วนความเจือจาง 1:100 กับ
สารละลายมาตรฐานธีโอฟิลลีน

กราฟ I direct plot

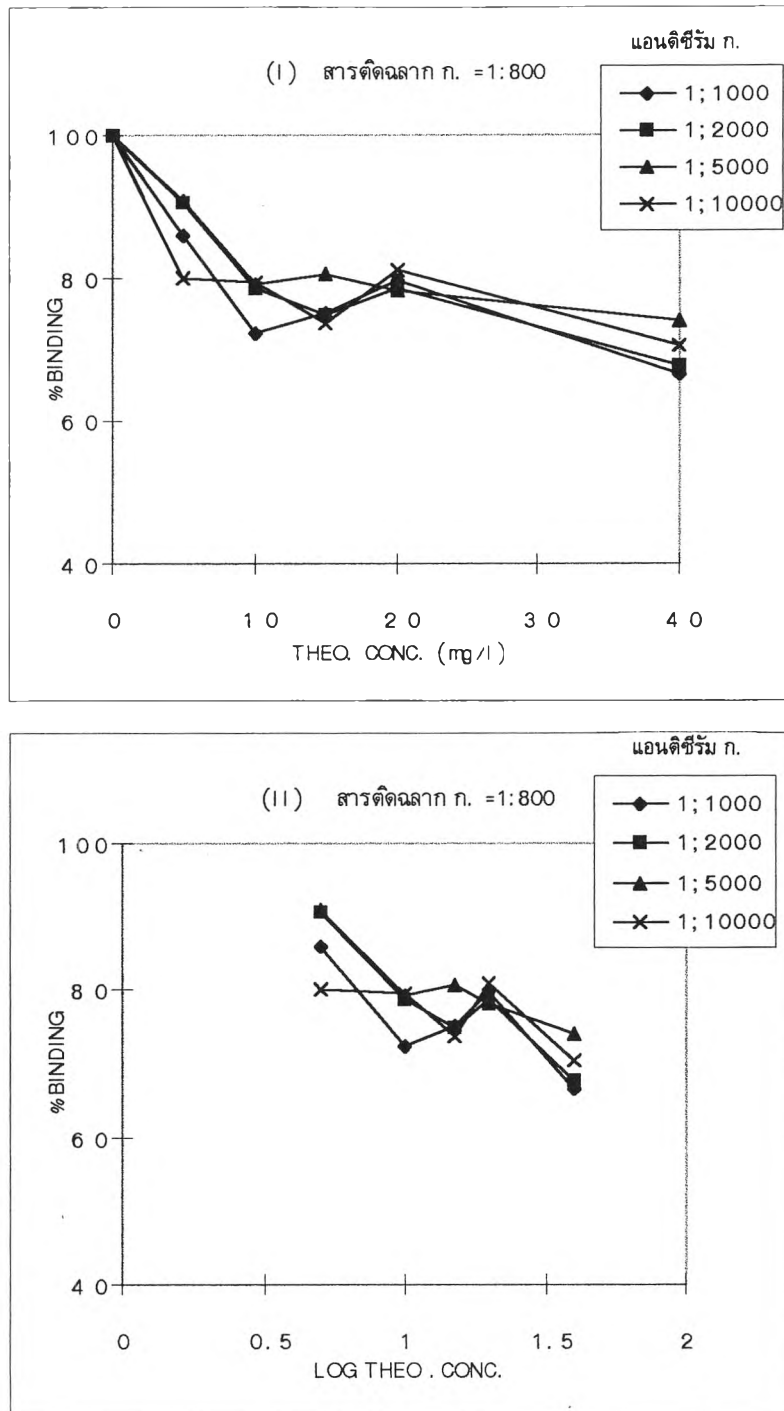
กราฟ II logic plot



รูปที่ 41 ผลของปฏิกิริยาแย่งที่ระหว่างสารติดฉลาก ก. อัตราส่วนความเจือจาง 1:500 กับ สารละลายมาตรฐานธีโอฟิลลีน

กราฟ I direct plot

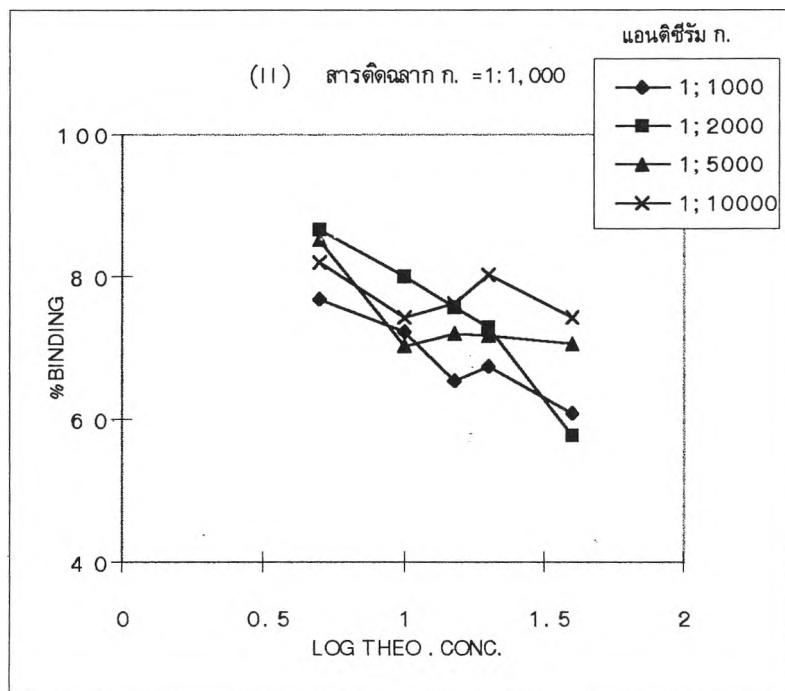
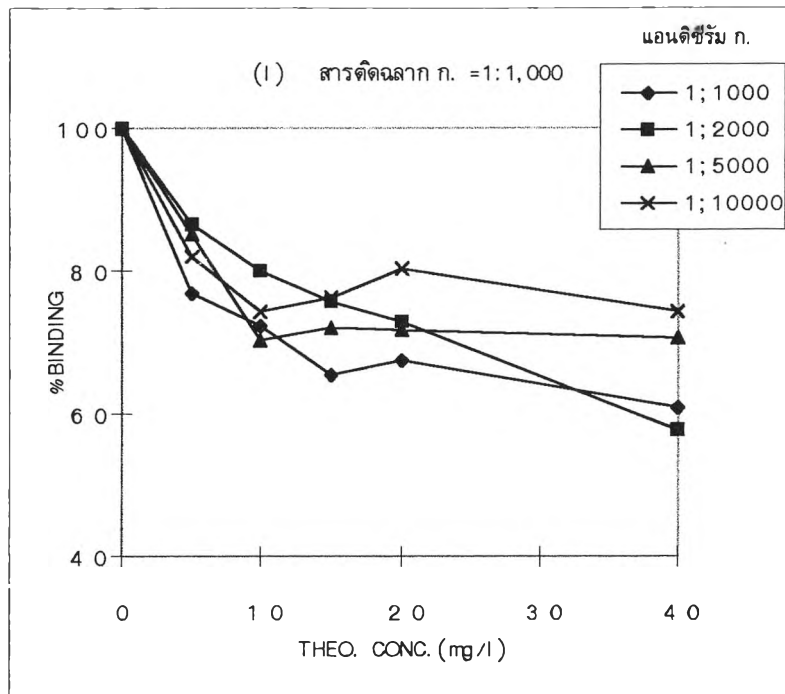
กราฟ II logic plot



รูปที่ 42 ผลของปฏิกิริยาแย่งที่ระหว่างสารดีดิลลาก ก. อัตราส่วนความเจือจาง 1:800 กับ สารละลายมาตรฐานธีโอฟิลลีน

กราฟ I direct plot

กราฟ II logic plot



รูปที่ 43 ผลของปฏิกิริยาแย่งที่ระหว่างสารติดฉลาก ก. อัตราส่วนความเจือจาง 1:1,000 กับ สารละลายมาตรฐานธิโอฟิลลีน

กราฟ I direct plot

กราฟ II logic plot

ตารางที่ 24 แสดงผลการเกิดปฏิกิริยาการแย่งที่ระหว่าง ธิโอฟิลีนติดฉลาก ก. และสารละลายมาตรฐานธิโอฟิลีน

อัตราส่วนความเจือจาง ของ สารติดฉลาก ก.	อัตราส่วนความเจือจาง ของ แอนติซีรัม ก.	ค่า r (correlation coefficient)
1:100	1:1,000	0.0899
	1:2,000	0.4661
	1:5,000	0.0113
	1:10,000	0.0822
1:500	1:1,000	0.7102
	1:2,000	0.8678
	1:5,000	0.8671
	1:10,000	0.3396
1:800	1:1,000	0.5958
	1:2,000	0.8700
	1:5,000	0.8464
	1:10,000	0.4440
1:1,000	1:1,000	0.9242
	1:2,000	0.9470*
	1:5,000	0.5619
	1:10,000	0.2970

*สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการเกิดปฏิกิริยาการแย่งที่

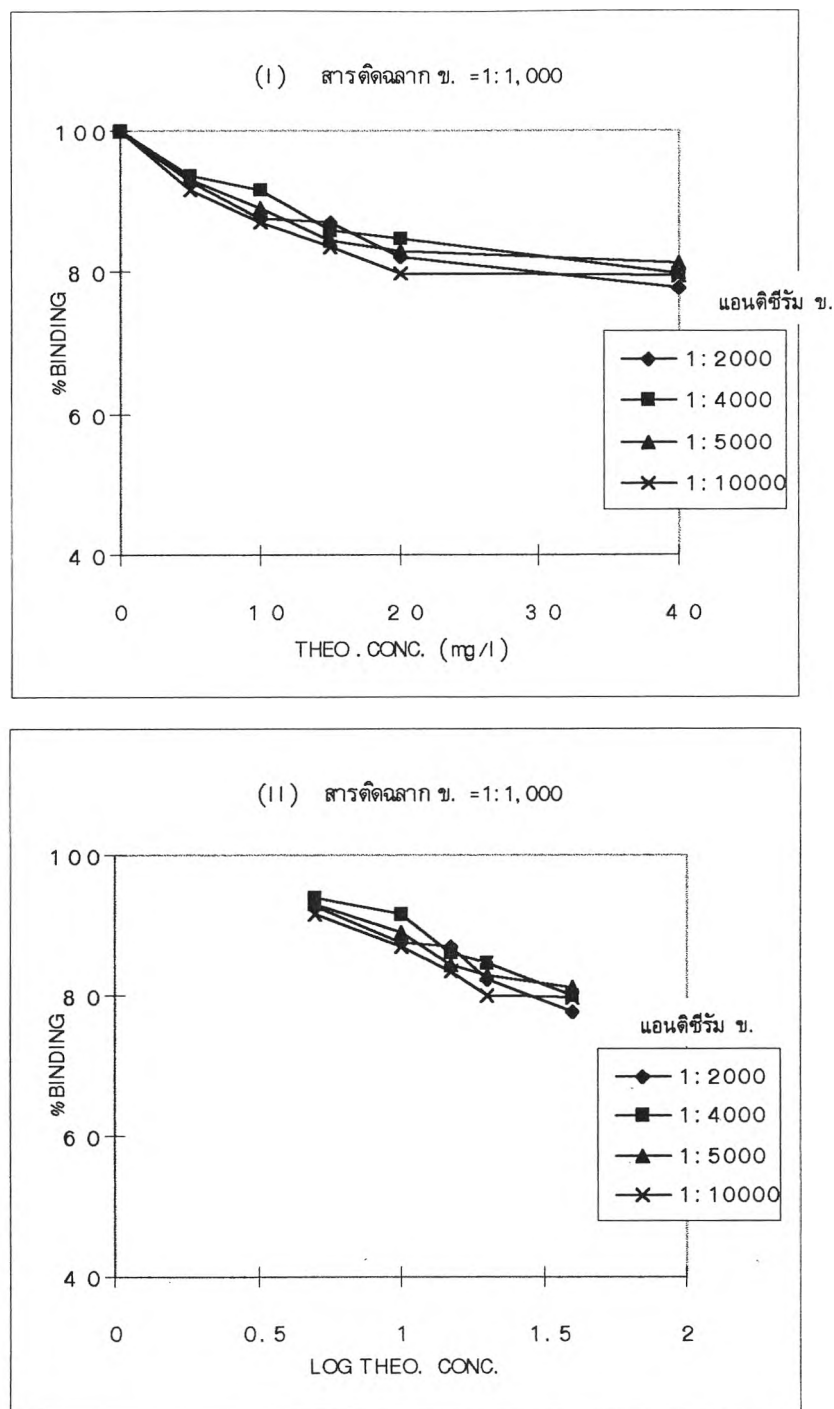
ผลการเกิดปฏิกิริยาการแย่งที่ระหว่าง สารติดฉลาก ข. กับธีโอฟิลลีนในการจับกับ แอนติบอดีที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยอิมมูโนเจนในรูปของอนุพันธ์ ข. (7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine) ณ ค่าอัตราส่วนความเจือจางต่าง ๆ

เมื่อใช้ซีรัมของอิมมูโนเจน ข. ที่มีอัตราส่วนความเจือจางของสารติดฉลากต่างกัน 4 ค่า คือ 1:1,000, 1:5,000, 1:8,000 และ 1:10,000 ตามลำดับ กับอัตราส่วนความเจือจางของ แอนติซีรัม 4 ค่า คือ 1:2,000, 1:4,000, 1:5,000 และ 1:10,000

การแสดงความสัมพันธ์ของการแย่งที่กับความเข้มข้นของธีโอฟิลลีนจากกราฟมาตรฐาน ระหว่าง % การจับ กับความเข้มข้นของธีโอฟิลลีน นำมาสร้างกราฟ log plot ระหว่าง % การจับกับ ความเข้มข้นของ ธีโอฟิลลีนในเทอมของ log ดังแสดงในรูปที่ 44-47

จากตารางที่ 25 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการแย่งที่กับความเข้มข้นของธีโอฟิลลีนในเชิงเส้นตรงที่ดีที่สุด (คือที่ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์(r)มีค่ามากที่สุด)ของอนุพันธ์ ข. คือที่ สารติดฉลากมีอัตราส่วนความเจือจางเท่ากับ 1:8,000 และ แอนติซีรัมมีอัตราส่วนความเจือจางเท่ากับ 1:10,000 โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9962

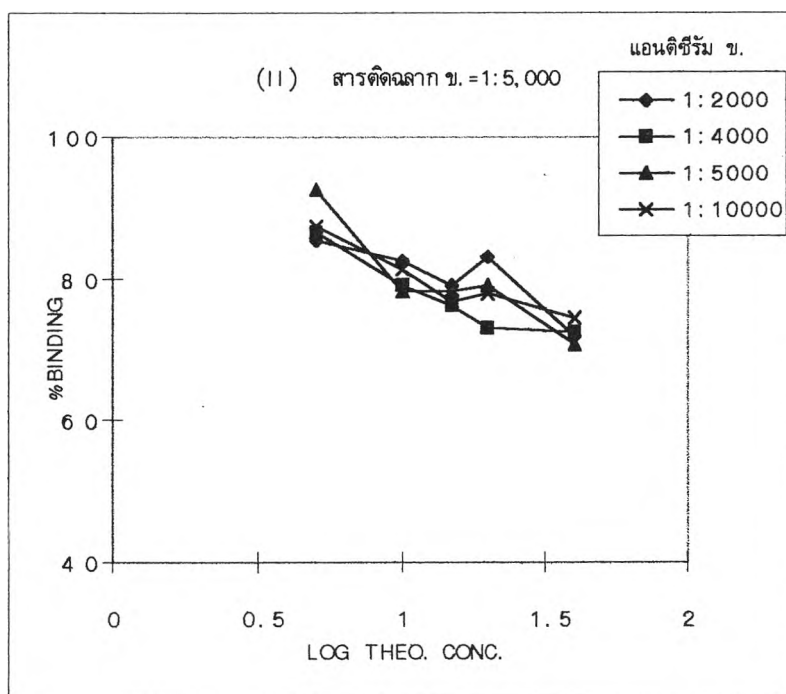
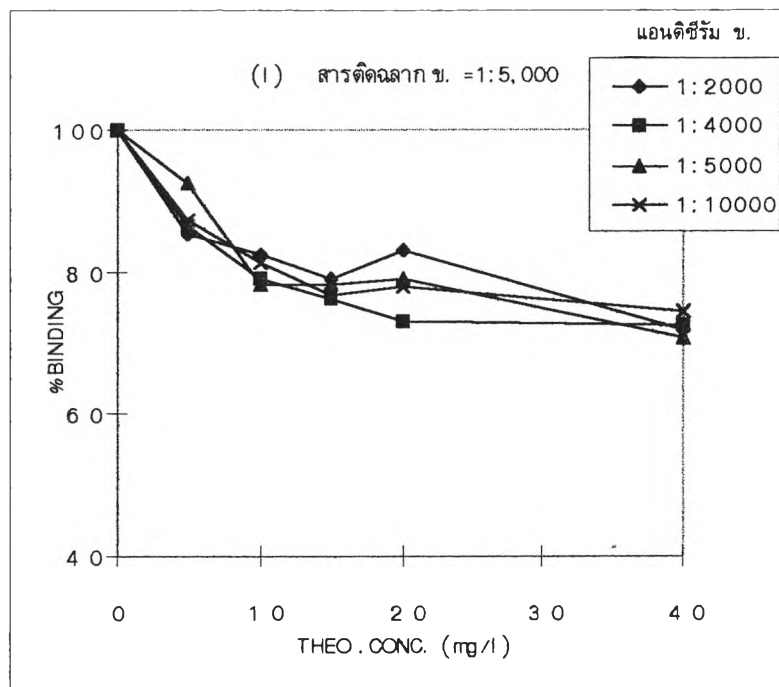
ดังนั้นสภาวะที่ได้นี้จะถูกนำไปใช้ในการศึกษาผลของเฮเทอโรโลกัสคอมบิเนชันต่อไป



รูปที่ 44 ผลของปฏิกิริยาแย่งที่ระหว่างสารติดฉลาก ข. อัตราส่วนความเจือจาง 1:1,000 กับ สารละลายมาตรฐาน ธีโอฟิลลีน

กราฟ I direct plot

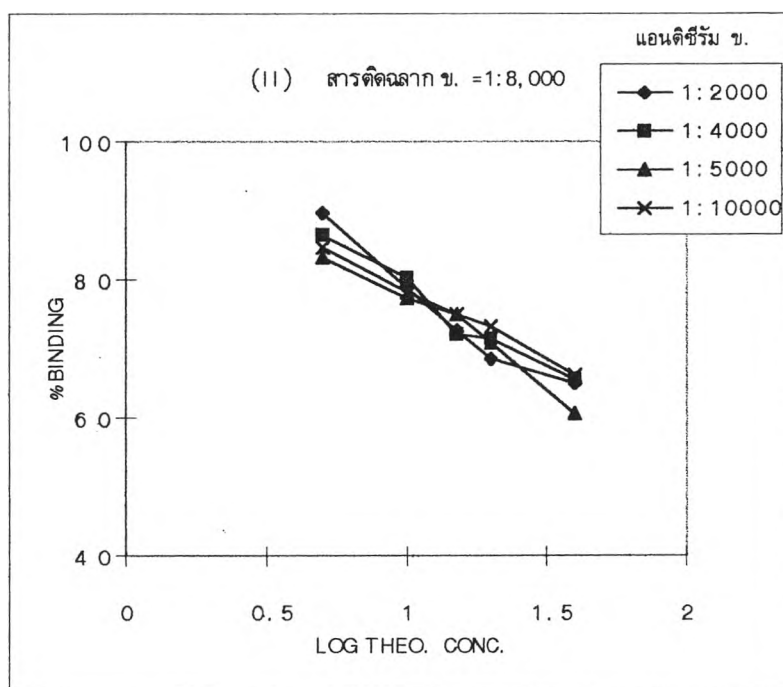
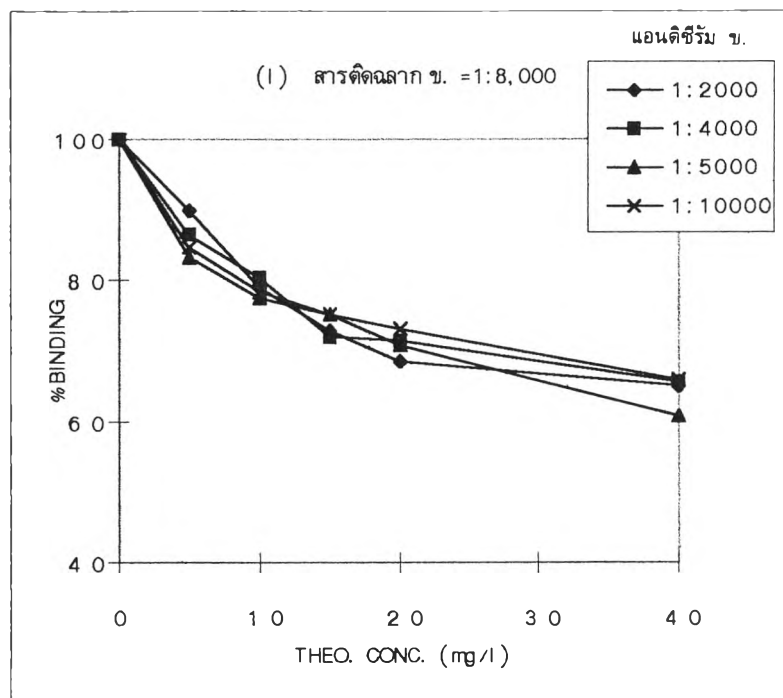
กราฟ II logic plot



รูปที่ 45 ผลของปฏิกิริยาแย่งที่ระหว่างสารติดฉลาก ข. อัตราส่วนความเจือจาง 1:5,000 กับสารละลายมาตรฐาน ธีโอฟิลลีน

กราฟ I direct plot

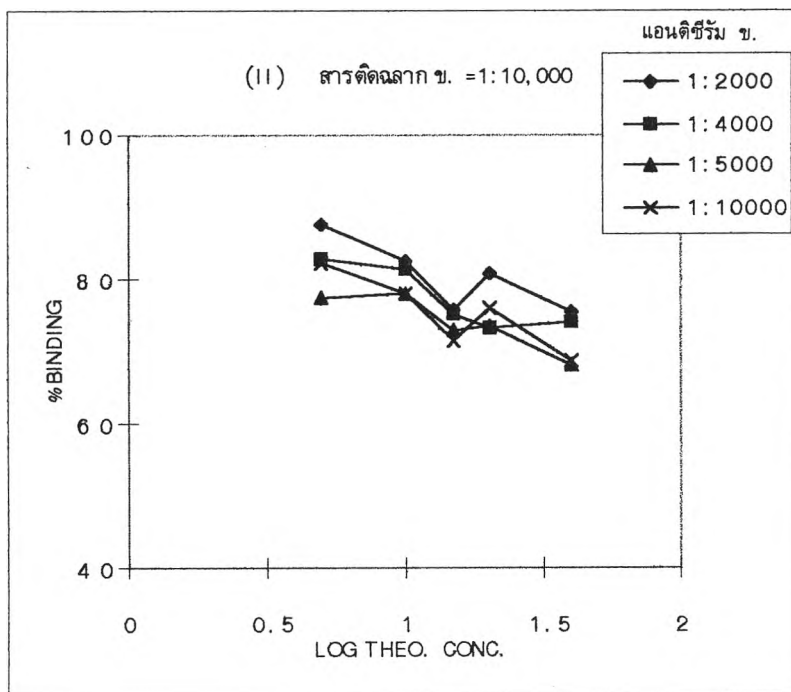
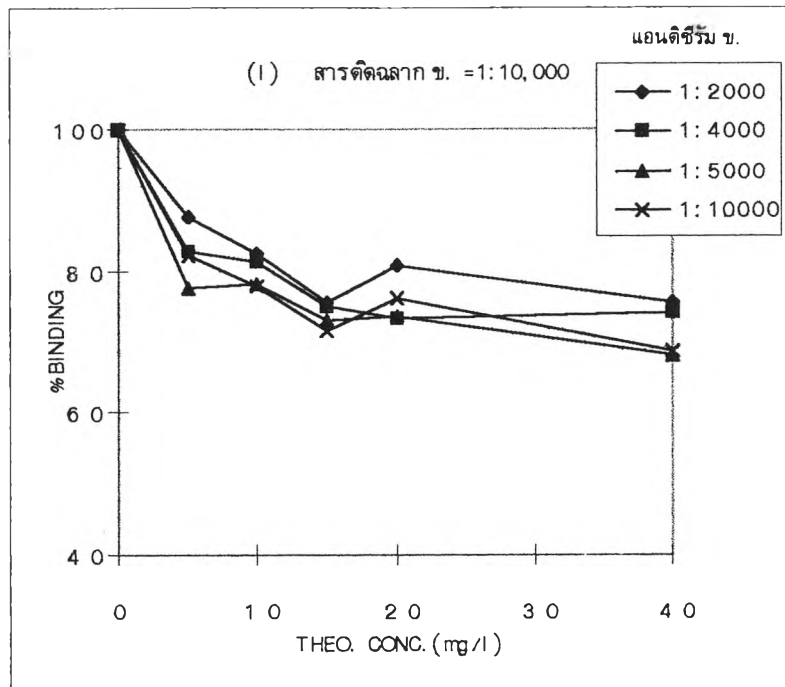
กราฟ II logic plot



รูปที่ 46 ผลของปฏิกิริยาแย่งที่ระหว่างสารติดตามлак ข. อัตราส่วนความเจือจาง 1:8,000 กับสารละลายมาตรฐาน ธีโอฟิลลีน

กราฟ I direct plot

กราฟ II logic plot



รูปที่ 47 ผลของปฏิกิริยาแย่งที่ระหว่างสารติดฉลาก ข. อัตราส่วนความเจือจาง 1:10,000 กับ สารละลายมาตรฐาน ทีโอฟิลลีน

กราฟ I direct plot

กราฟ II logic plot

ตารางที่ 25 แสดงผลการเกิดปฏิกิริยาการแย่งที่ระหว่างริโอฟิลลินติดฉลาก ข. และสารละลายมาตรฐานริโอฟิลลิน

อัตราส่วนความเจือจาง ของ สารติดฉลาก ข.	อัตราส่วนความเจือจาง ของ แอนติซีรัม ข.	ค่า r (correlation coefficient)
1:1,000	1:2,000	0.9630
	1:4,000	0.9597
	1:5,000	0.9388
	1:10,000	0.9084
1:5,000	1:2,000	0.7285
	1:4,000	0.8963
	1:5,000	0.8321
	1:10,000	0.8973
1:8,000	1:2,000	0.9498
	1:4,000	0.9627
	1:5,000	0.9629
	1:10,000	0.9962*
1:10,000	1:2,000	0.7292
	1:4,000	0.7653
	1:5,000	0.8373
	1:10,000	0.8251

*สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการเกิดปฏิกิริยาการแย่งที่

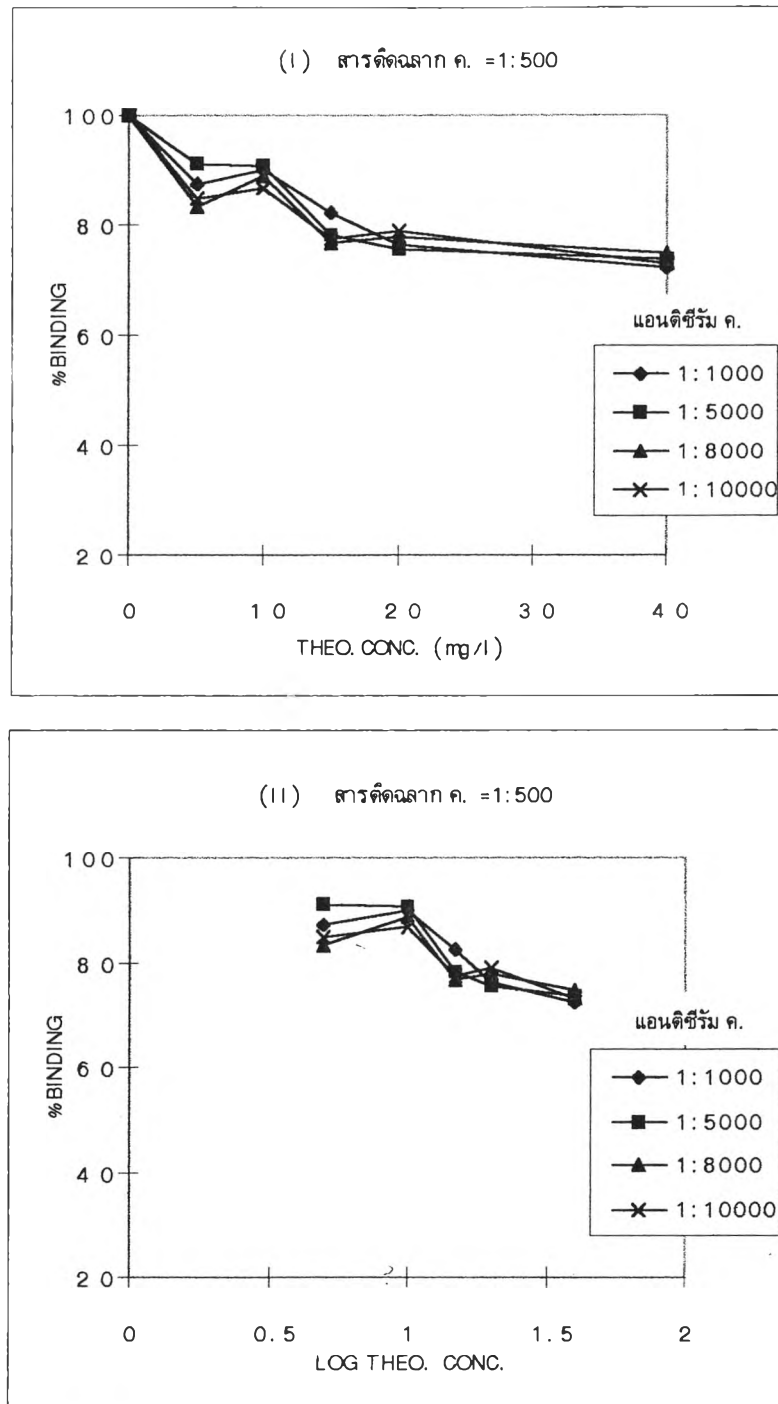
ผลการเกิดปฏิกิริยาการแย่งที่ระหว่าง สารติดฉลาก ค. กับธีโอฟิลลีนในการจับกับแอนติบอดีที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยอิมมูโนเจนในรูปของอนุพันธ์ ค. 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine ณ ค่าอัตราส่วนความเจือจางต่าง ๆ

เมื่อใช้ซีรัมของอิมมูโนเจน ค. ที่มีอัตราส่วนความเจือจางของสารติดฉลากต่างกัน 4 ค่า คือ 1:500, 1:800, 1:1,000 และ 1:5,000 ตามลำดับ กับอัตราส่วนความเจือจางของแอนติซีรัม 4 ค่า คือ 1:1,000, 1:5,000, 1:8,000 และ 1:10,000

การแสดงความสัมพันธ์ของการแย่งที่กับความเข้มข้นของธีโอฟิลลีนจากกราฟมาตรฐานระหว่าง % การจับ กับความเข้มข้นของธีโอฟิลลีน นำมาสร้างกราฟ logic plot ระหว่าง %การจับกับ ความเข้มข้นของ ธีโอฟิลลีนในเทอมของ log ดังแสดงในรูปที่ 48-51

จากตารางที่ 26 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการแย่งที่กับความเข้มข้นของธีโอฟิลลีนในเชิงเส้นตรงที่ดีที่สุด (คือที่ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) มีค่ามากที่สุด) ของอนุพันธ์ ค. คือ ที่สารติดฉลากมีอัตราส่วนความเจือจางเท่ากับ 1:5,000 และแอนติซีรัมมีอัตราส่วนความเจือจางเท่ากับ 1:1,000 โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9945

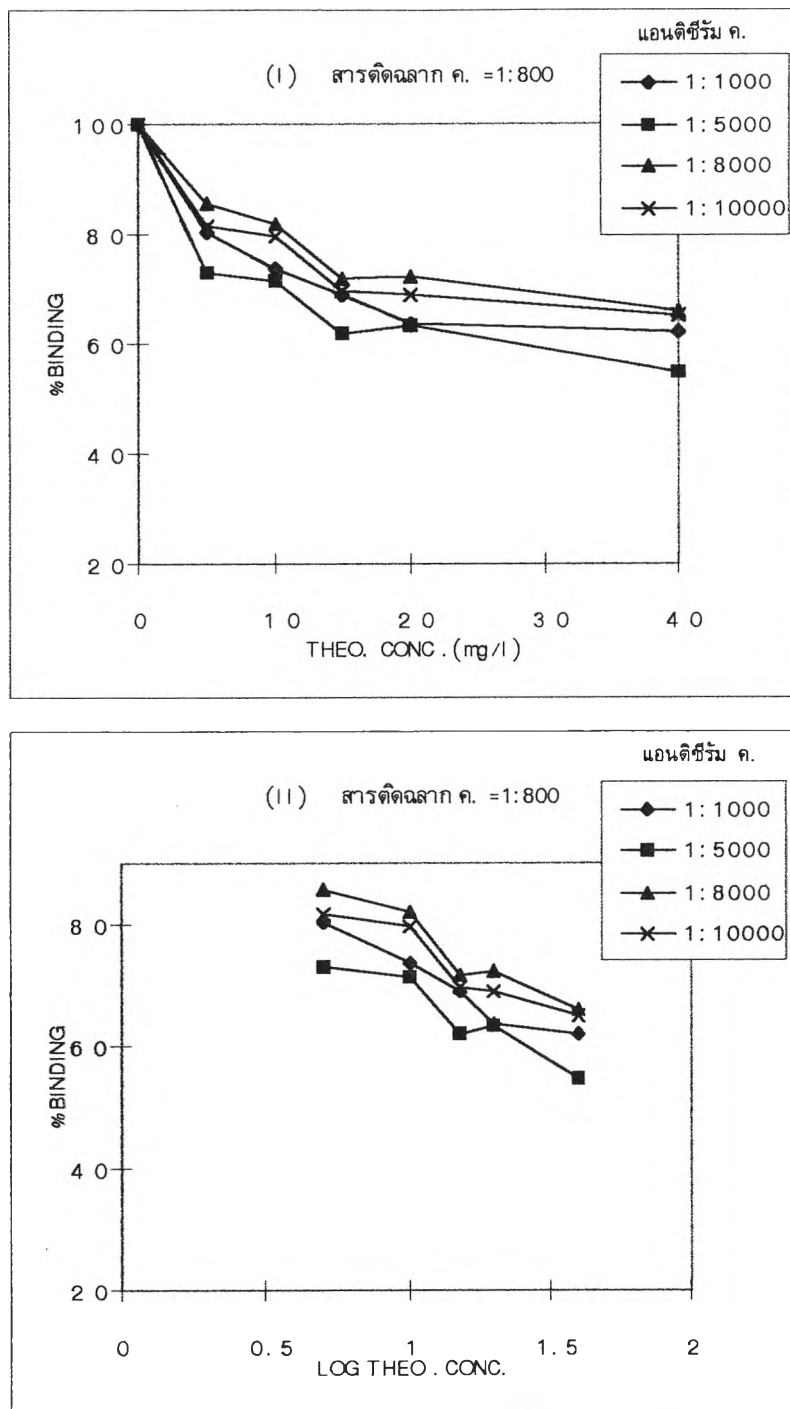
ดังนั้นสภาวะที่ได้นี้จะถูกนำไปใช้ในการศึกษาผลของเฮเทอโรโลกัสคอมบิเนชันต่อไป



รูปที่ 48 ผลของปฏิกิริยาแย่งที่ระหว่างสารคัดหลาก ค. อัตราส่วนความเจือจาง 1:500 กับ สารละลายมาตรฐานธีโอฟิลลีน

กราฟ I direct plot

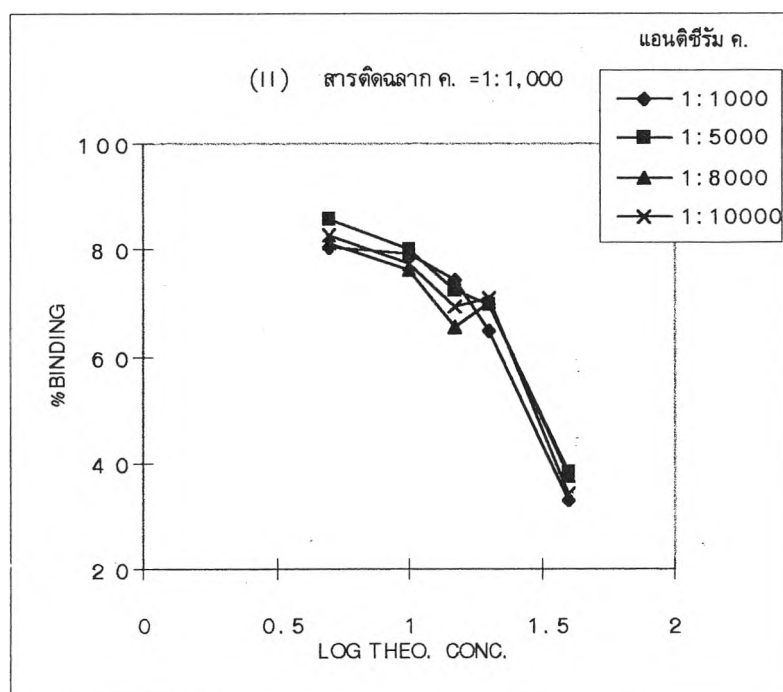
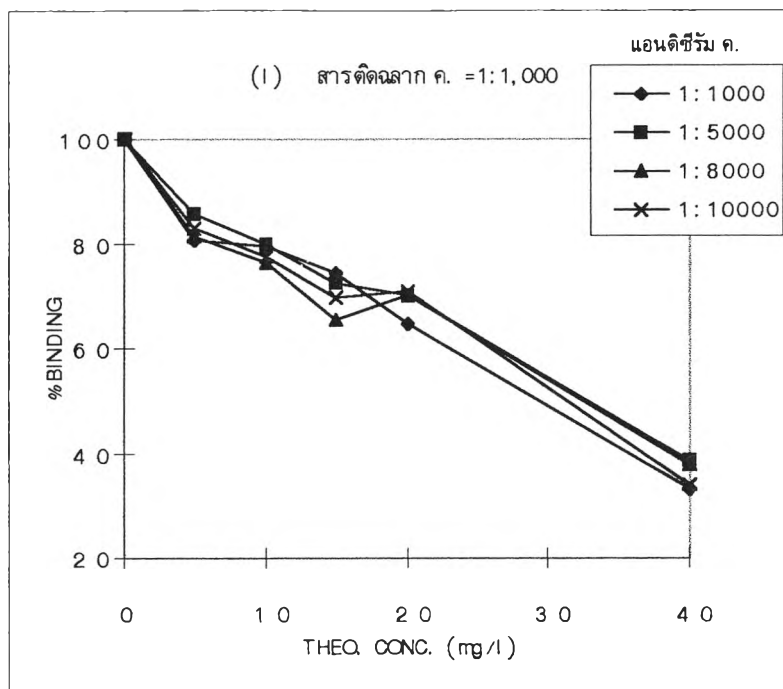
กราฟ II logic plot



รูปที่ 49 ผลของปฏิกิริยาแย่งที่ระหว่างสารติดฉลาก ค. อัตราส่วนความเจือจาง 1:800 กับ สารละลายมาตรฐานธีโอฟิลลีน

กราฟ I direct plot

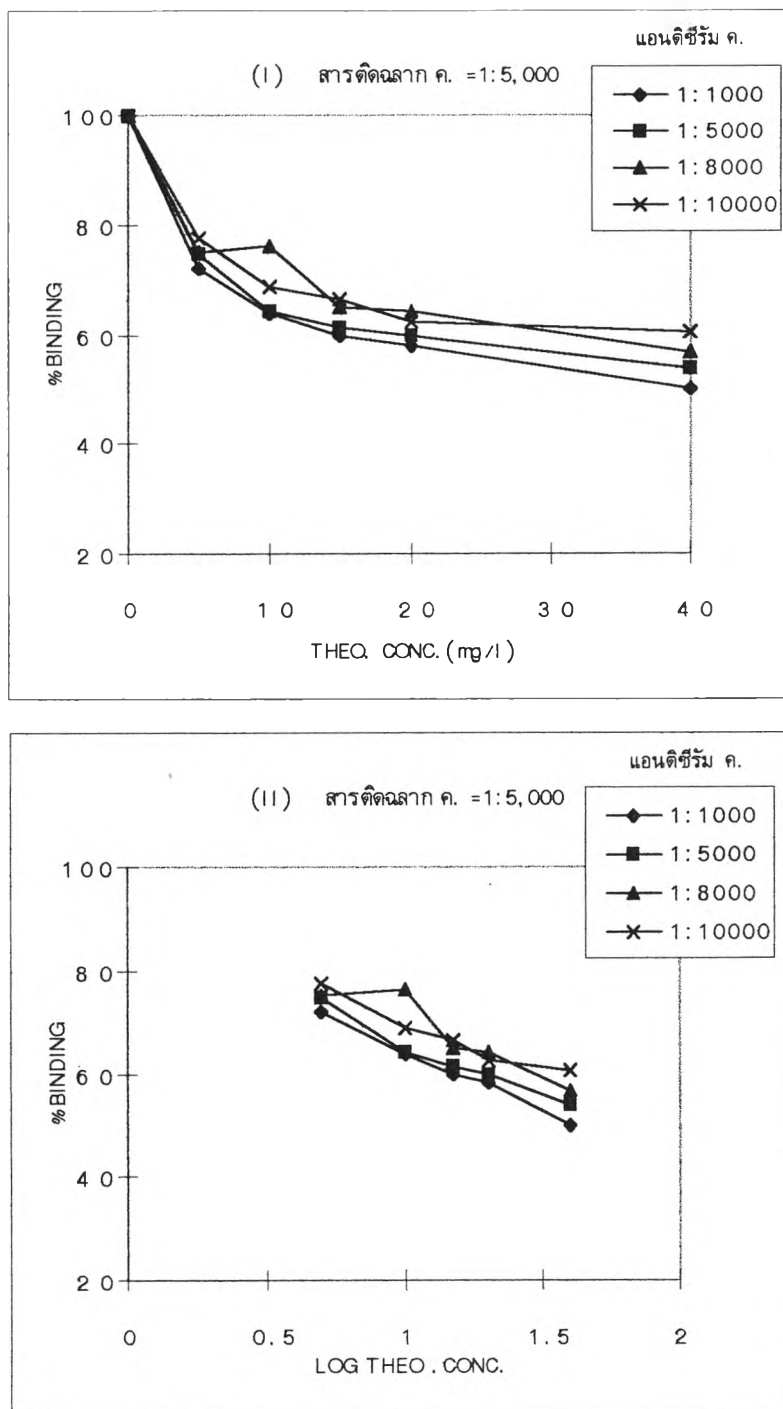
กราฟ II logic plot



รูปที่ 50 ผลของปฏิกิริยาแย่งที่ระหว่างสารติดฉลาก ค. อัตราส่วนความเจือจาง 1:1,000 กับ สารละลายมาตรฐานธีโอฟิลลีน

กราฟ I direct plot

กราฟ II logic plot



รูปที่ 51 ผลของปฏิกิริยาแย่งที่ระหว่างสารติดฉลาก ค. อัตราส่วนความเจือจาง 1:5,000 กับ สารละลายมาตรฐานธีโอฟิลลีน

กราฟ I direct plot

กราฟ II logic plot

ตารางที่ 26 แสดงผลการเกิดปฏิกิริยาการแย่งที่ระหว่าง ธิโอฟิลีนติดฉลาก ค. และสารละลายมาตรฐานธิโอฟิลีน

อัตราส่วนความเจือจาง ของ สารติดฉลาก ค.	อัตราส่วนความเจือจาง ของ แอนติซีรัม ค.	ค่า r (correlation coefficient)
1:500	1:1,000	0.7834
	1:5,000	0.8160
	1:8,000	0.5333
	1:10,000	0.7710
1:800	1:1,000	0.9388
	1:5,000	0.8983
	1:8,000	0.9225
	1:10,000	0.8899
1:1,000	1:1,000	0.7847
	1:5,000	0.8503
	1:8,000	0.8143
	1:10,000	0.7909
1:5,000	1:1,000	0.9945*
	1:5,000	0.9597
	1:8,000	0.8515
	1:10,000	0.9342

*สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการเกิดปฏิกิริยาการแย่งที่

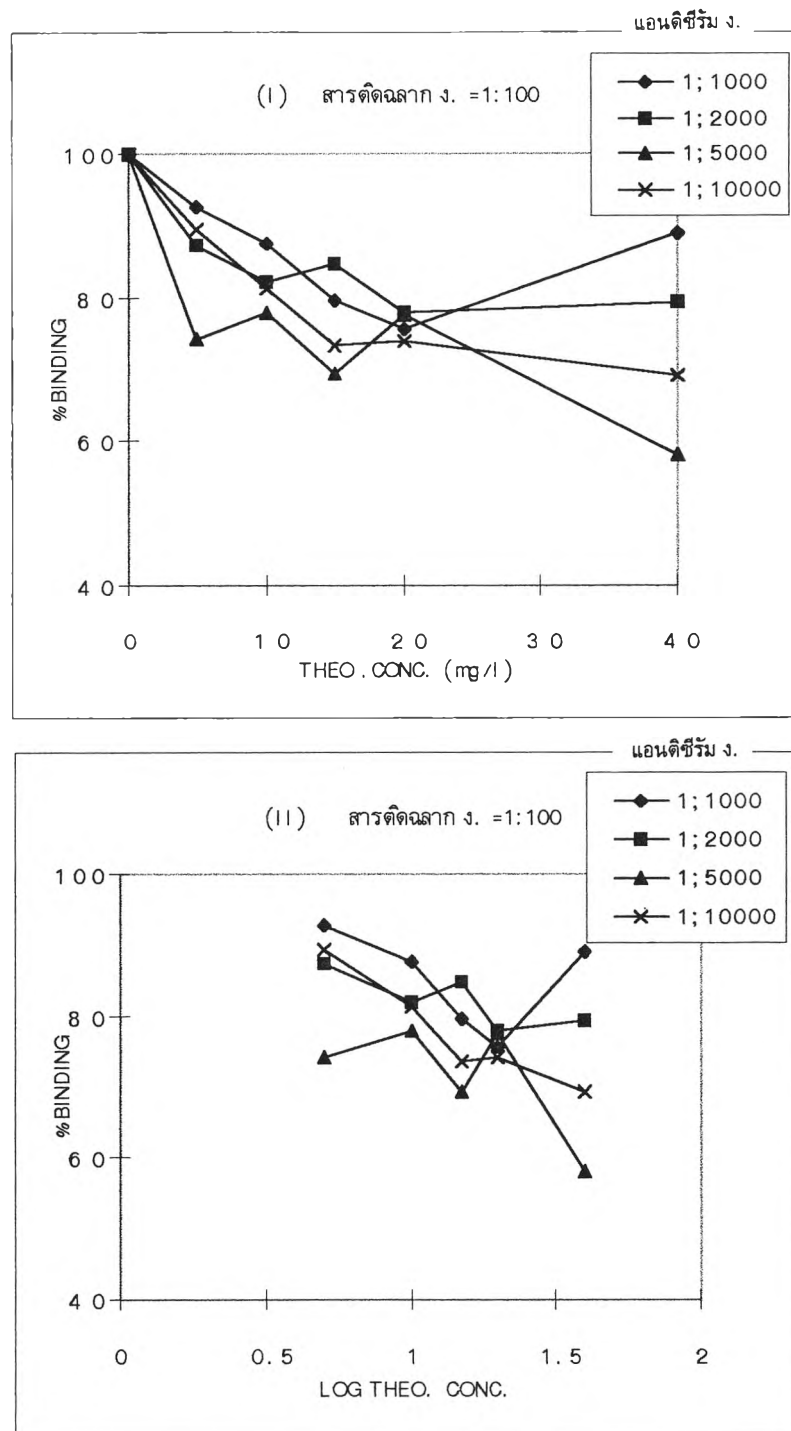
ผลการเกิดปฏิกิริยาการแย่งที่ระหว่าง สารติดฉลาก ง. กับธีโอฟิลลีนในการจับกับ แอนติบอดีที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยอิมมูโนเจนในรูปของอนุพันธ์ ง. 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine ณ ค่าอัตราส่วนความเจือจางต่าง ๆ

เมื่อใช้ซีรัมของอิมมูโนเจน ง. ที่มีอัตราส่วนความเจือจางของสารติดฉลากต่างกัน 4 ค่า คือ 1:100, 1:500, 1:1,000 และ 1:4,000 ตามลำดับ กับอัตราส่วนความเจือจางของ แอนติซีรัม 4 ค่า คือ 1:1,000, 1:,000, 1:5,000 และ 1:10,000

การแสดงความสัมพันธ์ของการแย่งที่กับความเข้มข้นของธีโอฟิลลีนจากกราฟ มาตรฐานระหว่าง % การจับกับความเข้มข้นของธีโอฟิลลีน นำมาสร้างกราฟ logic plot ระหว่าง % การจับกับความเข้มข้นของ ธีโอฟิลลีนในเทอมของ log ดังแสดงในรูปที่ 52-55

จากตารางที่ 27 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการแย่งที่กับความเข้มข้นของธีโอฟิลลีนใน เส้นตรงที่ดีที่สุด (คือที่ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) มีค่ามากที่สุด) ของ อนุพันธ์ ค. คือที่ สารติดฉลากมีอัตราส่วนความเจือจางเท่ากับ 1:4,000 และแอนติซีรัมมีอัตราส่วนความเจือจาง เท่ากับ 1:5,000 โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9909

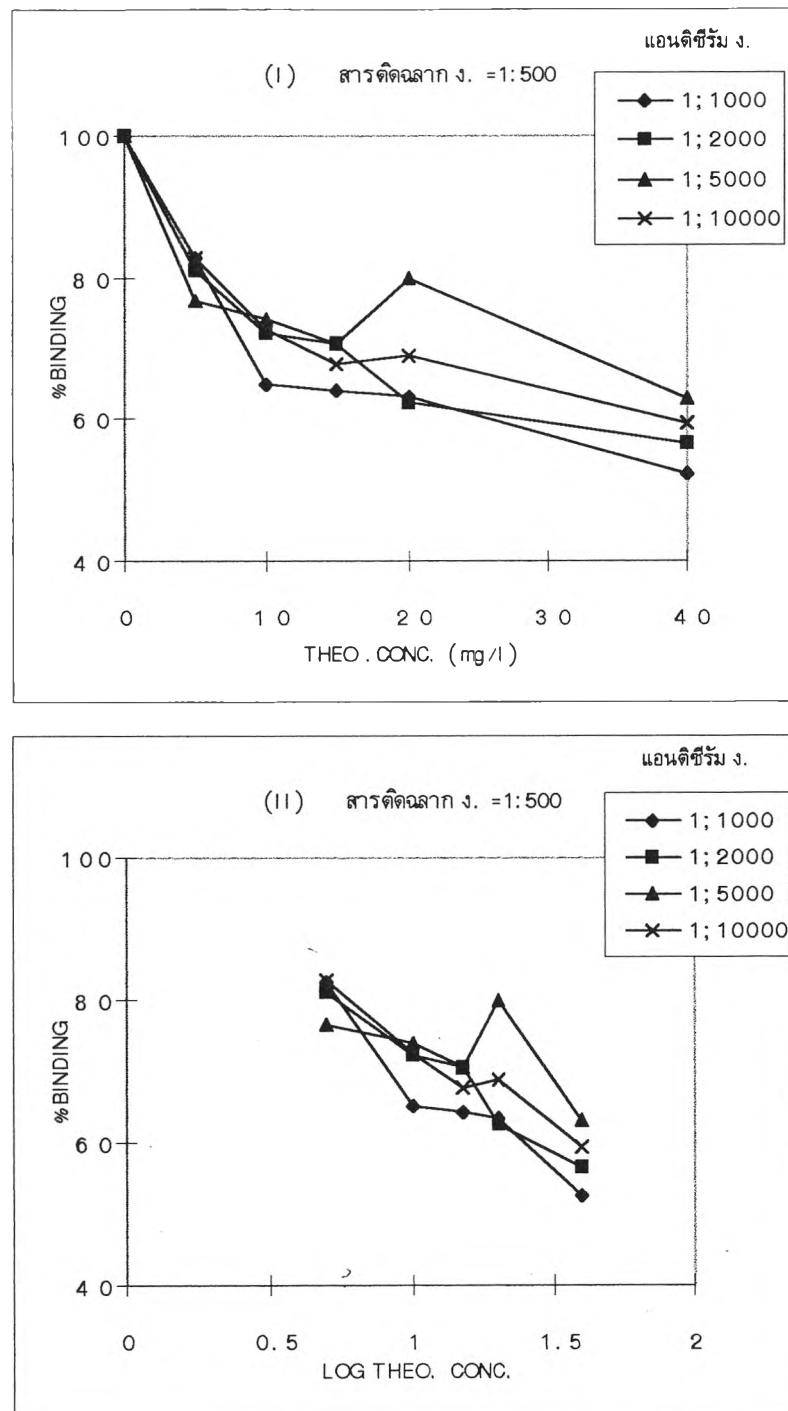
ดังนั้นสถานะที่ได้นี้จะถูกนำไปใช้ในการศึกษาผลของเฮเทอโรโลจิสคอมบิเนชันต่อไป



รูปที่ 52 ผลของปฏิกิริยาแย่งที่ระหว่างสารตัดฉลาก ง. อัตราส่วนความเจือจาง 1:100 กับ สารละลายมาตรฐานริโอฟิลซีน

กราฟ I direct plot

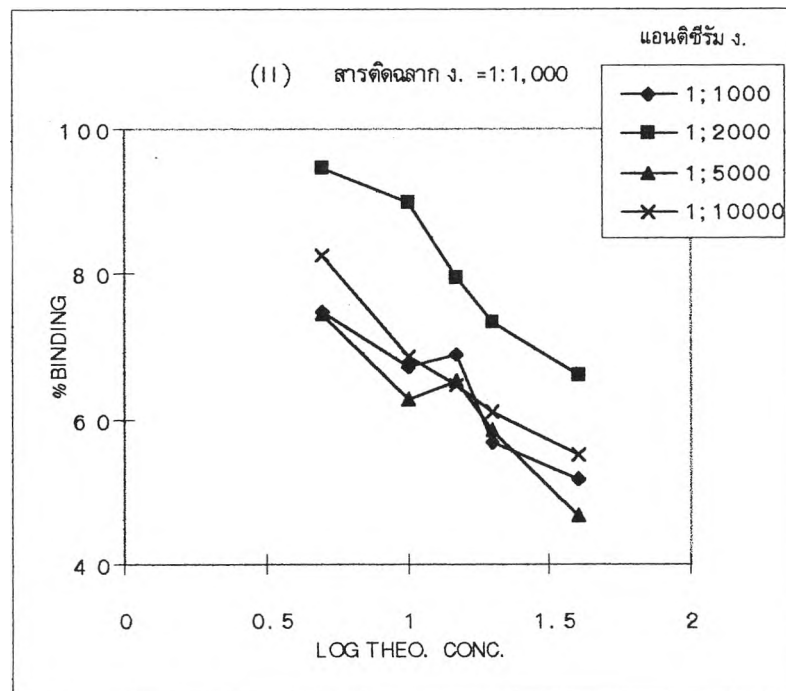
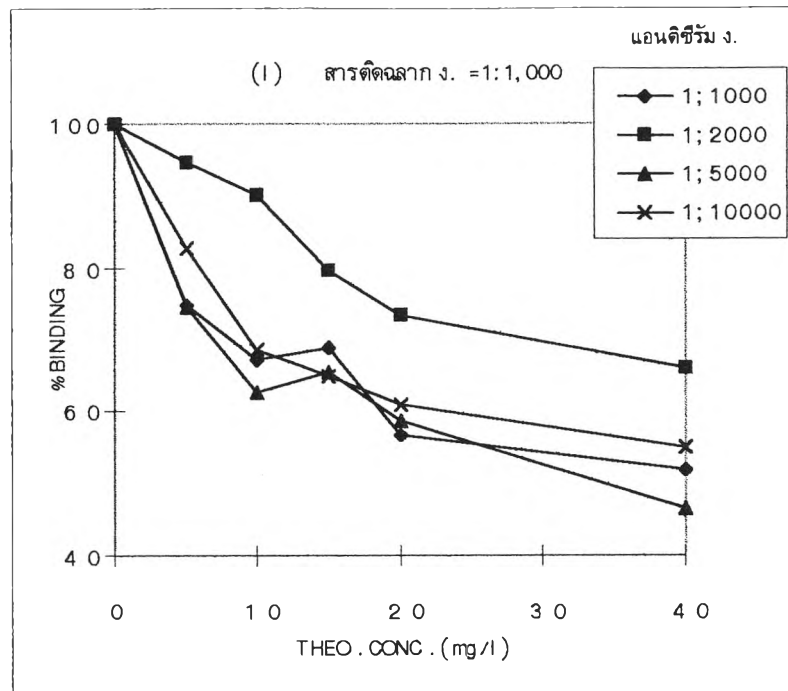
กราฟ II logic plot



รูปที่ 53 ผลของปฏิกิริยาแย่งที่ระหว่างสารติดฉลาก ง. อัตราส่วนความเจือจาง 1:500 กับ สารละลายมาตรฐานธีโอฟิลลีน

กราฟ I direct plot

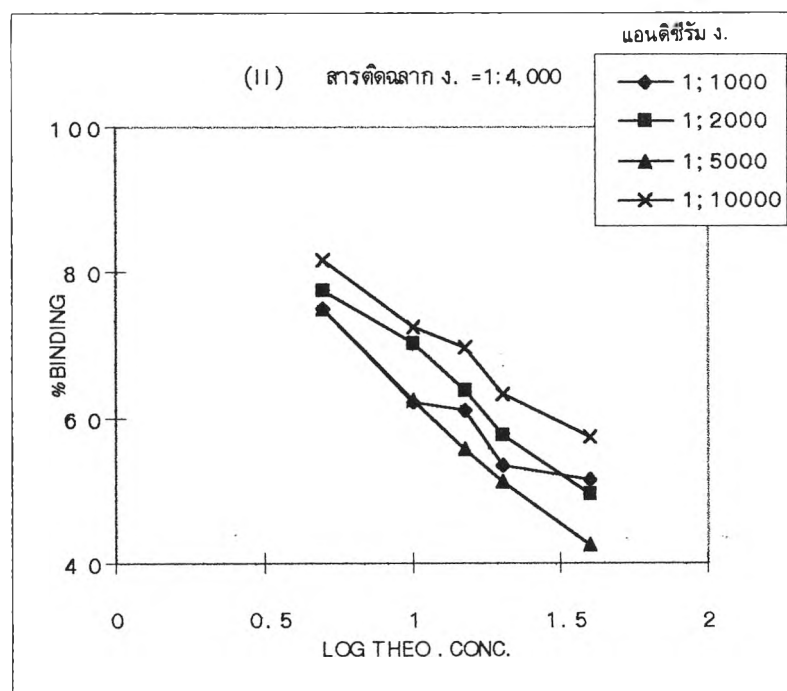
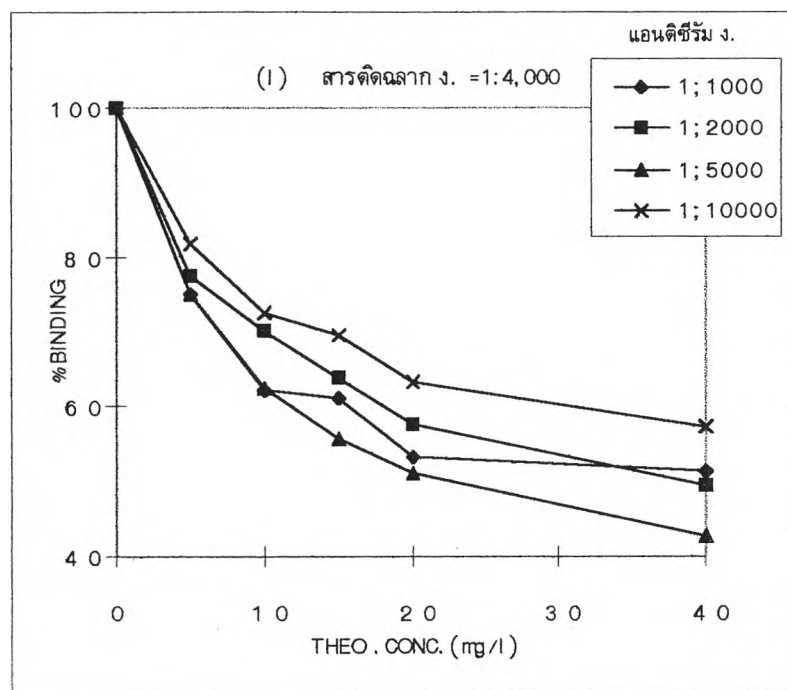
กราฟ II logic plot



รูปที่ 54 ผลของปฏิกิริยาแย่งที่ระหว่างสารติดฉลาก ง. อัตราส่วนความเจือจาง 1:1,000 กับ สารละลายมาตรฐานอีโอฟิลลีน

กราฟ I direct plot

กราฟ II logic plot



รูปที่ 55 ผลของปฏิกิริยาแย่งที่ระหว่างสารติดฉลาก ง. อัตราส่วนความเจือจาง 1:4,000 กับ สารละลายมาตรฐานธีโอฟิลลีน

กราฟ I direct plot

กราฟ II logic plot

ตารางที่ 27 แสดงผลการเกิดปฏิกิริยาการแย่งที่ระหว่างธีโอฟิลีนติดฉลาก ง. และสารละลายมาตรฐานธีโอฟิลีน

อัตราส่วนความเจือจาง ของ สารติดฉลาก ง.	อัตราส่วนความเจือจาง ของ แอนติซีรัม ง.	ค่า r (correlation coefficient)
1:100	1:1,000	0.1427
	1:2,000	0.6465
	1:5,000	0.4436
	1:10,000	0.9286
1:500	1:1,000	0.9070
	1:2,000	0.9656
	1:5,000	0.3770
	1:10,000	0.9555
1:1,000	1:1,000	0.8772
	1:2,000	0.9551
	1:5,000	0.9115
	1:10,000	0.9559
1:4,000	1:1,000	0.9082
	1:2,000	0.9885
	1:5,000	0.9909*
	1:10,000	0.9833

*สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการเกิดปฏิกิริยาการแย่งที่

ตารางที่ 28 สรุปสภาวะแอนติซีรัมและสารติดฉลากที่เหมาะสมที่สุด

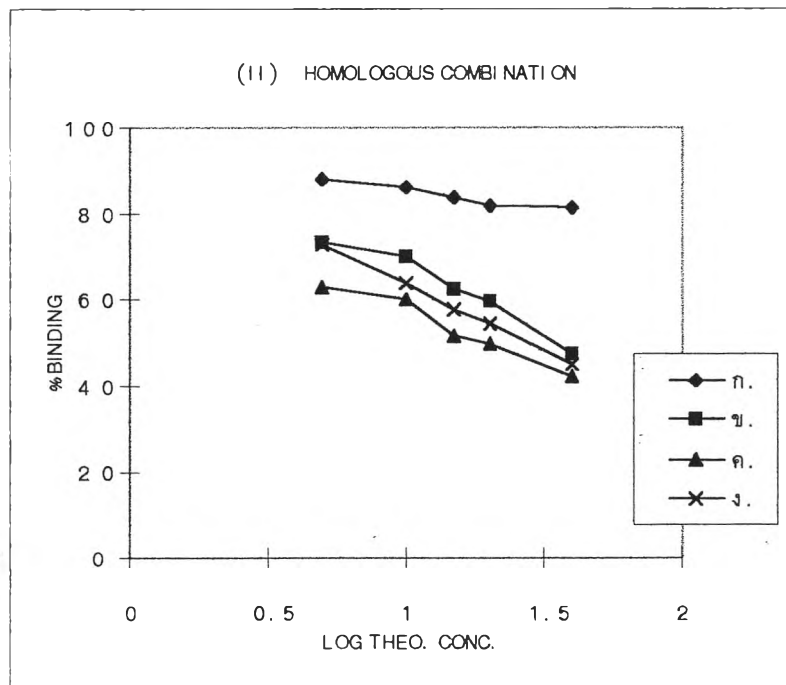
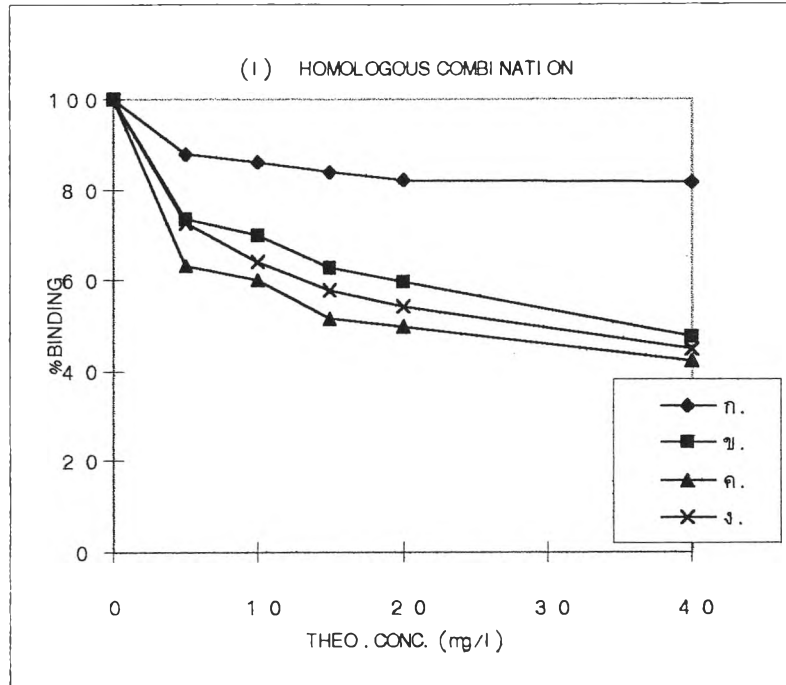
อนุพันธ์	อัตราส่วนความเจือจาง	
	แอนติซีรัม	สารติดฉลาก
ก.	1:2,000	1:1,000
ข.	1:10,000	1:8,000
ค.	1:1,000	1:5,000
ง.	1:5,000	1:4,000

6. การศึกษาผลของเฮเทอโรโลกัส คอมมิเนชันระหว่างสารติดฉลากรีโอฟิลลีนกับ อิมมูโนเจน

ผลของสภาวะที่เหมาะสมของการเกิดปฏิกิริยาแย่งที่ระหว่างรีโอฟิลลีนติดฉลาก เอ็นไซม์กับสารละลายมาตรฐานรีโอฟิลลีน จากข้อ 5 ถูกนำมาใช้ศึกษาคอมมิเนชัน ลักษณะต่าง ๆ ดังนี้

โฮโมโลกัส คอมมิเนชัน

ปฏิกิริยาการแย่งที่ระหว่างสารติดฉลากกับรีโอฟิลลีน เมื่อใช้แอนติซีรัมที่มาจากอนุพันธ์ ชนิดเดียวกัน ดังแสดงในรูปที่ 56 และตารางที่ 29 พบว่า วิธีการวิเคราะห์รีโอฟิลลีนด้วยสาร ติดฉลาก ง. และใช้แอนติซีรัมจากอนุพันธ์ ง. เช่นเดียวกันแสดงผลการแย่งที่ได้ดีที่สุด โดยมี ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์(r) เท่ากับ 0.9994 และมีความไวของการแย่งที่ในเทอมของ ความชันของเส้นกราฟ เท่ากับ 30.844



รูปที่ 56 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ธีโอฟิลลีนโดยใช้ ไฮโมโลกัส คอมบิเนชัน

กราฟ I direct plot

กราฟ II logic plot

ตารางที่ 29 โฮโมโลกัส คอมมิเนชันของการวิเคราะห์โอฟิลลีน

สารติด ฉลาก	อัตราส่วน ความเจือ จาง	แอนติ ซีรัม	อัตราส่วน ความเจือ จาง	r (correlation coefficient)	ความชัน
ก.	1:1,000	ก.	1:2,000	0.9236	8.0309
ข.	1:8,000	ข.	1:10,000	0.9469	29.355
ค.	1:5,000	ค.	1:2,000	0.9545	24.506
ง.	1:4,000	ง.	1:5,000	0.9994	30.844*

บริดจ์ เฮเทอโรโลกัส คอมมิเนชัน

การวิเคราะห์โอฟิลลีนโดยใช้ปฏิกิริยาการแย่งที่ระหว่างสารติดฉลากกับโอฟิลลีน เมื่อใช้แอนติซีรัมจากอนุพันธ์ต่างกัน คือ

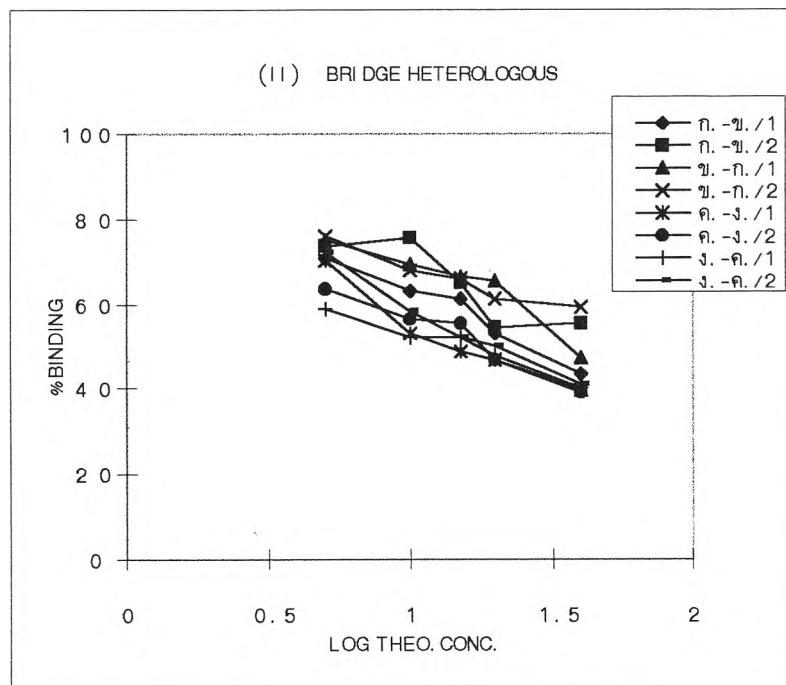
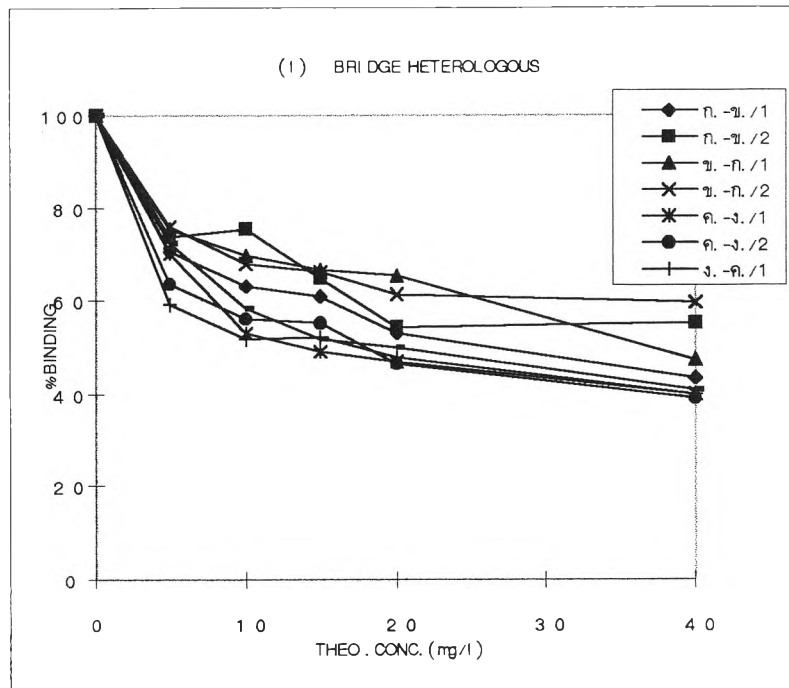
สารติดฉลาก ก. และแอนติซีรัมจาก ข.

สารติดฉลาก ข. และแอนติซีรัมจาก ก.

สารติดฉลาก ค. และแอนติซีรัมจาก ง.

สารติดฉลาก ง. และแอนติซีรัมจาก ค.

ได้ผลดังแสดงใน รูปที่ 57 และตารางที่ 30 พบว่า การใช้ บริดจ์ เฮเทอโรโลกัส คอมมิเนชัน ระหว่างสารติดฉลาก ง. กับ แอนติซีรัม จาก ค. แสดงผลการแย่งที่ได้ดีที่สุดในแง่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9734 และความไวของการแย่งที่ในเทอมของความชันของเส้นกราฟ เท่ากับ 34.182



รูปที่ 57 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ธีโอฟิลลีนโดยใช้ บริดจ์ เฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชัน
 กราฟ I direct plot
 กราฟ II logic plot

ตารางที่ 30 บริดจ์ เฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชันของการวิเคราะห์ซีไอฟิลลีน

สารติดฉลาก	อัตราส่วน ความเจือจาง	แอนติซีรัม	อัตราส่วน ความเจือจาง	r	ความชัน
ก.	1:1,000	ข.	1:2,000	0.9638	30.358
			1:10,000	0.7371	24.956
ข.	1:8,000	ก.	1:2,000	0.9360	18.662
			1:10,000	0.8708	28.983
ค.	1:5,000	ง.	1:2,000	0.9235	32.144
			1:10,000	0.9474	27.377
ง.	1:4,000	ค.	1:1,000	0.9734	34.182*
			1:5,000	0.9538	20.241

ไซท์ เฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชัน

การวิเคราะห์ซีไอฟิลลีน โดยใช้ปฏิบัติการแย่งที่ระหว่าง สารติดฉลาก กับ ซีไอฟิลลีน
เมื่อใช้ แอนติซีรัมจากอนุพันธ์ต่างกัน คือ

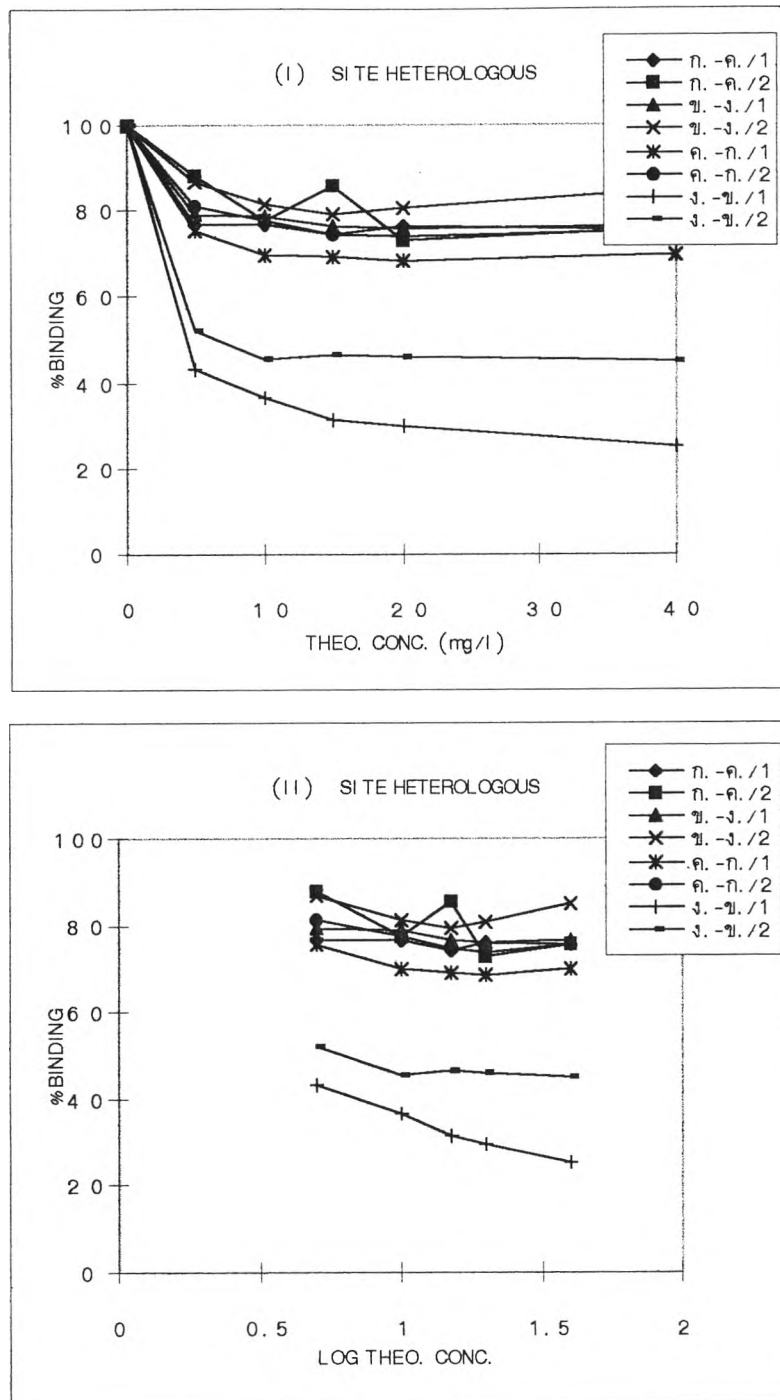
สารติดฉลาก ก. และแอนติซีรัมจาก ค.

สารติดฉลาก ข. และแอนติซีรัมจาก ง.

สารติดฉลาก ค. และแอนติซีรัมจาก ก.

สารติดฉลาก ง. และแอนติซีรัมจาก ข.

ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 58 และตารางที่ 31 พบว่าการใช้ไซท์เฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชัน
ระหว่างสารติดฉลาก ง. กับแอนติซีรัมจาก ข. แสดงผลการแย่งที่ได้ดีที่สุดในค่าสัมประสิทธิ์
สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9807 และความไวของการแย่งที่ในเทอมของความชันของเส้นกราฟ
เท่ากับ 20.035



รูปที่ 58 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์รีโอพลัสตินโดยใช้ไซท์เฮเทอโรโลจิส คอมบิเนชัน

กราฟ I direct plot

กราฟ II logic plot

ตารางที่ 31 ไชท์ เฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชันของการวิเคราะห์รีโอฟิลลีน

สารติดตาม	อัตราส่วน ความเจือจาง	แอนติซีรัม	อัตราส่วน ความเจือจาง	r	ความชัน
0.2191	1:1,000	ค.	1:1,000	0.4918	13.5930
			1:2,000	0.2191	1.3842
ข.	1:8,000	ง.	1:5,000	0.7029	3.6757
			1:10,000	0.0706	2.4750
ค.	1:5,000	ก.	1:1,000	0.6640	7.0790
			1:2,000	0.5414	6.2877
ง.	1:4,000	ข.	1:5,000	0.9807	20.0350*
			1:10,000	0.6434	7.0605

บริดจ์ และ ไชท์ เฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชัน

การวิเคราะห์รีโอฟิลลีน โดยใช้ปฏิกิริยาการแย่งที่ระหว่าง สารติดตาม กับ รีโอฟิลลีน
เมื่อใช้ แอนติซีรัมจากอนุพันธ์ต่างกัน คือ

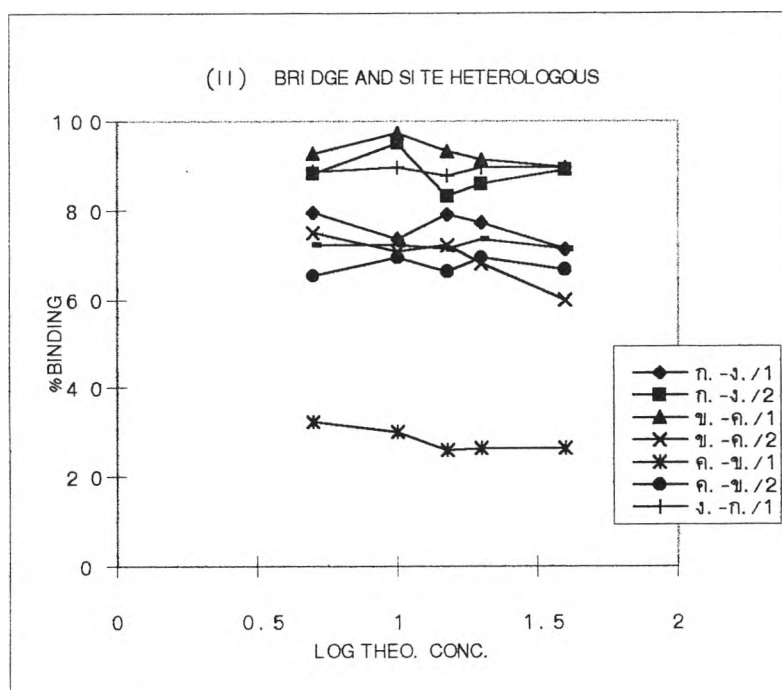
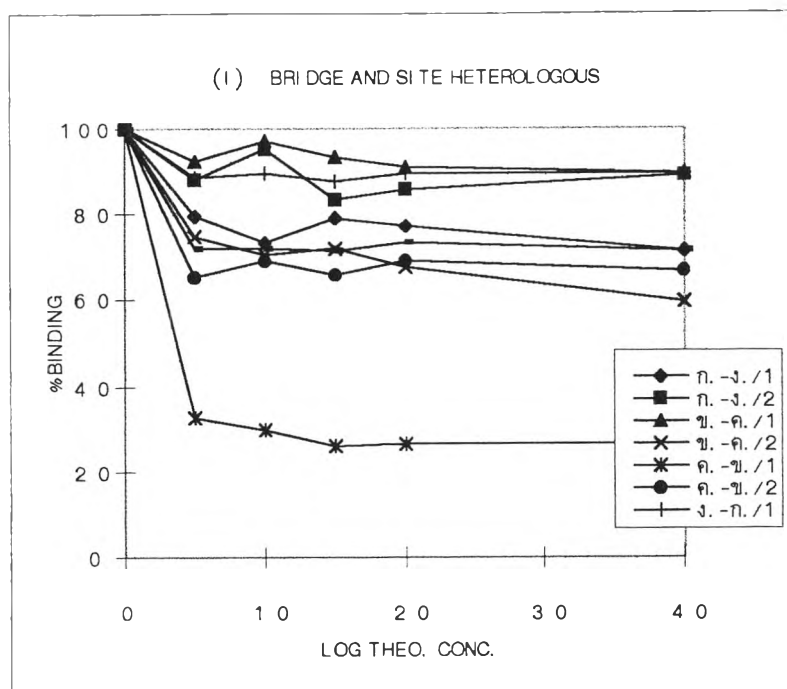
สารติดตาม ก. และแอนติซีรัมจาก ง.

สารติดตาม ข. และแอนติซีรัมจาก ค.

สารติดตาม ค. และแอนติซีรัมจาก ข.

สารติดตาม ง. และแอนติซีรัมจาก ก.

ได้ผลดังแสดงใน รูปที่ 59 และตารางที่ 32 พบว่า การใช้ บริดจ์ และ ไชท์เฮเทอ-
โรโลกัส คอมบิเนชัน ระหว่างสารติดตาม ข. กับ แอนติซีรัม จาก ค. แสดงผลการแย่งที่ได้ดีที่
สุดโดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.8551 และความไวของการแย่งที่ในเทอมของ
ความชันของเส้นกราฟ เท่ากับ 15.837



รูปที่ 59 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์รีโอไฟล์สึนโดยใช้ บริดจ์ และ ไซท์ เฮเทอโรโลกัส
คอมบิเนชัน

กราฟ I direct plot

กราฟ II logic plot

ตารางที่ 32 บริดจ์ และ ไชท์ เฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชันของการวิเคราะห์รีโอฟิลลีน

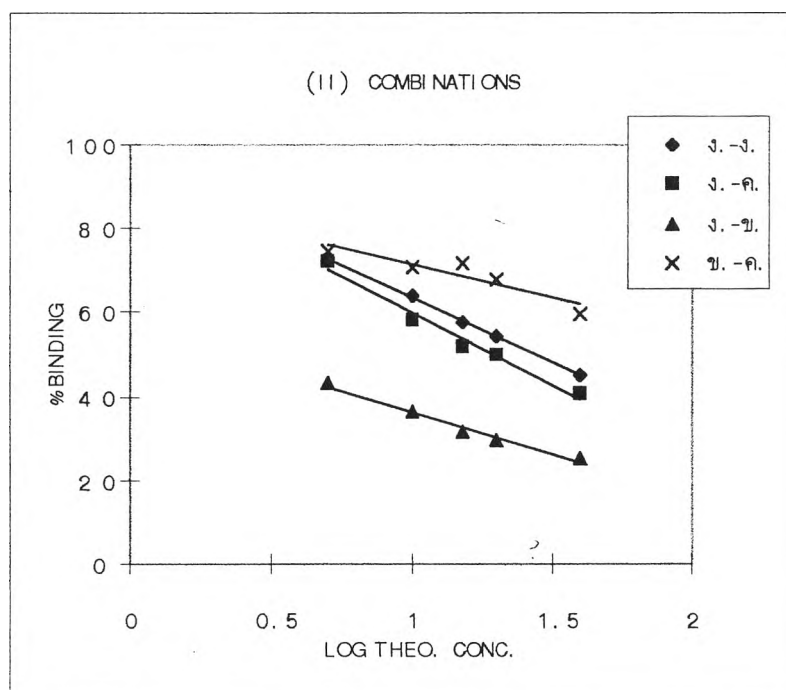
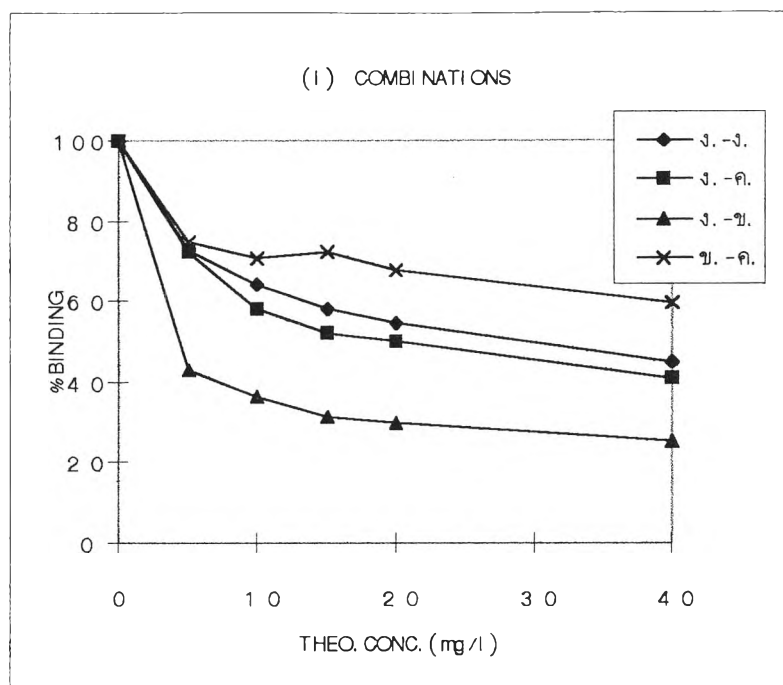
สารติดฉลาก	อัตราส่วน ความเจือจาง	แอนติซีรัม	อัตราส่วน ความเจือจาง	r	ความชัน
ก.	1:1,000	ง.	1:2,000	0.3845	6.6201
			1:5,000	0.0294	2.2594
ข.	1:8,000	ค.	1:1,000	0.8551	15.8370*
			1:10,000	0.3469	4.8823
ค.	1:5,000	ข.	1:2,000	0.7740	7.4530
			1:5,000	0.0500	1.2521
ง.	1:4,000	ก.	1:2,000	0.0114	0.2715
			1:5,000	0.1191	0.8813

เปรียบเทียบคอมบิเนชันลักษณะต่าง ๆ ในการวิเคราะห์รีโอฟิลลีน

ดังแสดงในตารางที่ 33 และ รูปที่ 60 จะเห็นได้ว่า การวิเคราะห์รีโอฟิลลีน โดยใช้ บริดจ์ เฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชัน จาก สารติดฉลาก ของ 8-(4-carboxybutyl)1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ง.) กับ แอนติซีรัมของ 8-(3-carboxypropyl)1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ค.) ให้ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการแย่งที่ กับ ความเข้มข้นของรีโอฟิลลีนในเชิงเส้นตรง ที่ดีที่สุดโดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์(r) เท่ากับ 0.9734 และมีความไวของการแย่งที่จับซึ่งแสดงในเทอมของความชันของเส้นตรง คือ 34.182

ตารางที่ 33 เปรียบเทียบ ผลของคอมบิเนชัน ลักษณะต่าง ๆ ในการวิเคราะห์รีโอฟิลลีน

คอมบิเนชัน	สารติดฉลาก	แอนติซีรัม	r	ความชัน
ไฮโมโลกัส	ง.	ง.	0.9994	30.844
บริดจ์เฮเทอโรโลกัส	ง.	ค.	0.9734	34.182*
ไชท์เฮเทอโรโลกัส	ง.	ข.	0.9807	20.035
บริดจ์และไชท์ เฮเทอโรโลกัส	ข.	ค.	0.8551	15.837



รูปที่ 60 กราฟเปรียบเทียบ ผลของคอมบิเนชัน ลักษณะต่าง ๆ ในการวิเคราะห์ธีโอฟิลลีน

กราฟ I direct plot

กราฟ II logic plot

ความจำเพาะเจาะจงของการวิเคราะห์ธีโอฟิลลีนเมื่อใช้คอมบิเนชันลักษณะต่าง ๆ

จากคอมบิเนชันลักษณะต่าง ๆ ที่เลือกมาใช้ในการวิเคราะห์ธีโอฟิลลีน พบว่าการใช้สารติดฉลาก ง. กับแอนติซีรัม ค. มีความจำเพาะเจาะจงค่อนข้างสูง โดยมี %การเกิดปฏิกิริยากับคาเฟอีนได้น้อยมาก ดังแสดงในตารางที่ 34 หรือกล่าวอีกในหนึ่งคือ ณ ระดับความเข้มข้นปกติของธีโอฟิลลีนที่ตรวจพบในร่างกาย แม้ผู้ป่วยจะรับประทาน ชา กาแฟ หรือ สารอื่นใดที่มีคาเฟอีนอยู่ก็จะไม่รบกวนต่อการวิเคราะห์ โดย คอมบิเนชันของสารติดฉลาก ง. กับ แอนติซีรัม ค. จะให้ผลเทียบเท่า โมโนโคลนอล แอนติบอดี คือมีความจำเพาะเจาะจงสูงสุด เนื่องจากไม่เกิด cross reaction กับ คาเฟอีน

ดังนั้น การสังเคราะห์ธีโอฟิลลีนโดยใช้สารติดฉลากเป็น 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine และ แอนติซีรัมจาก อิมมูโนเจน ของ 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine จะได้การวิเคราะห์ที่มีความไวและความจำเพาะเจาะจงเทียบเท่ากับโมโนโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งเหมาะแก่การนำหลักการนี้ไปใช้ในการพัฒนาเป็นชุดการตรวจวัดยาธีโอฟิลลีน ในร่างกายได้ต่อไป

ตารางที่ 34 %Cross reactivity กับคาเฟอีนระหว่างแอนติซีรัมของธีโอฟิลลีนกับสารติดฉลาก

สารติดฉลาก	แอนติซีรัม	คอมบิเนชัน	ความเข้มข้นเฉลี่ยของตัวยา ณ 50% การจับ(mg/l)		%Cross reactivity
			ธีโอฟิลลีน (n=2)	คาเฟอีน (n=2)	
ง.	ง.	ไฮโมโลกัส	20.5	375.0	5.47
	ค.	บริดจ์เฮเทอโรโลกัส	18.5	∞	0
	ข.	ไซท์เฮเทอโรโลกัส	10.8	350.0	3.09

จากผลของเฮเทอโรโลกัสคอมมิเนชันแบบต่าง ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับโฮโมโลกัสคอมมิเนชันพบว่าโดยรวมแล้วการใช้บริดจ์เฮเทอโรโลกัสคอมมิเนชันจะให้ความไวของการวิเคราะห์ดีขึ้น ซึ่งผลที่พบนี้คล้ายกับการรายงานของ Hosoda et al., 1980; 1981; 1985; 1986 และ Van Weemen and Schuurs, 1976 จึงกล่าวได้ว่าการใช้บริดจ์เฮเทอโรโลกัสคอมมิเนชัน ให้ความไวของการวิเคราะห์ดีขึ้น

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

1. การสังเคราะห์อนุพันธ์โอฟิลลีน

ได้มีการสังเคราะห์อนุพันธ์โอฟิลลีน ณ ตำแหน่งที่ 7 สองอนุพันธ์ คือ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ก.) ได้ผลิตภัณฑ์ 57% ของสารตั้งต้น และ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ข.) ได้ผลิตภัณฑ์ 16% ของสารตั้งต้น และสังเคราะห์อนุพันธ์ ณ ตำแหน่งที่ 8 สองอนุพันธ์ คือ 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ค.) ได้ผลิตภัณฑ์ 36.40% ของสารตั้งต้น และ 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ง.) ได้ผลิตภัณฑ์ 4% ของสารตั้งต้น

2. การเตรียมอิมมูโนเจนจากอนุพันธ์โอฟิลลีน

จากอนุพันธ์ ก., ข., ค. และ ง. จะนำมาเตรียมอิมมูโนเจนโดยการเตรียมอิมมูโนเจน ก. และ ข. จะใช้ NHS ester method โดยการเตรียมอนุพันธ์ ก. และ ข. ให้อยู่ในรูป NHS เอสเทอร์ แล้วนำไปทำปฏิกิริยากับ BSA ส่วนอิมมูโนเจน ค. และ ง. จะใช้ Mixed anhydride method จะได้อิมมูโนเจน ก., ข., ค. และ ง. โดยมีจำนวนอนุพันธ์แต่ละตัวที่ติดบน BSA 1 โมล คือ 11, 10, 12 และ 27 ตามลำดับ

3. การเตรียมสารติดฉลากเอ็นไซม์จากอนุพันธ์ ก., ข., ค. และ ง.

โดยสารติดฉลาก ก. และ ข. จะใช้ NHS ester method จาก NHS เอสเทอร์ของอนุพันธ์ ก. และ ข. ส่วนการเตรียมสารติดฉลาก ค. และ ง. จะใช้ Mixed anhydride method ได้สารติดฉลาก ก., ข., ค. และ ง. โดยมีจำนวนโมลของอนุพันธ์ ก., ข., ค. และ ง. คือ 8, 7, 7 และ 11 ตามลำดับ

4. การศึกษาผลของเฮเทอโรโลกัสคอมบิเนชันลักษณะต่างๆในการวิเคราะห์โอฟิลลีนโดยวิธีเอ็นไซม์อิมมูโนแอสย์

พบว่าการใช้บริดจ์เฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชัน ระหว่างสารติดฉลากของ 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine และแอนติซีรัม ของ 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine จะให้ความไวและความจำเพาะเจาะจงของการวิเคราะห์ที่ดีที่สุด

โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9734 มีความไวในเทอมของความชื้นคือ 34.182 และมี %cross reactivity เท่ากับ 0

จึงสรุปได้ว่าการวิเคราะห์โอฟิลลีน กรณีที่ใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดี ให้เทียบเท่ากับการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี ควรใช้เทคนิคของบริดจ์เฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชัน ที่มีการใช้สารติดฉลากจาก 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine และแอนติซีรัมจาก 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine จะสามารถเพิ่ม ความไวและความจำเพาะของการวิเคราะห์ได้มากที่สุด

รายการอ้างอิง

- Cook, C. E. , Twine, M. E. , Myer, M. , Amenson, E. , Kepler, J. A., and Taylor, G. F. 1976. Theophylline radioimmunoassay: Synthesis of antigen and characterization of antiserum. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 13: 497-505.
- Crowther, J. R. 1995. ELISA theory and practice. Institute for animal health, Woking, UK: 177-205.
- Daly, J. W. , Padgett, W. , Shamin, M. T. , Butts-Lamb , P. , and Water, J. 1985. 1,3-Dialkyl-8-(p-sulfonyl)xanthines: Potent water-soluble antagonists for A₁ and A₂-adenosine receptors. J. Med. Chem. 28: 87-492.
- Ferencik Miroslav. 1993. Handbook of immunochemistry. 115: 142-143.
- Habeeb, A. F. 1966. Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzene sulfuric acid. Anal. Biochem. 14: 328-336.
- Hosada, H. 1979. The preparation of steroid *N*-hydroxysuccinimide esters and their reactivities with bovine serum albumin. Chem. Pharm. Bull. : 742-746.
- Hosada, H. , Kawamura, N., and Nambara, T. 1981. Effect of bridge heterologous combination on sensitivity in enzyme immunoassay for cortisol. Chem. Pharm. Bull. 29(7): 1969-1974.
- Hosada, H. , Kobayashi, N. , Ishii, N. , and Nambara, T. 1986. Bridging phenomena in steroid immunoassays. The effect of bridge length on sensitivity in enzyme immunoassay. Chem. Pharm. Bull. 34(5): 2105-2111.

- Hosoda, H. , Kobayashi, N. , Ishii, N. , and Nambara, T. 1985. The bridge length effect on sensitivity in steroid enzyme immunoassay. Chem. Pharm. Bull. 33: 902-904.
- Hosoda, H. , Kobayashi, N. , and Nambara, T. 1983. Effect of bridge heterologous combination on sensitivity in enzyme immunoassay for 11-deoxycortisol. Chem. Pharm. Bull. 31: 953-958.
- Hosoda, H. , Sakai, Y. , Yoshida, H. , Miyairi, S. , Ishii, K. , and Nambara, T. 1979. The preparation of steroid *N*-hydroxysuccinimide esters and their reactivities with bovine serum albumin. Chem. Pharm. Bull. 27: 742-746.
- Hosada, H. , Yashda, H. , Sakai, Y. , et al. 1980. Sensitivity and specificity in enzyme immunoassay of testosterone. Chem. Pharm. Bull. 28(10): 3035-3040.
- Hu, C. E. , Singh, P., and Ullman, E. F. 1980. Use of (Pivaloxy)methyl as a protecting group in the synthesis of antigenic theophylline (1,3-dimethyl xanthine) derivative. J. Org. Chem. 45: 1711-1713.
- Ishikawa, E. , Kawai, T., and Miyai, K. 1981. Enzyme immunoassay. 133-134.
- Kerr, M. A., and Thorpe, R. 1994. Immunochemistry. Lab Fax. Oxford. Blackwell scientific publication: 63-70.
- Kim, H. O. , Ji, X. , Melman, N. , Olah , M. E. , Stiles, G. L., and Jacobson, K. A. 1994. Structure-activity relationships of 1, 4-dialkylxanthine derivatives at rat A₃ adenosine receptors. J. Med. Chem. 37: 3373-3382.

- Kirton, K. T. et al. 1972. Characterization of antibody to prostaglandin $F_{2\alpha}$. Biochem. Biophys. Res. Com. 47(4): 903-909.
- Litman, et al. 1983. An internally referenced test strip immunoassay for morphine. Clin. chem. 29: 1589-1603.
- Mcdonal, J. M., and Ladenson, J. H. 1978. Theophylline toxicity. Clin. Chem. 24(9): 1603-1608.
- Nakane, P. K. , and Kawaoi, A. 1974. Peroxidase-Labeled antibody a new method of conjugation. J. Histo. Cytochem. 22: 1084-1091.
- Nishikawa, T. , Saito, M. , and Kubo, H. 1984. Effect of heterologous combination on competitive nephelometric immunoassay I. site-heterologous combination for theophylline immunoassay. Chem. Pharm. Bull. 32: 4951-4957.
- Okuyama, T., and Satake, K. 1960. On the preparation and properties of 2,4,6-trinitrophenyl-amino acids and peptides. J. Biochem. 47: 454-466.
- Patrono, C., and Peskar, B. A. 1987. Producing of antisera by conventional techniques. Radioimmunoassay in basic and clinical pharmacology : 23-29.
- Sadee, W., and Beelen, G. C. M. 1980. Drug level monitoring: Analytical technique metabolism and pharmacokinetics. USA: John Wiley & Son: 45.
- Satake, K. , Kuyama, T. , Ohashi, M. , and Shinoda, T. 1960. The spectrophotometric determination of amine, amino acid and peptide with 2,4,6-trinitrobenzene 1-sulfonic acid. J. Biochem. 47: 645-660.
- Sikora, K., and Smedley, H. M. 1984. Monoclonal antibodies : 6-8.

- Standefer, J. C., and Saunders, G. C. 1978. Enzyme immunoassay for gentamicin Clin. chem. 24: 1903-1907.
- Tijssen, P. 1985. Practical and theory of enzyme immunoassay. : Elsevier-North Holland: 279-283.
- Van weemen, B. K., and Schuurs, A. H. 1972. Immunoassay using hapten enzyme conjugates. FEBS letters. 24(1) : 77-81.
- Van weemen, B. K., and Schuurs, A. H. 1975. The influence of heterologous combinations of antiserum and enzyme labeled estrogen on the characteristics of estrogen enzyme-immunoassay. Immunochemistry. 12: 667-670.
- Wilson, M. B., and Kakane, P. K. 1978. Recent developments in the periodate method of conjugating HRP to antibodies. Immunofluorescence and related staining techniques : 215-224.
- Yoshida, H. , Sakai. , Y. , Miyairi, S. , and Nambara, T. 1980. Sensitivity and specificity in enzyme immunoassay of testosterone. Chem. Pharm. Bull. 28(10): 3035-3040.
- Zuk, R. F. , et al. 1985. Enzyme immunochemistry-A quantitative immunoassay requiring no instrument. Clin. chem. 29: 1144-1150.

ประวัติผู้เขียน

นางสาวสุชาสินี พิชญวศิน เกิดเมื่อวันที่ 16 เมษายน พ.ศ. 2514 จบการ
ศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนนารีรัตน์จังหวัดแพร่ อำเภอเมือง จังหวัด
แพร่ และสำเร็จการศึกษาชั้นปริญญาตรีเกาส์ศาสตรบัณฑิต จากคณะเกาส์ศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ เมื่อปีการศึกษา 2537

