บทที่ 1

บทนำ

การวิเคราะห์ด้วยวิธีอิมมูโนแอสเสย์ เป็นการวิเคราะห์ที่อาศัยหลักการของการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน (antigen) และ แอนติบอดี (antibody)วิธีอิมมูโนแอสเสย์มีชื่อเรียกได้ต่าง ๆตามตัวติดฉลากที่ใช้เช่น เรดิโออิมมูโนแอสเสย์ (radioimmunoassay) จะใช้สารกัมมันตรังสีเป็นตัวติดฉลาก หรือเอ็นไซม์อิมมูโนแอสเสย์(enzyme immunoassay) ซึ่งใช้เอ็นไซม์เป็นตัวติดฉลาก เป็นต้น

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

นอกจากนี้ได้มีความพยายามเพิ่มความจำเพาะเจาะจงของการใช้ โพลีโคลนอลแอนติบอดีด้วยการนำหลักการของเฮเทอโรโลกัสคอมบิเนชัน (heterologous combination) มาใช้โดยเฉพาะกับการทำเอ็นไซม์อิมมูโนแอสเสย์ ปกติแล้วเฮปเทน (hepten ซึ่งหมายถึงสารที่ต้องการวิเคราะห์และสามารถนำมาติดฉลากหรือเตรียมเป็น อิมมูโนเจนได้) ที่ติดฉลากด้วยเอ็นไซม์กับเฮปเทนที่เตรียมอิมมูโนเจนเป็นอนุพันธ์ตัวเดียวกัน ซึ่งจะเรียกกันว่า โฮโมโลกัส คอมบิเนชัน (Homologous combination) (Ishikawa et al., 1981) แต่ถ้าเฮปเทนที่ติดฉลากด้วยเอ็นไซม์กับเฮปเทนที่เตรียมอิมมูโนเจนเป็นอนุพันธ์ต่างกัน จะเป็นเฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชัน (Heterologous combination) (Van Weemen, 1975) (Van Weemen and Schuurs, 1976)

เฮเทอโรโลกัสคอมบิเนชันมีได้ 3 ลักษณะ โดยถ้าเฮปเทนในการเตรียมอิมมูโนเจนเป็นอนุพันธ์ที่มีความยาวของสายโซ่ (bridge chain) ต่างกันกับเฮปเทนที่นำมาติดฉลากด้วยเอ็นไซม์ เรียกว่า บริดจ์เฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชัน (Bridge heterologous combination) (Van Weemen et al., 1972; 1975; Hosoda et al., 1980; 1981; 1983ก, 1983ข; 1985;1986) ถ้าเฮปเทนในการเตรียมอิมมูโนเจนเป็นอนุพันธ์ที่มีสายโซ่มาต่อ ณ ตำแหน่งที่ต่างกันกับเฮปเทนที่นำมาติดฉลากด้วยเอ็นไซม์เรียกว่าไซท์เฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชัน (site heterologous combination) (Van Weemen et al., 1975; Hosoda et al., 1980) ถ้าเฮปเทนในการเตรียมอิมมูโนเจนเป็นอนุพันธ์ที่มีทั้งสายโซ่และตำแหน่งสายโซ่ที่มาต่อต่างกันกับเฮปเทนที่นำมาติดฉลากด้วยเอ็นไซม์ เรียกว่าบริดจ์และไซท์เฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชัน (Bridge and Site heterologous combination) (Hosoda et al., 1980)

มีรายงานต่าง ๆกล่าวถึงความพยายามใช้ หลักการของเฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชัน เมื่อแอนติบอดีเป็นโพลีโคลนอลแอนติบอดีซึ่งพบว่าสามารถช่วยเพิ่มความไวและความจำเพาะของการวิเคราะห์เป็นการหักล้างข้อเสียของการใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดี

ตัวอย่างเช่น ในการศึกษาเฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชันของ estrogen (Van Weemen and Schuurs, 1975) โดยใช้อนุพันธ์ ณ ตำแหน่งที่ 17 ของ estradiol ($C_{18}H_{24}O_2$) พบว่า การใช้บริดจ์ เฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชันระหว่างแอนติบอดีจาก estradiol-17-hemisuccinate ($C_{22}H_{28}O_5$) กับสารติดฉลากจาก estradiol-17-hemiglutarate ($C_{23}H_{30}O_5$) และ การใช้ไซท์เฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชัน ระหว่างแอนติบอดีจากอนุพันธ์ ณ ตำแหน่งที่ 17 คือ estradiol-17-hemisuccinate ($C_{22}H_{28}O_5$) กับสารติดฉลากจากอนุพันธ์ ณ ตำแหน่งที่ 11 คือ 11-α-OH-estradiol-11-hemisuccinate ($C_{22}H_{30}O_7$) พบว่าการใช้บริดจ์ เฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชัน จะให้ความไวของการวิเคราะห์ที่สูงที่สุด

ส่วนความจำเพาะของการวิเคราะห์ โดยการทดสอบกับ non estrogen steroid พบว่า ผลยังไม่แน่ชัดขึ้นกับชนิดของ non estrogen steroid ที่ใช้ทดสอบ แต่ปรากฏว่าการใช้บริดจ์ เฮเทอโรโลกัสคอมบิเนชันจะมีผลต่อความจำเพาะน้อยกว่า การใช้ ไซท์เฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชัน

หรือในการวิเคราะห์ Testosterone (Hosoda et al.,1980) โดยการศึกษาบริดจ์ เฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชันระหว่างแอนติบอดี จากอนุพันธ์ ณ ตำแหน่งที่ 4 ของ testosterone คือ แอนติซีรัมจาก 4-O-hemiglutaroyl-4-hydroxytestosterone ($C_{24}H_{32}O_6$) และ สารดิดฉลากจาก 4-hemisuccinoyl-4-hydroxytestosterone ($C_{23}H_{32}O_6$) , 4-(2-carboxymethylthio)testosterone ($C_{21}H_{30}O_4S$) และ 4-(carboxylethylthio) testerone ($C_{22}H_{32}O_4S$) และการศึกษาไซท์ เฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชัน ระหว่างแอนติบอดีจากอนุพันธ์ ณ ตำแหน่งที่ 4 คือ 4-hemiglutaroyl-4-hydroxytestosterone ($C_{24}H_{32}O_6$) กับสารดิดฉลาก 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 โดยทดสอบกับสารที่มีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงกับ 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 แบบต่างๆ โดยเลือกใช้ตัวยาธิโอฟิลลีน เนื่องจากธิโอฟิลลีนเป็นยาที่มีการใช้กันมานานและมีความจำเป็นต้องมี 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