บทที่ ๑

บทนำ

๑.๑ ความเป็นมาของปัญหา

ในปัจจุบันนี้สารประกอบติดฉลากรังสี (Radioactive labelled compound) มีประโยชน์ต่อมนุษย์มากดังจะเห็นได้จากการนำเอาสารประกอบติดฉลากดังกล่าวไปใช้ในการวิจัยทางด้านวิทยาศาสตร์หลายสาขา เช่น ทางด้านการแพทย์ การเกษตร ชีววิทยา โดยเฉพาะอย่างยิ่งทางด้านราดิโออิมมิวโนแอสเสย์ (radioimmunoassay) ซึ่งเป็นการนำเอาความรู้ทางด้านรังสีวิทยา (Radiology) และอิมมิวโนวิทยา (Immunology) มาประยุกต์ใช้ร่วมกัน

สารประกอบติดฉลากรังสีที่นำมาใช้ในทางราดิโออิมมิวโนแอสเสย์มีหลายชนิด เช่น สารประกอบพวกโปรตีน เปปไทด์ฮอร์โมน (peptide hormone) สเตอรอยด์ฮอร์โมน (steroid hormone) เป็นต้น สำหรับสารรังสีที่นำมาใช้ในการติดฉลากนั้นนิยมทั้งตริเตียม (H-3) และไอโอดีน-๑๒๕ (I-125) แต่จากการเปรียบเทียบกันแล้วไอโอดีน-๑๒๕ ดีกว่าตริเตียมในข้อที่ไอโอดีน-๑๒๕ ให้รังสีแกมมาวัดรังสีสะดวกกว่าค่าใช้จ่ายถูกกว่าและสำหรับสารประกอบบางจำพวกยังติดฉลากด้วยไอโอดีนรังสีได้ง่ายกว่าตริเตียมด้วย

ในการนำเอาไอโอดีน-๑๒๕ เข้าต่อกับสารประกอบบางชนิดอาจสามารถทำได้โดยตรงแต่ในบางกรณีสำหรับสารประกอบโมเลกุลเล็กๆ เช่น สารประกอบสเตอรอยด์นั้นทำได้ยากแต่ก็สามารถทำได้โดยวิธีทางอ้อม (indirect method) โดยการทำให้สเตอรอยด์ฮอร์โมนนั้นอยู่ในรูปของสารประกอบสเตอรอยด์ออกซีม (steroid oxime) ก่อนแล้วผสมด้วยโมเลกุลของสารประกอบไทโรซีน เมทธิล เอสเทอร์ (tyrosine methyl ester) จากนั้นจึงนำเอาไอโอดีน-๑๒๕ เข้าต่ออีกทีหนึ่งด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้คลอรามีน-ที

(chloramine-T) เป็นตัวออกซิไดซ์ (oxidizing agent) ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็วและประหยัด

สำหรับวิทยานิพนธ์นี้ได้ทำการทดลองโดยใช้ไอโอดีน-๑๒๕ เข้าต่อกับสารประกอบเทสโทสเตอโรน ๓-(โอ-คาร์บอซี่เมทธิล) ไฮดรอซีลามีน ไทโรซีน เมทธิล เอสเทอร์ [testosterone 3-(O-carboxymethyl) hydroxylamine tyrosine methyl ester] ที่เตรียมขึ้นจากปฏิกริยาของเทสโทสเตอโรน (testosterone) กับ (โอ-คาร์บอซี่เมทธิล) ไฮดรอซีลามีน [(O-carboxymethyl) hydroxylamine] และไทโรซีน เมทธิล เอสเทอร์ (tyrosine methyl ester)

๑.๒ วัตถุประสงค์และขอบเขตของการวิจัย

๑.๒.๑ เพื่อศึกษาวิธีการเตรียมสารประกอบเทสโทสเตอโรน ๓-(โอ-คาร์บอซี่เมทธิล) ไฮดรอซีลามีน ไทโรซีน เมทธิล เอสเทอร์และทำสารประกอบที่เตรียมได้ให้บริสุทธิ์

๑.๒.๒ เพื่อศึกษาวิธีการนำเอาสารรังสีไอโอดีน-๑๒๕ เข้าต่อกับโมเลกุลของสารประกอบที่เตรียมได้ในข้อ ๑.๒.๑ จากนั้นทำสารประกอบที่ติดฉลากแล้วให้บริสุทธิ์

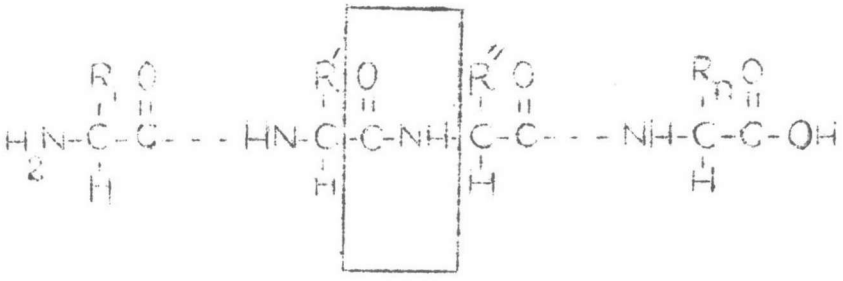
๑.๒.๓ นำเอาสารประกอบที่เตรียมได้ในข้อ ๑.๒.๒ ไปทดสอบปฏิกริยาทางด้านราดิโออิมมิวโนแอสเสย์โดยการวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน (testosterone hormone) ในพลาสมา (plasma) ของควายปลักเพื่อประโยชน์ในการทำผสมเทียม

๑.๓ หลักการสำคัญที่นำมาใช้ในการวิจัย

๑.๓.๑ การคอนจูเกต (Conjugation) ระหว่างสารประกอบสเตอรอยด์กับโมเลกุลของโปรตีน[๑, ๒, ๓, ๔] สามารถทำได้โดยแบ่งออกเป็น ๒ ขั้นตอนดังต่อไปนี้

๑.๓.๑. ก. การเตรียมอนุพันธ์ของสเตอรอยด์ (Preparation of steroid derivative) [๑] โดยทั่วไปแล้วสารประกอบสเตอรอยด์จะมีไฮดรอกซิล (hydroxyl) หรือคีโต (keto) กรุ๊ปหรือทั้งสองกรุ๊ปอยู่ในโครงสร้างโมเลกุลซึ่งกรุ๊ปเหล่านี้ไม่สามารถจะยึดกับโมเลกุลของพวกโปรตีนหรือกรดนิวคลีอิค (nucleic acid) ด้วยพันธะโควาเลนท์ (covalent bond) อย่างเหนียวแน่นแต่เมื่อเปลี่ยนสารประกอบสเตอรอยด์ดังกล่าวให้อยู่ในรูปอนุพันธ์สเตอรอยด์ที่มีคาร์บอซิล (carboxyl) กรุ๊ปแล้วจะสามารถยึดกับโมเลกุลของโปรตีนหรือกรดนิวคลีอิคด้วยพันธะเปปไทด์ (peptide bond) ได้

พันธะเปปไทด์[๕] เป็นพันธะระหว่างกรดอะมิโน (aminoacid) ในเปปไทด์ (peptide) หรือในโปรตีนดังแสดงในรูปที่ ๑ พันธะเปปไทด์จะมีคุณสมบัติและความแข็งแรงระหว่างพันธะเดี่ยว (single bond) และพันธะคู่ (double bond) เพราะว่าเรโซแนนซ์ (resonance) กล่าวคือจะมีการเปลี่ยนที่ของอิเลคตรอน (electron) ดังแสดงไว้ในรูปที่ ๒

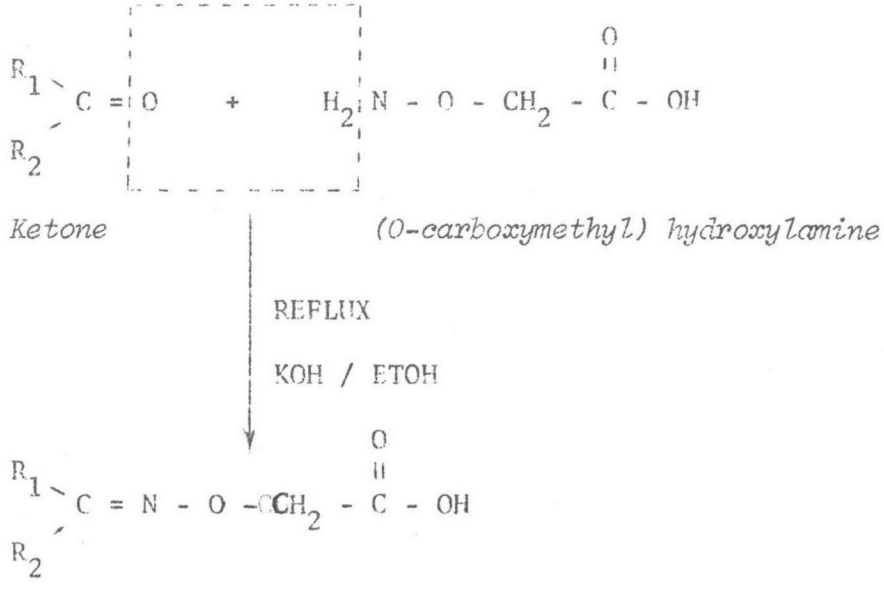


พันธะเปปไทด์

รูปที่ ๑ แสดงโครงสร้างของเปปไทด์

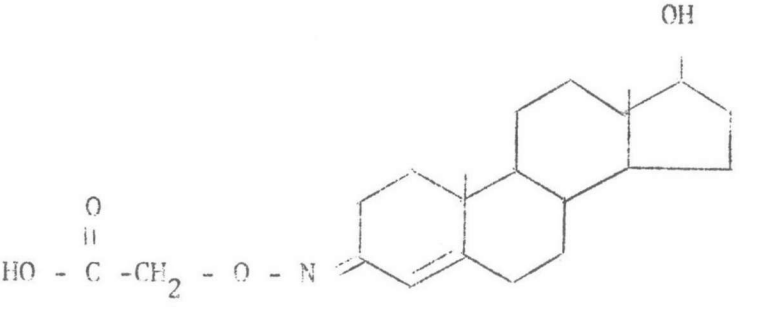
รูปที่ ๒ พันธะเปปไทด์แสดงรีโซแนนซ์

Erlanger และคณะ[๑] ได้ประสบความสำเร็จในการเตรียมอนุพันธ์ (โอ-คาร์บอซี่เมทธิล) ออกซีม [(O-carboxymethyl) oxime] ของสารประกอบสเตอรอยด์ฮอร์โมนบางตัว เช่น อัลโดสเตอโรน (aldosterone) โปรเจสเตอโรน (progesterone) เทสโทสเตอโรน[๖, ๗, ๘] เป็นต้น โดยการนำสารประกอบสเตอรอยด์ฮอร์โมนดังกล่าวมาทำปฏิกริยากับสารประกอบ (โอ-คาร์บอซี่เมทธิล) ไฮดรอซีลามีน ไฮโดรคลอไรด์ [(O-carboxymethyl) hydroxylamine hydrochloride] ในสารละลายตัวกลางที่เป็นด่างและเอทธานอลดังแสดงไว้ในรูปที่ ๓



รูปที่ ๓ แสดงปฏิกริยาการเกิดออกซีมระหว่างคีโตกรุ๊ปกับ (โอ-คาร์บอซี่เมทธิล) ไฮดรอซีลามีน

การทำปฏิกริยาในสารละลายตัวกลางที่เป็นด่างจะทำให้ไฮโดรคลอไรด์ในสารประกอบ (โอ-คาร์บอซี่เมทธิล) ไฮดรอซีลามีน ไฮโดรคลอไรด์ถูกขจัดออกซึ่งเป็นการกระตุ้นให้อะมิโนกรุ๊ฟในสารประกอบ (โอ-คาร์บอซี่เมทธิล) ไฮดรอซีลามีนเพิ่มความไวในการทำปฏิกริยายิ่งขึ้น สำหรับคุณสมบัติของคีโตกรุ๊ฟนั้น α-β-unsaturated ketones จะมีความไวในการทำปฏิกริยามากกว่า α-β-saturated ketones และ Δ^4-3-ketone กรุ๊ฟของสเตอรอยด์จะมีความไวในการทำปฏิกริยามากกว่า 17-ketone ของ androstenedione, 20-ketones ของโปรเจสเตอโรนและ corticoid hormones จากคุณสมบัติของคีโตกรุ๊ฟดังกล่าวการเกิดอนุพันธ์เทสโทสเตอโรนออกซีมจึงเกิดในคาร์บอน (C) ตำแหน่งที่ ๓



รูปที่ ๔ แสดงถึงสูตรโครงสร้างของเทสโทสเตอโรน ๓-(โอ-คาร์บอซี่เมทธิล) ออกซีม

๑.๓.๑. ข. การคอนจูเกตระหว่างสารประกอบอนุพันธ์ของสเตอรอยด์กับโปรตีนหรือ macromolecular carriers (๑, ๒) สารประกอบ macromolecular carriers นี้มีหลายชนิดที่นำมาใช้ในการคอนจูเกต เช่น สารประกอบเฟนนีลามีน (phenylamine) ฮีสตามีน (histamine) ไทโรซีน เมทธิล เอสเทอร์

สำหรับปฏิกริยาในการคอนจูเกตสารประกอบดังกล่าวนี้ จากการศึกษารายงานต่างๆ พบว่าในขณะนี้มีอยู่ ๒ วิธีคือ

ก. การคอนจูเกตโดยใช้ปฏิกริยา Mix Acid Anhydride (๒)
ปฏิกริยานี้แบ่งออกเป็น ๒ ขั้นตอนคือ

ขั้นตอนที่ ๑ กระตุ้นสารประกอบอนุพันธ์ของสเตอรอยด์ให้อยู่ในรูป mix acid anhydride) ด้วยไอโซบิวทิลคลอโรคาร์บอเนต

ขั้นตอนที่ ๒ เป็นการทำปฏิกริยาระหว่าง mix acid anhydride กับส่วนของ E-amino กรุ๊ฟของ lysine residues ในสารประกอบ carrier protein

ข. การคอนจูเกตโดยใช้ปฏิกริยาคาร์บอไดอิมีด (carbodiimide reaction) (๑, ๓, ๔, ๙, ๑๐)

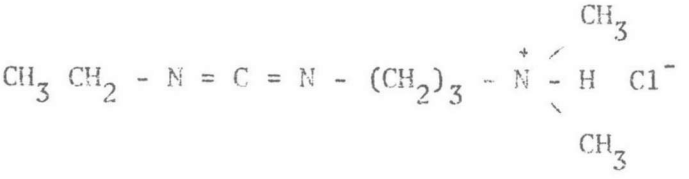
ปฏิกริยานี้เกิดโดยการใช้สารประกอบคาร์บอไดอิมีดเป็นตัวเชื่อม (coupling reagent) ระหว่างคาร์บอซิล (carboxyl) และอะมิโน (amino) กรุ๊ฟดังแสดงในรูปที่ ๕

สารประกอบคาร์บอไดอิมีดที่ใช้ทั่วๆ ไปมีดังนี้คือ

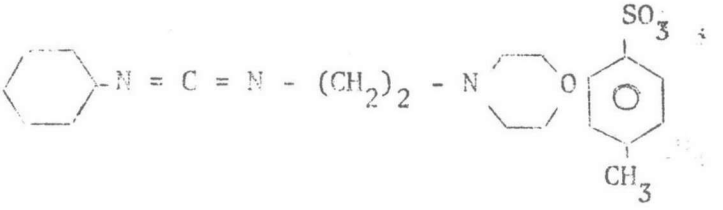
H - N = C = N - H

CARBODIIMIDE

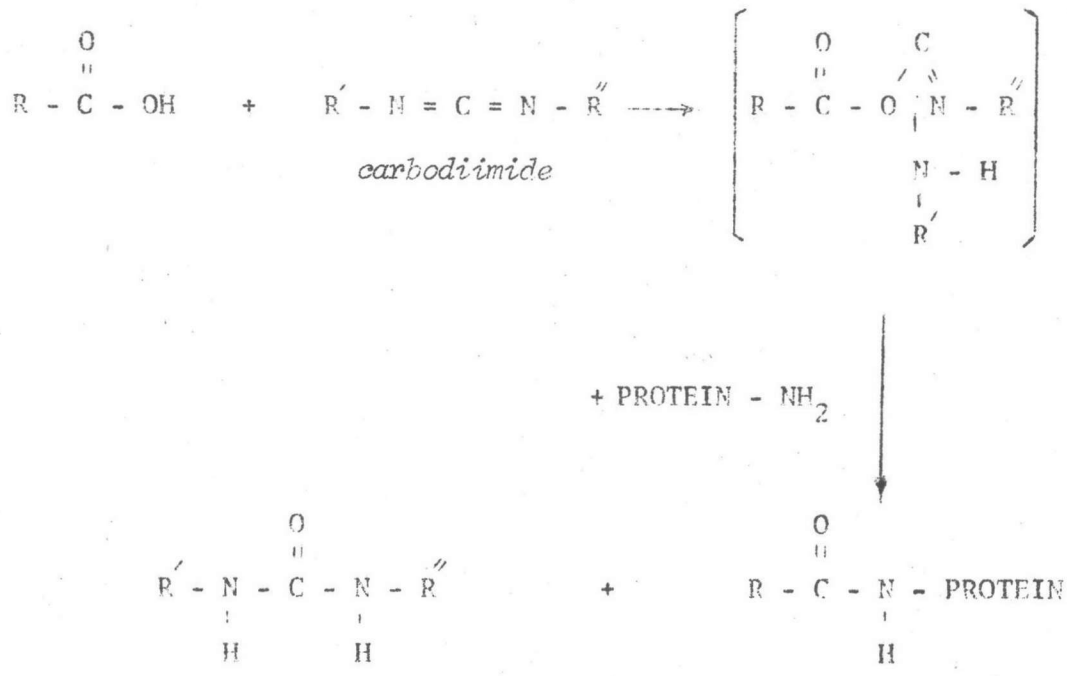
DICYCLOHEXYL CARBODIIMIDE (DCC)



1 - ETHYL - 3 - (3 - DIMETHYLAMINOPROPYL)
CARBODIIMIDE HYDROCHLORIDE (EDC.HCl)



1 - CYCLOHEXYL - 3 - (2 - MORPHOLINOETHYL) CARBODIIMIDE
MET - P - TOLUENE SULPHONATE (CMC)



รูปที่ ๕ แสดงปฏิกริยาคาร์บอไดอิมีด

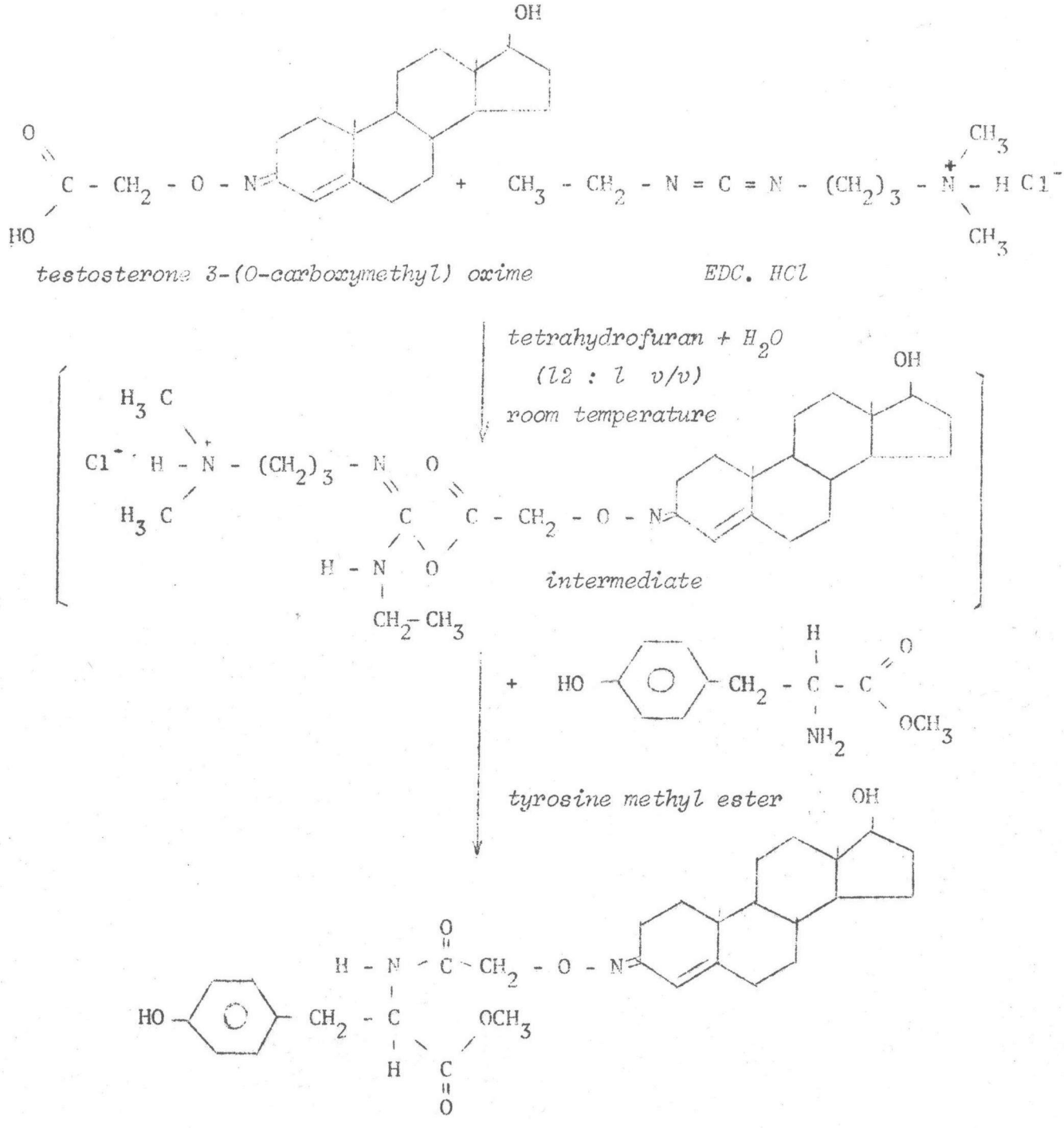
สำหรับการทดลองในวิทยานิพนธ์นี้เกี่ยวกับการคอนจูเกตระหว่างสารประกอบอนุพันธ์สเตอรอยด์กับไทโรซีน เมทธิล เอสเทอร์ การทดลองได้ใช้ปฏิกริยาคาร์บอไดอิมีดเป็นหลักโดยใช้ ๑-เอทธิล-๓-(๓-ไดเมทธิลอะมิโนโปรปิล) คาร์บอไดอิมีด ไฮโดรคลอไรด์เป็นตัวเชื่อม ทั้งนี้เนื่องจากปฏิกริยาการคอนจูเกตดังกล่าวสามารถเกิดได้ดีในอุณหภูมิห้องและในส่วนผสมของเตทตระไฮโดรฟูราน (tetrahydrofuran) กับน้ำในอัตราส่วน ๑๒ : ๑ โดยปริมาตร[๓]

จากรูปที่ ๕ สามารถนำมาดัดแปลงเขียนเป็นปฏิกริยาการคอนจูเกตระหว่างเทสโทสเทอโรน ๓-(โอ-คาร์บอกซิเมทธิล) ออกซิมกับไทโรซีน เมทธิล เอสเทอร์ ดังแสดงในรูปที่ ๖

๑.๓.๒ การติดฉลากสารประกอบโปรตีนและสเตอรอยด์ฮอร์โมนด้วยไอโอดีน-๑๒๕

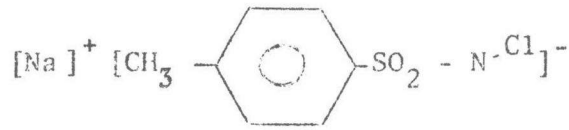
การติดฉลากนี้สามารถทำได้หลายวิธี แต่วิธีที่ใช้กันแพร่หลายซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็วได้ผลดีและประหยัดก็คือวิธีทางเคมีโดยใช้คลอรามีน-ทีเป็นตัวออกซิไดซ์

สำหรับในกรณีที่เป็นสารประกอบโมเลกุลเล็กๆ เช่น พวกสเตอรอยด์ฮอร์โมน การนำเอาไอโอดีน-๑๒๕ เข้าไปในโมเลกุลจะทำได้ยากแต่สามารถทำได้โดยการผูกสารประกอบดังกล่าวเข้ากับสารประกอบตัวอื่น เช่น ไทโรซีน เมทธิล เอสเทอร์ก่อนแล้วจึงนำไอโอดีน-๑๒๕ เข้าต่ออีกขั้นหนึ่งโดยวิธีทางเคมี George C. Oliver และคณะ[๑๑] ได้เป็นผู้ริเริ่มด้วยการคอนจูเกตดิจิทอกซิน (digitoxin) กับไทโรซีน เมทธิล เอสเทอร์แล้วจึงนำไปติดฉลากด้วยไอโอดีน-๑๒๕ โดยดัดแปลงมาจากวิธีการของ Hunter และ Greenwood [๑๒]

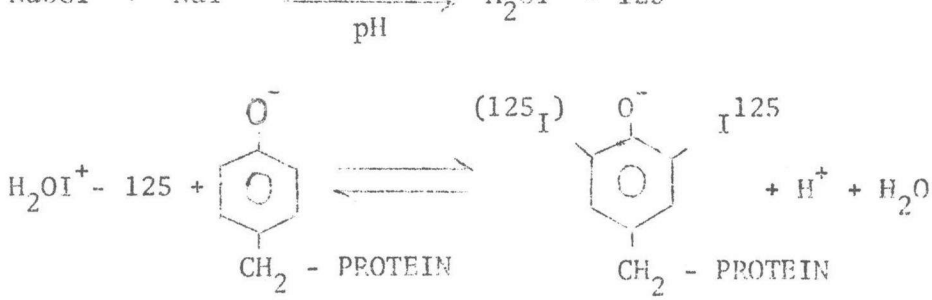


รูปที่ ๖ แสดงการเกิดสารประกอบเทสโทสเตอโรน ๓-(โอ-คาร์บอกซี่เมทธิล) ไฮดรอซีลามีน ไทโรซีน เมทธิล เอสเทอร์โดยปฏิกิริยาคาร์บอไดอิมีด

คุณสมบัติของคลอรามีน-ที[๑๐, ๑๓, ๑๔, ๑๕] เป็นเกลือโซเดียมของ N-monochloro derivative of p-toluene sulphonamide ซึ่งมีสูตรทางเคมีคือ

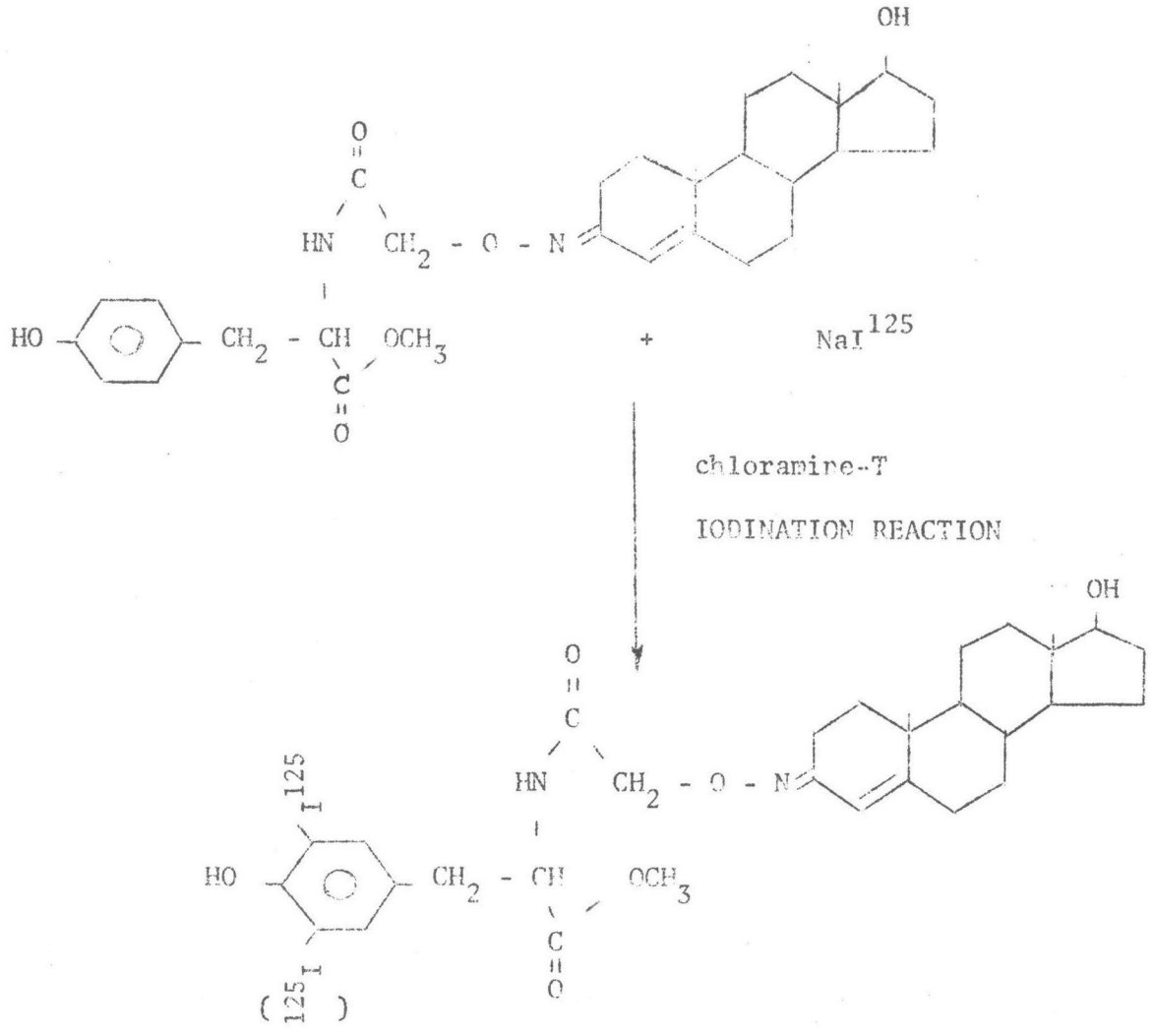


เมื่ออยู่ในสารละลายที่มีน้ำประกอบอยู่จะเกิดปฏิกริยาให้กรดไฮโปคลอรัส (hypochlorous acid) ออกมาและสามารถทำปฏิกริยากับโซเดียมไอโอไดด์ (NaI) ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพี เอช (pH) เป็นด่างเล็กน้อยซึ่งจะทำให้เกิดไอโอดีนประจุบวก (cationic iodine) ขึ้น จากนั้นไอโอดีนประจุบวกจะเข้าทำปฏิกริยากับไทโรซีนกรุ๊ฟในสารประกอบในตำแหน่งออโธ (ortho position) ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นแต่ละขั้นได้แสดงไว้ในรูปที่ ๗



รูปที่ ๗ แสดงปฏิกริยาแต่ละขั้นตอนของการติดฉลากสารประกอบที่มีไทโรซีนกรุ๊ฟด้วยไอโอดีน-๑๒๕ โดยวิธีคลอรามีน-ที

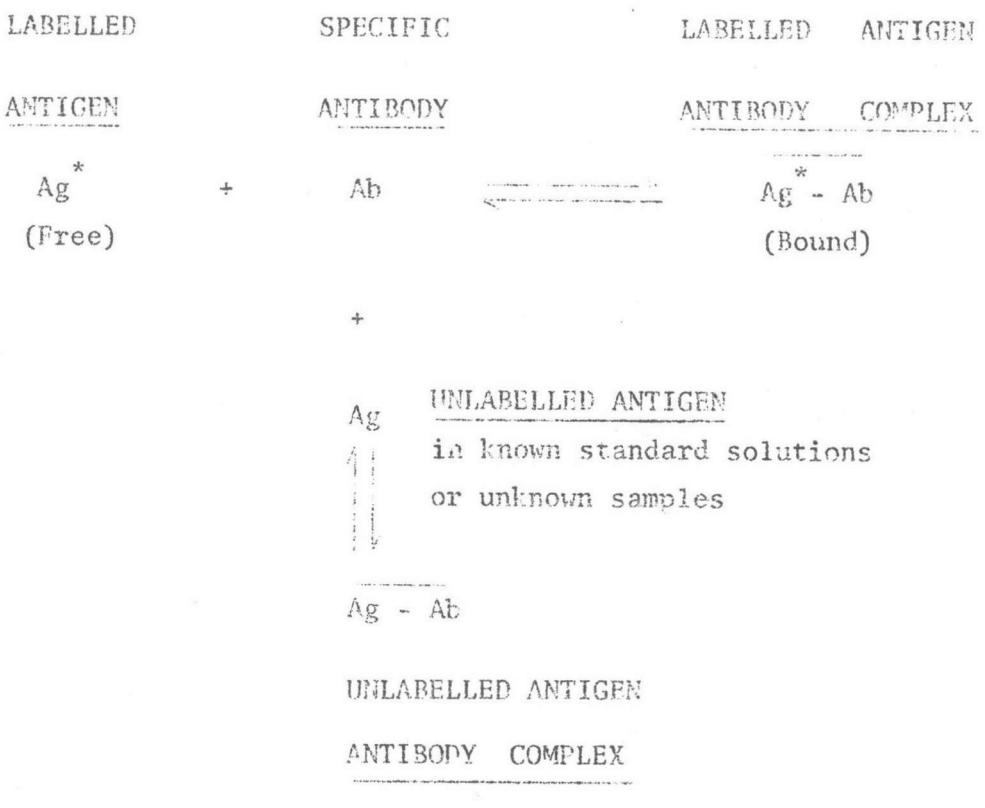
ในการติดฉลากไอโอดีน-๑๒๕ เข้าในไทโรซีนกรุฟนี้ พี เอช ของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ที่เหมาะสมที่สุดควรมีค่า ๘.๕ หลังจากปฏิกริยาเกิดขึ้นแล้วจะหยุดปฏิกริยามิให้เกิดเป็นสารประกอบไดไอโอโด (diiodo compound) ได้โดยการเติมสารละลายโซเดียมเมตรไบซัลไฟต์ (sodium metabisulfite)



รูปที่ ๘ แสดงปฏิกริยาการติดฉลากสารประกอบเทสโทสเตอโรน ๓-(โอ-คาร์บอซี่เมทธิล) ไฮดรอซีลามีน ไทโรซีน เมทธิล เอสเทอร์ ด้วยไอโอดีน-๑๒๕ โดยวิธีคลอรามีน-ที

๑.๓.๓ หลักการทั่วไปเกี่ยวกับการทำราดิโออิมมิวโนแอสเสย์(๑๖, ๑๗)

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบบางชนิดโดยวิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์เป็นการนำเอาความรู้ทางด้านรังสีวิทยาและอิมมิวโนวิทยามาประยุกต์ใช้ร่วมกันโดยอาศัยหลักการแข่งขันในการทำปฏิกริยาของสารติดฉลากรังสีและสารมาตรฐานหรือสารที่ต้องการหาปริมาณกับสารแอนตีบอดีที่มีความจำเพาะ (specific) ในการรวมตัวกับสารติดฉลากหรือสารมาตรฐานนั้นๆ ดังแสดงในรูปที่ ๙



รูปที่ ๙ แสดงการแข่งขันในการเข้ารวมตัวระหว่างสารติดฉลากกับสารแอนตีบอดีในปฏิกริยาราดิโออิมมิวโนแอสเสย์

เมื่อ Ag เป็นสารมาตรฐานหรือสารที่ต้องการวัดหาปริมาณ

Ag^* เป็นสารติดฉลากรังสีซึ่งใช้เป็นตัววัดปฏิกริยา

Ab เป็นแอนติบอดีที่มีความจำเพาะในการรวมตัวกับ Ag และ Ag^* แล้วเกิด bound complex

ถ้า Ab และ Ag^* มีปริมาณคงที่ทั้ง Ag และ Ag^* จะแข่งกันเข้าทำปฏิกริยากับ Ab การเกิด bound complex ของ Ag-Ab และ Ag^*-Ab จะแปรตามปริมาณของ Ag มาตรฐานหรือปริมาณของ Ag ในสารตัวอย่างดังนั้นทำให้สามารถหาปริมาณ Ag ในสารตัวอย่างได้โดยการเปรียบเทียบ Ag^*-Ab ที่เกิดในสภาวะที่มีสารตัวอย่างกับการเกิด Ag^*-Ab ในสภาวะที่มีสารมาตรฐานปริมาณต่างๆ ที่ทำไว้เป็นกราฟมาตรฐาน

๑.๓.๔ การแยกฮอร์โมนอิสระออกจากส่วนที่ทำปฏิกริยากับแอนติบอดีหรือแอนติซีรัม

สำหรับสเตอรอยด์ฮอร์โมนสามารถทำได้หลายวิธีแต่ได้เลือกใช้วิธีการเติมน้ำยาแขวนตะกอนผงถ่าน (dextran charcoal suspension) ซึ่งเป็นวิธีที่ได้ผลดี สะดวก รวดเร็วและประหยัดโดยที่น้ำยาแขวนตะกอนผงถ่านที่เติมลงไปจะดูด (absorb) ฮอร์โมนอิสระและไอโอดีน-๑๒๕ อิสระเอาไว้ส่วนฮอร์โมนที่ทำปฏิกริยากับแอนติบอดีหรือแอนติซีรัมจะไม่ถูกดูดทำให้สามารถแยกออกจากกันได้

๑.๔ ความสำคัญหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัยนี้

ก. จะได้วิธีการนำเอาราดิโอไอโอดีนเข้าไปในสารประกอบโมเลกุลเล็กๆ บางชนิดได้ผลดี สะดวก รวดเร็ว และประหยัด

ข. เป็นการสะดวกและประหยัดสำหรับห้องปฏิบัติการที่ศึกษาวิจัยเรื่องเกี่ยวกับระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนหรือเพื่อที่จะเตรียมสารประกอบติดฉลากใช้เอง โดยใช้วิธีที่ได้จากผลการวิจัยนี้

000706

ค. สารประกอบฮอร์โมนติดฉลากด้วยไอโอดีน-๑๒๕ ในขณะนี้ใช้แพร่หลายในประเทศแต่ยังไม่มีการศึกษาถึงการผลิตอย่างจริงจังที่แล้วมาเป็นการสั่งซื้อจากต่างประเทศโดยตรงซึ่งมีปัญหามากในเรื่องค่าใช้จ่ายสูงและไม่สะดวกสำหรับผู้ใช้ การวิจัยนี้จึงเป็นการริเริ่มและช่วยให้มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการเตรียมสารประกอบติดฉลากสำหรับราดิโออิมมิวโนแอสเสย์ขึ้นใช้เองในประเทศ