

บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

1. การสังเคราะห์อนุพันธ์ของธีโอฟิลลีน

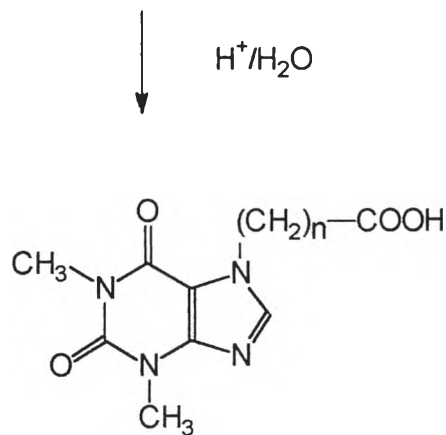
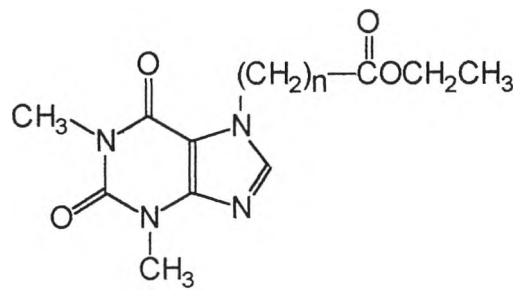
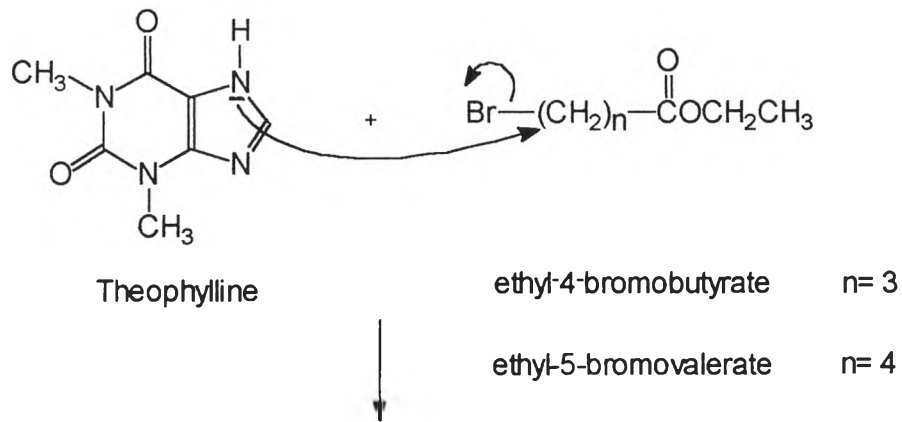
1.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์ ณ ตำแหน่งที่ 7 (อนุพันธ์ ก. และ ข.)

การสังเคราะห์ประยุกต์จากวิธีของ Hu และ Singh, 1980 โดยการทำปฏิกิริยาอัลคิลเลชัน(alkylation) ที่ไนโตรเจนตำแหน่งที่ 7 ของ ธีโอฟิลลีน ด้วยethyl-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 1กรัม/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)ที่ความเข้มข้น1กรัม/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.

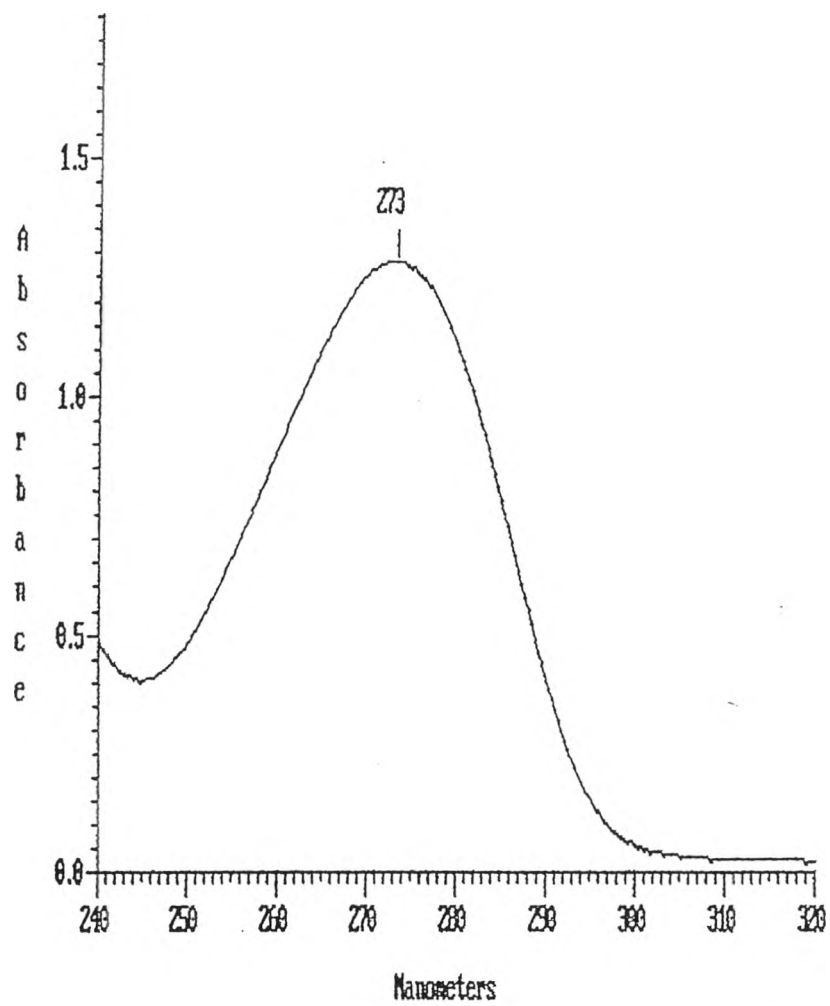
รูปที่ 1 ปฏิกริยาในการสังเคราะห์อนุพันธ์ของธีโอฟิลลีน

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

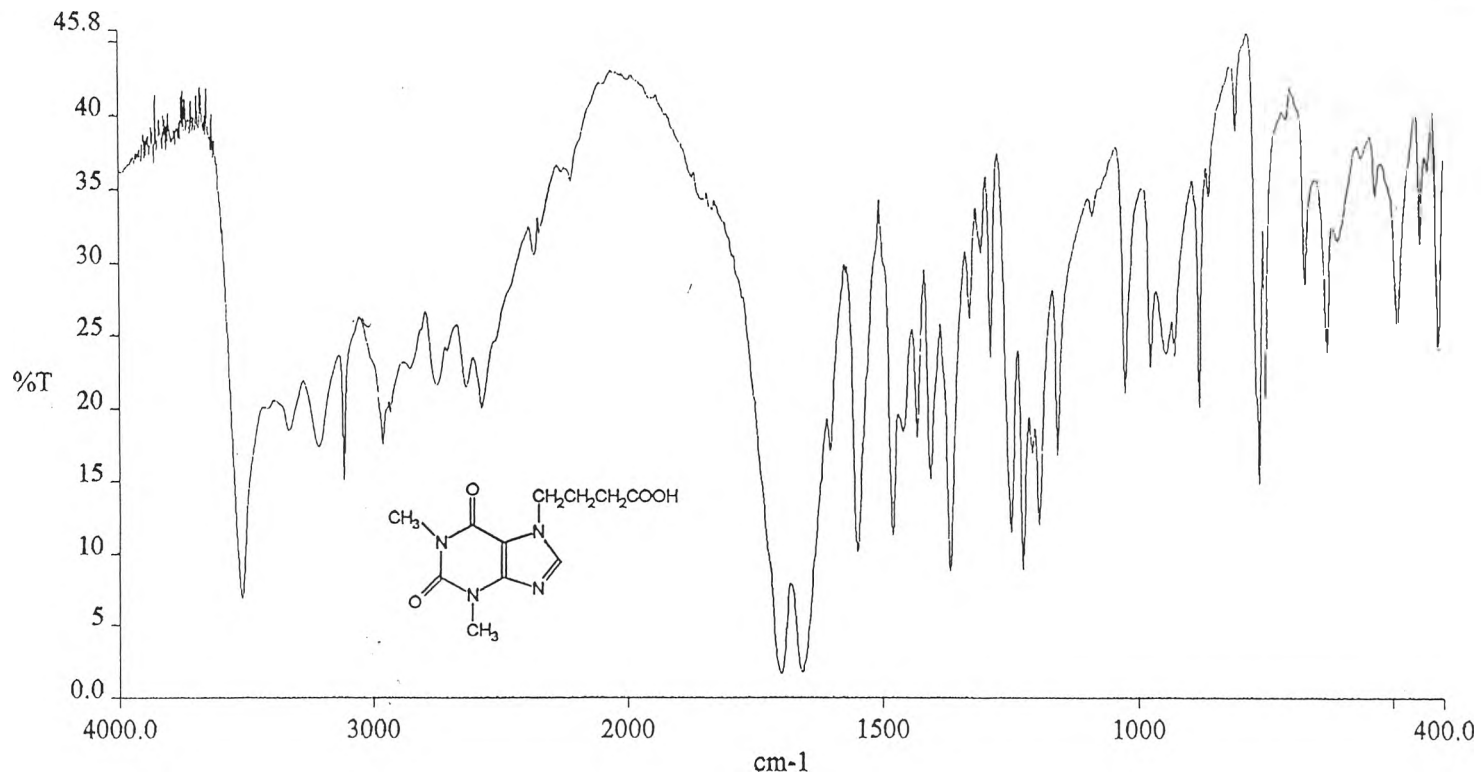
อนุพันธ์ ข. 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine

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



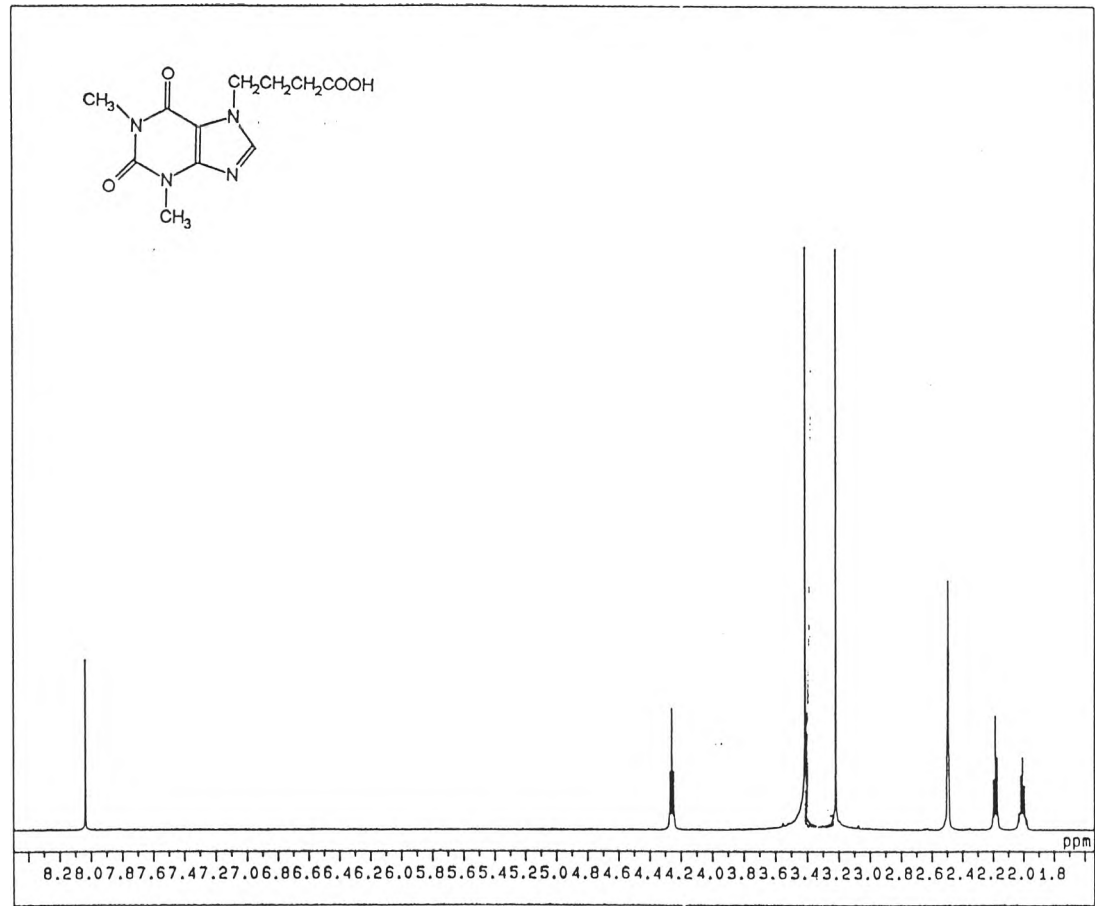
รูปที่ 2 UV สเปกตรัมของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ก.)
ความเข้มข้น 33 มคก./มล.



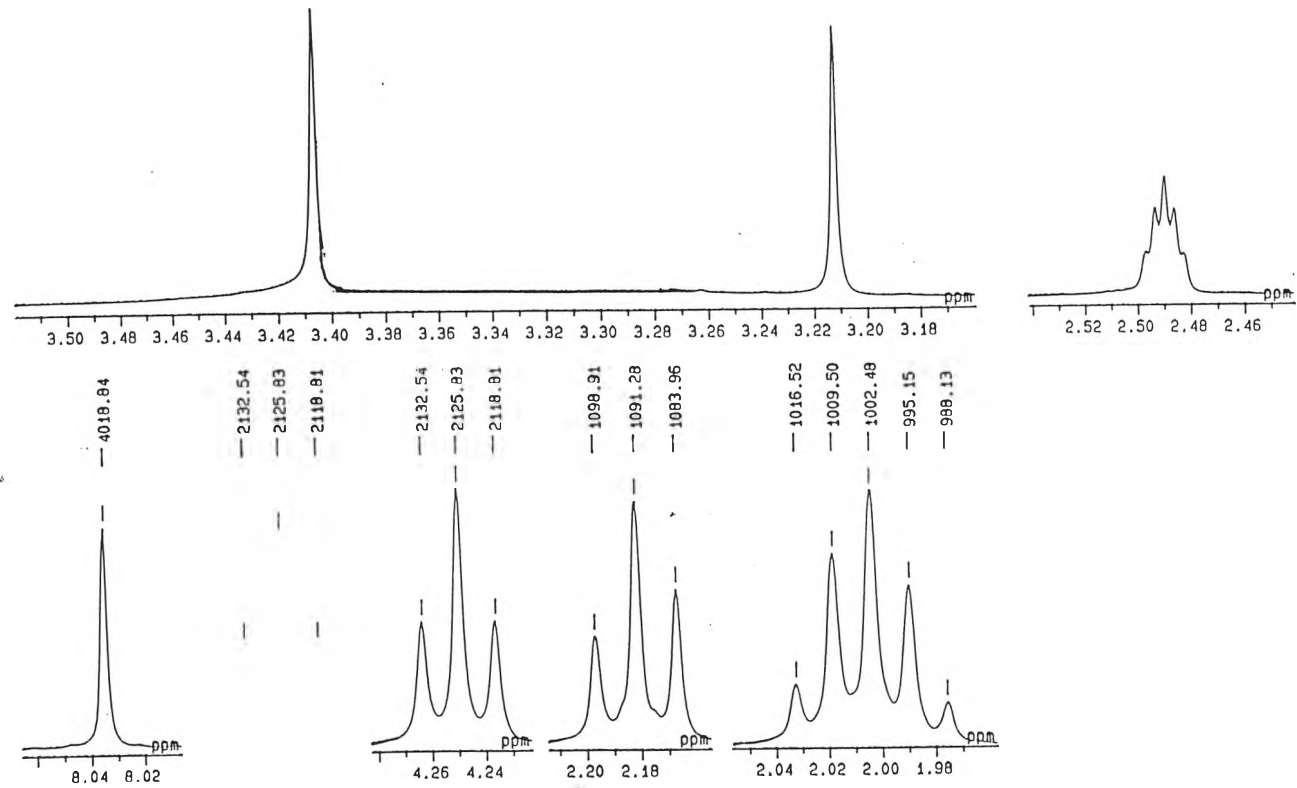
รูปที่ 3 IR สเปกตรัมของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ก.)

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

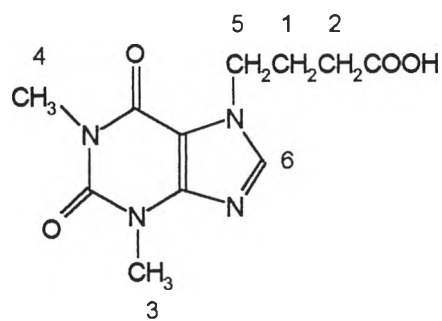


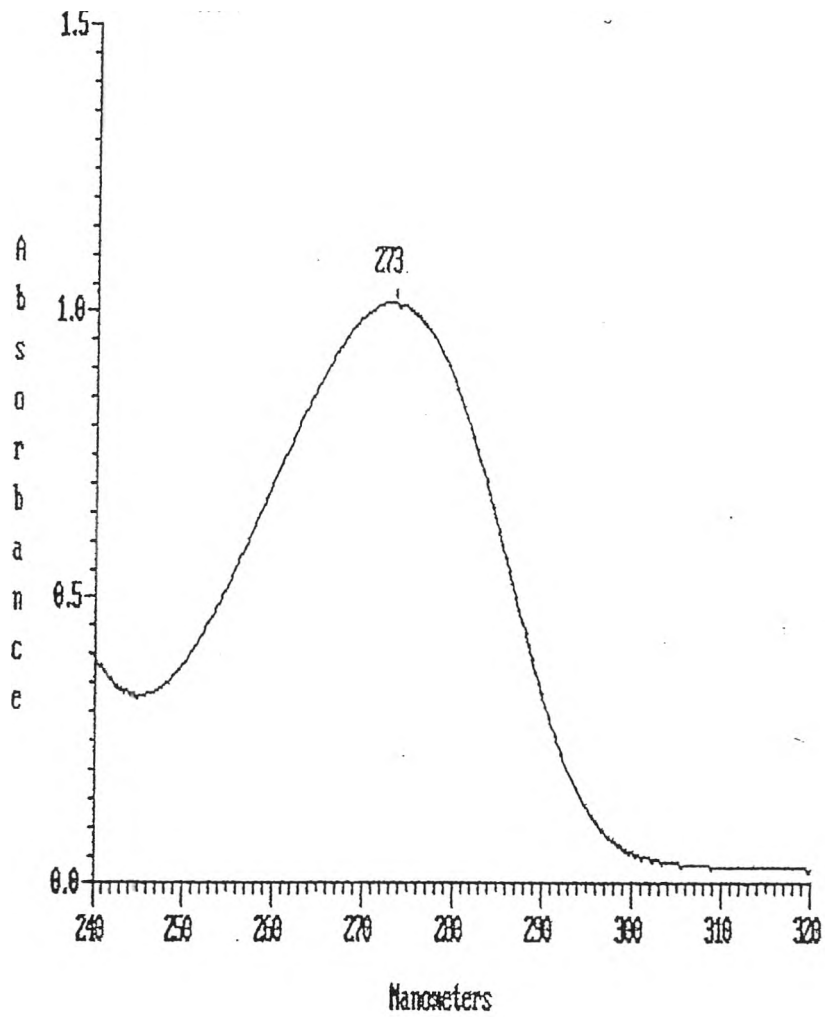
รูปที่ 5 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ก.) ใน DMSO-d_6
(ขยายสเกลจาก 1.96-8.06 ppm)

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

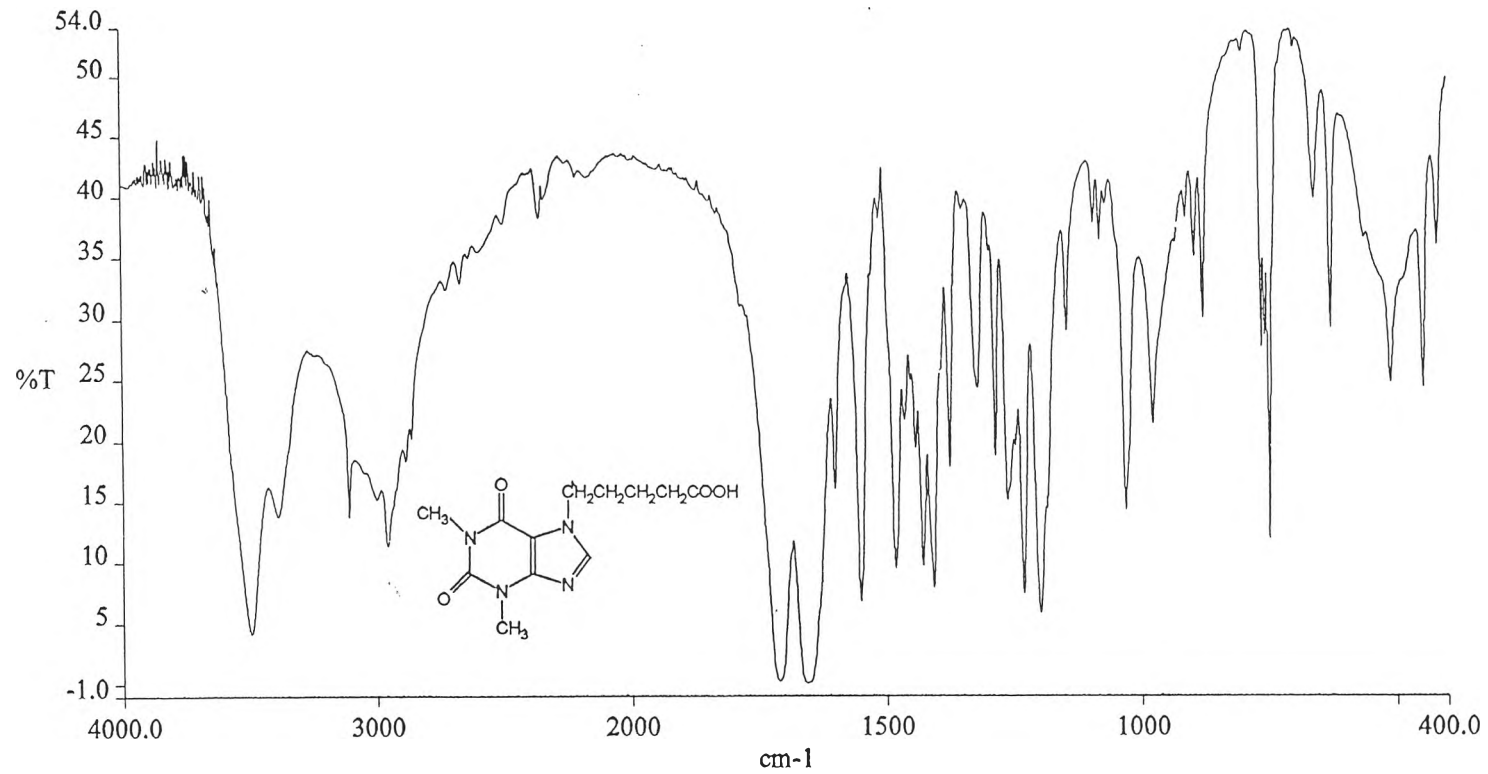
Position	Chemical shift (ppm)	Multiplicity
1	1.97-2.04	2H, m ¹⁾
2	2.16-2.20	2H, t ²⁾ , J = 7.0 Hz
3	3.21	3H, s ³⁾
4	3.41	3H, s
5	4.23-4.27	2H, t, J = 7.0 Hz
6	8.04	1H, s

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





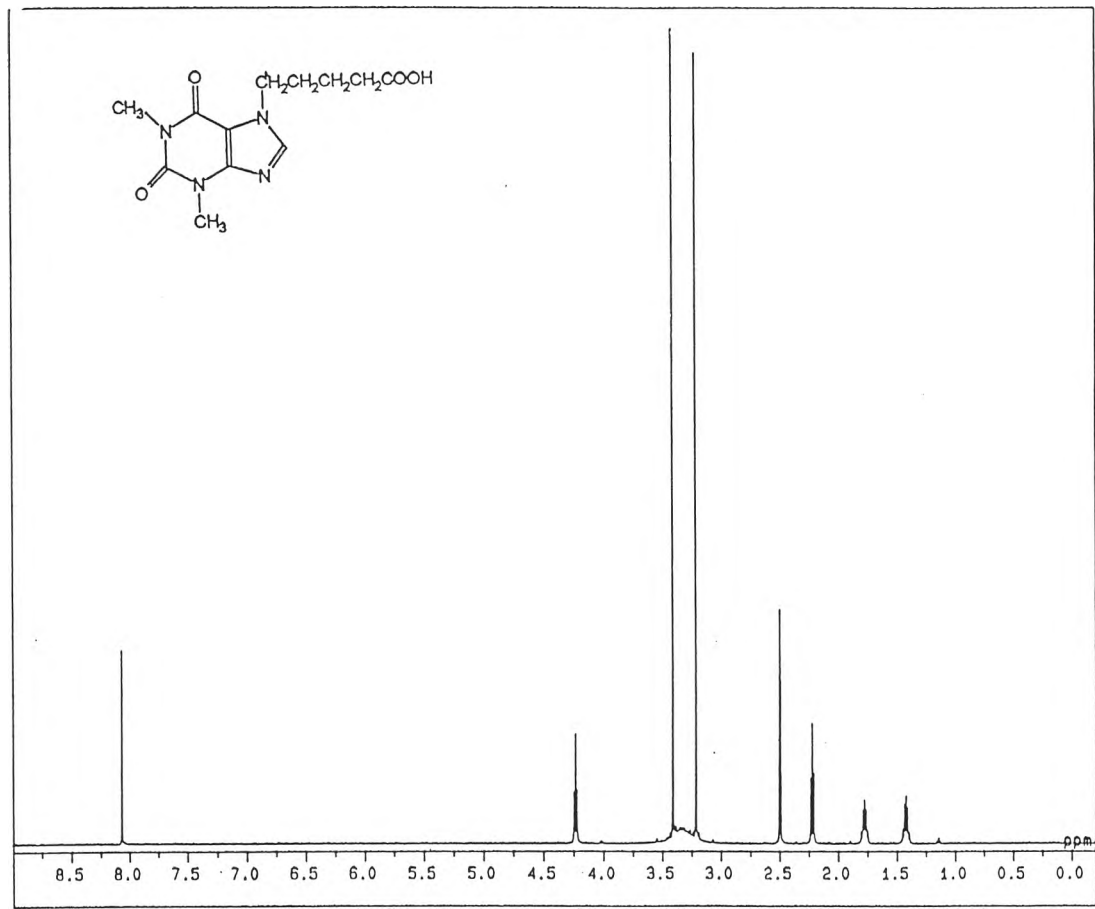
รูปที่ 6 UV สเปกตรัมของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ข.)
ความเข้มข้น 33 มคก./มล.



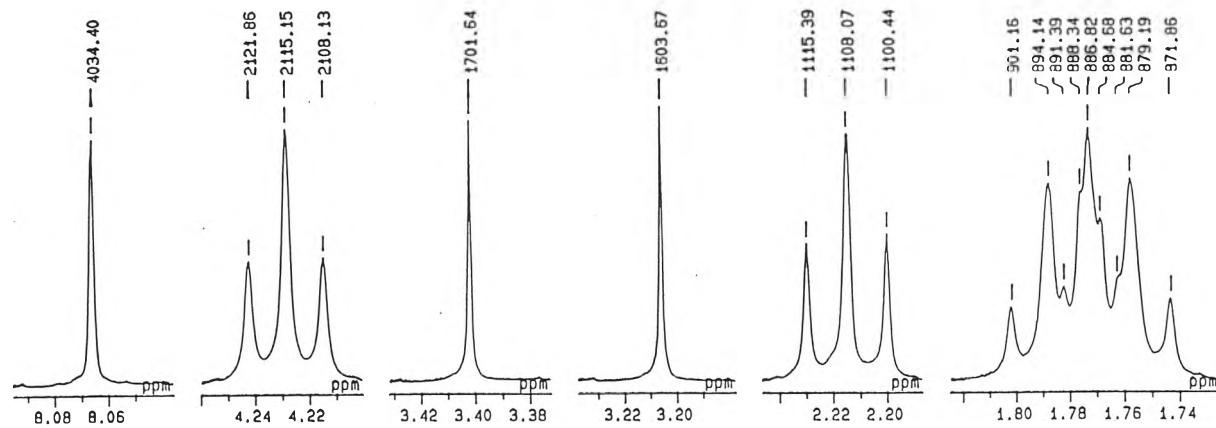
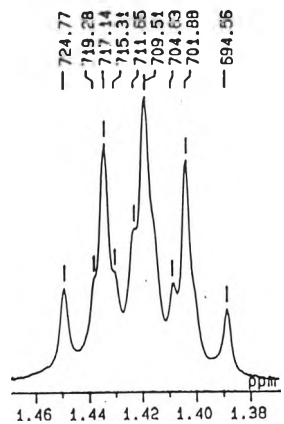
รูปที่ 7 IR สเปกตรัมของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ข.)

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



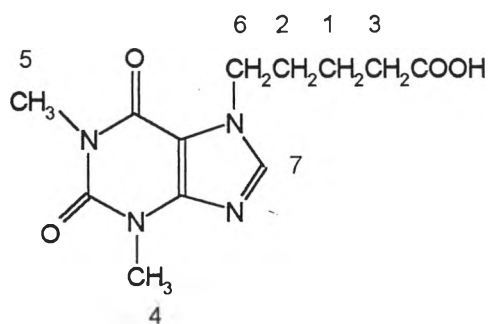
รูปที่ 8 ¹H-NMR สเปกตรัมของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ข.) ใน DMSO-d₆



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

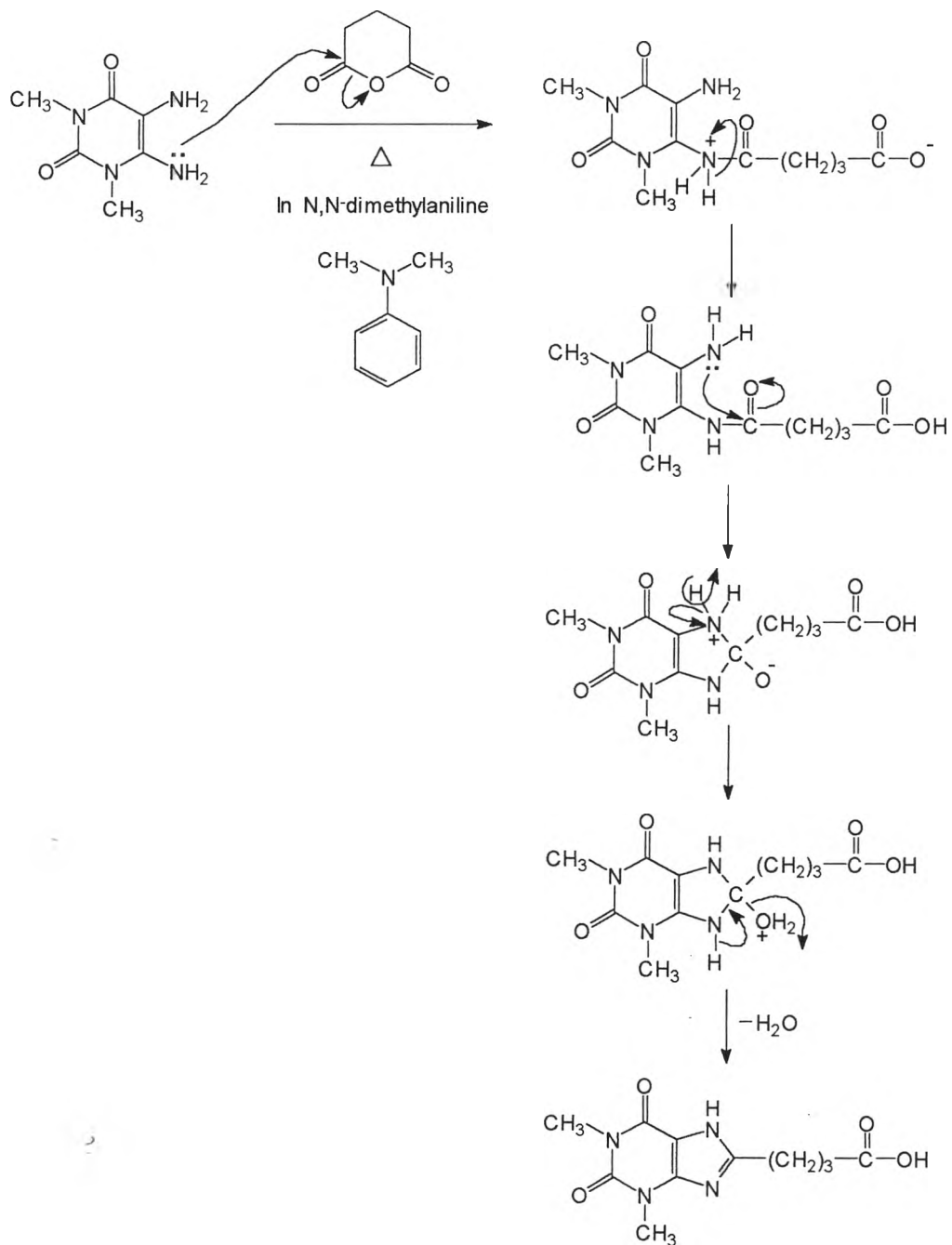


1.2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ ณ ตำแหน่งที่ 8 คือ 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ค.) (Cook et al., 1976)

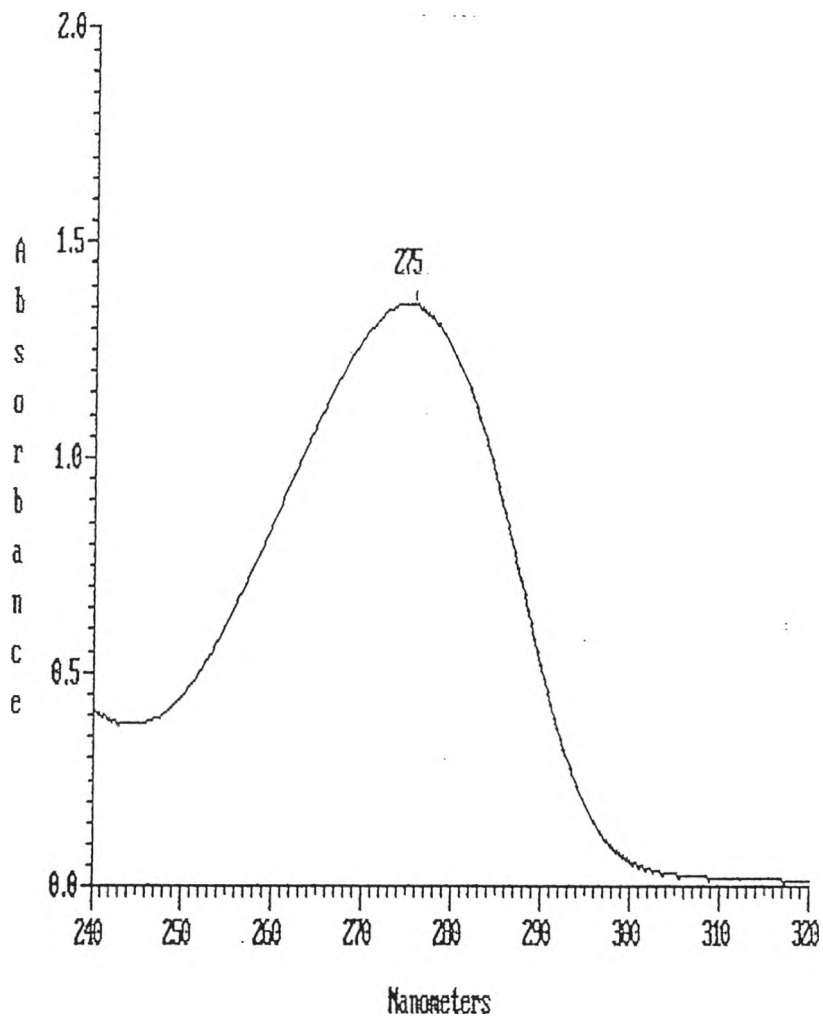
จากการสังเคราะห์อนุพันธ์ ค. ดังได้แสดงกลไกของปฏิกิริยาในรูปที่ 10 เป็นการรีฟลักซ์ 4,5-diamino-1,3-dimethylpyrimidine-2,6-dione กับ glutaric anhydride ใน *N,N*-dimethylaniline แล้วเกิดไซโคลซ์เซชัน(cyclization) จะได้ 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ค.) เป็นผงสีเหลืองอ่อน คิดเป็น 36.40%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

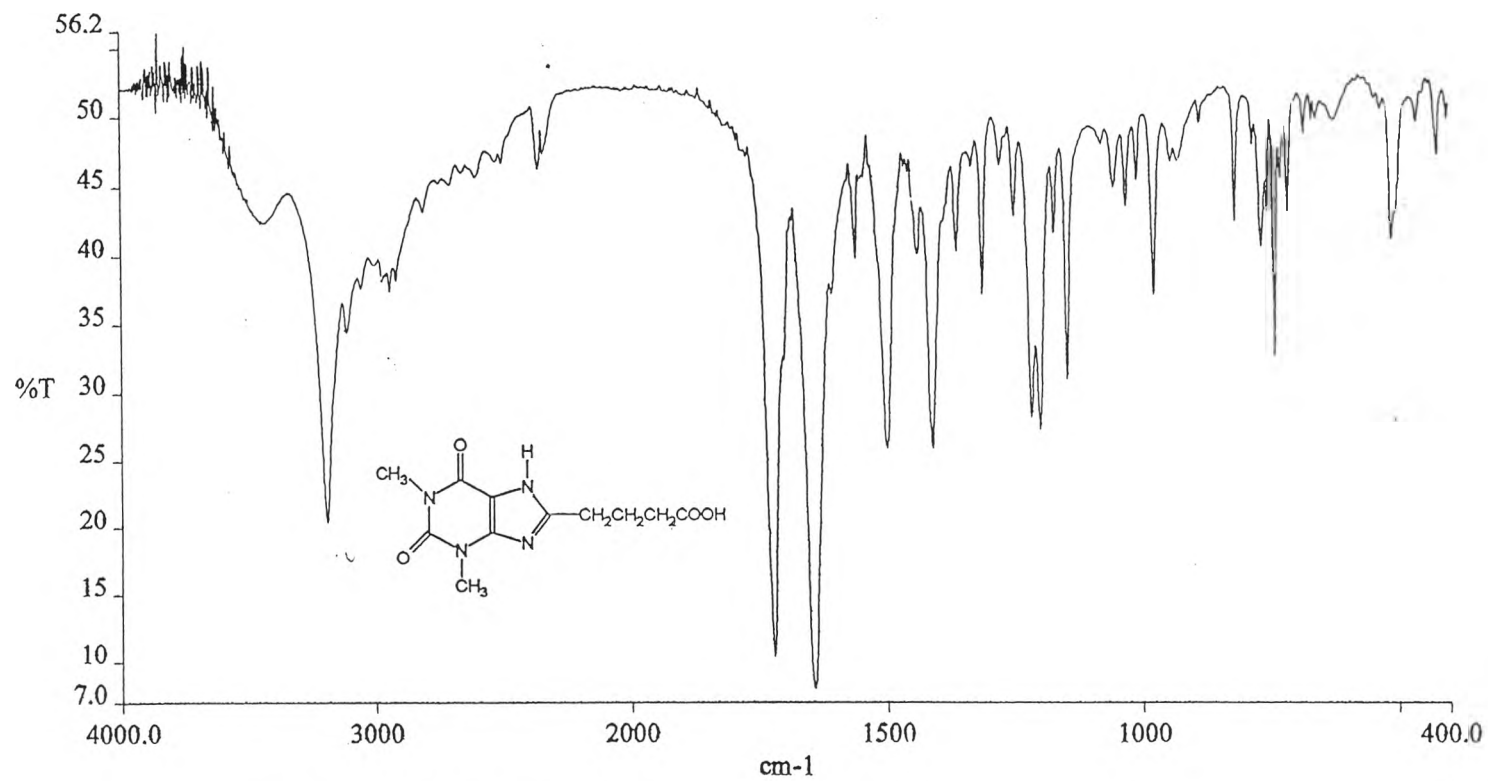
ทำการพิสูจน์สูตรโครงสร้างของอนุพันธ์ ค. ด้วย IR สเปกตรัม ดังแสดงในรูปที่ 12 และตารางที่ 6 และ ¹H-NMR สเปกตรัมในรูปที่ 13 และ 14 และค่าเคมีคัลชิฟท์ (δ) ในตารางที่ 7



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



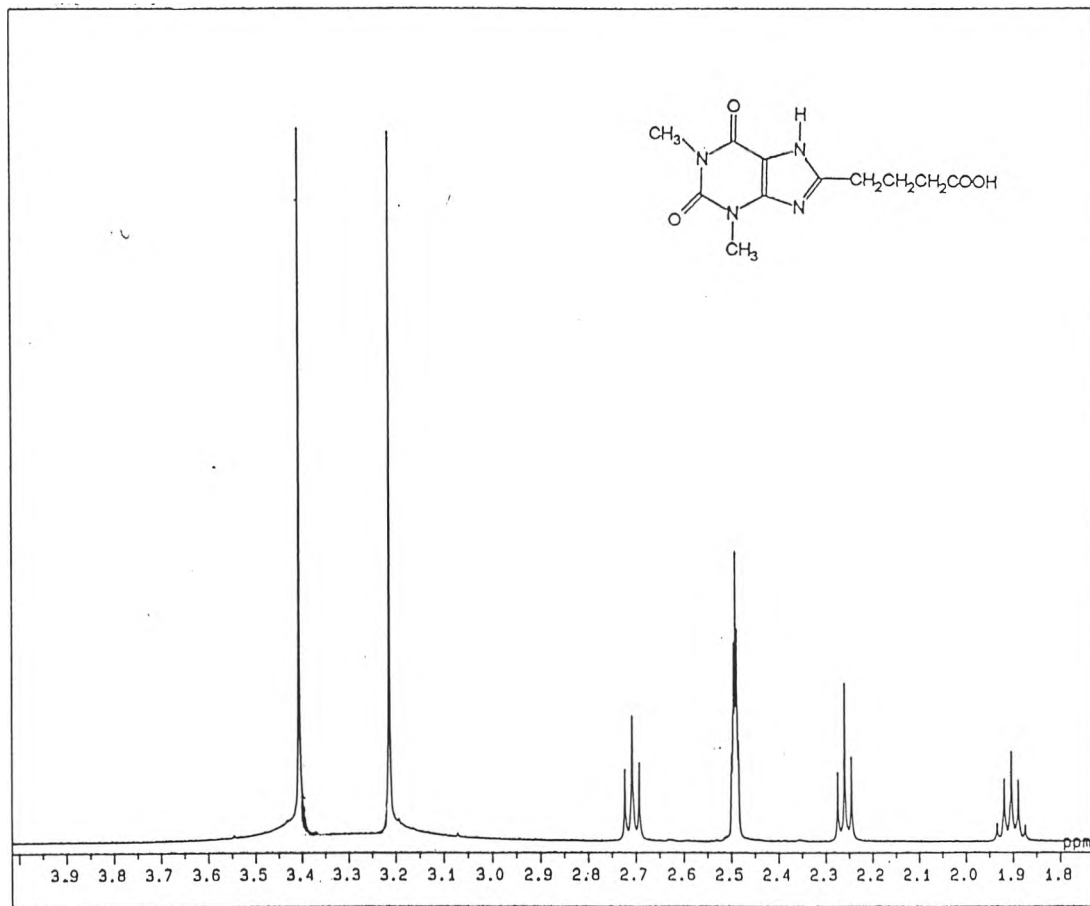
รูปที่ 11 UV สเปกตรัมของ 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ค.)
ความเข้มข้น 33 มคก./มล.



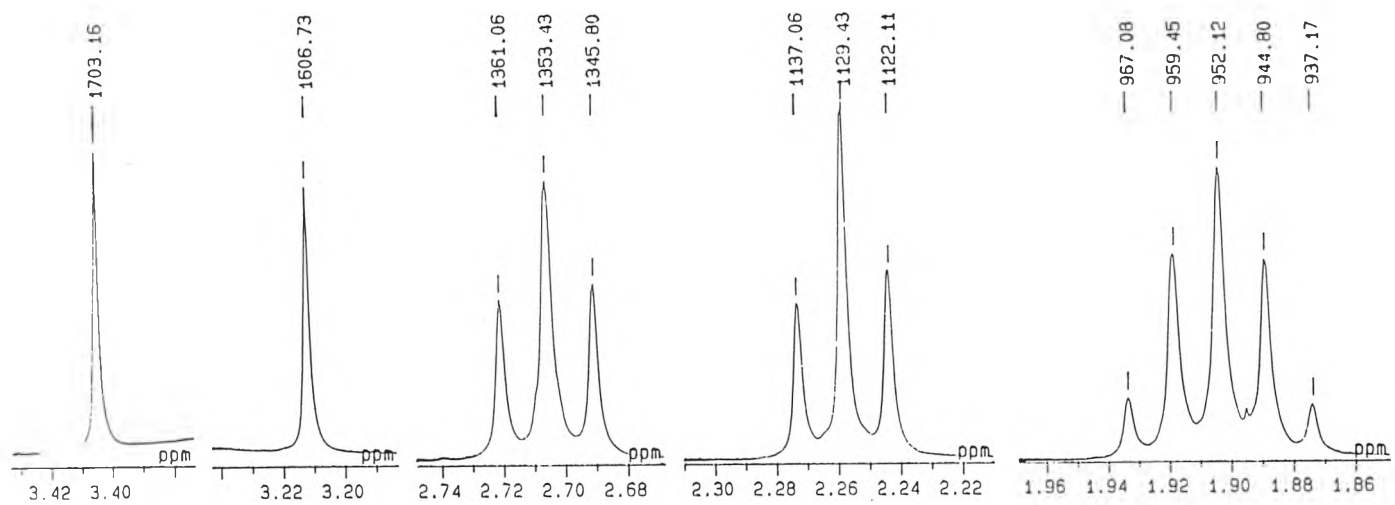
รูปที่ 12 IR สเปกตรัมของ 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ค.)

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



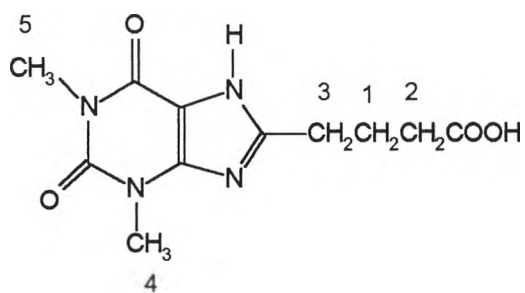
รูปที่ 13 ¹H-NMR สเปกตรัมของ 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ค.) ใน DMSO-d₆



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



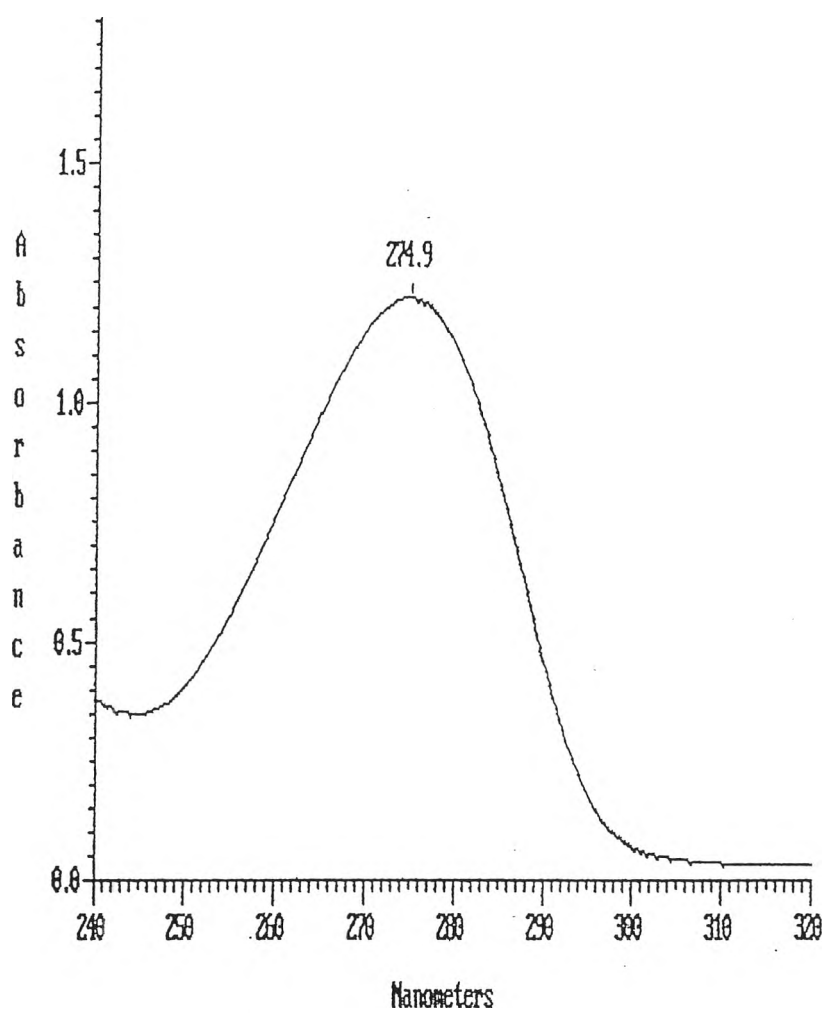
1.3 การสังเคราะห์อนุพันธ์ คือ 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ง.)

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.)

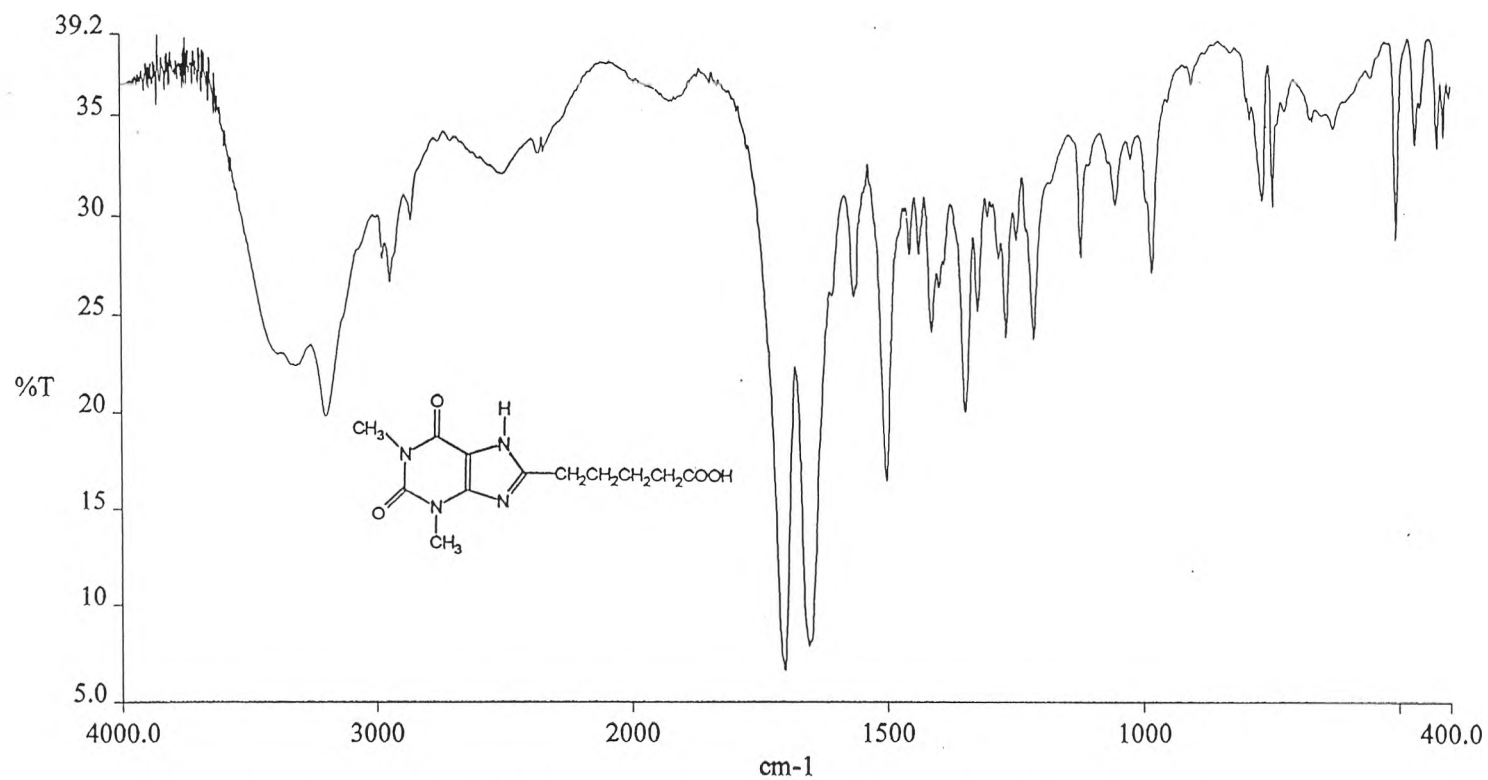
อนุพันธ์ ง. มีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 275 nm ดังแสดงใน UV สเปกตรัมในรูปที่ 16 และมีค่าจำเพาะของการดูดกลืนแสง (specific absorbance, k) ที่ความเข้มข้น 1 กรัม/ลิตร เท่ากับ 36.77

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.



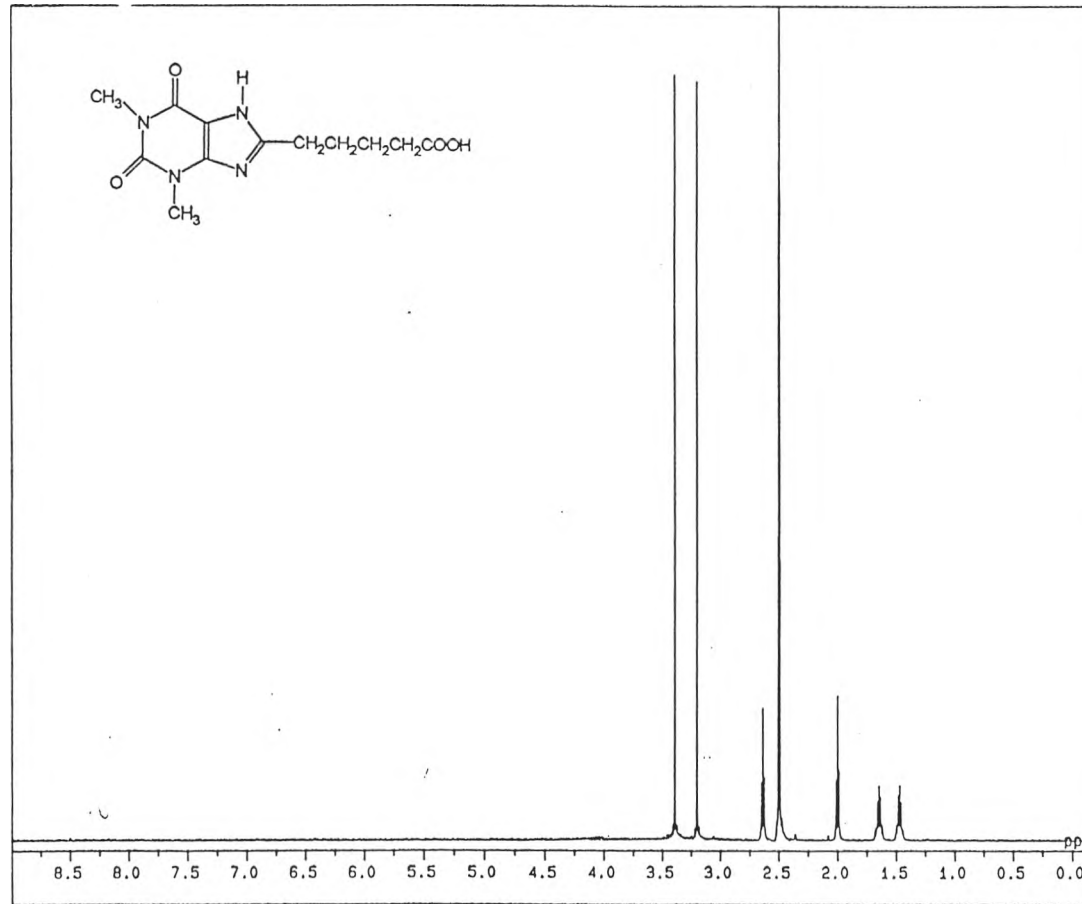
รูปที่ 16 UV สเปกตรัมของ 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ง.)
ความเข้มข้น 33 มก./มล.



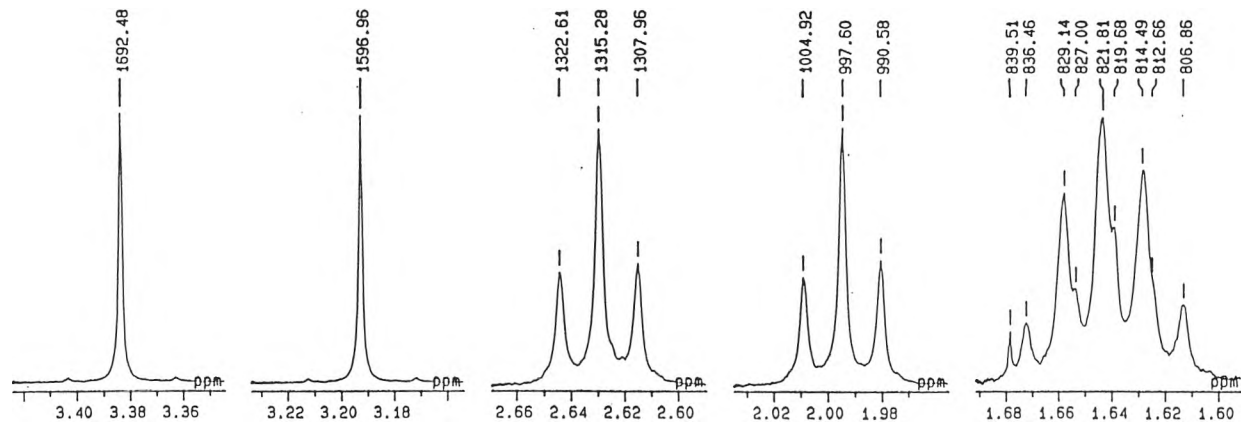
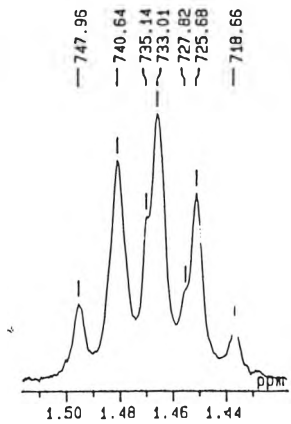
รูปที่ 17 IR สเปกตรัมของ 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ง.)

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



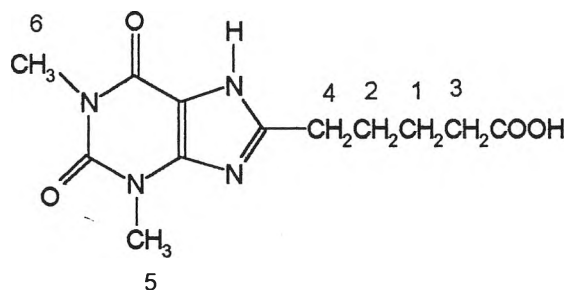
รูปที่ 18 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของ 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ง.) ใน DMSO-d_6



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.)

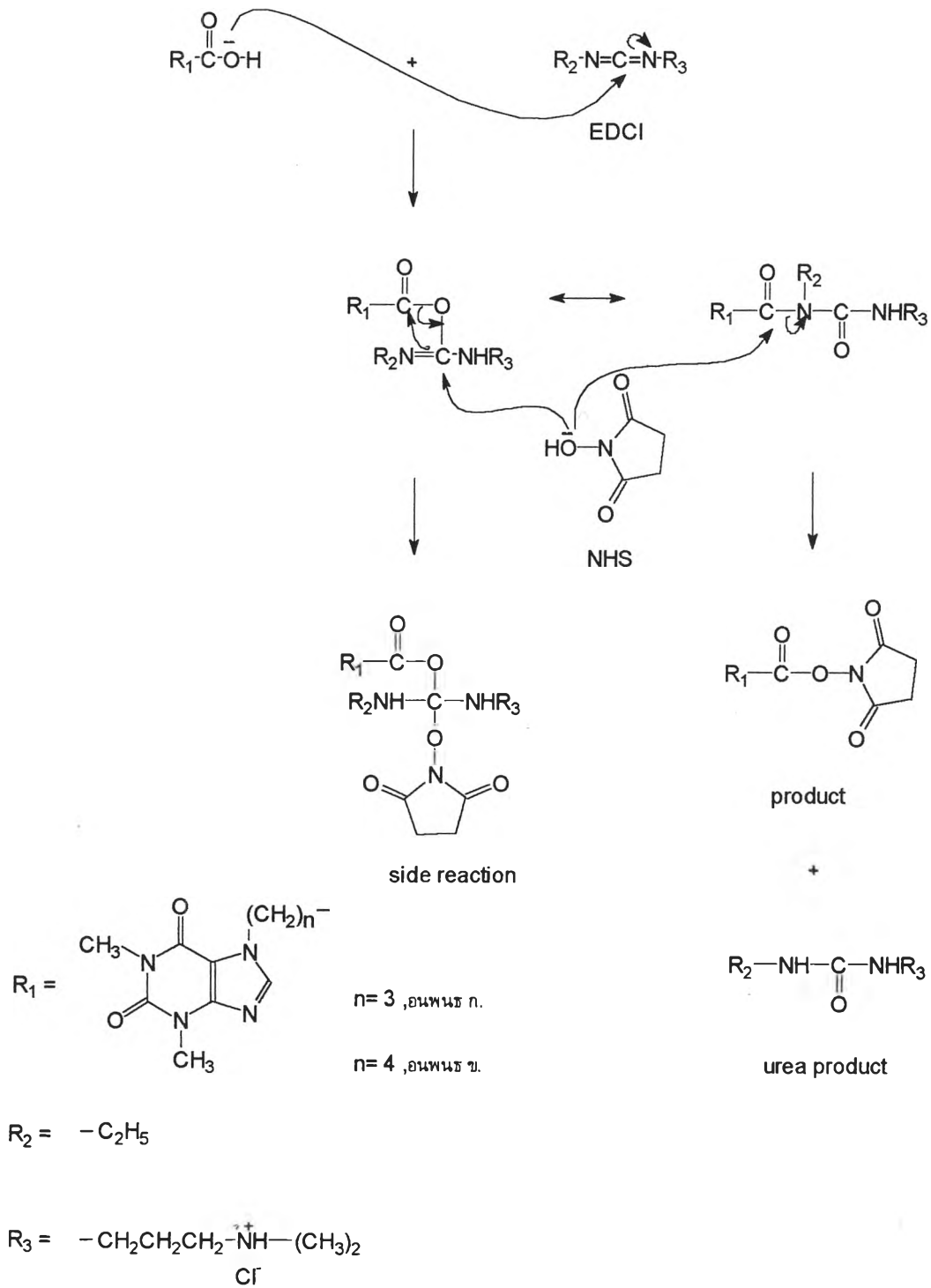
การเตรียมอิมมูโนเจนของอนุพันธ์ ก. เป็นการเกิดปฏิกิริยาควบคู่กันระหว่างอนุพันธ์ ก. ในรูป NHS เอสเทอร์ กับ BSA ดังแสดงในรูปที่ 20

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

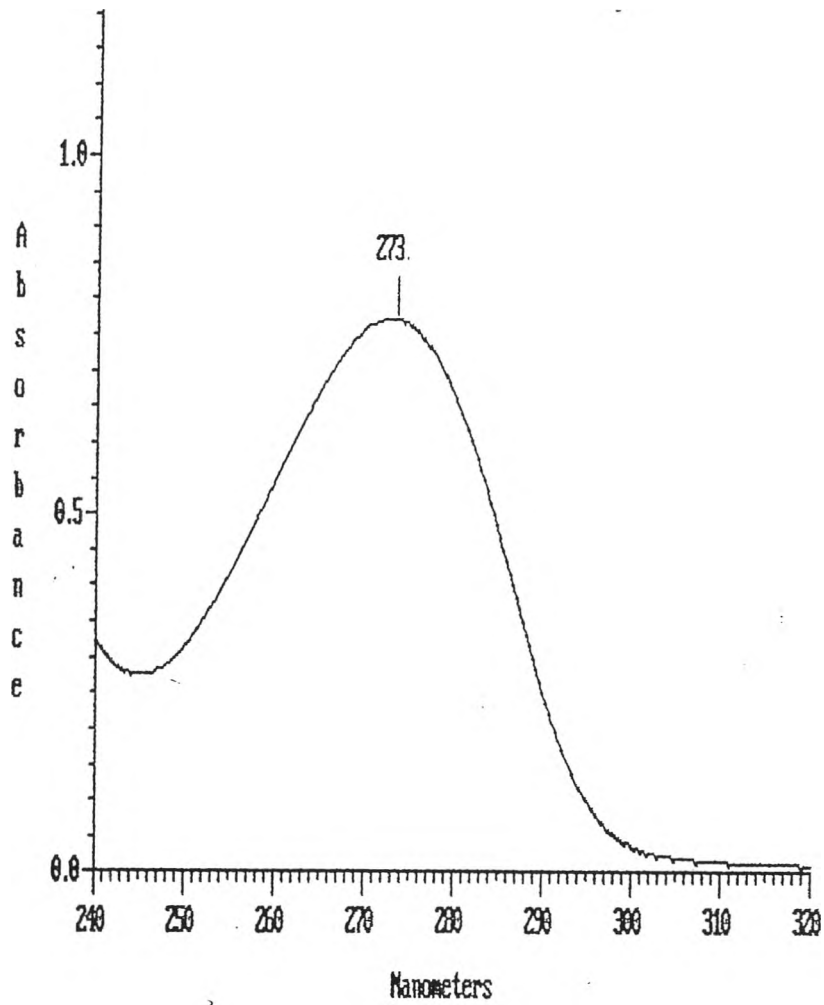
การแสดงผลของ IR สเปกตรัม ดังรูปที่ 22 และตารางที่ 10 และ ¹H-NMR สเปกตรัมดังรูปที่ 23 และ 24 และค่า เคมีลึกลับ (δ) ในตารางที่ 11

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

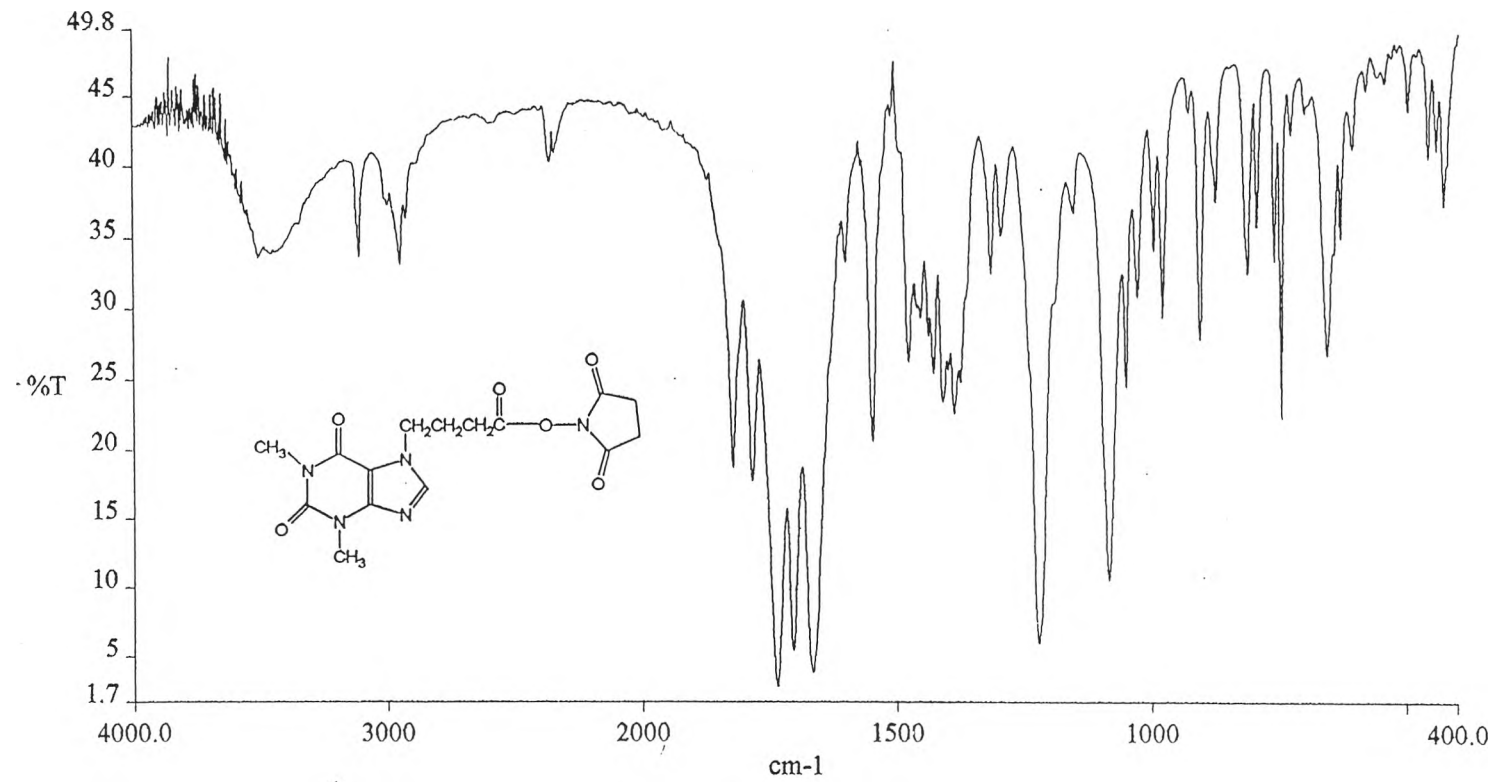
1 โมลของ BSA จับกับ NHS เอสเทอร์ของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine ประมาณ 11 โมล



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



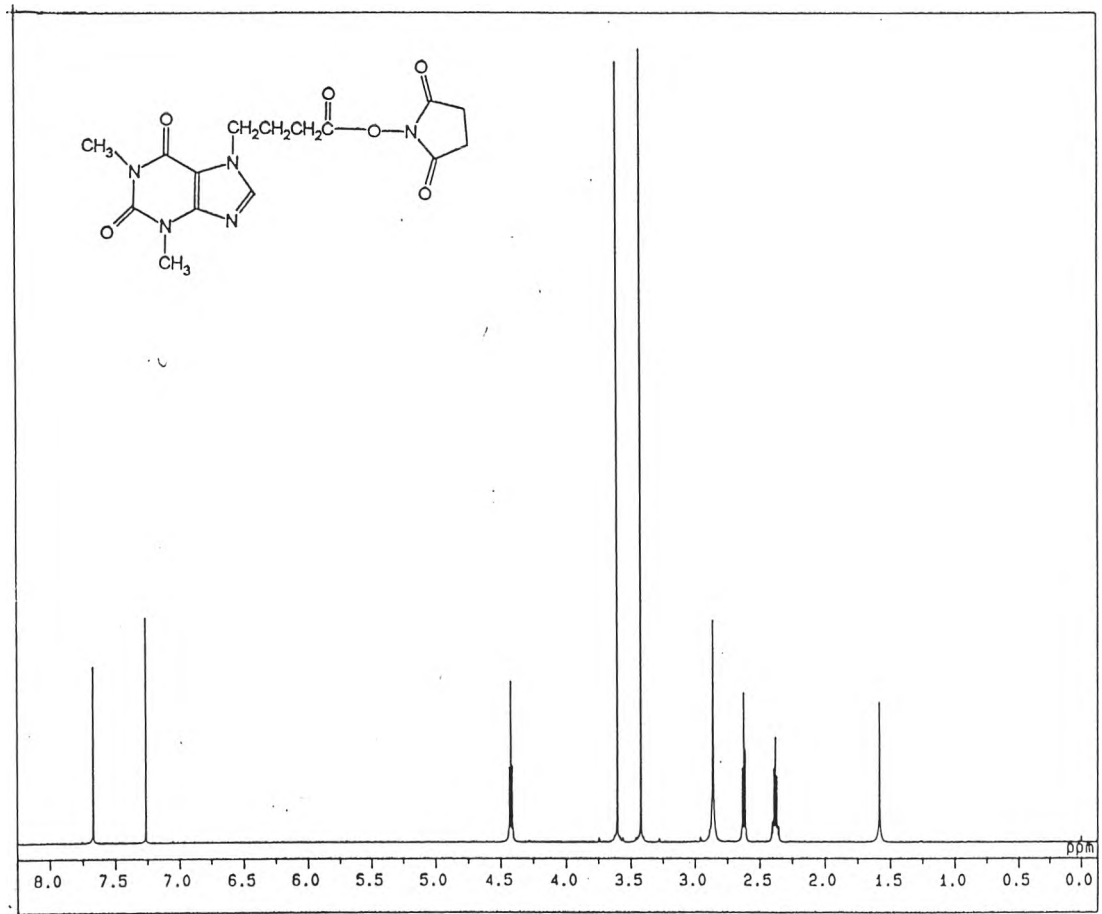
รูปที่ 21 UV สเปกตรัมของ NHS เอสเทอร์ ของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethyl xanthine (NHS เอสเทอร์ ของอนุพันธ์ ก.) ความเข้มข้น 33 มคก./มล.



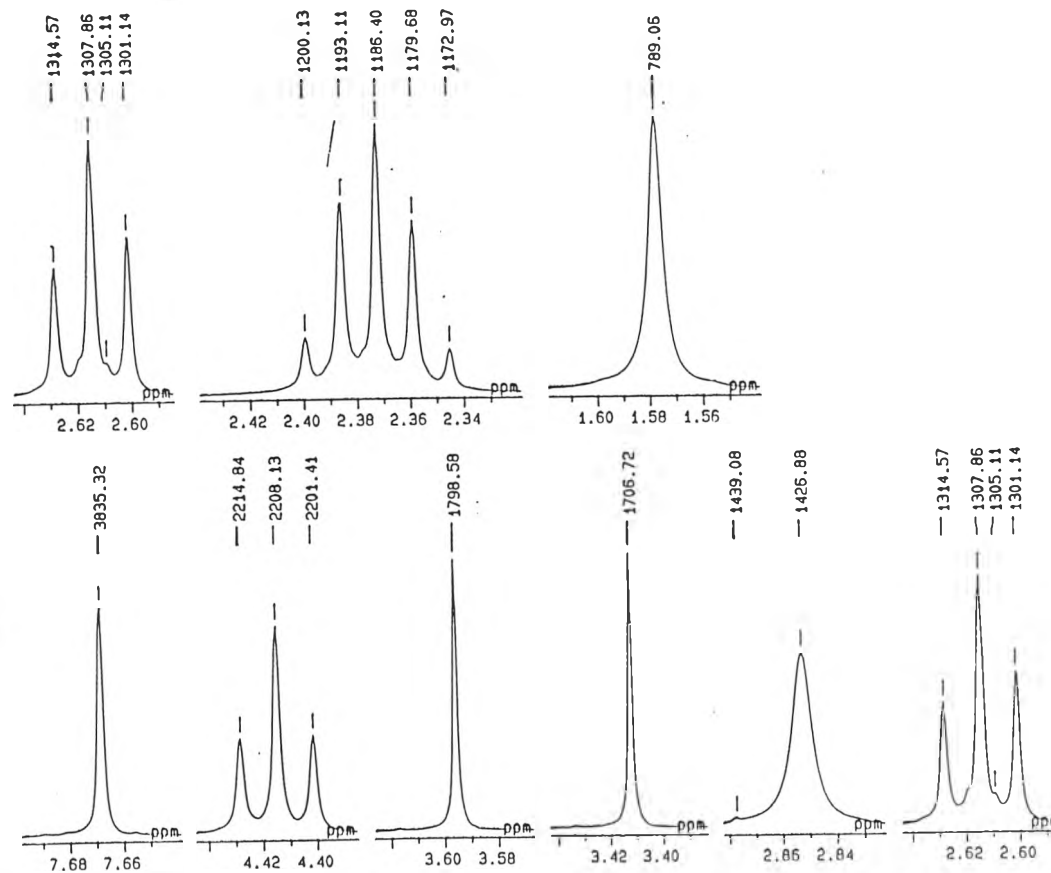
รูปที่ 22 IR สเปคตรัมของ NHS เอสเทอร์ ของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (NHS เอสเทอร์ ของอนุพันธ์ ก.)

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



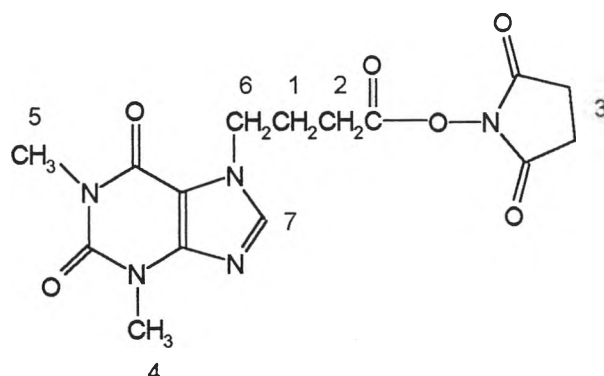
รูปที่ 23 ¹H-NMR สเปกตรัม NHS เอสเทอร์ ของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethyl xanthine (NHS เอสเทอร์ ของอนุพันธ์ ก.) ใน CDCl₃

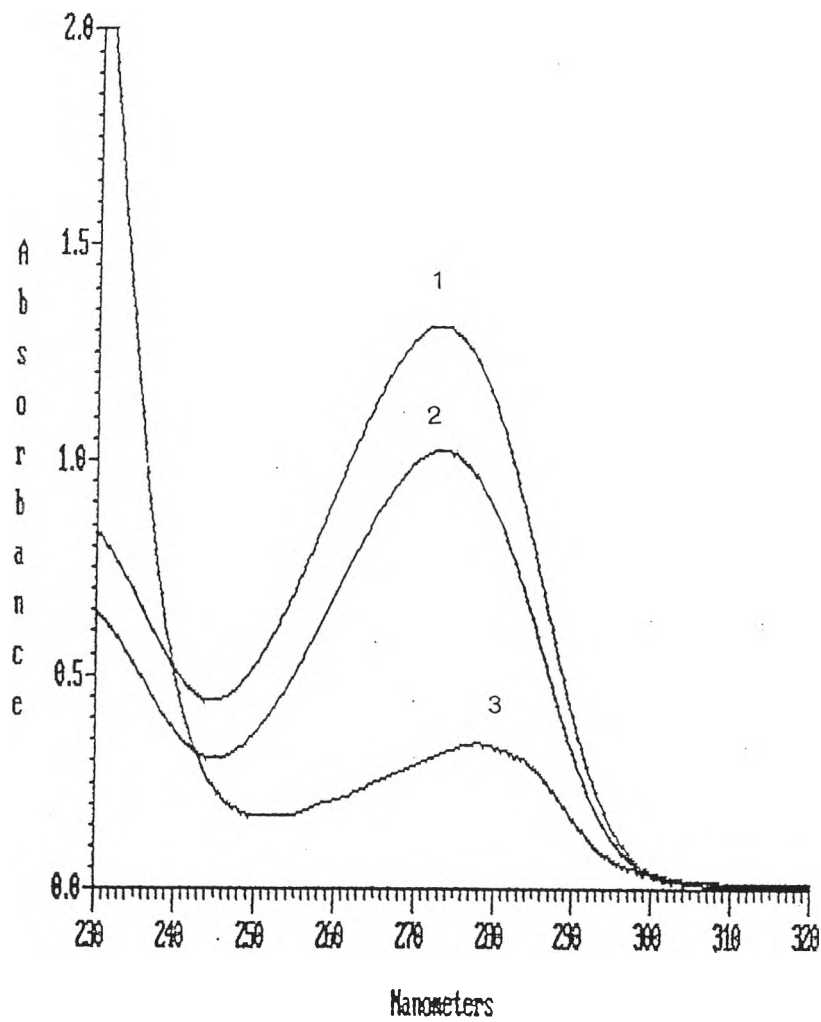


รูปที่ 24 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัม NHS เอสเทอร์ ของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethyl xanthine (NHS เอสเทอร์ ของอนุพันธ์ ก.) ใน CDCl_3
(ขยายสเกลจาก 1.55-7.69 ppm)

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. 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.)

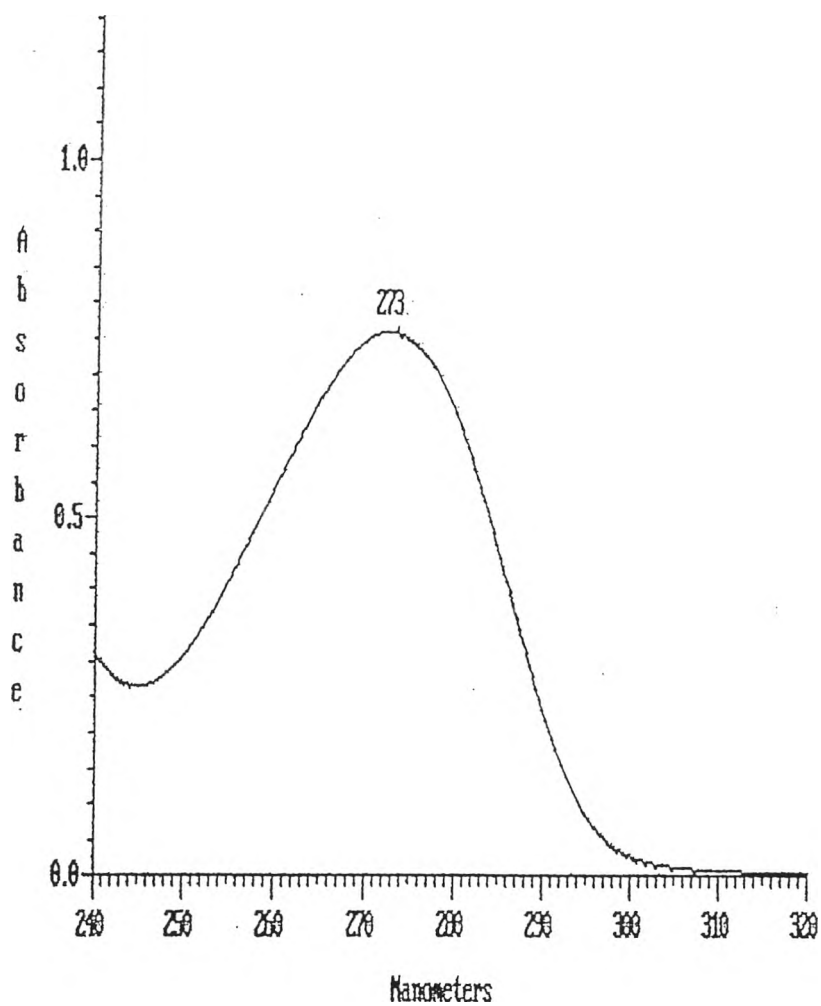
การเตรียมอิมมูโนเจน ข. เช่นเดียวกับ วิธีการเตรียมอิมมูโนเจน ก. โดยการสังเคราะห์อนุพันธ์ ข. ในรูป NHS เอสเทอร์ ก่อน จะได้ NHS เอสเทอร์ สำหรับอนุพันธ์ ข. เป็นผงสีขาว คิดเป็น 34.56% ของสารตั้งต้น มีจุดหลอมเหลว 164-165°C มีการดูดกลืนแสงสูงสุดของ UV สเปกตรัมที่ความยาวคลื่นที่ 273 nm เช่นเดียวกับธิโอฟิลีน 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

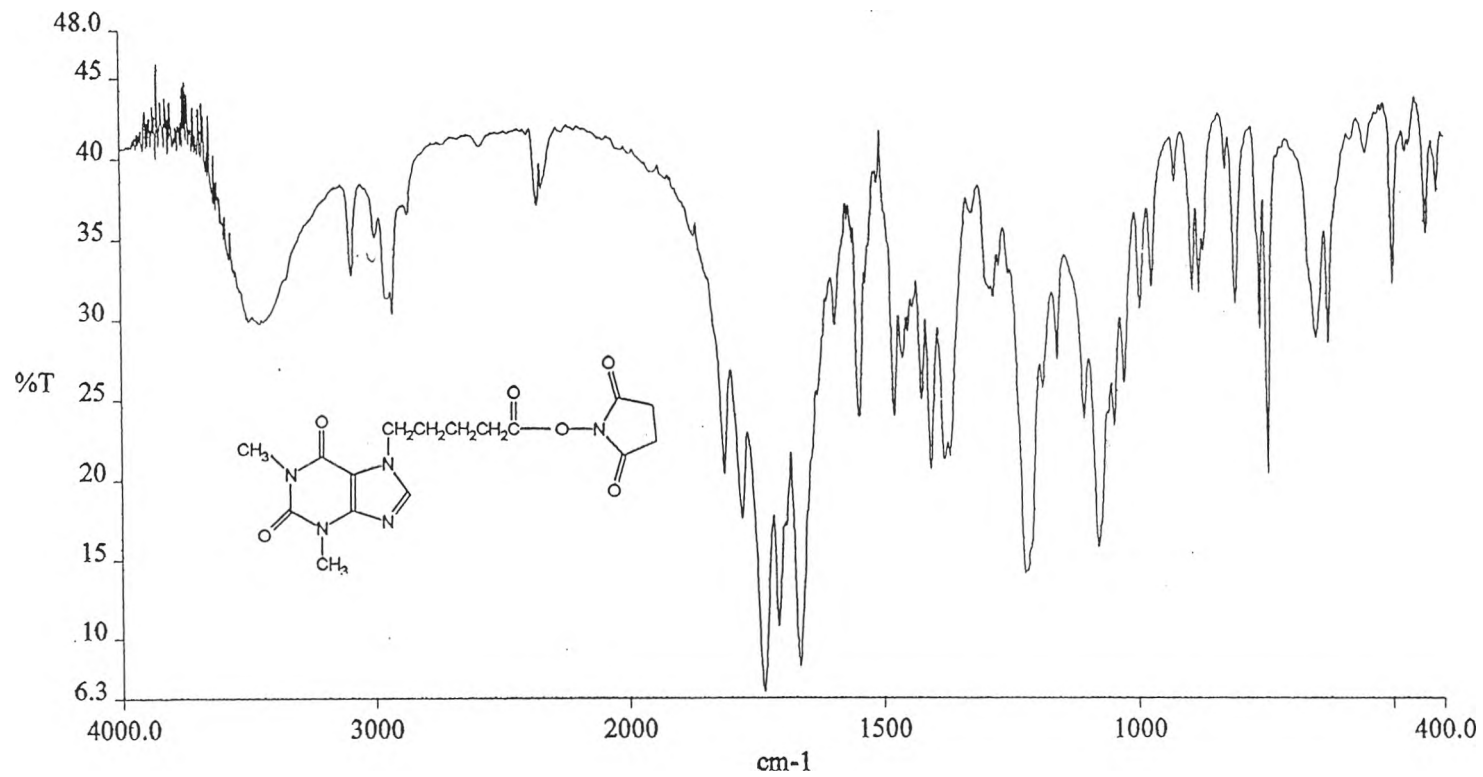
ผลการจับกันระหว่าง NHS เอสเทอร์ ของอนุพันธ์ ข. กับ BSA ได้อิมมูโนเจน ข. เป็นผงสีขาว มีการดูดกลืนแสงสูงสุดในช่วง UV ต่างจาก NHS เอสเทอร์ ของ 7-(4-

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



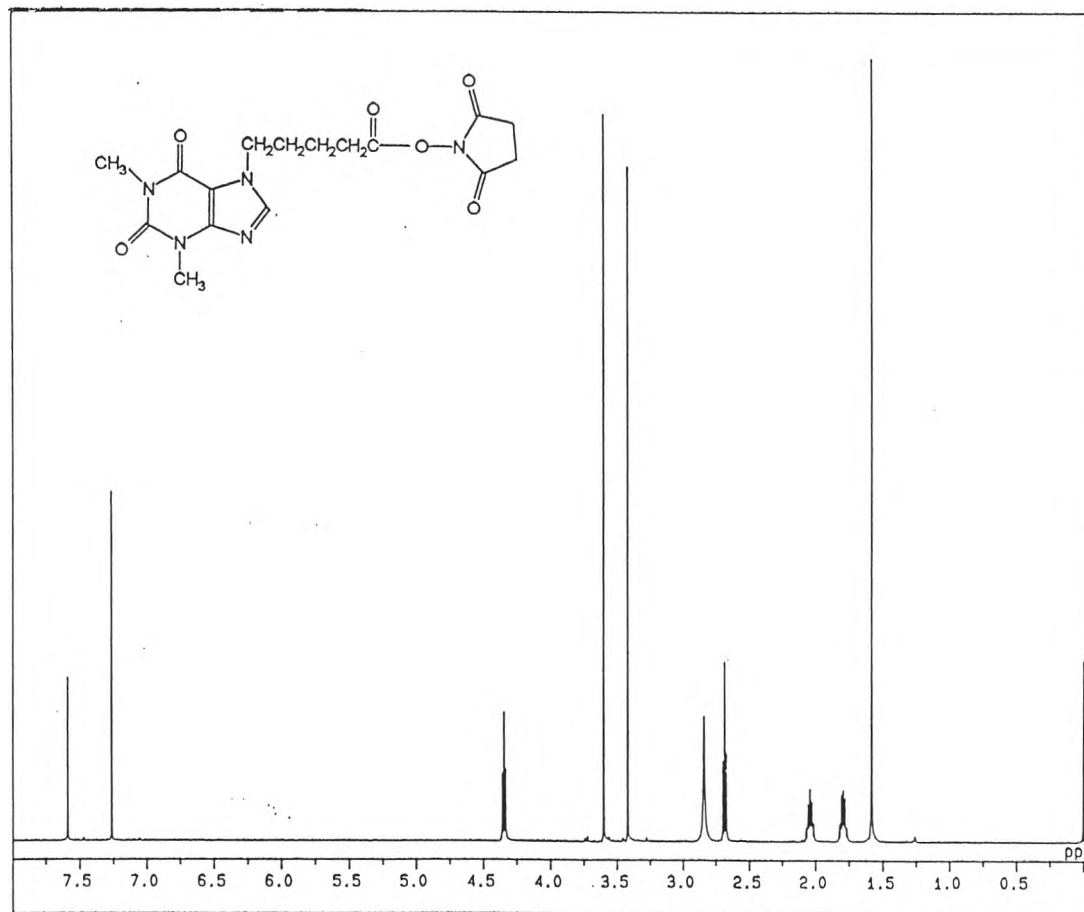
รูปที่ 26 UV สเปคตรัมของ NHS เอสเทอร์ ของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethyl xanthine (NHS เอสเทอร์ ของอนุพันธ์ ข.) ความเข้มข้น 33 มคก./มล.



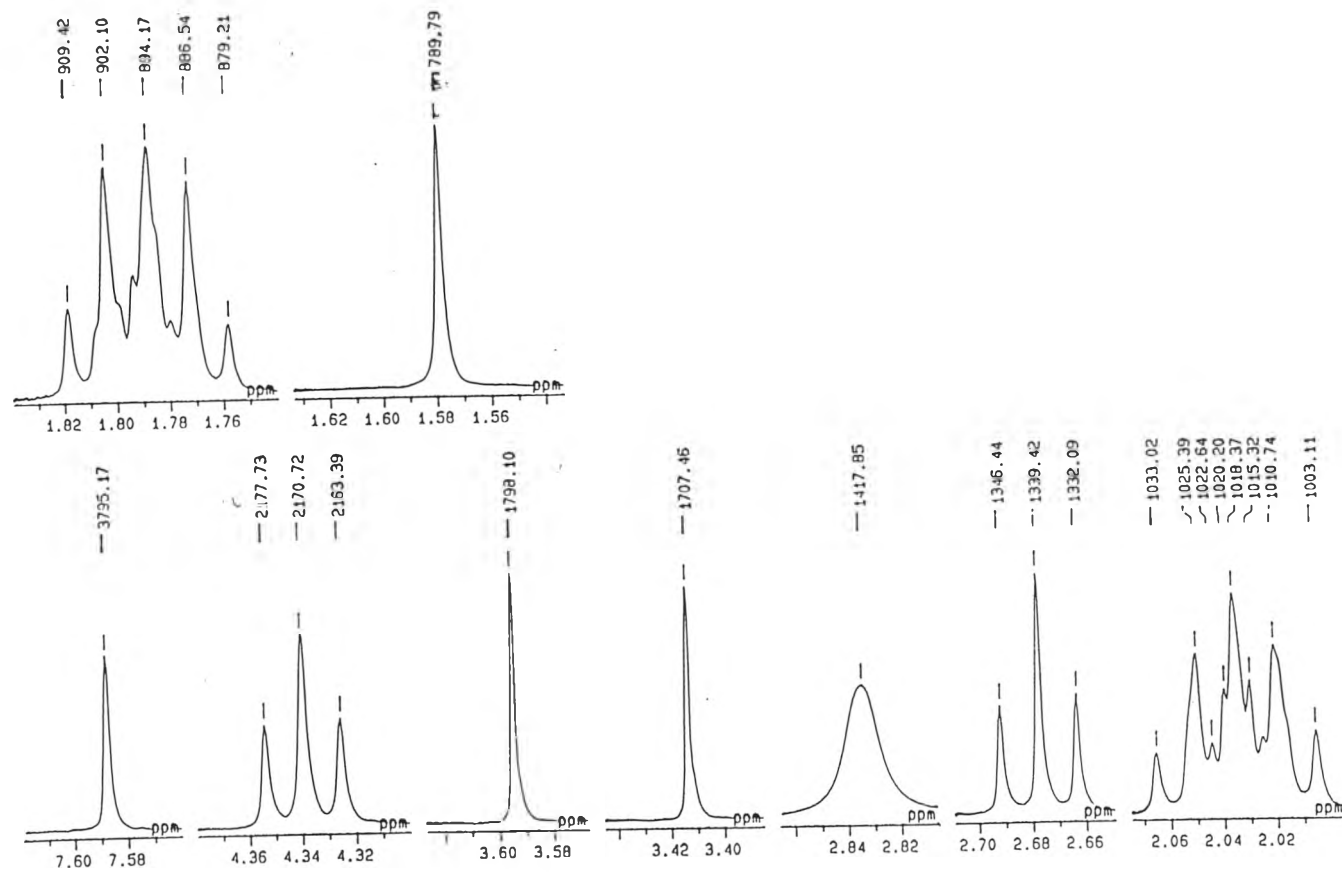
รูปที่ 27 IR สเปกตรัมของ NHS เอสเทอร์ ของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (NHS เอสเทอร์ ของอนุพันธ์ ข.)

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



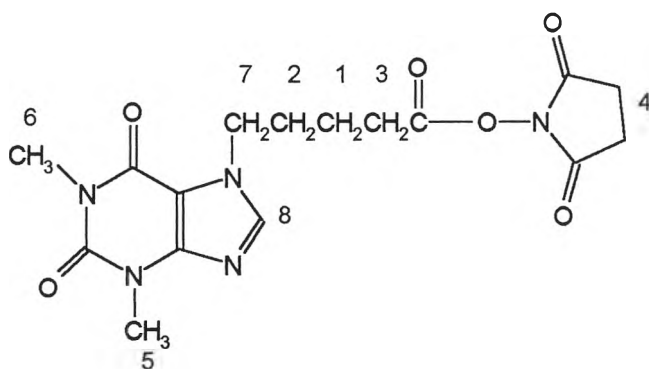
รูปที่ 28 ¹H-NMR สเปกตรัม NHS เอสเทอร์ ของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethyl xanthine (NHS เอสเทอร์ ของอนุพันธ์ ข.) ใน CDCl₃

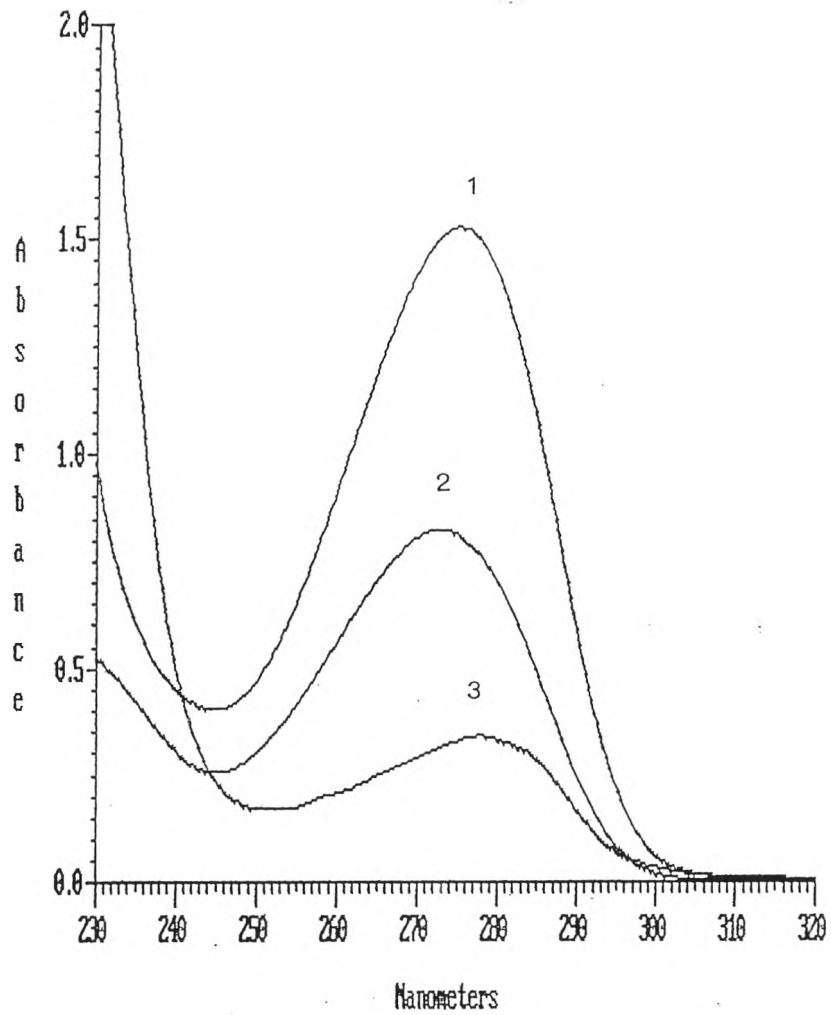


รูปที่ 29 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัม NHS เอสเทอร์ ของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethyl xanthine (NHS เอสเทอร์ ของอนุพันธ์ ข.) ใน CDCl_3
(ขยายสเกลจาก 1.54-7.62 ppm)

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), อนุพันธ์ ข. (2) และ BSA (3) ความเข้มข้น 0.286 มก./มล.

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

ตารางที่ 15 การหาอัตราส่วนจำนวนโมลของอนุพันธ์ ข. ที่ติดบน BSA ของ
อิมมูโนเจน ข.

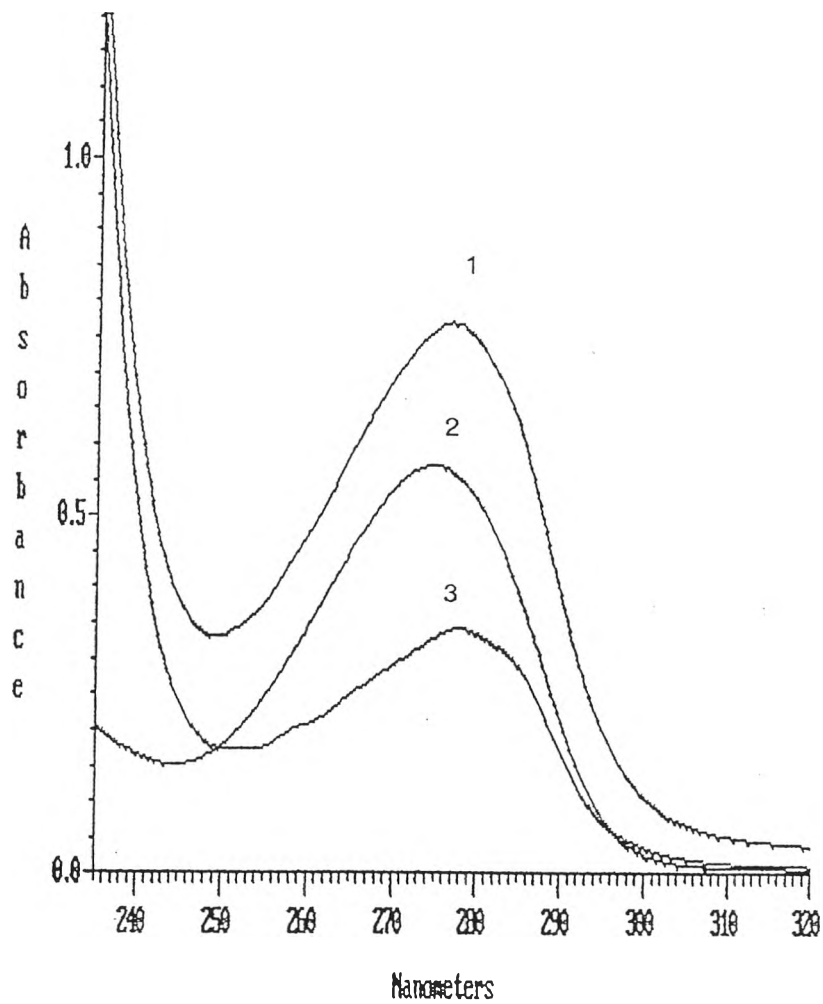
ความเข้มข้น (มก./มล.)	Abs. 275 nm ของอิมมูโนเจน ข.	Abs. 275 nm ของ BSA	Abs. 275 nm ของอนุพันธ์ ข.	จำนวนโมลของ อนุพันธ์ ข. ต่อ BSA
0.286	0.515	0.141	0.374	10.15
0.286	0.510	0.140	0.370	10.32
0.286	0.514	0.145	0.369	10.29
ค่าเฉลี่ย				10.25±0.09

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.

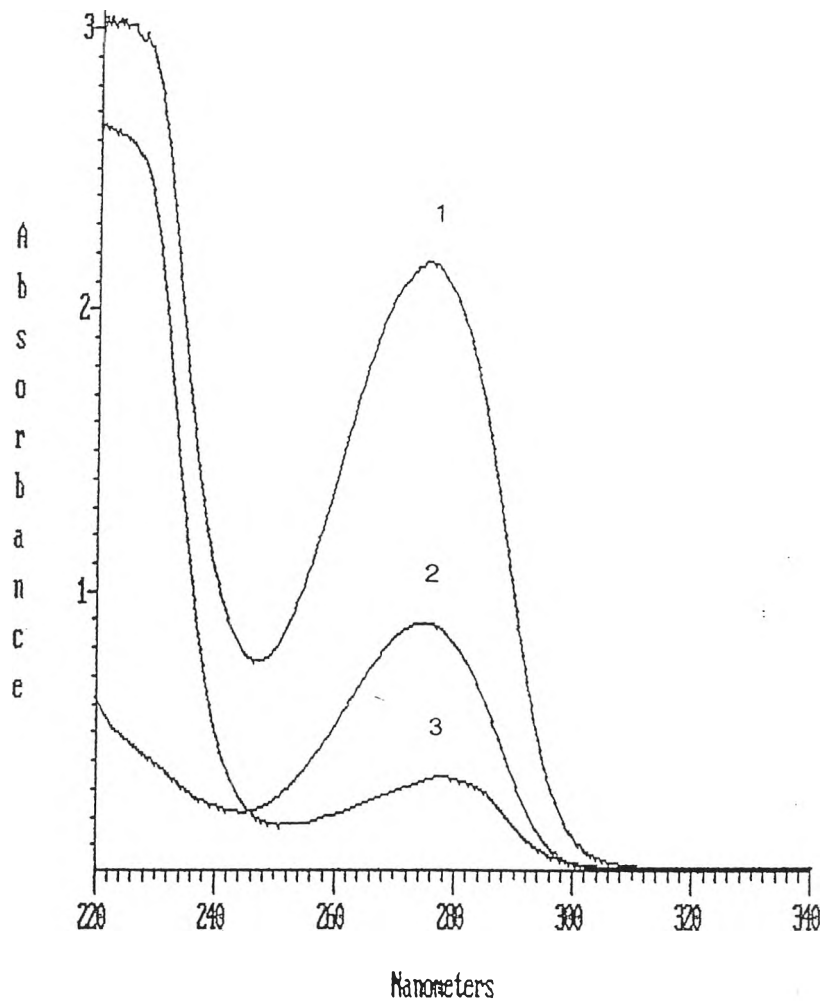
ความเข้มข้น (มก./มล.)	Abs. 275 nm ของอิมมูโนเจน ค.	Abs. 275 nm ของ BSA	Abs. 275 nm ของอนุพันธ์ ค.	จำนวนโมลของ อนุพันธ์ ค. ต่อ BSA
0.500	1.175	0.304	0.871	11.85
0.500	1.158	0.303	0.855	11.65
0.500	1.168	0.302	0.866	11.79
ค่าเฉลี่ย				11.76±0.01

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

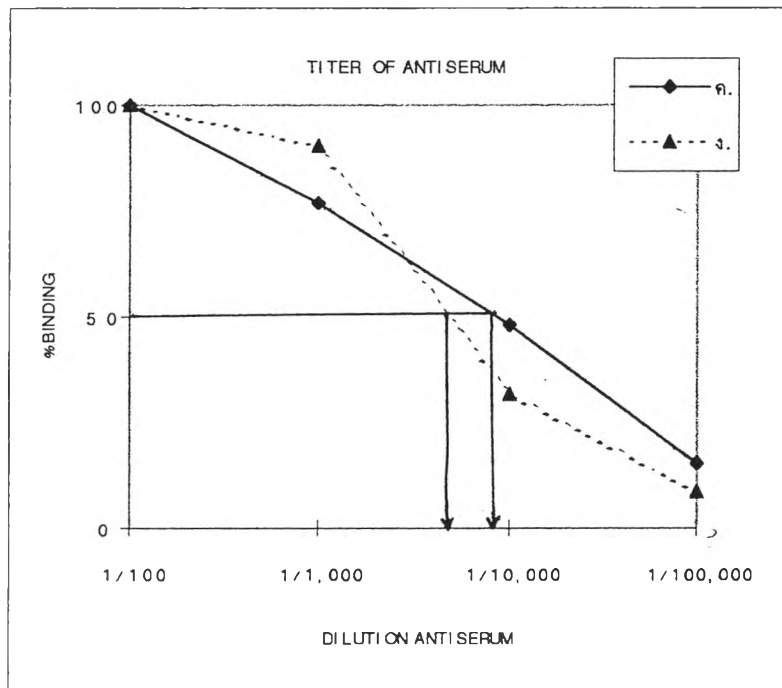
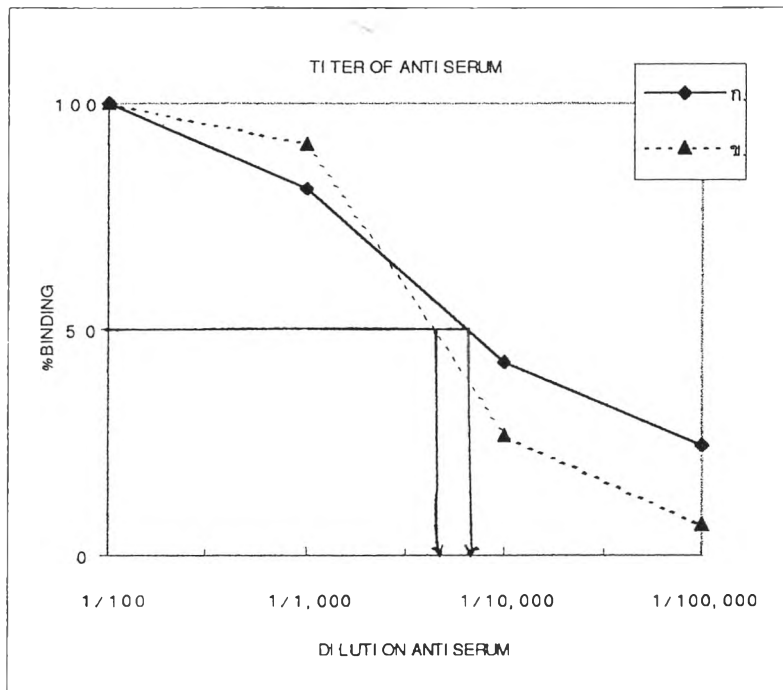
ความเข้มข้นของอนุพันธ์ ง. ในอิมมูโนเจน = $\frac{\text{absorbance ของอนุพันธ์ ง.}}{\text{specific absorbance (k)}}$

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.

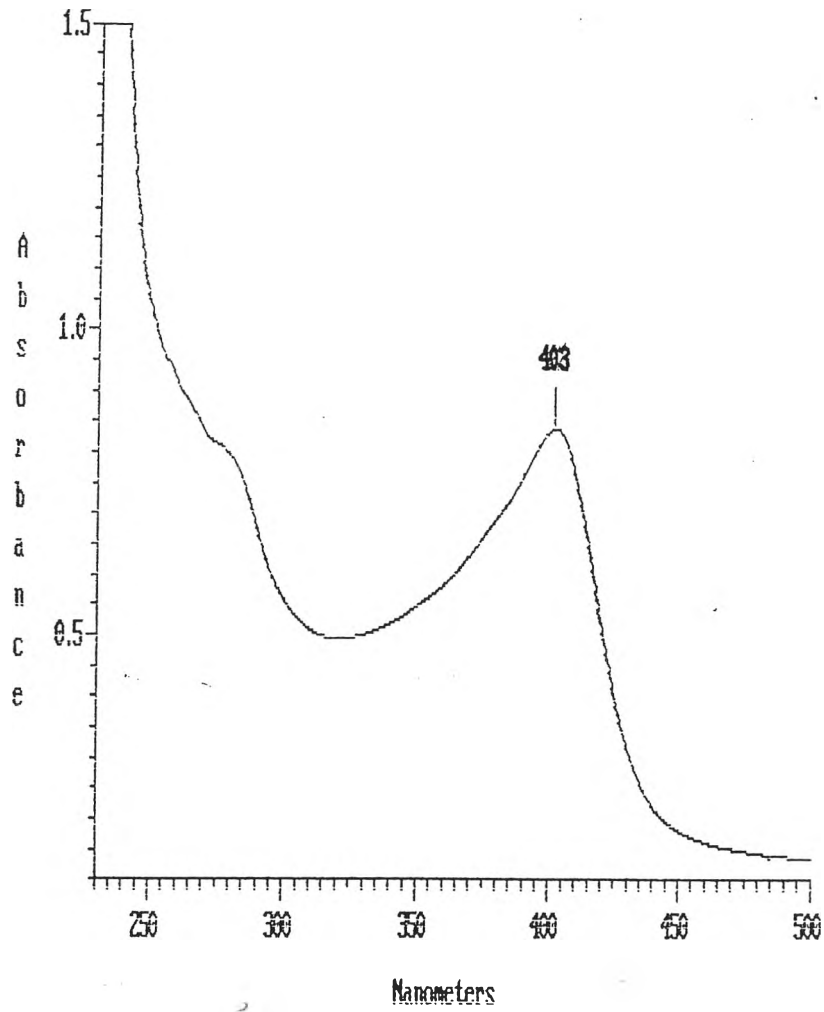
4. การติดฉลากอิโอฟิลลีนด้วยเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดส

4.1 การเตรียมเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดสเพื่อการติดฉลาก

เอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ถูกเพิ่มกลุ่มอะมิโนจะยังคงคุณสมบัติของเอ็นไซม์ โดยมีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาลค่อนข้างเบา 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

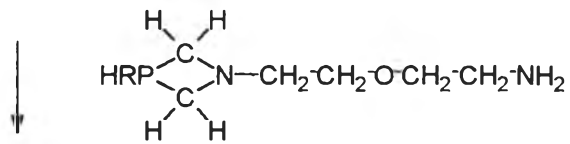
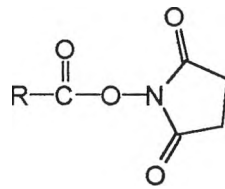
ความเข้มข้น (M)	Absorbance ที่ ความยาวคลื่น 354 nm	จำนวนหมู่ฟังก์ชันอะมิโน ต่อ 1 โมลของเอ็นไซม์
2.5×10^{-5}	0.756	14.22
2.5×10^{-5}	0.836	15.72
2.5×10^{-5}	0.736	13.84
ค่าเฉลี่ย		14.59 ± 0.99



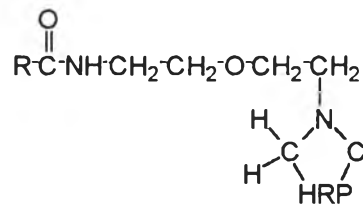
รูปที่ 34 UV สเปกตรัมของ aminated HRP 3.00 มก./มล.

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

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

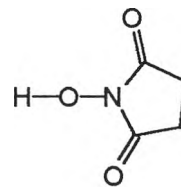


aminated HRP

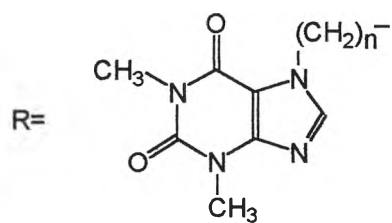


HRP labeled theophylline

+



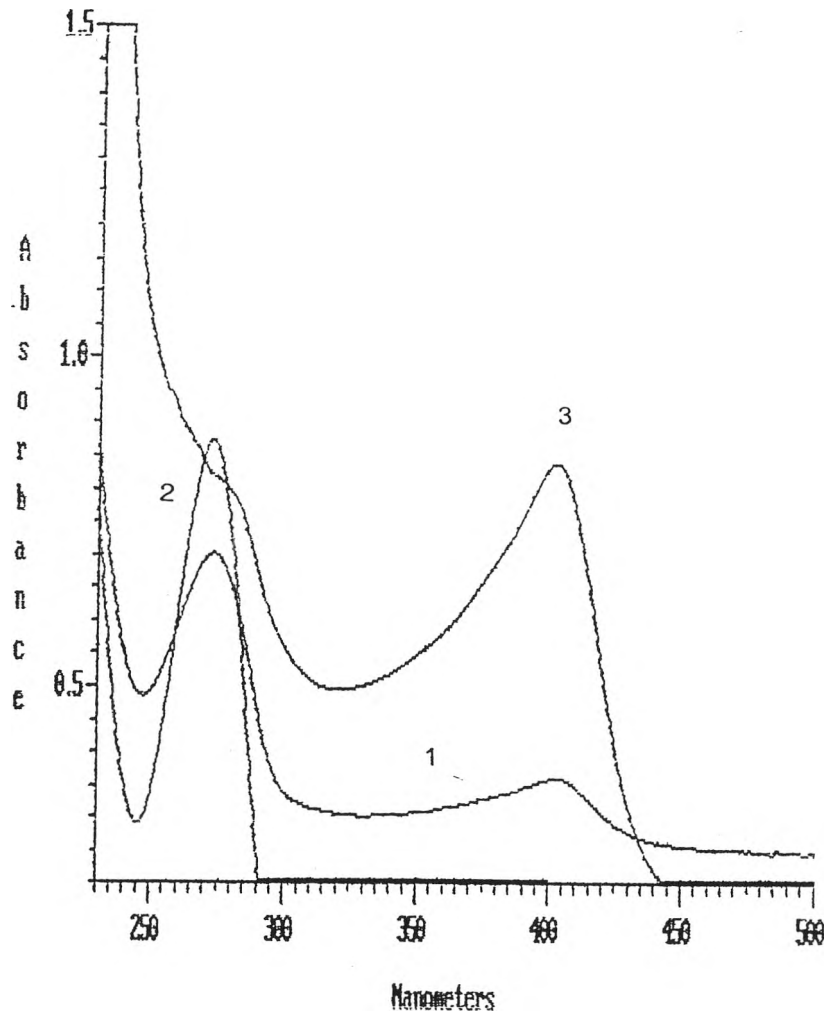
NHS



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.

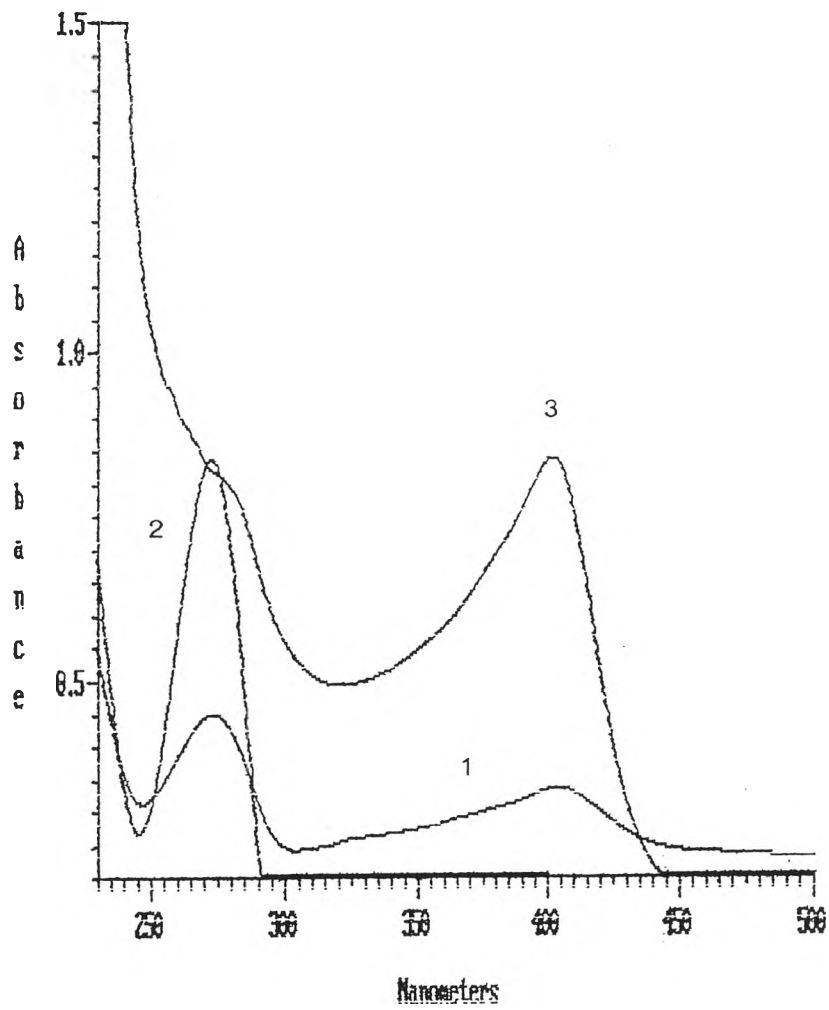
3 = aminated HRP

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 ข. ที่ติดฉลากเอ็นไซม์ (1), อนุพันธ์ ข. (2) และเอ็นไซม์ (3) ความเข้มข้น 3.00 มก./มล.

1 = สารติดฉลาก ข.

2 = อนุพันธ์ ข.

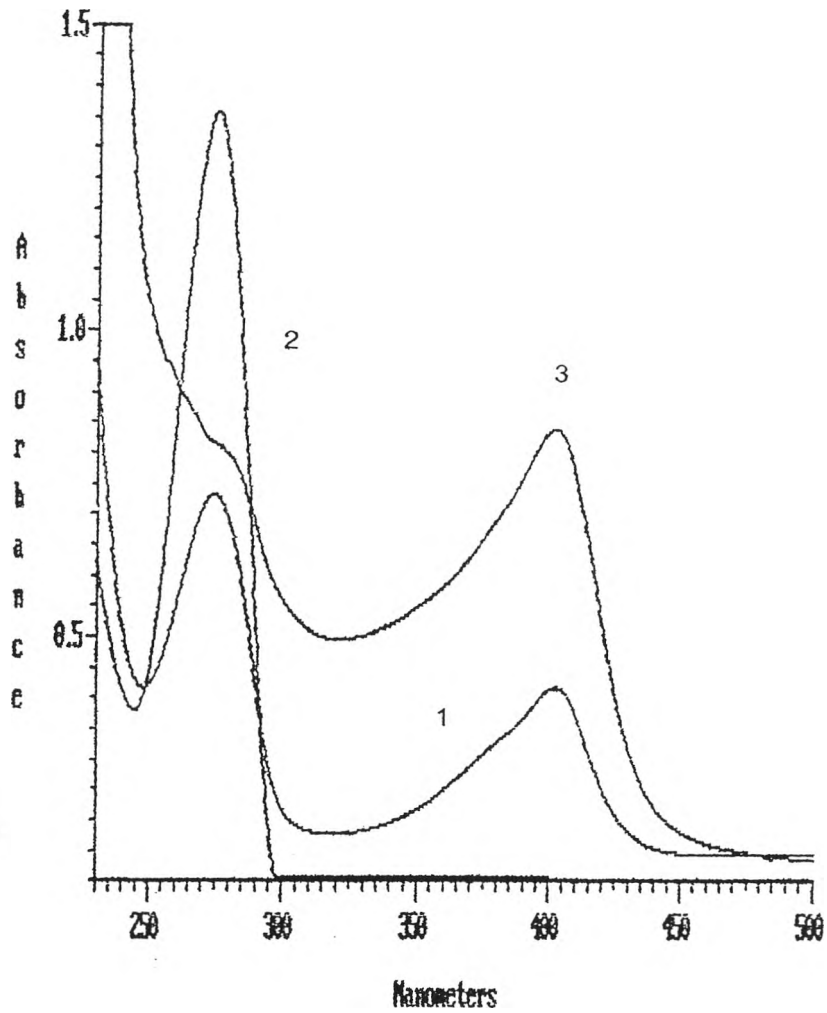
3 = aminated HRP

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

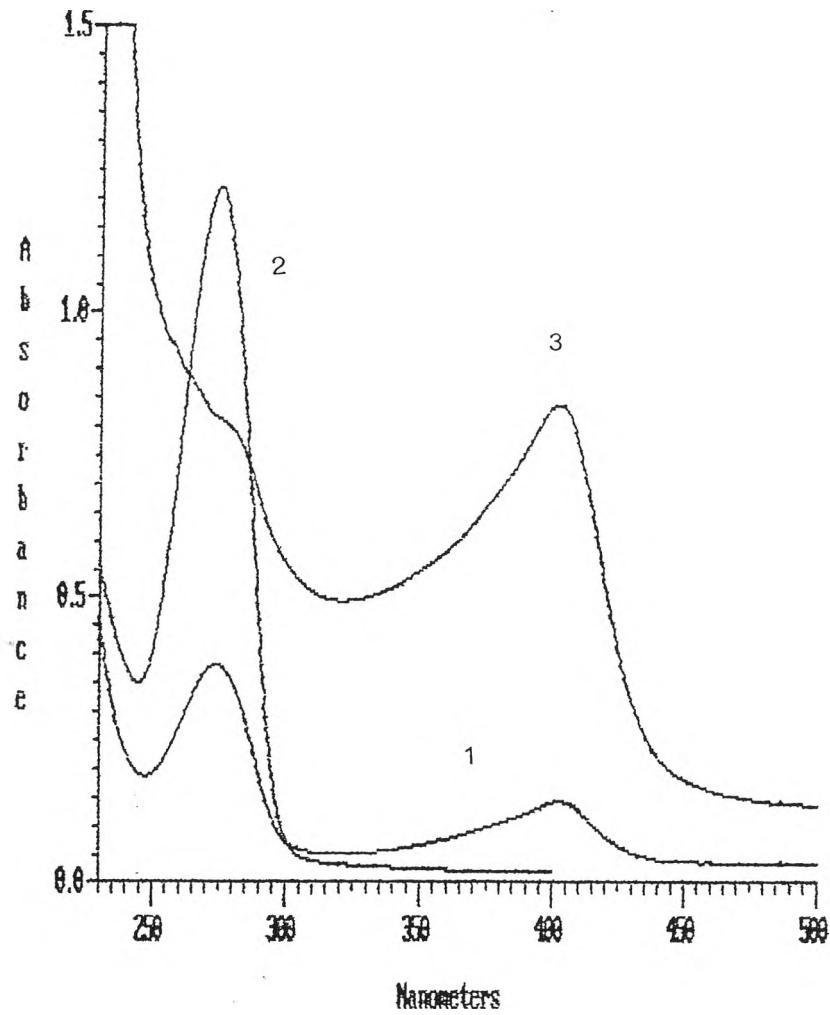
4.5 การติดฉลาก 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine กับเอ็นไซม์ เปอร์ออกซิเดส (สารติดฉลาก ง.)

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

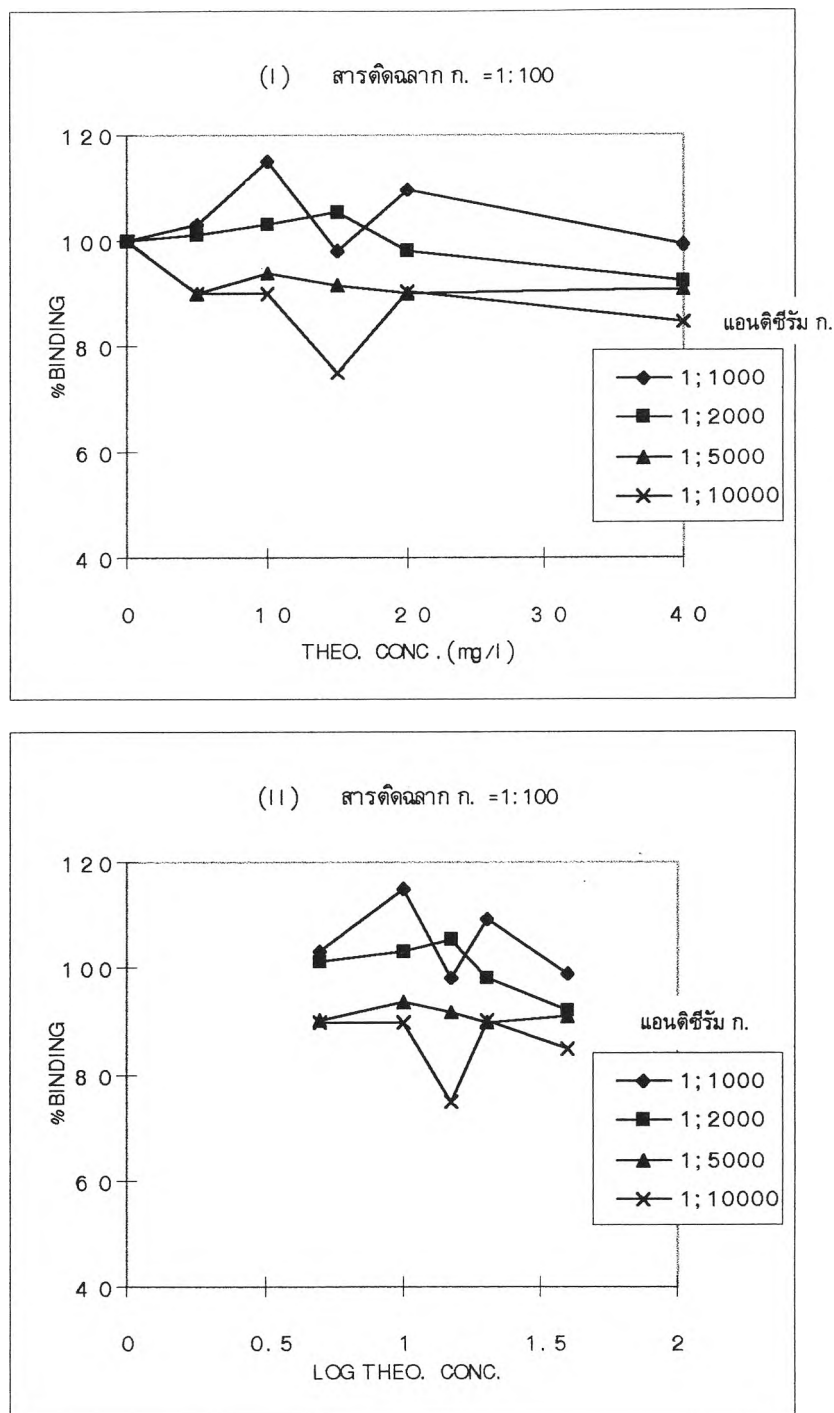
$$\% \text{การจับ} = (B/B_0) \times 100$$

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

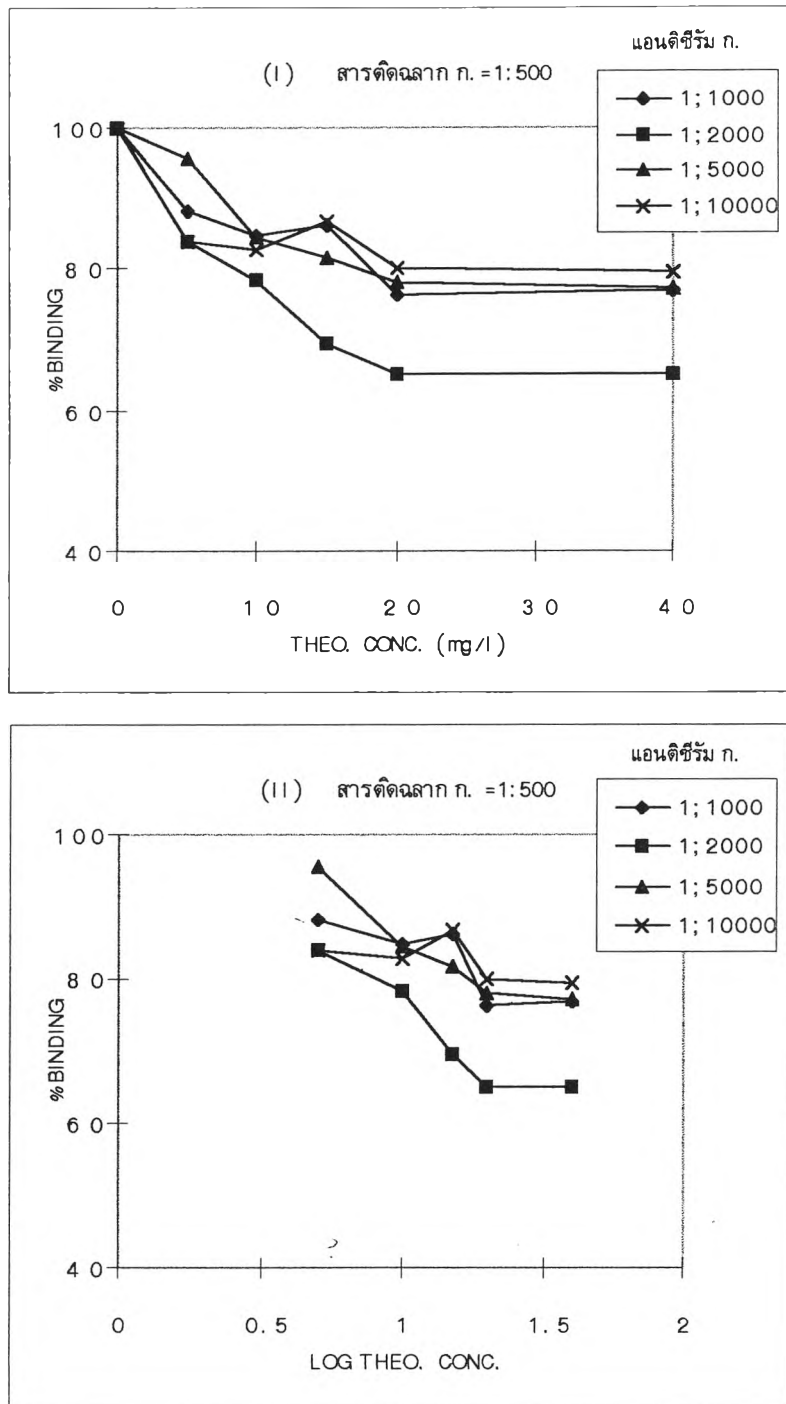
ดังนั้นสภาวะที่ได้นี้จะถูกนำไปใช้ในการศึกษาผลของเฮเทอโรโลกส์คอมบิเนชันต่อไป



รูปที่ 40 ผลของปฏิกิริยาแย่งที่ระหว่างสารติดฉลาก ก. อัตราส่วนความเจือจาง 1:100 กับ สารละลายมาตรฐานริโอฟิลีน

กราฟ I direct plot

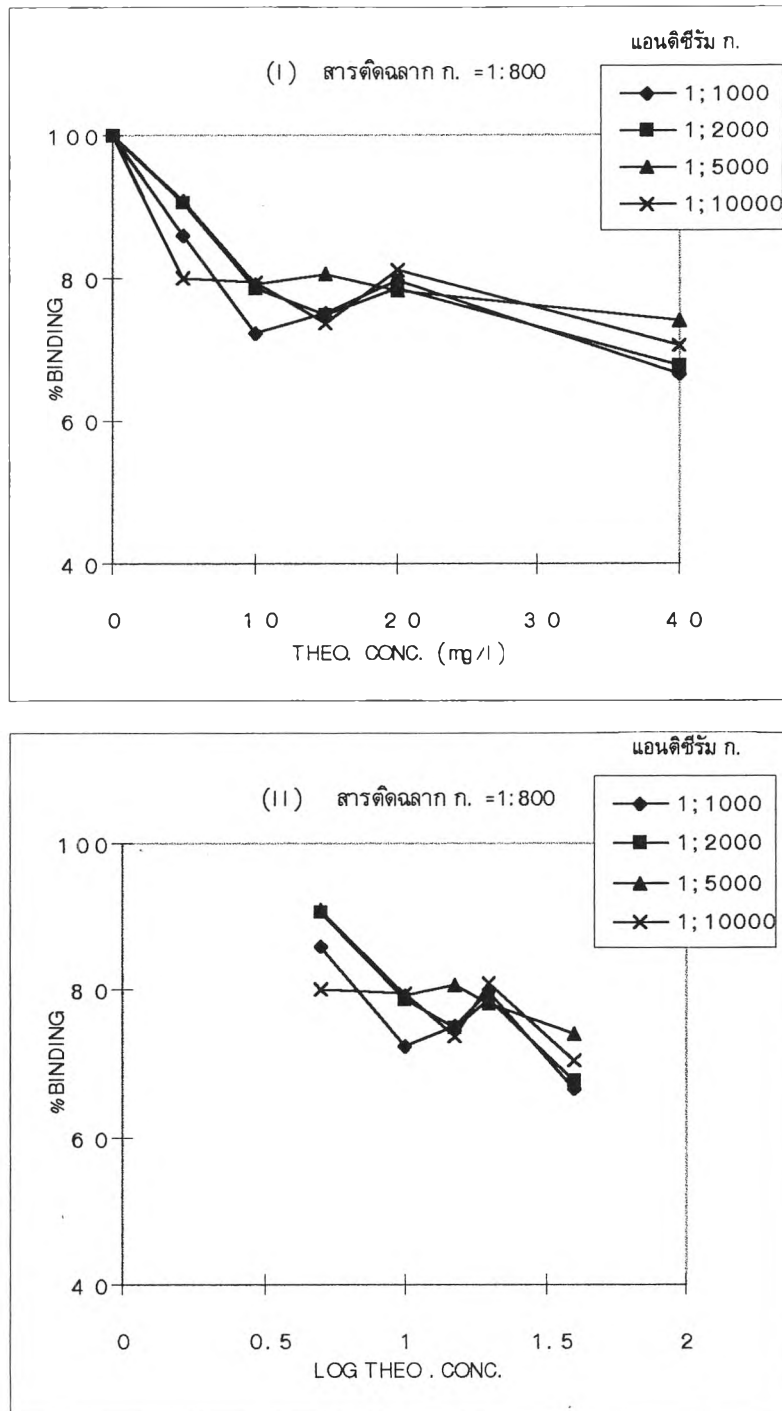
กราฟ II logic plot



รูปที่ 41 ผลของปฏิกิริยาแย่งที่ระหว่างสารติดฉลาก ก. อัตราส่วนความเจือจาง 1:500 กับ สารละลายมาตรฐานธีโอฟิลลีน

กราฟ I direct plot

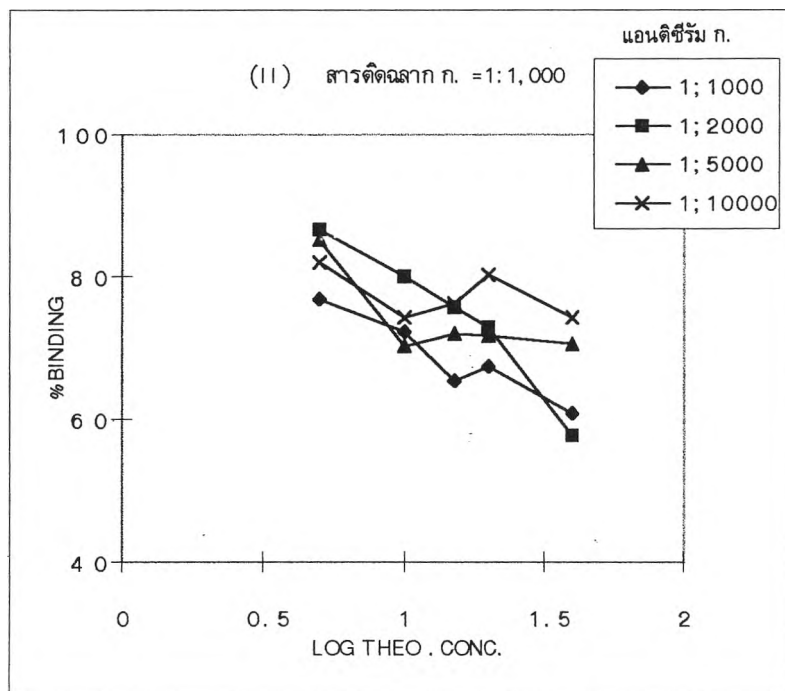
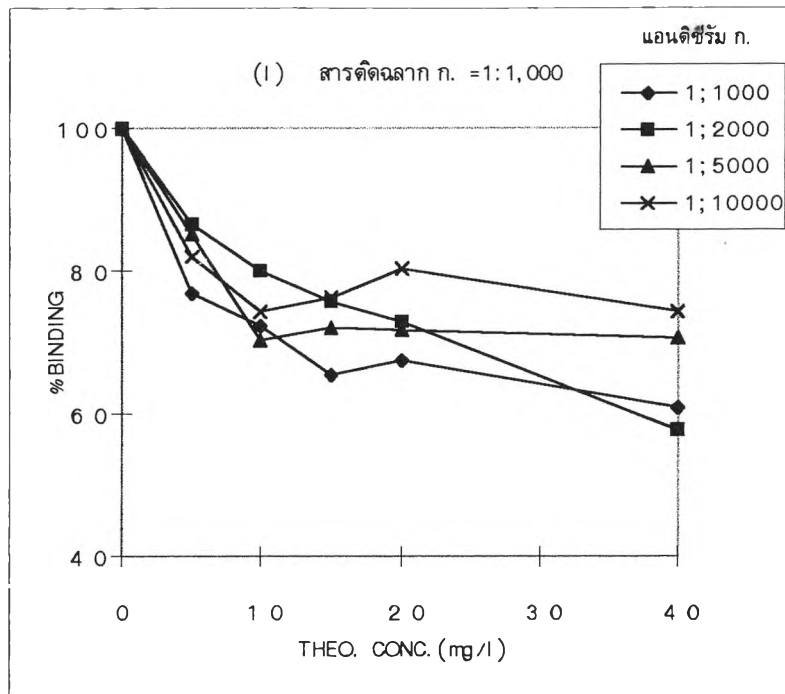
กราฟ II logic plot



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 สารละลายมาตรฐานอิโพลีน

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

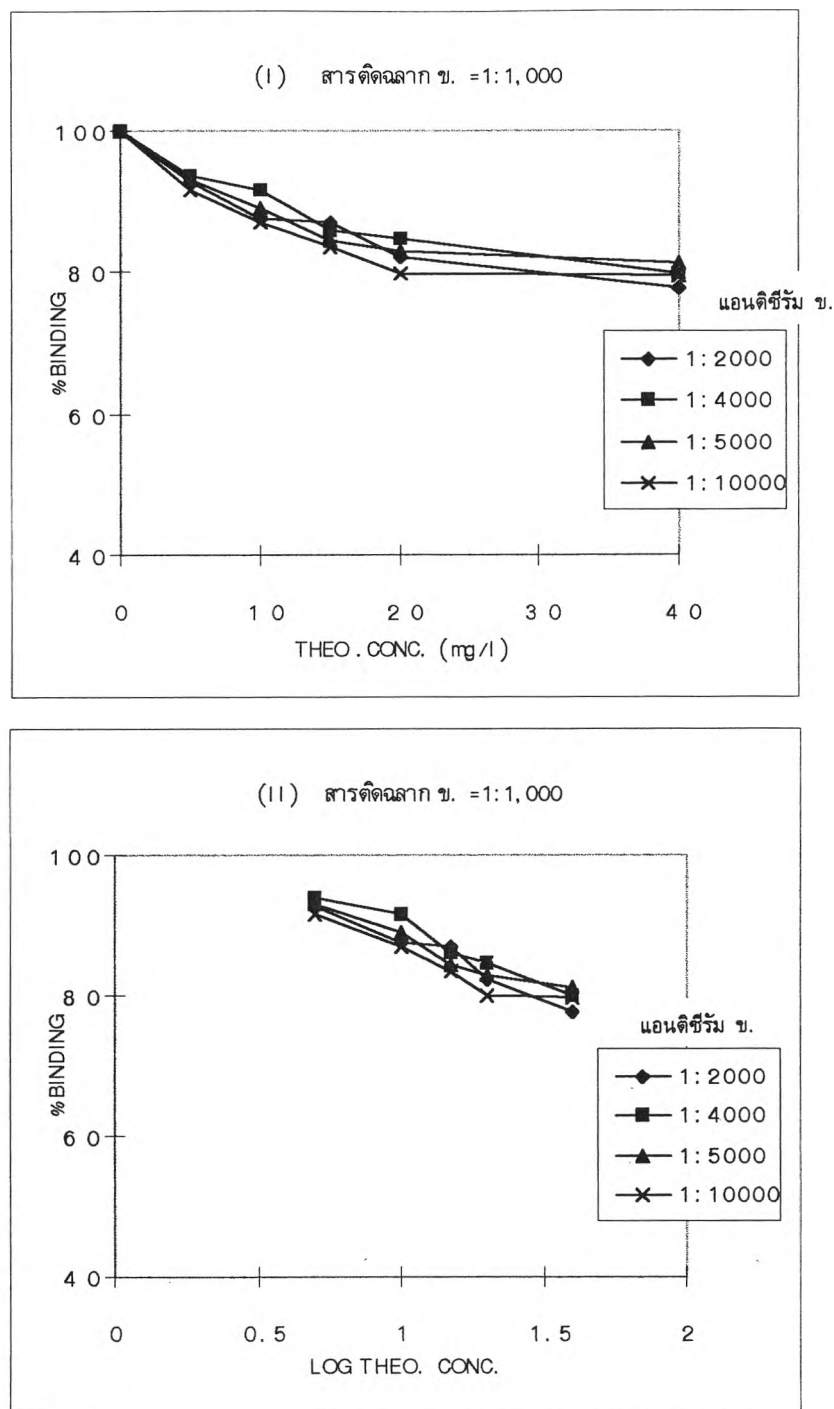
ผลการเกิดปฏิกิริยาการแย่งที่ระหว่าง สารติดฉลาก ข. กับธีโอฟิลลีนในการจับกับ แอนติบอดีที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยอิมมูโนเจนในรูปของอนุพันธ์ ข. (7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine ณ ค่าอัตราส่วนความเจือจางต่าง ๆ

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

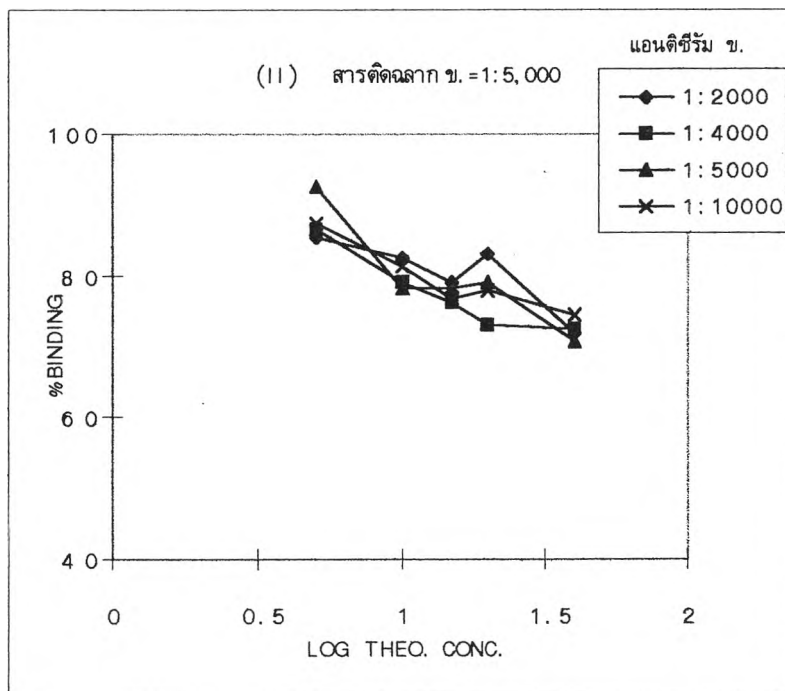
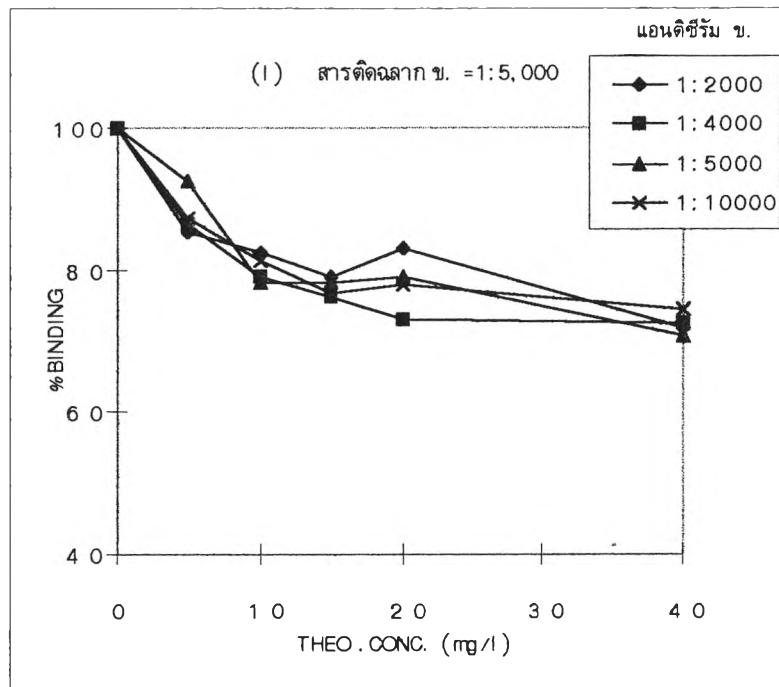
ดังนั้นสภาวะที่ได้นี้จะถูกนำไปใช้ในการศึกษาผลของเฮเทอโรโลกัสคอมบิเนชันต่อไป



รูปที่ 44 ผลของปฏิกิริยาแย่งที่ระหว่างสารติดตามลาก ข. อัตราส่วนความเจือจาง 1:1,000 กับ สารละลายมาตรฐาน วิโอฟิลลีน

กราฟ I direct plot

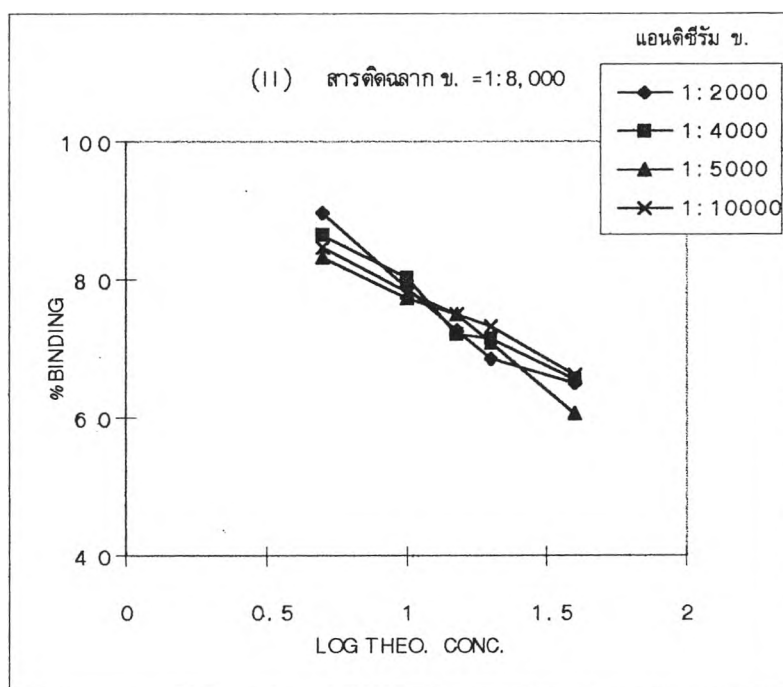
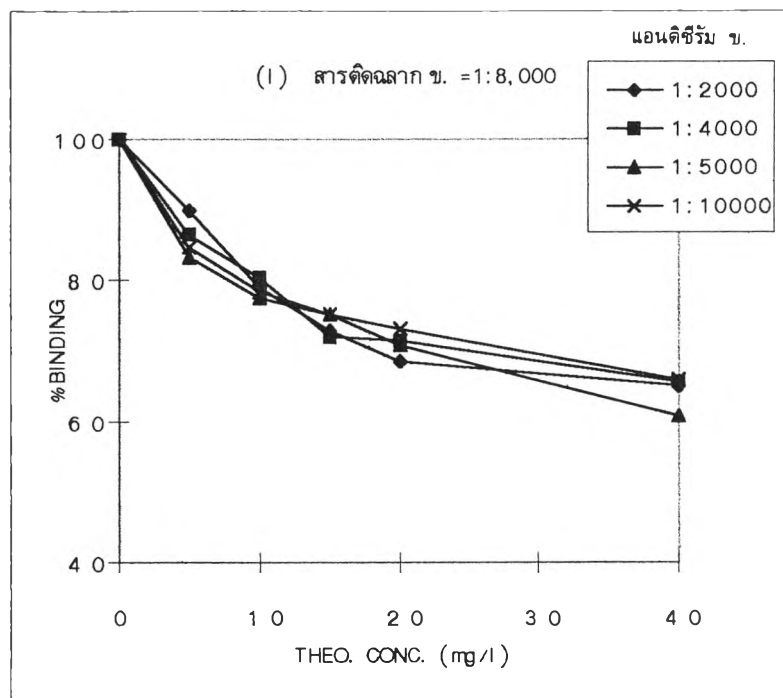
กราฟ II logic plot



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

กราฟ I direct plot

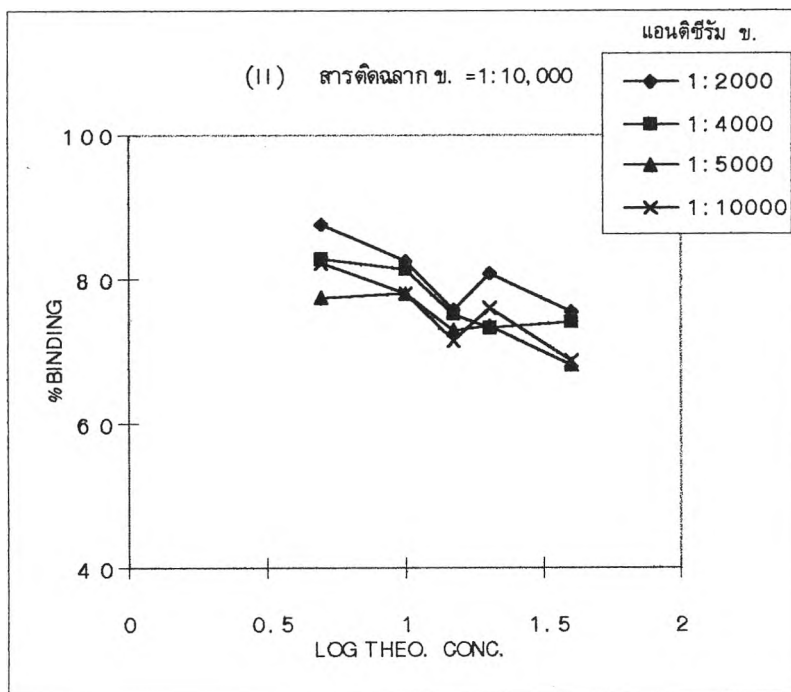
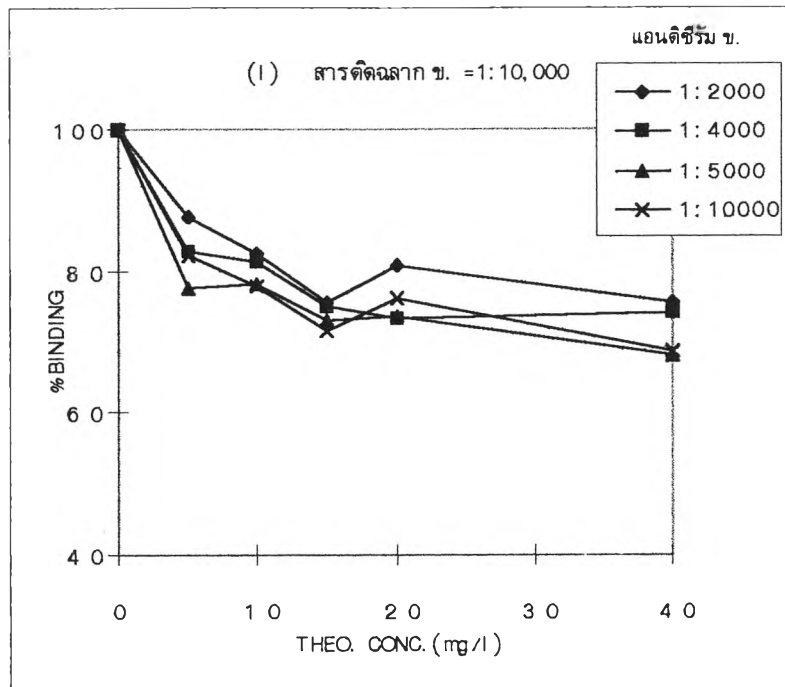
กราฟ II logic plot



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

กราฟ I direct plot

กราฟ II logic plot



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

กราฟ I direct plot

กราฟ II logic plot

ตารางที่ 25 แสดงผลการเกิดปฏิกิริยาการแย่งที่ระหว่างริโอฟิลีนติดฉลาก ข. และสารละลายมาตรฐานริโอฟิลีน

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

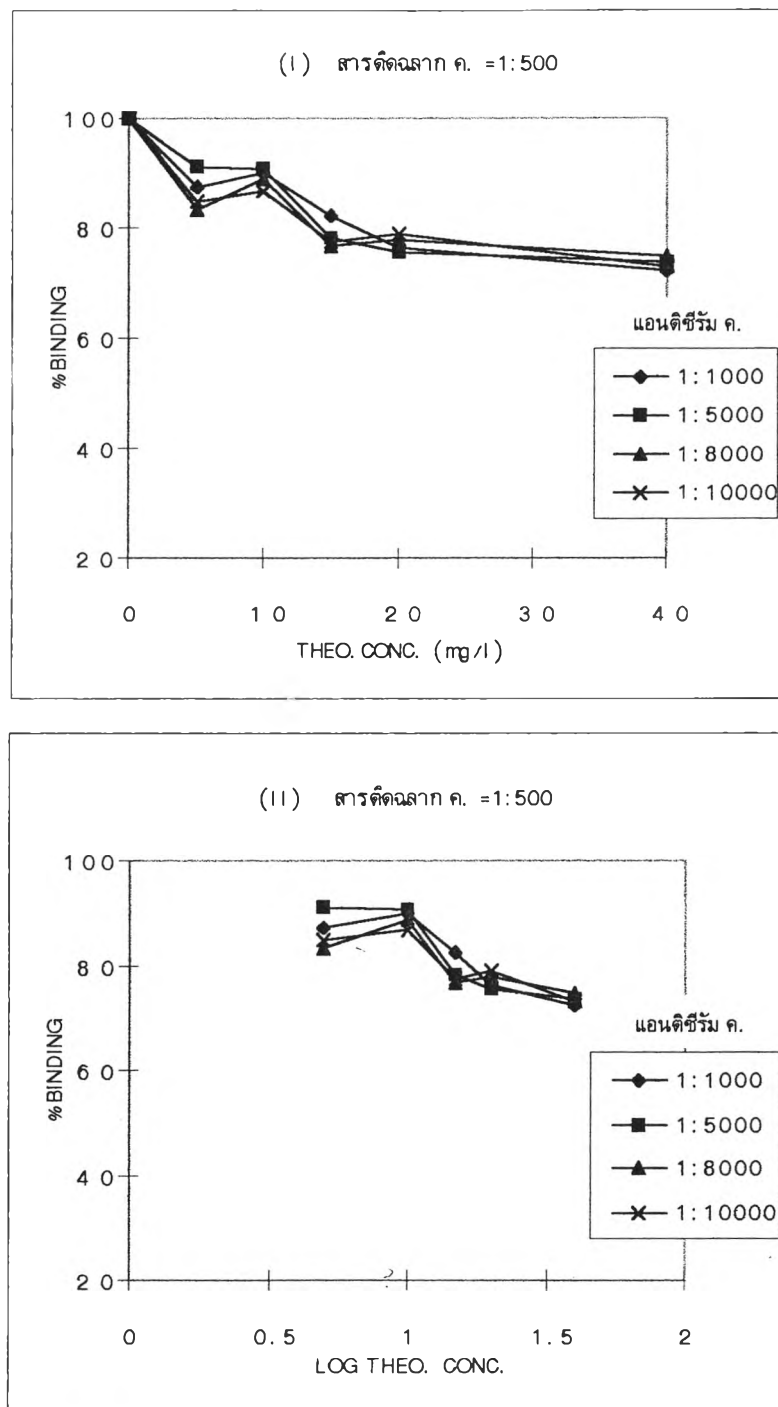
ผลการเกิดปฏิกิริยาการแย่งที่ระหว่าง สารติดฉลาก ค. กับธีโอฟิลลีนในการจับกับแอนติบอดีที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยอิมมูโนเจนในรูปของอนุพันธ์ ค. 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine ณ ค่าอัตราส่วนความเจือจางต่าง ๆ

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

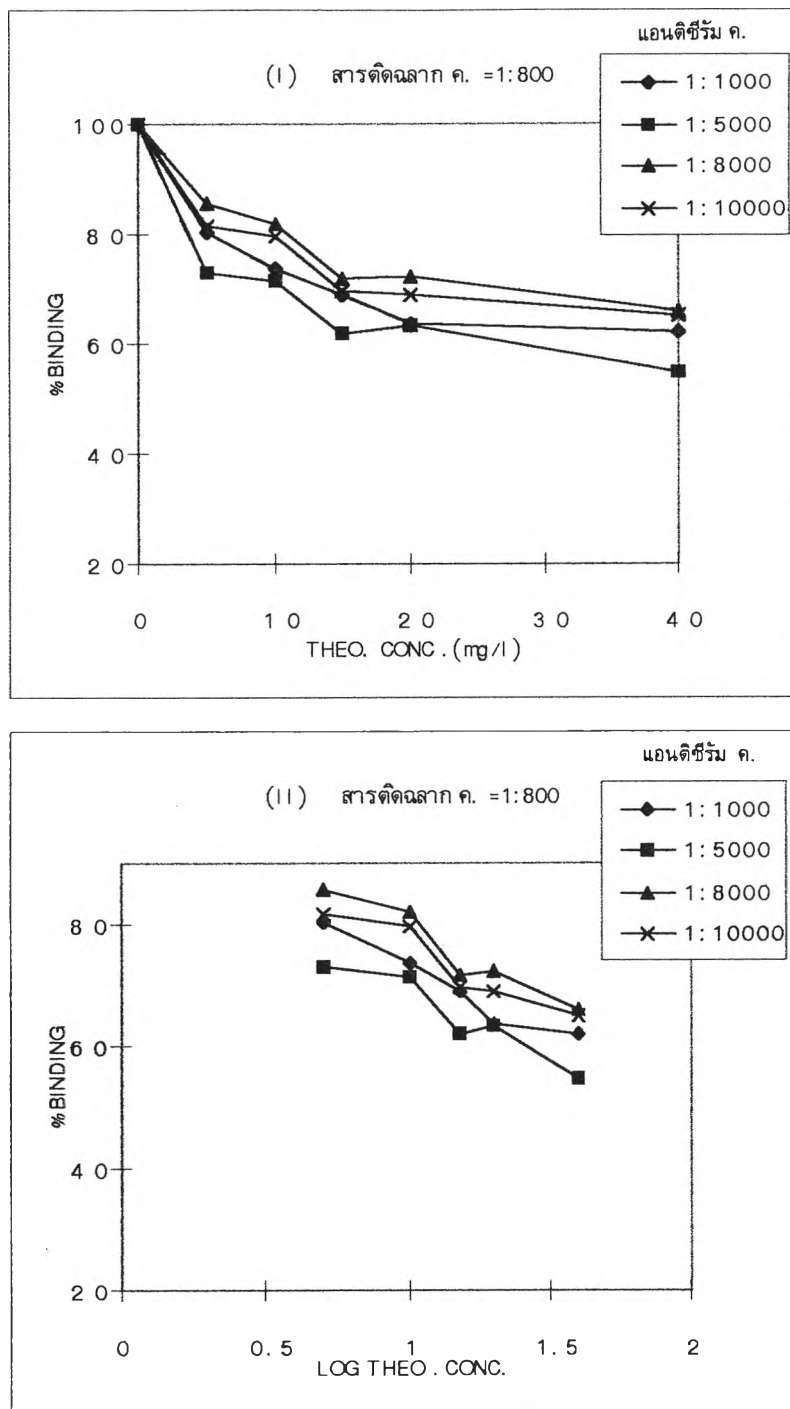
ดังนั้นสภาวะที่ได้นี้จะถูกนำไปใช้ในการศึกษาผลของเฮเทอโรโลกัสคอมบิเนชันต่อไป



รูปที่ 48 ผลของปฏิกิริยาแย่งที่ระหว่างสารคัดหลาก ค. อัตราส่วนความเจือจาง 1:500 กับ สารละลายมาตรฐานธีโอฟิลลีน

กราฟ I direct plot

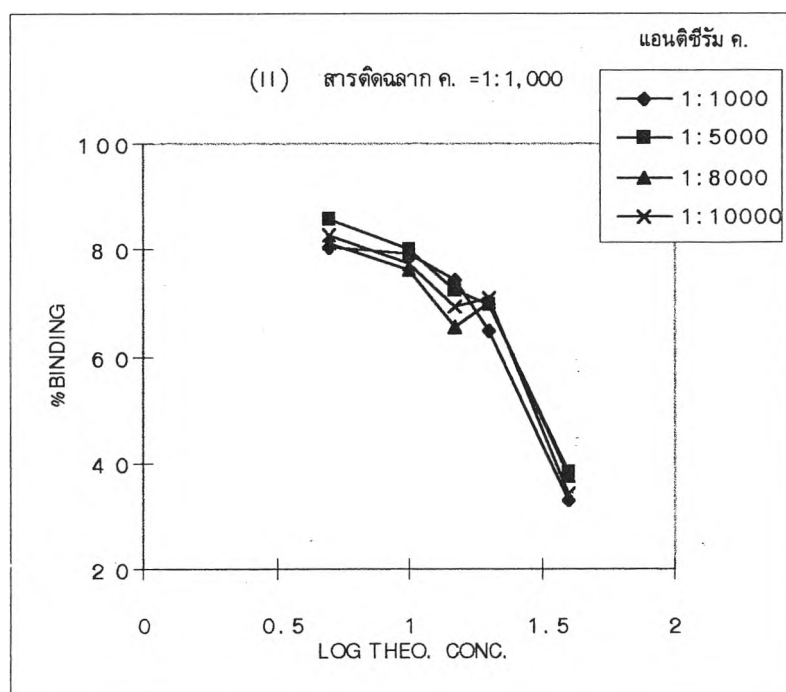
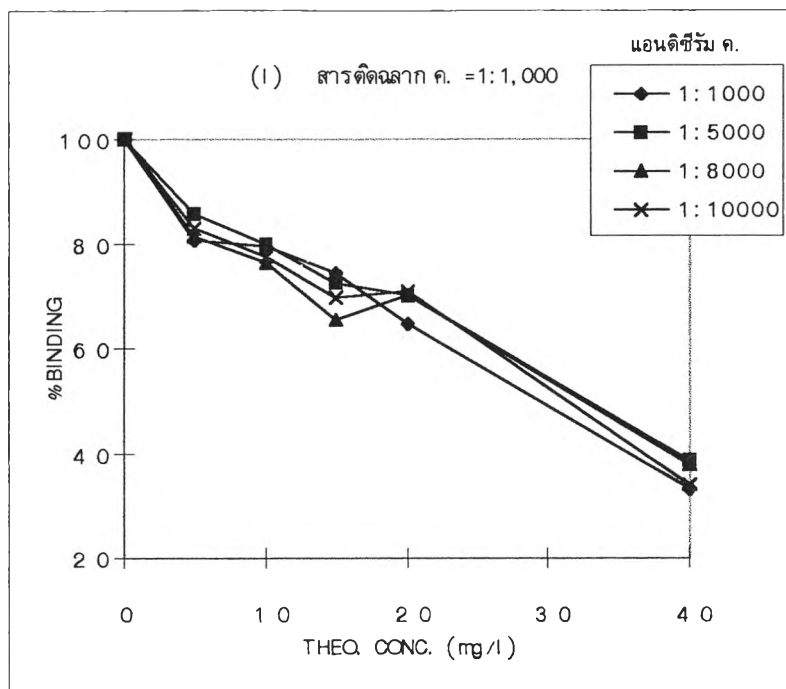
กราฟ II logic plot



รูปที่ 49 ผลของปฏิกิริยาแย่งที่ระหว่างสารดีดิลลาท ค. อัตราส่วนความเจือจาง 1:800 กับ
สารละลายมาตรฐานธิโอฟิลลีน

กราฟ I direct plot

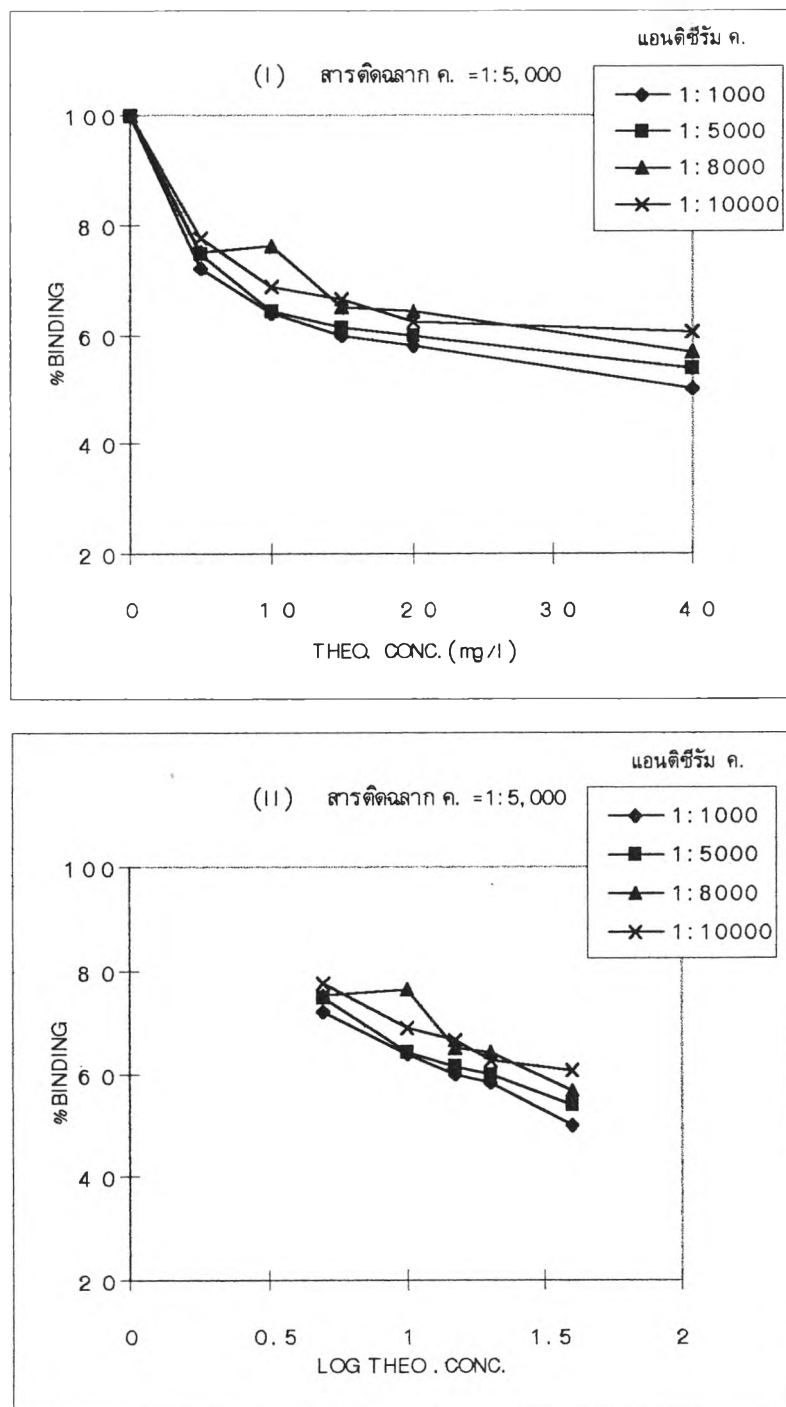
กราฟ II logic plot



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

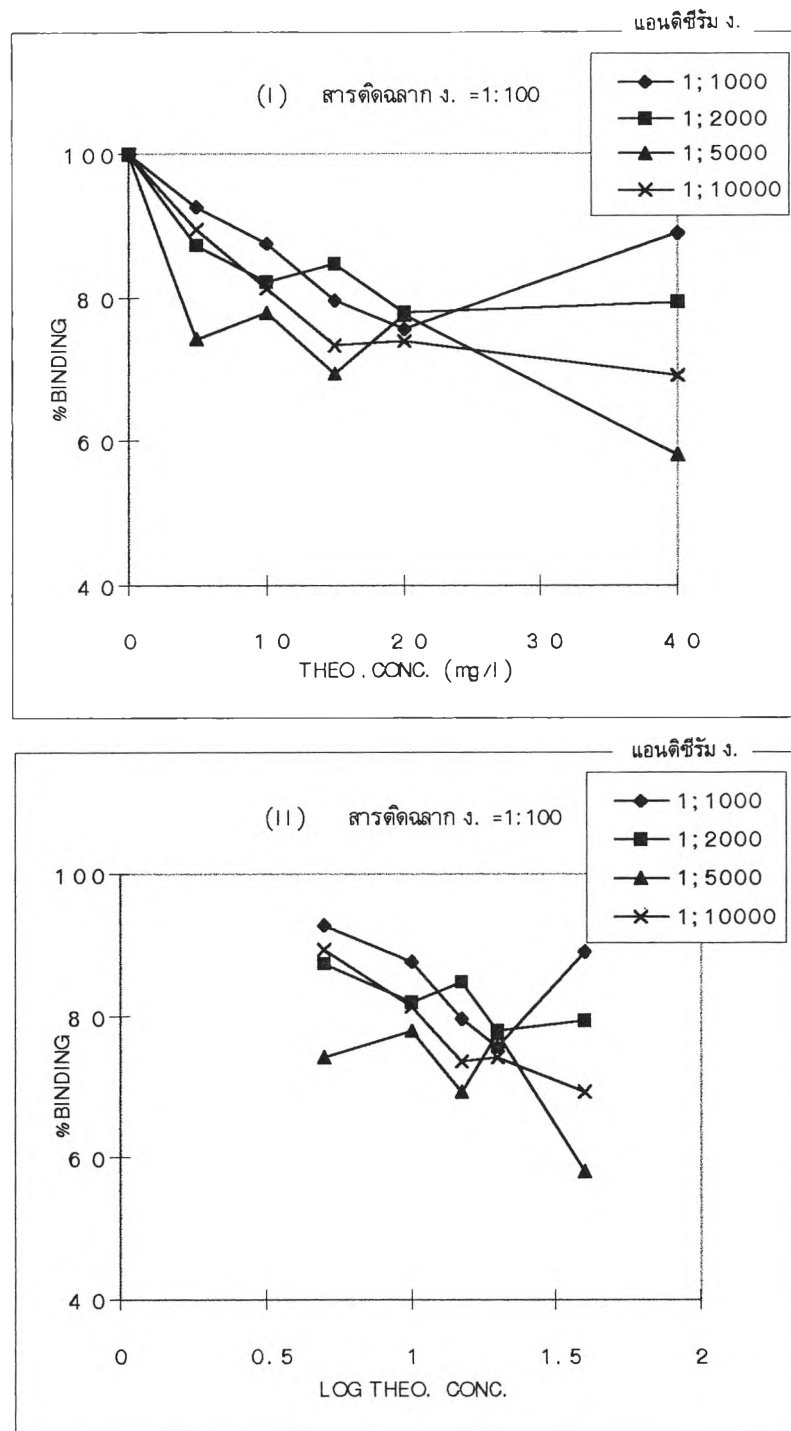
ผลการเกิดปฏิกิริยาการแย่งที่ระหว่าง สารติดฉลาก ง. กับธีโอฟิลลีนในการจับกับ แอนติบอดีที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยอิมมูโนเจนในรูปของอนุพันธ์ ง. 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine ณ ค่าอัตราส่วนความเจือจางต่าง ๆ

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

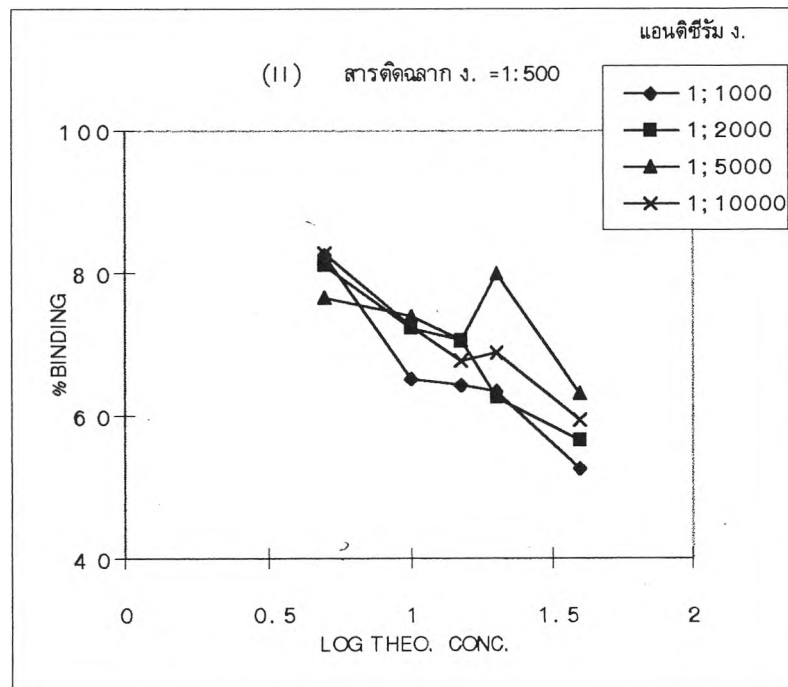
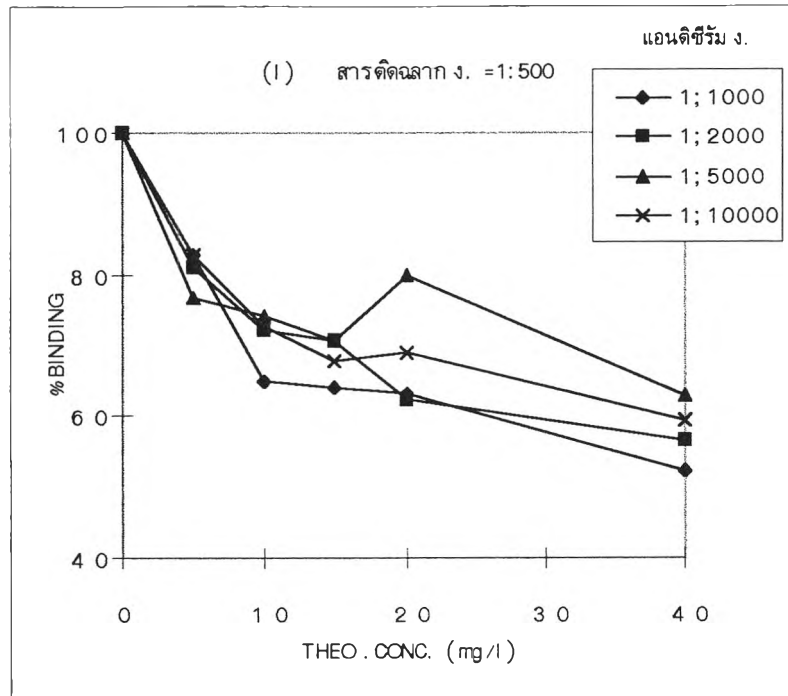
ดังนั้นสถานะที่ได้นี้จะถูกนำไปใช้ในการศึกษาผลของเฮเทอโรโลจิสคอมบิเนชันต่อไป



รูปที่ 52 ผลของปฏิกิริยาแย่งที่ระหว่างสารตัดฉลาก ง. อัตราส่วนความเจือจาง 1:100 กับ สารละลายมาตรฐานริโอฟิลซีน

กราฟ I direct plot

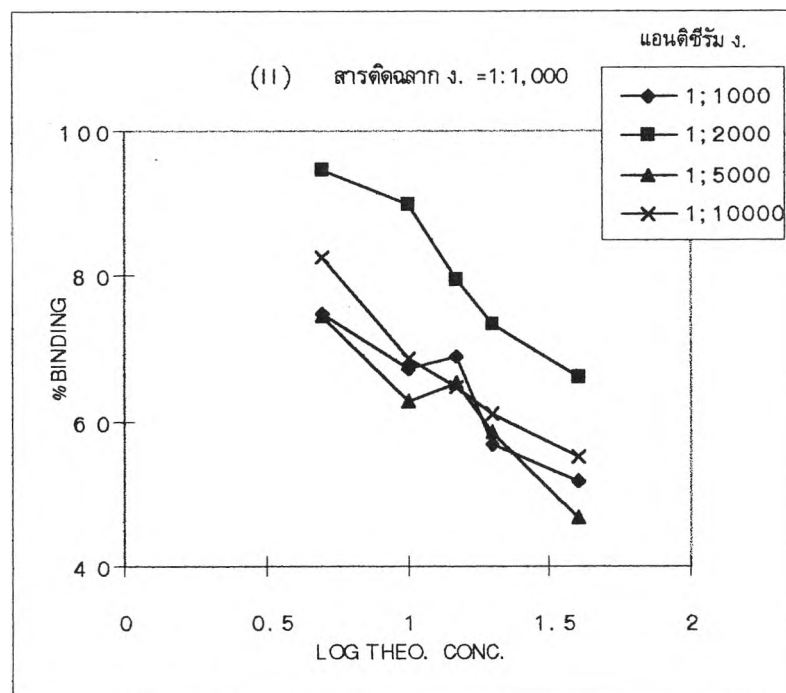
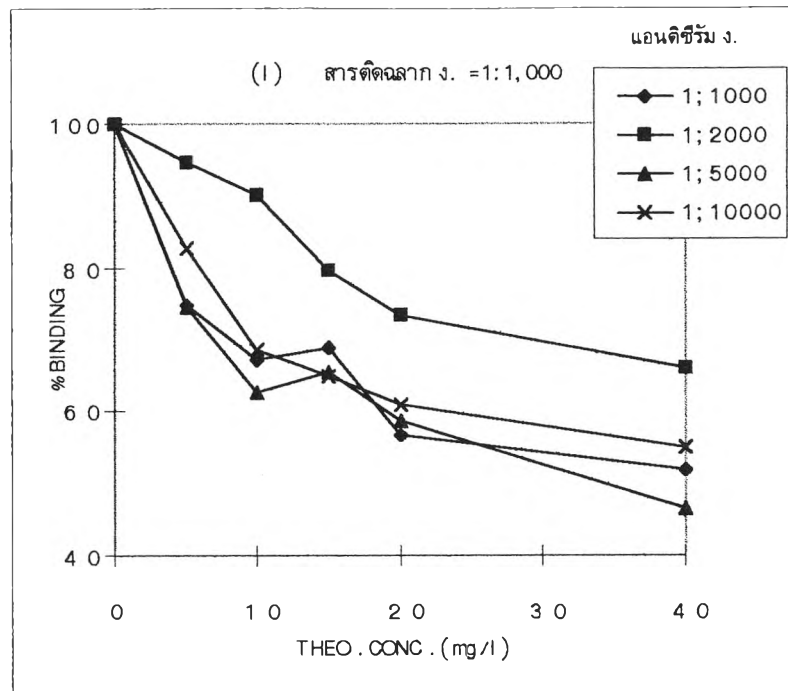
กราฟ II logic plot



รูปที่ 53 ผลของปฏิกิริยาแย่งที่ระหว่างสารติดฉลาก ง. อัตราส่วนความเจือจาง 1:500 กับ สารละลายมาตรฐานอิโพลีน

กราฟ I direct plot

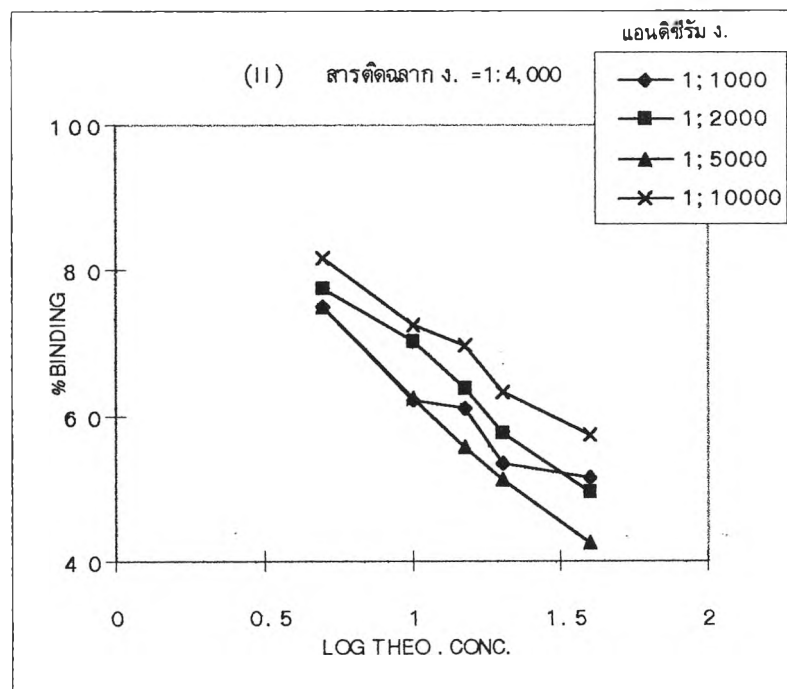
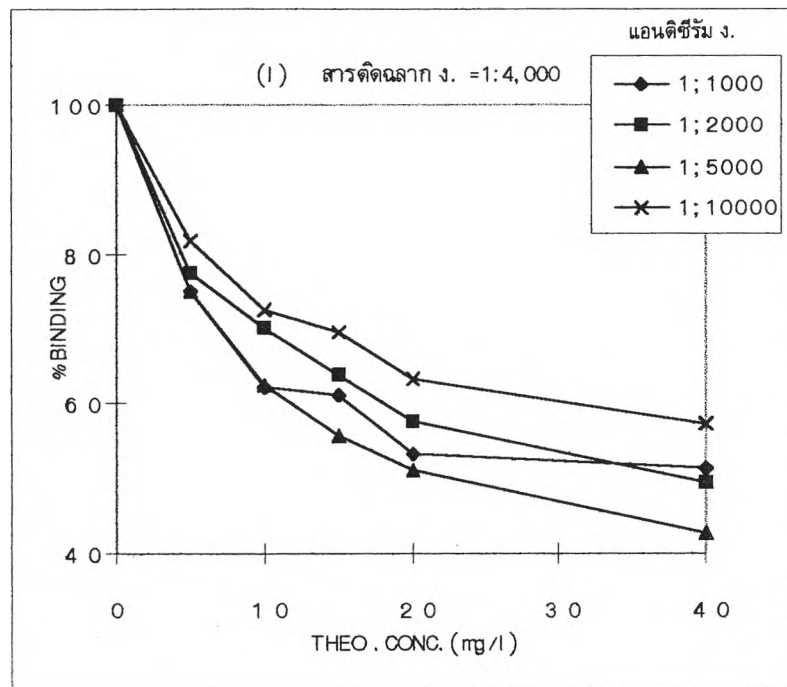
กราฟ II logic plot



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

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

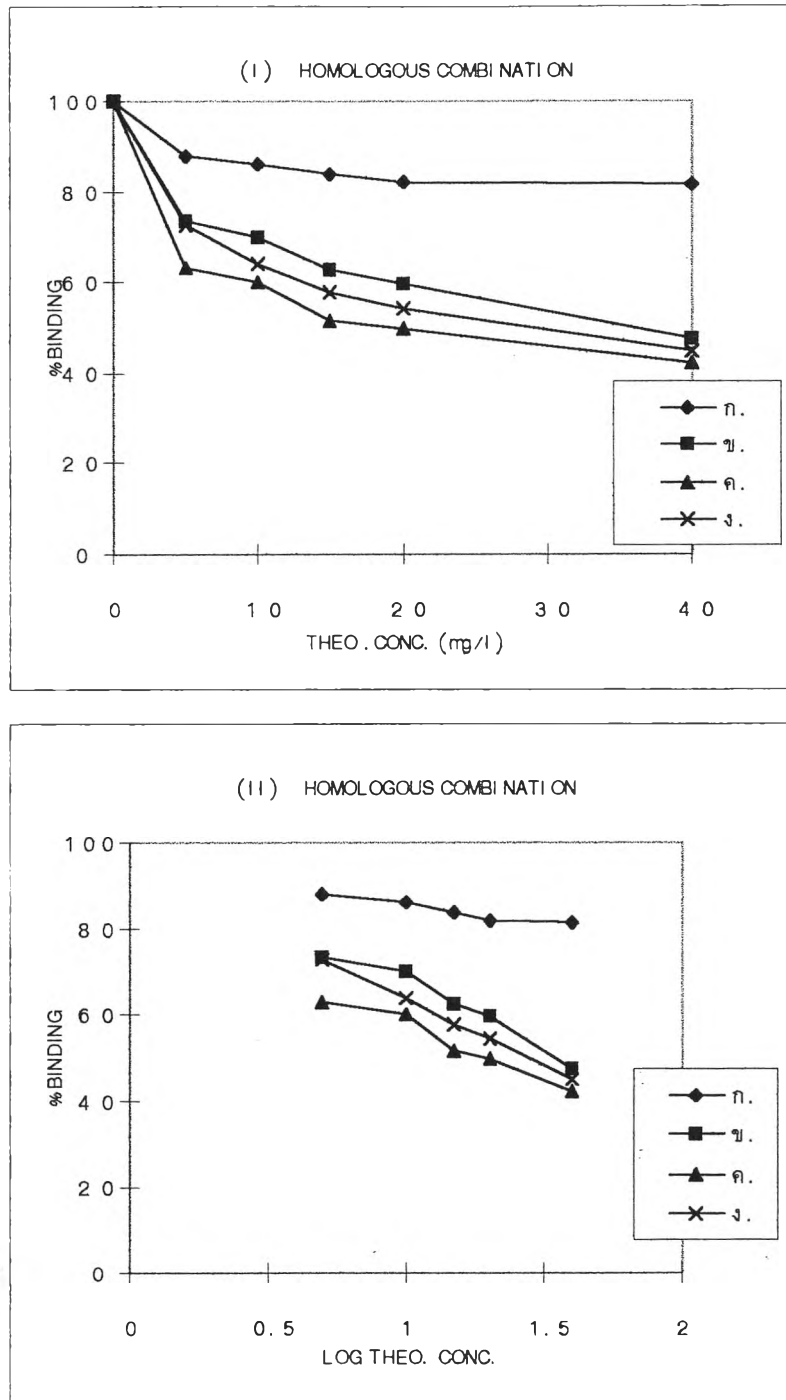
อนุพันธ์	อัตราส่วนความเจือจาง	
	แอนติซีรัม	สารติดฉลาก
ก.	1:2,000	1:1,000
ข.	1:10,000	1:8,000
ค.	1:1,000	1:5,000
ง.	1:5,000	1:4,000

6. การศึกษาผลของเฮเทอโรโลกัส คอมมิเนชันระหว่างสารติดฉลากรีโอฟิลลีนกับ อิมมูโนเจน

ผลของสภาวะที่เหมาะสมของการเกิดปฏิกิริยาแย่งที่ระหว่างรีโอฟิลลีนติดฉลาก
เอ็นไซม์กับสารละลายมาตรฐานรีโอฟิลลีน จากข้อ 5 ถูกนำมาใช้ศึกษาคอมมิเนชัน ลักษณะ
ต่าง 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 คอมบิเนชันของการวิเคราะห์โอฟิลลีน

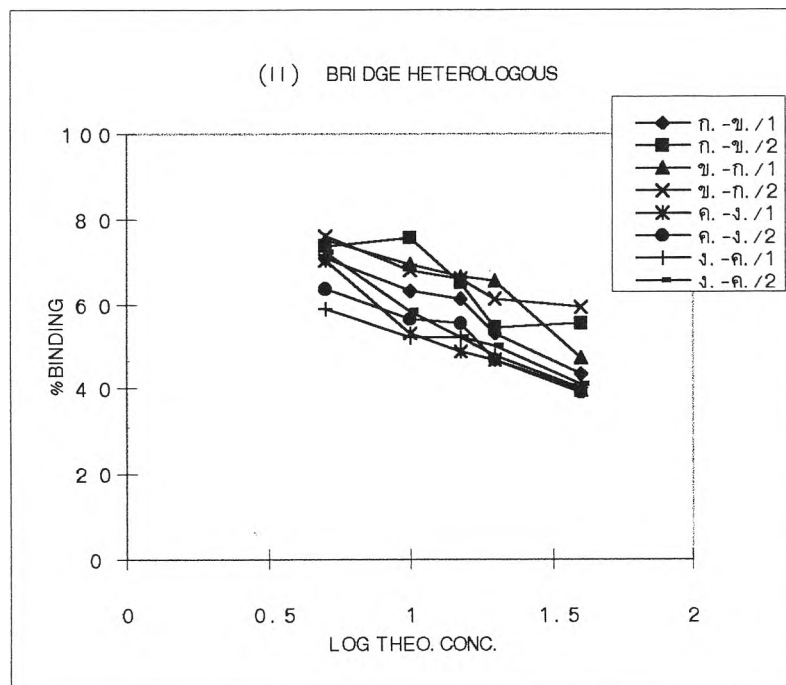
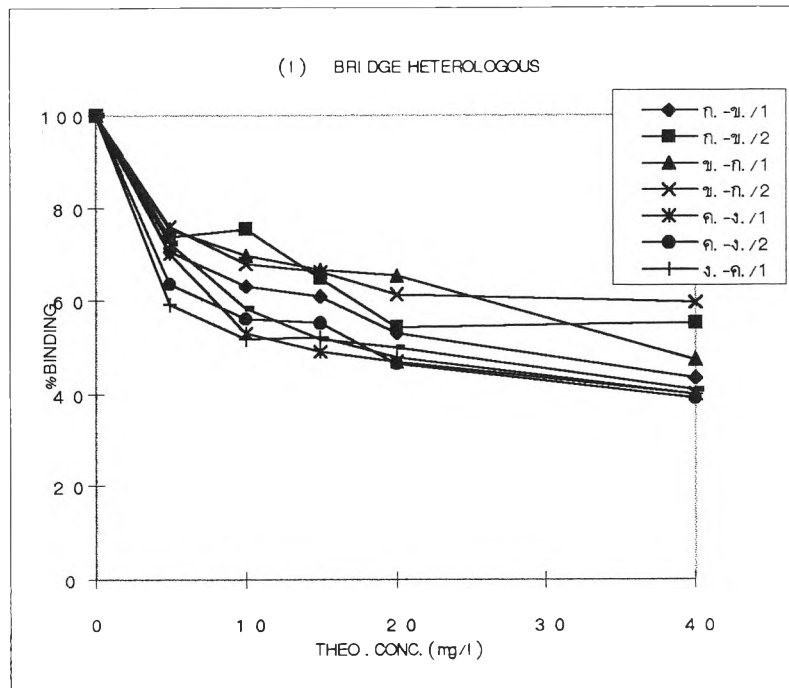
สารติด ฉลาก	อัตราส่วน ความเจือ จาง	แอนติ ซีรัม	อัตราส่วน ความเจือ จาง	r (correlation coefficient)	ความชัน
ก.	1:1,000	ก.	1:2,000	0.9236	8.0309
ข.	1:8,000	ข.	1:10,000	0.9469	29.355
ค.	1:5,000	ค.	1:2,000	0.9545	24.506
ง.	1:4,000	ง.	1:5,000	0.9994	30.844*

บริดจ์ เฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชัน

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 คอมบิเนชัน ระหว่างสารติดฉลาก ง. กับ แอนติซีรัม จาก ค. แสดงผลการแย่งที่ได้ดีที่สุดในแง่ของค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9734 และความไวของการแย่งที่ในเทอมของความชันของเส้นกราฟ เท่ากับ 34.182



รูปที่ 57 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์รีโอพลีสินโดยใช้ บริดจ์ เฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชัน

กราฟ I direct plot

กราฟ II logic plot

ตารางที่ 30 บริดจ์ เฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชันของการวิเคราะห์รีโอฟิลลีน

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

การวิเคราะห์รีโอฟิลลีน โดยใช้ปฏิบัติการแย่งที่ระหว่าง สารติดฉลาก กับ รีโอฟิลลีน
เมื่อใช้ แอนติซีรัมจากอนุพันธ์ต่างกัน คือ

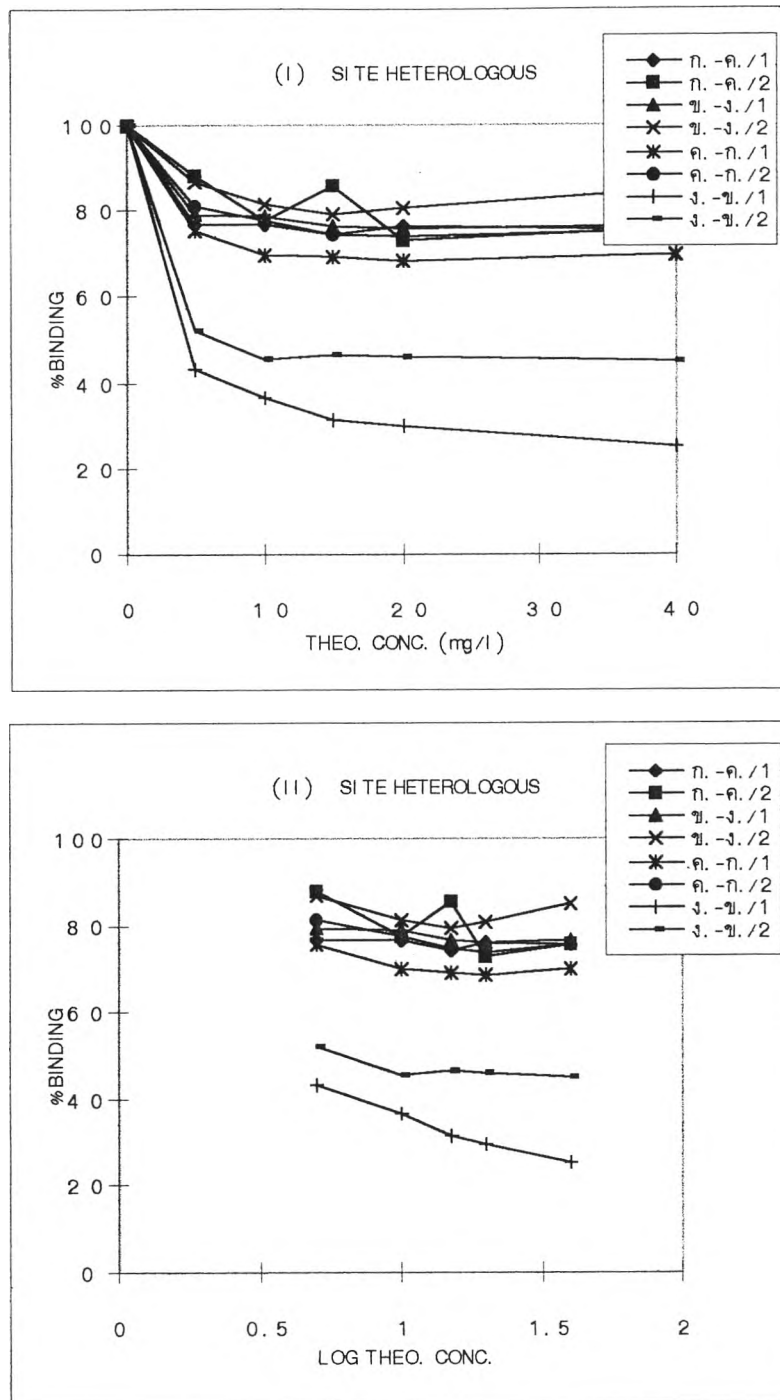
สารติดฉลาก ก. และแอนติซีรัมจาก ค.

สารติดฉลาก ข. และแอนติซีรัมจาก ง.

สารติดฉลาก ค. และแอนติซีรัมจาก ก.

สารติดฉลาก ง. และแอนติซีรัมจาก ข.

ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 58 และตารางที่ 31 พบว่าการใช้ไซท์เฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชัน
ระหว่างสารติดฉลาก ง. กับแอนติซีรัมจาก ข. แสดงผลการแย่งที่ได้ดีที่สุดโดยมีค่าสัมประสิทธิ์
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

สารติดฉลาก	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 สารติดฉลาก กับ รีโอฟิลลีน
เมื่อใช้ แอนติซีรัมจากอนุพันธ์ต่างกัน คือ

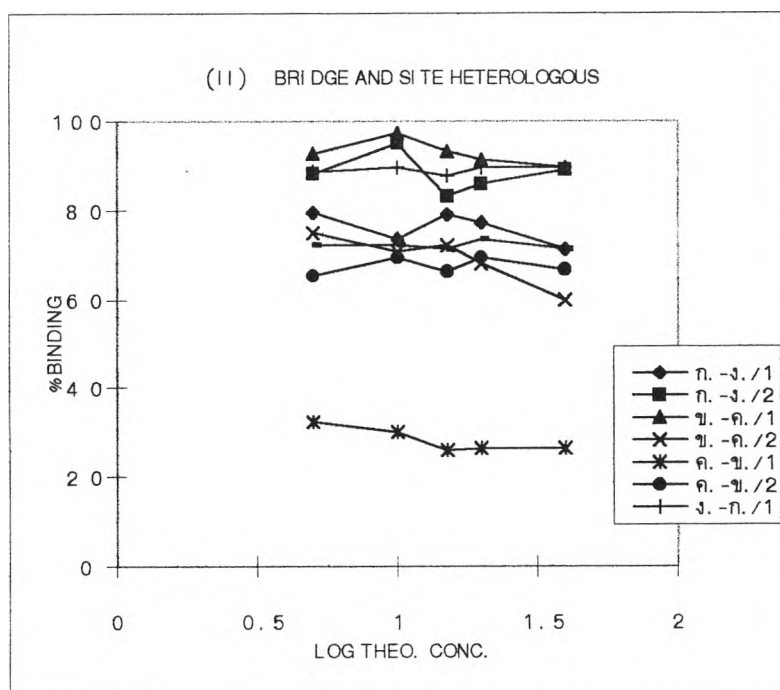
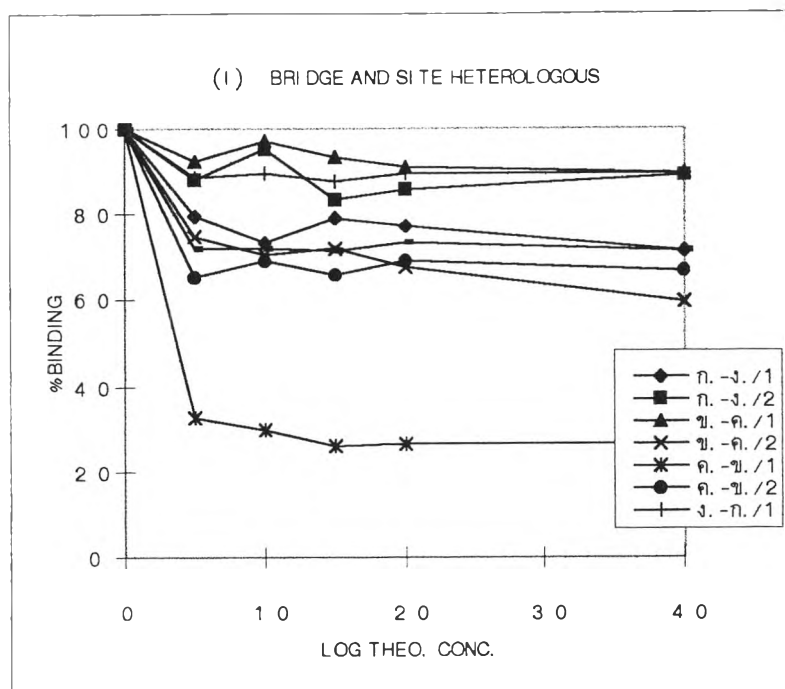
สารติดฉลาก ก. และแอนติซีรัมจาก ง.

สารติดฉลาก ข. และแอนติซีรัมจาก ค.

สารติดฉลาก ค. และแอนติซีรัมจาก ข.

สารติดฉลาก ง. และแอนติซีรัมจาก ก.

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



รูปที่ 59 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์รีโอฟิลลีนโดยใช้ บริดจ์ และ ไซท์ เฮเทอโรโลกัส
คอมบิเนชัน

กราฟ I direct plot

กราฟ II logic plot

ตารางที่ 32 บริดจ์ และ ไชท์ เฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชันของการวิเคราะห์รีโอฟิลลีน

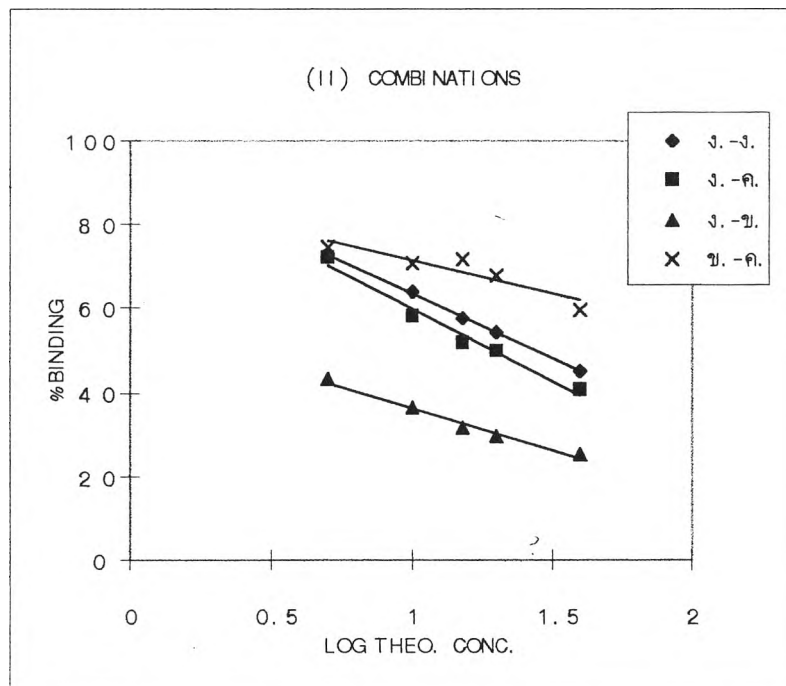
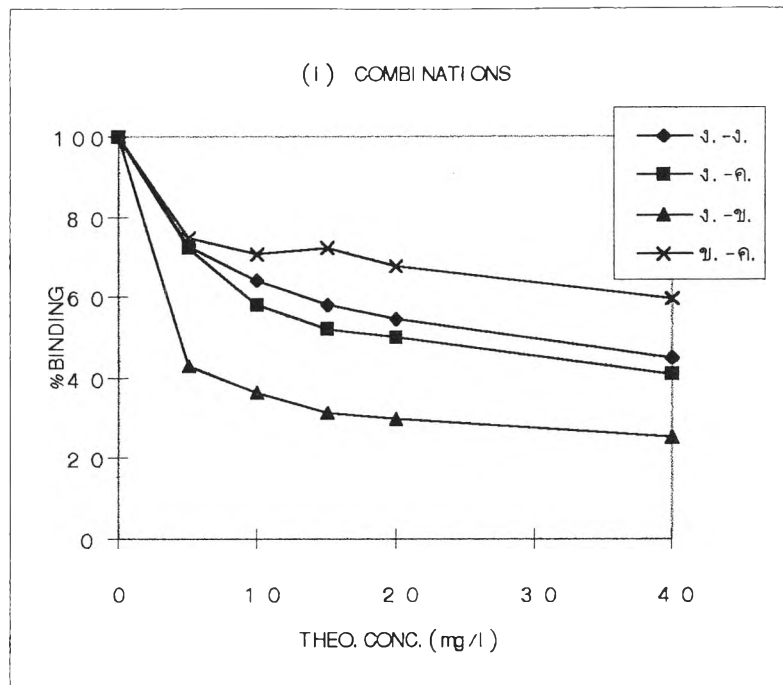
สารติดฉลาก	อัตราส่วน ความเจือจาง	แอนติซีรัม	อัตราส่วน ความเจือจาง	r	ความชัน
ก.	1:1,000	ง.	1:2,000	0.3845	6.6201
			1:5,000	0.0294	2.2594
ข.	1:8,000	ค.	1:1,000	0.8551	15.8370*
			1:10,000	0.3469	4.8823
ค.	1:5,000	ข.	1:2,000	0.7740	7.4530
			1:5,000	0.0500	1.2521
ง.	1:4,000	ก.	1:2,000	0.0114	0.2715
			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 ความเข้มข้นของ รีโอฟิลลีนในเชิงเส้นตรง ที่ดีที่สุดโดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์(r) เท่ากับ 0.9734 และมี ความไวของการแย่งที่จับซึ่งแสดงในเทอมของความชันของเส้นตรง คือ 34.182

ตารางที่ 33 เปรียบเทียบ ผลของคอมบิเนชัน ลักษณะต่าง ๆ ในการวิเคราะห์รีโอฟิลลีน

คอมบิเนชัน	สารติดฉลาก	แอนติซีรัม	r	ความชัน
โฮโมโลกัส	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