ผลของเฮเทอโรโลกัสคอมบิเนชัน ระหว่างธิโอฟิลลีนติดฉลากเอ็นไซม์และอิมมูโนเจนต่อความไวและความจำเพาะของการวิเคราะห์ธิโอฟิลลีนโดยวิธีเอ็นไซม์อิมมูโนแอสเสย์

นางสาวสุธาสินี พิชญวศิน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชเคมี ภาควิชาเภสัชเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2540

ISBN 974-637-634-9

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 15320132

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	ผลของเฮเทอโรโลกัสคอมบิเนชันระหว่างธิโอฟิลลีนติดฉลากเอ็นไซม์และอิมมูโนเจนต่อความไวและความจำเพาะของการวิเคราะห์ธิโอฟิลลีนโดยวิธีเอ็นไซม์อิมมูโนแอสเสย์
โดย	นางสาวสุธาสินี พิชญวศิน
ภาควิชา	เภสัชเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. เพ็ญศรี ทองนพเนื้อ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ ดร. สุวรรณา หวังวีรวงศ์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์นายแพทย์ศุภวัฒน์ ชุติวงศ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สมเกียรติ รุจิรวัฒน์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาตราจารย์ ดร.เพ็ญศรี ทองนพเนื้อ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(อาจารย์ ดร. สุวรรณา หวังวีรวงศ์)

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

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร. บุญศรี องค์พิพัฒนกุล)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

สุธาสินี พิชญวศิน : ผลของเฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชัน ระหว่างธิโอฟิลลีนติดฉลากเอ็นไซม์และอิมมูโนเจนต่อความไวและความจำเพาะของการวิเคราะห์ธิโอฟิลลีนโดยวิธีเอ็นไซม์อิมมูโนแอสย์ อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. เพ็ญศรี ทองนพเนื้อ, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ดร. สุวรรณา หวังวีรวงศ์, 130 หน้า. ISBN 974-637-634-9.

อนุพันธ์ธิโอฟิลลีนสื่อนุพันธ์ได้ถูกสังเคราะห์ขึ้นเพื่อติดฉลากกับเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดสและเตรียมอิมมูโนเจน อนุพันธ์ที่มีความยาวของสายโซ่คาร์บอนต่างกัน ที่ตำแหน่งที่ 7 คือ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (ก.) และ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (ข.) และอนุพันธ์ ที่มีความยาวของสายโซ่คาร์บอนต่างกัน ที่ตำแหน่งที่ 8 ของแซนธีน คือ 8-(3-carboxypropyl)-1,3 dimethylxanthine (ค.) และ 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (ง.) คอมบิเนชันทั้ง 16 ลักษณะ ระหว่างธิโอฟิลลีนติดฉลากเอ็นไซม์และอิมมูโนเจนของอนุพันธ์ทั้งหมดนี้ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์ธิโอฟิลลีนโดยหลักการแย่งที่ในเอ็นไซม์อิมมูโน แอสเสย์ โดยการสร้าง logic plot ระหว่างเปอร์เซ็นต์การจับ และความเข้มข้นของธิโอฟิลลีนในเทอมของ log ของแต่ละคอมบิเนชัน พบว่าความไวของการวิเคราะห์ในรูปของความชันของเส้นกราฟภายใต้ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงเมื่อใช้บริดจ์ เฮเทอโรโลกัสคอมบิเนชันระหว่างสารติดฉลากของอนุพันธ์ ง. กับแอนติซีรัมของอนุพันธ์ ค. จะดีกว่าการใช้ โฮโมโลกัสคอมบิเนชันจากอนุพันธ์ ง. และไซท์เฮเทอโรโลกัสคอมบิเนชันระหว่างสารติดฉลากเอ็นไซม์ของอนุพันธ์ ง. กับแอนติซีรัมของอนุพันธ์ ข. ซึ่งมีความชันเท่ากับ 34.18, 30.84 และ 20.04 ตามลำดับ ส่วนการใช้บริดจ์และไซท์เฮเทอโรโลกัสคอมบิเนชันให้ความไวที่ต่ำที่สุด สำหรับการเกิดปฏิกิริยาข้ามของคาเฟอีนต่อธิโอฟิลลีนพบว่า บริดจ์ เฮเทอโรโลกัสคอมบิเนชันมีความจำเพาะเจาะจงต่อ ธิโอฟิลลีนดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับคอมบิเนชันลักษณะอื่นดังกล่าวข้างต้น ดังนั้นคอมบิเนชันที่ดีที่สุดในการวิเคราะห์ธิโอฟิลลีนโดยวิธีเอ็นไซม์อิมมูโนแอสเสย์ คือ บริดจ์ เฮเทอโรโลกัสคอมบิเนชันที่ใช้สารติดฉลากเป็น 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine กับแอนติซีรัม เป็น 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine

ภาควิชา เภสัชเคมี ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา - ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2540 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

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 logic 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 heterolgous 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 ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา - ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ปีการศึกษา 2540 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ ด้วยความกรุณาของ รองศาสตราจารย์ ดร. เพ็ญศรี ทองนพเนื้อ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ซึ่งได้กรุณาสละเวลาให้คำปรึกษา แนะนำ ตรวจสอบ แก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ด้วยความเอาใจใส่ และให้กำลังใจแก่ผู้ทำวิจัยตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. สุวรรณา หวังวีรวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาแนะนำให้ความรู้ ข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์อีกทั้งยังช่วยกรุณาตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ทุกท่านที่ได้กรุณาสละเวลาตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คณาจารย์ภาควิชาเภสัชเคมีที่ได้กรุณาอบรมสั่งสอนให้ความรู้แก่ผู้ทำวิจัยตลอดการศึกษา ณ ที่แห่งนี้ และขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์คณะเภสัชศาสตร์ และผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่านที่ได้ให้ความกรุณาให้คำปรึกษาและให้ความช่วยเหลือแก่ผู้ทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ภาควิชาเภสัชเคมี ทุกท่านที่ได้ให้ความร่วมมือช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณภาควิชา จุลชีววิทยา และศูนย์เครื่องมือวิจัยทางเภสัชศาสตร์และห้องปฏิบัติการกลาง คณะเภสัชศาสตร์ ที่ได้ให้ความเอื้อเฟื้ออุปกรณ์ เครื่องมือ และสถานที่สำหรับใช้ในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่ได้กรุณาให้ทุนสนับสนุนบางส่วนสำหรับการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณนิธิมา สุทธิพันธ์, คุณมาลัย ทวีโชติภัทร, คุณวลัยลักษณ์ เมทธาภัทร, คุณนิรักษพรณ์ สุระเดช และ คุณสุทธาทิพย์ ปรัชญชริณกร

และ ขอขอบคุณ เพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ทั้งในภาควิชา และ นอกภาควิชาเภสัชเคมี ที่ได้มีส่วนช่วยเหลือ ทุกท่าน

สุดท้ายนี้ที่จะลืมเสียมิได้ ผู้ทำวิจัยต้องขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่ได้ให้ความรัก ความเข้าใจ และเป็นกำลังใจ ตลอดมา

สุธาสินี พิชญวศิน

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง.
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ.
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ.
สารบัญ ..... ช.
สารบัญตาราง ..... ฌ.
สารบัญรูป ..... ฒ.
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ ..... ท.

บทที่

1 บทนำ 1
2 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ 5
วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี 5
วิธีการทดลอง 6
1. การสังเคราะห์อนุพันธ์ธิโอฟิลลีน 6
2. การเตรียมอิมมูโนเจน 10
3. การกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี 13
4. การเตรียมเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดส 15
5. การติดฉลากธิโอฟิลลีนด้วยเอ็นไซม์ 16
6. การกำหนดสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา
การแย่งที่ระหว่างธิโอฟิลลีนติดฉลากเอ็นไซม์ กับ
ละลายสารมาตรฐานธิโอฟิลลีนในการจับกับแอนติบอดี 17
7. การศึกษาผลของเฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชัน
ระหว่างธิโอฟิลลีนติดฉลากเอ็นไซม์กับอิมมูโนเจน 18
3 ผลการทดลองและวิจารณ์ผล 20
4 สรุปผล 124

หน้า

รายการอ้างอิง 126
ประวัติผู้เขียน 130

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในกระต่าย	14
2	อินฟราเรดแอบซอพชัน(Infrared apsorption) ของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ก.)	25
3	ค่าเคมิคัลชิฟท์(δ)จาก ^{1}H-NMR ของ 7-(3-carboxypropyl) -1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ก.)	28
4	อินฟราเรดแอบซอพชัน(Infrared apsorption) ของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ข.)	31
5	ค่าเคมิคัลชิฟท์(δ)จาก ^{1}H-NMR ของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ข.)	34
6	อินฟราเรดแอบซอพชัน(Infrared apsorption) ของ 8-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ค.)	39
7	ค่าเคมิคัลชิฟท์(δ)จาก ^{1}H-NMR ของ 8-(3-carboxypropyl) -1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ค.)	42
8	อินฟราเรดแอบซอพชัน(Infrared apsorption) ของ 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ง.)	47
9	ค่าเคมิคัลชิฟท์(δ)จาก ^{1}H-NMR ของ 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ง.)	50
10	อินฟราเรดแอบซอพชัน(Infrared apsorption) ของ NHS เอสเทอร์ ของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (NHS เอสเทอร์ ของ อนุพันธ์ ก.)	55
11	ค่าเคมิคัลชิฟท์(δ)จาก ^{1}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

ตารางที่ หน้า

13 อินฟราเรดแอบซอพชัน(Infrared apsorption) ของ NHS เอสเทอร์ ของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (NHS เอสเทอร์ ของ อนุพันธ์ ข.) 64

14 ค่าเคมิคัลชิฟท์(δ)จาก ^{1}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 ค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัม 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 ผลการเกิดปฏิกิริยาการแย่งที่(competition)ระหว่าง ธิโอฟิลลีนติดฉลาก ก. และ สารละลายมาตรฐานธิโอฟิลลีน 93

25 ผลการเกิดปฏิกิริยาการแย่งที่(competition)ระหว่าง ธิโอฟิลลีนติดฉลาก ข. และ สารละลายมาตรฐานธิโอฟิลลีน 99

26 ผลการเกิดปฏิกิริยาการแย่งที่(competition)ระหว่าง ธิโอฟิลลีนติดฉลาก ค. และ สารละลายมาตรฐานธิโอฟิลลีน 105

27 ผลการเกิดปฏิกิริยาการแย่งที่(competition)ระหว่าง ธิโอฟิลลีนติดฉลาก ง. และ สารละลายมาตรฐานธิโอฟิลลีน 111

28 สรุปสภาวะแอนติซีรัมและสารติดฉลากที่เหมาะสมที่สุด 112

29 โฮโมโลกัส คอมบิเนชัน ของการวิเคราะห์ธิโอฟิลลีน 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 reactivityกับ คาเฟอีนระหว่างแอนติซีรัมของ
ธิโอฟิลลีนกับสารติดฉลาก 122

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	ปฏิกิริยาในการสังเคราะห์อนุพันธ์ของธิโอฟิลลีน.....	21
2	UV สเปคตรัมของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3- dimethylxanthine (อนุพันธ์ ก.) ความเข้มข้น 33 มคก./มล.	23
3	IR สเปคตรัมของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ก.)	24
4	^{1}H-NMR สเปคตรัมของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ก.) ใน DMSO-d_6	26
5	^{1}H-NMR สเปคตรัมของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ก.) ใน DMSO-d_6 ขยายสเกลจาก 1.96-8.06 ppm	27
6	UV สเปคตรัมของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3- dimethylxanthine (อนุพันธ์ ข.) ความเข้มข้น 33 มคก./มล.	29
7	IR สเปคตรัมของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3- dimethylxanthine (อนุพันธ์ ข.)	30
8	^{1}H-NMR สเปคตรัมของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ข.) ใน DMSO-d_6	32
9	^{1}H-NMR สเปคตรัมของ 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 สเปคตรัมของ 8-(3-carboxypropyl)-1,3- dimethylxanthine (อนุพันธ์ ค.) ความเข้มข้น 33 มคก./มล.	37
12	IR สเปคตรัมของ 8-(3-carboxypropyl)-1,3- dimethylxanthine (อนุพันธ์ ค.)	38
13	^{1}H-NMR สเปคตรัมของ 8-(3-carboxypropyl)-1,3- dimethylxanthine (อนุพันธ์ ค.) ใน DMSO-d_6	40
14	^{1}H-NMR สเปคตรัมของ 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 สเปคตรัมของ 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ง.) ความเข้มข้น 33 มคก./มล. 45

17 IR สเปคตรัมของ 8-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (อนุพันธ์ ง.) 46

18 ^{1}H-NMR สเปคตรัมของ 8-(4-carboxybutyl)-1,3- dimethylxanthine (อนุพันธ์ ง.) ใน DMSO-d_6 48

19 ^{1}H-NMR สเปคตรัมของ 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 สเปคตรัมของ NHS เอสเทอร์ ของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (NHS เอสเทอร์ ของ อนุพันธ์ ก.) ความเข้มข้น 33 มคก./มล. 53

22 IR สเปคตรัมของ NHS เอสเทอร์ ของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (NHS เอสเทอร์ ของ อนุพันธ์ ก.) 54

23 ^{1}H-NMR สเปคตรัมของ NHS เอสเทอร์ ของ 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine (NHS เอสเทอร์ ของ อนุพันธ์ ก.) ใน $CDCL_3$ 56

24 ^{1}H-NMR สเปคตรัมของ 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 สเปคตรัมเปรียบเทียบระหว่างอิมมูโนเจน ก. (1),อนุพันธ์(ก.) และ BSA(3) ความเข้มข้น 0.500 มก./มล. 59

26 UV สเปคตรัมของ NHS เอสเทอร์ ของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (NHS เอสเทอร์ ของ อนุพันธ์ ข.) ความเข้มข้น 33 มคก./มล. 62

27 IR สเปคตรัมของ NHS เอสเทอร์ ของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (NHS เอสเทอร์ ของ อนุพันธ์ ข.) 63

รูปที่ หน้า

28 ^{1}H-NMR สเปคตรัมของ NHS ester ของ 7-(4-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine (NHS ester ของ อนุพันธ์ ข.) ใน $CDCL_3$ 65

29 ^{1}H-NMR สเปคตรัมของ 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 สเปคตรัมเปรียบเทียบระหว่างอิมมูโนเจน ข. (1),อนุพันธ์(ข.) และ BSA(3) ความเข้มข้น 0.286 มก./มล. 68

31 UV สเปคตรัมเปรียบเทียบระหว่างอิมมูโนเจน ค. (1),อนุพันธ์(ค.) และ BSA(3) ความเข้มข้น 0.500 มก./มล. 70

32 UV สเปคตรัมเปรียบเทียบระหว่างอิมมูโนเจน ง. (1),อนุพันธ์(ง.) และ BSA(3) ความเข้มข้น 0.500 มก./มล. 73

33 กราฟแสดงผลการหาไตเตอร์ของแอนติซีรัม ก. , ข. ,ค. และ ง. 76

34 UV สเปคตรัม ของ aminated HRP 3.00 มก./มล. 78

35 ปฏิกิริยาเคมีในการสังเคราะห์อนุพันธ์ธิโอฟิลลีน ณ ตำแหน่งที่ 7 ติดฉลากเอ็นไซม์ HRP 80

36 UV สเปคตรัมเปรียบเทียบระหว่างอนุพันธ์ ก. ที่ติดฉลากเอ็นไซม์ (1), อนุพันธ์ ก. (2) และ เอ็นไซม์ (3) ความเข้มข้น 3.00 มก./มล. 81

37 UV สเปคตรัมเปรียบเทียบระหว่างอนุพันธ์ ข. ที่ติดฉลากเอ็นไซม์ (1), อนุพันธ์ ข. (2) และ เอ็นไซม์ (3) ความเข้มข้น 3.00 มก./มล. 83

38 UV สเปคตรัมเปรียบเทียบระหว่างอนุพันธ์ ค. ที่ติดฉลากเอ็นไซม์ (1), อนุพันธ์ ค. (2) และ เอ็นไซม์ (3) ความเข้มข้น 3.00 มก./มล. 85

39 UV สเปคตรัมเปรียบเทียบระหว่างอนุพันธ์ ง. ที่ติดฉลากเอ็นไซม์ (1), อนุพันธ์ ง. (2) และ เอ็นไซม์ (3) ความเข้มข้น 3.00 มก./มล. 87

40 ผลของปฏิกิริยาแย่งที่ระหว่างสารติดฉลาก ก. อัตราส่วนความเจือจาง 1:100 สารละลายมาตรฐานธิโอฟิลลีน 89

41 ผลของปฏิกิริยาแย่งที่ระหว่างสารติดฉลาก ก. อัตราส่วนความเจือจาง 1:500 สารละลายมาตรฐานธิโอฟิลลีน 90

42 ผลของปฏิกิริยาแย่งที่ระหว่างสารติดฉลาก ก. อัตราส่วนความเจือจาง 1:800 สารละลายมาตรฐานธิโอฟิลลีน 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 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ธิโอฟิลลีนโดยใช้โฮโมโลกัส คอมบิเนชัน 113

รูปที่ หน้า

57 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ธิโอฟิลลีนโดยใช้
บริดจ์ เฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชัน 115
58 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ธิโอฟิลลีนโดยใช้
ไซท์ เฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชัน 117
59 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ธิโอฟิลลีนโดยใช้
บริดจ์ และ ไซท์ เฮเทอโรโลกัส คอมบิเนชัน 119
60 กราฟเปรียบเทียบผลของ คอมบิเนชันลักษณะต่าง ๆ
ในการวิเคราะห์ ธิโอฟิลลีน 121

คำอธิบายสัญญลักษณ์และคำย่อ

^{o}ซ	องศาเซลเซียส
%	เปอร์เซนต์
A	absorbance
a	absorptivity
BSA	bovine serum albumin
cm	centimeter
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
HCl	hydrochloric acid
Hz	hertz
H_2O_2	hydrogen peroxide
HRP	horseradish peroxidase
IR	infrared
J	coupling costant
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