IMMUNOASSAYS OF AMPHETAMINES: STRUCTURE OF IMMUNOGEN VERSUS ANTIBODY SPECIFICITY

PORNTIP SUTTIJITPAISAL

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
(MICROBIOLOGY)

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1994

Copyright by Mahidol University

30547

ชื่อวิทยานิพนธ์ : ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของอิมมูโนเจน กับความจำเพาะของแอนติบอดี้ในการวิเคราะห์สารแอมเฟตามีนโดยวิธีทางอิมมูโน

ผู้วิจัย : พรทิพย์ สุทธิจิตไพศาล

ปริญญา : วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ :

กวี รัตนบรรณางกูร	Ph.D.
สถิตย์ สิริสิงห	D.M.D.,Ph.D.
ชโลบล อยู่สุข	Ph.D.
ลีรา กิตติกูล	Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา : 31 ตุลาคม พ.ศ. 2537

บทคัดย่อ

การศึกษาวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์หลัก 2 ประการคือ หนึ่ง เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารประเภทแอมเฟตามีน โดยอาศัยหลัก reverse latex agglutination inhibition (RLI) ด้วยแอนติบอดี้ที่ผลิตต่อสารเมทแอมเฟตามีน และศึกษาคุณสมบัติของวิธีวิเคราะห์นี้ในด้านความไว และความจำเพาะต่อยา และสารเคมีต่างๆ วัตถุประสงค์ที่สองคือ จากความรู้ที่ได้ในการศึกษาดังกล่าวข้างต้นประกอบกับข้อมูลต่างๆ ที่มีในวารสารในเรื่องการวิเคราะห์สารแอมเฟตามีนโดยวิธีทางอิมมูโน โดยเฉพาะอย่างยิ่งคุณสมบัติของวิธีวิเคราะห์ในด้านความไว และความจำเพาะ เพื่อนำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของอิมมูโนเจนที่ใช้ และความจำเพาะของแอนติบอดี้ที่ผลิตขึ้น.

Copyright © Mahidol University

ในการพัฒนาวิธี RLI ดังกล่าว ได้ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ของเมทแอมเฟตามีนคือ N- (3-aminopropyl) methamphetamine (APMA) ซึ่งยังคงสภาพของ amino group อยู่ และมีแขนยาวออกไปอีก 4 อณู ได้นำอนุพันธ์ APMA มาเชื่อมกับ purified tetanus toxoid (PTT) โดยใช้ carbodiimide เป็นตัวเชื่อม และนำไปฉีดกระต่ายเพื่อกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกัน ได้นำเซรุ่มจากกระต่ายมาทำ IgG ให้บริสุทธิ์โดยวิธีตกตะกอนในแอมโมเนียม ซัลเฟต และตามด้วยโครมาโตกราฟี่บน DEAE Sephadex IgG ที่ได้ถูกนำมาเคลือบบนเม็ดลาเท็กส์ และทำ latex agglutination โดยเติมสารแอนติเจนที่เป็น bovine serum albumin เชื่อมติดกับ APMA ได้นำตัวยาและสารเคมีต่างๆมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาlatex agglutination นี้ และได้หาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาต่างๆ ดังกล่าว โดยพบว่าการเคลือบเม็ดลาเท็กส์ควรใช้ IgG ที่ความเข้มข้น 150 ไมโครกรัม/มล. ที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที ใน 0.1M glycine buffered saline, pH 8.2 ส่วนการทำ reverse latex agglutination inhibition (RLI) นั้น ควรอบสารที่ต้องการทดสอบกับเม็ดลาเท็กส์ที่เคลือบแล้วด้วย IgG เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที ที่ 37°C จากการทดลองพบว่าวิธี RLI ดังกล่าวสามารถวิเคราะห์สารเมทแอมเฟตา-มีนและสารแอมเฟตามีนได้ที่ความเข้มข้น 0.25 และ 14.6ไมโครกรัม/มล. ตามลำดับ ส่วนสาร *l*-ephedrine และ *p*-hydroxymethampheta- mine นั้น สามารถวิเคราะห์ได้ที่ความเข้มข้น 512 และ 1,250 เท่าของความเข้มข้นของเมทแอมเฟตามีนตามลำดับ และยังพบว่ายา และสารเคมีต่างๆ รวมทั้งปัสสาวะจากคนปกติไม่มีผลต่อปฏิกิริยา RLI นี้ ดังนั้น วิธี RLI ที่พัฒนาขึ้นนี้จึงมีประโยชน์เมื่อใช้ร่วมกับวิธี RLI ที่ถูกพัฒนาเพื่อการวิเคราะห์แอมเฟตามีน (*J. Immunol. Methods, 157* (1993) 189-195) ในการแยกแยะว่าในปัสสาวะของผู้เสพนั้นมีสารแอมเฟตามีนหรือสารเมทแอมเฟตามีน.

จากข้อมูลที่ได้เกี่ยวกับความไวและความจำเพาะของวิธี RLI ที่กล่าวข้างต้น ประกอบกับข้อมูลที่มีอยู่ในวารสารต่างๆเกี่ยวกับความไว และความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์สารประเภทแอมเฟตามีนที่เคยถูกพัฒนามาก่อนทำให้สามารถสังเคราะห์แนวความสัมพันธ์ของโครงสร้างทางเคมีของอิมมูโนเจนที่ใช้กระตุ้น กับความจำเพาะของแอนติบอดี้ที่สัตว์ผลิตขึ้นตอบสนองความสัมพันธ์ในด้านโครงสร้างและความจำเพาะ (immunogen structure and antibody specificity relationship) นี้ เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อความเข้าใจความจำเพาะของแอนติบอดี้ และต่อการวางแผนการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารประเภทแอมเฟตามีนโดยทางอิมมู-

โนในอนาคต โดยสามารถกล่าวโดยสรุปดังนี้คือ ก) วิธีวิเคราะห์ที่ใช้ตรวจเฉพาะสารแอมเฟตามีน หรือเมทแอมเฟตามีน อย่างใดอย่างหนึ่งเพียงอย่างเดียว ควรพัฒนาโดยเริ่มต้นจากการใช้อิมมูโนเจนที่สังเคราะห์จากสารแอมเฟตามีน (หรือเมทแอมเฟตามีน) ที่เชื่อมจาก para-position ของ phenyl ring วิธีการวิเคราะห์นี้จะแสดงปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross reaction) น้อยมากต่อสาร secondary (หรือ tertiary amines) แต่จะแสดงปฏิกิริยาข้ามกลุ่มอย่างรุนแรงต่ออนุพันธ์ประเภท ring substituted (เมท) แอมเฟตามีน ข) วิธีวิเคราะห์ที่สามารถใช้ตรวจพบได้ทั้งสารแอมเฟตามีน และเมทแอมเฟตามีน ควรพัฒนาโดยเริ่มต้นจากการใช้แอมเฟตามีน (ไม่ใช้เมทแอมเฟตามีน) ที่เชื่อมต่อที่ amino group เป็นสารอิมมูโนเจน วิธีการวิเคราะห์ที่ได้จะแสดงปฏิกิริยาข้ามกลุ่มน้อยมากกับสารประเภท tertiary amines อื่นๆ และ phenyl-substituted แอมเฟตามีน หรือเมทแอมเฟตามีน.

Copyright by Mahidol University

Thesis title : Immunoassays of Amphetamines: Structure of Immunogen versus Antibody Specificity.

Name : Porntip Suttijitpaisal

Degree : Master of Science (Microbiology)

Thesis Supervisory Committee:

Kavi Ratanabanangkoon	Ph.D.
Stitaya Sirisinha	D.M.D.,Ph.D.
Chalobon Yoosook	Ph.D.
Leera Kittigul	Ph.D.

Date of Graduate : 31 October B.E. 2537 (1994)

ABSTRACT

The present study was carried out with 2 objectives. The first objective was to develop an immunoassay based on a reverse latex agglutination inhibition (RLI) test using antibody raised against methamphetamine. The characteristics of the test with respect to sensitivity and specificity were recorded. The second objective was to formulate a "structure-specificity" relationship using the specificity data gathered above on specificity, together with all available information on immunoassays of amphetamines, especially with regard to the structure of immunogen used and the specificity.

Copyright by Mahidol University

methamphetamne but contained an extra 4 atom extension from the amino groups. This derivative was then conjugated with purified tetanus toxoid (PTT) by using a carbodiimide coupling reagent. The conjugate was used to raise antibody in rabbits. The antibody, purified by ammonium sulfate precipitation followed by ion-exchange chromatography on DEAE-Sephadex, was used to coat latex particles. These antibody-sensitized latex particles agglutinated in the presence of an antigen prepared by conjugating APMA to bovine serum albumin. Various drugs and chemicals were tested for their ability to inhibit this agglutination reaction. The optimal conditions for the reverse latex agglutination inhibition (RLI) test were established. Specifically, the latex particles were coated with 150 μg/ml of IgG at 37°C for 30 mins in 0.1 M glycine buffered saline, pH 8.2. In the inhibition reaction, drugs and chemicals were preincubated with IgG-sensitized latex particles at 37°C for 30 mins. It was found that the sensitivities of the RLI for methamphetamine and amphetamine were 0.25 μg/ml and 14.6 μg/ml, respectively. *l*-Ephedrine and *p*-hydroxymethamphetamine respectively, were 512 and 1,250 times, respectively less reactive than methamphetamine in this RLI test. Various commonly used drugs and chemicals including urine failed to inhibit the RLI reaction. This RLI test, when used in combination of the RLI test for amphetamine reported earlier (*J. Immunol. Methods 157,* (1993) 189-195) would distinguish which of the amphetamines (methamphetamine or amphetamine) was present in a urine sample.

Information on the structure of the immunogen used in this study and the specificity of the antibody obtained, together with corresponding data present in the literature have allowed the formulation of a "structure-specificity" pattern, delineated on the basis of immunochemistry and stereochemistry. The "structure-specificity" relationship should be useful for future developments of these immunoassays. Specifically, immunoassays intended to detect either amphetamine or methamphetamine with minimal cross-reaction, should employ immunogen with amphetamine (or methamphetamine) derivatized via the para position of the phenyl ring. Such assays

should show minimal cross-reaction with other secondary (or tertiary) amines but should strongly cross-react with phenyl ring substituted analogs. On the other hand, assays intended for detection of both amphetamine and methamphetamine should employ amphetamine (rather than methamphetamine) derivatized via its amino group as an immunogen. Such assays should show minimal cross-reaction with other tertiary amines and phenyl-substituted amphetamine/methamphetamine.

Copyright by Mahidol University