اندازه گيري غلظت مرفين ۶ گلوكورونيد با استفاده از روش بهبود يافته ELISA

سيمين عذار مشايخي[1]*، محمدرضا قندفروش ستاري[1]، ريچارد هين[2] و ليزت نيكسون[2]

[1].دانشكده داروسازي تبريز و مركز تقيقات هماتولوژي و آنكولوژي، دانشگاه علوم پزشكي تبريز، [2] دانشكده پزشكي دانشگاه كارديف بريتانيا

تاريخ دريافت: ٨٥/١٢/٢١ ، تاريخ پذيرش: ٨۶/۴/١٠

Morphine-6-glucuronide assay using a competitive ELISA assay

Mashayekhi S.O.*[1], Ghandforoush-sattari M.R.[1], Hain R.W.D.[2], Nixon L.S.[2]

[1] Faculty of Pharmacy, Hematology and Oncology Research Center Tabriz University of Medical Sciences, [2] School of Medicine, Cardiff University, Wales, UK.

Received: 2007/3/12 , Accepted: 2007/7/1

Objectives: Morphine 6–glucuronide (M6G), a metabolite of morphine, is considerably more potent analgesic than morphine itself. M6G in serum is particularly difficult to measure, due to low lipophilicity of the molecule and low serum concentrations after usual parenteral doses of morphine. **Methods:** A competitive ELISA assay was developed to measure the concentration of M6G in serum and buffer samples. This competitive ELISA method effectively measured the degree to which samples containing an unknown amount of antigen (M6G) compete with a fixed concentration of an anti-body (R_{29}). **Results:** The method was shown to be sensitive and reproducible with low intra-assay and inter-assay variation, low matrix effect and low cross reactivity. The method was simple and easy to use, and several samples (10 to 35 samples on each plate) could be analyzed simultaneously. **Conclusion:** The major advantage of the ELISA method over HPLC was the use of a very small volume (as little as 20 µl) for the assay. This advantage is important in the case of measuring M6G when it is not feasible to obtain a large volume of sample, for example in samples from newborn babies and children.

Keywords: *Morphine-6-glocuronide, ELISA, assay.*

زمينه و هدف: مرفين داروي ضد درد قوي اپيوئيدي است كه در كبد به دو متـــــابوليت مرفين-٣-گلوكورونيد و مرفين ۶-گلوكورونيد (M6G) متابوليزه مي شود. مرفين ۶-گلوكورونيد يك تركيب با فعاليت ضد دردي بالاتري نسبت به مرفين است كه ميتواند به عنوان جايگزين مرفين در درمان دردهاي شديد اســـــــفاده شود. **روش ها:** اندازه گيري غلظت سرمي مرفين ٦-گلوكورونيد به دليل چربي دوستي بالاي مولكول و غلظت سرمي كم آن بعد از تجويز دوزهاي نرمال وريدي مرفين، توسط روش هاي اندازه گيري رايج دشوار بوده و نياز به ابداع يك روش جديد براي اندازه گيري آن ضروري به نظر مي رسيد. **يافته ها:** در مطالعه حاضر يك روش ELISA رقابتي براي اندازه گيري غلظت مرفين ٦-گلوكورونيد در سرم و ساير محلول ها ارائه گرديد. در اين روش يك آنتي بادي (M6G–ovalbumin) با پيوند ضعيف كووالانسي به سطح پلاستيكي چاهك هاي ميكروتيتر متصل شده و ميزان رقابت مرفين ٦-گلوكورونيد و يك آنتي بادي اختصاصي (R_{29}) براي اتصال به M6G–ovalbumin انـــــدازه گيــري مي شود. **نتيجه گيري:** اين روش يك روش ساده، تكرار پذير، حساس و اختصاصي براي اندازه گيري سطح سرمي مرفين ٦-گلوكورونيد بوده و غلظت آن در مقدار بسيار كم سرمي (20 µl) قابل اندازه گيري مي باشد. از ديگر مزاياي روش ارائه شده اندازه گيري همزمان چندين نمونه (١٠ تا ٣٥ نمونه) در يك پليت مي باشد.

واژه هاي كليدي: *مرفين ۶ گلوكورونيد، الايزا.*

*نويسنده مسئول: دكتر سيمين عذار مشايخي، استاديار، دانشكده داروسازي دانشگاه علوم پزشكي تبريز، تلفن: ٠٤١١-٣٣٩٢٥٩٣، نمابر: ٠٤١١-٣٣٤٤٧٩٨

**Corresponding Author: Dr Simin Mashayekhi, Assistant Professor, Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tel: 0411-: 3392593; Fax: 0411-3344798; E-mail mashayekhis@yahoo.co.uk*

۱- مقدمه

بخش عمده اي از مرفين در كبد (۱, ۲) و در حد جزئي در ارگانهاي ديگر از جمله مغز (۳, ٤) و كليه ها (5) متابوليزه شده و فقط قسمت كمي از آن به صورت تغيير نيافته دفع مي شود. مرفين ۶-گلوكورونيد (10–15%) و مـــــرفين ۳-گلوكورونيد (45-55%, M3G) مهم ترين متابوليت هاي مرفين مي باشد. از بين اين دو متابوليت، مرفين ۳-گلوكورونيد نه تنها داراي فعاليت ضد دردي نيست (٦) بلكه اثرات آنتاگونيستي مرفين را نيز دارد (۷). در مقايسه، مرفين ۶-گلوكورونيد يك متابوليت فعال بوده و حتي قدرت ضد دردي آن به مراتب از مرفين بيشتر است [۹۰ برابر بيشتر در صورت تزريق داخل نخاعي (intrathecal) و ٦۵۰ برابر بيشتر در صورت تزريق در داخل بطن هاي مغز (Intracerebroventricular)] (۸). در مطالعه اي كه توسط Osborne و همكاران صورت گرفت نشان داده شد كه در زماني كه غلظت پلاسمايي مرفين و مرفين ۳-گلوكورونيد به يك حد غير قابل تشخيص رسيده بود اثرات ضد دردي هنوز مشاهده ميشد كه اين اثر به مرفين ۶-گلوكورونيد نسبت داده مي شود (۹).

مطالعات مختلف نشان داده است كه غلظت پلاسمايي مرفين يا حتي غلظت مرفين در مايع مغزي- نخاعي رابطه ضعيفي با ميزان اثرات ضد دردي آن دارد (۱۰, ۱۱). از طرف ديگر به نـــــظر مي رسد مرفين ۶-گلوكورونيد با قدرت ضد دردي بيشتري كه نسبت به مرفين دارد (۸) مسئول بخش قابل توجهي از اثرات ضد دردي مرفين، بخصوص بعد از تـــــجويز طولاني مدت است (۱۲ و ۱۳). مرفين ۶-گلوكورونيد در نمونه هاي سرمي توسط روشهاي مختلف از جمله گازكروماتوگرافي و كروماتوگرافي با كارايي بالا (HPLC) و با استفاده از رديابهاي مختلف از جمله رديابهاي فلورسانس، ماوراء بنفش (UV) و الكتروشيميايي انـــدازه گيري مي شود ولي به دليل چربي دوستي بالاي اين تركيب، روش هاي موجود استخراج و اندازه گيري غلظت پلاسمايي آن به اندازه كافي حساس نبوده و قادر به اندازه گيري غلظت هاي پلاسمايي آن در اوايل تجويز مرفين و يا در انتهاي منحني غلظت- زمان نيستند. به عنوان مثال حساسيت گزارش شده در مطالعات مختلف با استفاده از روش كروماتوگرافي با كارايي بالا عبارت بود از: 5 ng/ml با استفاده از ۰٫5ml پلاسما (١٤)، 1.0 ng/ml با استفاده از 0.6 ml پلاسما (١٥)، 5 ng/ml با استفاده از 0.6 ml پلاسما (١٦)، 0.5 ng/ml با استفاده از 0.5 ng/ml پلاســـما (١٧)، 5 ng/ml با استفاده از ۱ml پلاسما (١٨). همان گونه كه مشخص است حجم بالايي از نمونه ها در اين متد ها استفاده شده است كه در مواردي كه امكان گردآوري اين مقدار نمونه وجود ندارد (مانند گردآوري نمونه هايي از نوزادان) اين متد ها غير قابل استفاده خواهند بود. لذا با وجود اهميت اين تركيب ارائه يك روش اندازه گيري حساس ضروري به نظر رسيد.

۲- مواد و روش ها

۲-۱: مواد لازم و دستگاه ها

مـرفين ۶-گلوكورونيد (Sigma–Aldrich، آمريكا) آمينوبوتيل نورمرفين-۶-گلوكورونيداوآلبومين (aminobutylnormorphine – 6 glucuronide ovalbumin و يا به اختصار M6G– ovalbumin) (۱۹)

R_{29} (دانشگاه ساري- انـــگلستان): براي تهيه اين تركيب، موقعيت N يـــــــك هاپتن سنتتيك به نام N-آمينو بـــوتيل نورمرفين (N–aminobutylnormorphine–6 glucuronide) به تيروگلوبولين كونژوگه شده و همزمان با واكسن BCG به خرگوش ها تزريق شد. تزريق بعد از ۹ و ۲۳ هفته تكرار و خون از اين خرگوش ها اخذ و سرم آن را جدا وبعد از افزودن سديم آزيد در دماي 4° C نگهداري مي شد (19). R_{29} در اتصال به M6G– ovalbumin با مرفين ۶-گلوكورونيد رقابت مي كند.

آنتي بادي IgG خرگوش(Sigma–Aldrich، آمريكا)

سوبستراي فسفاتاز Sigma 104® (Sigma–Aldrich، آمريكا)

پودر ژلاتين (G) (BDH – آمريكا)

EDTA (مرك- آلمان)

ديانانول آمين (Sigma–Aldrich، آمريكا)

مرفين، مـــــرفين ۳-گلوكورونيد، نورمرفين، ديـــامرفين، كدئين و مرفيـــــن ۳و ٦-دي گلوكورونيد (M3,6DG) و نالورفين (Sigma–Aldrich، آمريكا)

۲-۲: بافر ها و محلول هاي مورد استفاده

بافر بيكربنات (pH=9.6)، بافر فسفات (PBS, pH = 7.4)، بافر تريس (TBS, pH=9.6)، TBSGT/EDTA (TBS بعلاوه ۰٫۱% ژلاتين و ۰٫۱% توين 20، EDTA ۲۰ mmol/L، pH=7.0)، محلول شستشو حاوي يك درصد توين20 در آب ديونيزه.

۲-۳: دستگاه ها

پليت ها توسط دستگاه Microplate reader (BIO–RAD ،UK، مدل 3550) خوانـــــده شده و يافته ها توسط برنامه Microplate Manager آناليز مي شد.

۲-٤: روش كار

متد اوليه براي اندازه گيري مرفين ۶-گلوكورونيد توسط ريچارد هين در سال 1996 (۷) ارائه شد بود ولي در روش ارائه شده اثر ماتريس سرم فاقد دارو بسيار بالا (۵-۱۰% كل پيوندها) و حساسيت آن پايين بود(0.8 ng/ml براي نمونه هاي فاقد اثر ماتريس مانند بافر) و اختلاف بالايي بين نتايج مربوط بـــه نمونه هاي يكسان وجود داشت كه استفاده از آن را به صورت روتين غير ممكن مي ساخت لذا تغييراتي در جهت بهبودي آن انجام گرديد كه به شرح زير مي باشد:

۲-٤-۱: پوشش (Coating)

رقت هاي مختلفي از M6G–ovalbumin (۱ قسمت در 5000 و 20000 در بافر بيكربنات) و R_{29} (۱ قسمت در 10000 و 30000 در

محلول TBSGT/EDTA) تهيه شد و منحني استاندارد با هر كدام تهيه گرديد. زماني كه رقت 1/20000 از M6G–ovalbumin و 1/30000 از R_{29} استفاده شد، اختلاف بين جذب نوري نمونه سرمي بدون حضور مرفين ٦-گلوكورونيد (ماكزيمم اتصال R_{29} با نام اختصاري B_0) و جذب نوري بالاترين غلظت استفاده شده استاندارد به حداكثر مقدار خود رسيد. با توجه به اين كه هر چه قدر اين اختلاف بزرگ تر باشد حساسيت متد بيشتر خواهد بود از اين دو رقت براي اندازه گيري نمونه ها استفاده شد.

۲-٤-۲: بلوكه كردن (**Blocking**)

از آنجايي كه جذب نوري پيوندهاي غير اختصاصي (NSB) و اثر ماتريس نمونه هاي سرمي فائد دارو بالا بود يك مرحله بلوكه كردن به روش اضافه شد. براي انتخاب بهترين روش بلوكه كردن يك پليت به سه قسمت تقسيم شد و قسمت اول با محلول ۱% ژلاتين در PBS، قسمت دوم با محلول ۱% آلبومين گاوي (BSA) در PBS بلوكه شد. قسمت سوم بلوكه نشد. از بين محلول هاي فوق محلول ۱% ژلاتين در PBS حداكثر تفاوت بين جذب نوري بالاترين و پايين ترين نمونه استاندارد و نسبت اين اختلاف به B_0 را داشت. ميزان پيوند غير اختصاصي در تمام حالات مشابه بود.

۲-٤-۳: تركيب و **pH** بافر

تركيبات و pH هاي مختلفي براي بافر استفاده شده براي رقيق كردن محلول هاي استاندارد و نمونه هاي سرمي، آزمايش شد كه شامل PBSGT، PBSGT+EDTA، PBST+BSA, PBST+HSA, TBSGT, TBSGT+EDTA و TBST+BSA+EDTA بود كه غلظت ژلاتين (G) و توين (T) ۰,۱% و غلظت آلبومين انساني (HSA) و گاوي (BSA) ۱% بود. زماني كه از محلول TBSGT استفاده شد بالاترين جذب نوري براي نمونه هاي سرمي بدون دارو مشاهده شد كه به معني اثر ماتريسي پايين تري بود. بعلاوه وقتي EDTA به محلول TBSGT اضافه شد كاهش بيشتري در اثر ماتريس مشاهده گرديد لذا محلول TBSGT+EDTA براي كارهاي آتي استفاده گرديد.

از بين بافر هاي فوق pH هاي مختلفي (۷، ۷,۵، ۸ و ۹) از بهترين بافر (TBSGT+EDTA) مـــورد بررسي قرار گرفت. زماني كه از pH = 7.0 اين بافر استفاده شد اختلاف بين جذب نوري مربوط به محلول استاندارد با بالاترين و پايين ترين غلظت و نسبت اين اختلاف به جذب نوري مربوط به B_0 بيشتر از بقيه بود.

۲-٤-٤: روش اندازه گيري

مراحل مختلف متد به نحو زير بود:

۱. در پليت هاي حاوي ۹٦ چاهك ميكرو تيتر ، هر چاهك با 150µl از محلول M6G–ovalbumin 1/20000 در بافر بيكربنات پر شده و بعد از حداقل يك شب انكوباسيون در دماي 4° C پليت ها با استفاده از محلول شستشو، ۲ بار شستشو داده مي شدند.

۲. در مرحله بعد هر چاهك توسط 200 µl محلول ۱% ژلاتين در محلول بافر فسفات به مدت ۳۰ دقيقه بلوكه شده و بعد از اين مدت پليت ها ۲ بار شستشو داده مي شدند.

۳- در روز آزمايش محلول هاي استاندارد مرفين ٦-گلوكورونيد با غلظت هاي بين 0.017 – 333.33 ng/ml در محلول TBSGT/EDTA از يك محلول استوك 1 mg/ml تهيه مي شد. سه رقت (۱:۱۰، ۱:۲۰ و ۱:٤۰) از نمونه ها و نمونه هاي مربوط به كنترل كيفيت نيز تهيه مي شد. هر چاهك نمونه و كنترل كيفيت و استاندارد حاوي 50 µl محلول R_{29} و به ترتيب 100 µl از رقت نمونه، كنترل كيفيت و استاندارد بود. در هر پليت ۲ سري چاهك براي B_0 (ماكزيمم اتصال R_{29}) و پيوندهاي غير اختصاصي (NSB) در نظر گرفته مي شد كه چاهك مربوط به B_0 حاوي 100 µl از محلول TBSGT/EDTA و50 µl از محلول R_{29} بود و چاهك NSB حاوي 150 µl از محلولTBSGT/EDTA بود. براي هر كدام از نمونه ها و محلول ها دو چاهك در پليت در نظر گرفته مي شد. شمايي از نحوه نمونه گذاري يك پليت در شكل ۱ نشان داده شده است.

۳.سپس پليت ها به مدت ۱۲۰ دقيقه در انكوباتور در دماي 37° C لرزانده مي شدند. بعد از اتمام اين زمان پليت ها به مدت ۱۵ دقيقه در دماي اتاق قرار داده شده سپس پليت ها ۲ بار شستشو داده مي شدند.

٤.در مرحله بعد مقدار 150 µl از آنتي بادي دوم (آنتي بادي ضد IgG خرگوش) با غلظت 1:5000 به هر چاهك افزوده شده و پليت ها به مدت ۳۰ دقيقه در دماي اتاق لرزانده مي شدند. بعد از اين مرحله پليت ها ۳ بار شستشو داده مي شدند.

۵.سپس 150 µl از محلول1 mg/ml از سوبـــستراي فسفاتاز Sigma 104® در بافر ۱۰% دي اتانول آمين به هر چاهك افزوده شده و زماني كه جذب نوري چاهک هاي B_0 مـــعادل 1.5– 1 مي شد، جذب نوري تمام چاهك ها توسط دستگاه microplate reader خوانده مي شد (طول موج فرائت= ٤۰۵ nm و طول موج رفرانس = ٤۹۰ nm).

٦. اين يافته ها توسط برنامه Microplate Manager آناليز شده و نمودار استاندارد رسم مي شد و غلظت نمونه ها محاسبـــــه مي گرديد. شكل ۲ نمونه يك منحني استاندارد را نشان مي دهد و جدول ۱ نتايـــج مربوط به آزمايش يك كيت بر روي سه دسته نمونه مربوط به استاندارد، NSB ، و كنترل كيفيت را نشان مي دهد.

۲-٤-۵: بررسي اثر ماتريس

بررسيها نشان داد كه نمونه سرمي عاري از هر گونه دارو داراي قدرت جذب مي باشد. بنابراين بررسي اثر ماتريس خود سرم بر روي متد و ميزان ضروري رقيق شدن براي حذف اين اثر لازم

بود لذا رقت هاي ١:١٠، ١:٢٠، ١:٤٠، ١:٨٠ و ١:١٠٠ از سرم فاقد دارو مطابق روش روتين آزمايش گرديد.

٢-٤-٦: حساسيت متد

حساسيت هر متد اندازه گيري، حداقل غلظت قابل اندازه گيري است كه از غلظت صفر قابل تشخيص باشد. در اين متد، حساسيت، ميزان پيوند ايجاد شده توسط حداقل غلظتي است كه از حداكثر پيوند ايجاد شده (B_0) قابل تشخيص باشد. لذا در يك پليت ٢٤ چاهك B_0 تعبيه گرديد وبا پليت مطابق متد روتين رفتار شد. در صورت توزيع يكنواخت جذب نوري B_0 ، جذب نوري بزرگتر از ميانگين منهاي دو برابر انحراف معيار، غير قابل تمايز از جذب نوري B_0 خواهد بود كه حساسيت متد را مشخص خواهد كرد (جدول ٢).

٢-٤-٧: پيوندهاي غير اختصاصي (NSB)

NSB، جذب نوري توليد شده توسط بافر در غياب مرفين ٦-گلوكورونيد يا R_{29} است. در متد ارائه شده توسط ريچارد هين (٧) اين مقدار بالا بود (٥-١٠%) كه روي حساسيت متد تاثير مي گذاشت با تغييرات اعمال شده ميزان NSB كاهش يافت كه با اندازه گيري ميانگين پيوندهاي ايجاد شده در ٢٠ چاهك مربوط به NSB، ميزان پيوند غير اختصاصي محاسبه گرديد.

٢-٤-٨: تست اختصاصي بودن متد (Specificity)

براي بررسي اختصاصي بودن متد براي مرفين ٦-گلوكورونيد، شش ماده اوپياتي شامل مرفين، مرفين ٣-گلوكورونيد، نورمرفين، ديامرفين، كدئين و مرفين ٣و ٦-دي گلوكورونيد و در نهايت نالورفين كه از نظر ساختماني مشابه مرفين ٦-گلوكورونيد است، در نظر گرفته شد و غلظت هاي مختلفي از آنها تهيه گرديد. اين غلظت ها مطابق روش روتين در متد اندازه گيري، آزمايش شد و غلظت ظاهري مرفين ٦-گلوكورونيد ايجاد شده توسط اين تركيبات مشخص گرديد (شكل٣ و جدول ٣).

٢-٤-٩: ميزان هماهنگي منحني استاندارد سرم و بافر

براي بررسي اين هماهنگي ٢ سري محلول استاندارد تهيه شد: يك سري در بافر، يك سري درسرم، و هماهنگي بين آنها بررسي شد. از طرف ديگر چون در تست ها ازمحلول هاي رقيق شد سرم استفاده مي شد، اين تست مجددا با مقايسه منحني استاندارد در بافر با منحني استاندارد محلول هاي استاندارد تهيه شده در سرم رقيق شده با رقت هاي ١:١٠ ، ١:٢٠ و١:٤٠ تكرار گرديد.

٢-٤-١٠: تغييرات درون روزي (intra-assay) و بين روزي (inter-assay)

براي بررسي تغييرات درون روزي با استفاده از ٥ سري از رقتهاي مرفين ٦-گلوكورونيد، ٥ منحني استاندارد در يك پليت تهيه شد و براي بررسي تغييرات بين روزي با استفاده از ٥ سري رقتهاي مرفين ٦-گلوكورونيد، ٥ منحني استاندارد در ٥ پليت مختلف تهيه شد. اين پليت ها مطابق روش روتين آزمايش شدند.

٢-٤-١١: اثر مدت زمان پوشش چاهك ها بر روي متد

براي بررسي اثر طول مدت پوشش چاهك ها توسط محلول M6G–ovalbumin، چهار قسمت يك پليت به فاصله زماني ٣، ٢ و ١ ماه و ٣ روز قبل از اندازه گيري، پوشش داده شد و در اين مدت پليت در دماي 4° C نگهداري شد. درهر قسمت پليت ٥ محلول استاندارد، دو رقت از يك نمونه سرمي بدون دارو (١:١٠ و١:٢٠) و سه رقت از يك نمونه سرمي داراي مرفين ٦-گلوكورونيد با غلظت١٠٠ ng/ml (١:١٠، ١:٢٠ و ١:٤٠) مورد بررسي قرار گرفت و نتايج با استفاده از تست ANOVA مقايسه شد.

٢-٤-١٢: تست مقدار بازيافت (Recovery)

سه غلظت (١٠و ٥٠ و ١٠٠ ng/ml) از مرفين ٦-گلوكورونيد در سرم تهيه شد و ازهر كدام ٣ نمونه دوتايي در يك پليت تعيين غلظت گرديد. غلظت هاي اندازه گرفته شده با غلظت هاي اوليه مقايسه گرديد.

٣- نتايج

٣-١: اثر ماتريس

آزمايش نشان داد كه رقت ١:١٠ از سرم فاقد دارو، غلظت ظاهري معادل ٢ ng/ml از مرفين ٦-گلوكورونيد را از خود نشان مي دهد و رقيق كردن بيشتر موجب شد كه اثر ماتريس سرم كاملاً حذف شود. رقت هاي بيشتر از ١:٢٠ سرمي فاقد اثرات ماتريس چشم گيري بود يعني غلظت ظاهري مرفين ٦-گلوكورونيد ايجاد شده توسط اين نمونه ها صفر يا كمتر از حساسيت متد بود.

٣-٢: حساسيت متد

جذب نوري مربوط به چاهك هاي B_0 به صورت يكنواخت توزيع شده بود. ميانگين جذب نوري اين ٢٤ چاهك ١,٢٢ بود (جدول ٢) و «ميانگين منهاي دو برابر انحراف معيار» معادل ١,٠٥٧ بود. بنا به منحني استاندارد، اين جذب نوري معادل جذب نوري ايجاد شده توسط غلظت 0.038 ng/ml از مرفين ٦-گلوكورونيد بود.

درنتيجه، اين غلظت، حداقل غلظت قابل تفكيك از صفر بود، منتها اين براي نمونه هاي بافري صدق مي كند و از آنجايي كه نمونه هاي سرمي را بايد ٢٠ مرتبه رقيق كرد تا اثر ماتريس آن ها حذف شود، حساسيت متد براي اين گونه نمونه ها معادل 0.76 ng/ml محاسبه گرديد.

٣-٣: پيوند هاي غير اختصاصي (NSB)

در متد ارائه شده توسط ريچارد هين (٧) ميزان NSB معادل ٥-١٠% كل پيوند ها بود ولي با استفاده از روش جديد، ميزان NSB فقط معادل ٣% كل پيوند ها بود.

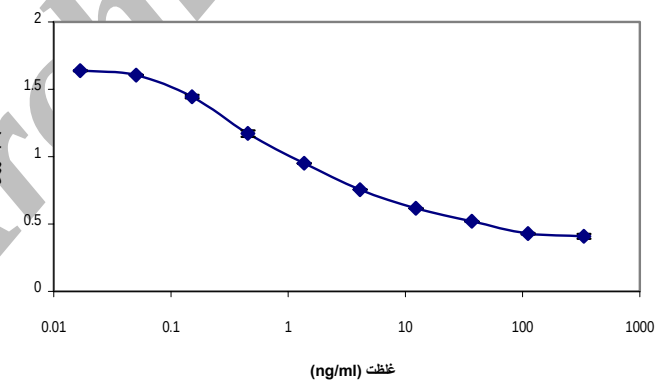
۴-۳: تست اختصاصي بودن متد (Specificity)

بـــررسي غلظت ظاهري مـــرفين ٦-گلوكورونيد ايجاد شده توسط چنديـــــن غلظت اوپيوئيد هاي مختلف (مرفين، مرفين ۳-گلوكورونيد، نورمرفين، ديامرفين، كدئين و نالورفين)، عدم وجود واكنش متقاطع (Cross-reactivity) را با آنتي بادي ضد مرفين ٦-گلوكورونيد (R_{29}) نشان داد (جدول ۳). حتي غلظتهاي بسيار بالاي اين تركيبات (مثلا ۱۰۰۰ ng/ml)، جذب نوري كمتري از حساسيت متد را داشت.

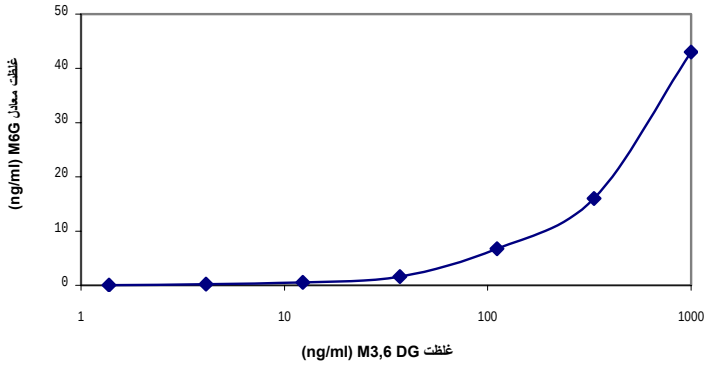
از بين تركيبات آزمايش شده فقط مرفين ۳ و ٦-دي گلوكورونيد داراي واكنش متقاطع بالايي با مرفين ٦-گلوكورونيد بود (شكل ۳). با وجود اين واكنش متقاطع بالا، احتمال بروز اين تداخل در نمونه هاي باليني بسيار پائين است. دليل اين مسئله، غلظت هاي بسيار پائين مرفين ۳ و ٦-دي گلوكورونيد درسرم به دنبال تجويز اوپيوئيد ها است، كه در بـــــــيشتر موارد حتي قابـــــل اندازه گيري نميباشد (٦).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0.017	0.050	0.151	0.455	1.365	4.099	12.31	36.96	111.11	333.33	B_0	NSB	استاندارد ها (ng/ml)
B	0.017	0.050	0.151	0.455	1.365	4.099	12.31	36.96	111.11	333.33	B_0	NSB	تكرار استاندارد ها
C	Qc_1	Qc_2	S_1	S_2	S_3	S_4	S_5	S_6	S_7	S_8	S_9	S_{10}	رقت اول
D	Qc_1	Qc_2	S_1	S_2	S_3	S_4	S_5	S_6	S_7	S_8	S_9	S_{10}	تكرار رقت اول
E	Qc_1	Qc_2	S_1	S_2	S_3	S_4	S_5	S_6	S_7	S_8	S_9	S_{10}	رقت دوم
F	Qc_1	Qc_2	S_1	S_2	S_3	S_4	S_5	S_6	S_7	S_8	S_9	S_{10}	تكرار رقت دوم
G	Qc_1	Qc_2	S_1	S_2	S_3	S_4	S_5	S_6	S_7	S_8	S_9	S_{10}	رقت سوم
H	Qc_1	Qc_2	S_1	S_2	S_3	S_4	S_5	S_6	S_7	S_8	S_9	S_{10}	تكرار رقت سوم

شكل ۱: نحوه نمونه گذاري يك پليت(نمونه هاي كنترل كيفي = Qc S , = نمونه)



شكل ۲: منحني استاندارد M6G



شكل ٣: واكنش متقاطع مربوط به مرفين ٣ و ٦ دي گلوكورونيد با M6G

جدول ١: نتايج آزمايش يك كيت بر روي نمونه هاي استاندارد، پيوندهاي غير اختصاصي (NSB) و كنترل كيفيت.

نمونه	غلظت مرفين ٦ – گلوكورونيد (ng/ml)	جذب نوري	انحراف معيار
استاندارد ١	٣٣٣/٣	٠/٤٠٩	٠/٠١١٨
استاندارد ٢	١١١	٠/٤٢٨	٠/٠٠٦
استاندارد ٣	٣٦/٩٦	٠/٥١٩	٠/٠٠١
استاندارد ٤	١٢/٣١	٠/٦١٦	٠/٠٠١
استاندارد ٥	٤/٠٩٩	٠/٧٥٥	٠/٠٠١
استاندارد ٦	١/٣٦٥	٠/٩٥٠	٠/٠٠١
استاندارد ٧	٠/٤٥٤٥	١/١٧١	٠/٠٢٣
استاندارد ٨	٠/١٥١٤	١/٤٤٥	٠/٠١٢
استاندارد ٩	٠/٠٥٠٤	١/٦٠٦	٠/٠٠١
استاندارد ١٠	٠/٠١٦٧٨	١/٦٣٨	٠/٠٠٣
NSB	٠	٠/٠٣١	٠/٠٢٥
كنترل ١	١٠	٠/٦٥٥	٠/٠٣٢
كنترل ٢	٥٠	٠/٥٠٠	٠/٠١٤
كنترل ٣	١٠٠	٠/٤٤٠	٠/٠٥٤

جدول ۲: جذب نوري ۲٤ چاهك مربوط به B0 در يك پليت.

۱/۱۹۹	۱/۲۵٦	۱/۳۰۲	۱/۰۸۷	۱/۲٦	۱/۱۵۱
۱/۲۵٦	۱/۱۸	۱/۳٤۸	۱/۱۵۵	۱/۰۵۷	۱/۲۳۳
۱/۲۸۷	۱/۲۲	۱/۲۷۹	۱/۱٦٤	۱/۰۸۷	۱/۲۹٦
۱/۲٦۱	۱/۲۳۱	۱/۳۳٦	۱/۱٤۲	۱/۱۸۸	۱/۲۸۰
	۱/۲۲			میانگین	
	۰/۰۸			انحراف معیار	

جدول ۳: غلظت ظاهري مرفين ٦-گلوکورونيد ايجاد شده توسط اويوئيد هاي مختلف.

غلظت تست شده	غلظت ظاهري مرفين ٦-گلوکورونيد (ng/ml)، ايجاد شده توسط:					
(ng/ml)	مرفين	کدئين	نالورفين	نورمرفين	مرفين ۳ - گلوکورونيد	ديامرفين
۱۰۰۰/۰	۰/۰٤۲	۰/۰۱۰٦	۰/۰۱۰٤	۰/۰۹۸	۰/۰۸٤	۰/۰٤۱
۱۰۰/۰	۰/۰۹٦	۰/۰۱۱۵	۰/۰۹٤	۰/۰٤٦	۰/۰۹۵	۰/۰۳۵
۱۰/۰	۰/۱۱۰	۰/۰۲۷	۰/۰۱۱۵	۰/۰۳۵	۰/۰۹۲	۰/۰۳۸
۱/۰	۰/۰٦۸	۰/۰۲۹	۰/۰۱۲۲	۰/۰۲۷	۰/۰۹٦	۰/۰۳۲
۰/۱	۰/۰۱۱۱	۰/۰۱۱	۰/۰۱۳۸	۰/۰۱۸	۰/۰۹۰	۰/۰۱۷
۰/۰۱	۰/۰۹۵	۰/۰۰٦	۰/۰۱۳٤	۰/۰۱۲	۰/۰۸۳	۰/۰۰۸

۳-۵: ميزان هماهنگي منحني استاندارد سرم و بافر

دو منحني «جذب نوري - غلظت» براي محلول هاي استاندارد سرم و بافر موازي بودند ولي منحني استاندارد سرم، جذب نوري کمتري را داشت (R^2=۰/۲۳٤ و $P < 0.05$). منتها با توجه به اين که جذب نوري B_0 براي استاندارد هاي سرمي هم کمتر از جذب نوري B_0 براي استاندارد هاي بافر بود، در صورت محاسبه درصد اتصال براي هر غلظت (نسبت جذب نوري استاندارد ها به جذب نوري B_0 مربوطه)، تفاوت بين منحني هاي استاندارد بافر و سرم به حداقل رسيد و اختلاف بين آنها معني دار نبود (R^2=۰/۰٤۱ و $P > 0.05$). اين نتايج نشان داد که منحني استاندارد تهيه شده در بافر و سرم يك شكل و مشابه بودند و انتظار مي رفت که در صورتي که منحني هاي استانداردي که در رقت هاي ۱:۱۰، ۱:۲۰ يا ۱:٤۰ سرم تهيه شود، اين تشابه حتي بيشتر باشد. مقايسه نمودار استاندارد در اين سه غلظت با منحني استاندارد بافر نشان داد که تفاوت بين آنها نيز معني دار نيست ($P > 0.05$). بنـابر اين مي توان در تست هاي انجام شده به جاي منحني استاندارد تهيه شده در سرم از مشابه تهيه شده در بافر استفاده نمود.

۳-٦: تغييرات درون روزي و بين روزي

پنج منحني استاندارد تهيه شده در يك پليت، يكسان بوده و اختلاف معني داري بين منحني ها وجود نداشت ($P<0.001$) و ميانگين ضريب انحراف نسبي (Coefficient Variation, CV%) براي ۹ غلظت (N=5) معادل ۱/۲٦ ± ۳/۲۳% بود (جدول ٤). اين نشان دهنده مناسب بودن تكرار پذيري درون روزي متد مي باشد. مقايسه بين روزي منحني هاي استاندارد نشان داد که شباهت بين آنها کمتر از حالت فوق بوده ولي هنوز در حد قابل قبول بود. در اين بررسي نشان داده شد که ميانگين درصد ضريب انحراف نسبي براي ۱۰ غلظت (N=5) معادل ۳/۱ ± ۹/۲۳ % بوده که قابل قبول مي باشد (جدول ۵). اين نشان دهنده مناسب بودن تكرار پذيري برون روزي متد مي باشد.

۳-۷: اثر مدت زمان پوشش بر روي متد

آناليز دانت (Dunnett Test) اين اطلاعات نشان داد که تفاوتي بين منحني هاي استاندارد، NSB و نمونه هاي مرفين ٦-گلوکورونيد در سرمي در زمان هاي مختلف پوشش وجود ندارد ($P > 0.05$) و لذا مشخص شد که مي توان پليت ها را در بچ هاي بزرگتر پوشش داده و تا زمان آزمايش در دماي ٤ °C نگهداري کرد.

۳-۸: تست بازيافت

براي سه غلظت (۱۰و ۵۰ و ۱۰۰ ng/ml) از مرفين ٦-گلوکورونيد در سرم، ميزان بازيافت به ترتيب معادل ۹۸/۲%، ۱۰۱/۹% و ۱۰۵/۳% بود (جدول ٦).

جدول ٤: ميانگين جذب نوري و انحراف معيار و درصد ضريب انحراف نسبي مربوط به ٥ منحني استاندارد از يك پليت.

غلظت مرفين ٦-گلوكورونيد (ng/ml)	ميانگين جذب نوري	انحراف معيار	درصد ضريب انحراف نسبي
٣٣٣/٣٣	٠/٢٠٨٨	٠/٠١٠	٤/٨٠٦
١١١/١١	٠/٢٢١٠	٠/٠٠٨	٣/٨٢٦
٣٦/٩٦	٠/٢٥٤٨	٠/٠٠٤	١/٤٥٣
١٢/٣١	٠/٢٩٤٢	٠/٠١٣	٤/٤١٥
٤/٠٩٩	٠/٣٧٢٤	٠/٠٠٥	١/٢٦٨
١/٣٦٥	٠/٤٦٣٨	٠/٠١٨	٣/٩٧١
٠/٤٥٤٥	٠/٥٨٩٢	٠/٠١٦	٢/٦٥٠
٠/١٥١٤	٠/٧٠٨٠	٠/٠٢٠	٢/٨٧٢
٠/٠٥٠٤	٠/٨٤٤٤	٠/٠٣٢	٣/٨٣٣

جدول ٥: ميانگين جذب نوري وانحراف معيار و درصد ضريب انحراف نسبي مربوط به ٥ منحني استاندارد از٥ پليت.

غلظت مرفين ٦-گلوكورونيد (ng/ml)	ميانگين جذب نوري	انحراف معيار	درصد ضريب انحراف نسبي
٣٣٣/٣٠	٢٠/٥٦٦	١/٨٩٦	٩/٢١٩
١١١/٠٠	٢١/٥٩٥	١/٩٢٩	٨/٩٣٣
٣٦/٩٦	٢٥/٠٧١	٢/٩١٣	١١/٦١٩
١٢/٣١	٢٨/٨٣٢	٣/٧٥٦	١٣/٠٢٧
٤/٠٩٩	٣٦/٣٨٩	٤/٠٣٩	١١/١٠٠
١/٣٦٥	٤٥/٤٣٩	٥/٤٥٩	١٢/٠١٤
٠/٤٥٤٥	٥٨/١٨١	٥/٣٢٦	٩/١٥٤
٠/١٥١٤	٧١/٩٨١	٦/٦٩٦	٩/٣٠٢
٠/٠٥٠٤	٨٣/٥٠١	٥/٧٨٧	٦/٩٣٠
٠/٠١٦٨	٩٢/٤٦٥	٢/٧١٧	٢/٩٣٨

جدول ٦: نتايج تست بازيافت (Recovery).

غلظت تهيه شده مرفين ٦-گلوكورونيد (ng/ml)	ميانگين غلظت اندازه گرفته شده (ng/ml)	انحراف معيار	در صد بازيافت
١٠	٩/٨٢	١/٥	٩٨/٢
٥٠	٨٠/٩٥	٥/٤	١٠١/٩
١٠٠	١٠٥/٣	١٠/٧	١٠٥/٣

٤-بحث

با توجه به عدم حساسيت روش هاي اندازه گيري مختلف از جمله گازكروماتوگرافي و كروماتوگرافي با كار آيي بالا، نياز به يك روش حساس و دقيق بـــــــــراي اندازه گيري مرفين ٦-گلوكورونيد در نمونه هاي مختلف ملموس بود. متد الايزاي ارائه شده توسط ريچارد هين (٧) داراي اثرات ماتريس بالا و اختلاف بالايي بين نتايج مربوط به نمونه هاي يكسان بود و از حساسيت پائيني برخوردار بود.

ما توانستيم با انتخاب رقت هاي مناسب M6G–ovalbumin و R_{29} حساسيت روش را افزايش داده و محدوده وسيع تري از غلظتهاي مرفين ٦-گلوكورونيد را اندازه گيري نماييم. با اضافه كردن مرحله بلوكه كردن با محلول ١% ژلاتين در بافر فسفات، نيز بر حساسيت متد افزوده شد. بعلاوه افزودن اين مرحله باعث شد كه اثرات ماتريسي سرم نيز به صورت چشم گيري كاهش يابد. تاثيرات افزوده اي با تغيير بافر مورد استفاده در تمام مراحل از PBSGT به TBSGT همراه با EDTA (pH = 7.0) نيز مشاهده گرديد. اگرچه تغييرات فوق منجر به كاهش چشم گيري در اثرات ماتريس سرم شد ولي هنوز اين اثر وجود داشت كه با رقيق كردن نمونه هاي سرمي، بر اين مشكل غلبه شد منتها اين عمل موجب شد كه حساسيت متد براي نمونه هاي سرمي كمتر از نمونه هاي بافري باشد. حساسيت متد براي نمونه ها در بافر و سرم به ترتيب 0.038 و 0.76 ng/ml است كه البته بايد توجه داشت كه اين حساسيت مناسب و كارآمد بوده و بسيار بيشتر از حساسيت ارائه شده توسط روش كروماتوگرافي با كار آرايي بـــــالا مي باشد (5 ng/ml با استفاده از ٠,5ml پلاسما (١٤)، 1.0 ng/ml با استفاده از0.6 ml پلاسما (١٥)، 5 ng/ml با استفاده از ٠,٦ml پلاسما (١٦)، 0.5 ng/ml با استفاده از ٠,5ml پلاسما (١٧)، 5 ng/ml با استفاده از ١ml پلاسما (١٨)). علاوه بر تفاوت چشم گير در ميزان حساسيـــــت اين متد، مقادير بسيار كمي از نمونه ها براي اندازه گيري لازم بود (20 µl). اين مزيت بخصوص در زماني كه تهيه مقادير زياد نمونه امكان پذير نباشد، اهميت خود را نـــــشان مي دهد. از جمله چنين مواردي مي توان نمونه هاي خوني نوزادان و كودكان يا نمونه هاي مايع مغزي-نخاعي را نام برد. آنتي بادي استفاده شده براي مرفين ٦-گلوكورونيد اختصاصي بود و تنها استثناء مرفين ٣ و ٦-دي گلوكورونيد بود كه در غلظتهاي بـــــالاتر از 100 ng/ml آن واكنش متقاطع قابل توجهي با مرفين ٦-گلوكورونـــــــيد داشت، منتـــــها احتـــمال بروز اين تداخل در نـــــمونه هاي باليني بسيار پائين مي باشد، چرا كه مرفين ٣ و ٦-دي گلوكورونيد در نمونه هاي پلاسمايي افرادي كه اوپيوئيد دريافت كرده اند در غلظت هاي بسيار كم و در بيشتر موارد در غلظتهاي غير قابل اندازه گيري وجود دارد (٦) لـــذا مي توان گفت كه اين متـــد براي مرفين ٦-گلوكورونيد اختصاصي مي باشد.

بررسي هماهنگي منحني هاي استاندارد در بافر و سرم نشان داد كه دو منحني موازي بوده و جذب نوري منحني مربوط به بافر كمي بيشتر بود كه در صورت مقايسه درصد پيوندهاي آنها مشخص شد كه دو منحني يكسان بوده و تفاوت معني داري بين آنها وجود ندارد ($P > 0.05$). اين تطابق زماني بيشتر ملموس بود كه منحني استاندارد بافر را با منحني هاي استاندارد تهيه شده در سرم رقيق شده مقايسه كنيم. تفاوت بين اين منحني ها با منحني مربوط به بافر معني دار نبوده ($P > 0.05$) بنابراين استفاده از بافر براي تهيه منحني استاندارد قابل قبول بوده و استفاده از بافر براي اين منظور هم مناسب تر بوده و هم اين كه مواد بيولوژيكي كمتر تلف مي شد.

تست مدت زمان پوشش نشان داد كه مي توان تعداد زيادي پليت را جهت تست ها آماده نمود و در زمان هاي مناسب از آنها استفاده كرد. متد داراي تغييرات درون روزي و بين روزي پائيني بود كه نشان دهنده قابليت تكرارپذيري متد است.

٤- نتيجه گيري

اين متد يك روش حساس، تكرار پذير با تغييرات درون روزي و بين روزي پائين، اثرات ماتريسي و تداخل كم است. اين متد، يك روش ساده و آسان بوده و هم زمان حداقل ١٠ نمونه با اثر ماتريسي بـــــالا مانند نمونه هاي سرمي، دريك پليت قابل اندازه گيري مي باشد و در صورتي كه نمونه ها فاقد اثر ماتريسي باشند حتي تا ٣٥ نمونه در يك پليت قابل اندازه گيري مي باشد.

5- تشكر و قدرداني

مؤلفين از وزارت بهداشت و درمان و آموزش پزشكي، به جهت اعطاء بورسيه تحصيلي كمال تشكر را دارد.

7- References:

1. Christrup L.L. Morphine metabolites, Acta Anaesthesiol Scand, 1997, 41(1 Pt 2): 116-22.
2. Bodenham A., Quinn K., Park G.R. Extrahepatic morphine metabolism in man during the anhepatic phase of orthotopic liver transplantation, Br J Anaesth, 1989, 63(4): 380-4.
3. Wahlstrom A., Lenhammar L., Ask B., Rane A. Tricyclic antidepressants inhibit opioid receptor binding in human brain and hepatic morphine glucuronidation, Pharmacol Toxicol, 1994, 75(1): 23-7.
4. Sandouk P., Serrie A., Urtizberea M., Debray M., Got P., Scherrmann J.M. Morphine pharmacokinetics and pain assessment after intracerebroventricular administration in patients with terminal cancer, Clin Pharmacol Ther, 1991b, 49(4): 442-8.
5. Yue Q.Y., Odar-Cederlof I., Svensson J.O., Sawe J. Glucuronidation of morphine in human kidney microsomes, Pharmacol Toxicol, 1988, 63(5): 337-41.
6. Patel N., Joel S., Lam W., Slevin M. Is morphine 3,6 diglucuronide an important metabolite of morphine or morphine 6 glucuronide? in Proceeding of Seventh World Congress on Pain. 1993.
7. Hain R.D., Disposition of morphine and its metabolites in children with cancer. MD thesis, 1996. Institute of Cancer Research, University of London
8. Paul D., Standifer K.M., Inturrisi C.E., Pasternak G.W. Pharmacological characterization of morphine-6 beta-glucuronide, a very potent morphine metabolite, J Pharmacol Exp Ther, 1989, 251(2): 477-83.
9. Osborne R., Joel S., Trew D., Slevin M. Analgesic activity of morphine-6-glucuronide, Lancet, 1988, 1(8589): 828.
10. van Dongen RT, Crul BJ, Koopman-Kimenai PM, TB. V. Morphine and morphine-glucuronide concentrations in plasma and CSF during long-term administration of oral morphine., Br J Clin Pharmacol., 1994 Sep, 38(3): 271-3.11.Wolff T, Samuelsson H, T. H. Concentrations of morphine and morphine metabolites in CSF and plasma during continuous subcutaneous morphine administration in cancer pain patients., Pain, 1996 Dec, 68(2-3): 209-16.
12. Pauli-Magnus C, Hofmann U, Mikus G, Kuhlmann U, T. M. Pharmacokinetics of morphine and its glucuronides following intravenous administration of morphine in patients undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis., Nephrol Dial Transplant., 1999 Apr, 14(4): 903-9.
13. Lotsch J., Geisslinger G. Morphine-6-glucuronide: an analgesic of the future?, Clin Pharmacokinet, 2001, 40(7): 485-99.
14. Rotshteyn Y., Weingarten B. A highly sensitive assay for the simultaneous determination of morphine, morphine-3-glucuronide, and morphine-6-glucuronide in human plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical and fluorescence detection, Ther Drug Monit, 1996, 18(2): 179-88.
15. Pawula M., Barrett D.A., Shaw P.N. An improved extraction method for the HPLC determination of morphine and its metabolites in plasma, J Pharm Biomed Anal, 1993, 11(4-5): 401-6.
16. White M.W. Determination of morphine and its major metabolite, morphine-3-glucuronide, in blood by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, J Chromatogr, 1979, 178(1): 229-40.
17. Vree T.B., Verwey-van Wissen C.P. Pharmacokinetics and metabolism of codeine in humans, Biopharm Drug Dispos, 1992, 13(6): 445-60.
18. Meng Q.C., Cepeda M.S., Kramer T., Zou H., Matoka D.J., Farrar J. High-performance liquid chromatographic determination of morphine and its 3- and 6-glucuronide metabolites by two-step solid-phase extraction, J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 2000, 742(1): 115-23.
19. Chapman D.J., Cross M.J., Joel S.P., Aherne G.W. A specific radioimmunoassay for the determination of morphine-6-glucuronide in human plasma, Ann Clin Biochem, 1995, 32: 297-302.