Chulalongkorn Medical Journal

Volume 32
Issue 1 *January 1988*

Article 10

1-1-1988

In vitro applications of 1H and 31P NMR spectrometer for biological science research

สมพงษ์ จินายน

Follow this and additional works at: https://digital.car.chula.ac.th/clmjournal

Part of the Medicine and Health Sciences Commons

Recommended Citation

จินายน, สมพงษ์ (1988) "In vitro applications of 1H and 31P NMR spectrometer for biological science research," *Chulalongkorn Medical Journal*: Vol. 32: Iss. 1, Article 10.
Available at: https://digital.car.chula.ac.th/clmjournal/vol32/iss1/10

This Review Article is brought to you for free and open access by the Chulalongkorn Journal Online (CUJO) at Chula Digital Collections. It has been accepted for inclusion in Chulalongkorn Medical Journal by an authorized editor of Chula Digital Collections. For more information, please contact ChulaDC@car.chula.ac.th.

บทฟื้นฟูวิชาการ

ประโยชน์ของโปรตอนและฟอสฟอรัส เอน เอม อาร์ สเปคโตรมิเตอร์ สำหรับงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

สมพงษ์ จินายน*

Chinayon S. In vitro applications of ^{1}H and ^{31}P NMR spectrometer for biological science research. Chula Med J 1988 Jan; 32 (1) : 75-84

Proton and Phosphorus nuclear magnetic resonance (NMR) measurements are the sophisticated technologies used in in vitro biological studies. The physical behaviour of nuclei and atoms of compounds in the applied magnetic field together with the radiofrequency pulse are the principles of NMR spectroscopy. Proton (^{1}H) NMR spectroscopy has the advantages of the direct and simultaneous identification of biological substances with ease, speed and specificity. Biological samples, for example, urine, serum, plasma and pieces of tissues are qualitatively and quantitatively analysed for the contained biologic substances without any pretreatments (extraction or purification). The ^{1}H NMR spectroscopy has been widely used to identify amino acids, organic acids, and other metabolites in various pathological conditions, inborn errors of metabolism, metabolic acidosis, and intoxication. The ^{31}P NMR spectroscopy is a useful probe for studying the intracellular metabolism of intact living tissues under physiological environment. The appropriate experimental models can be designed to study the metabolic event of phosphorus metabolites and the high energy phosphate compounds. Also, an intracellular pH can be measured by this novel technique.

Reprint requests : Chinayon S, Department of Medical Technology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10500, Thailand.
Received for publication. November 3, 1987.

* ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การพิสูจน์ชนิดและวัดปริมาณสารชีวเคมีโดยเทคนิค nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy นั้น ได้ใช้กันอย่างแพร่หลายในวงการวิทยาศาสตร์การแพทย์ต่างประเทศทั้งด้านงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ชีวภาพ และด้านการช่วยวินิจฉัยโรคในผู้ป่วย[1-36] เทคนิคนี้สามารถตรวจหาสารเคมีและยาในชีววัตถุได้ทั้งเชิงปริมาณและคุณภาพ เป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะเจาะจงสูง (high specificity) และมีความแม่นยำ (accuracy) มากในการพิสูจน์ชนิดสารเคมี การตรวจใช้ตัวอย่างปริมาตรน้อย รวดเร็ว (rapid) และมีขั้นตอนการวิเคราะห์ง่าย ซึ่งคุณสมบัติประการหลังเป็นสิ่งที่นักวิทยาศาสตร์ต้องการในการปฏิบัติงานวิเคราะห์ คือวัดได้โดยตรงในตัวอย่างโดยไม่ต้องผ่านวิธีการเตรียมตัวอย่าง เช่น การสะกัดแยกหรือการทำให้บริสุทธิ์ก่อน[4,5,14] อีกประการหนึ่ง NMR spectroscopy มีประโยชน์ที่เป็นเอกลักษณ์ คือ เป็นวิธีการที่ไม่ทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ (non destructive measurement) และสามารถตรวจพิสูจน์สารหลายชนิดได้พร้อมกันในเวลาเดียวกัน รวมทั้งวิเคราะห์ปริมาณได้ด้วย ถ้ามีสารมาตรฐานสำหรับเปรียบเทียบความเข้มข้น (reference standard) และตรวจ NMR spectrum ด้วยภาวะการทำงานของเครื่องมืออย่างเดียวกัน[18] วัตถุตัวอย่างอาจเป็นซีรั่ม พลาสมา เลือดครบส่วน เม็ดเลือดแดง และชิ้นเนื้อเยื่อหรือน้ำสะกัดแยกของชิ้นเนื้อเยื่อ อย่างไรก็ตามมีข้อจำกัดของคุณสมบัติเทคนิควิเคราะห์ที่ต้องพิจารณา คือ ความไว (sensitivity) ซึ่งตรวจพบสารเคมีได้เมื่อมีปริมาณสูงกว่า 0.1-1.0 mmol/L ขึ้นไป (^{1}H-NMR) วิธี NMR spectrometer เป็นเครื่องมือที่มีหลักการทำงานซับซ้อน จึงมีราคาสูงมาก (เกินกว่า 5 ล้านบาทขึ้นไป) ทำให้ค่าใช้จ่ายของการตรวจสอบแต่ละครั้งสูง[18] นอกจากนั้นการวัด resonance ของสารเคมีในเนื้อเยื่อ สารนั้นควรอยู่ในสภาพที่ไม่รวมตัวกับโปรตีนโมเลกุลใหญ่ จึงจะได้สัญญาณที่ชัดเจน[18]

การพิสูจน์สารเคมีโดยทฤษฎี NMR นั้น ใช้คุณสมบัติทางฟิสิกส์ของอะตอมที่อยู่ใน functional groups ของโมเลกุล ทั้งนี้โดยไม่ต้องอาศัยปฏิกิริยาเคมีในการตรวจวิเคราะห์สารเลย ส่วนสำคัญของเครื่อง NMR spectrometer ประกอบด้วยส่วนที่สร้างสนามแม่เหล็ก (external magnetic field) ส่วนที่สร้างที่คลื่นเสียง (radiofrequency pulse) และเครื่องคอมพิวเตอร์ที่ควบคุมการเก็บสัญญาณการสะท้อนพลังงานของอะตอม พร้อมทั้งการขยายให้เป็นสัญญาณที่เห็นได้ด้วยตาเปล่าและมีเครื่องบันทึก peaks ได้ด้วย นอกจากนั้นสามารถคำนวณ peak areas และตำแหน่งเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานบอกตำแหน่ง (reference position) หลักการของเครื่องมือ NMR จึงยุ่งยากใช้ทั้งหลักวิชาทางฟิสิกส์และคอมพิวเตอร์[20,21] ต่อมามีการสร้างภาพจากสัญญาณการสะท้อนพลังงานของสารชีวเคมีที่อยู่ในร่างกาย ซึ่งเรียกว่า magnetic resonance imaging (MRI) จึงบันทึกภาพอวัยวะของร่างกายหรือส่วนของเนื้อเยื่อในคนได้โดยตรง ช่วยการวินิจฉัยและการรักษาโรคได้ในหลายระบบของร่างกาย[20,21]

สำหรับบทความนี้กล่าวถึงเฉพาะประโยชน์ของ NMR spectroscopy ในการวิเคราะห์แยกสารในหลอดทดลองเท่านั้น หลักการโดยย่อของ NMR spectroscopy คือ โดยธรรมชาตินิวเคลียสของอะตอมซึ่งเป็นส่วนประกอบโมเลกุลสารเคมีที่มี mass number เป็นเลขคี่มีการหมุนตัวและมีคุณสมบัติเป็นแม่เหล็กแท่งเล็ก ๆ เมื่อนำมาวางในสนามแม่เหล็กที่มีกำลังมาก (external magnetic field) แล้วผ่านคลื่นเสียงที่มีความถี่เข้าไปเป็นระยะสั้นและเป็นชุด นิวเคลียสที่ถูก "excited" ดูดซึมพลังงานไว้และปล่อยออกมา (resonance) แตกต่างกันตามชนิดของอะตอมรวมทั้งบ่งชี้ถึงจำนวนของอะตอมด้วย ซึ่งสามารถวัดสัญญาณนี้ได้ด้วยเครื่องรับ จึงใช้ในการบอกชนิดสารเคมีในชีววัตถุได้เมื่อเปรียบเทียบกับความถี่ของสารมาตรฐานบอกตำแหน่งและสารมาตรฐานบอกปริมาณ (quantitative standard)[27]

Proton (^{1}H) NMR spectroscopy :

^{1}H atoms นั้นพบในธรรมชาติได้ 100% ดังนั้นจึงได้มีผู้นำมาประยุกต์ใช้สำหรับช่วยการวินิจฉัยโรค[1-20] สำหรับในประเทศไทย การศึกษาวิจัยทางด้านการแพทย์โดยใช้เทคนิค NMR spectroscopy ในห้องปฏิบัติการยังเป็นของใหม่อยู่[22] เพราะมีข้อจำกัดในการจัดซื้อเครื่องมือราคาสูง มาคุ้มครอง โปษยะจินดาและคณะ[22] ใช้ proton NMR spectroscopy ตรวจหา spectrum และปริมาณของกรดอะมิโนในปัสสาวะผู้ป่วยโรค thalassemia และพบว่าผู้ป่วย beta-thalassemia Hb E มีปริมาณขับถ่ายของ beta-aminoisobutyric acid (AIBA) ในปัสสาวะสูงกว่าผู้ป่วยซึ่งมี Hb H ในเลือด[22] การทดลองดังกล่าวใช้เครื่องมือ JEOL NMR spectrometer FX 90Q ที่ความถี่สนามแม่เหล็ก 89.55 MHz. นอกจากนั้นพบว่าคนปกติเกือบไม่มีการขับถ่ายสาร β-AIBA ออกทางปัสสาวะ เพราะเพียง 2 ใน 20 คนที่พบสารปริมาณน้อยมาก (trace) เมื่อศึกษาเฉพาะกลุ่ม thalassemia Hb E พวกที่ได้รับการตัดม้ามออก มีปริมาณ β-AIBA ในปัสสาวะ 24 ชั่วโมง สูงกว่าพวกที่ไม่ได้รับการผ่าตัด การเพิ่มปริมาณ

ไม่มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงทางพยาธิสภาพของเลือด หรืออาการแสดงทางคลินิกหรือการทำหน้าที่ของไต ผู้รายงานได้ให้ข้อเสนอแนะว่าเนื่องจาก β -AIBAในปัสสาวะได้มาจากการทำลายของเม็ดเลือดแดงชนิด normoblasts ที่ม้ามและเนื้อเยื่ออื่น การเพิ่มปริมาณในเลือดแสดงถึงการเพิ่มการทำลายสารโปรตีนในเนื้อเยื่อ จึงน่าจะใช้เป็นข้อมูลสำหรับพยากรณ์การดำเนินของโรคไปในทางที่รุนแรงขึ้นได้[22]

การบอกตำแหน่งสัญญาณของ proton ใน functional groups ของสารเคมีแต่ละชนิดนั้น ใช้ค่า chemical shift (CS) ซึ่งมีหน่วยเป็น parts per million (ppm) เป็นสเกลเมื่อเปรียบเทียบตำแหน่งกับสารมาตรฐาน ซึ่งตรวจพร้อมกับสารที่ต้องการพิสูจน์หา และบันทึกให้ peak ของสารมาตรฐานใน spectrum อยู่ที่ตำแหน่ง 0 สำหรับ peaks ของสารที่ตำแหน่งทางซ้ายมือของสารมาตรฐาน ค่า CS มีเครื่องหมายเป็น +ppm และที่ตำแหน่งทางขวามือของสารมาตรฐาน มีเครื่องหมายเป็น –ppm สัญญาณมาตรฐาน (reference signal) สำหรับ proton ^{1}H NMR spectroscopy คือ methyl groups ของสาร tetramethylsilane ซึ่งถูกกำหนดให้อยู่ที่ตำแหน่ง 0 ppm ค่า CS ของแต่ละสัญญาณที่บันทึกได้นำมาพิสูจน์โดยอ่านจากตาราง ppm ของสารแต่ละชนิด หรือเปรียบเทียบค่ากับ ppm ของสารที่ทราบชนิดแล้วนำมาทดลองบันทึกหาตำแหน่งของ peak โดยเครื่องมือเดียวกัน[20] อีกประการหนึ่ง chemical shift range ของ protons ที่อยู่ใน functional groups ของสารเคมีมีช่วงแคบ ประมาณ 10 ppm เท่านั้น และ resonance peaks ของ functional groups ในสารชีวเคมีถูกบดบังด้วยสัญญาณจาก proton resonance ของโมเลกุลน้ำ ซึ่งมีปริมาณสูง (ความเข้มข้น 110 m mol/L) และมี CS อยู่ระหว่าง 3.5 ถึง 5.5 ppm[13,18,20] ได้มีการแก้ไขข้อจำกัดนี้โดยวิธีการลบล้างสัญญาณ proton ของน้ำออก วิธีหนึ่งคือ homogated decoupling method โดยใช้โปรแกรมจากคอมพิวเตอร์ ทำให้ตรวจสัญญาณของ resonances จากสารชีวเคมีอื่นที่มี CS อยู่บริเวณนั้นหรือใกล้เคียงได้ชัดเจนขึ้น[4,6,7,13] อนึ่งวิธีการระเหยแห้ง วัตถุตัวอย่าง (lyophilization) แล้วละลายใน D_2O เป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่กำจัดสัญญาณ proton จากน้ำได้อย่างสมบูรณ์[13,22]

สำหรับการวัด peak area มีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณของ resonated nuclei ของสาร จึงใช้แสดงปริมาณความเข้มข้นของสารในวัตถุตัวอย่างได้เมื่อเปรียบเทียบกับ peak area ของสารมาตรฐานสำหรับวัดปริมาณ และคำนวณโดยโปรแกรมเครื่องคอมพิวเตอร์[18]

ในต่างประเทศได้มีผู้นำเทคนิค ^{1}H NMR spectroscopy มาใช้ในการพิสูจน์ชนิดสารและหาปริมาณสารในปัสสาวะและซีรั่ม เพื่อช่วยในการวินิจฉัยโรคมานานกว่า 10 ปี Matsushita และคณะ[4] ได้ใช้เครื่องมือ JEOL JNM-FX 100 spectrometer ที่คลื่นความถี่ 100 MHz ตรวจ spectra ของสารเคมีในปัสสาวะผู้ป่วยเบาหวาน ผู้ป่วยภาวะไตวายเรื้อรัง และผู้ป่วย nephrotic syndrome พบสัญญาณของ creatinine อยู่ที่ตำแหน่ง 3.06 ppm ซึ่งเป็นสัญญาณจากส่วน methyl proton (CH_3-N) ของโมเลกุล และที่ตำแหน่ง 3.94 ppm ซึ่งเป็นสัญญาณจาก methylene proton (-CH_2) โดยใช้ DSS (2,2-Dimethyl -2-Silapentane-5-Sulfonate Sodium Salt) เป็น internal standard สำหรับ CS และ signal intensity (peak area) ส่วนกลูโคสในปัสสาวะของผู้ป่วยเบาหวานพบสัญญาณอยู่ที่ตำแหน่ง CS 3.0-5.3 ppm ทำให้ปิดบังสัญญาณของสารเคมีอื่นในช่วงดังกล่าว อย่างไรก็ตามการวัดปริมาณกลูโคสในปัสสาวะโดย proton NMR ทำได้ง่ายและมีค่าที่แม่นยำ เพราะไม่มีสารรบกวนวิธีการตรวจ เช่น ascorbic acid และคาร์โบไฮเดรทชนิดอื่น ซึ่งมีผลกระทบต่อค่ากลูโคสเมื่อวัดโดยปฏิกิริยาเคมี[4]

Yoshikawa และคณะ[6] แนะนำว่าการที่จะลบล้างสัญญาณโปรตอนของโมเลกุลน้ำออกจากตัวอย่างนั้นควรใช้ homogated decoupling technique และได้แสดง spectrum ของสารที่ตรวจพบในปัสสาวะผู้ป่วยภาวะไตวายเรื้อรังพบ creatinine ที่ CS 3.03 ppm และ alanine ที่ 1.46 ppm.

นอกจากนั้น Yamaguchi และคณะ[7,11,12] ได้ใช้ proton NMR โดยเครื่อง JEOL FX-90Q spectrometer ที่ความถี่ 89.55 MHz สำหรับตรวจขั้นต้นหรือตรวจคัดกรองเพื่อหาสาร metabolites ในปัสสาวะเด็กที่มีความบกพร่องทางเมตาบอลิสึมแต่กำเนิด เช่น ตรวจหา spectrum ของ phenylalanine, homogentisic acid และ organic acids (methylmalonic acid, isovaleric acid) รวมทั้งกรดอะมิโนอื่นในปัสสาวะเด็ก

อาจใช้ NMR spectroscopy วัดปริมาณของสารเคมี (quantitiative analysis) ด้วยการเปรียบเทียบ peak area ของสารนั้นกับสาร internal หรือ external reference material หรือเปรียบเทียบกับ peak area ของสารมาตรฐานสำหรับวัดปริมาณ[3,4,5,9,11,12] และการวัดปริมาณครีอะตินินในปัสสาวะ โดย ^{1}H NMR spectrosocpy มีค่าใกล้เคียงกับที่วัดโดยวิธีทางเคมีด้วยปฏิกิริยา Jaffe[9] การปรับปรุง

เทคนิคการเตรียมตัวอย่างปัสสาวะโดยวิธีการระเหยแห้ง ทำให้สามารถใช้เครื่อง NMR spectromcter ที่ใช้ electro-magnet ธรรมดาสำหรับการพิสูจน์สารปริมาณน้อย เช่น กรดอะมิโนในปัสสาวะได้[22] และการพิสูจน์สารที่เกิดขึ้นเนื่องจากภาวะความบกพร่องของเมตาบอลิสึมในร่างกายจากสาเหตุทางพันธุกรรมได้[13] การกำจัด proton resonance จากโมเลกุลของน้ำด้วยวิธีดังกล่าวเหมาะสำหรับการพิสูจน์สารที่มีปริมาณน้อยและมีตำแหน่ง CS อยู่ตรงกับตำแหน่งของ water proton resonance Yamamoto และคณะ[13] ใช้เครื่อง JEOL FX-90Q spectrometer ที่ความถี่ 89.55 MHz แสดงสัญญาณของกลีเซอรอล (glycerol) ในปัสสาวะผู้ป่วยที่มีความบกพร่องในการทำงานของเอนไซม์ glycerol kinase สัญญาณดังกล่าวอยู่ที่ตำแหน่ง 3.3 และ 4.38 ppm นอกจากนั้นยังตรวจพบ peak ของ glycolic acid (3.90 ppm) และ glycine ซึ่งมีหลายสัญญาณที่ตำแหน่ง 2.17, 2.46, 3.80 ppm ด้วย ส่วนวิธีลบล้างสัญญาณ water proton โดย homogated decoupling mode นั้น ไม่สามารถกำจัดน้ำได้อย่างสมบูรณ์ จึงไม่อาจแสดง peaks ดังกล่าวแล้วในปัสสาวะ แต่ถ้าใช้เครื่องมือ NMR ที่มีกำลังสนามแม่เหล็กสูง (high resolution or high field NMR) จะช่วยให้การตรวจสัญญาณของสารชีวเคมีในชีววัตถุที่มีน้ำเป็นส่วนประกอบได้ชัดเจนขึ้น[4,5,6]

การศึกษา proton nuclear magnetic resonance (^{1}H NMR) ในซีรั่ม ให้ประโยชน์ในการช่วยเป็นดัชนีบ่งชี้โรคมะเร็ง (malignant tumor)[14,19] ภาวะ metabolic acidosis จากการเพิ่มกรดอินทรีย์บางชนิด[17,18] และภาวะที่รับประทานยาหรือแอลกอฮอล์ในปริมาณมาก[18] หรือสังเกตการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารเคมีในเนื้อเยื่อได้[16] หรือภาวะการมีโปรตีนชนิดที่ผิดปกติในเลือด[15]

เทคนิค ^{1}H NMR spectroscopy อาจใช้เป็น nondestructive technique ช่วยในการวินิจฉัยโรคมะเร็งได้ ผลการตรวจซีรั่มผู้ป่วย 23 ราย พบว่า 87% มีระดับซีรั่มแลคเตท (lactate) สูง ซึ่งแสดงโดยสัญญาณ methyl protons ของแลคเตท (1.32 ppm) นอกจากนั้นยังวิเคราะห์ปริมาณโดยวิธีเคมีได้สูงกว่าคนปกติด้วย (1-16 mM) ส่วนคนสุขภาพปกติจำนวน 25 ราย พบเพียง 9% ที่แสดงสัญญาณ methyl proton ของ lactate ในขณะที่วิเคราะห์ปริมาณโดยวิธีเคมีได้ค่าปกติ (<1 mM)[14] นอกจากนั้นผู้ป่วยโรคมะเร็ง 30% ยังพบสัญญาณ methyl proton ของอะซิเตท (acetate) ในซีรั่มด้วย การที่ปริมาณซีรั่มแลคเตทสูงอาจเป็นเพราะว่าเนื้อเยื่อของเนื้องอกเพิ่มการเปลี่ยนแปลงปริมาณกลูโคสให้เป็นแลคเตท[14] การพิสูจน์แลคเตทในซีรั่มด้วยเทคนิค NMR spectroscopy ใช้เวลารวดเร็ว ไม่ต้องเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีพิเศษ ใช้ปริมาตรตัวอย่างน้อย (0.5 มล.) และในขณะเดียวกันยังสามารถพิสูจน์สัญญาณของอะซิเตทและอะลานิน (alanine) ได้ด้วย ในปี ค.ศ. 1986 Fossel และคณะ[19] ได้ตรวจพลาสมาผู้ป่วยโรคมะเร็งด้วยวิธี NMR โดยใช้เครื่อง Bruker AM Fourier-transform spectrometer ที่ความถี่ 360 หรือ 400 MHz และใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ลบล้างสัญญาณโปรตอนจากน้ำออก แล้วศึกษาลักษณะของ peak หรือ resonance ของกลุ่ม methyl และ methylene proton ในพลาสมา lipoproteins พบว่ามีความแตกต่างกับที่พบในผู้ป่วยโรคเนื้องอกชนิดไม่ร้ายแรง หรือผู้ป่วยโรคอื่น หรือคนปกติ คือ ค่าเฉลี่ยความกว้างของ peak วัดโดยใช้ค่า line width ในกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งหลายชนิดต่ำกว่า (29.9 ± 2.5 Hz) กลุ่มอื่นที่กล่าวแล้ว (36.7 ± 2.0 Hz, 36.1 ± 2.6 Hz และ 39.5 ± 1.6 Hz ตามลำดับ) ยกเว้นในกลุ่มหญิงตั้งครรภ์และผู้ป่วยโรค benign prostatic hyperplasia ที่มี line width ของสัญญาณต่ำใกล้เคียงกับผู้ป่วยโรคมะเร็ง ผู้วิจัยได้ให้ข้อสันนิษฐานว่าภาวะที่มีการแบ่งตัวของเซลล์ในอวัยวะอย่างรวดเร็วทำให้เกิดกลไกทาง biophysic มีการเปลี่ยนคุณสมบัติทางฟิสิกส์ของโปรตอนในโมเลกุลของ lipoproteins เกิดความผิดปกติในการเคลื่อนไหวของกลุ่ม methyl และ methylene ในโมเลกุลของไลปิด ซึ่งตรวจได้โดยวิธีการ NMR spectroscopy เท่านั้น ส่วนการเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากกลไกทางชีวเคมีนั้น ไม่มีหลักฐานสนับสนุนเพราะระดับพลาสมา lipoproteins ตรวจโดยวิธีทางเคมีไม่เปลี่ยนแปลง ดังนั้นวิธีการ ^{1}H NMR spectroscopy โดยใช้เครื่องมือที่มีกำลังสนามแม่เหล็กสูง น่าจะเป็นเทคนิคที่ไวสำหรับการพยากรณ์ความรุนแรงของโรคเนื้องอกได้วิธีหนึ่ง อย่างไรก็ตามการทดลองนี้ต้องศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันผลอีก[19]

ได้มีผู้ใช้ ^{1}H และ ^{13}C NMR spectroscopy ศึกษาลักษณะโครงสร้างของสารส่วนที่เรียกว่า uremic middle molecules ที่พบในพลาสมาของผู้ป่วยภาวะยูรีเมีย (uremia) นำมาแยกโดยวิธี ultrafiltration ก่อน พบว่าสารนั้นคือ glucuronidate-o-hydroxyhippuric acid ซึ่งพบปริมาณเล็กน้อยในพลาสมา และในปัสสาวะของคนสุขภาพปกติด้วย[17]

Harada และคณะ[16] ใช้ ^{1}H NMR เพื่อพิสูจน์แยกชนิดและวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารเมตาบอไลท์ในอวัยวะและเนื้อเยื่อของหนู หลังจากการสกัดแยกส่วนด้วย D_2O

(D_2O extract) และใช้เครื่อง JEOL JNM-FX-90Q หรือ JNM-FX 200 spectrometer ที่ความถี่ 90 หรือ 200 MHz โดยใช้ Fourier-transform mode และลบล้างสัญญาณโปรตอนของน้ำด้วยวิธี gated homonuclear decoupling mode ตรวจพบสัญญาณโปรตอน ในกลุ่ม methyl groups ของสารกลูโคส ไพรูเวท กรดอะมิโน อะลานิน และแลคเตท ในน้ำสกัดจากอวัยวะ ตับ ไต ม้าม สมอง หัวใจ และกล้ามเนื้อ สำหรับเนื้อเยื่อชนิดหลังพบสาร ATP และ carnosine ด้วย นอกจากนั้นยังใช้ ^1H NMR ศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับแลคเตท และ ไพรูเวท ในกล้ามเนื้อหัวใจและกล้ามเนื้อลาย ซึ่งแปรตามระยะเวลาที่ตัดเนื้อเยื่อทั้งสองชนิดออกจากร่างกายสัตว์ทดลองด้วย พบว่า ระดับของแลคเตทและไพรูเวทในกล้ามเนื้อหัวใจจะเพิ่มขึ้นหลังตัดออกนานครึ่งชั่วโมง และเพิ่มขึ้นเรื่อยจนถึง 6 ชั่วโมง จึงลดลง ส่วนกล้ามเนื้อลายนั้นความเข้มข้นของสารทั้งสองคงที่ตลอดช่วงเวลา 1/2 ถึง 6 ชั่วโมง แต่เมื่อศึกษาที่เวลา 24 ชั่วโมง กล้ามเนื้อทั้งสองชนิดจะมีปริมาณแลคเตทและไพรูเวทลดลง[16]

มีการพัฒนาส่วนประกอบของเครื่องมือ NMR เพื่อประยุกต์ใช้ขึ้นในงานทางการแพทย์มากขึ้น เช่น ใช้ high-field proton NMR ความถี่ 500 MHz สำหรับพิสูจน์และหาปริมาณสารชีวเคมียาและแอลกอฮอล์ในซีรั่ม[13] ซีรั่มคนปกติจะพบ spectrum ของกลูโคส แลคเตท และสารไขมันซึ่งมีลักษณะเป็น peak กว้าง (0.9 และ 1.0 ppm) ซีรั่มโปรตีนมีสัญญาณอยู่ที่ตำแหน่ง 6-8 ppm ภายหลังการดื่มแอลกอฮอล์ (vodka 30 มล.) จะพบสัญญาณโปรตอนจาก methyl resonance ของเอทธานอลที่ 1.20 และพบสัญญาณของอะซิเตท (1.93 ppm) ซึ่งเป็นผลิตผลจากกระบวนการ oxidation ของเอทธานอลในร่างกาย นอกจากนี้ ^1H NMR สามารถแสดง proton peak ของเมธานอลที่เติมลงในซีรั่ม และกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณเมธานอลในเลือดเป็นเส้นตรงที่ระดับ 20-50 mg/L (r = 0.998)[18] หรือใช้ในการตรวจวิเคราะห์ยาในซีรั่ม เช่น salicylate และ phenobarbital และยังใช้ตรวจวิเคราะห์กรดอินทรีย์ในซีรั่มผู้ป่วยภาวะ lactic acidosis, diabetic และ proprionic acidemia ด้วย[18]

การพิสูจน์สารใช้ค่า chemical shifts ของสารประกอบที่มีในซีรั่มโดยธรรมชาติหรือเติมลงไปมีดังนี้[18]

water	4.9 (s)
glucose	3.2-4.0 (m), 4.65 (d), 5.25 (d)
ethanol	1. 20 (t), 3.67 (q)
methanol	3.39 (s)
lactate	1.34 (d), 4.16 (q)
acetate	1.93 (s)
acetoacetate	2.29 (s), 3.45 (s)
β-hydroxybutyrate	1.21(d), 2.29-2.44(m), 4.16(q)
acetone	2.24 (s)
propionate	1.07 (t), 2.19 (q)
salicylate	6.9-8.0 m

ค่า chemical shifts แสดงเป็น ppm จากสารมาตรฐานบอกตำแหน่ง (TSP). ลักษณะของ peak คือ s = singlet; d = doublet; t = triplet; q = quarlet; m = many peaks, or complex multiplet.

Phosphorus (31p) NMR spectroscopy:

การตรวจ ^{31}P NMR ของชีววัตถุโดยเครื่องสเปคโตรมิเตอร์ สามารถนำมาประยุกต์ใช้สำหรับศึกษาชีวเคมีทางการแพทย์ได้เช่นกัน ^{31}P นิวเคลียสในอะตอมของ phosphorus พบในธรรมชาติ 100% แม้ว่าความไวของ ^{31}P NMR spectroscopy จะน้อยกว่า ^1H NMR คือเพียง 1 ใน 15 ส่วน แต่ก็สามารถจะพิสูจน์สารในวัตถุตัวอย่างได้อย่างมีความแม่นยำถ้าความเข้มข้นสูงกว่า 0.50 mM/L อนึ่งภายในเซลล์และพลาสมามีสารเมตาบอไลท์ที่ประกอบด้วยฟอสฟอรัสอะตอม (phosphorylated metabolites) มีจำนวนน้อยกว่าชนิดที่ประกอบด้วยโปรตอน ทำให้สามารถตรวจสัญญาณและพิสูจน์สารได้ง่ายกว่า และไม่ถูกบดบังด้วยสัญญาณโปรตอนจากน้ำ อีกประการหนึ่งช่วงระยะ chemical shifts ของ ^{31}P ใน spectrum กว้างถึง 40 ppm และใช้ 85% orthophosphoric acid เป็นสารมาตรฐานบอกตำแหน่ง[20, 23] จึงได้มีการนำเทคนิค ^{31}P NMR spectroscopy มาใช้ศึกษากระบวนการเมตาบอลิสึมที่ให้พลังงาน ภายในเซลล์หรือเนื้อเยื่อ เช่น การพิสูจน์และวัดปริมาณสารพวกอนุพันธ์ของน้ำตาล (2,3 diphosphoglycerate, sugar phosphates) สารฟอสเฟตอินทรีย์ (ATP และ phosphocreatine) และสารฟอสเฟตอนินทรีย์ (Pi) นอกจากนั้นยังใช้ในการวัดภาวะความเป็นกรดด่างภายในเซลล์ได้ด้วย [20, 23-27, 30, 31] การศึกษาข้างต้น สามารถทำได้ในหลอดทดลอง โดยใช้ NMR spectroscopyเทคโนโลยี ส่วนข้อจำกัดอย่างอื่นเหมือนกับที่กล่าวแล้วใน proton NMR spectroscopy ผลการศึกษาให้ความรู้เกี่ยวกับกระบวนการเมตาบอลิสึม และกลไกการควบคุมภายในเซลล์ กระบวนการขนส่งสารชีวเคมีบางชนิดผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ การแสดงส่วนย่อยภายในเซลล์ (compartmentation) และวัดภาวะความเป็นกรดด่างภายในเซลล์ที่คงรูป (intact cells)[23, 24] อย่างไรก็ตามการศึกษาทางชีวเคมีต้องกำหนดแผนการทดลองอย่างระมัดระวังด้วย และ

แม้ว่าจะมีการพัฒนาทางเทคโนโลยี เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของเครื่องมือ NMR การศึกษาก็ยังมีข้อจำกัดเพราะว่านิวเคลียสของโมเลกุลที่มีการเคลื่อนตัวน้อย (highly immobilized molecules) ให้สัญญาณที่มี peak กว้าง ทำให้การพิสูจน์สารและการวิเคราะห์ปริมาณไม่แน่นอน ไม่อาจศึกษาสารประกอบฟอสฟอรัส ขณะที่อยู่ในรูปของส่วนประกอบเยื่อหุ้มเซลล์และในนิวเคลียส ดังนั้นจึงใช้ศึกษาเฉพาะสารเมตาบอไลท์ในเซลล์ และเนื้อเยื่อ[23-31] หรือในชีววัตถุที่มีลักษณะเป็นของเหลว[20, 25, 29, 26]

ตำแหน่งของสัญญาณ ^{31}P NMR ที่ได้จากสารประกอบบางชนิดภายในเซลล์นั้นเปลี่ยนแปลงได้โดยภาวะแวดล้อม เช่น ionic strength และปฏิกิริยาเฉพาะของสารนั้นกับสารอื่นภายในเซลล์ เช่น มากกว่า 90% ATP ในเซลล์อยู่ในสภาพที่รวมตัวกับ Mg^{2+}[23, 24, 25] ในปี ค.ศ. 1974 Hoult และคณะ[24] ศึกษา ^{31}P NMR spectra ทั้งในชิ้นกล้ามเนื้อหนู ในสภาพที่คงรูปและอยู่ในภาวะแวดล้อมทางสรีรวิทยาของร่างกาย และในน้ำสกัดแยก glycogen ด้วยสารฟอสเฟตเมตาบอไลท์ให้สัญญาณ ^{31}P NMR ที่มีรูปแบบและตำแหน่งของ peak ไม่ยุ่งยาก เพราะภาวะแวดล้อมทางเคมีของอะตอมในโมเลกุลคล้ายกัน จึงแปลผลการพิสูจน์ชนิดสารได้ง่าย สามารถวิเคราะห์ปริมาณจากสัญญาณความเข้มข้น (intensity of signal) ได้ และมีค่าเท่ากับวิธีวิเคราะห์ทางเคมี การศึกษาครั้งนี้ใช้เครื่องมือ NMR ที่มีกำลังสนามแม่เหล็กสูง (129 MHz) สามารถตรวจพบสัญญาณจากสาร sugar phosphates (glucose-6-phosphate), phospholipids, inorganic phosphate (Pi) และ creatine phosphate รวมทั้ง γ, α และ β phosphate groups ของ ATP

จากการพบว่าค่า Chemical shift (หรือ frequency) ของสัญญาณ Pi เปลี่ยนแปลงตาม pH ในชิ้นกล้ามเนื้อ จึงนำมาเป็นหลักการในการวัด pH ภายในเซลล์ โดยเตรียม pH titration curve จากค่า CS ของ Pi ในน้ำยาบัฟเฟอร์ที่ pH หลายระดับ เมื่อต้องการทราบ pH ในชิ้นกล้ามเนื้อก็นำมาตรวจด้วยเครื่องมือหาสัญญาณและตำแหน่ง ^{31}P NMR ของสาร บันทึกสัญญาณ Pi และค่า CS เทียบกับกราฟที่เตรียมไว้ก็จะได้ค่า pH[24] อนึ่งเมื่อพิจารณาลักษณะ peak ของ resonance จากสารประกอบฟอสเฟตเมตาบอไลท์ในชิ้นกล้ามเนื้อพบว่ามีลักษณะกว้างกว่าที่พบในน้ำยา ซึ่งบ่งชี้ถึงการเคลื่อนตัวน้อย ในภาวะแวดล้อมอย่างแรก[24] การศึกษาครั้งนี้ยังสามารถแสดงว่า Pi ในเซลล์กล้ามเนื้อนั้นมีการกระจายตัวอยู่ในหลายส่วนซึ่งไม่ปะปนเป็นเนื้อเดียวกัน และสัญญาณความเข้มข้นซึ่งบ่งชี้ถึงปริมาณของ Pi เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการทดลอง ขณะที่ปริมาณของ creatine phosphate ลดลง ส่วนสัญญาณความเข้มข้นของ ATP คงที่ในระยะแรก แล้วลดลงเมื่อปริมาณ creatine phosphate ต่ำลงมาก อนึ่งค่า pH ในเซลล์กล้ามเนื้อหนูลดลง 0.9 pH unit ในระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นขณะทดลอง (2.6 ชั่วโมง) บ่งชี้ถึงการสะสมความเป็นกรดภายในเซลล์กล้ามเนื้อขณะที่ดำเนินกระบวนการเมตาบอลิสึม แสดงโดยปริมาณ creatine phosphate ลดต่ำลงจนหมด และเซลล์เพิ่มกระบวนการ glycolysis[24]

ผลการศึกษา ^{31}P NMR spectra ในกล้ามเนื้อคงรูปของสัตว์ทดลองอีกหลายชนิดรวมทั้งคน[25] พบชนิดสารฟอสเฟตเมตาบอไลท์ส่วนใหญ่เหมือนกับที่พบในกล้ามเนื้อหนู[24] นอกจากนั้นการใช้เทคนิค ^{31}P NMR สามารถติดตามฟอสเฟตเมตาบอลิสึมภายในเซลล์ได้ (time course study) ในภาวะ anaerobic condition เมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น NMR spectra ของกล้ามเนื้อกบแสดงการลดปริมาณสาร creatine phosphate ปริมาณ Pi เพิ่มขึ้นจาก 4% ของฟอสเฟตทั้งหมดเป็น 72% ภายในเวลา 15 ชั่วโมง เช่นเดียวกับ sugar phosphates ที่เพิ่มจาก 3% เป็น 15% ของปริมาณฟอสเฟตทั้งหมดภายในเวลา 6.2 ชั่วโมง อนึ่ง chemical shifts และชนิดสารฟอสเฟตเมตาบอไลท์บางอย่างแตกต่างกัน เมื่อตรวจกล้ามเนื้อของสัตว์ต่างชนิด จึงสามารถใช้ ^{31}P NMR spectroscopy ช่วยในการแยกความแตกต่างระหว่างกล้ามเนื้อของสัตว์ต่างชนิดได้ เช่น ระหว่างกล้ามเนื้อกบและหอยโข่ง โดยที่ในหอยโข่งพบ peak ของสาร arginine phosphate (ที่ 3.2 ppm) ซึ่งเป็นฟอสเฟตที่ให้พลังงานเช่นเดียวกับ creatine phosphate (ที่ 3.0 ppm) ของสัตว์พวกมีกระดูกสันหลัง การตรวจ ^{31}P NMR spectrum ยังใช้ช่วยวินิจฉัยพยาธิสภาพกล้ามเนื้อไก่ ที่เป็นโรค muscular dystrophy เพราะพบ abnormal peaks ของสารประกอบฟอสเฟตที่ตำแหน่ง 0.4-0.5 ppm ซึ่งไม่พบในกล้ามเนื้อไก่ปกติ นอกจากนั้นการศึกษายังแสดงว่าในเซลล์กล้ามเนื้อนั้น ATP จะรวมตัวอยู่กับ Mg^{2+} เป็น Mg-ATP complex เพราะค่า CS ของสัญญาณ ATP ในเซลล์กล้ามเนื้อคงรูป เท่ากันกับค่าที่ได้จากการตรวจน้ำสะกัดแยกชิ้นกล้ามเนื้อ แต่แตกต่างกับค่า CS ของสัญญาณ ATP ในน้ำสกัดเนื้อ แล้วใช้วิธีการแยกไอออนออกก่อน ในกล้ามเนื้อกบระดับ ATP คงที่อยู่จนเมื่อปริมาณ creatine phosphate ใกล้จะหมด ทั้งนี้ทดลองในภาวะที่ไม่มีออกซิเจน เป็นเวลา 7 ชั่วโมง ส่วนกล้ามเนื้อจากสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำชนิดอื่นและสัตว์ปีกนั้น

ปริมาณ ATP ลดลงในเวลา 2 ชั่วโมง การทดลองวัด pH ในกล้ามเนื้อทำโดยใช้ค่า CS ของ Pi และอ่านจาก pH titration curve ส่วนกลุ่ม phosphate ของ ATP ไม่พบการเปลี่ยน chemical shift ตาม pH ที่เปลี่ยนไปเช่นเดียวกับ creatine phosphate[25, 32] การศึกษาข้างต้นใช้เครื่อง Bruker HFX-5 ที่คลื่นความถี่ 36.43 MHz แสดงให้เห็นว่าเทคนิค ^{31}P NMR เป็นวิธีการที่ง่าย มีความแม่นยำ การหาปริมาณสารฟอสเฟตเมตาบอไลท์ให้ค่าวิเคราะห์ที่สอดคล้องกับวิธีการทางเคมี (chemical analysis) จึงมีประโยชน์ในการตรวจหาและติดตามการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบฟอสฟอรัสได้หลายอย่างพร้อมกันในชิ้นเนื้อที่คงสภาพเพียงชิ้นเดียวในภาวะสรีรวิทยาปกติของร่างกาย[25]

Yoshizaki และคณะได้ศึกษา ^{31}P NMR ของฟอสฟอรัสเมตาบอไลท์ในกล้ามเนื้อกบ[26, 27] รายงานอื่น[24, 25] พบการเปลี่ยนแปลงปริมาณเนื่องจากระยะเวลา แต่ peak areas ของ ATP คงที่ตลอดระยะเวลา 5 1/2 ชั่วโมงที่ศึกษา ฟอสเฟตทั้ง 3 กลุ่ม คือ γ, α และ β ของ ATP จะแสดงปริมาณของสัญญาณด้วยอัตราส่วน 1:1,4:1 ค่า intracellular pH วัดจาก chemical shift ของ Pi ในเซลล์กล้ามเนื้อศึกษาในภาวะที่ไม่มีออกซิเจนลดลง 0.1 pH unit นอกจากนั้นยังพบ resonance ของสาร phosphodiesters (glycerolphosphorylcholine) เป็นบางครั้งในกล้ามเนื้อกบด้วย[26] เนื่องจากสัญญาณของ Pi ประกอบด้วยหลาย peaks ซ้อนกันอยู่ซึ่งบ่งชี้ถึงความไม่เท่ากันของค่า pH ในแต่ละส่วนของเซลล์กล้ามเนื้อ (heterogeneity) ขณะที่มีกระบวนการ glycolysis ภายในเซลล์มีภาวะความเป็นกรดเพิ่มขึ้น พร้อมกับลดความแตกต่างของค่า pH ในเซลล์กล้ามเนื้อด้วย แสดงโดย Pi peak แคบลงไม่มีความซ้ำซ้อน[27] ^{31}P NMR spectrum จากสารฟอสเฟตเมตาบอไลท์ที่พบเป็นส่วนประกอบในเซลล์กล้ามเนื้อกบ เมื่อตรวจวัดด้วยเครื่องมือ JEOL PFT-100 NMR ที่คลื่นความถี่ 40.29 MHz มีดังนี้ Pi, creatine phosphate, γ, α, และ β phosphate group ของ ATP (spectrum เรียงจากด้านซ้ายมือมาขวามือ) นอกจากนั้นพบสัญญาณขนาดเล็กของ sugar phosphates อยู่ที่ตำแหน่งใกล้กับ Pi[26, 27] แต่ถ้าใช้เครื่องมือ NMR ที่มีกำลังสนามแม่เหล็กสูง ตรวจพบว่าสัญญาณสำหรับตำแหน่ง α group ของ ATP จะประกอบด้วยสัญญาณของสาร nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+) อยู่ด้วย[25, 28] วิธีการ NMR spectroscopy วัด pH ภายในเซลล์ได้หลายชนิดเพราะเป็นเทคนิคที่ไม่มีการทำลายเซลล์ เช่น เม็ดเลือดแดงใช้ค่า chemical shifts ของสาร 2, 3 diphosphoglycerate (2, 3 DPG)[29] หรือ Pi[30]

สำหรับเซลล์กล้ามเนื้อคน[25] และสัตว์ทดลอง[23-27] ใช้ chemical shift ของ (Pi) นอกจากนั้นมีการใช้ค่า chemical shifts ของ γ-phosphate group ของ ATP วัด pH ภายใน chromaffin granules[31] ปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อค่า chemical shifts ของฟอสเฟตเมตาบอไลท์ ซึ่งทำให้ค่า pH ระหว่างการทดลองเปลี่ยนได้ เช่น ionic strength การรวมตัวกับธาตุ Mg^{2+} ความเข้มข้นของไอออน Na^+, K^+, Mg^{2+} และ Ca^{2+} ปริมาณโปรตีนบางชนิดที่อยู่ในเซลล์และอุณหภูมิในหลอดทดลองขณะทำการบันทึกสัญญาณ[32]

สัญญาณสารฟอสเฟตเมตาบอไลท์ในเม็ดเลือดแดงคงรูป และในเม็ดเลือดแดงที่แตกตัว (hemolysate) ของทั้งคนและสัตว์ทดลอง ที่ศึกษาโดย ^{31}P NMR spectroscopy พิสูจน์ชนิดสารได้โดยใช้ค่า chemical shifts (ppm)[29, 30, 33] เมื่อใช้เครื่อง Varian Associated XL-100-15 ที่ความถี่ 40.5 MHz ศึกษา chemical shifts ของสารที่ตรวจพบ คือ sugar phosphates, 2, 3-DPG และ Pi รวมทั้ง ATP โดยมี 1.0 M H_3PO_4 เป็นสารมาตรฐานบอกตำแหน่ง ถ้าตรวจสัญญาณในเลือดครบส่วน (whole blood) จะพบสัญญาณ resonance ของ phospholipids ในพลาสมาด้วยเมื่อใช้ acid-citrate-dextrose (ACD) เป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด[29] ปี ค.ศ. 1974 Henderson และคณะ[33] ได้ศึกษากระบวนการเมตาบอลิสึมโดยตรงในเม็ดเลือดแดงคงรูปในหลอดทดลอง ด้วยเทคนิค ^{31}P NMR spectroscopy (Bruker HFX-5) ที่ความถี่ 36.43 MH_Z และใช้ Fourier transform mode เมื่อวัด resonance สารฟอสฟอรัสเมตาบอไลท์ โดยมี 85% H_3PO_4 บรรจุในหลอดแก้วปิดสนิทเป็นสารมาตรฐานบอกตำแหน่งที่ 0 ppms พบ peak ต่ำของ monoesterified phosphate (triose หรือ hexose phosphate) ที่ตำแหน่ง 3.7 ppm, 2,3-diphosphoglycerate (3-P group = 3.3 ppm, 2-P group = 2.6 ppm) สำหรับ Pi peak อยู่ที่ 1.5 ppm โมเลกุลของ ATP ให้สัญญาณ resonance ของ polyphosphate chains 3 ตำแหน่ง ดังนี้ γ-P = -5.9 ppm, α-P = -10.7 ppm และ β-p = -20.2 ppm สัญญาณสารประกอบฟอสฟอรัสที่พบในซีรั่มหรือพลาสมาได้แก่ Pi ที่ตำแหน่ง 1.3 ppm ดังนั้นถ้าตรวจ ^{31}P NMR spectrum ในเลือดครบส่วนจะพบสัญญาณ Pi ที่อยู่ในพลาสมาอยู่ในตำแหน่ง upfield shoulder ของสัญญาณ Pi ในเม็ดเลือดแดง เพราะสัญญาณมีส่วนซ้ำซ้อนกัน[33] สำหรับผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเมตาบอลิสึมของฟอสเฟตเมตาบอไลท์ในเม็ดเลือดแดงในภาวะสรีรวิทยาของร่างกาย ระดับ

2,3 DPG ลดลง และระดับ Pi สูงขึ้นเมื่อเก็บรักษาเซลล์ไว้นาน 5 สัปดาห์ที่อุณหภูมิ 4C แต่เมื่อเติมสาร inosine และ pyruvate ลงไประดับ 2,3 DPG กลับเพิ่มขึ้นอีก และระดับ Pi ต่ำลง[33] 2,3 DPG เป็นเมตาบอไลท์ที่พบปริมาณสูง (5 mM) ในเม็ดเลือดแดง และเป็นสารตั้งต้นของ 3-phosphoglycerate ซึ่งเป็นสารที่เกิดในวิถี glycolysis ของกลูโคส[34] ในภาวะปกติจะไม่รวมตัวกับ oxygenated และ carbon monoxygenated form ของฮีโมโกลบิน แต่จะรวมตัวได้ดีกับ deoxygeneted form ของฮีโมโกลบิน[29] การทดลองในเม็ดเลือดแดงสุนัขพบว่าการเปลี่ยนปริมาตรของเม็ดโลหิตแดงทำให้ค่า Chemical shifts ของ 2,3 DPG เปลี่ยนไป การเปลี่ยนตำแหน่งสัญญาณ resonance ที่พบนี้ไม่เกี่ยวกับ ionic strength, การรวมตัวกับฮีโมโกลบิน ผลกระทบจาก diamagnetic susceptibility หรือการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนระหว่างปริมาณ Mg^{2+} ต่อ 2,3 DPG จึงสันนิษฐานว่าน่าจะมีการจับกันระหว่าง 2,3 DPG และ binding site ภายในเซลล์ ซึ่งควบคุมโดยสภาพทางฟิสิกส์ของเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดง[34]

Monti และคณะได้ใช้เทคนิค ^{31}P NMR spectroscopy (Bruker AM 200 spectrometer) ที่คลื่นความถี่ 81.02 MH_Z ใช้ 85% H_2PO_4 เป็นสารมาตรฐานบอกตำแหน่ง ศึกษาฟอสเฟตเมตาบอลิสึมในเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยโรคไตที่มีภาวะยูรีเมีย (uremia) พบว่ามีค่า intracellular pH ต่ำกว่าคนปกติ คือ แสดงภาวะความเป็นกรดสูง (7.20 vs 7.31 units)[30] ค่า pH นี้ได้จาก chemical shifts ของ Pi และ titration curve ซึ่งเตรียมโดยใช้ hemolysates ของเม็ดเลือดแดงหลายตัวอย่าง ปรับให้แต่ละตัวอย่างมีช่วงค่า pH ต่างกันโดยใช้กรดหรือด่าง แล้วหาสัญญาณ resonance ของฟอสเฟตเมตาบอไลท์ บันทึกค่า chemical shift ของ Pi ทุกตัวอย่างนำมาเขียนเป็นกราฟมาตรฐาน นอกจากนี้พบว่าผู้ป่วยยูรีเมียมีการเพิ่มปริมาณ ATP คิดเป็นร้อยละ 29 ของปริมาณสารฟอสเฟตรวมในเม็ดเลือดแดง (คนปกติ 23%)

อนึ่งค่า relaxation time ของ 2,3 DPG ในผู้ป่วยต่ำกว่าค่าที่พบในคนปกติด้วย การที่ผู้ป่วยยูรีเมียมีระดับ ATP ในเม็ดเลือดแดงสูง เพราะภาวะความเป็นกรดซึ่งเกิดจากไตวายเป็นปัจจัยชักนำให้การทำงานของเอนไซม์ในเซลล์ลดลง และทำให้เกิดการลดเมตาบอลิสึม การใช้ ATP จึงน้อยลง และสะสมอยู่ภายในเซลล์เม็ดเลือดแดง ส่วนการที่พบค่า relaxation time ของ 2,3 DPG น้อยลงแสดงว่ามีความผิดปกติเกี่ยวกับการเคลื่อนที่ของโมเลกุล 2,3 DPG ด้วย การเปลี่ยนแปลงทุกอย่างที่กล่าวมาข้างต้นจะกลับสู่ภาวะปกติเมื่อผู้ป่วยได้รับการรักษาด้วยวิธี hemodialysis[30]

ถึงแม้ว่า ^{31}P NMR spectroscopy เป็นเทคโนโลยีที่เหมาะสมที่สุดสำหรับศึกษาปรากฏการณ์ภายในเซลล์เม็ดเลือดแดง ขณะที่ยังคงสภาพอยู่ก็ตาม เครื่องมือ NMR จำเป็นต้องใช้กำลังสนามแม่เหล็กสูง เพื่อที่จะวัดและแยกตำแหน่งสัญญาณ resonance ของสารต่างชนิดกัน สารชีวเคมีที่อยู่ในเซลล์ให้สัญญาณที่มี peak กว้างกว่าขณะเมื่ออยู่ในน้ำยา[35] ทำให้ความไวในการพิสูจน์สารหรือการวิเคราะห์ปริมาณลดลง อนึ่งค่า chemical shifts ของสารชีวเคมีบางชนิด เปลี่ยนตามภาวะแวดล้อมของนิวเคลียส เช่น ภาวะความเป็นกรดด่าง การรวมตัวกับโปรตีน และ magnetic susceptibility gradient ที่ต่างกันของภายในและภายนอกเซลล์ การวัด intracellular pH จะใช้ chemical shift ของ α-phosphate ของ ATP ซึ่งไม่เปลี่ยนแปลงตาม pH เป็น internal standard ด้วย เพื่อกำจัดผลกระทบเนื่องจากปัจจัยทางฟิสิกส์[30, 25] คือใช้ความแตกต่างระหว่าง chemical shift ของ Pi และ α-phosphate ATP สำหรับอ่านค่า pH ของเม็ดเลือดแดงจากกราฟมาตรฐานซึ่งเตรียมโดยใช้วิธีเดียวกัน

การใช้กรด perchloric acid สกัดแยกสารจากเนื้อเยื่อ เช่น ไตหนู[36] และศึกษาโดย ^{31}P NMR (60.7 MHz) พบ spectrum ของสารฟอสเฟตเมตาบอไลท์ คล้ายกับที่พบในเซลล์เม็ดเลือดแดง คือ พบ peaks ของ monophosphate esters, Pi, ATP resonance (γ,α,β phosphate groups) และพบ peak ของ glycerol phosphorylcholine ปริมาณมาก แต่ไม่พบ 2,3 DPG

เมื่อทำการทดลองโดยทำลายเนื้อไตบริเวณ cortex ของไตข้างใดข้างหนึ่ง เกิดมีการเปลี่ยนแปลงในเมตาบอลิสึมของฟอสเฟต คือ มีปริมาณ Pi เพิ่ม แต่ organophosphate compounds อื่นลดลง แสดงถึงการเพิ่มอัตรา hydrolysis ของสารฟอสเฟตเมตาบอไลท์ จึงใช้ ^{31}P NMR สำหรับศึกษาหน้าที่ของเซลล์ในไตในหลอดทดลองได้ด้วย

สรุป

^{1}H และ ^{31}P NMR spectroscopy เป็นเทคนิคที่นำมาใช้ในงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ชีวภาพได้หลายอย่าง วิธีการไม่ต้องใช้ปฏิกิริยาเคมีและสารเคมีหลายชนิดเหมือนกับการวิเคราะห์ทางเคมี แต่อาศัยคุณสมบัติทางฟิสิกส์ในนิวเคลียสของโปรตอนและฟอสฟอรัสอะตอมของสารชีวเคมี และเครื่องมือพิเศษ NMR spectrometer ซึ่งสามารถสร้างสนามแม่เหล็กและพลังงานผ่านอะตอมของสารชีวเคมีในเนื้อเยื่อหรือเซลล์หรือชีววัตถุที่เป็นของเหลว วัดพลังงานที่สะท้อนออกมาโดยใช้เครื่องคอมพิวเตอร์บันทึกสัญญาณ เทคนิค

^{1}H NMR มีประโยชน์สำหรับการตรวจสารชีวเคมีปริมาณน้อยได้อย่างรวดเร็ว และโดยตรงในเวลาเดียวกันไม่ต้องผ่านขั้นตอนการเตรียมวัตถุตัวอย่างก่อน มีคุณสมบัติพิเศษ คือ ความแม่นยำสูง ทั้งด้านคุณภาพและปริมาณวิเคราะห์ จึงมีการประยุกต์ใช้ในการตรวจพิสูจน์สารในเลือดหรือปัสสาวะเพื่อพิสูจน์หากรดอะมิโน และสารเมตาบอไลท์อื่นที่เกิดจากภาวะความบกพร่องของเมตาบอลิสึมเนื่องจากสาเหตุทางพันธุกรรม และหาพวกกรดอินทรีย์ในเลือดสำหรับช่วยการวินิจฉัยภาวะความเป็นกรดในร่างกายรวมทั้งพิสูจน์ชนิดยาที่ตรวจพบในเลือด ข้อจำกัด คือ โปรตอนจากโมเลกุลของน้ำบดบังสัญญาณสะท้อนของโปรตอนจากสารอื่นที่ตำแหน่งเดียวกัน แต่กำจัดได้โดยคอมพิวเตอร์โปรแกรมหรือวิธีการระเหยแห้ง อีกประการหนึ่ง คือ ส่วนประกอบของเครื่องมือซับซ้อนต้องใช้ผู้ชำนาญการเฉพาะ และเครื่องมือมีราคาสูงทำให้ราคาของการวิเคราะห์สูงมาก เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีวิเคราะห์ทางเคมี จึงเหมาะสำหรับงานวิจัยที่มีงบประมาณสนับสนุนเท่านั้น เทคนิค ^{31}P NMR มีประโยชน์สำหรับศึกษาและติดตามกระบวนการเมตาบอลิสึมภายในเซลล์ขณะที่คงรูปในสภาพเดียวกับสรีรวิทยาปกติของร่างกาย หรืออาจจัดระบบการทดลองได้หลายแบบ สามารถพิสูจน์ชนิดสารฟอสเฟตที่ให้พลังงานในเซลล์ในการตรวจครั้งเดียวกันและวัดปริมาณวิเคราะห์ได้พร้อมกัน ที่สำคัญคือการประยุกต์ใช้ในการวัดค่าภาวะความเป็นกรดด่างภายในเซลล์ขณะที่ยังมีชีวิตอยู่ ^{31}P NMR spectrum ของสารฟอสเฟตเมตาบอไลท์นั้นพิสูจน์ได้ง่ายและไม่ถูกบังโดยสัญญาณจากโปรตอนของน้ำ จึงใช้เป็นเครื่องมือที่สำคัญสำหรับศึกษากลไกการทำหน้าที่ของเซลล์ทั้งในภาวะปกติและพยาธิสภาพได้

อ้างอิง

1. Epstein FH. Nuclear magnetic resonance : a new tool in clinical medicine. N Engl J Med 1981 May 28; 304 (22) : 1360-1361
2. Gunby P. The new wave in medicine : nuclear magnetic resonance. JAMA 1982 Jan; 247 (2): 151-159
3. Traube M, Bock JL, Boyer JL. D-lactic acidosis after jejunoileal bypass : identification of organic anions by nuclear magnetic resonance spectroscopy. Ann Intern Med 1983 Feb; 98(2): 171-173
4. Matsushita K, Yoshikawa K, Ohsaka A. ^{1}H-NMR of human urine, an application of NMR spectroscopy in clinical pathology. JEOL news 1982 Mar; 18A (2): 54-56
5. Nicholson JK, O' Flynn MP, Sadler PJ, Macleod AF, Juul SM, Sonksen PH. Proton-nuclear-magnetic-resonance studies of serum, plasma and urine from fasting normal and diabetic subjects. Biochem J 1984 Jan 15; 217 (2): 365-375
6. Yoshikawa K, Matsushita K, Ohsaka A. ^{1}H-NMR spectroscopy in aqueous mediums. Examination of experimental conditions with human urine as a model sample. Physiol Chem Phys 1982; 14 (4): 385-389
7. Yamaguchi S, Koda N, Eto Y, Aoki K. Rapid screening of metabolic disease by proton NMR urinalysis. Lancet 1984 Aug 4; 2 (8397): 284
8. Nicholson JK, Sadler PJ, Bales JR, Juul SM, Macleod AF, Sonksen PH. Monitoring metabolic diseases by proton NMR of urine. Lancet 1984 Sep 29; 2(8405): 751-752
9. Bales JK, Higham DP, Howe I, Nicholson JK, Sadler PJ. Use of high-resolution proton nuclear magnetic resonance spectroscopy for rapid multi-component analysis of urine. Clin Chem 1984 Mar; 30 (3): 426-432
10. Lles RA, Hind AJ, Chalmers RA. Use of proton nuclear magnetic resonance spectroscopy in detection and study of organic acidurias. Clin Chem 1985 Nov; 31 (11): 1795-1801
11. Yamaguchi S, Koda N, Eto Y, Aoki K. Quick screening and diagnosis of organic acidemia by NMR urinalysis. J Pediatr 1985 Apr; 106 (4): 620-622
12. Yamaguchi S. Koda N. Ohashi T. Diagnosis of alkaptonuria by NMR urinalysis: rapid qualitative and quantitative analysis of homogentisic acid. Tohoku J Exp Med 1986; 150: 227-228
13. Yamamoto H, Koda N, Yamaguchi S, Eto Y, Aoki K. Revised method of ^{1}H - NMR urinalysis for detecting inborn errors of metabolism. Clin Chem 1987 May; 33(5): 714-715
14. Ohsaka A, Yoshikawa K, Matuhasi T. Detection by proton nuclear magnetic resonance of elevated lactate concentration in serum from patients with malignant tumors. Jpn J Med Sci Biol 1979 Oct; 32(5): 305-309
15. Zoppi F, Borasi G. NMR evidence for multicomponent spin lattice relaxation time in a case of cryoglobulinemia. Clin Chem 1985 Jul; 31(7): 1243-1244

16. Harada H, Maeiwa M, Yoshikawa K, Ohsaka A. Identification and quantitation by ^{1}H - NMR of metabolites in animal organs and tissues. An application of NMR spectroscopy in forensic science. Forensic Sci Int 1984 Jan; 24(1): 1-7
17. Gallice P, Monti JP, Crevat A, Durand C, Murisasco A. A compound from uremic plasma and from normal urine isolated by liquid chromatography and identified by nuclear magnetic resonance. Clin Chem 1985 Nov; 31(11): 30-34
18. Bock JL. Analysis of serum by high-field proton nuclear magnetic resonance. Clin Chem 1982 Sep; 28(9): 1873-1877
19. Fossel ET, Carr JM, McDonagh J. Detection of malignant tumors, water-suppressed proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of plasma. N Engl J Med 1986 Nov 27; 315(22): 1369-1376
20. Brown CE, Battocletti JH, Johnson LF. Nuclear magnetic resonance (NMR) in clinical pathology: current trends. Clin Chem 1984 May; 30(5): 606-618
21. นิตยา สุวรรณเวลา. Magnetic Resonance Imaging (MRI). จุฬาลงกรณ์เวชสาร 2530 มกราคม 31(1) : 1 - 4
22. Poshyachinda M, Mitrakul C, Watane D, Saesow N, Sitprija V. Proton NMR spectroscopic analysis of urinary metabolites in thalassemia. A paper presented for the IAEA seminar on applications of stable isotopes in human nutritional and medical studies, Vienna, Austria, 25-28 November, 1986.
23. Gadian DG, Radda GK. NMR studies of tissue metabolism. Annu Rev Biochem 1981; 50: 69-83.
24. Hoult DI, Busby SJW, Gadian DG, Radda GK, Richards RE, Seeley PJ. Observation of tissue metabolites using 31P nuclear magnetic resonance. Nature 1974 Nov 15; 252(2): 285-287
25. Burt CT, Glonek T, Barany M. Analysis of phosphate metabolites, the intracellular pH, and the state of adenosine triphosphate in intact muscle by phosphorus nuclear magnetic resonance. J Biol Chem 1976 May; 251(9): 2584-2591
26. Yoshizaki K. Phosphorus nuclear magnetic resonance studies of phosphorus metabolites in frog muscle. J Biochem 1972 Jul; 84(1): 11-18
27. Yoshizaki K, Nishikawa H, Yamada S, Morimoto T, Watari H. Intracellular pH measurement in frog muscle by means of ^{31}P-nuclear magnetic resonance. Jpn J Physiol 1979; 29(2): 211-225
28. Dawson MJ, Gadian DG, Wilkie DR. Contraction and recovery of living muscles studies by ^{31}P nuclear magnetic resonance. J Physiol (London) 1977 Jun; 267(3): 703-735
29. Moon RD, Richards JH. Determination of intracellular pH by ^{31}P magnetic resonance. J Biol Chem 1973 Oct; 248(20): 7276-7278
30. Monti JP, Gallice P, Baas M, Murisasco A, Crevat A. Modification of intra-erythrocytic homeostasis in uremic patients, as studied with ^{31}P nuclear magnetic resonance. Clin Chem 1987 Jan; 33(1): 76-80
31. Casey RP, Njus D, Radda GK, Sehr PA. Active proton uptake by chromaffin granules: observation by amine distribution and phosphorus -31 nuclear magnetic resonance techniques. Biochemistry 1977 Mar, 16(5): 972-977
32. Seo Y, Murakami M, Watari H, Imai Y, Yoshizaki K, Nishikawa H, Morimoto T. Intracellular pH determination by a ^{31}P - NMR technique. The second dissociation constant of phosphoric acid in a biological system. J Biochem (Tokyo) 1983 Sep; 94(3): 729-734
33. Henderson TO, Costello AJR, Omachi A. Phosphate metabolism in intact human erythrocytes : determination by phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy. Proc Nat Acad Sci 1974 Jun; 71(6) : 2487-2490
34. Fossel ET, Solomon AK. Modulation of 2,3 diphosphoglycerate ^{31}P-NMR resonance positions by red cell membrane shape. Biochim Biophys Acta 1976 Jun; 436(2) : 505-511
35. Fabry ME, San George RC. Effect of magnetic susceptibility on nuclear magnetic resonance signals arising from red cells : A warning. Biochemistry 1983 Aug; 22(17) : 4119-4125
36. Ghazarian JG, Garancis JC, Yanda DM, Hansen KA, Brown CE, Bourdeau A, Laouri D, Balsan S. Changes in 25-hydroxyvitamin D_3 1 α-and 24-hydroxylase activities of kidney cells isolated from rats with either unilateral kidney damage or acute renal insufficiency. Endocrinology 1983 Aug; 113(2) : 476-484