รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนาวิธี Competitive ELISA สำหรับตรวจวิเคราะห์ยาต้านไวรัสเอช-ไอ-วีเนวิราพีน

โดย ดร. มุกดา ภัทราวราพันธ์ และคณะ

พฤษภาคม 2550

สัญญาเลขที่ MRG4880040

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนาวิธี Competitive ELISA สำหรับตรวจวิเคราะห์ยาต้านไวรัสเอช-ไอ-วีเนวิราพีน

ผู้วิจัย	สังกัด
1. ดร. มุกดา ภัทราวราพันธ์	**มหาวิทยาลัยเชียงใหม่**
2. ดร. ชัชชัย ตะยาภิวัฒนา	**มหาวิทยาลัยเชียงใหม่**

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ.และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชัชชัย ตะยาภิวัฒนา ที่ให้ความกรุณาเป็นที่ปรึกษาวิจัย และให้คำแนะนำปรึกษา ให้ข้อเสนอแนะต่างๆและกำลังใจ รวมทั้งเอื้อเฟื้อเครื่องมืออุปกรณ์ และสารเคมีเพื่อให้งานวิจัยดำเนินไปได้ดีเสมอมา

ขอขอบคุณ นายสิงหา คมขำ และนางสาวสาวิตรี นะงอลา ที่ช่วยเหลือดำเนินการต่างๆให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วง

ขอขอบคุณ คณาจารย์ เจ้าหน้าที่ ของภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้คำแนะนำปรึกษาในด้านเครื่องมือต่างๆ และเป็นกำลังใจในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ คุณอัจฉรา ว่องชูวงศ์ องค์การเภสัชกรรม ที่เอื้อเฟื้อยาต้านไวรัสเอชไอวีสำหรับใช้ในงานวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยนี้

มุกดา ภัทราวราพันธ์

การพัฒนาวิธี Competitive ELISAสำหรับตรวจวิเคราะห์ยาต้านไวรัสเอช-ไอ-วีเนวิราพีน

บทคัดย่อ

ในส่วนแรกของงานวิจัยนี้ ได้พัฒนาแผ่นตรวจวิเคราะห์ยาต้านไวรัสเอชไอวีชนิดเนวิราพีน (NVP) ได้เป็นผลสำเร็จ โดยเริ่มจากการผลิตแอนติซีรัมต่อ NVP จากการฉีดกระตุ้นกระต่ายด้วยคอนจูเกต NVP-BSA ทำการประเมินคุณภาพของโพลีโคลนัลแอนติบอดีที่เตรียมได้ด้วย Western immunoblotting และ competitive indirect ELISA จากนั้นนำ anti-NVP แอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาคอนจูเกตกับ colloidal gold ซึ่งตรวจสอบปฏิกิริยาด้วยเทคนิคอัลตราไวโอเลตสเปคโทรสโคปี และใช้ภาพจากกล้องจุลทรรศอิเล็คตรอนแบบส่องผ่านในการตรวจสอบขนาดและรูปร่างของคอนจูเกตที่ได้ นำเอา gold conjugates มาผลิตแผ่นตรวจอิมมูโนโครมาโทกราฟิกสำหรับเนวิราพีน จากผลการศึกษาเบื้องต้นพบว่าแผ่นตรวจสามารถใช้ตรวจหายา NVP ได้ในระดับความเข้มข้นต่ำสุดคือ 1.0 μg/ml ใน PBS บัฟเฟอร์ โดยที่ยาต้านไวรัสชนิดอื่นไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มรบกวนการอ่านผล

ในส่วนที่สองของงานวิจัย ได้สังเคราะห์พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลเพื่อให้ได้แอนติบอดีเทียมเพื่อใช้พัฒนา enzyme-linked molecularly imprinted sorbent assay สำหรับเนวิราพีน ในตอนแรกได้ใช้นิโคตินาไมด์เป็นสารต้นแบบสำหรับสังเคราะห์พอลิเมอร์ลอกแบบ 11 ชนิด ซึ่งแตกต่างกันที่ชนิดและอัตราส่วนของฟังก์ชันนัลมอนอเมอร์ สารครอสลิงค์ ตัวทำละลาย และวิธีการพอลิเมอไรเซชัน จากการศึกษาการจับกับสารต้นแบบพบว่า MIP11 หรือ poly(MAA-*co*-TRIM) ซึ่งเตรียมได้จากปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบตกตะกอนในตัวทำละลายผสม THF/methanol/H_2O สามารถจับกับนิโคตินาไมด์และเนวิราพีนได้ดีที่สุดโดยเฉพาะในตัวกลางที่เป็นน้ำ เมื่อใช้สภาวะพอลิเมอไรเซชันแบบเดียวกันนี้ในการสังเคราะห์พอลิเมอร์ลอกแบบเนวิราพีนหรือ P(NVP) พอลิเมอร์ที่ได้นี้สามารถจับกับเนวิราพีนได้ดีและมีความจำเพาะสูง จากนั้นได้เตรียม HRP-labelled NVP ซึ่งทำการตรวจสอบคุณลักษณะด้วย competitive ELISA assay โดยใช้ rabbit anti-NVP antibodies ที่ผลิตได้จากตอนแรก ในขั้นสุดท้ายได้ใช้พอลิเมอร์ MIP11 และ P(NVP) แทนแอนติบอดีในการพัฒนา competitive binding assay สำหรับตรวจหาเนวิราพีน ซึ่งได้กราฟมาตรฐานสำหรับเนวิราพีนที่มีความเข้มข้น 10-100 μg/ml และ 10-500 μg/ml เมื่อใช้ MIP11และ P(NVP) ตามลำดับ

Development of Competttitive ELISA Methods for Determination of Nevirapine, an Anti-HIV Drug

Abstract

In the first part of this research, an immunochromatograhic (IC) strip test to detect nevirapine (NVP) in human plasma has been successfully developed. Antiserum to NVP was first raised in rabbits by immunization against NVP chemically conjugated with bovine serum albumin, and subsequently validated by Western immunoblotting and competitive indirect ELISA. The partially purified anti-NVP antibodies were conjugated with colloidal gold particles. UV-visible spectroscopic technique was used to monitor the conjugation reaction, while transmission electron microscopy images were used to characterize the particle size and shape of the conjugates. The resulting colloidal gold conjugates were used for the production of an IC strip test for nevirapine. Preliminary results show that it was possible to detect the presence of NVP at a concentration as low as 1.0 μg/ml in PBS, and no cross-reactivity from other commonly administered HIV drugs or components in the human plasma was observed.

In the second part of this research, molecularly imprinted polymers were synthesized to obtain an artificial antibody to be use in developing an enzyme-linked molecularly imprinted sorbent assay for NVP. Initially, nicotinamide was used as a pseudo-template instead of nevirapine to synthesize 11 imprinted polymers by varying types and ratios of functional monomer, crosslinker, porogen, and polymerization methods. Equilibrium rebinding studies revealed that MIP11, poly(MAA-*co*-TRIM), prepared by precipitation polymerization in solvent mixture THF/methanol/H_2O exhibited high binding affinity toward nicotinamide especially in aqueous media. And when the same polymerization condition was used in the synthesis of nevirapine-imprinted polymer, P(NVP), the resulting polymer exhibits high binding ability and selectivity toward NVP. HRP-labelled NVP was then prepared and characterized by competitive ELISA assay using rabbit anti-NVP antibodies produced from previous section. Finally, the polymers MIP11 and P(NVP) were used in place of antibodies to develop a competitive binding assay for NVP detection. The calibration curves were obtained corresponding to NVP concentrations ranging from 10-100 μg/ml and 10-500 μg/ml from using MIP11 and P(NVP), respectively.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
Abstract	ค
สารบัญ	ง
หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)	1
บทที่ 1 บทนำ	6
1.1 เนวิราพีน	6
1.2 อิมมูโนแอสเสย์	7
1.3 ประเภทของอิมมูโนแอสเสย์	9
1.4 อิมมูโนโครมาโทกราฟิกแอสเสย์	12
1.5 พอลิเมอร์ลอกแบบ	12
1.6 โมเลคิวลาร์อิมพรินต์ซอร์เบนท์แอสเสย์	20
บทที่ 2 การพัฒนาแผ่นตรวจยาต้านไวรัสเอชไอวีชนิดเนวิราพีน (เอ็นวีพี)	26
2.1 บทนำ	26
2.2 เครื่องมือ/วัสดุอุปกรณ์	28
2.3 สารเคมี	28
2.4 วิธีการทดลอง	29
2.5 ผลการทดลองและการอภิปรายผล	35
2.6 สรุปผลการทดลอง	43
บทที่ 3 การพัฒนาวิธี enzyme-linked molecularly imprinted sorbent assay	46
3.1 บทนำ	46
3.2 เครื่องมืออุปกรณ์ และสารเคมี	48
3.3 วิธีการทดลอง	49
3.4 ผลการทดลองและการอภิปรายผล	52
3.5 สรุปผลการทดลอง	67
Outputที่ได้จากโครงการ	70
ภาคผนวก	71

หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)
ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่

เรื่อง การพัฒนาวิธี Competitive ELISA สำหรับตรวจวิเคราะห์ยาต้านไวรัสเอช-ไอ-วีเนวิราพีน (Development of Competitive ELISA methods for Determination of Nevirapine, an Anti-HIV Drug)

อ. ดร. มุกดา ภัทราวราพันธ์
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

---

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

Nevirapine (NVP),11-cyclopropyl-5,11-dihydro-4-methyl-6H-dipyrido-[3,2-b:2',3'-e] มีชื่อการค้าว่า Viramune ผลิตโดย บริษัท Boehringer Ingelheim Pharma KG, Germany เป็นยาตัวแรกในกลุ่ม Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibiter (NNRTIs) ที่ได้รับการรับรองให้ใช้รักษาผู้ติดเชื้อ HIV ในสหรัฐอเมริกา ยาชนิดนี้มีฤทธิ์แรงในการยับยั้งอย่างจำเพาะต่อ reverse transcriptase (RT) ของ HIV-1 ข้อดีของยาชนิดนี้คือออกฤทธิ์ยาว สามารถรับประทานเพียงวันละ 1-2 ครั้ง ไม่มีข้อจำกัดเรื่องอาหาร แต่มีข้อเสียคือมีผลข้างเคียง เช่น ผื่นขึ้นในช่วง 2-4 สัปดาห์แรกของการกินยา ทำให้การทำงานของตับผิดปกติ ดีซ่าน ตับอักเสบ นอกจากนี้เมื่อใช้เดี่ยว ๆ หรือร่วมกับยาในสูตรที่อ่อนหรือล้มเหลวในการรักษามาก่อนจะทำให้เกิดการดื้อยาอย่างรวดเร็วมากและทำให้การรักษายากขึ้น

ในปัจจุบันการตรวจวิเคราะห์ Nevirapine ยังต้องอาศัยเครื่องมือวิเคราะห์ที่ซับซ้อน เช่น High Performance Liquid Chromatography (HPLC) เทคนิคนี้ต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์ ใช้เวลานานและราคาในการวิเคราะห์สูง ปัญหาที่เกิดขึ้นตามมาก็คือค่าใช้จ่ายในการรักษาที่สูงขึ้นจึงเป็นการยากที่จะใช้เทคนิควิเคราะห์นี้กับคนไข้ได้อย่างทั่วถึง แนวทางหนึ่งที่จะช่วยแก้ปัญหาคือการใช้วิธีทางอิมมูโนแอสเซย์ (immunoassay) ซึ่งเป็นวิธีที่มีความจำเพาะและความไวในการตรวจวิเคราะห์สูง วิธีการไม่ยุ่งยาก ไม่ต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญหรือเครื่องมือราคาแพง นอกจากนี้ยังสามารถพัฒนาไปสู่การตรวจวิเคราะห์แบบ automation analysis หรือ strip test ทำให้สะดวกรวดเร็วและช่วยลดค่าใช้จ่ายในการรักษา

วิธีทางอิมมูโนแอสเซย์โดยทั่วไปนั้นจะใช้แอนติบอดีชีวภาพ (biological antibody) ในการตรวจจับกับสารที่สนใจ ข้อดีของแอนติบอดีชีวภาพคือมีความจำเพาะสูง แต่มีข้อจำกัดคือเตรียมได้ยาก ราคาแพงและไม่ค่อยเสถียร อีกทางเลือกหนึ่งแทนการใช้แอนติบอดีชีวภาพคือการใช้โพลีเมอร์ลอกแบบ (Molecular Imprinted polymers, MIPs) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้จากการลอกแบบโมเลกุล (molecular imprinting) ของสารต้นแบบ (template) ให้ได้ receptor sites ที่มีหมู่ฟังก์ชัน, ขนาด และรูปร่างที่พอดีกับโมเลกุลต้นแบบ ด้วยคุณสมบัติความจำเพาะที่คล้ายกับแอนติบอดีชีวภาพ ดังนั้นจึง

เรียก MIPs ได้ว่าเป็นแอนติบอดีเทียม (artificial antibody) ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้ดีในงานทางอิมมูโนแอสเซส์ โดยจะเรียกเทคนิคนี้ว่า molecularly imprinted sorbent assays (MIAs) ข้อดีของ MIPs คือมีราคาถูกกว่าแอนติบอดีชีวภาพและมีความเสถียรสูง แต่ก็มีข้อเสียคือการเตรียมวัสดุพอลิเมอร์ที่มีความจำเพาะสูงนั้นทำได้ยาก ต้องอาศัยการทดลองเพื่อคัดสรรให้ได้ MIPs ที่มีความจำเพาะที่ดี

ที่ผ่านมามีรายงานวิจัยที่หลากหลายเกี่ยวกับการใช้ MIPs ในการตรวจวิเคราะห์สารโมเลกุลเล็ก เช่น chloramphenicol, atrazine, และ epinephrine โดยพบว่า MIPs ที่เตรียมได้นั้นให้ความจำเพาะและความไวที่ดีเทียบเท่ากับการใช้แอนติบอดีชีวภาพและสามารถใช้วิเคราะห์ตัวอย่างได้หลายประเภท ไม่ว่าจะเป็นเลือด พลาสมา หรือตัวอย่างปัสสาวะ สำหรับ nevirapine ยังไม่พบรายงานการเตรียม MIPs ต่อยาตัวนี้ แต่จากความสำเร็จของการพัฒนา MIAs ที่ผ่านมาจึงมีความเป็นไปได้สูงที่จะเตรียม MIPs ที่มีความจำเพาะกับ nevirapine เพื่อที่จะพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์แบบ molecularly imprinted sorbent assays ของยาชนิดนี้และรวมไปถึง HIV inhibitors ตัวอื่นๆ ต่อไปได้

2. วัตถุประสงค์

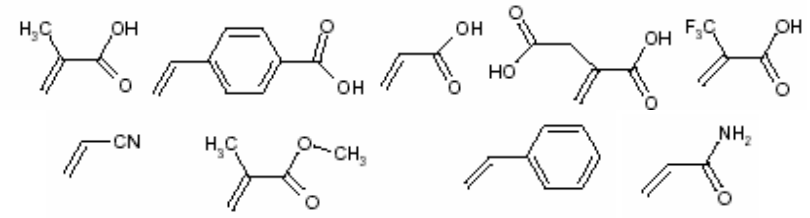
1. เพื่อสังเคราะห์พอลิเมอร์ลอกแบบ (molecular imprint polymer) ที่มีความจำเพาะกับ nevirapine
2. เพื่อพัฒนา molecularly imprinted sorbent assays โดยใช้พอลิเมอร์ลอกแบบ (molecular imprint polymer) ที่เตรียมได้ในการตรวจวิเคราะห์ nevirapine
3. เพื่อประเมินความจำเพาะและความไวของเทคนิค molecular imprint sorbent assays ในการตรวจพิสูจน์ Nevirapine โดยเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน

3. ระเบียบวิธีวิจัย

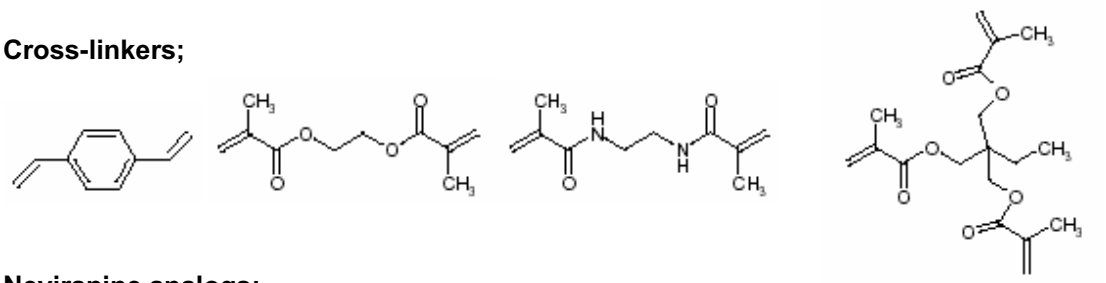
ในการวิจัยนี้จะศึกษาวิธีการสังเคราะห์โพลีเมอร์ลอกแบบ (Molecular Imprinted polymers, MIPs) เพื่อพัฒนา Immunoassay สำหรับตรวจพิสูจน์ nevirapine ขั้นตอนการวิจัยมีรายละเอียดดังนี้

1. เตรียมสารตั้งต้น ได้แก่ monomers, crosslinkers และ nevirapine analogs เพื่อที่จะนำมาใช้ในการสังเคราะห์ MIPs ตัวอย่างสารเหล่านี้แสดงดังรูปที่ 1

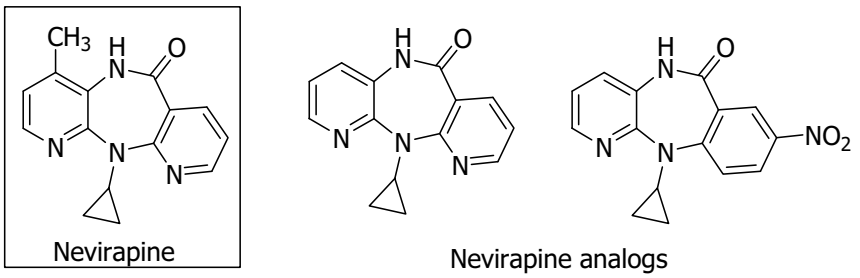
Monomers;



Cross-linkers;



Nevirapine analogs;



รูป 1 Monomers, crosslinkers และ nevirapine analogs สำหรับเตรียม MIPs

2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ molecularly imprinted microspheres โดยอ้างอิงตามวิธีของ K. Haupt 1998[1] ซึ่งเป็นการเตรียม MIP microspheres โดยวิธี precipitation polymerization โดยจะใช้ monomers และ crosslinkers ในอัตราส่วนเท่าๆกัน และใช้ print molecule ในปริมาณ 5 เท่าของ monomers ตรวจสอบขนาดและรูปร่างของ MIPs ที่ได้โดยเทคนิค scanning electron microscopy (SEM) ตรวจสอบความจำเพาะของ MIPs เปรียบเทียบกับ non-MIPs (สังเคราะห์ในแบบเดียวกับ MIPs แต่ไม่เติม print molecule) โดยวิธี competitive binding assays หรือ UV spectroscopy

3. เลือก MIPs ที่มีความจำเพาะดีมาพัฒนา enzyme-linked molecular imprint sorbent assays โดยจะสังเคราะห์ enzyme-nevirapine conjugates เพื่อใช้เป็น probe เอนไซม์ที่จะใช้ได้แก่ horseradish peroxidase และ/หรือ tobacco peroxidase วิธีการเตรียม conjugates และการเตรียม assays อ้างอิงตามรายงานของ I. Surugiu 2000[2]

4.ทดสอบค่าสหสัมพันธ์และความน่าเชื่อมั่นของวิธี molecular imprint sorbent assays ในการตรวจพิสูจน์ nevirapine โดยเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน เช่น HPLC[3]

<u>เอกสารอ้างอิง</u>

1. K. Haupt, A. Dzgoev and K. Mosbach, *Anal. Chem.*, 1998, **70**, 628.

2. I. Surugiu, L. Ye, E. Yilmaz, A. Dzgoev, B.Danielsson, K.Mosbach and K. Haupt, *Anal. Commun*., 2000, **125**, 13.

3. Hollanders, R. M., E. W. van Ewijk-Beneken Kolmer, D. M. Burger, E. W. Wuis, P. P. Koopmans, and Y. A. Hekster., *J. Chromatogr. B*, 2000, **744**:65-71.

4. **แผนการดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการในแต่ละช่วง 6 เดือน**

กิจกรรม/ขั้นตอนการดำเนินงาน	ปีที่ 1/ เดือน		ปีที่ 2/ เดือน	
	1-6	7-12	1-6	7-12
1.เตรียมสารตั้งต้น ได้แก่ monomers, crosslinkers และ nevirapine analogs พร้อมกับศึกษาสภาวะในการสังเคราะห์พอลิเมอร์ลอกแบบ (MIPs)	←			
2.สังเคราะห์ MIPs หลายๆชนิดเพื่อตรวจสอบความจำเพาะ และเตรียมสารเคมีสำหรับ ELISA		↔		
3. เตรียมและทดสอบประสิทธิภาพของ ELISA assays ศึกษา cross-reactivities และ sensitivity			↔	
4. ประเมินผลการตรวจวิเคราะห์ของวิธี enzyme-linked molecular imprint sorbent assays เปรียบเทียบกับวิธี HPLC				→

5. ผลงาน/หัวข้อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติในแต่ละปี

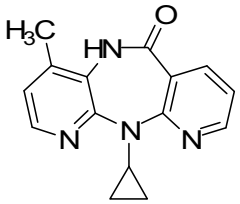
ปีที่ 1: ชื่อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์ : Preparation and evaluation of molecularly imprinted polymeric microspheres for Nevirapine Detection

ชื่อวารสารที่คาดว่าจะตีพิมพ์ : Analyst Communications (impact factor 2.371) หรือ Analyst (impact factor 2.003)

บทที่ 1
บทนำ

1.1 เนวิราพีน (Nevirapine, NVP)

เนวิราพีน หรือ 11-cyclopropyl-5,11-dihydro-4-methyl-6H-dipyrido-[3,2-b:2',3'-e] (รูป 1.1) มีชื่อทางการค้าว่า Viramune ผลิตโดยบริษัท Boehringer Ingelheim Pharma KG ประเทศเยอรมนี NVP เป็นยาตัวแรกในกลุ่มของ Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibiter (NNRTIs) ที่ได้รับการรับรองให้ใช้รักษาผู้ติดเชื้อไวรัสเอชไอวี (HIV) ในสหรัฐอเมริกาในปี ค.ศ.1996 ยาชนิดนี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งอย่างจำเพาะต่อ reverse transcriptase (RT) ของไวรัส HIV-1 โดยการออกฤทธิ์ของ NVP จะเป็นแบบ noncompetitive คือไม่มีการแย่งจับแข่งกับ native nucleotides แต่เป็นการจับ HIV-1 RT ตรงบริเวณล่างลงมา (downstream) จากบริเวณเร่ง (catalytic site) ข้อดีของยาชนิดนี้คือ มีฤทธิ์ยาวนาน สามารถรับประทานเพียงวันละ 1-2 ครั้ง ไม่มีข้อจำกัดเรื่องอาหาร แต่ข้อเสียคือ มีผลข้างเคียงเช่น ผื่นขึ้นในช่วง 2-4 สัปดาห์แรกของการกินยา ทำให้การทำงานของตับผิดปกติ ดีซ่าน ตับอักเสบ นอกจากนี้เมื่อใช้เดี่ยว ๆ หรือใช้ร่วมกับยาในสูตรที่อ่อนหรือล้มเหลวในการรักษามาก่อน จะทำให้เกิดการดื้อยาอย่างรวดเร็วมาก ซึ่งจะทำให้การรักษายากขึ้น



Nevirapine

รูปที่ 1.1 โครงสร้างของเนวิราพีน

ในปัจจุบันมักจะใช้ยาชนิดนี้เป็นยาตัวหนึ่งในสูตรยาร่วม 3 ชนิด (triple drug therapy) ในการรักษาผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเอชไอวี เนื่องจากมีราคาไม่แพงและการออกฤทธิ์ที่ดี โดยมากจะใช้กับผู้ป่วยที่ยังมีอาการยังไม่รุนแรงมากเพื่อลดภาระค่ารักษาให้กับผู้ป่วย โดยจะเก็บเอา protease inhibitors ที่ราคาแพงกว่ามากไว้ใช้ทีหลัง นอกจากนี้ยังใช้ในสูตรรักษาแบบระยะสั้น (short course) ในการป้องกันการติดเชื้อจากแม่ไปสู่ลูก[1]

แม้ว่าการใช้สูตรยาร่วม 3 ชนิด จะให้ผลการรักษาที่น่าพอใจ แต่ความล้มเหลวในการรักษาก็ยังคงเกิดขึ้น ส่วนหนึ่งเกิดจากการที่ผู้ป่วยไม่ปฏิบัติตามข้อตกลงของการใช้ยาอย่างเคร่งครัด เช่นการกินยาไม่ต่อเนื่องหรือหยุดยา พฤติกรรมในการรับประทานยาที่ไม่ตรงเวลาและไม่สม่ำเสมอของผู้ป่วยนี้เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เชื้อไวรัสเอชไอวีเกิดการกลายพันธุ์ อันเป็นเหตุให้การรักษาด้วยยาต้านไวรัสเอดส์ที่มีอยู่ไม่สัมฤทธิ์ผล[2]

ปริมาณของยาที่ผู้ป่วยได้รับทั่วไปคือ วันละครั้งๆละ 200 mg ในช่วงสองสัปดาห์แรก จากนั้นจึงเป็นวันละสองครั้ง จากการศึกษาทางคลินิกพบว่า NVP สามารถถูกดูดซับได้ง่ายหลังจากรับประทานเข้าไป ซึ่งจะสามารถตรวจหาระดับของ NVP ในพลาสมาในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 3.0 -10.0 µg/ml ในปัจจุบันมีวิธีในการตรวจหาปริมาณของ NVP ในพลาสมาอยู่หลายวิธี เทคนิคเหล่านี้ได้แก่ HPLC [3], LC-MS [4], และ ELISA assay [5]

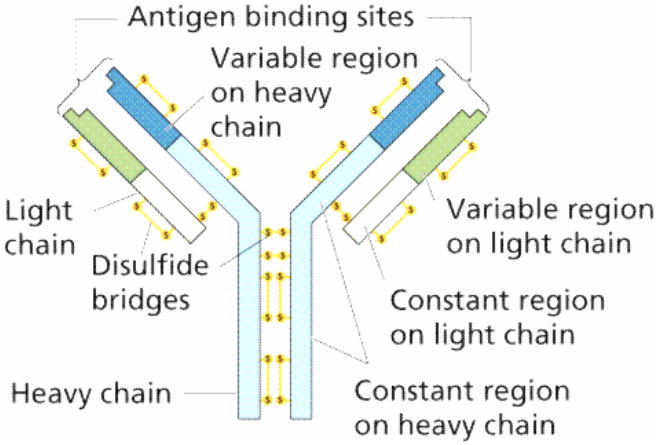
1.2 อิมมูโนแอสเสย์ (Immunoassay) [6]

เป็นเทคนิคที่สามารถใช้วิเคราะห์ได้ทั้งทางคุณภาพ (Qualitative analysis) และทางปริมาณ (quantitative analysis) โดยอาศัยการจับกันระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีในการตรวจวัด

1.2.1 แอนติบอดี (Antibody)

เป็นสารไกลโคโปรตีนที่ประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ 82-96 % และคาร์โบไฮเดรต 4-18% ซึ่งเกิดจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อ antigenic determinant ที่เป็นสิ่งแปลกปลอม และจะทำปฏิกิริยาจำเพาะกับ antigenic determinant นั้นเท่านั้น จากผลของความจำเพาะนี้ทำให้ร่างกายสามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอม เช่น สารพิษ จุลชีพ ปรสิต ออกได้ เนื่องจากแอนติบอดีเป็นโกลบูลินที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายจึงเรียกว่า อิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin, Ig)

โครงสร้างพื้นฐานของอิมมูโนโกลบูลิน จะมีรูปร่างคล้ายรูปตัว T หรือตัว Y ประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์ 4 สาย คือ heavy (H) chain 2 สายที่เหมือนกัน และ light (L) chain 2 สายที่เหมือนกัน เชื่อมต่อกันด้วย disulfide bond มี hinge region อยู่กลาง H chain เพื่อการเคลื่อนไหวของส่วนที่จับกับแอนติเจน (รูป 1.2)



รูปที่ 1.2 โครงสร้างพื้นฐานของแอนติบอดี

1.2.2 แอนติเจน (Antigen)

เป็นสารที่สามารถชักนำให้ร่างกายสร้างแอนติบอดีหรือ T-lymphocyte ชนิดจำเพาะได้ และสามารถทำปฏิกิริยาจำเพาะกับแอนติบอดีหรือ T-lymphocyte นั้นๆ โดยทั่วไปสารที่จะมีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนได้จะต้องเป็นสิ่งแปลกปลอมซึ่งสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้เกิดการตอบสนอง (immunogenicity) หรือเรียกว่าเป็นอิมมูโนเจน (immunogen) และสามารถทำปฏิกิริยากับภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นแบบจำเพาะคือ ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีหรือ T-lymphocyte ได้ เรียกว่า antigenicity

ลักษณะโครงสร้างของสารที่เป็นแอนติเจนคือ จะต้องมีความแปลกปลอม (Foreignness) มีโครงสร้างซับซ้อนหรือมีคุณสมบัติทางชีวเคมีที่จำเพาะแตกต่างกันไป เช่น ประจุไฟฟ้า คุณสมบัติการละลาย มีโครงสร้างจำเพาะ มีขนาดที่ใหญ่พอสมควร โดยทั่วไปสารที่เป็นแอนติเจนได้ดีมากคือสารในกลุ่มโปรตีน รองลงมาคือพวกโพลีแซคคาไรด์ ไขมัน และกรดนิวคลิอิก ตามลำดับ

1.2.3 แรงที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยาแอนติเจน-แอนติบอดี

แอนติบอดีจะจับกับแอนติเจนตรงบริเวณ antigenic determinant ซึ่งในการทำปฏิกิริยากันจะคายพลังงานออกมา ดังนั้นปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีจึงสามารถเกิดขึ้นได้เอง โดยแรงยึดกันระหว่างสารสองโมเลกุลนี้จะเป็นแรงยึดเหนี่ยวอย่างอ่อนที่ไม่ใช่พันธะโควาเลนท์ ซึ่งแบ่งประเภทได้ดังนี้

- แรงยึดเหนี่ยวระหว่างประจุ (Electrostatic, Coulombic, Ionic bond)

เป็นแรงยึดเหนี่ยวที่เกิดจากประจุที่ต่างชนิดกัน เช่น R-OO^- กับ ^+H_3N-R โดยที่ประจุชนิดหนึ่งอยู่บน antigenic determinant และอีกประจุหนึ่งอยู่บน antigen binding site บนโมเลกุลของแอนติบอดี แรงชนิดนี้จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อโมเลกุลของแอนติบอดีมาอยู่ใกล้กัน

- แรงจากพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen bond)

เป็นแรงยึดเหนี่ยวอย่างอ่อนที่เกิดจากการจับกันระหว่างอะตอมของไฮโดรเจน กับอิเล็คโทรเนกาทีฟอะตอมอื่นที่มีความเป็นลบสูงเช่น F, O, N แรงนี้จะเกิดขึ้นได้เมื่ออะตอมเหล่านี้มาอยู่ในระยะที่ไกล้กันมากๆ

- แรงแวนเดอร์วาลส์ (Van der Wall's force)

เป็นแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลสองโมเลกุลที่อยู่ไกล้กัน ซึ่งเกิดจากการกระจายของอิเล็คตรอนที่ไม่สม่ำเสมอในโมเลกุลทำให้มีการเหนี่ยวนำให้มีวิถีของวงโคจรของอิเล็คตรอนให้มีความสอดคล้องกัน

- แรงไฮโดรโฟบิก (Hydrophobic force)

เป็นแรงที่เกิดจากส่วนที่ไม่ชอบน้ำในโมเลกุลของแอนติเจนและแอนติบอดีที่เข้ามาอยู่ไกล้ๆกัน แรงชนิดนี้มีบทบาทมากในปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี

1.3 ประเภทของอิมมูโนแอสเสย์

1.3.1 Radioimmunoassay (RIA)

เป็นวิธีที่ใช้สารรังสีในการตรวจวัดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี วิธี RIA แบ่งได้เป็นหลายประเภท เช่น

- Classical RIA

หลักการของวิธีนี้คือ ใช้แอนติเจนที่ติดฉลากด้วยสารรังสี เช่น ^3H, ^{14}C กับแอนติเจนในสารตัวอย่าง ในการแย่งจับกับแอนติบอดีที่เติมลงไปในปริมาณที่จำกัด ถ้ามีแอนติเจนในสารตัวอย่างมาก แอนติเจนที่ติดด้วยสารรังสีก็จะจับกับแอนติบอดีได้น้อย เมื่อแยกเอาแอนติบอดีที่จับกับแอนติเจนมาวัดปริมาณรังสี ก็จะทราบว่ามีแอนติเจนที่ติดด้วยสารรังสีอยู่เท่าไร ซึ่งเมื่อนำค่าที่วัดได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างเปอร์เซ็นต์ของแอนติเจนที่ติดด้วยสารรังสีซึ่งถูกแอนติบอดีจับ กับ ความเข้มข้นของแอนติเจนมาตรฐาน ก็จะสามารถหาปริมาณแอนติเจนที่มีในตัวอย่างได้

- Solid phase RIA

เนื่องจากการแยกเอาแอนติบอดีที่จับกับแอนติเจนออกตามวิธีของ Classical RIA มีความยุ่งยาก จึงได้มีการพัฒนานำเอาแอนติบอดีไปเคลือบไว้กับวัสดุยึดเกาะ (solid phase) เช่น เคลือบกับข้างหลอดพลาสติก หรือติดกับสารที่เป็นของแข็งเช่น dextran แต่ยังคงใช้หลักการแย่งกันจับของแอนติเจนที่มีในสารตัวอย่างและแอนติเจนที่ติดฉลากอยู่เหมือนเดิม

- Immunoradiometric assay

วิธีนี้จะนำเอาแอนติบอดีมาติดฉลากด้วยสารรังสี และใช้แอนติเจนติดกับวัสดุยึดเกาะแทน โดยผสมแอนติเจนที่ติดอยู่กับวัสดุยึดเกาะกับแอนติเจนในตัวอย่างก่อน แล้วจึงเติมแอนติบอดีที่ติดฉลากลงไป จากนั้นแยกเอา solid phase ออกแล้ววัดปริมาณรังสี ถ้าแอนติเจนในตัวอย่างมีน้อย ค่าปริมาณรังสีที่วัดได้ก็จะมาก

1.3.2 Immunofluorescence (FI)

วิธีนี้จะติดฉลากแอนติบอดีหรือแอนติเจนด้วยสารเรืองแสง fluorescent เช่น fluorescein isothiocyanate (FITC) หรือ tetramethyl rhodamine ทำการวัดปริมาณแสงที่คายออกมาหลังจากปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีก็จะทราบปริมาณของสารที่ต้องกาตรวจหา วิธีนี้เป็นวิธีที่มีความไวในการวิเคราะห์สูง

1.3.3 เอนไซม์อิมมูโนแอสเสย์ (Enzyme Immunoassays, EIAs)[7,8]

EIAs เป็นวิธีตรวจวัดทางภูมิคุ้มกันวิทยาที่ใช้เอนไซม์เป็นตัวช่วยแสดงผลที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจน โดยจะนำเอนไซม์มาติดฉลากกับแอนติเจนหรือแอนติบอดีและตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์ในขั้นสุดท้าย สามารถแบ่งเทคนิคนี้เป็นสองวิธีคือ Homogeneous EIAs และ Heterogeneous EIAs

Homogeneous EIAs

วิธีนี้มีชื่อเรียกอีกอย่างว่า Enzyme Multiplied Immunoassay technique (EMIT) ซึ่งจะใช้แอนติเจน (ยา) ที่ติดฉลากกับเอนไซม์ตรงตำแหน่งใกล้ๆกับ active site กับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อยามาผสมรวมกับสิ่งส่งตรวจที่ต้องการตรวจหาระดับยา ยาในสิ่งส่งตรวจและยาที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์จะแข่งขันกันจับกับแอนติบอดี ถ้าไม่มียาในสิ่งส่งตรวจ แอนติบอดีจะจับกับยาที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ทำให้ไม่สามารถตรวจการทำงานของเอนไซม์ได้ แต่ถ้ามียาในสิ่งส่งตรวจยานั้นจะแย่งจับกับแอนติบอดีต่อยา ทำให้เหลือยาที่ติดฉลากกับเอนไซม์ในรูปอิสระและสามารถตรวจการทำงานของเอนไซม์ได้หลังจากที่เติม substrate ในกรณีนี้การวัดการทำงานของเอนไซม์จะสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณยาในสิ่งส่งตรวจ เอนไซม์ที่ใช้ในวิธีนี้ได้แก่ lysozyme, glucose-6-phosphate dehydrogenase (6PDH) เป็นต้น

Heterogeneous EIAs

ชื่อที่นิยมใช้คือ Enzyme-linked immunoassay (ELISA) เป็นวิธีที่ใช้ตรวจหาแอนติเจนหรือแอนติบอดี หลักการของวิธีนี้คือนำเอาแอนติเจนหรือแอนติบอดีมาเคลือบติดกับผิววัสดุยึดเกาะ เช่น เม็ดพลาสติก หลอดพลาสติก แผ่นพลาสติก (strip) หรือในหลุมของ microtiter plate ก่อน จากนั้นจึงเติมแอนติบอดีหรือแอนติเจนซึ่งอาจจะติดฉลากด้วยเอนไซม์เพื่อให้ทำปฏิกิริยากันแล้วจึงแยกหรือล้าง

เอาแอนติเจนหรือแอนติบอดีอิสระ (free fraction) ออก สุดท้ายจึงวัดการทำงานของเอนไซม์เพื่อตรวจหาแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ติดอยู่กับผิววัสดุยึดเกาะ (bound fraction) ELISA แบ่งออกได้เป็น 3 วิธีคือ Indirect ELISA, Competitive ELISA และ Sandwich ELISA

- Indirect ELISA

เป็นวิธีที่ใช้ตรวจหาแอนติบอดีในตัวอย่างซีรัม โดยการนำเอาแอนติเจนไปเคลือบผิววัสดุยึดเกาะ ล้างเอาส่วนที่เกินมาออก จากนั้นจึงทำปฏิกิริยากับซีรัม (สิ่งส่งตรวจ) ที่ต้องการตรวจหาแอนติบอดี ล้างเอาส่วนที่เกินออก เติมแอนติบอดีที่จำเพาะกับชนิดของแอนติบอดีที่ต้องการตรวจหาซึ่งติดฉลากกับเอนไซม์ ล้างส่วนที่เกินออกไปแล้วตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์โดยเติม substrate ที่ให้ผลิตภัณฑ์เป็นสารที่มีสี ความเข้มของสีจะแปรผันตรงกับปริมาณแอนติบอดีที่มีอยู่ในตัวอย่างซีรัม

- Competitive ELISA

เป็นวิธีที่ใช้ตรวจหาแอนติบอดีหรือแอนติเจนในตัวอย่าง โดยจะทำการเคลือบผิววัสดุยึดเกาะด้วยแอนติบอดีต่อแอนติเจน ล้างส่วนที่เกินออก จากนั้นให้ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์และแอนติเจนในสิ่งส่งตรวจ ซึ่งจะแย่งกันจับกับแอนติบอดีที่เคลือบไว้ในขั้นแรก หลังจากล้างส่วนที่เกินมาออกก็เติม substrate เพื่อตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์ ความเข้มของสีที่ได้จากวิธีนี้จะแปรผกผันกับปริมาณสารที่มีอยู่ในตัวอย่าง

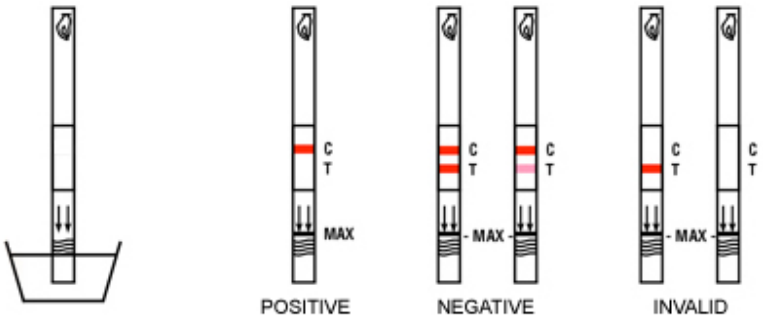
- Sandwich ELISA

เป็นวิธีที่ใช้ตรวจหาแอนติบอดีหรือแอนติเจนในตัวอย่าง วิธี double antigen sandwich ELISA จะใช้สำหรับตรวจหาแอนติบอดี โดยเคลือบแอนติเจนที่ผิววัสดุยึดเกาะล้างเอาส่วนที่เกินออกจากนั้นเติมซีรัม (สิ่งส่งตรวจ) ที่ต้องการตรวจหาแอนติบอดี ล้างเอาส่วนที่เกินออก แล้วเติมแอนติเจนซึ่งติดฉลากกับเอนไซม์ให้จับกับ Fab อีกข้างหนึ่งของแอนติบอดีที่จับอยู่กับแอนติเจนบนผิวยึดเกาะ ล้างเอาส่วนที่เกินออกไป แล้วตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์โดยเติม substrate ความเข้มของสีจะแปรผันตรงกับปริมาณแอนติบอดีที่มีอยู่ในตัวอย่างซีรัม ส่วนวิธี double antibody sandwich ELISA จะนำเอาแอนติบอดีที่จำเพาะกับสารที่ต้องการตรวจหาไปเคลือบกับวัสดุยึดเกาะ จากนั้นให้ทำปฏิกิริยากับสิ่งสงตรวจ ล้างเอาส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก แล้วเติมแอนติบอดีตัวที่สองที่ติดฉลากเอนไซม์ให้ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนที่ถูกจับไว้ ล้างเอาส่วนที่เกินออกไปแล้วเติม substrate เพื่อตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์ที่ติดฉลากแอนติบอดี วิธีนี้แอนติบอดีตัวที่สองอาจจะไม่ต้องติดฉลากด้วยเอนไซม์ก็ได้ แต่ต้องเติมแอนติโกลบูลินที่ติดฉลากเอนไซม์ซึ่งจำเพาะกับชนิดของแอนติบอดีตัวที่สองอีกขั้นหนึ่ง วิธีนี้ความเข้มของสีจะแปรผันตรงกับปริมาณแอนติเจนที่มีอยู่ในสิ่งส่งตรวจ

ELISA เป็นวิธีที่ได้ถูกใช้มากที่สุด และในปัจจุบันได้มีการประยุกต์ในการตรวจหาแอนติบอดีหรือแอนติเจนชนิดต่างๆเช่น ยา ยาฆ่าแมลง ไวรัส โดยมีรูปแบบที่แตกต่างกันออกไปอีกหลายรูปแบบ

1.4 Immunochromatographic assay[9]

เป็นการแย่งจับแอนติบอดีซึ่งติดฉลากด้วย gold colloidal ระหว่างแอนติเจนที่เคลือบอยู่บนแผ่นพลาสติก (strip) กับแอนติเจนที่อยู่ในสิ่งส่งตรวจ เมื่อตัวอย่างซึมผ่านตำแหน่งที่มีแอนติบอดีที่ติดฉลาก gold colloidal เคลือบอยู่ จะมีการชะเอาแอนติบอดีไปด้วย ถ้าหากในตัวอย่างมีแอนติเจน มันจะถูกจับด้วยแอนติบอดี เมื่อสารเคลื่อนไปที่ตำแหน่งที่เคลือบไว้ด้วยสารชนิดเดียวกับที่ต้องการตรวจก็จะไม่มีแอนติบอดีที่จะเหลือจับกับส่วนนี้ได้อีกทำให้ไม่เกิดแถบสีขึ้น และเมื่อของเหลวเคลื่อนที่ไปถึงส่วนที่เคลือบไว้ด้วยแอนติโกลบูลิน แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วย gold colloidal ก็จะถูกจับไว้ที่บริเวณนี้ทำให้เกิดแถบสีขึ้น ในกรณีนี้ถ้าไม่เห็นแถบสีที่บริเวณที่เคลือบด้วยแอนติเจน แสดงว่ามีสารที่ต้องการตรวจอยู่ในตัวอย่าง การทำงานของแผ่นตรวจทั่วไปแสดงดังรูป 1.3



รูปที่ 1.3 การทำงานของแผ่นตรวจ

1.5 พอลิเมอร์ลอกแบบ (Molecular imprinted polymers, MIPs)

Molecular imprinted polymers (MIPs) เป็นพอลิเมอร์ที่มีความสามารถในการสร้างพันธะที่จำเพาะเจาะจงกับโมเลกุลต้นแบบ (template) โดยเทคนิคการลอกแบบโมเลกุล (molecular imprinting) ได้ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ.1972 โดย Wulff และคณะ[10] และต่อมาถูกเผยแพร่มากขึ้นโดยคณะทำงานของ Arshady และคณะ ในปี ค.ศ.1980[11] ซึ่งสามารถสร้างวัสดุซึ่งมีคุณสมบัติจำเพาะ (selectivity) คล้ายแอนติบอดี้[12] พอลิเมอร์ลอกแบบเป็นครอสลิงค์พอลิเมอร์ (crosslinked polymer) ที่มีช่องว่างที่มีความสามารถในการจดจำ(recognition site)โครงสร้างของสารที่เป็นต้นแบบ (template)[13] ซึ่งกระบวนการลอกแบบโมเลกุล (molecular imprinting process) จะประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ

1.เริ่มจากการจัดเรียงตัวของฟังก์ชันนัลมอนอเมอร์รอบ ๆโมเลกุลต้นแบบ และจะมีการสร้างอันตรกิริยาขึ้นทำให้เกิดเป็นสารเชิงซ้อน(complex)

2.ทำปฏิกิริยาครอสลิงค์พอลิเมอไรเซชัน (crosslinking polymerization)รอบ ๆโมเลกุลต้นแบบเพื่อให้ได้พอลิเมอร์ที่คงรูป

3.นำโมเลกุลต้นแบบออกโดยการสกัดหรือไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมหลังจากนั้นจะได้ช่องว่างที่มีความสามารถในการจดจำกับโมเลกุลต้นแบบ โดยช่องว่างนี้จะจำเพาะกับโมเลกุลต้นแบบทั้งในทางเคมีและโครงสร้างใน 3 มิติ

จะเห็นได้ว่าแนวทางในการลอกแบบโมเลกุลนี้คล้ายคลึงกับแนวคิดที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ที่เป็นแบบแม่กุญแจและลูกกุญแจที่เสนอขึ้นโดย Fisher ในปี ค.ศ.1890[14] จากการที่มีช่องว่างที่มีความสามารถในการจดจำนี้ทำให้สามารถใช้ MIPs เลียนแบบเอนไซม์, ตัวรับเฉพาะ, แอนติบอดี้สำหรับแยกโมเลกุลต่าง ๆออกจากสารผสมที่มีสิ่งรบกวนมาก นอกจากนี้ยังสามารถใช้ MIPs ในงานแยกทางโครมาโทรกราฟฟี (chromatographic separation)[15,16] การแยกสารที่เป็นไครัล (chiral separation)[15,17]และในงานตรวจวัด (sensor)[18-20] ข้อดีของ MIPs มีความแข็งแรงเชิงกายภาพสูง,ทนต่ออุณหภูมิและความดันปานกลางและเฉื่อยต่อกรด,เบส,ไอออนของโลหะและตัวทำละลายอินทรีย์ นอกจากนี้แล้วยังมีราคาถูกและสามารถเตรียมได้ง่ายจึงทำให้สามารถนำไปใช้งานได้หลากหลาย

1.5.1 รูปแบบของการสังเคราะห์พอลิเมอร์ลอกแบบ[13]

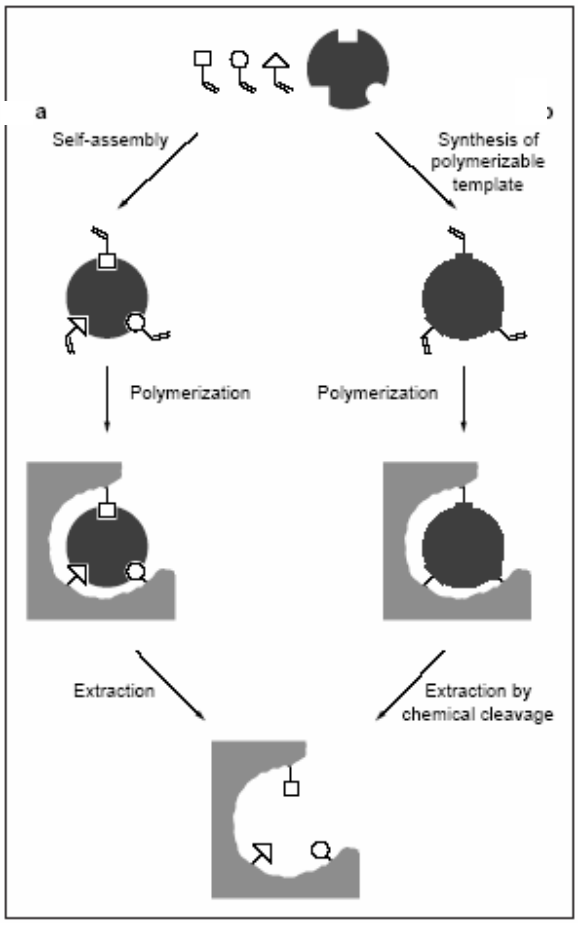
การลอกแบบโมเลกุล เพื่อให้ได้พอลิเมอร์ที่มีความจำเพาะกับสารตั้งต้นแบบสามารถทำได้หลายวิธีซึ่งสามารถแบ่งกว้าง ๆออกได้ 2 ประเภท ได้แก่

- Pre-organized approach หรือ Covalent approach

แนวทางนี้ถูกพัฒนาขึ้นโดย Wulff และคณะ [10] ซึ่งเตรียมพอลิเมอร์ลอกแบบโดยการต่อเชื่อมมอนอเมอร์เข้ากับโมเลกุลต้นแบบโดยพันธะโคเวเลนต์ (covalent bond) เช่น โบโรเนต เอสเทอร์ (boronate esters) , อิมีน (imines) และ คีทาล (ketals) แล้วจึงนำสารที่ได้มาสังเคราะห์เป็นพอลิเมอร์ หลังจากแตกพันธะระหว่างสารต้นแบบกับพอลิเมอร์ แล้วล้างเอาโมเลกุลต้นแบบออกก็จะได้พอลิเมอร์ที่มีช่องว่างที่มีความจำเพาะเจาะจงกับโมเลกุลต้นแบบ

- Self-assembly approach.

แนวทางนี้ถูกพัฒนาขึ้นโดย Mosbach และคณะ [11] โดยในขั้นแรกจะผสมมอนอเมอร์กับโมเลกุลต้นแบบ เพื่อให้เกิด complexation โดยจะเกิดอันตรกิริยา (interaction) อย่างอ่อน แบบนอนโคเวเลนต์ (non-covalent) เช่น hydrogen bonding , electrostatic , hydrophobic interaction หรือ metal coordination interactions จากนั้นจึงทำปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน (polymerization) เกิด crosslinking รอบๆ โมเลกุลต้นแบบ เมื่อแยกโมเลกุลต้นแบบออกจากพอลิเมอร์ จะเกิดช่องว่างภายในพอลิเมอร์ที่มีช่องว่างซึ่งมีหมู่ฟังก์ชัน, ขนาด และรูปร่างที่พอดีกับโมเลกุลต้นแบบ วิธีการสังเคราะห์ทั้งสองแบบแสดงดังรูป 1.4



รูปที่ 1.4 เปรียบเทียบ Pre-organized approach และ Self-assembly approach

แนวทางทั้งสองแบบมีข้อดีและข้อเสียที่แตกต่างกัน แต่โมเลกุลลอกแบบ (molecular imprinting molecule) แบบ self-assembly approach มีความน่าสนใจมากกว่า pre-organized approach เพราะสามารถใช้โมเลกุลต้นแบบในการเกิดอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลต้นแบบกับมอนอเมอร์เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนขึ้นในขั้นเตรียมการพอลิเมอไรเซชัน (pre-polymerization) โดยโครงสร้างของโมเลกุลต้นแบบจะถูกลอกแบบโดยการจัดเรียงตัวของมอนอเมอร์ที่อยู่ในบริเวณที่มีการเกิดพันธะ (binding site) ข้อดีของแนวทางนี้คือ อันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการจะมีความเสถียร ดังนั้นจึงมีโอกาสเป็นไปได้สูงที่จะได้ช่องว่างที่มีความจำเพาะเจาะจง และข้อดีอีกข้อคือ การเตรียมพอลิเมอร์โดยวิธีนี้สามารถเตรียมโดยได้ง่าย

1.5.2 ปัจจัยที่มีผลต่อความจำเพาะเจาะจงของ MIPs

ความจำเพาะเจาะจงของ MIPs ขึ้นอยู่กับหลายๆปัจจัย เช่น ชนิดของโมเลกุลต้นแบบ (Template) ฟังก์ชันนัลมอนอเมอร์ (functional monomer) ครอสลิงค์เกอร์ (crosslinker) ตัวทำละลาย (Solvents) ตัวเริ่มปฏิกิริยา (Initiator) และวิธีการพอลิเมอไรเซชัน ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

- โมเลกุลต้นแบบ (Template)

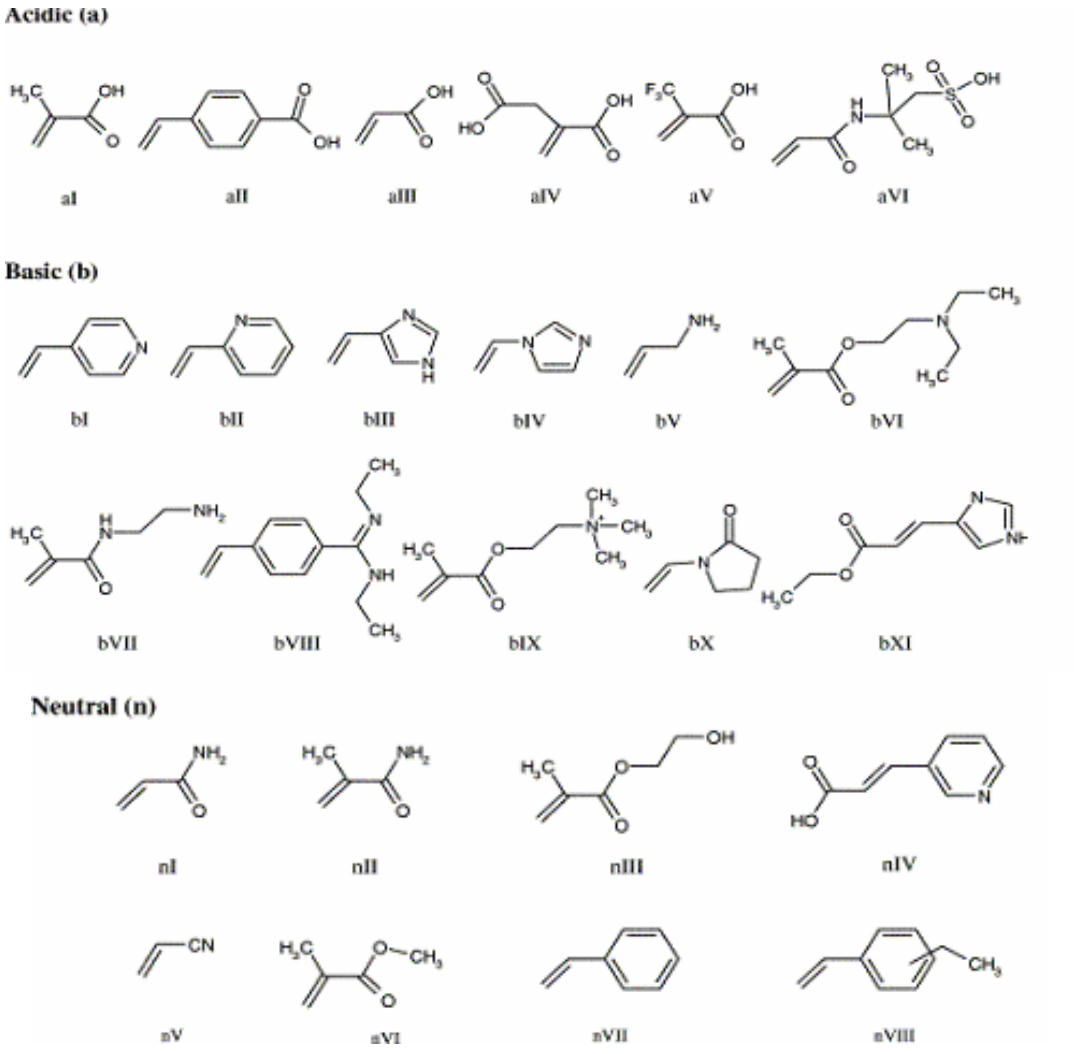
โมเลกุลต้นแบบ เป็นสิ่งสำคัญสำหรับเทคนิคการลอกแบบโมเลกุล เนื่องจากโมเลกุลต้นแบบเป็นตัวควบคุมการจัดเรียงตัวของหมู่ต่างๆของฟังก์ชันนัลมอนอเมอร์ให้เกิดความจำเพาะเจาะจงกันระหว่างโมเลกุลต้นแบบ และ MIPs นั้นๆ

การเลือกโมเลกุลต้นแบบ ไม่สามารถเลือกได้จากสารทุกชนิด จะมีเพียงบางสารเท่านั้นที่สามารถเป็นโมเลกุลต้นแบบ ได้ เนื่องจากโมเลกุลต้นแบบ จะต้องเฉื่อยเมื่ออยู่ภายใต้สภาวะของปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบแรดดิคอล (free radical polymerization) ดังนั้น ก่อนการเลือกโมเลกุลต้นแบบ ควรตั้งคำถามเพื่อใช้ในการพิจารณาก่อน เช่น โมเลกุลต้นแบบ นั้นมีหมู่ฟังก์ชันที่เกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันหรือไม่ โมเลกุลต้นแบบนั้นมีหมู่ฟังก์ชันที่สามารถยับยั้งหรือหน่วงปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบฟรีแรดดิคอล เช่น thiol group หรือ hydroquinone หรือไม่ และโมเลกุลต้นแบบ นั้นมีความเสถียรต่ออุณหภูมิหรือรังสีอัลตร้าไวโอเลต (UV) มากน้อยแค่ไหน เช่น โมเลกุลต้นแบบ ควรเสถียรที่อุณหภูมิ 60 ^{O}C เมื่อ AIBN ถูกใช้เป็นตัวเริ่มต้น หรือที่ 80^{O}C เมื่อใช้ benzoylperoxide เป็นตัวริเริ่ม

5.2.2 ฟังก์ชันนัลมอนอเมอร์ (functional monomer)

มอนอเมอร์จะต้องมีหมู่ฟังก์ชันที่เหมาะสมกับหมู่ฟังก์ชันของโมเลกุลต้นแบบ (เช่น H-bond donor กับ H-bond acceptor) โดยหมู่ฟังก์ชันทั้งสองจะเกิดอันตรกิริยากันในบริเวณ imprinting binding site ในกรณีที่มีการใช้ฟังก์ชันนัลมอนอเมอร์มากกว่า 2 ชนิด จะต้องพิจารณา reactivity ratio ของมอนอเมอร์เพื่อทำให้ทราบว่าฟังก์ชันนัลมอนอเมอร์นั้นจะเกิดปฏิกิริยาโคพอลิเมอไรเซชัน (copolymerization) ได้หรือไม่

สำหรับเทคนิคการลอกแบบโมเลกุลที่เป็นแบบ non-covalent จะใช้ปริมาณ (จำนวนโมล) ของมอนอเมอร์ที่มากเมื่อเทียบกับโมเลกุลต้นแบบ เพื่อให้เกิดการรวมกันของมอนอเมอร์และโมเลกุลต้นแบบ ได้ดีขึ้น ซึ่งโดยทั่วไปจะใช้อัตราส่วนของโมเลกุลต้นแบบต่อมอนอเมอร์ เท่ากับ 1:4 หรือมากกว่า ตัวอย่างมอนอเมอร์ ที่นิยมใช้ในการสังเคราะห์ MIPs แบบนอนโคเวเลนต์ ซึ่งแบ่งออกเป็นชนิดที่เป็นกรด เบส และชนิดที่เป็นกลาง โดยแสดงดังรูปที่ 1.5

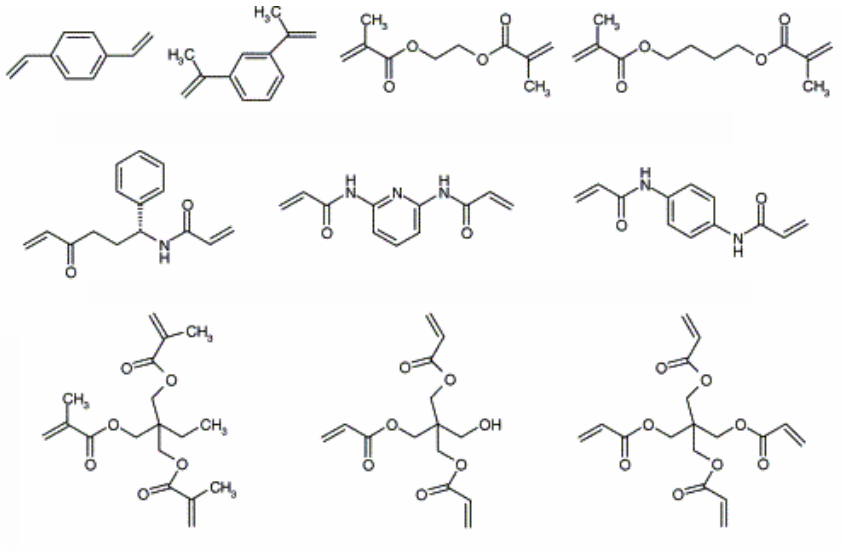


รูปที่ 1.5 โครงสร้างของมอนอเมอร์ที่นิยมใช้ในการสังเคราะห์ MIPs

- ครอสลิงค์เกอร์ (Crosslinker)

ครอสลิงค์เกอร์เป็นมอนอเมอร์ที่มีหมู่ฟังก์ชันที่สามารถเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันได้มากกว่า 1 ตำแหน่ง โดย ครอสลิงค์เกอร์จะทำหน้าที่หลัก 3 อย่างในเทคนิคการลอกแบบ คือ ทำหน้าที่ควบคุมสัณฐานวิทยา (Morphology) ของ MIPs ทำหน้าที่ทำให้บริเวณ imprinted binding site มีความเสถียร และหน้าที่สุดท้ายของครอสลิงค์เกอร์คือการทำให้ polymer matrix มีความเสถียรเชิงกล ในการสังเคราะห์มักจะนิยมใช้อัตราส่วนของครอสลิงค์เกอร์ที่สูง เพื่อทำให้เกิดช่องว่างที่คงรูป และทำให้เกิดวัสดุที่มีความเสถียรเชิงกลเพียงพอ โดยปกติจะใช้อัตราส่วนของครอสลิงค์เกอร์จะมากกว่า 80%

การเลือกครอสลิงค์เกอร์ในการเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันจะต้องพิจารณาค่า reactivity ratio ของครอสลิงค์เกอร์เช่นเดียวกับการเลือกมอนอเมอร์ที่ต้องพิจารณาจากค่า reactivity ratio แต่ในบางครั้งอาจจะไม่ทราบค่า reactivity ratio ที่แท้จริง ของครอสลิงค์เกอร์ทุกตัว จึงอาจต้องใช้การประมาณจากโครงสร้างที่คล้ายคลึงกัน ตัวอย่างของครอสลิงค์เกอร์ ที่ใช้ในการเตรียม MIPs แสดงดังรูป 1.6



รูปที่ 1.6 โครงสร้างของครอสลิงค์เกอร์ ที่นิยมใช้ในการสังเคราะห์ MIPs

- ตัวทำละลาย (Solvents หรือ Porogens)

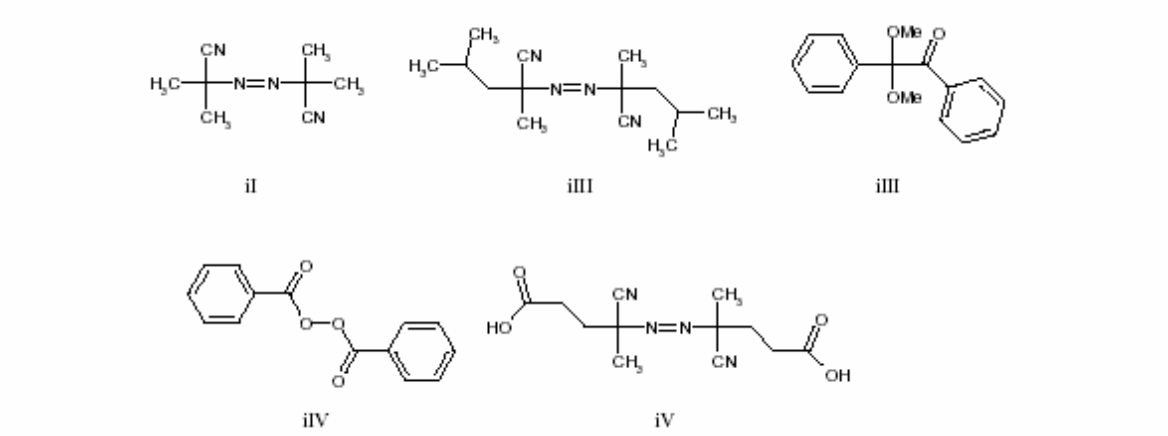
ตัวทำละลายทำให้องค์ประกอบทุกองค์ประกอบในปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน เช่น โมเลกุลต้นแบบ ฟังก์ชันนัลมอนอเมอร์ ครอสลิงค์เกอร์ และตัวเริ่มปฏิกิริยา (initiator) มาอยู่ในเฟสเดียวกัน

และทำหน้าที่ในการเหนี่ยวนำให้เกิดช่องว่าง (pores) ขึ้นใน MIPs จากหน้าที่นี้จึงมักเรียกตัวทำละลายว่า porogen

ตัวทำละลายจะควบคุมสัณฐานวิทยาและปริมาตรของช่องว่าง โดยเฉพาะ thermodynamically good solvent มีแนวโน้มที่จะทำให้เกิดพอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างที่มีช่องว่างที่จำเพาะเจาะจง และมีพื้นที่ผิวที่จำเพาะเจาะจง แต่การใช้ thermodynamically poor solvent จะนำไปสู่โครงสร้างที่มีช่องว่างไม่จำเพาะเจาะจง และมีพื้นผิวที่จำเพาะเจาะจงต่ำ นอกจากบทบาทในการทำให้เกิดช่องว่างแล้ว ในการพอลิเมอไรเซชันแบบนอนโคเวเลนต์ ตัวทำละลายยังทำหน้าที่ควบคุมความแรงของอันตรกิริยาแบบนอนโคเวเลนต์ โดยหาก ตัวทำละลายมีขั้วมาก จะส่งผลให้อันตรกิริยาลดลง และทำให้ความจำเพาะเจาะจงลดลงด้วย ดังนั้น ตัวทำละลายที่มีขั้วน้อย หรือมี dielectric constant ต่ำ จึงมีความเหมาะสมที่สุด ที่จะใช้เป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการสังเคราะห์ MIPs โดยตัวทำละลายที่นิยมใช้ เช่น tetrahydrofuran, toluene, acetonitrile

- ตัวเริ่มปฏิกิริยา (Initiator)

ตัวเริ่มปฏิกิริยาเป็นสารที่เหนี่ยวนำทำให้เกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน โดยในการใช้งานก็มีข้อควรระวัง เช่น หากโมเลกุลต้นแบบไม่เสถียรต่อแสงหรือความร้อน ก็ไม่ควรจะเลือกใช้แสงหรือความร้อนในการทำให้ตัวเริ่มปฏิกิริยาเกิดฟรีแรดดิคอล อีกสิ่งที่ควรระวัง คือ การเกิด complexation ของพันธะไฮโดรเจนนั้นจะเกิดได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ ดังนั้นไม่ควรใช้ความร้อนสูงในการทำให้ เกิดฟรีแรดดิคอล หรืออาจแก้ไขโดยเลือกใช้แสงแทนก็ได้ โดยตัวอย่างของตัวเริ่มปฏิกิริยาที่นิยมใช้แสดงดังรูป 1.7



รูป 1.7 โครงสร้างของตัวเริ่มต้นปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันที่นิยมใช้ในการสังเคราะห์ MIPs

1.5.3 วิธีการพอลิเมอไรเซชัน

พอลิเมอร์สังเคราะห์จากปฏิกิริยาการเกิดพอลิเมอร์ของมอนอเมอร์มีวิธีการพื้นฐานในทางปฏิบัติ 4 ลักษณะด้วยกัน คือ

- ปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบบัลค์ (bulk polymerization)

ปฏิกิริยาการเกิดพอลิเมอร์แบบบัลค์ จะเป็นการทำปฏิกิริยาการเกิดพอลิเมอร์ที่มีมอนอเมอร์หรือคู่มอนอเมอร์บริสุทธิ์ และตัวริเริ่มเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ไม่มีตัวทำละลายหรือสารอื่น ในกรณีที่พอลิเมอร์ที่ได้สามารถละลายมอนอเมอร์ระบบจะปรากฏเพียงเนื้อเดียวตลอดปฏิกิริยาการเกิดพอลิเมอร์และจะจัดเป็นปฏิกิริยาการเกิดพอลิเมอร์แบบเนื้อเดียว แต่ถ้าพอลิเมอร์ที่ได้ไม่สามารถละลายในมอนอเมอร์พอลิเมอร์จะแยกออกจากมอนอเมอร์ทำให้ระบบปรากฏเป็น 2 ชั้น จึงจัดเป็นพอลิเมอไรเซชันแบบเนื้อผสม

การสังเคราะห์วิธีการนี้จัดว่าเป็นระบบที่มีความบริสุทธิสูงมาก ได้พอลิเมอร์ที่มีการปนเปื้อนต่ำ เพราะเมื่อปฏิกิริยาเสร็จสิ้น ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีเพียงพอลิเมอร์เท่านั้น อาจจะมีมอนอเมอร์เหลืออยู่บ้างเล็กน้อย ทั้งนี้เพราะมอนอเมอร์จะต้องทำหน้าที่เป็นสารตัวทำละลายพอลิเมอร์ที่เกิดขึ้น การมีพอลิเมอร์ซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่และยาวละลายอยู่ในมอนอเมอร์ทำให้ความหนืดของส่วนผสมเพิ่มขึ้นเรื่อยๆในระหว่างการสังเคราะห์

นอกจากความหนืดที่เกิดเพิ่มขึ้นเมื่อใช้เวลาของการสังเคราะห์นานขึ้นเรื่อยๆแล้ว เนื่องจากปฏิกิริยาการเกิดพอลิเมอร์เป็นปฏิกิริยาคายความร้อนทำให้อุณหภูมิภายในระบบเพิ่มขึ้นอีกด้วย การกระจายความร้อนภายในระบบเกิดได้ต่ำเพราะความหนืดที่เกิดเพิ่มขึ้นระหว่างการสังเคราะห์ ทำให้การสังเคราะห์วิธีการนี้มีโอกาสเกิดตำแหน่งจุดเข้มของความร้อน ซึ่งอาจเป็นตำแหน่งที่ทำให้เกิดการสลายตัวของพอลิเมอร์ระหว่างการสังเคราะห์

- ปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบตกตะกอน (precipitation polymerization)

เป็นวิธีการสังเคราะห์ที่คิดค้นขึ้น เพื่อขจัดปัญหาเกี่ยวกับความหนืดและการเกิดจุดเข้มของความร้อนระหว่างการสังเคราะห์แบบบัลค์ มีการใช้ตัวทำละลายแท้จริง เช่น คลอโรฟอร์ม โทลูอีน หรืออื่นๆร่วมในระบบ ตัวทำละลายที่เลือกใช้นี้ต้องสามารถละลายส่วนผสมทุกชนิดในระบบได้ซึ่งรวมทั้งพอลิเมอร์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการสังเคราะห์ด้วย ความหนืดของระบบเมื่อเกิดปฏิกิริยาการเกิดพอลิเมอร์มีเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกันกับวิธีการสังเคราะห์แบบบัลค์ อย่างไรก็ตามไม่สูงเท่ากับกรณีของการสังเคราะห์แบบบัลค์ การควบคุมความหนืดสามารถทำได้โดยการเติมเพิ่มปริมาณตัวทำละลายเข้าไปในระบบระหว่างการสังเคราะห์

การใช้ตัวทำละลายเข้าไปมีส่วนร่วมในการสังเคราะห์วิธีการนี้ พบว่าการคงค้างของตัวทำละลายในเนื้อพอลิเมอร์ (polymer matrix) มีส่วนทำให้พอลิเมอร์เกิดการปนเปื้อน นอกจากนี้ปริมาณปนเปื้อนเพราะตัวทำละลายในการสังเคราะห์พอลิเมอร์แต่ละครั้งมีความแตกต่างกัน ซึ่งส่งผลกระทบถึงสมบัติของพอลิเมอร์ที่เกิดขึ้นเสมอ

- ปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบแขวนลอย (suspension polymerization)

เป็นวิธีการสังเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นโดยใช้แนวคิดในเรื่องความบริสุทธิ์ของพอลิเมอร์ที่เกิดขึ้นและความสามารถในการระบายความร้อนจากปฏิกิริยาการเกิดพอลิเมอร์ การสังเคราะห์ด้วยวิธีการนี้จะใช้การกวนสารละลายระหว่างมอนอเมอร์กับสารก่อเกิดปฏิกิริยาในตัวกลางบางชนิดที่ไม่ผสมกับสารละลายมอนอเมอร์ เช่น น้ำ เป็นต้น ทำให้ภายในหยดสารละลายมอนอเมอร์มีสภาพคล้ายกับวิธีการสังเคราะห์แบบบัลค์ ความร้อนจากปฏิกิริยาการเกิดพอลิเมอร์จะระบายออกจากหยดมอนอเมอร์ไปยังตัวกลาง การสังเคราะห์วิธีการนี้การกวนจะต้องกระทำอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งปฏิกิริยาการเกิดพอลิเมอร์เกิดขึ้นในเปอร์เซนต์ที่สูงพอจนทำให้หยดมอนอเมอร์มีสภาพผิวที่แกร่งพอ จนสามารถจะแยกออกจากระบบได้ ในทางปฏิบัติอาจมีการเติมสารความแกร่งหรือสร้างประจุบนผิวของหยดมอนอเมอร์เรียกว่า “สารซัสเพนดิง (suspending agent)” เพื่อทำให้การรวมตัวกันของหยดมอนอเมอร์เมื่อเกิดการกระทบกันระหว่างการกวนน้อยลง พอลิเมอร์ที่เกิดขึ้นจะมีรูปทรงกลมหรือรีเล็กน้อยตามลักษณะของหยดมอนอเมอร์ที่แขวนตัวอยู่ในตัวกลาง ข้อบกพร่องของการสังเคราะห์วิธีการนี้อยู่ที่ระบบการกวนเพราะหาตำแหน่งใบพัดไม่เหมาะสม สัดส่วนตัวกลางกับมอนอเมอร์ไม่มากพอ หรือเกิดการขัดข้องทางระบบไฟฟ้าระหว่างการสังเคราะห์จะส่งผลให้การสังเคราะห์วิธีการนี้ไม่ประสบความสำเร็จ

- ปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบอิมัลชัน (emulsion polymerization)

เป็นวิธีการสังเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นโดยการทำให้หยดมอนอเมอร์สามารถแขวนลอยอยู่ได้ในน้ำโดยไม่เกิดการตกตะกอนและไม่ต้องอาศัยการกวนเพื่อทำให้เกิดการกระจายตัวของหยดมอนอเมอร์ ซึ่งลักษณะนี้เป็นลักษณะที่พบได้ในระบบอิมัลชันจากสารธรรมชาติ เช่น น้ำนม หรือน้ำยางพารา เป็นต้น การคงสภาพของมอนอเมอร์ในตัวกลางของระบบนี้ต้องอาศัยสารช่วยการคงสภาพ เรียกว่า “สารอิมัลซิฟายอิง (emulsifying agent) พอลิเมอร์ที่ได้มักจะมีขนาดที่เล็กมากจนมีลักษณะคล้ายผงละเอียดและมีสภาพผิวที่ขรุขระมากกว่าการสังเคราะห์แบบแขวนลอย

1.6 โมเลคิวลาร์อิมพรินต์ซอร์เบนท์แอสเสย์ (molecular imprinted sorbent assay, MIA)

เมื่อเปรียบเทียบ MIP กับแอนติบอดีแล้ว MIP จะเป็นวัสดุที่มีคุณสมบัติที่ดีเยี่ยมคือ มีความแข็งแรงเชิงกายภาพสูง ทนทานต่ออุณหภูมิและความดันปานกลาง และเฉื่อยต่อกรด เบส ไอออนของโลหะและตัวทำละลายอินทรีย์ นอกจากนี้แล้วยังมีราคาถูกและสามารถเตรียมได้ง่ายโดยใช้สารตันแบบที่เป็นสารที่ต้องการจะวิเคราะห์ได้โดยตรง ส่วนแอนติบอดีจะมีขั้นตอนในการเตรียมที่ยุ่งยาก โดยจะต้องเตรียม hapten ซึ่งเป็นโปรตีนที่เชื่อมต่อกับสารที่มีโครงสร้างไกล้เคียงกับสารที่จะวิเคราะห์ก่อนแล้วจึงฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองเพื่อให้สร้างแอนติบอดี นอกจากนี้ยังเสียสภาพได้ง่าย แต่ข้อดีของแอนติบอดีก็คือมีความจำเพาะที่สูงกว่า MIPs โดยเฉพาะเมื่อการจับกันของสารอยู่ในน้ำ

อย่างไรก็ตามได้มีความพยายามที่จะใช้ MIPs แทนแอนติบอดีใน heterogeneous ligand binding assay ซึ่งเริ่มต้นในปี 1993 โดย Vlatakis และคณะ [21] ได้ใช้ MIPs ที่จำเพาะกับ diazepam

และ morphine ใน competitive radioligand binding assays สำหรับตรวจหายานี้ โดยใช้รูปแบบที่เหมือนกับวิธี solid phase radioimmunoassay (RIA) ต่อมาก็ได้มีการพัฒนารูปแบบของ MIA เพื่อเพิ่มความไวและความจำเพาะของเทคนิค ลดปริมาณพอลิเมอร์ที่ใช้และสามารถทำได้ในตัวกลางที่เป็นน้ำ นอกจากนี้ยังได้มีการใช้สารตัวตรวจ (probe) ชนิดอื่นๆนอกเหนือจากสารรังสี เช่น ใช้สารเรืองแสงหรือเอนไซม์เป็นต้น

1.6.1 ตัวอย่างเทคนิค MIAs ที่ได้มีการศึกษา

ที่ผ่านมาพอลิเมอร์ที่ใช้ใน MIA จะอยู่ในรูปแบบของเม็ดพอลิเมอร์ ดังนั้นการใช้ radiolabelled probes จึงทำได้สะดวกที่สุดเนื่องจากสารตัวตรวจที่ติดฉลากด้วยสารรังสีจะมีรูปร่างที่เหมือนกับสารที่จะวิเคราะห์ทุกประการ โดยหลังจากที่ทำ competitive binding ก็จะทำการวัดปริมาณรังสีของ supernatant อย่างไรก็ตามการใช้สารรังสีก็มีข้อจำกัดเนื่องจากก่อให้เกิดของเสียซึ่งเป็นสารรังสี และจะต้องทำในห้องปฏิบัติการเฉพาะ ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนา MIAs โดยใช้สารตัวตรวจชนิดอื่นๆ เช่น chromophore labelled probes, fluorophore labelled probes และ enzyme labelled probes เป็นต้น ตัวอย่างของเทคนิคเหล่านี้แสดงดังตาราง 1.1

ตาราง 1.1 ตัวอย่าง MIAs ประเภทต่างๆที่ได้มีการพัฒนาขึ้น

Template	Probe	Assay solvent	Ref
	Radiolabelled		
Morphine	3H-Morphine	(a) Toluene, (b) citrate pH6/EtOH(9:1)	12
Cortisol	3H-Cortisol	THF	22
S-Propranolol	3H- S-Propranolol	Toluene	23
2,4-D	14C-2,4-D	Phosphate pH7/Triton X-100 (999:1)	24
Caffeine	14C-Caffeine	(a) Heptane/THF (3:1), (b) MeCN	25
	Chromophore-labelled		
Chloramphenicol	Chloramphenicol-methyl red	MeCN	26,27
Biotin methyl ester	Biotin nitrophenyl ester	MeCN	28

ตาราง 1.1 (ต่อ)

Template	Probe	Assay solvent	Ref.
	Fluorophore-labelled		
Triazine	5-(4,6Dichlorotriazinyl) aminofluoresceine	EtOH	29
chloramphenicol	Dansylated chloramphenicol	MeCN	30
Atrazine	5-(4,6-Dichlorotriazinyl) aminofluoresceine	Water	31
	Enzyme-labelled		
2,4-D	2,4-D-tobacco peroxidase	Phosphate pH7/Triton X-100(999:1)	32
Epinephrine	Norepinephrine-horseradish peroxidase	Phosphate pH6	31
Microcystin-L,R	Microcystin-horseradish peroxidase	Phosphate pH7	33

1.6.2 Enzyme-linked molecularly imprinted sorbent assays

enzyme labeled probes เป็นสารตัวตรวจที่ได้รับความนิยมมากในเทคนิคอิมมูโนแอสเสย์ เนื่องจากสามารถใช้ในปริมาณน้อยๆ ได้ แต่ให้สัญญาณที่สามารถตรวจวัดได้อย่างชัดเจน ไม่ว่าจะเป็นสารที่มีสี สารเรืองแสง fluorescent หรือ luminescent

ใน MIAs การใช้ enzyme labels probe ถือเป็นสิ่งที่ท้าทาย เนื่องจากเอนไซม์ที่ติดฉลากกับสารอาจจะบดบังตำแหน่งของ binding sites อยู่ที่ผิวของ MIPs ทั้งชนิดที่เป็น microspheres หรือเป็นแผ่นฟิล์ม อย่างไรก็ดีได้มีรายงานที่พัฒนา ELISA-type assays ได้เป็นผลสำเร็จ

Surugiu และคณะ [34] ได้ใช้ tobacco peroxidase-labelled 2,4-D เป็น competitive probe ในการตรวจวิเคราะห์สาร 2,4-D โดยเคลือบ microtiter plate ด้วย polymer microspheres แล้ววัดปริมาณของ unbound probe ใน supernatant หลังจากแยกเอาพอลิเมอร์ออกด้วย colorimetric และ chemiluminescence assay วิธีนี้สามารถวิเคราะห์ปริมาณ 2,4-D ในช่วง 40-600 ug/ml และ 1-200 ug/ml ตามลำดับ ต่อมาได้พัฒนาแอสเสย์นี้ในรูปแบบ high-throughput imaging โดยวัดปริมาณของ

bound probe ด้วยกล้อง charge-coupled device (CCD) วิธีนี้สามารถวิเคราะห์ปริมาณ 2,4-D ได้ต่ำลงในระดับ 0.01-100 ug/ml

Piletsky และคณะ [24,35] ได้พัฒนาเทคนิค MIA เพื่อตรวจวิเคราะห์ epinephrine, atrazine และ phenylephedrine โดยใช้ horseradish peroxidase (HRP) labeled probe เป็นสาร competitor วิธีนี้ได้สังเคราะห์พอลิเมอร์ฟิล์มบางในแต่ละหลุมของ polystyrene microtiter plate โดยใช้มอนอเมอร์ aminophenylboronic acid ทำปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันในสารละลายที่มี epinephrine ผสมอยู่ แอสเสย์นี้ได้ทำที่ pH 6-8 เพื่อลด nonspecific binding ของเอนไซม์กับพอลิเมอร์ซึ่งทำให้การตรวจวัด atrazine ไม่ได้ผล แต่เทคนิคนี้ก็ยังให้ผลดีกับ epinephrine และ phenylephedrine

1.6.3 การพัฒนาเทคนิค competitive ligand-binding MIA

โดยทั่วไปในการพัฒนาเทคนิค MIA จะประกอบด้วยขั้นตอนที่สำคัญ 4 ขั้นตอนคือ

1. เตรียม MIP ที่จำเพาะต่อสารที่ต้องการจะวิเคราะห์ โดยรูปแบบของพอลิเมอร์ที่ใช้อาจจะเป็น magnetic bead, microspheres หรือเป็นแผ่นฟิล์มบางที่เคลือบในหลุมของ microtiter plate

2. ตรวจสอบการจับกันของสารตัวตรวจกับ MIP โดยใช้สารตัวตรวจในปริมาณที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้และหาปริมาณของ MIP ที่จะจับกับสารตัวตรวจได้ 50% ทำการเปรียบเทียบการจับกับ NIP เพื่อยืนยันว่าภายใต้สภาวะที่ใช้ในการจับกันของสารตัวตรวจกับ MIP เป็นการจับกันแบบจำเพาะ

3. ตรวจสอบการยับยั้งการจับกันของสารตัวตรวจกับ MIP ด้วยสารที่จะวิเคราะห์และสารอื่นๆที่อาจจะมีโครงสร้างไกล้เคียง เพื่อหาความไวในการวิเคราะห์และ cross-reactivity

4. ประเมินประสิทธิภาพของ MIA หลังจากที่ได้สภาวะที่เหมาะสมโดยใช้ตัวอย่างจริง

เอกสารอ้างอิง

(1) Van, L. F.; Phanuphak, P.; Ruxrungtham, K. *Lancet* 2004, 363, 1253-1263.

(2) Richman, D. D.; Havlir, D.; Corbeil, J. *J. Virol.* 1994, 68, 1660-1666.

(3) Kappelhoff, B. S.; Rosing, H.; Huitema, A. D.; Beijnen, J. H. *J. Chromatogr. B* 2003, 792, 353.

(4) Egge-Jacobsen, W.; Unger, M.; Niemann, C. U. *Ther. Drug Monit.* 2004, 26, 546.

(5) Azoulay, S.; Nevers, M. C.; Cr´eminon, C. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004, 48, 104.

(6) Wild, D. *The Immunoassay Handbook*; 2 ed.; Nature Publishing Group: New York, 2001.

(7) Lequin, R. M. *Clinical Chemistry* 2005, 51, 2415–2418.

(8) Ishikawa, E. *Enzyme Immunoassay*; Lippincott Williams & Wilkins,US: New York, 1982.

(9) Weller, M. G. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 2000, 366, 635-645.

(10) Wulff, G.; Sarhan, A. *Angew. Chem.* 1972, 84, 364.

(11) Arshady, R.; Mosbach, K. *Makromol. Chem.* 1982, 182, 687.

(12) Andersson, L. I.; Muller, R.; Vlatakis, G.; Mosbach, K. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1995, 92, 4788.

(13) Cormack, P. A. G.; Elorza, A. Z. *J.Chromatogr. B* 2004, 804, 173–182.

(14) Fischer, E. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 1894, 27, 2985.

(15) Andersson, L. I. *J. Chromatogr. B: Biomedical Sciences and Applications* 2000, 745, 3-13.

(16) Hennion, M.-C.; Pichon, V. *J. Chromatogr.A A Century of Chromatography* 1903-2003 2003, 1000, 29-52.

(17) Owens, P. K.; Karlsson, L.; Lutz, E. S. M.; Andersson, L. I. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 1999, 18, 146-154.

(18) Andrea, P.; Miroslav, S. r. a.; Silvia, S. r. a.; Stanislav, M. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2001, 76, 286-294.

(19) Haupt, K.; Mosbach, K. *Trends in Biotechnology* 1998, 16, 468-475.

(20) Dickert, F. L.; Halikias, K.; Hayden, O.; Piu, L.; Sikorski, R. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2001, 76, 295-298.

(21) Vlatakis, G. *Nature* 1993, 361, 645-647.

(22) Ramström, O.; Ye, L.; Mosbach, K. *Chem. Biol.* 1996, 471-477.

(23) Ansell, R. J.; Mosbach, K. *Analyst* 1998, 30, 1611-1618.

(24) Haupt, K.; Dzgoev, A.; Mosbach, K. *Anal. Chem.* 1998, 70, 628-631.

(25) Ye, L.; Weiss, R.; Mosbach, K. *Macromolecules* 2000, 33, 8239-8245.

(26) McNiven, S.; Kato, M.; Levi, R.; Yano, K.; Karube, I. *Anal. Chim. Acta* 1998, 365, 69-74.

(27) Levi, R.; McNiven, S.; Piletsky, A.; Cheong, S.-H. Y., I.; Karube, K. *Anal. Chem.* 1997, 69, 2017-2021.

(28) Takeuchi, T.; Dobashi, A.; Kimura, K. *Anal. Chem.* 2000, 72, 2418-2422.

(29) Piletsky, S. A.; Piletskaya, E. V.; El'Skaya, A. V.; Levi, R.; Yano, K.; Karube, I. *Anal. Lett.* 1997, 30, 445-455.

(30) Suarez-Rodriguez, J. L.; Diaz-Garcia, M. E. *Biosens. Bioelectron.* 2001, 16, 955-961.

(31) Piletsky, S. A.; Piletska, E. V.; Bossi, A.; Karim, K.; Lowe, P.; Turner, A. P. F. *Biosens. Bioelectron.* 2001, 16, 701-707.

(32) Surugiu, I.; Ye, L.; Yilmaz, E.; Dzgoev, A.; Danielsson, B.; Mosbach, K.; Haupt, K. *Analyst* 1999, 125, 13-16.

(33) Chianella, I.; Lotierzo, M.; Piletsky, S. A.; Tothill, I. E.; Chen, B. N.; Karim, K.; Turner, A. P. F. *Anal. Chem.* 2002, 74, 1288-1293.

(34) Surugiu, I.; Danielsson, B.; L., Y.; Mosbach, K.; Haupt, K. *Anal. Chem.* 2001, 73, 487-491.

(35) Piletsky, S. A.; Piletska, E. V.; Chen, B.; Karim, K.; Weston, D.; Barrett, G.; Lowe, P.; Turner, A. P. F. *Anal. Chem.* 2000, 72, 4381-4385.

บทที่ 2
การพัฒนาแผ่นตรวจยาต้านไวรัสเอชไอวีชนิดเนวิราพีน (เอ็นวีพี)

2.1 บทนำ

เนวิราพีน (NVP) เป็นยาตัวแรกในกลุ่มของ Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibiter (NNRTIs) ที่ได้รับการรับรองให้ใช้รักษาผู้ติดเชื้อเอชไอวี (HIV) ในสหรัฐอเมริกา ยาชนิดนี้ออกฤทธิ์ยับยั้งอย่างจำเพาะต่อ reverse transcriptase (RT) ของ HIV-1 โดยการออกฤทธิ์ของ NVP จะเป็นแบบ noncompetitive คือไม่มีการแย่งจับแข่งกับ native nucleotides แต่เป็นการจับ HIV-1 RT ตรงบริเวณ downstream จากบริเวณเร่ง (catalytic site)[1] ในปัจจุบัน Nevirapine (NVP) มักจะใช้เป็นยาตัวหนึ่งในสูตรยาร่วม 3 ชนิด (triple drug therapy) นอกจากนี้ยังใช้ในสูตรรักษาแบบระยะสั้น (short course) ในการป้องกันการติดเชื้อ HIV จากแม่ไปสู่ลูก (mother-to-child transmission of HIV (PMTCT)[2,3] ข้อดีของยาชนิดนี้คือ มีฤทธิ์นาน สามารถรับประทานเพียงวันละ 1-2 ครั้ง ไม่มีข้อจำกัดเรื่องอาหาร แต่ข้อเสียคือมีผลข้างเคียงเช่น ผื่นขึ้นในช่วง 2-4 สัปดาห์แรกของการกินยา ทำให้การทำงานของตับผิดปกติ ดีซ่าน ตับอักเสบ นอกจากนี้เมื่อใช้เดี่ยว ๆ หรือร่วมกับยาในสูตรที่อ่อนหรือล้มเหลวในการรักษามาก่อน จะทำให้เกิดการดื้อยาอย่างรวดเร็วมากซึ่งจะทำให้การรักษาไม่สัมฤทธิ์ผล

จากการสำรวจจำนวนผู้ติดเชื้อเอดส์ในประเทศไทยของกระทรวงสาธารณสุขในรอบ 10 ปีที่ผ่านมาพบว่ามีผู้ติดเชื้อเอดส์ที่ยังมีชีวิตอยู่ราว 1 ล้านคนและมีการคาดหมายว่าจะมีผู้ป่วยเอดส์ใหม่เพิ่มขึ้นอีกถึงปีละ 5-6% ในปัจจุบันจำนวนผู้เสียชีวิตจากโรคเอดส์จะลดลงไปมาก เนื่องจากยาต้านไวรัสสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อไวรัสได้ ทำให้ร่างกายของผู้ป่วยสร้างภูมิต้านทานได้มากขึ้นและผู้ป่วยเริ่มมีสุขภาพดี สามารถกลับไปใช้ชีวิตได้ตามปกติ แต่อย่างไรก็ดีการรักษาก็ยังคงต้องทำไปอย่างต่อเนื่อง แม้ว่าการใช้ triple drug therapy จะให้ผลในการรักษาที่น่าพอใจแต่ความล้มเหลวในการรักษาก็ยังคงเกิดขึ้น ส่วนหนึ่งเกิดจากการที่ผู้ป่วยไม่ปฏิบัติตามข้อตกลงของการใช้ยาอย่างเคร่งครัด เช่นการกินยาไม่ต่อเนื่องหรือหยุดยา พฤติกรรมในการรับประทานยาที่ไม่ตรงเวลาและไม่สม่ำเสมอของผู้ป่วยกลับกลายเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เชื้อไวรัสเอชไอวีเกิดการกลายพันธุ์ อันเป็นเหตุให้การรักษาด้วยยาต้านไวรัสเอดส์ที่มีอยู่นั้นไม่สัมฤทธิ์ผลปัญหานี้เป็นปัญหาระดับชาติที่ทำให้รัฐบาลต้องสูญเสียงบประมาณจำนวนมหาศาลในการดูแลรักษาผู้ป่วยเหล่านี้

Therapeutic drug monitoring program เป็นวิธีการหนึ่งที่ช่วยลดหรือชะลอความเสี่ยงต่อการดื้อยา[4] โดยในการรักษาจะให้ยาอย่างเป็นระบบควบคู่ไปกับร่วมกับการตรวจสอบปริมาณยาในผู้ป่วยอย่างใกล้ชิดเพื่อดูว่าผู้ป่วยมีการรับประทานยาตามที่แพทย์สั่งหรือไม่ ซึ่งจะช่วยให้ผู้ป่วยได้รับยาในปริมาณที่เหมาะสม นอกจากนี้ยังช่วยลดอาการข้างเคียง ชะลอการดื้อยาและปลอดภัยกับหญิงมีครรภ์ที่ติดเชื้อ จากการศึกษาวิจัยพบว่าระดับของเชื้อไวรัส HIV แปรผันโดยตรงกับปริมาณของ nevirapine ใน

พลาสมา[5] อีกทั้งยาชนิดนี้ยังถูก metabolize ได้ช้ากว่ายาต้านไวรัสชนิดอื่นๆ ดังนั้น nevirapine จึงเป็นยาที่มีความสำคัญที่ต้องตรวจวิเคราะห์ใน Therapeutic drug monitoring program

ในปัจจุบันการตรวจสอบปริมาณยาในผู้ป่วยจะทำโดยการเก็บตัวอย่างเลือดผู้ติดเชื้อ HIV มาทำการแยกซีรั่มเพื่อตรวจดูระดับยาต้านไวรัสเอชไอวีด้วยเทคนิค HPLC[6] ทุกเดือน เทคนิคนี้ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง ต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์ ใช้เวลานานและราคาในการวิเคราะห์สูง จึงไม่สามารถทำการติดตั้งได้ในทุกโรงพยาบาล โดยเฉพาะยิ่งเฉพาะในชนบทที่ห่างไกล อีกทั้งการนัดหมายผู้ติดเชื้อ HIV เจาะเลือดในรูปแบบนี้ ทำให้ผู้ติดเชื้อรู้ทันและหันกลับมารับประทานยาในช่วงที่ใกล้กับวันนัด ทำให้ไม่ได้ผลตรวจที่แท้จริง

แนวทางหนึ่งที่จะช่วยแก้ปัญหานี้คือการใช้วิธีทางอิมมูโนแอสเซย์ (immunoassay) ซึ่งเป็นวิธีที่มีความจำเพาะและความไวในการตรวจวิเคราะห์สูง วิธีการไม่ยุ่งยากไม่ต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญหรือเครื่องมือราคาแพง นอกจากนี้ยังสามารถพัฒนาไปสู่การตรวจวิเคราะห์แบบ automation analysis หรือ strip test ทำให้สะดวกรวดเร็วและช่วยลดค่าใช้จ่ายในการรักษา

เมื่อไม่นานมานี้ได้มีรายงานวิจัยที่พัฒนา competitive ELISA สำหรับตรวจสอบยาชนิดนี้[7] โดยได้เตรียมพอลิโคลนอลแอนติบอดีจากอิมมูโนเจนที่เป็นคอนจูเกตของโปรตีน keyhole limpet hemocyanin (KLH) กับอนุพันธ์ของ nevirapine ซึ่งพบว่าความไวในการวิเคราะห์ดีกว่าวิธี HPLC ถึง 100 เท่าและยังให้ความจำเพาะในการตรวจวัดสูง ใช้งานง่ายสะดวกรวดเร็วกว่า

อย่างไรก็ตามเพื่อให้การตรวจติดตามยาในผู้ป่วยทำได้ง่ายขึ้น การพัฒนาแผ่นตรวจ (strip test) น่าจะเป็นทางออกหนึ่งที่จะทำให้การควบคุมการใช้ยาในคนไข้มีประสิทธิภาพดีและทำได้ทั่วถึงยิ่งขึ้น โดยแผ่นตรวจเป็นเทคนิควิเคราะห์เชิงคุณภาพที่ทำได้ง่าย สะดวกรวดเร็ว และมีราคาถูก สามารถใช้ตรวจวิเคราะห์สารได้หลากหลาย[8-11] หลักการของเทคนิคนี้จะอาศัยการเคลื่อนที่ของแอนติบอดีหรือแอนติเจนที่ติดฉลากด้วยสารตัวตรวจ (probe) ผ่านไปที่แถบของแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ได้เคลือบไว้ที่ผิวของเมมเบรนบนแผ่นตรวจ โดยทั่วไปจะนิยมใช้ colloidal gold เป็นสารตัวตรวจมากกว่าที่จะใช้สารเรืองแสงหรือเอนไซม์ เนื่องจากมีความเสถียร ไม่ต้องใช้ปฏิกิริยาอื่นใดในการทำให้ผลปรากฏเหมือนในกรณีของเอนไซม์[12,13] การที่ colloidal gold ไปสะสมอยู่ที่ใดที่หนึ่งในปริมาณมากจะทำให้เห็นเป็นแถบสีแดงม่วง จากคุณสมบัตินี้ทำให้เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์สั้นลง

2.2 เครื่องมือ/วัสดุอุปกรณ์

96-well microtiter plates (Nunc, Denmark)

automatic plate reader (Tecan, Austria)

NMR spectrometer รุ่น Bruker DRX 400 MHz สำหรับ ^{1}H และ 100 MHz สำหรับ ^{13}C

Transmission electron microscope equipped with energy dispersive spectrometer (EDS) (JEOL JEM-2010, Japan)

Isoflow dispenser (Imagene Technology, USA).

Precision Laminator (Zeta Corporation, Korea)

Strip cutter (INDEX CUTTER, USA)

2.3 สารเคมี

Bovine serum albumin (BSA), บริษัท Sigma, USA.

chloroauric acid, HAuCl4·3 H2O, บริษัท Fluka, USA.

1,3-diisopropylcarbodiimide (DIC), บริษัท Fluka, USA.

4-(dimethylamino)pyridine (DMAP), บริษัท Fluka, USA.

N-hydroxy succinimide (NHS), บริษัท Fluka, USA.

methyl-5-bromovalerate,, บริษัท Fluka, USA.

Nevirapine, องค์การเภสัชกรรมแห่งประเทศไทย (GPO), Thailand

zidovudine (AZT), บริษัท Sigma, USA.

lamivudine (3TC), บริษัท Sigma, USA.

didanosine (ddI), บริษัท Sigma, USA.

abacavir (ABC), บริษัท Sigma, USA.

stavudine (d4T), บริษัท Sigma, USA.

efavirenz (EFV), บริษัท Sigma, USA.

indinavir (IDV), บริษัท Sigma, USA.

saquinavir (SQV), บริษัท Sigma, USA.

amprenavir (APV), บริษัท Sigma, USA.

ritonavir (RTV), บริษัท Sigma, USA.

nelfinavir (NFV), บริษัท Sigma, USA.

NFV metabolite (M8), บริษัท Sigma, USA.

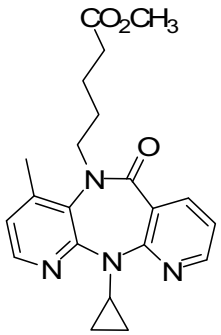
lopinavir (LPV), บริษัท Sigma, USA.

2.4 วิธีการทดลอง

2.4.1 การเตรียมเนวิราพีนคอนจูเกตกับโปรตีน BSA (NVP-BSA)

ทำการสังเคราะห์โปรตีนคอนจูเกต NVP-BSA โดยใช้วิธีตามรายงานของ Azoulay และคณะ [7] โดยใช้ BSA เป็นโปรตีนตัวพา (carrier protein)

การสังเคราะห์อนุพันธ์เมธิลเอสเธอร์ของ NVP



1

นำ NVP (100 mg, 0.36 mmol) มาละลายในไดเมธิลฟอร์มาไมด์ (1.5 ml) จากนั้นเติมโพแทสเซียมคาร์บอเนต (149.3 mg, 1.08 mmol) ตามด้วยสารละลายของเมธิล-5-โบรโมวาลีเรต A (60 μl, 0.36 mmol) ในไดเมธิลฟอร์มาไมด์ นำสารผสมที่ได้ไปรีฟลักซ์เป็นเวลา16 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลง แล้วกรองเอาส่วนที่เป็นของเหลวมาระเหยตัวทำละลายออกภายใต้สูญญากาศ นำสารผลิตภัณฑ์หยาบที่ได้มาตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยวิธี Thin layer chromatography (TLC) ทำการแยกสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโทกราฟีคอลัมน์โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับและใช้ตัวทำละลายผสมของเฮกเซน: เอทิลอะซิเตท 70:30 เป็นตัวชะ นำของเหลวที่แยกได้ไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้สูญญากาศได้ NVP linked methyl ester **1** มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลือง คิดเป็นร้อยละของผลผลิต (% yield) เท่ากับ 52% พิสูจน์เอกลักษณ์โดยใช้เทคนิค NMR ได้ผลดังแสดง

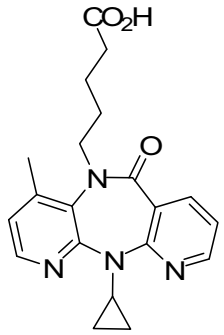
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$)

δ 8.49 (dd, *J* = 2, 4.8 Hz, 1H), 8.05 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 7.75 (dd, *J* = 2, 7.6 Hz, 1H), 6.97 (dd, *J* = 7.6, 4.8 Hz, 1H), 6.92 (d, *J* = 5.2, 1H), 4.38 (t, 2H), 3.66 (s, 3H), 3.65 (m, 1H), 2.42 (t, 2H), 2.34 (s, 3H), 1.87(m, 4H), 0.96 (m, 2H), 0.47 (m, 2H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$)

δ 173.7, 162.9, 159.0, 152.8, 151.3, 143.8, 143.5, 137.3, 132.7, 122.0, 119.6, 118.4, 51.5, 33.7, 29.0, 28.2, 21.7, 18.0, 8.7, 8.6.

NVP linked carboxylic acid 2.



2

นำสาร **1** (78.1 mg, 0.20 mmol) มาละลายในสารละลายผสมของเตตราไฮโดรฟิวราน: เมธานอล: น้ำ ในอัตราส่วน 3:2:1 (2 ml) จากนั้นเติมลิเธียมไฮดรอกไซด์โมโนไฮเดรต ($LiOH.H_2O$) (16.7 mg, 0.40 mmol) คนที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้สูญญากาศ นำสารที่ได้มาเติมน้ำแล้วปรับ pH ให้เป็นกลางด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1 M นำสารละลายที่ได้มาสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท 2 x 2 ml จากนั้นจึงกำจัดน้ำในตัวทำละลายอินทรีย์ออกด้วยการเติมแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต หลังจากนั้นกรองเอาส่วนที่เป็นของเหลวมาระเหยตัวทำละลายออกภายใต้สุญญากาศให้ NVP linked carboxylic acid **2** มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลือง คิดเป็นร้อยละของผลผลิตเท่ากับ 85% พิสูจน์เอกลักษณ์โดยใช้เทคนิค NMR ได้ผลดังแสดง

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$)

δ 8.49 (dd, *J* = 2, 4.8 Hz, 1H), 8.10(d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 7.78 (dd, *J* = 2, 7.6 Hz, 1H), 6.99 (dd, *J* = 7.6, 4.8 Hz, 1H), 6.90 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 4.40 (t, 2H), 3.66 (m,1H), 2.42 (t, 2H), 2.32 (s, 3H), 1.87 (m, 4H), 0.96 (m, 2H), 0.47 (m, 2H)

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$)

δ 177.9, 162.8, 159.0, 152.6, 151.4, 144.0, 143.7, 137.4, 132.8, 122.0, 119.6, 118.5, 33.6, 29.0, 28.1, 21.0, 18.1, 14.1, 8.9, 8.7.

การสังเคราะห์ NVP-BSA conjugate

นำสาร **2** (33 mg; 0.087 mmol) มาทำปฏิกิริยากับเอ็น-ไฮดรอกซีซัคซินิไมด์ (NHS) (12.0 mg; 0.1 mmol) ในแอนไฮดรัสไดเมธิลฟอร์มาไมด์ (3.6 ml) โดยใช้ 1,3-ไดไอโซโพรพิลคาร์โบไดอิไมด์ (23.4 mg; 0.11 mmol) เป็นคัปปลิงรีเอเจนต์ โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 16 h จากนั้นนำสารที่ได้มาหยดอย่างช้าๆลงในสารละลายของ BSA ในคาร์บอเนต/ ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ pH 8.2 ที่ 0°C จากนั้นคนต่ออย่างช้าๆ ที่อุณหภูมิห้องหนึ่งชั่วโมง แล้วคนทิ้งไว้อีก 24 h ที่ 4°C นำสารละลายของโปรตีนคอนจูเกตที่ได้ไปทำการไดอะไลซีสสามครั้งใน 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (pH 7.4) เพื่อกำจัดสารโมเลกุลเล็กๆที่เหลือจากปฏิกิริยาออก โดยสารละลายที่ได้หลังจากไดอะไลซีสจะเก็บไว้ที่ -20 °C ก่อนที่จะนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

การเตรียม polyclonal antibodies

ทำการฉีดกระตุ้นกระต่าย (An albino New Zealand rabbit) เพื่อให้สร้างโพลีโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ NVP ด้วย 1.0 mg ของ NVP-BSA antigen ที่ผสมกับ Freund's adjuvant ทำการฉีดกระตุ้นด้วย 1.0 mg แอนติเจนใน incomplete Freund's adjuvant หนึ่งสัปดาห์หลังจาก post-immunization ตามด้วยการฉีดกระตุ้นอีกสามครั้งโดยเว้นระยะครั้งละสองอาทิตย์ เก็บซีรัมกระต่ายก่อนที่จะถูกฉีดใต้ผิวหนังทุกครั้งก่อนที่จะฉีดแอนติเจนเพื่อนำมาตรวจสอบการตอบสนองในการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะ นำ hyperimmune serum ที่ได้สองอาทิตย์หลังจากการอิมมูไนส์ครั้งสุดท้ายและทำการตกตะกอนด้วยสารละลายอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต และนำมาไดอะไลซีสใน 5 mM โซเดียมบอแรกซ์บัฟเฟอร์ pH 9.0

2.4.2 การทดสอบและพิสูจน์คุณลักษณะของโพลีโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ NVP

2.4.2.1. Western immunoblotting

ทำ SDS-PAGE โดยนำ NVP-BSA มาแยกโปรตีนตามขนาดด้วยกระแสไฟฟ้าโดยใช้เทคนิคตามรายงานของ Laemmli และคณะ [14] โดยนำ NVP-BSA และ BSA ที่ไม่ได้ถูกคอนจูเกตในรูปที่ถูกรีดิวซ์มาทำอิเล็กโตรฟอริซีสบน 12% พอลิอะคริลาไมด์เจล โดยเตรียมตัวอย่างใน 2-เมอแคปโทเอธานอลและ SDS ภายใต้สภาวะที่ทำให้โปรตีนเสียสภาพ (denature) หลังจากเกิดการแยกจึงถ่ายแถบโปรตีนที่แยกได้ลงบนโพลี่ไวนิลลิดีนไดฟลูโอไรด์ เมมเบรน (PVDF membrane) ตามวิธีของ Tawbin และคณะ[15] บล็อคเมมเบรนด้วย 5% skimmed milk ใน PBSเป็นเวลา 1 h จากนั้นนำเมมเบรนที่ได้มาทำปฏิกิริยากับ โมโนโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อNVP โดยเติม NVP-BSA immunized rabbit serum (1:2,000 ด้วย 2% BSA ใน PBS) หลังจาก incubation 1h ล้างเอา polyclonal antibodies ที่เหลือออกแล้วเติมด้วย HRP-swine anti-rabbit immunoglobulins conjugate (DAKO, Germany) diluted 1:5,000 ใช้ TMB/H_2O_2 immunoblotting substrate solution (Fermentas,

Lithuania) ในการดู antibodies ที่ติดอยู่บนเมมเบรน มวลโมเลกุลของแถบโปรตีนที่ได้จะเทียบกับแถบโปรตีนมาตรฐาน

2.4.2.2. Competitive indirect ELISA

ใช้ competitive indirect ELISA เพื่อทดสอบปฏิกิริยาระหว่าง NVP-BSA immunized rabbit serum กับยาต้านไวรัสเอสด์ชนิดต่างๆ โดยยาที่ใช้ทดสอบได้แก่ nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs); zidovudine (AZT), lamivudine (3TC), didanosine (ddI), abacavir (ABC) and stavudine (d4T); the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs); efavirenz (EFV);and the protease inhibitors (PIs), indinavir (IDV), saquinavir (SQV), amprenavir (APV), ritonavir (RTV), nelfinavir (NFV), NFV metabolite (M8) and lopinavir (LPV). โดยปกติปริมาณของยาเหล่านี้ที่ตรวจพบในพลาสมาในระหว่างการรับยาจะอยู่ในช่วง 0.10-12 μg/ml.[16] ดังนั้นสำหรับ competitive ELISA ได้ใช้ยาที่มีความเข้มข้น 10 μg/ml เพื่อให้ใกล้เคียงกับที่พบในพลาสมา ขั้นตอนของการทดลองมีดังนี้คือ นำแอนติเจน NVP-BSA (50 μl) ที่ความเข้มข้น 10 μg/ml ในคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ pH 9.6 มาเคลือบบน EIA well ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 16 h จากนั้นแล้วทำการป้องกันการจับอย่างไม่จำเพาะของแอนติบอดีโดยการเติม 200 μl ของ 2% skimmed milk ใน PBS แล้วทิ้งไว้ 2 h ที่อุณหภูมิห้อง ล้าง blocking solution ออกด้วย 0.05% TWEEN ใน PBS นำซีรัมกระต่ายที่ 1:8,000 dilution มาผสมกับยาที่จะทดสอบ (10 μg/ml) ทิ้งไว้ 1 h ที่ 37°C จากนั้นนำสารที่ได้นี้มา เติมลงในหลุมที่เคลือบด้วย NVP-BSA หลุมละ 50 μl) หลังจากทำการล้างหลุม ก็เติมสารตรวจติดตาม HRP-swine anti-rabbit immunoglobulin conjugate ที่ 1:3,000 dilution หลุมละ 50 μl ทิ้งไว้ 1 h แล้วล้างเอารีเอเจนต์ส่วนเกินออก สุดท้ายจึงเติมสารละลายสับเสตรท TMB/H_2O_2 (100 μl) แล้วทิ้งไว้ 15 นาที ทำการหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยการเติม 1M HCl 100 μl นำเพลตมาวัด optical density (O.D.) ที่ความยาวคลื่น 450 nm เปรียบเทียบค่า O.D. ที่อ่านได้ของแต่ละหลุมซึ่งเป็นบ่งบอกถึงความสามารถของยาในการแข่งขันกับ anti-NVP polyclonal antibodies ใน hyperimmune serumของกระต่าย

2.4.3 การสังเคราะห์ colloidal gold

ทำการสังเคราะห์ colloidal gold ตามวิธีของ Turkevich และคณะ[17]โดยนำสารละลายของกรดคลอโรออริก (5 mM $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$, 5 ml) มาทำให้เจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออน 90 ml จากนั้นนำมาคนโดยให้ความร้อนจนเดือด แล้วเติม 0.5% sodium citrate solution (5 ml) เพื่อรีดิวซ์ Au(II) ไปเป็น Au(0) ให้ความร้อนจนสารละลายเปลี่ยนสีไปเป็นสีแดงม่วง

2.4.4 การเตรียม gold conjugate

นำ Polyclonal antibodies มาเจือจางใน 5 mM sodium borate buffer pH 9.0 เพื่อให้ได้ immunoglobulins เข้มข้น 2.5 mg/ml เติมสารละลายที่ได้นี้ลงในสารละลายของ colloidal gold (0.25 mM, 100 ml) อย่างช้าๆพร้อมกับคนไปด้วย โดยใช้ 0.01 M Na_2CO_3 ปรับ pH ของสารละลายให้เป็นกลาง คนสารละลายทิ้งไว้ 30 นาทีแล้วจึงเติมด้วยสารละลาย 5% BSA ใน 5 mM NaCl ปริมาตร 5 ml หลังจากทิ้งไว้ 5 นาทีนำของเหลวที่ได้มาทำการเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาทีเพื่อแยกเอา antibodies ที่ไม่ได้คอนจูเกตกับทองออก นำส่วนที่เป็นทองมาทำให้แขวนลอยใหม่ในบัฟเฟอร์ (1% BSA in 49 mM Na_2HPO_4) โดยปรับความเข้มข้นให้มีค่า O.D. เท่ากับ 40 ที่ความยาวคลื่น 580 nm

2.4.5 การพิสูจน์คุณลักษณะของ colloidal gold conjugate

2.4.5.1. การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศอิเลคตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscopy ,TEM)

ใช้เทคนิค TEM เพื่อตรวจสอบขนาดและรูปร่างของ colloidal gold ก่อนและหลังการคอนจูเกตกับแอนติบอดี โดยเตรียมตัวอย่างด้วยการหยด colloidal gold ใน acetone/H_2O ลงใน carbon-coated TEM copper grid ให้เป็นฟิล์มบาง ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งหนึ่งคืนก่อนที่จะเอามาส่องด้วยกล้อง TEM microscope ซึ่งทำที่ acceleration voltage เท่ากับ120 kV ด้วยกำลังขยาย 80,000 วัด size distributions ของ gold จากรูปภาพขยายที่ได้จาก TEM images โดยนับอนุภาคของทอง 150 counts ทำการ index หาชนิดของอนุภาคที่เห็นใน TEM จากรูปแบบของ selected area diffraction (SAD) ของอนุภาค[18]

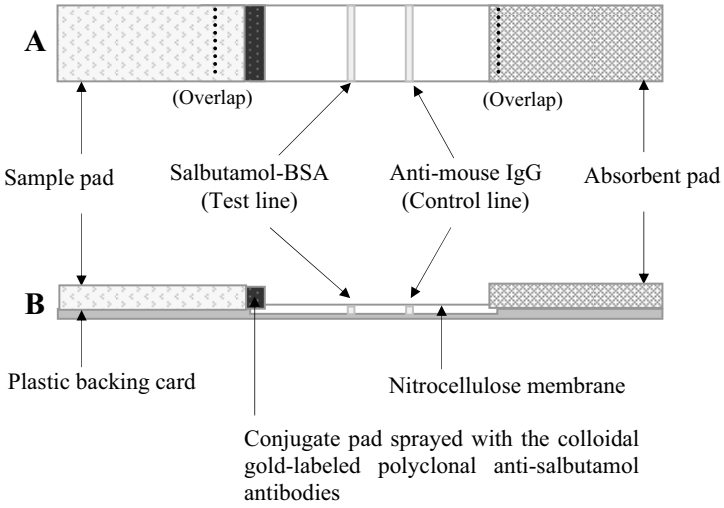
2.4.5.2. การตรวจสอบการคอนจูเกตของแอนติบอดีกับ colloidal goldด้วยเทคนิค UV-visible spectroscopy

ตรวจสอบการเกิดคอนจูเกชันระหว่าง colloidal goldกับแอนติบอดีด้วยการวัดการดูดกลืนแสงของสารละลายในช่วงความยาวคลื่น 200-700 nm โดยเตรียมตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0.5 mM ในน้ำและทำการวัดการดูดกลืนแสงทันทีหลังจากที่เตรียมสารละลายของ colloidal goldหลังจากเติมแอนติบอดีและหลังจากทำการเหวี่ยงและล้างเอาแอนติบอดีส่วนเกินที่ไม่ได้คอนจูเกตกับทองออก

2.4.6. การเตรียมแผ่นตรวจอิมมูโนโครมาโทกราฟิก

ทำการพ่นสารละลายของ gold conjugate (anti-NVP-CGC, O.D. = 40 ที่ λ 580 nm) ลงบน glass fiber (conjugate pad) ด้วยเครื่อง isoflow dispenser (Imagene Technology, USA) ติดแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (Scheicher and Schuell, Germany) กับแผ่นพลาสติกด้วยเครื่อง Precision Laminator (Zeta Corporation, Korea) นำ NVP-BSA ที่ความเข้มข้น 1.0 mg/ml และ goat anti-rabbit

IgG (KPL, USA) ที่ความเข้มข้น 0.5 mg/ml ใน PBS บัฟเฟอร์มาพ่นบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนที่เตรียมได้เป็นสองโซนคือส่วนที่เป็นแถบทดสอบ (test line) และส่วนที่เป็นแถบควบคุม (control line) ตามลำดับ จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่ 37°C เป็นเวลา 2 h นำมาทิ้งไว้ให้แห้งใน dessicator ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากแถบที่พ่นแห้งดีแล้วก็นำ sample application pad, anti-NVP-CGC sprayed conjugate pad, jetted nitrocellulose membrane, และ absorbent pad มาประกอบเป็นแผ่นใหญ่แล้วนำมาตัดเป็น strips ขนาด 3.5 mm/strip ด้วย strip cutter (INDEX CUTTER, USA) รายละเอียดของแผ่นตรวจดังแสดงในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 องค์ประกอบและตำแหน่งส่วนประกอบของชุดทดสอบ. (A) แสดงด้านบน และ (B) แสดงด้านข้าง.

2.4.7 การตรวจหา NVP ด้วยแผ่นตรวจอิมมูโนโครมาโทกราฟิก

เตรียมสารละลายมาตรฐานของ NVP ใน PBS บัฟเฟอร์ pH 7.4 ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5, 1.0 and 3.0 μg/ml ทำการวิเคราะห์หา NVP ด้วยแผ่นตรวจ IC strip test โดยการจุ่มแผ่นตรวจลงในสารละลายมาตรฐานของ NVP ทิ้งไว้จนของเหลวซึมผ่านแถบควบคุมไปถึง absorbent pad หลังจากนั้นหนึ่งนาทีจึงอ่านผลซึ่งจะเห็นแถบสีแดงที่แถบควบคุม ส่วนที่แถบทดสอบความเข้มของสีแดงจะแปรผกผันกับปริมาณของ NVP ที่มีในสารตัวอย่างเช่นถ้าไม่มี NVP จะเกิดแถบสีแดงขึ้นที่แถบทดสอบนี้

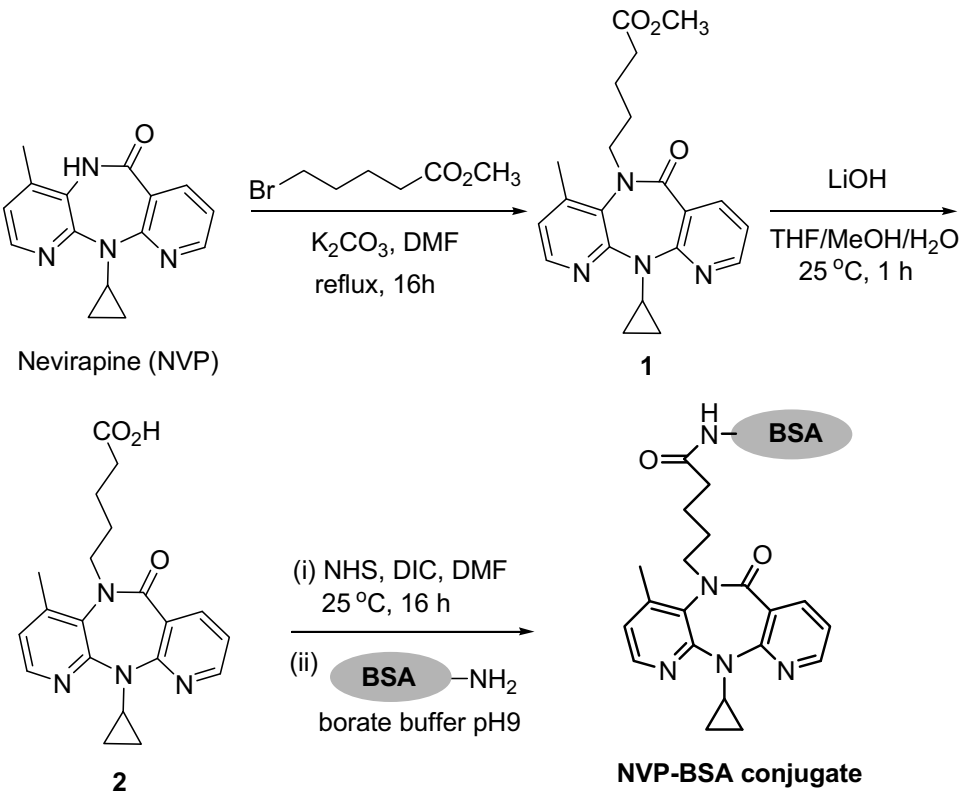
2.4.8. การศึกษา Cross-reactivity ในการตรวจสอบด้วยแผ่นตรวจอิมมูโนโครมาโทกราฟิก

ทำการทดสอบแบบเดี่ยวกับในหัวข้อ 2.10 แต่เปลี่ยนใช้สารตัวอย่างเป็นยาต้านไวรัส HIV ชนิดต่างๆซึ่งเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้น 10 μg/ml ใน PBS บัฟเฟอร์ pH 7.4 และเพื่อตรวจสอบถึงผลกระทบของ plasma matrix ต่อประสิทธิภาพของแผ่นตรวจ จึงใช้ human plasma ที่เติมและไม่ได้เติมด้วย 5.0 μg/ml ของ NVP มาทำการทดสอบด้วย

2.5 . ผลการทดลองและการอภิปรายผล

2.5.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเนวิราพีนและการต่อเชื่อมกับโปรตีน BSA

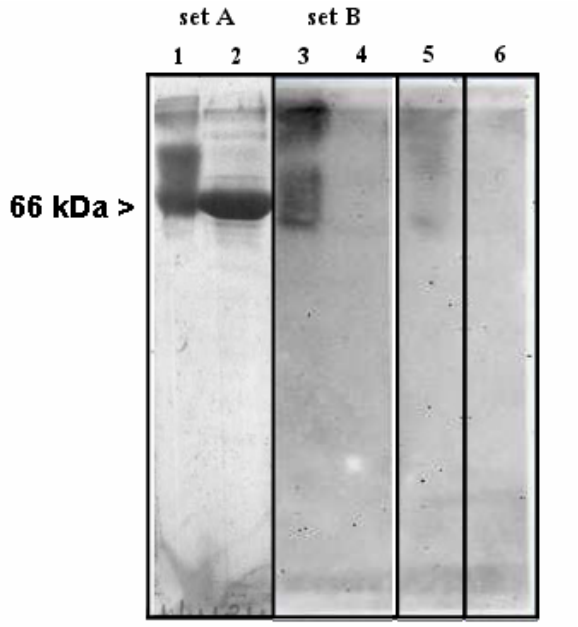
การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเนวิราพีนตามวิธีในแผนภาพ 1 โดยเริ่มต้นจากปฏิกิริยาอัลลิลเลชันของเอไมด์ด้วยmethyl-5-bromovalerate ได้เอสเทอร์ **1** จากนั้นจึงทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสในสารละลายเบส ได้อนุพันธ์กรดคาร์บอกซิลิก **2** ซึ่งเมื่อเปลี่ยนให้เป็นอนุพันธ์ของ NHS แล้วนำไปทำปฏิกิริยาต่อกับโปรตีน BSA จะได้โปรตีนที่ต่อเชื่อมกับ NVP (NVP-BSA conjugate)



แผนภาพ 2.1 การสังเคราะห์ NVP-BSA conjugate

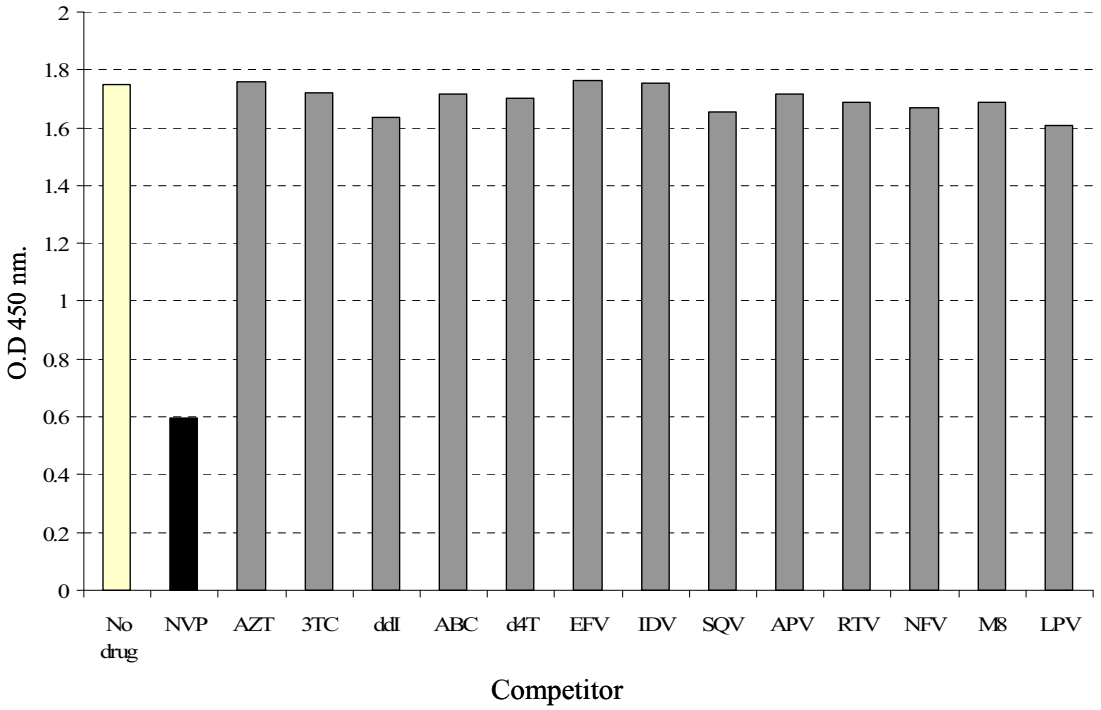
2.5.2 การประเมินคุณภาพของโพลีโคลนัลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโมเลกุลของ NVP

รูปที่ 2.2 แสดงผลที่ได้จากการทำ Western immunoblotting assay ซึ่งแสดงแถบ immunoreactive ของ NVP-BSA (lanes 1, 3, 5 และ 6) เปรียบเทียบกับของโปรตีน BSA ที่ไม่ได้คอนจูเกต(lanes 2 and 4) แถบของ NVP-BSA และ BSA bands ที่เห็นใน lanes 1 และ 2 (set A) ได้ย้อมด้วย Amido black B ซึ่งพบแถบโปรตีนหลักของ BSA ที่ 66 kDa. โปรตีนที่มีมวลโมเลกุลสูงๆน่าจะเป็นสารปนเปื้อนของ partially purified BSA fraction V แถบโปรตีนที่เห็นใน lane 3, Set B ซึ่งได้จากการ incubation ด้วยซีรัมกระต่าย (dilution 1:2,000) แสดงให้เห็นว่ามีโพลีโคลนัลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโมเลกุลของ NVP ในซีรัม การที่ไม่เห็นแถบใน (lane 4) ซึ่งมี BSA อยู่ แสดงว่า anti-BSA antibodies ที่มีอยู่ใน hyperimmune serum ได้ถูก neutralized ด้วย BSA ใน serum diluting buffer นอกจากนี้เมื่อผสม hyperimmune serum กับ 10 μg/ml NVP ก็ทำให้ความเข้มของแถบโปรตีนที่ 66 kDa และที่มวลโมเลกุลมากกว่าลดลง (lane 5) แสดงให้เห็นว่าโพลีโคลนัลแอนติบอดีที่ได้มีความจำเพาะต่อโมเลกุลของ NVP



รูปที่ 2.2 Western immunoblotting analysis of BSA-NVP and BSA. Lanes 1, 3, 5 and 6 were BSA-NVP. Lane 2 and 4 were unconjugated BSA separated under denaturing condition. Set A was stained with Amido black B for protein detection on blotting membrane. Set B was reacted with rabbit serum (dilution 1:2,000). Lane 5 was probed with rabbit serum mixed with NVP (10 μg/ml final concentration). No rabbit serum was added to lane 6. The HRP-swine anti-rabbit immunoglobulin conjugate was applied to all lanes.

เพื่อพิสูจน์ความจำเพาะของแอนติบอดีที่เตรียมได้จึงทำการทดสอบด้วยวิธี competitive indirect ELISA โดยสารที่ใช้ทดสอบเป็นยาต้านไวรัส HIV ชนิดต่างๆ ได้แก่AZT, 3TC, ddI, ABC, d4T, EFV, IDV, SQV, APV, RTV, NFV (plus NFV metabolite, M8) และ LPV ผลที่ได้แสดงดังรูป 2.3 จะเห็นว่าค่า O.D. จาก EIA well ที่มี NVP เป็น competitor น้อยกว่าค่าที่ได้จาก control well (ไม่มียา) มาก ในทางกลับกันยาต้านไวรัสชนิดอื่นๆให้ค่า O.D. ที่ใกล้เคียงกับค่าของ control well จากผลที่ได้แสดงว่า anti-NVP antibodiesที่ผลิตได้มีความจำเพาะสูงต่อ NVP

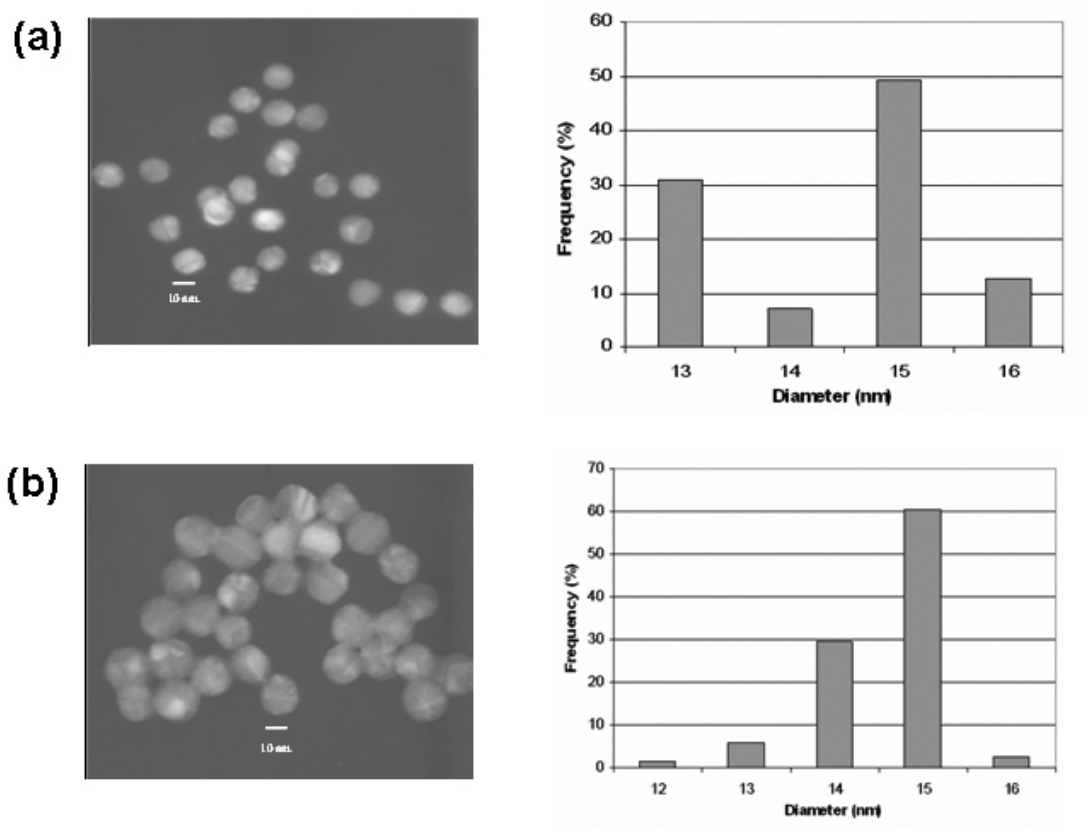


รูปที่ 2.3 Assessment of specific recognition of the rabbit anti-NVP polyclonal antibodies by competitive indirect ELISA with various anti-HIV drugs at 10 μg/ml concentration.
An OD at 450 nm was used. This experiment was performed in triplicate and a similar absorbance pattern was observed.

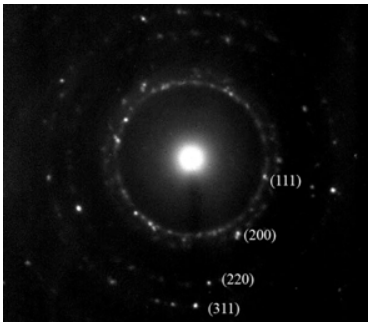
2.5.*3.* การพิสูจน์คุณลักษณะของ colloidal gold และ gold conjugate

2.5.*3.1.* การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศอิเลคตรอนแบบส่องผ่าน

TEM images ของ gold particles และ antibody gold conjugates แสดงดังรูปที่ 2.4 (a-b) โดยจะเห็นว่าขนาดและรูปร่างของ gold particles ที่ได้มีความสม่ำเสมอ โดยจะมีเส้นผ่าศูนย์กลางอยู่ในช่วง 15.0±3.05 nm ซึ่งเป็นขนาดที่พอเหมาะสำหรับการนำมาใช้เป็นตัวตรวจใน IC assay (10-20 nm)[19] จากการ index แพทเทิร์นของ selected area diffraction (SAD) ที่ได้จากอนุภาคที่เห็นด้วย TEM ตาม JCPDS File No. 4-784 [20] (รูปที่ 2.5) พบว่าอนุภาคที่ได้เป็น gold metal phase



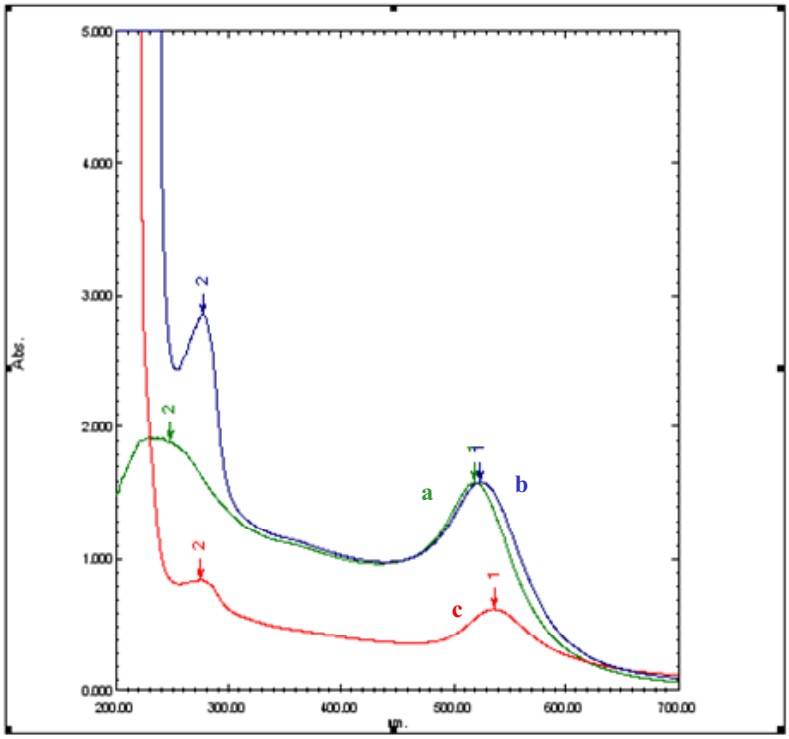
รูปที่ 2.4 TEM images and size distribution of (a) unconjugated colloidal gold particles (b) antibody-gold particles.



รูปที่ 2.5 Selected area diffraction (SAD) pattern derived from an antibody-gold particle.

2.5.3.2 การตรวจสอบการคอนจูเกตของแอนติบอดีกับ colloidal gold ด้วยเทคนิค UV-visible spectroscopy

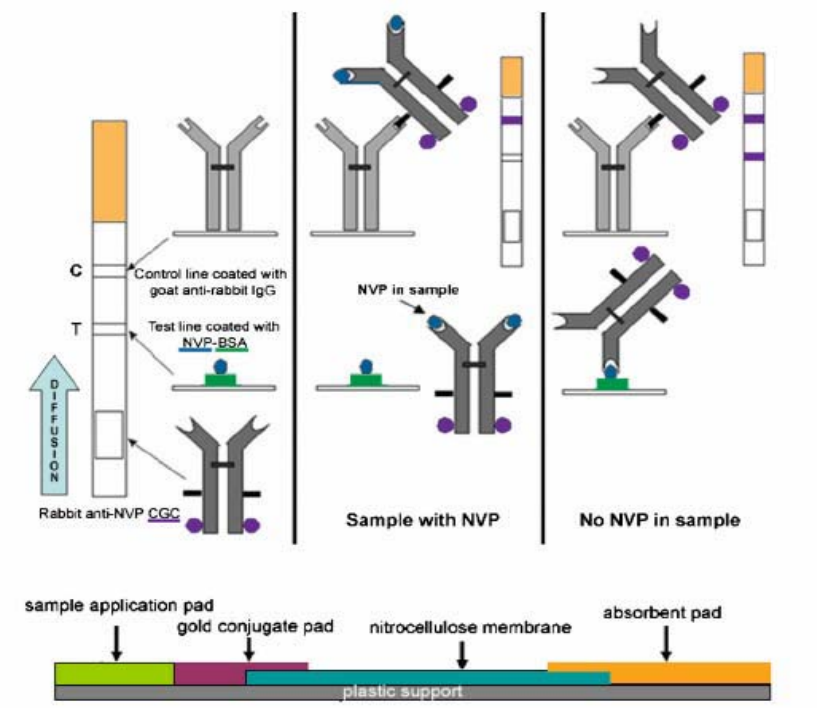
ผลจากตรวจสอบการเกิดคอนจูเกชันระหว่าง colloidal gold กับแอนติบอดีด้วยการวัดการดูดกลืนแสงของสารละลายของ colloidal gold ก่อนและหลังการเติมแอนติบอดี แสดงดังรูปที่ 2.6 โดยเส้น A ซึ่งเป็นสารละลายของ colloidal gold ก่อนเติมแอนติบอดีมีพีคที่ประมาณ 519 nm ซึ่งเกิดจาก surface plasmon resonance ของ gold colloid หลังจากเติมแอนติบอดี (curve B) จะเกิด red shift ของ band นี้ซึ่งเป็นสิ่งที่บ่งชี้ว่ามีอันตรกิริยาระหว่างทองกับแอนติบอดีเกิดขึ้น ส่วน peak ที่ 280 nm เกิดจากการดูดกลืนแสงของแอนติบอดี เมื่อทำการเหวี่ยงตะกอนเพื่อกำจัดแอนติบอดีส่วนเกินที่ไม่ได้คอนจูเกตกับทองออกแล้วนำ gold conjugate ที่ได้มาละลายใหม่จะให้ผล UV-visible spectra ดัง curve C ซึ่งมี absorption bands อยู่ที่ ~ 510 nm และ 280 nm แสดงให้เห็นว่ามีแอนติบอดีติดอยู่บนผิวของ gold colloid



รูปที่ 2.6 UV-visible spectra of colloidal gold and antibody-gold conjugates. Curve A; colloidal gold solution. Curve B; anti-NVP-CGC immediately after addition of antibody to gold solution. Curve C; anti-NVP CGC after centrifugation to remove the unbound antibody

2.5.4. การพัฒนาแผ่นตรวจอิมมูโนโครมาโทกราฟิกโดยใช้ anti-NVP-CGC

ไดอะแกรมแสดงองค์ประกอบของแผ่นตรวจ IC-test strip แสดงในรูปที่ 2.7 โดยเมื่อจุ่มแผ่นตรวจในสารตัวอย่างที่เป็นของเหลว ของเหลวนี้จะเคลื่อนที่ขึ้นไปบนแถบตรวจด้วยแรงแคปปิลลารี (capillary action) ซึ่งจะละลายพาเอาrabbit anti-NVP-CGC ที่อยู่บน the conjugate pad มาด้วยถ้าสารตัวอย่างมี NVP โพลีโคลนัลแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วย colloidal gold particle ซึ่งมีสีม่วงบน conjugate released pad จะจับกับ NVPทำให้เมื่อเคลื่อนที่มาถึงส่วน test line จึงมีเหลือที่จะสามารถจับได้กับ NVP-BSA ที่เคลือบอยู่บนเมมเบรนได้น้อยลงหรือไม่เหลือเลย ทำให้เห็นแถบสีแดงม่วงที่จางลงหรือไม่เห็นแถบที่ test line เลย ในทางตรงกันข้ามถ้าสารตัวอย่างไม่มี NVP หรือมีในปริมาณที่น้อยกว่าค่า cut off โพลีโคลนัลแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วย colloidal gold particle สามารถจับได้กับ NVP-BSA ที่เคลือบอยู่บนเมมเบรน ทำให้เห็นแถบสีแดงม่วงที่ test line ได้



รูปที่ 2.7 Configuration of the IC NVP strip test. The schematic diagram shows the areas where rabbit anti-NVP-CGC, NVP-BSA and goat anti-rabbit IgG are immobilized (left panel). The reactions which occur on the IC strip in the presence of NVP (middle panel), and in the absence of NVP (right panel) are shown. A red-purple color appears at the test and/or control lines depending on the presence of NVP.

ในการตรวจทดสอบด้วยวิธีนี้สามารถเห็นผลได้ภายในเวลา 10 นาที สำหรับ control line (C) จะต้องเห็นแถบสีเสมอไม่ว่าจะมี NVP อยู่ในสารตัวอย่างหรือไม่เนื่องจากปริมาณของ rabbit anti-NVP-CGC มีอยู่เกินพอ ซึ่งเมื่อ rabbit anti-NVP-CGCขึ้นมาถึงจุด C ก็จะถูกจับไว้ด้วย goat anti-rabbit IgG โดย control line จะมีไว้เพื่อเป็นดัชนีที่บอกผู้ใช้ว่า anti-NVP-CGC ได้ผ่าน test line มาแล้ว ผู้ใช้จึงจะสามารถอ่านผลการทดสอบได้ นอกจากนี้ยังใช้ยืนยันถึงประสิทธิภาพการทำงานของแอนติบอดี ซึ่งถ้าหากแถบสีที่ control line ไม่ปรากฏ จะแสดงว่าแผ่นตรวจใช้งานไม่ได้

2.5.5. การตรวจหา NVP ในสารละลายมาตรฐานด้วย IC test strips

ผลจากการตรวจหา NVP ใน PBS บัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้นต่างๆแสดงดังรูปที่ 2.8 เมื่อไม่มี NVP ในตัวอย่างจะเห็นแถบสีแดงทั้งบน test line และ control line ซึ่งจะแปลผลเป็นลบ (negative) เมื่อปริมาณของ NVPเพิ่มขึ้นจะเห็นแถบสีที่ test line จางลง และเมื่อความเข้มข้นของ NVP อยู่ในช่วงระหว่าง 1.0- 3.0 μg/ml จะมองไม่เห็นแถบสีที่ test line ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า limit of detection ของแผ่นตรวจนี้คือ 1.0 μg/ml

รูปที่ 2.8 IC strip test results at NVP concentrations of 0, 0.1, 0.5, 1.0, and 3.0 μg/ml in PBS pH 7.4.

เพื่อให้สามารถนำแผ่นตรวจมาใช้กับตัวอย่างจริงซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นตัวอย่างเลือด ดังนั้นจึงได้ตรวจสอบถึงผลของ plasma matrix ที่อาจจะรบกวนการวิเคราะห์ด้วย IC strip test โดยได้เติม NVP ลงใน human plasma โดยเตรียมให้มีความเข้มข้น 5.0 μg/ml แล้วทำการตรวจวิเคราะห์ NVP ด้วยแผ่นตรวจ โดยที่ความเข้มข้นนี้จะต้องไม่เห็นแถบสีที่ test line จากผลการทดลองในรูปที่ 2.9 แสดงให้เห็นว่าแผ่นตรวจสามารถทำงานได้ดี โดย plasma matrix ในตัวอย่างเลือดไม่ได้มีการรบกวนการอ่านผล

รูปที่ 2.9 Evaluation of IC strip with human plasma spiked with NVP at a concentration of 5.0 μg/ml and blank human plasma.

2.5.*6.* การศึกษาการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross-reactivity) ในการตรวจสอบด้วยแผ่นตรวจอิมมูโนโครมาโทกราฟิก

การทดลองนี้ได้ใช้แผ่นตรวจที่เตรียมขึ้นจุ่มในสารตัวอย่างเป็นยาต้านไวรัส HIV ชนิดต่างๆ ได้แก่ AZT, 3TC, ddI, ABC, d4T, EFV, IDV, SQV, APV, RTV, NFV และ LPV (รูปที่ 9) ซึ่งเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้น 10 μg/ml ใน PBS บัฟเฟอร์ pH 7.4 จากผลการทดลองพบว่ายาทุกชนิดให้แถบสีที่ test line ซึ่งมีความเข้มของสีไกล้เคียงกับในกรณีที่ตัวอย่างไม่มียา NVP (ผลไม่ได้แสดง) ซึ่งแสดงว่าหากในสารตัวอย่างมียาเหล่านี้ผสมอยู่ก็จะไม่รบกวนผลของการตรวจหา NVP

2.6 สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยส่วนนี้ ได้พัฒนาแผ่นตรวจวิเคราะห์ยาต้านไวรัส HIV ชนิด NVP เป็นผลสำเร็จ โดยใช้รีเอเจนต์ที่ผลิตขึ้นเองทั้งหมดเริ่มจาก hapten, polyclonal antibodies และ gold-colloidal conjugate จากการศึกษาในเบื้องต้นพบว่าแผ่นตรวจสามารถใช้ตรวจหายา NVP ได้ในระดับความเข้มข้นต่ำสุดคือ 1.0 μg/ml ใน PBS บัฟเฟอร์ โดยที่ยาต้านไวรัสชนิดอื่นไม่ได้ส่งผลรบกวนต่อการอ่านผล นอกจากนี้การตรวจยา NVP ด้วยวิธีนี้ยังมีความสะดวก แม่นยำ และไม่ต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญ ใช้เวลาในการวิเคราะห์รวมไม่เกิน 10 นาที ซึ่งโดยทั่วไปในผู้ป่วยที่รับยา NVP ขนาด 200 mg สองครั้งต่อวันจะมี

ระดับของยา NVP ในพลาสมาประมาณ 3.0-10.0 μg/ml ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้สูงที่จะสามารถใช้แผ่นตรวจที่เตรียมขึ้นนี้ในการติดตามการรับประทานยาของผู้ป่วยได้อย่างต่อเนื่องและทั่วถึง

เอกสารอ้างอิง

(1) Richman, D. D.; Havlir, D.; Corbeil, J.; al., e. *J. Virol.* 1994, 68, 1660-1666.

(2) Leth, F. V.; Phanuphak, P.; Ruxrungtham, K.; al., e. *Lancet* 2004, 363, 1253.

(3) Lallemant, M.; Jourdain, G.; Coeur, S. L.; al., e. *N. Eng. J. Med* 2004, 351, 217.

(4) Back, D.; Gatti, G.; Fletcher, C.; al., e. *AIDS* 2002, 16, 5.

(5) Veldkamp, A. I.; Weverling, G. J.; Lange, J. M. *AIDS* 2001, 15, 1089.

(6) Kappelhoff, B. S.; Rosing, H.; Huitema, A. D.; Beijnen, J. H. *J. Chromatogr. B* 2003, 792, 353.

(7) Azoulay, S.; Nevers, M. C.; Cr´eminon, C. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004, 48, 104.

(8) Chiao, D. J.; Shyu, R. H.; Hu, C. S.; Chiang, H. Y.; Tang, S. S. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2004, 809, 37.

(9) Cho, Y. J.; Lee, D. H.; Kim, D. O.; Min, W. K.; Bong, K. T.; Lee, G. G.; Seo, J. H. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 8447.

(10) Paek, S. H.; Lee, C. W.; Yook, S. H.; Kwon, O. H.; Park, Y. N. *Anal. Lett.* 1999, 32, 335.

(11) Paek, S. H.; Lee, S. H.; Cho, J. H. *Methods* 2000, 22, 53.

(12) Johne, B.; Hansen, K.; Mark, E.; Holtlund, J. *J. Immunol. Methods* 1995, 183, 167.

(13) Faulk, W. P.; Taylor, G. M. *Immunochemistry* 1971, 8, 1081.

(14) Laemmli, U. K. *Nature* 1970, 227, 680.

(15) Tawbin, H.; Stachelin, T.; Gordon, J. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1979, 76, 4350.

(16) Acosta, E. P.; King, J. R. *Clin. Infect. Dis.* 2003, 36, 373.

(17) Turkevich, M.; Stevenson, P. L.; Hillier, J. *Discuss. Faraday Soc.* 1951, 11, 55.

(18) Williams, D. B.; Carter, C. B. New York, 1996, p 265–287.

(19) Sun, X.; Zhao, X.; Tang, J.; Jun, Z.; Chu, F. S. *Int. J. Food Microbiol.* 2005, 99, 185.

(20) *JCPDS Powder Diffraction File: Inorganic Phases, International Centre for Diffraction Data* Swarthmore, Pennsylvania, 1985.

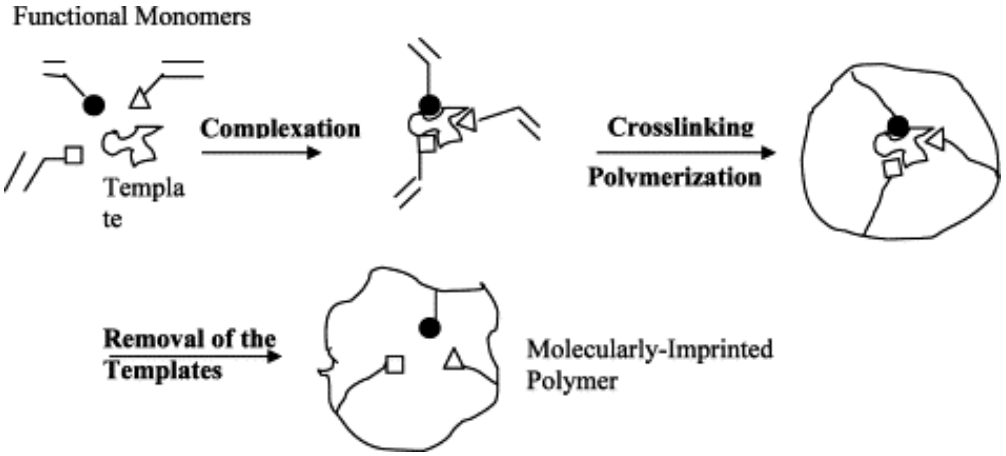
บทที่ 3
การพัฒนาวิธี enzyme-linked molecularly imprinted sorbent assay เพื่อตรวจวิเคราะห์เนวิราพีน

3.1 บทนำ

โดยทั่วไปเทคนิคอิมมูโนแอสเซย์จะใช้แอนติบอดีชีวภาพ (biological antibody) เป็นสารสำหรับตรวจจับกับสารที่สนใจจะตรวจวิเคราะห์ ซึ่งสามารถผลิตแอนติบอดีได้จากการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองด้วยสารที่เป็นอิมมูโนเจน (immunogen) ที่ได้มาจากการคอนจูเกตสารที่สนใจเข้ากับโปรตีนขนาดใหญ่ ข้อดีของแอนติบอดีชีวภาพคือมีความจำเพาะสูง ทำให้การตรวจวิเคราะห์มีประสิทธิภาพและมีความไว (sensitivity) สูง แต่มีข้อจำกัดคือ เตรียมยาก มีราคาแพงและมีความเสถียรต่ำ[1]

อีกทางเลือกหนึ่งแทนการใช้แอนติบอดีชีวภาพคือการใช้พอลิเมอร์ลอกแบบ (molecular Imprinted polymers, MIPs) ในอิมมูโนแอสเสย์ ซึ่งจะเรียกเทคนิควิเคราะห์แบบนี้ว่า molecular imprint sorbent assays (MIAs)[2-6] พอลิเมอร์ลอกแบบเป็นพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้จากการลอกแบบโมเลกุล (molecular imprinting) ของสารต้นแบบ (template) ให้ได้ receptor site ที่มีหมู่ฟังก์ชัน ขนาด และรูปร่างที่พอดีกับโมเลกุลต้นแบบ ด้วยคุณสมบัติความจำเพาะในทำนองเดียวกับแอนติบอดีชีวภาพ ดังนั้นจึงเรียกได้ว่าเป็นแอนติบอดีเทียม (artificial antibody)[3] ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้ดีในงานทางอิมมูโนแอสเสย์ ข้อดีของ MIPs คือ มีราคาถูก และมีความเสถียรสูง แต่ข้อเสียคือ มีความจำเพาะต่ำกว่าแอนติบอดีโดยเฉพาะเมื่อการจับกันกับสารที่จะวิเคราะห์อยู่ในตัวกลางที่เป็นน้ำนอกจากนี้การที่จะเตรียมวัสดุพอลิเมอร์ที่มีความจำเพาะสูงได้นั้น จะต้องอาศัยการทดลองเพื่อคัดสรรพอลิเมอร์ที่มีองค์ประกอบที่เหมาะสมให้ได้ MIPs ที่มีความจำเพาะดี

พอลิเมอร์ลอกแบบที่มีความสามารถในการสร้างพันธะที่จำเพาะกับโมเลกุลต้นแบบ สามารถสังเคราะห์ได้ตามขั้นตอนดังรูปที่ 3.1 โดยขั้นแรกผสมมอนอเมอร์กับโมเลกุลต้นแบบเพื่อให้เกิด complexation โดยการเกิด interaction ระหว่างโมเลกุลทั้งสองอาจจะเกิดผ่าน electrostatic interaction หรือ hydrogen bonding จากนั้นจึงเติมสาร crosslinker และ initiator เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน (polymerization) โดยที่จะมีการเชื่อมสายพอลิเมอร์รอบๆ โมเลกุลต้นแบบ ขั้นสุดท้ายจึงทำการสกัดแยกเอาสารต้นแบบออก ซึ่งจะทำให้เกิดช่องว่างภายในหรือที่ผิวของเม็ดพอลิเมอร์ที่มีความจำเพาะกับโมเลกุลต้นแบบ[7]



รูปที่ 3.1 การสังเคราะห์พอลิเมอร์ลอกแบบ

แม้ว่าการใช้งานของ MIPs ส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของ packing materials ในคอลัมน์โครมาโทกราฟีหรือในงาน solid-phase extraction[8-15] เพื่อการตรวจวิเคราะห์สารประเภทต่างๆด้วยเทคนิค HPLC แต่เมื่อไม่นานมานี้ก็ได้มีการประยุกต์เอา MIPs มาใช้แทนแอนติบอดีชีวภาพใน ligand binding assays ในรูปแบบต่างๆ ไม่ว่าจะเป็น radioligand binding assay[16,17], chromophore[18], fluorescent assays[19] หรือ enzyme-linked assay[20] โดยจากการศึกษาพบว่าเทคนิค MIAs หลายๆแบบที่ได้มีการพัฒนาขึ้นมาให้ความจำเพาะและความไวที่ดีใกล้เคียงกับการใช้แอนติบอดีและสามารถใช้วิเคราะห์ตัวอย่างหลายประเภทไม่ว่าจะเป็นเลือด พลาสมาหรือตัวอย่างปัสสาวะ[2,3,21-23]

ในการตรวจติดตามปริมาณของเนวิราพีน (NVP) ได้มีรายงานวิจัยที่ได้พัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ เทคนิคเหล่านี้ได้แก่ High-performance liquid chromatography (HPLC)[24], LC-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS)[25], HPTLC[26] และ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)[27] เนื่องจากเป้าหมายของงานวิจัยนี้คือการพัฒนาเทคนิคใหม่ๆที่มีประสิทธิภาพ มีต้นทุนการผลิตต่ำ ไม่ต้องอาศัยเครื่องมือราคาแพง และมีการใช้งานที่ไม่ยุ่งยาก ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาความเป็นไปได้ในการประยุกต์ MIPs มาพัฒนาเทคนิค enzyme-linked molecularly imprinted sorbent assay สำหรับการตรวจวิเคราะห์เนวิราพีน โดยในการทดลองได้เตรียมพอลิเมอร์ลอกแบบชนิดต่างๆโดยใช้ปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบบัลค์และแบบตกตะกอน และหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ ligand binding assays โดยใช้พอลิเมอร์ลอกแบบที่มีประสิทธิภาพในการจับกับ NVP ได้ดีที่สุด

3.2 เครื่องมืออุปกรณ์ และสารเคมี

3.2.1 เครื่องมือ/อุปกรณ์

อุปกรณ์พื้นฐานสำหรับการสังเคราะห์

UV/Vis spectrophotometer (Perkin Elmer, Lambda 25), U.S.A.

Scanning Electron Microscope (SEM) (JEOL, 6335F), Japan

NMR spectrometer (Bruker, Avance), Germany

Fourier transform infrared (FT-IR) spectrometer (Bruker, TENSOR 27), Germany

Centrifuge (BECMAN COULTER, Allergra 64R), U.S.A.

Rocking table (Specimen mixer, BCT-33)

UV-Vis spectrophotometer, รุ่น 6400, บริษัท Jenway, U.K

ELISA plate reader, Tecan, Austria

3.2.2 สารเคมี

Nevirapine (NVP), $C_{15}H_{14}N_4O$, Government Phamaceutical Organization, Thailand

Nicotinamide (NAM), $C_6H_6N_2O$, assay 98.5%, BDH, England

2-Amino pyridine (2-Apy), $C_5H_6N_2$, assay 98%, Merck, Germany

3-Amino pyridine (3-Apy), $C_5H_6N_2$, assay 98%, Fluka, Switzerland

4-Amino pyridine (4-Apy), $C_5H_6N_2$, assay 98%, Fluka, Switzerland

Pyridine, C_5H_5N, assay 98%, Fluka, Switzerland

Aniline, $C_6H_5N_2$, assay 98.5%, BHD, England

o-phenylenediamine (OPD), $C_6H_8N_2$, assay 99%, Fluka, Switzerland

Methacrylic acid (MAA), $C_4H_6O_2$, assay 98%, Fluka, Switzerland

Acrylamide (ACA), C_3H_5NO, assay 99%, Sigma, U.S.A.

2-hydroxyethyl acrylate (2-HEA), $C_5H_7O_2$, assay 98%, Aldrich, U.S.A.

Itaconic acid (ITA), $C_5H_6O_4$, assay 99%, Aldrich, U.S.A.

Ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA), $C_{10}H_{10}O_4$, assay 98%, Aldrich, U.S.A.

Trimethylolpropane trimethacrylate (TRIM), $C_{18}H_{26}O_6$, Aldrich, U.S.A.

p-divinylbenzene (DVB), $C_{10}H_{10}$, assay 50%, Fluka, Switzerland

Polyethylene glycol dimethacrylate (p-EGDMA), Mn 700, Aldrich, U.S.A.

Benzoylperoxide, $C_{14}H_{10}O_4$, assay 97%, Fluka, Switzerland

Methyl 5-bromovalerate, $C_6H_{11}O_2Br$, assay 97%, Aldrich, U.S.A.

Lithium hydroxide, $LiOH.H_2O$, assay 99%, Aldrich, U.S.A.

N-hydroxy succinamide, $C_4H_5NO_3$, assay 97%, Aldrich, U.S.A.

N,N'-diisopropylcarbodiimide, $C_7H_{14}N_2$, Sigma, U.S.A.

Diisopropyl ethylamine, $C_8H_{19}N$, assay 99.5%, Sigma-Aldrich, U.S.A.

Horseradish peroxidase (HRP), Sigma, U.S.A.

TMB microwell peroxidase substrate, KPL

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเตรียม MIPs โดยวิธีพอลิเมอไรเซชันแบบบัลค์ (Bulk Polymerization)

ผสมสารต้นแบบและมอนอเมอร์ในตัวทำละลายในปริมาณที่เหมาะสม คนทิ้งไว้ แล้วจึงเติมด้วยสารละลายของสารครอสลิงค์ จากนั้นจึงเติม benzoyl peroxide ซึ่งใช้เป็นสารตัวเริ่มปฏิกิริยาสำหรับปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน เสร็จแล้วผ่านก๊าซไนโตรเจนลงในของเหลวผสมที่ได้เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อไล่อากาศออก แล้วจึงนำขวดสารนี้มาใส่ในตู้อบที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 60 °C โดยตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาวจับกันเป็นก้อนใหญ่ จากนั้นจึงนำสารผลิตภัณฑ์ที่ได้มากรองและล้างเอาสารปนเปื้อนออก แล้วจึงนำมาบดให้เป็นผงละเอียด ขั้นสุดท้ายจึงนำพอลิเมอร์ที่เตรียมได้มาสกัดเอาสารต้นแบบออกด้วย soxhlet extractor โดยใช้ 10% acetic acid ใน methanol เป็นตัวทำละลาย ทำการตรวจสอบเอกลักษณ์ของพอลิเมอร์ที่ได้ด้วยเทคนิค IR และศึกษารูปร่าง (morphology) ของพอลิเมอร์ที่ได้ด้วยเทคนิค scanning electron microscope (SEM)

3.3.2 การเตรียม MIPs โดยวิธีพอลิเมอไรเซชันแบบตกตะกอน (Precipitation Polymerization)

ผสมสารต้นแบบและมอนอเมอร์ในตัวทำละลายในปริมาณที่เหมาะสม (ตารางที่ 2) คนทิ้งไว้ แล้วจึงเติมด้วยสารละลายของสารครอสลิงค์ จากนั้นจึงเติม benzoyl peroxide ซึ่งใช้เป็นสารริเริ่ม (initiator) สำหรับปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน เสร็จแล้วผ่านก๊าซไนโตรเจนลงในของเหลวผสมที่ได้เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อไล่อากาศออก แล้วจึงนำขวดสารนี้มาใส่ในตู้อบที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 60 °C โดยตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นผงสีขาว จากนั้นจึงนำสารผลิตภัณฑ์ที่ได้มากรองและล้างเอาสารปนเปื้อนออก ขั้นสุดท้ายจึงนำพอลิเมอร์ที่เตรียมได้มาสกัดเอาสารต้นแบบออกด้วย soxhlet extractor โดยใช้ 10% acetic acid ใน methanol เป็นตัวทำละลาย ทำการตรวจสอบเอกลักษณ์ของพอลิเมอร์ที่ได้ด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโคปี (Infrared spectroscopy) และศึกษารูปร่าง (morphology) ของพอลิเมอร์ที่ได้ด้วยเทคนิค scanning electron microscope (SEM)

3.3.3 การตรวจสอบเอกลักษณ์ของโมเลกุลพอลิเมอร์ด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโคปี

บด KBr 100 มิลลิกรัม กับสารตัวอย่างที่บดละเอียด 1 มิลลิกรัม ให้เป็นเนื้อเดียวกันในครกหินอ่อน (agate motar) นำของผสมที่ได้ใส่ในแม่แบบปริมาณพอสมควร นำไปอัดที่ความดัน 10 ตัน เป็นเวลา 1 นาที นำ disc ที่ได้ใส่ลงในช่องเซลล์ และบันทึกผล spectrum

3.3.4 การศึกษาสัณฐาณวิทยา (morphology) ของพอลิเมอร์ที่ได้ด้วยเทคนิค scanning electron microscope (SEM)

เตรียมตัวอย่างพอลิเมอร์สำหรับการศึกษาด้วยเทคนิค SEM โดยนำพอลิเมอร์มาผสมกับอะซิโตนจากนั้นจึงหยดลงบนแท่น stub ทิ้งไว้ให้อะซิโตนระเหยออกที่อุณหภูมิห้องหนึ่งคืนแล้วนำ stub มาเคลือบด้วยทองก่อนที่จะนำมาทำ SEM

3.3.5 การวัดการจับกันของพอลิเมอร์กับ NVP ด้วยเทคนิค UV

วัดค่าการดูดกลืนแสง UV (absorbance) ของสารละลาย (0.5 mM, 2 ml) ของเนวิราพีนหรือนิโคตินาไมด์ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายก่อนและหลังแช่ด้วยพอลิเมอร์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ นำมาคำนวณหาร้อยละของสารที่ถูกจับอยู่กับพอลิเมอร์ (% bound) โดยใช้กราฟมาตรฐาน (calibration curve)

สำหรับนิโคตินาไมด์จะวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 262 nm ส่วนเนวิราพีนจะวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 281 nm

3.3.6 การสังเคราะห์ NVP-HRP conjugates

นำสาร 2 (33 mg, 0.087 mmol) มาทำปฏิกิริยากับ NHS (12.0 mg, 0.1 mmol) ในสารละลายของ 1,3-diisopropylcarbodiimide (23.4 mg, 0.11 mmol) ใน DMF ที่ปราศจากน้ำ (3.6 ml) เป็นเวลา 16 h ที่ 25 °C จากนั้นจึงค่อยๆเติมสารละลายที่ได้นี้ทีละหยดลงในสารละลายของ HRP (5 ml) ใน 0.05 M carbonate/bicarbonate buffer pH 8.2 ที่ 0 °C คนสารทิ้งไว้หนึ่งชั่วโมงที่ 25 °C จากนั้นนำมาคนต่อที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารผสมที่ได้มาทำไดอะไลซีสใน 0.1 M phosphate buffer saline (pH 7.4) และเก็บสารละลายของ NVP-HRP ที่ได้ที่อุณหภูมิ 0 °C

3.3.7 การตรวจสอบประสิทธิภาพของ NVP-HRP conjugate ด้วย competitive ELISA

นำ 96-well microtiter plates มาเคลือบด้วย rabbit anti-NVP antibodies (1:2000 dilution ใน 0.05 M คาร์บอเนตบัฟเฟอร์ pH 9.6, 50 µl/well) ที่ 4°Cทิ้งไว้หนึ่งคืนแล้ว blocked ด้วย PBS buffer ที่มี 2% skim milk (200 µl /well) ที่อุณหภูมิห้อง 2 h จากนั้นล้างด้วย 0.05% tween 20/PBS เติมสารละลายผสมของ NVP-HRP (1:4000 dilution ใน 2% skim milk/PBS)และ NVP (10, 1.0, 0.1, 0.01, 0 µg/ml) ใน 2% skim milk/PBS (50 µl /well) หลังจากทิ้งไว้ 1 h.ทำการล้าง plate แล้วเติม TMB/H_2O_2 substrate 100 µl ลงในแต่ละหลุม ตั้งทิ้งไว้ 20นาทีและหยุดปฏิกิริยาด้วย 1 N HCl (50 µl/well) อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ λ_{max} 450 nm แสดงผลที่ได้ในเทอม$B/B_0 \times 100$ โดย B และ B_0 แสดง bound enzymatic activity เมื่อมีและไม่มีสาร competitor ตามลำดับ

3.3.8 การพัฒนา MIA เพื่อตรวจหาปริมาณ NVP

การหาค่า (IC_{50}) ของพอลิเมอร์ที่ pH 6, 7 และ 8

แช่พอลิเมอร์ปริมาณต่างๆ (0.4-15 mg) ในสารละลายของ NVP-HRP (1:500,000 dilution) ใน 0.01 M phosphate buffer ที่มี 0.05% tween 20 ที่ pH 6, 7 และ 8 (1.00 ml) เป็นเวลา 1.0 h จากนั้นแยกเอาพอลิเมอร์ออกโดยนำไปเหวี่ยงที่ 16000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูดเอาของเหลวที่ได้มา 200 µl แล้วเติมด้วย TMB/H_2O_2 substrate 200 µl หลังจากทิ้งไว้ 5 นาทีหยุดปฏิกิริยาด้วย 1 N HCl (200 µl) แล้วอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ λ_{max} 450 nm ทำการทดลองซ้ำสามครั้ง

การเตรียม calibration curve ด้วยเทคนิค MIA

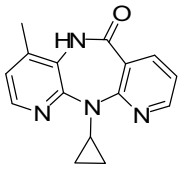
เติมสารละลายของ NVP (0, 0.2, 2, 20, 200, 1,000 µg/ml) ใน 0.01 M phosphate buffer pH 6 containing 0.05% tween 20 ปริมาณ 0.50 ml ลงบนพอลิเมอร์ที่ชั่งมา 4 mg ตั้งทิ้งไว้ 1.0 h. จากนั้นจึงเติมด้วยสารละลาย NVP-HRP conjugate (1:20,000 dilution, 0.50 ml) ตั้งทิ้งไว้บน rocking table อีก 1.0 h จากนั้นแยกเอาพอลิเมอร์ออกโดยนำไปเหวี่ยงที่ 16000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูดเอาของเหลวที่ได้มา 200 µl แล้วเติมด้วย TMB/H_2O_2 substrate 200 µl หลังจากทิ้งไว้ 5 นาทีหยุดปฏิกิริยาด้วย 1 N HCl (200 µl) แล้วอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ λ_{max} 450 nm ทำการทดลองซ้ำสามครั้ง แสดงผลที่ได้ในเทอม $B/B_0 \times 100$ โดย B และ B_0 แสดง bound enzymatic activity เมื่อมีและไม่มีสาร competitor ตามลำดับ

3.4 ผลการทดลองและการอภิปรายผล

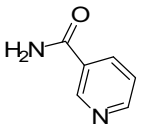
3.4.1 การสังเคราะห์และสมบัติของพอลิเมอร์ลอกแบบนิโคตินาไมด์และเนวิราพีน

ในขั้นตอนแรกของการทดลองนี้ ต้องการหาสภาวะของการทดลองที่เหมาะสมในการเตรียมพอลิเมอร์ลอกแบบที่มีความจำเพาะ จึงได้เลือกใช้นิโคตินาไมด์ (nicotinamide, NAM) ซึ่งเป็นสารที่มีโครงสร้างและหมู่ฟังก์ชันคล้ายคลึงกับ NVP แต่หาง่ายและราคาถูกกว่า เป็นสารต้นแบบ โดยได้ทำการปรับเปลี่ยนชนิดและอัตราส่วนของมอนอเมอร์และสารครอสลิงค์ (crosslinkers) ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้เป็นตัวกลางในปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน รวมถึงรูปแบบของปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน โดยโครงสร้างของสารต้นแบบ มอนอเมอร์ และสารครอสลิงค์ที่ใช้ในการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.2

สารต้นแบบ

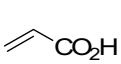


Nevirapine (NVP)

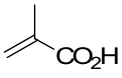


Nicotinamide (NAM)

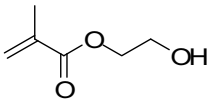
มอนอเมอร์



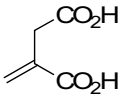
acrylic acid (ACA)



methacrylic acid (MAA)

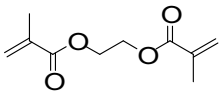


2-hydroxyethyl acrylate (HEA)

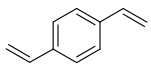


itaconic acid (ITA)

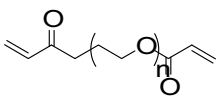
สารครอสลิงค์



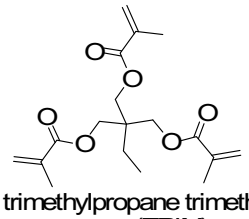
ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA)



divinylbenzene (DVB)



poly(ethylene glycol) diacrylate (PEDA)



trimethylpropane trimethacrylate (TRIM)

รูปที่ 3.2 โครงสร้างของสารต้นแบบ มอนอเมอร์ และสารครอสลิงค์ ที่ใช้ในการสังเคราะห์ MIPs ต่อ NAM

จากการสังเคราะห์พอลิเมอร์ด้วยวิธีพอลิเมอไรเซชันแบบบัลค์และแบบตกตะกอนโดยใช้ NAM เป็นสารต้นแบบ ให้พอลิเมอร์ลอกแบบ MIP1-11 และพอลิเมอร์ไม่ลอกแบบ NIP1-11 ซึ่งสังเคราะห์โดยไม่มีสารต้นแบบ องค์ประกอบของพอลิเมอร์เหล่านี้แสดงดังตารางที่ 3.1

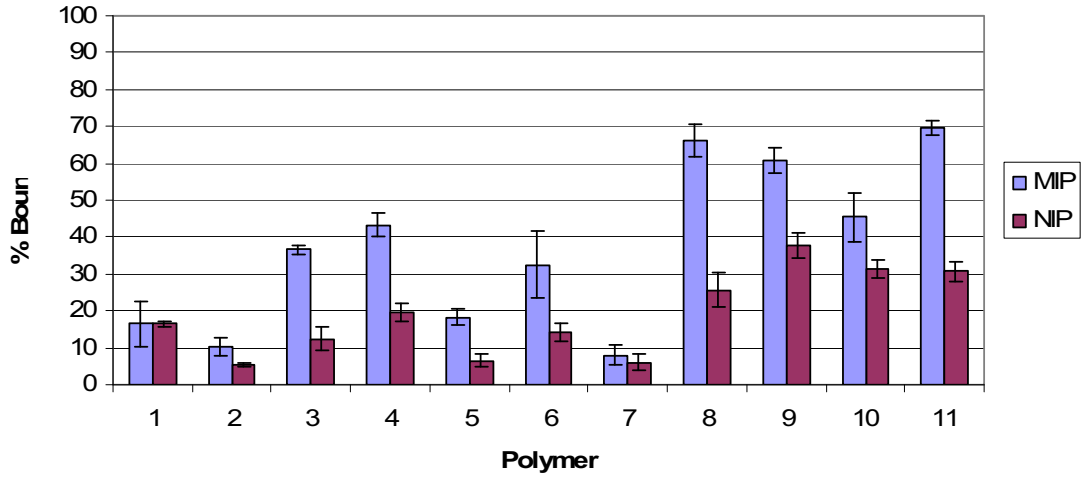
ตารางที่ 3.1 พอลิเมอร์ลอกแบบนิโคตินาไมด์และพอลิเมอร์ไม่ลอกแบบ

MIP/NIP	Monomer (mmol)	Crosslinker (mmol)	Poragen (ml)	Polymerization Method
1	ACA (1.0)	EGDMA (5.0)	CH_2Cl_2 (1.5)	Bulk
2	HEA (1.0)	EGDMA (5.0)	CH_2Cl_2 (1.5)	Bulk
3	MAA (1.0)	EGDMA (5.0)	CH_2Cl_2 (1.5)	Bulk
4	ITA (1.0)	EGDMA (5.0)	THF (1.5)	Bulk
5	MAA (1.0)	TRIM (5.0)	CH_2Cl_2 (1.5)	Bulk
6	MAA (1.0)	DVB (5.0)	CH_2Cl_2 (1.5)	Bulk
7	MAA (1.0)	PEDA (5.0)	CH_2Cl_2 (1.5)	Bulk
8	MAA (1.0)	TRIM (1.0)	CH_2Cl_2 (1.5)	Bulk
9	MAA (1.0)	TRIM (1.0)	CH_2Cl_2 (15)	precipitation
10	MAA (1.0)	TRIM (1.0)	MeOH:H_2O (15)	precipitation
11	MAA (1.0)	TRIM (1.0)	THF:MeOH:H_2O (15)	precipitation

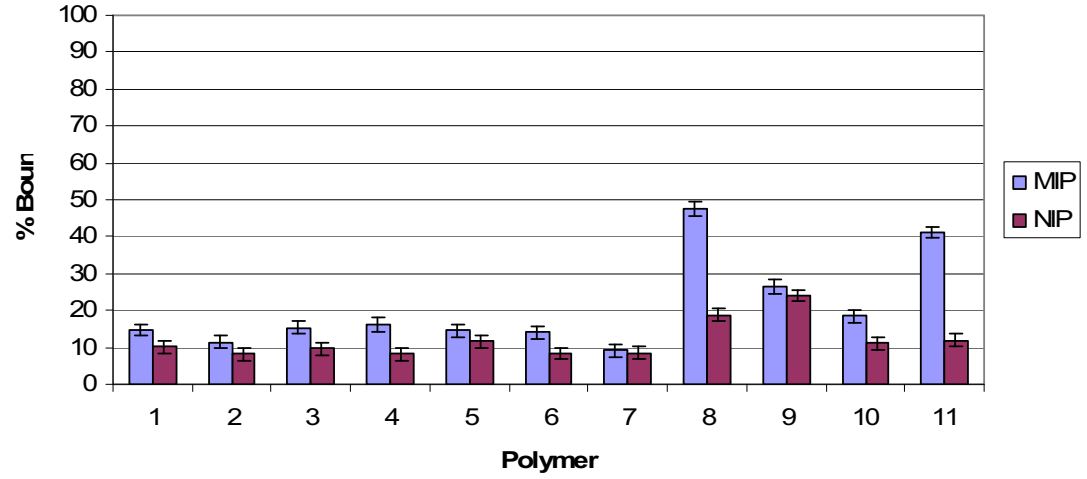
Note: ACA = acrylic acid, DVB= divinyl benzene, EDMA= ethyleneglycol methacrylate, HEA= 2-hydroxyethyl acrylate, ITA = itaconic acid, MAA= methacrylic acid, PEDA= poly(ethylene glycol) diacrylate, TRIM= trimethylpropane trimethacrylate ใช้ NAM, 0.25 mmol, Ratio of MeOH:H_2O was 4:1 (v/v) and ratio of THF/MeOH/H_2O was 5:4:1 (v/v/v).

หลังจากที่ได้พอลิเมอร์ ได้ทำการศึกษาปฏิกิริยาการจับกันระหว่างพอลิเมอร์กับ NAM ใน acetonitrile ซึ่งเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ และในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH7 ด้วยเทคนิค UV spectrophotometry โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ของสารละลายก่อนและหลังแช่ด้วยพอลิเมอร์ที่ความยาวคลื่น 262 nm แล้วนำค่าที่ได้นี้มาคำนวณหาร้อยละของสารที่ถูกจับอยู่กับพอลิเมอร์ (% bound) ผลของการจับกันของพอลิเมอร์ลอกแบบและไม่ลอกแบบชนิดต่างๆกับ NAM แสดงดังรูปที่ 3.3 ส่วนความแตกต่างของการจับกับ NAM ของพอลิเมอร์ลอกแบบ MIP1-11 และ ไม่ลอกแบบ NIP1-

11 แสดงในรูปของ imprinting factor ซึ่งคำนวณได้จากอัตราส่วนของ % bound ของ MIPs กับของ NIPs (ตาราง 3.2)



(a)



(b)

รูปที่ 3.3 Percent bound of NAM in (a) acetronitrile at the polymer concentration of 40 mg/ml, in (b) 0.01 M phosphate buffer pH7 containing 10% EtOH (0.5 mM) at the polymer concentration of 20 mg/ml

ตารางที่ 3.2 Imprinting factor ของ MIP1-11

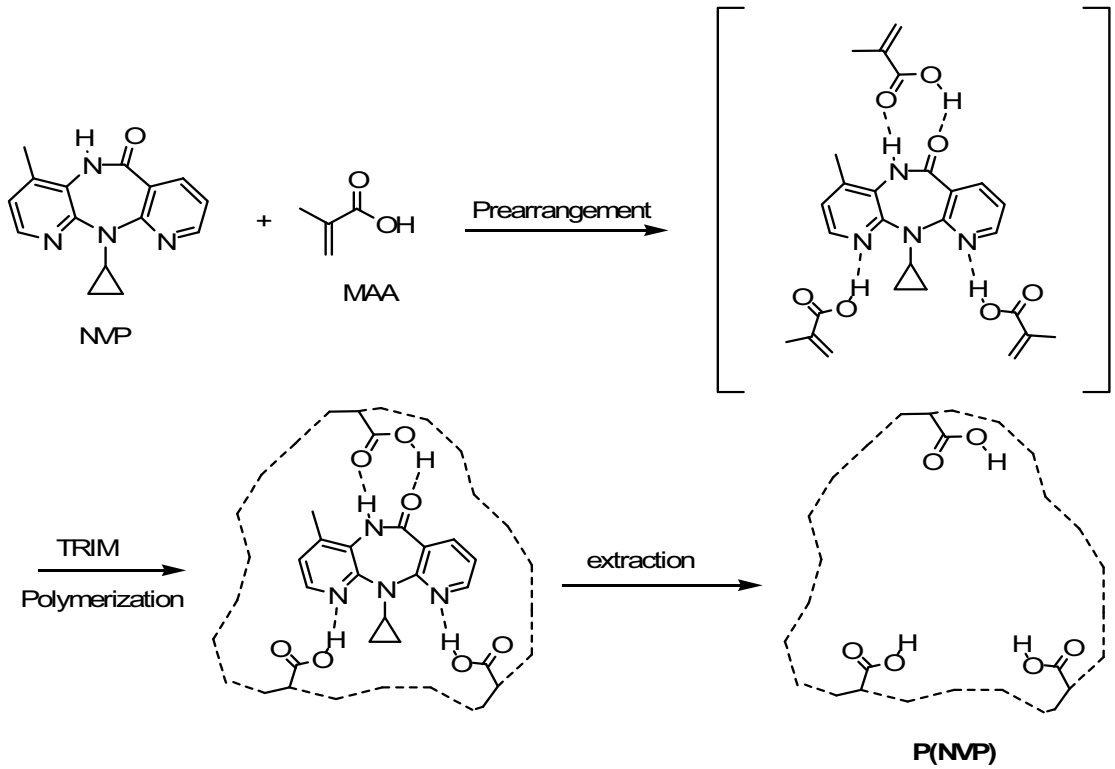
MIP	Imprinting factor (α)	
	ACN (40.0 mg polymer)	**Buffer pH 7 (20.0 mg polymer)**
1	2.66	1.44
2	1.82	1.40
3	2.93	1.59
4	2.23	1.94
5	2.79	1.25
6	2.31	1.62
7	1.33	1.04
8	2.57	2.52
9	1.61	1.09
10	1.44	1.65
11	1.97	3.27

จากรูปที่ 3.3 และตารางที่ 3.2 เมื่อเปรียบเทียบพอลิเมอร์ 1-4 ซึ่งสังเคราะห์โดยวิธีพอลิเมอไรเซชันแบบบัลค์ ใช้ EGDMA เป็นสารครอสลิงค์แต่ใช้มอนอเมอร์ที่แตกต่างกัน จะเห็นได้ว่า MIP3 และ MIP4 ซึ่งมี MAA และ ITA เป็นมอนอเมอร์ตามลำดับ มีความสามารถที่จะจับกับ NAM ได้ดีกว่าพอลิเมอร์อื่นๆทั้งใน acetronitrile และในน้ำ และมี imprinting factor สูงกว่าพอลิเมอร์อื่นๆ

เมื่อเปรียบเทียบพอลิเมอร์ 5-8 ซึ่งสังเคราะห์โดยวิธีพอลิเมอไรเซชันแบบบัลค์โดยใช้ MAA เป็นมอนอเมอร์แต่ปรับเปลี่ยนชนิดของสารครอสลิงค์ จะพบว่า MIP8 ซึ่งมี MAA เป็นมอนอเมอร์และมี TRIM เป็นสารครอสลิงค์ในอัตราส่วน 1:1 มีความสามารถในการจับกับ NAM ได้ดีที่สุดและดีกว่าพอลิเมอร์ไม่ลอกแบบโดยเฉพาะเมื่อตัวกลางเป็นน้ำ

เมื่อเปรียบเทียบพอลิเมอร์ 9-11 ซึ่งสังเคราะห์โดยวิธีพอลิเมอไรเซชันแบบตกตะกอน โดยใช้ MAA และ TRIM เป็นมอนอเมอร์และสารครอสลิงค์ตามลำดับ แต่เปลี่ยนชนิดของตัวทำละลาย จะเห็นได้ว่า MIP11 ซึ่งสังเคราะห์ใน THF/MeOH/H_2O 5:4:1 (v/v/v) จับกับ NAM ได้ดีที่สุดและมี imprinting factor สูงที่สุด

จากการทดลองนี้แสดงว่าสภาวะที่ใช้ในการสังเคราะห์พอลิเมอร์ 11 น่าจะช่วยให้ได้พอลิเมอร์ที่มีคุณสมบัติในการจับกับ NAM ที่ดีที่สุด ดังนั้นจึงใช้สภาวะนี้ในการสังเคราะห์พอลิเมอร์ลอกแบบของ NVP คือ P(NVP) ซึ่งเพื่อศึกษาคุณสมบัติและการใช้งานต่อไป แผนภาพแสดงการสังเคราะห์ P(NVP) แสดงดังรูปที่ 3.4



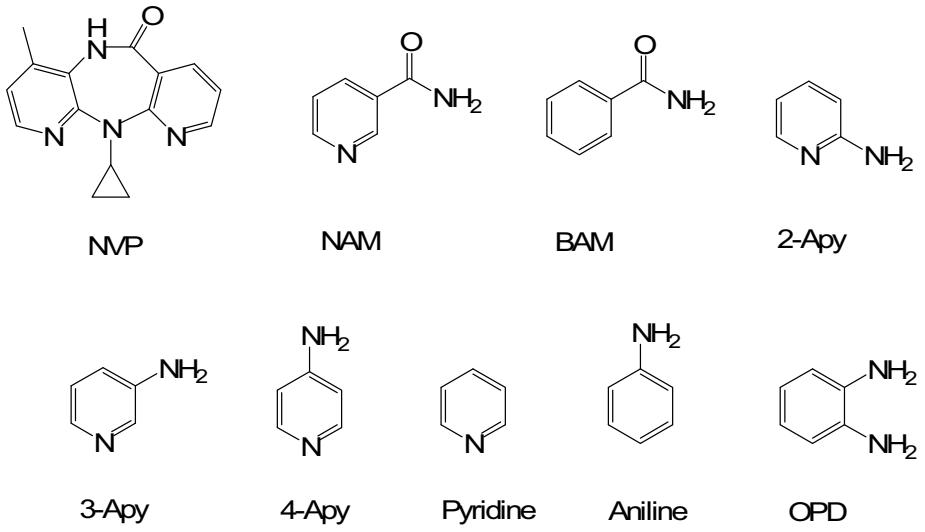
รูปที่ 3.4 Schematic representation of the synthesis of P(NVP)

จากการศึกษาการจับกันระหว่าง P(NVP) กับ NVP ใน acetronitrile และในน้ำ เปรียบเทียบกับ NIP11 ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ไม่ลอกแบบที่มีองค์ประกอบทางเคมีที่เหมือนกับ P(NVP) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายก่อนและหลังแช่ด้วยพอลิเมอร์ที่ความยาวคลื่น 281 nm พบว่า ค่า %bound ใน acetronitrile เท่ากับ 34.02±0.057% เมื่อใช้พอลิเมอร์ 20mg/ml ส่วนในน้ำมีค่า %bound เท่ากับ 68.55±0.052% เมื่อใช้พอลิเมอร์ 5 mg/ml โดยมี ค่า imprinting factor เท่ากับ 2.76 และ 4.85 ตามลำดับ จะเห็นว่าพอลิเมอร์ลอกแบบ NVP ที่ได้นี้มีประสิทธิภาพดีในการจับกับ NVP ในน้ำ ส่วนการที่ต้องใช้พอลิเมอร์ในปริมาณที่น้อยกว่าในกรณีของการจับกับ NAM น่าจะเกิดจาก hydrophobicity ของ

NVP เมื่อเทียบกับ NAM ทำให้มีความสามารถในการจับกับพอลิเมอร์ได้ดีกว่า NAM ในกรณีของการจับกันในน้ำก็ต้องใช้พอลิเมอร์ในปริมาณที่น้อยกว่าใน acetronitrile ซึ่งน่าจะอธิบายด้วยเหตุผลเดียวกัน

3.4.2 การศึกษาความจำเพาะ (selectivity) ของพอลิเมอร์ลอกแบบ MIP11 และ P(NVP)

ได้ตรวจสอบความจำเพาะของพอลิเมอร์ลอกแบบ MIP11 และ P(NVP) ด้วยการศึกษาการจับกับสารต่างๆที่มีหมู่ฟังก์ชันและรูปร่างที่ใกล้เคียงกับ NVP ได้แก่ nicotinamide (NAM), benzamide (BAM), 2-aminopyridine (2-Apy), 3-aminopyridine (3-Apy), 4-aminopyridine (4-Apy), pyridine, aniline และ *o*-phenylenediamine (OPD) โดยใช้สารที่มีความเข้มข้น 0.2 mM ใน 0.01 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ที่มี 0.05% tween 20 เป็น surfactant โครงสร้างของสารเหล่านี้แสดงดังรูปที่ 3.5



รูปที่ 3.5 Structure of compounds used in selectivity studies.

ทำการเปรียบเทียบความจำเพาะของพอลิเมอร์จากค่า distribution coefficient (Kd) โดยที่

$$Kd = Cp/Cs$$

เมื่อ Cp = ความเข้มข้นของสารที่จับอยู่บนพอลิเมอร์ (in μmol g^{-1}) และ Cs = ความเข้มข้นของสารที่อยู่ในสารละลาย (in μmol ml^{-1})

ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 3.3 ซึ่งพบว่าค่า Kd ของสารทุกตัวเมื่อจับกับพอลิเมอร์ไม่ลอกแบบ (NIP11) มีค่าที่ใกล้เคียงกัน แสดงว่า NIP11 ไม่มีความจำเพาะเนื่องจากมีการจัดตัวของหมู่ฟังก์ชันที่มา

จากมอนอเมอร์ในแบบสุ่ม ส่วน NVP มีค่า Kd ที่สูงเมื่อจับกับทั้ง MIP11 และ P(NVP) แสดงว่าพอลิเมอร์ทั้งสองมีความจำเพาะที่ดีต่อ NVP สิ่งที่น่าสนใจคือ NAM ก็มีค่า Kd ที่สูงเช่นกันเมื่อจับกับ P(NVP) แต่ค่านี้กลับน้อยเมื่อจับกับ MIP11 ซึ่งลอกแบบมาจาก NAM การที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากในการทดลองนี้ใช้พอลิเมอร์ในปริมาณที่น้อยและมีการเติม tween 20 เพื่อลด nonspecific adsorption ทำให้ NAM จับกับพอลิเมอร์ MIP11 ได้น้อยลง ส่วน P(NVP) น่าจะมีความไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) มากกว่า MIP11 เนื่องจากมี NVP ซึ่งเป็นสารที่มีขั้วน้อยกว่า NAM เป็นสารต้นแบบ ความไม่ชอบน้ำนี้น่าจะเป็นแรงเสริมให้การจับกับสารในตัวกลางที่เป็นน้ำเกิดได้ดีขึ้น และการที่ NAM สามารถจับกับ P(NVP) ได้ก็เป็นสิ่งที่เป็นไปได้ เนื่องจาก NAM มีทั้งหมู่เอไมด์และมีวง pyridine ที่เหมือนกับ NVP ทำให้สามารถเข้าไปจับที่ตำแหน่ง binding site ของ NVP ได้

ตารางที่ 3.3 The distribution coefficient (K_d) of MIP11, P(NVP) and NIP

Substrates	K_d		
	MIP11	**P(NVP)**	**NIP**
NVP	756.09	1611.34	71.04
NAM	34.54	508.42	32.87
BAM	90.56	102.22	74.26
2-Apy	75.70	58.52	57.51
3-Apy	17.19	24.94	63.74
4-Apy	56.80	40.75	37.90
Pyridine	27.67	16.53	41.89
Aniline	137.62	148.82	135.90
OPD	83.94	106.21	103.02

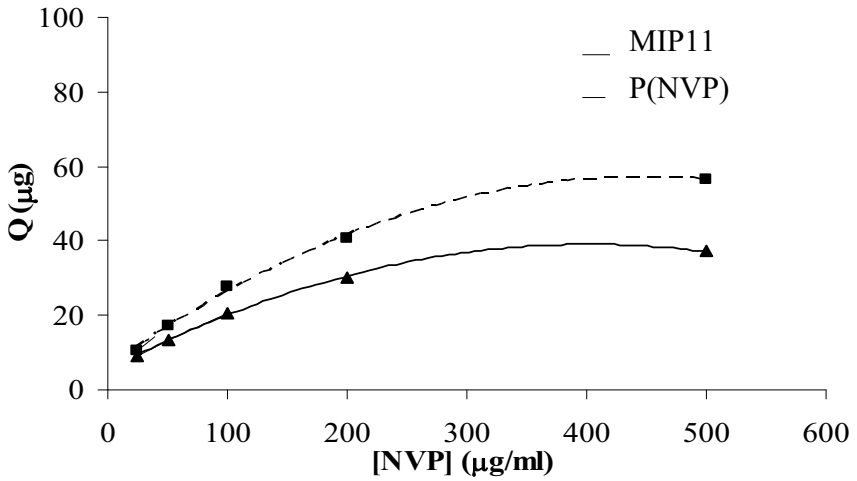
Unit: ml g-1; polymer 5.0 mg/ml. [initial substrate] = 0.2 mmol/L; V = 1.0 ml; adsorption time 1.0 h.

3.4.3 การศึกษา binding isotherm ของพอลิเมอร์ลอกแบบ

ได้ทำการหา binding parameters ของพอลิเมอร์ MIP11 และ P(NVP) โดยการศึกษา binding isotherm ที่ช่วงความเข้มข้นของ NVP ที่ 25-500 μg/ml ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 3.6 (a) ซึ่งพบว่าที่ pH7 ช่วงความเข้มข้นของ NVP ที่ค่าการจับเป็นเส้นตรงคือ 25-200 μg/ml เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากช่วงนี้มาพล็อตกราฟตาม Scatchard equation[28,29] คือ

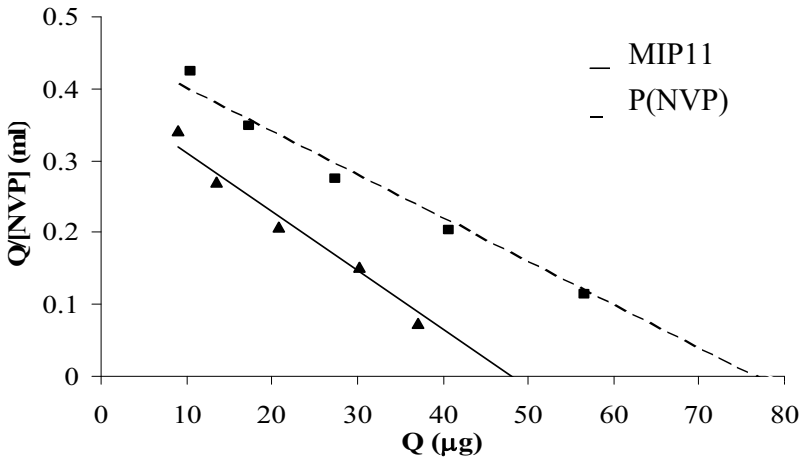
$$Q/[NVP] = (Q_{max} - Q/K_d) \qquad (1)$$

เมื่อ K_d คือ dissociation constant และ Q_{max} คือจำนวนของ maximum binding sites ได้ผลดังรูปที่ ซึ่งเป็นกราฟเส้นตรง (รูปที่ 3.6 (b)), มี slope และ intercept เท่ากับ-1/K_d และ Q_{max} ตามลำดับ จากผลที่ได้แสดงว่าภายใต้สภาวะการทดลองนี้ การจับกันของพอลิเมอร์กับ NVP เป็นแบบ homogeneous โดยที่ MIP11 มีค่า Q_{max} และ K_d เท่ากับ 57.92 μg/mg และ 134.27 mg/ml ส่น P(NVP) มีค่า Q_{max} และ K_d เท่ากับ 95.62 μg/mg และ 166.72 mg/ml จะเห็นได้ว่า P(NVP) มี binding capacities ที่สูงกว่า และจับกับ NVP ได้แข็งแรงกว่า MIP11



(a)

รูปที่ 3.6 Binding isotherm (a), Scatchard plots (b) of MIP11 and P(NVP); Q: amount of NVP bound to 0.8 mg of polymers; *V* = 1.0 ml; Adsorption time: 1.0 h.

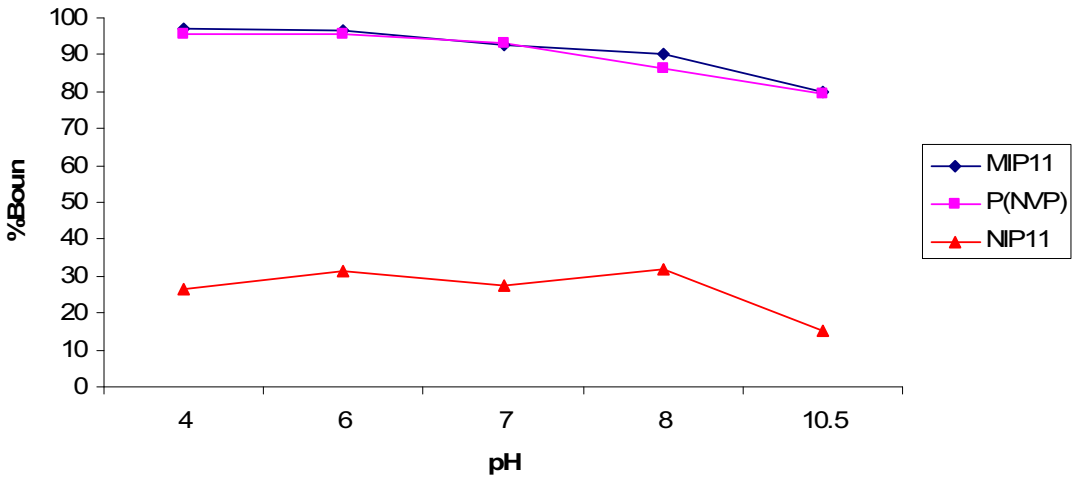


(b)

รูปที่ 3.6 (ต่อ)

3.4.4 ผลของ pH ต่อประสิทธิภาพของการจับกันของ NVP กับพอลิเมอร์

เพื่อตรวจสอบผลของ pH ที่มีต่อการจับกันของ NVP กับพอลิเมอร์ ได้ใช้พอลิเมอร์ 5mg/ml ตรวจสอบหา %bound ของ NVP จากสารละลายเริ่มต้นของ NVP 0.2 mM ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 4, 6, 7, 8 และ 10.5 ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 3.7 ซึ่งพบว่าทั้ง MIP11 และ P(NVP) สามารถจับกับ NVP ได้ดีในช่วง pH 4-7 และมีประสิทธิภาพลดลงที่ pH สูงขึ้น ส่วน NIP11 มีประสิทธิภาพในการจับกับ NVP ที่ต่ำกว่าพอลิเมอร์ลอกแบบที่ทุก ๆ pH



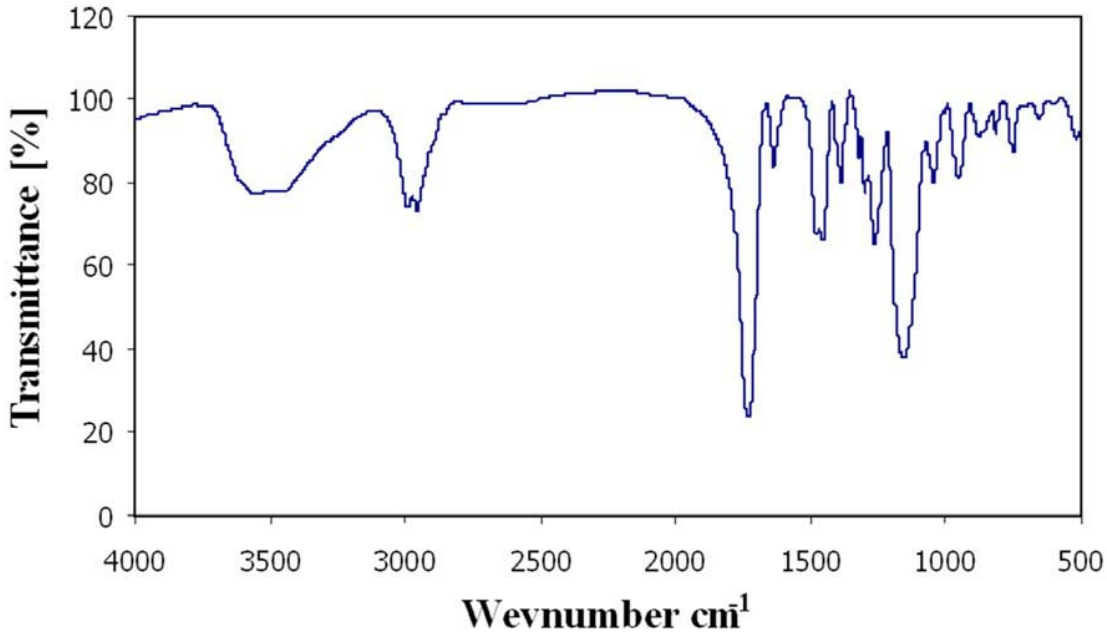
รูปที่ 3.7 ผลของ pH ต่อประสิทธิภาพของการจับกันของ NVP กับ MIP11, P(NVP) และ NIP11

3.4.5 การตรวจสอบเอกลักษณ์ของพอลิเมอร์ลอกแบบ

IR spectroscopy

ได้ตรวจสอบเอกลักษณ์ของพอลิเมอร์ทั้งหมดที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค FT-IR โดยเตรียมตัวอย่างของแข็งในรูป KBr discs ลักษณะทั่วไปของ IR spectrum ของพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้แสดงดังรูป 3.8 ซึ่งจะพบ O-H stretching, C-H stretching, C=O stretching ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในพอลิเมอร์อย่างชัดเจน นอกจากนี้การที่ MIP ให้ผลที่เหมือนกับ NIP แสดงว่าได้สกัดเอาสารต้นแบบออกไปได้หมด

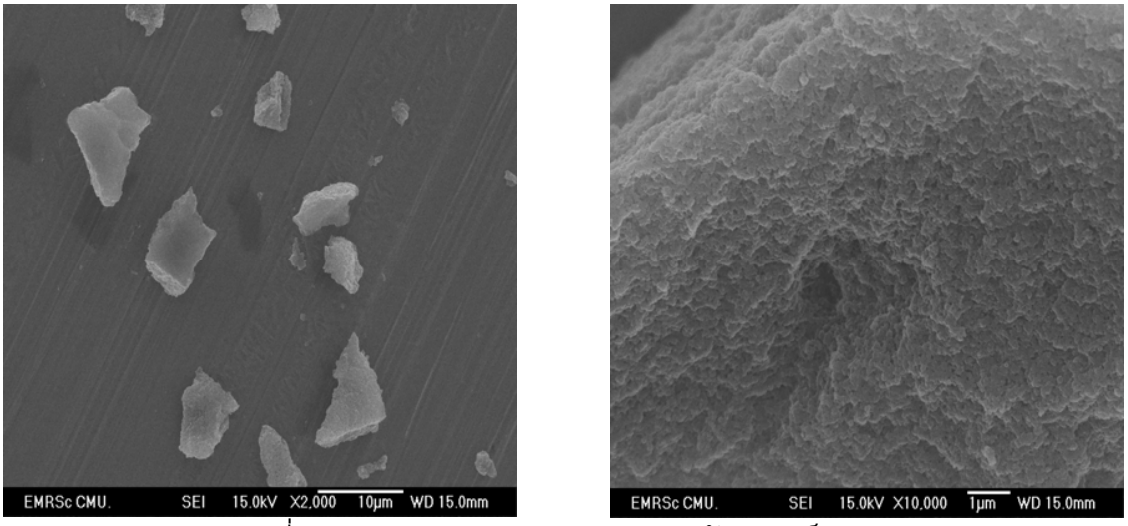
เลขคลื่น (cm^{-1})	สัญญาณ
3300-3500	O-H stretching of carboxylic acid
2850-3000	C-H stretching of sp^3
1725-1700	C=O stretching of carboxylic acid
1440-1395	O-H bending of carboxylic acid
1320-1210	C-O stretching of carboxylic acid



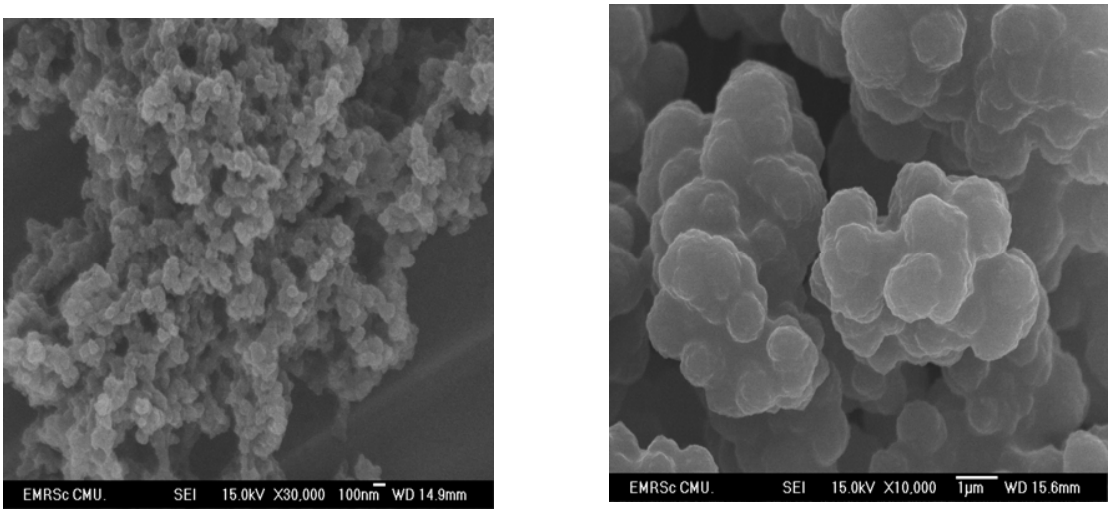
รูปที่ 3.8 IR spectrum (KBr) of a representative polymer, P(NVP)

Scanning electron Microscope (SEM) Technique

หลังจากทำการล้างและอบแห้ง ได้นำพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้นี้ไปตรวจสอบลักษณะรูปร่างด้วยเครื่องจุลทรรศอิเลคตรอน (SEM) พอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ในแบบบัลค์และแบบตกตะกอนจะมีขนาดและรูปร่างที่แตกต่างกัน ตัวอย่างของ SEM images ของพอลิเมอร์ที่เตรียมได้แสดงดังรูปที่ 3.9 และ 3.10 โดยที่พอลิเมอร์ที่ได้จากวิธีบัลค์จะมีลักษณะเป็นก้อนที่มีผิวขรุขระ มีรูปร่างที่ไม่สม่ำเสมอ ส่วนพอลิเมอร์ที่ได้จากวิธีตกตะกอนจะมีลักษณะเป็น microsphere ที่จับกันเป็นก้อน



รูปที่ 3.9 SEM micrograph ของ MIP8 สังเคราะห์แบบ Bulk



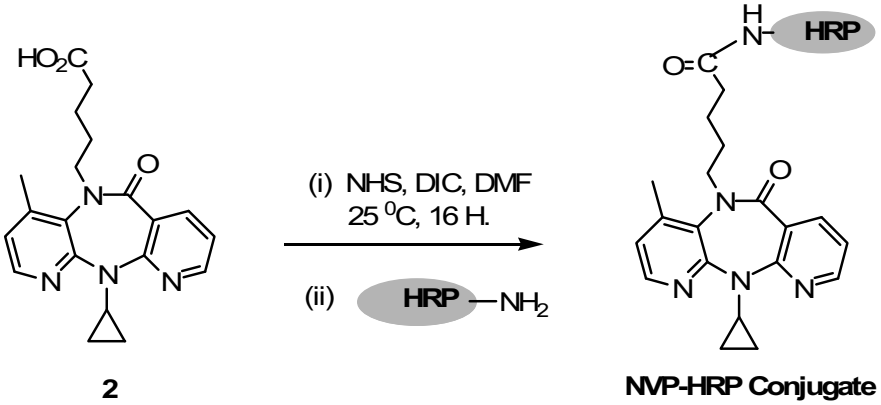
รูปที่ 3.10 SEM micrograph ของพอลิเมอร์ MIP(NVP) สังเคราะห์แบบ Precipitation

3.4.6 การพัฒนาเทคนิค MIA สำหรับตรวจวิเคราะห์ NVP

ในการพัฒนาเทคนิค enzyme-linked molecularly imprinted sorbent assay สำหรับการตรวจวิเคราะห์ NVP ได้เตรียมเอนไซม์คอนจูเกต NVP-HRP จากนั้นจึงศึกษาผลของความเข้มข้นและ pH ของสารละลายบัฟเฟอร์ ชนิดและปริมาณของ surfactant ที่เหมาะสมในการจับกันของ enzyme probe กับพอลิเมอร์ จากนั้นจึงได้หาปริมาณพอลิเมอร์ที่เหมาะสมซึ่งสามารถจับกับ HRP-NVP conjugate ได้ 50% (IC_{50}) เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมแล้ว จึงหาช่วงการวิเคราะห์ที่เป็นเส้นตรงของ competitive binding assay

3.4.5.1 การสังเคราะห์ NVP-HRP conjugate

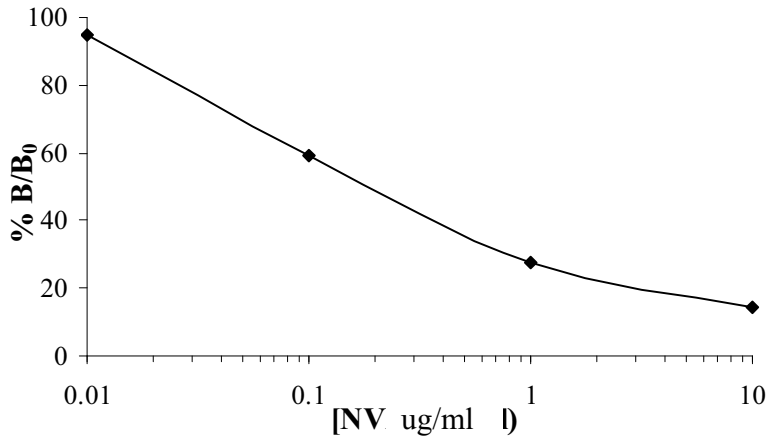
ทำการสังเคราะห์ NVP-HRP conjugate โดยใช้ NVP-linked carboxylic acid หรือสาร 2 ทำปฏิกิริยากับ NHS ก่อนให้ได้ activated ester แล้วจึงเติมสารที่ได้ลงในสารละลายของ HRP ตามแผนภาพที่ 3.1



แผนภาพที่ 3.1 Synthesis of NVP-HRP conjugate

3.4.6.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ NVP-HRP conjugate ด้วย competitive ELISA

เพื่อพิสูจน์ว่ามี NVP ติดอยู่กับเอนไซม์ HRP จริง จึงได้ตรวจสอบคอนจูเกตที่ได้ด้วยเทคนิค competitive ELISA โดยใช้ rabbit anti-NVP antibodies ที่เตรียมได้ในบทที่ 2 ทำ competition ระหว่าง NVP-HRP conjugate ที่เตรียมได้กับ NVP ที่ความเข้มข้น 10, 1.0, 0.1, 0.01 μg/ml และไม่มี inhibition ผลที่ได้แสดงดังรูป 3.11 จากกราฟที่ได้พบว่า NVP สามารถแข่งขันกับ NVP-HRP conjugate (1:4000 dilution) ในช่วง 0.01-1.0 μg/ml ข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่าได้สังเคราะห์ NVP-HRP conjugate ได้สำเร็จ

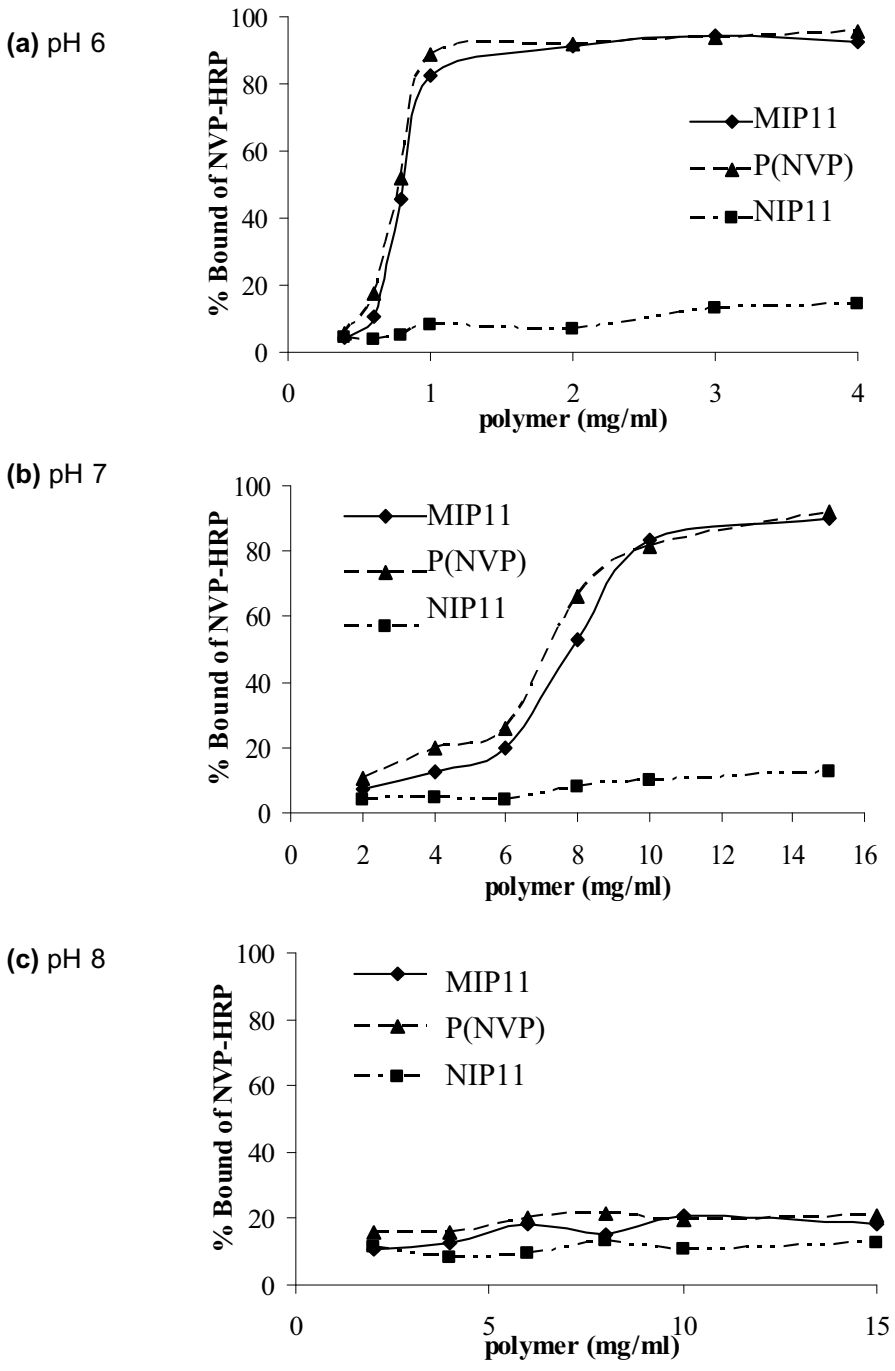


รูปที่ 3.11 Calibration curve for NVP detection using rabbit anti-NVP antibodies

3.4.6.3 การหาค่า IC_{50} ที่ pH ต่างๆ เพื่อเตรียมทำ competitive ELISA assay

ในการทดลองนี้ได้หาปริมาณพอลิเมอร์ที่สามารถจับกับ HRP-NVP conjugate ได้ 50% (IC_{50}) โดยการทำ titration experiment ใช้พอลิเมอร์ MIP11 และ P(NVP) ในปริมาณต่างๆ แช่ในสารละลายของเอนไซม์คอนจูเกตที่ 1:500,000 dilution ใน 0.01 M ฟอสเฟสบัฟเฟอร์ที่ pH 6, 7 และ 8 แล้ววัดปริมาณของเอนไซม์คอนจูเกตที่เหลืออยู่ในสารละลายหลังจากการเหวี่ยงแยกเอาพอลิเมอร์ออกด้วยการเติมเอนไซม์สับสเตรต TMB แล้ววัดการดูดกลืนแสงที่ λ_{max} = 450 nm ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 3.12

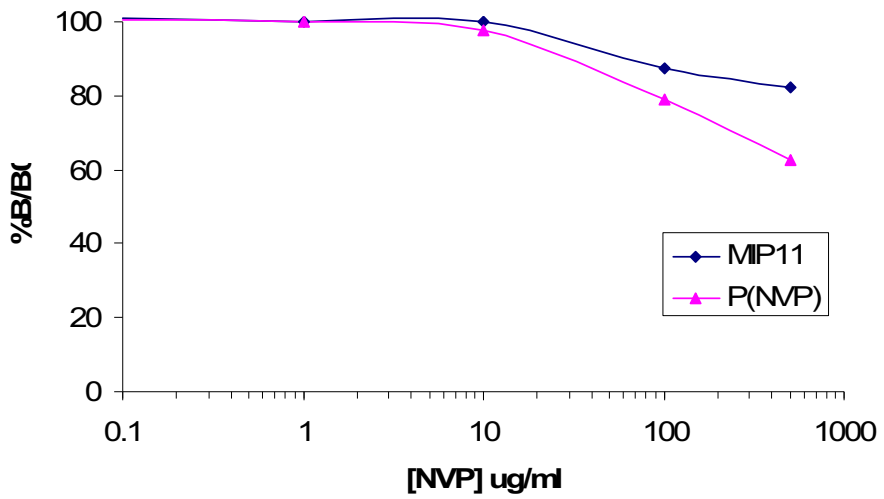
จากผลการทดลองพบว่าที่ pH 6 ค่า IC_{50} ของ MIP11 และ P(NVP) มีค่าเท่ากับ 0.8 mg/mlส่วนที่ pH7 มีค่าเท่ากับ 8 mg/ml และ 7 mg/ml ตามลำดับ และที่ pH8 ไม่มีการจับของ HRP-NVP conjugate อย่างมีนัยสำคัญกับพอลิเมอร์ทั้งสองชนิด เนื่องจากที่ pH 6 ใช้พอลิเมอร์ในปริมาณที่น้อยที่สุด ดังนั้นจึงเลือกเอาสภาวะนี้มาใช้ในการเตรียม competitive assay ในขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 3.12 Binding of NVP–HRP relative to polymer concentration for MIP11, P(NVP), and NIP11; (a) pH 6, (b) pH 7 and (c) pH 8.

3.4.6.4 การเตรียม molecularly imprinted sorbent assay

ในช่วงแรกของการทดลองได้ใช้วิธีเคลือบพอลิเมอร์ที่หลุม (well) ของ ELISA plate แล้ววัดค่า O.D. ที่ได้หลังจากเติม TMB บนพอลิเมอร์ที่อยู่บน plate โดยตรงตามวิธีที่มีรายงาน แต่พบว่ามีพอลิเมอร์บางส่วนหลุดออกในระหว่างการล้างและ incubate ทำให้ได้ผลที่มีความคลาดเคลื่อนสูงมาก แม้ว่าจะมีการปรับปรุงวิธีการเคลือบพอลิเมอร์แต่ก็ยังให้ผลไม่ดีเท่าที่ควร ดังนั้นจึงได้เปลี่ยนมาใช้วิธีการทำ assay ในหลอด microcentrifuge โดยทำ competition ระหว่าง NVP กับ NVP-HRP conjugate ที่ช่วงความเข้มข้นของ NVP ระหว่าง 0.1-500 μg/ml แล้วทำการวัดการทำงานของเอนไซม์ที่มีเหลืออยู่ในสารละลายหลังจากแยกเอาพอลิเมอร์ออกด้วยเครื่องเหวี่ยงตะกอน ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 3.13 ซึ่งพบว่าเมื่อใช้ MIP11 เป็นตัวจับจะมีช่วงการวิเคราะห์ที่เป็นเส้นตรงที่อยู่ระหว่าง 10-100 μg/ml ส่วน P(NVP) จะมีช่วงการวิเคราะห์ที่เป็นเส้นตรงที่ระหว่าง 10-500 μg/ml ส่วนเมื่อใช้ NIP11 เป็นตัวจับจะไม่มีการแข่งขันระหว่าง enzyme probe กับ NVP เกิดขึ้น จะเห็นว่าความไวของเทคนิคนี้ยังไม่ต่ำพอที่จะใช้ในการหาปริมาณ NVP ในตัวอย่างซึ่งระดับของยา NVP ในพลาสมามักจะพบในช่วงความเข้มข้น 3.0-10.0 μg/ml[30] ทั้งนี้การวัดการทำงานของเอนไซม์ที่มีเหลืออยู่ในสารละลายทำให้มีสัญญาณ background noise สูง ซึ่งอาจจะต้องแก้ไขโดยปรับรูปแบบของการวิเคราะห์ต่อไป



รูปที่ 3.13 Displacement curves with unlabelled NVP as competitor for MIP(NVP) and P(NVP). B/B0 is the ratio of the amounts of NVP–HRP bound in the presence of displacing ligand, B, to the amount bound in absence of displacing, B_0.

3.5 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้สังเคราะห์พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลของ NAM และ NVP โดยได้ใช้ NAM ซึ่งเป็นสารที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับ NVP แต่หาง่ายและราคาถูกกว่ามาเป็นสารต้นแบบสำหรับการคัดสรรเบื้องต้นเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับสังเคราะห์พอลิเมอร์ลอกแบบ NVP จากการศึกษาพบว่าพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์โดยวิธีพอลิเมอไรเซชันแบบตกตะกอนด้วย template/MAA/TRIM ในอัตราส่วน 1:4:4 สามารถจับกับ NVP ได้ดีในตัวกลางที่เป็นน้ำ เมื่อศึกษาความจำเพาะของพอลิเมอร์ทั้งสองโดยเปรียบเทียบค่า distribution coefficient ของ NVP เทียบกับสารอื่นๆที่มีโครงสร้างใกล้เคียง พบว่า NVP มีค่า Kd ที่สูงมาก ซึ่งแสดงว่าพอลิเมอร์ทั้งสองเลือกจับกับ NVP ได้ดีกว่าสารอื่นๆ โดยที่ P(NVP) มี cross reactivity ที่สูงกับ NAM จาก Scatchard plot analysis พบว่า MIP11 มีค่า Q_{max} และ K_d เท่ากับ 57.92 μg/mg และ 134.27 mg/ml ส่วน P(NVP) มีค่า Q_{max} และ K_d เท่ากับ 95.62 μg/mg และ 166.72 mg/ml เมื่อนำพอลิเมอร์ที่ได้มาใช้แทนแอนติบอดีในการพัฒนาเทคนิค enzyme-linked molecularly imprinted sorbent assay สำหรับการตรวจวิเคราะห์ NVP พบว่าเมื่อใช้ MIP11 จะมีช่วงการวิเคราะห์ที่เป็นเส้นตรงที่อยู่ระหว่าง 10-100 μg/ml ส่วน P(NVP) จะมีช่วงการวิเคราะห์ที่เป็นเส้นตรงที่ระหว่าง 10-500 μg/ml

เอกสารอ้างอิง

(1) Ishikawa, E. *Enzyme Immunoassay*; Lippincott Williams & Wilkins,US: New York, 1982.

(2) Ansell, R. J. *Bioseparation* **2002**, *10*, 365-377.

(3) Ansell, R. J. *J.Chromatogr.B* **2004**, *804*, 151-165.

(4) Haupt, K.; Mosbach, K. *Trends in Biotechnology* **1998**, *16*, 468-475.

(5) Hennion, M.-C.; Pichon, V. *J.Chromatogr. A, A Century of Chromatography 1903-2003* **2003**, *1000*, 29-52.

(6) Ye, L.; Mosbach, K. *React. Funct. Polym.* **2001**, *48*, 149-157.

(7) Peter, A. G. C.; Amaia, Z. E. *J.Chromatogr.B* **2004**, *804*, 173–182.

(8) Andersson, L. I. *J.Chromatogr.B: Biomedical Sciences and Applications* **2000**, *745*, 3-13.

(9) Baggiani, C.; Giovannoli, C.; Anfossi, L.; Tozzi, C. *J.Chromatogr. A* **2001**, *938*, 35-44.

(10) Feng, S. Y.; Lai, E. P. C.; Dabek-Zlotorzynska, E.; Sadeghi, S. *J.Chromatogr.A 26th International Symposium on Capillary Chromatography and Electrophoresis* **2004**, *1027*, 155-160.

(11) Matsui, J.; Fujiwara, K.; Ugata, S.; Takeuchi, T. *J.Chromatogr. A* **2000**, *889*, 25-31.

(12) Masque, N.; Marce, R. M.; Borrull, F. *TrAC Trends in Anal. Chem.* **2001**, *20*, 477-486.

(13) Sergeyeva, T. A.; Matuschewski, H.; Piletsky, S. A.; Bendig, J.; Schedler, U.; Ulbricht, M. *J.Chromatogr. A* **2001**, *907*, 89-99.

(14) Tarley, C. x. e. s. R. T.; Kubota, L. T. *Analytica Chimica Acta* **2005**, *548*, 11-19.

(15) Theodoridis, G.; Kantifes, A.; Manesiotis, P.; Raikos, N.; Tsoukali-Papadopoulou, H. *J.Chromatogr. A* **2003**, *987*, 103-109.

(16) Bengtsson, H.; Roos, U.; Andersson, L. I. *Anal. Comm.***1997**, *34*, 233-235.

(17) Vlatakis, G. *Nature* **1993**, *361*, 645-647.

(18) Levi, R.; McNiven, S.; Piletsky, A.; Cheong, S.-H. Y., I.; Karube, K. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 2017-2021.

(19) Haupt, K.; Dzgoev, A.; Mosbach, K. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 628-631.

(20) Surugiu, I.; Ye, L.; Yilmaz, E.; Dzgoev, A.; Danielsson, B.; Mosbach, K.; Haupt, K. *Analyst* **2000**, *125*, 13-16.

(21) Andersson, L. I. *J.Chromatogr.B: Biomedical Sciences and Applications* **2000**, *739*, 163-173.

(22) Lavignac, N.; Allender, C. J.; Brain, K. R. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *510*, 139-145.

(23) Owens, P. K.; Karlsson, L.; Lutz, E. S. M.; Andersson, L. I. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **1999**, *18*, 146-154.

(24) Dailly, E.; Thomas, L.; Kergueris, M. F.; Jolliet, P.; Bourin, M. *J. Chromatogr. B* **2001**, *758*, 129-135.

(25) Colombo, S.; Beguin, A.; Telenti, A.; Biollaz, J.; Buclin, T.; Rochat, B.; Decosterd, L. A. *J. Chromatogr. B* **2005**, *819*, 259-276.

(26) Kaul, N.; Agrawal, H.; Paradkar, A. R.; Mahadik, K. R. *Talanta* **2004**, *62*, 843-852.

(27) Azoulay, S.; Nevers, M. C.; Cr´eminon, C. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 104.

(28) Gue, H.; He, X. j. *Anal. Chem.* **2000**, *368*, 461-465.

(29) Jie, Z.; He, X. *Anal. Chim. Acta* **1998**, *381*, 85-91.

(30) In *USP DI - 2005; p. 2125*.

Output ที่ได้จากโครงการ

1.สามารถผลิตแอนติบอดีแบบชีวภาพและแบบสังเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพดีมีราคาถูกเพื่อเป็นพื้นฐานในการพัฒนาชุดตรวจวิเคราะห์ Nevirapine เพื่อช่วยในการติดตามการใช้ยาในผู้ติดเชื้อ HIV
2.กระบวนการผลิตนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการเตรียมแอนติบอดีต่อยาชนิดอื่นเพื่อนำมาใช้ในงานทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยาและสิ่งแวดล้อม
3. เป็นความรู้พื้นฐานที่เป็นประโยชน์ต่อการเรียนการสอน และการทำวิจัยในอนาคต
4. สามารถผลิตผลงานเพื่อตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติหรือนานาชาติ

<u>ชื่อผลงานที่ตีพิมพ์ไปแล้ว</u>

Development of a one-step immunochromatographic strip test for the rapid detection of nevirapine (NVP), a commonly used antiretroviral drug for the treatment of HIV/AIDS
Talanta, *Volume 71, Issue 1*, *15 January 2007*, *Pages 462-470*
M. Pattarawarapan, S. Nangola, T.R. Cressey and C. Tayapiwatana

ภาคผนวก

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
Talanta 71 (2007) 462–470
Talanta
www.elsevier.com/locate/talanta

Development of a one-step immunochromatographic strip test for the rapid detection of nevirapine (NVP), a commonly used antiretroviral drug for the treatment of HIV/AIDS

M. Pattarawarapan [a], S. Nangola [b,c], T.R. Cressey [d,e], C. Tayapiwatana [b,*]

[a] *Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Chiang Mai University, Thailand*
[b] *Division of Clinical Immunology, Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand*
[c] *Research and development Unit, i+MED LABORATORIES, Bangkok, Thailand*
[d] *Harvard School of Public Health, Harvard University, Boston, MA, USA*
[e] *Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UR 174, Program for HIV Prevention and Treatment, Chiang Mai University, Thailand*

Received 27 March 2006; received in revised form 16 May 2006; accepted 17 May 2006
Available online 30 June 2006

Abstract

Currently, high-performance liquid chromatographic (HPLC) methods are mainly used to measure antiretroviral plasma concentrations in HIV-infected patients. Although the utility of routine therapeutic drug monitoring (TDM) as an additional tool to optimize long-term antiretroviral therapy is unclear, if TDM is to be widely used, the availability of simple, cheap and reliable methods for the measurement of antiretroviral drug levels are needed, particularly in resource-limited settings. In this study, an immunochromatograhic (IC) strip test to detect the presence of nevirapine (NVP) in body fluids has been developed. Antiserum to NVP was first raised in rabbits by immunization against NVP chemically conjugated with bovine serum albumin, and subsequently validated by Western immunoblotting and competitive indirect ELISA. The partially purified anti-NVP antibodies were conjugated with colloidal gold particles. The conjugation of the colloidal gold and polyclonal antibodies was monitored by UV–vis spectroscopy, while transmission electron microscopy images were used to characterize the particle size and shape of the conjugates. The resulting colloidal gold conjugates were used for the production of an IC strip test to detect nevirapine in human plasma. Preliminary assessment suggests no-cross reactivity of the NVP polyclonal antibodies but assessment of plasma samples from HIV-infected patients receiving HAART needs to be conducted. This assay could potentially be used for drug monitoring as part of the clinical care of HIV infected patients.
© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: NVP; Immunochromatographic strip test; Colloidal gold; Immunoassay

1. Introduction

Nevirapine (NVP), 11-cyclopropyl-5,11-dihydro-4-methyl-6H-dipyrido-[3,2-b:2′,3′-e], is a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTI) which is widely used as a part of highly active antiretroviral therapy (HAART) for the treatment of HIV/AIDS, and as a single dose prophylactic intervention during labor for the prevention of mother-to-child transmission of HIV (PMTCT) [1,2].

NVP inhibits HIV-1 replication by binding directly to the HIV-l reverse transcriptase enzyme and disrupting its catalytic site. Unfortunately, NVP viral drug resistance can result from a specific single mutation, such as the K103N, in the viral reverse transcriptase gene and these mutations confer cross resistant to the other NNRTIs in the drug class [3]. A relationship between plasma NVP levels and efficacy has been reported [4]; therefore, maintaining sufficient NVP plasma drug levels is critical to reduce the risk for selecting NNRTI resistance viruses. For the majority of antiretroviral drugs, a similar relationship has been demonstrated and it has been proposed that individualization of drug dosing, guided by the measurement of drug levels (i.e., therapeutic drug monitoring (TDM)) could help optimize

* Corresponding author. Tel.: +66 18845141; fax: +66 53946042.
E-mail address: asimi002@chiangmai.ac.th (C. Tayapiwatana).

0039-9140/$ – see front matter © 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.talanta.2006.05.059

therapeutic outcome and prevent adverse effects [5]. Furthermore, TDM has also been suggested to be an additional tool to the standard methods of questionnaires and pill counts to help monitor drug adherence [6].

For the quantitative analysis of NVP in plasma, high-performance liquid chromatography (HPLC) with UV detection has been primarily used [7]. Recently, LC/MS methods have also been developed, these methods can simultaneously detect up to nine antiretroviral drugs in the same plasma sample [8]. However, since the majority of HIV-infected patients are living in rural areas, simpler and cheaper methods of NVP detection are needed to facilitate the assessment of TDM of antiretrovirals. Indeed, for plasma nevirapine levels, a qualitative thin-layer chromatography (TLC) method as well as a quantitative ELISA method has been reported [9,10].

Immunochromatographic strip tests are simple, rapid and cheap assays which have been developed for the qualitative measurement of many biological markers [11–15]. These assays rely on the transport of a labeled antibody (or antigen) probe to its specific antigen (or antibody) binding partner immobilized on the surface of a membrane. Among the different labeled test systems, colloidal gold appears to be the most attractive as unlike fluorescence or enzyme tags, gold probes are more stable and do not require time-consuming procedures such as incubations, washing steps and enzymatic reactions to generate a signal [16,17]. Due to the accumulation of colloidal gold, a red-purple color can be rapidly observed visually. These characteristics significantly shorten the analysis time and make it a very convenience to assay on-site.

In this study, we described the preparation and characterization of anti-NVP polyclonal antibodies and an antibody–colloidal gold probe. These reagents were used to develop a one-step immunochromatographic (IC) strip test for the rapid detection of NVP.

2. Experimental

2.1. Reagents

All chemicals were purchased from commercial suppliers and used as received. Chloroauric acid ($HAuCl_4{\cdot}3H_2O$), methyl-5-bromovalerate, 4-(dimethylamino)pyridine (DMAP), anhydrous *N,N*-dimethylformamide (DMF), *N*-hydroxy succinimide (NHS), and 1,3-diisopropylcarbodiimide (DIC) were purchased from Fluka, USA. Bovine serum albumin (BSA) was obtained from Sigma, USA. NVP was obtained as a gift from the Government Pharmaceutical Organization (GPO) of Thailand.

2.2. Instruments

Solid-phase EIA was performed in 96-well microtiter plates (Nunc, Denmark), and optical density (O.D.) was measured with an automatic plate reader (Tecan, Austria). NMR spectra were recorded on a Bruker *AVANCE*^{TM} NMR spectrometer (400 MHz for ^{1}H). Chloroform-d ($CDCl_3$) was used as the solvent. Chemical shift values (δ) are reported in ppm relative to internal tetramethylsilane. Coupling constants (J) are expressed in Hz. Transmission electron microscopy (TEM) images were recorded on a transmission electron microscope equipped with energy dispersive spectrometer (EDS) (JEOL JEM-2010, Japan).

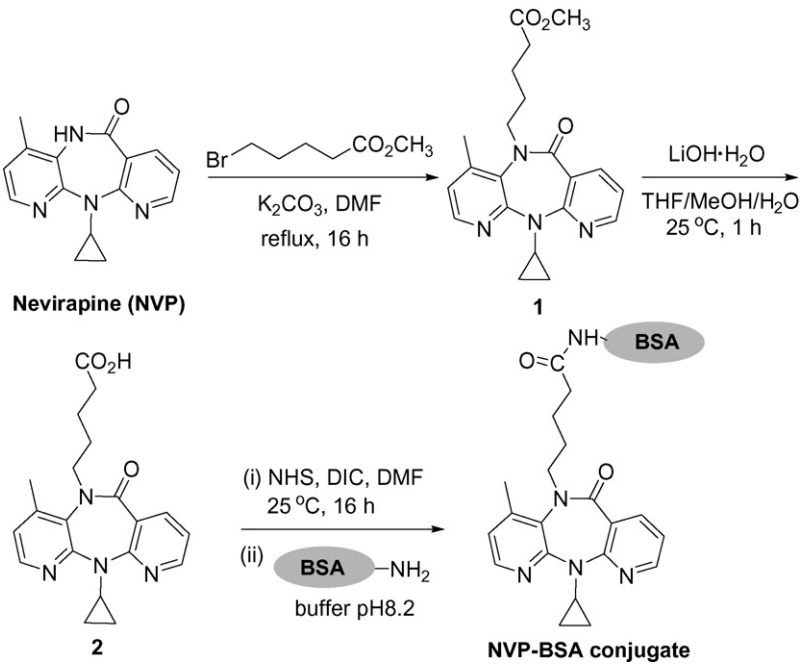
2.3. Preparation of NVP–BSA antigen

The immunogen (NVP–BSA conjugate) was synthesized according to Azoulay et al. [10], except that the carrier protein was changed to BSA instead of keyhole limpet hemocyanin (KLH) because the cost of immunogen production was significantly lower and it was presumed that the immunogenicity would not be affected.

NVP linked methyl ester (compound **1**; see Scheme 1): A solution of methyl 5-bromovalerate (60 μl, 0.36 mmol) in DMF (1.5 ml) was added to a mixture of NVP (100 mg, 0.36 mmol) and potassium carbonate (149.3 mg, 1.08 mmol) in DMF (1.5 ml). The resulting mixture was refluxed for 16 h, and then the solvent removed in vacuo. The crude residue was purified by chromatography on a silica gel (hexane-ethyl acetate 60/40, $R_f = 0.37$) to generate NVP linked methyl ester (**1**) as a yellow oil (78.1 mg, 52%). The following ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) was produced: δ 8.49 (dd, $J = 2$, 4.8 Hz, 1H), 8.05 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H), 7.75 (dd, $J = 2$, 7.6 Hz, 1H), 6.97 (dd, $J = 7.6$, 4.8 Hz, 1H), 6.92 (d, $J = 5.2$, 1H), 4.38 (t, 2H), 3.66 (s, 3H), 3.65 (m, 1H), 2.42 (t, 2H), 2.34 (s, 3H), 1.87 (m, 4H), 0.96 (m, 2H), 0.47 (m, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 173.7, 162.9, 159.0, 152.8, 151.3, 143.8, 143.5, 137.3, 132.7, 122.0, 119.6, 118.4, 51.5, 33.7, 29.0, 28.2, 21.7, 18.0, 8.7, 8.6.

NVP linked carboxylic acid (compound **2**): Compound **1** (78.1 mg, 0.20 mmol) was dissolved in a solution of THF/MeOH/H_2O 3:2:1 (2 ml). $LiOH{\cdot}H_2O$ (16.7 mg, 0.40 mmol) was then added and the mixture was stirred for 1 h at 25 °C. After concentration of the mixture in vacuo, the crude residue was diluted with water and neutralized with 1 M HCl. The resulting solution was extracted with 2 ml × 2 ml EtOAc, dried with anhydrous Na_2SO_4 and concentrated in vacuo to yield compound **2** as yellow oil (62.3 mg, 85%). The following ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) was produced: δ 8.49 (dd, $J = 2$, 4.8 Hz, 1H), 8.10(d, $J = 4.8$ Hz, 1H), 7.78 (dd, $J = 2$, 7.6 Hz, 1H), 6.99 (dd, $J = 7.6$, 4.8 Hz, 1H), 6.90 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H), 4.40 (t, 2H), 3.66 (m,1H), 2.42 (t, 2H), 2.32 (s, 3H), 1.87 (m, 4H), 0.96 (m, 2H), 0.47 (m, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 177.9, 162.8, 159.0, 152.6, 151.4, 144.0, 143.7, 137.4, 132.8, 122.0, 119.6, 118.5, 33.6, 29.0, 28.1, 21.0, 18.1, 14.1, 8.9, 8.7.

NVP–BSA conjugate: Compound **2** (33 mg; 0.087 mmol) was reacted with NHS (12.0 mg; 0.1 mmol) in the presence of 1,3-diisopropylcarbodiimide (23.4 mg; 0.11 mmol) in anhydrous DMF (3.6 ml) for 16 h at 25 °C. The mixture was then added dropwise to a stirred solution of BSA in 5 ml of 0.05 M carbonate/bicarbonate buffer pH 8.2 at 0 °C. The solution was stirred for a further hour at 25 °C and then for 24 h at 4 °C. The synthesized immunogen was then dialyzed with 0.1 M phosphate buffer saline (pH 7.4). The resulting solution was kept frozen at −20 °C until it was used.



Scheme 1. Synthesis of the NVP–BSA conjugate.

2.4. Preparation of polycloncal antibodies

An albino New Zealand rabbit was immunized with 1.0 mg of NVP–BSA antigen in complete Freund's adjuvant. The rabbit preimmunized serum was collected before subcutaneous multi-site injections. Booster injections of 1.0 mg of antigen in incomplete Freund's adjuvant were given 1 week post-immunization, followed by three additional boosters at 2-week intervals. The hyperimmune serum obtained 2 weeks after the last immunization was collected and precipitated with saturated $(NH_4)_2$ SO_4 and dialyzed against 5 mM sodium borax buffer pH 9.0.

2.5. Validation of polyclonal antibodies

2.5.1. Western immunoblotting

SDS-PAGE was performed according to the technique described by Laemmli [18]. Reduced forms of NVP–BSA and unconjugated BSA were electrophoretically separated on a 12% polyacrylamide gel. Samples were prepared in 2-mercaptoethanol and SDS under heat denaturizing conditions. The separated polypeptides were transferred to a PVDF membrane as described by Tawbin et al. [19]. The membrane was blocked with 5% skimmed milk in PBS for 1 h. Subsequently, the NVP–BSA immunized rabbit serum (1:2000 with 2% BSA in PBS) was applied to the blocked membrane. After 1 h incubation, excess polyclonal antibodies were washed out and HRP-swine anti-rabbit immunoglobulins conjugate (DAKO, Germany) diluted 1:5000 was added. The TMB/H_2O_2 immunoblotting substrate solution (Fermentas, Lithuania) was used to visualize bound antibodies on the membrane. The molecular size of each reactive band was calculated relative to standard proteins.

2.5.2. Competitive indirect ELISA

A competitive indirect ELISA was used to test the NVP–BSA immunized rabbit serum reactivity with other antiretroviral drugs. The drugs tested were: nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NRTI); zidovudine (AZT), lamivudine (3TC), didanosine (ddI), abacavir (ABC) and stavudine (d4T); the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI); efavirenz (EFV); and the protease inhibitors (PIs), indinavir (IDV), saquinavir (SQV), amprenavir (APV), ritonavir (RTV), nelfinavir (NFV), NFV metabolite (M8) and lopinavir (LPV). For antiretroviral drugs, although the therapeutic ranges vary the plasma concentrations achieved during a dosing interval following oral administration are commonly within 0.10–12 μg/ml [20]. For the competitive ELISA high concentrations of 10 μg/ml were used to mimic those concentrations which can be achieve in plasma. NVP–BSA antigen (50 μl) at a concentration of 10 μg/ml in carbonate buffer pH 9.6 was added to polystyrene wells and allowed to passively adsorb for 16 h at 4 °C. Subsequently, 200 μl of 2% skimmed milk in PBS was added to each well and incubated for 2 h at RT. The blocking solution was removed by washing three times with 0.05% TWEEN in PBS. A 1:8000 dilution of rabbit serum was mixed with a fix drug concentration (10 μg/ml) and incubated for 1 h at 37 °C. The mixture (50 μl) was applied into an individual NVP–BSA coated well. After washing the wells, 50 μl of HRP-swine anti-rabbit immunoglobulin conjugate diluted 1:3000 was added, incubated for 1 h and washed. TMB/H_2O_2 substrate solution (100 μl) was added for 15 min. The enzymatic reaction was stopped by adding 100 μl of 1 M HCl. The O.D. was measured at 450 nm. The O.D. value was used to compare the ability of each drug to compete with the anti-NVP polyclonal antibodies in the rabbit hyperimmune serum.

2.6. Synthesis and characterization of colloidal gold

Colloidal gold was synthesized according to the procedure described by Turkevich et al. [21] using a reduced scale. An aqueous solution of chloroauric acid (5 mM $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$, 5 ml) was diluted with 90 ml of deionized water. This solution was stirred and heated until boiling and then reduced with 0.5% sodium citrate solution (5 ml). Heating was continued until the solution color changed to a red-purple color.

2.7. Formation of gold conjugate

Polyclonal antibodies were diluted in 5 ml of 5 mM sodium borate buffer pH 9.0 in order to obtain 2.5 mg/ml of immunoglobulins. This solution was then added dropwise to a stirred solution of colloidal gold 0.25 mM, 100 ml. The pH of the colloidal gold solution was pre-adjusted to 7.0 by addition of 0.01 M Na_2CO_3. The mixture was stirred for 30 min and 5 ml of 5% BSA in 5 mM NaCl solution was added. After 5 min, the solution was centrifuged at 4 °C 14,000 rpm for 30 min to remove unconjugated antibodies from the solution. The pellet was subsequently resuspended in Phosphate Gold Diluent buffer (1% BSA in 49 mM Na_2HPO_4) to obtain an antibody–colloidal gold conjugate solution which had an O.D. of 40 at λ 580 nm.

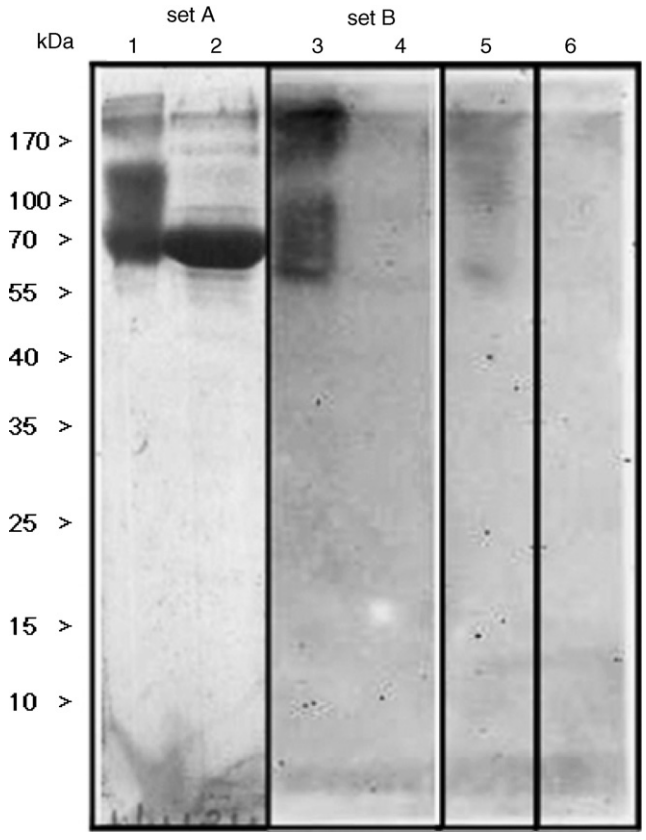


Fig. 1. Western immunoblotting analysis of NVP–BSA and BSA alone using the rabbit hyperimmune serum. Lanes 1, 3, 5 and 6 were NVP–BSA separated under denaturing condition. Lanes 2 and 4 were unconjugated BSA separated under denaturing condition. Set A was stained with Amido black B for protein detection on blotting membrane. Set B was reacted with rabbit serum (dilution 1:2000). Lane 5 was probed with rabbit serum mixed with NVP (10 μg/ml final concentration). No rabbit serum was added to lane 6. The HRP-swine anti-rabbit immunoglobulin conjugate was applied to all lanes. Molecular weight markers (in kilodaltons) are indicated.

2.8. Characterization of colloidal gold conjugates

2.8.1. Transmission electron microscopy (TEM)

The size and shape of colloidal gold with and without conjugated antibodies bound were compared using TEM measurements. The TEM samples were prepared by placing a drop of the colloidal gold in acetone/H_2O mixture onto a carbon-coated TEM copper grid. The resulting film was allowed to dry overnight and then used for TEM imaging. TEM microscope was operated at an acceleration voltage of 120 kV and at a magnification of 80,000. The size distributions of the particles from enlarged photographs of the TEM images were measured using at least 150 counts of the particles. A selected area diffraction (SAD) pattern of a colloidal gold particle containing antibodies was taken directly from the corresponding TEM image and the resulting diffraction pattern was indexed according to a standard procedure [22].

2.8.2. UV–vis spectroscopic studies

The formation of antibody–colloidal gold conjugates was monitored by UV–vis spectroscopy using a double beam spectrophotometer. The UV absorption of the colloidal gold and antibody–colloidal gold solution (0.5 mM in aqueous) were monitored immediately after preparation at λ 200–700 nm.

2.9. Preparation of an immunochromatographic (IC) strip test

An IC test strip was developed using rabbit anti-NVP polyclonal antibodies conjugated with colloidal gold particles (anti-NVP–CGC). A lateral flow test strip was constructed as follows:

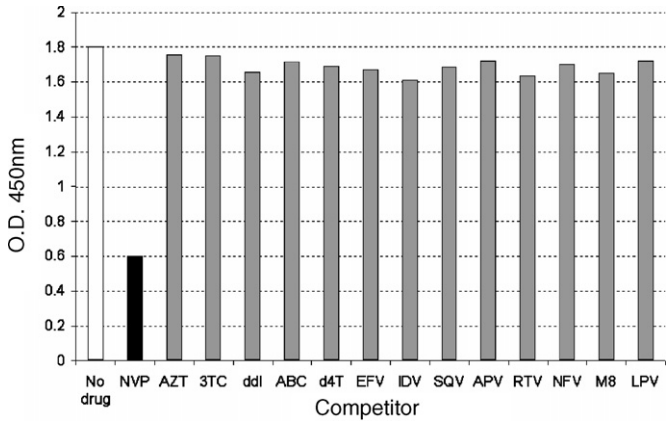


Fig. 2. Assessment of the rabbit anti-NVP polyclonal antibodies by competitive indirect ELISA with various anti-HIV drugs at 10 μg/ml. This experiment was performed in triplicate and a similar absorbance pattern was observed (see Section 2.5.2 for drug names).

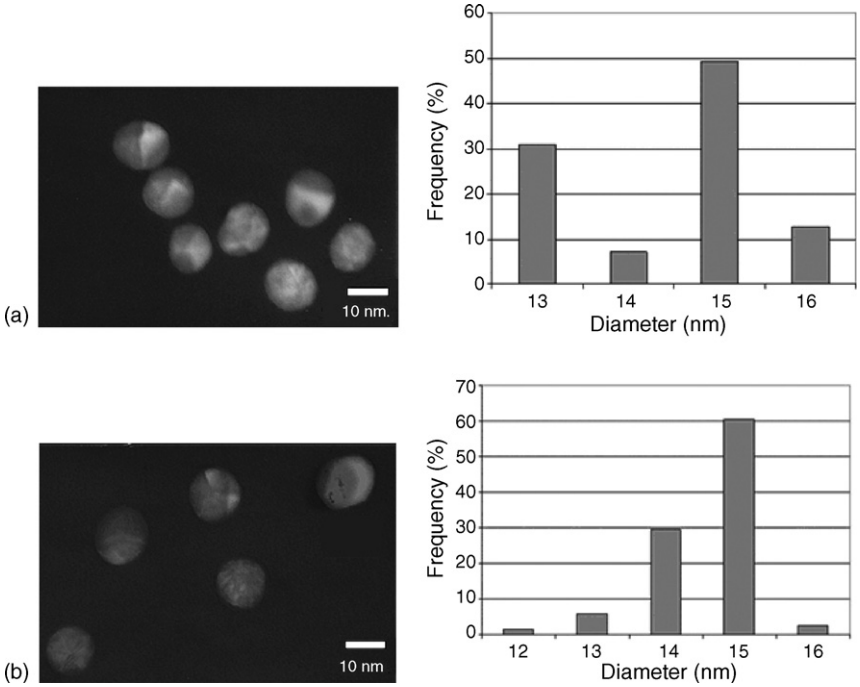


Fig. 3. TEM images and size distribution of (a) unconjugated colloidal gold particles (b) conjugated antibody–colloidal gold particles. For particle size comparison, the 10 nm-scale marker is indicated.

anti-NVP–CGC (O.D. of 40 at λ 580 nm) was jetted onto a glass fiber (conjugate pad) by an isoflow dispenser (Imagene Technology, USA). The nitrocellulose membrane (Scheicher and Schuell, Germany) was laminated on a plastic support by a Precision Laminator (Zeta Corporation, Korea). NVP–BSA at 1.0 mg/ml and goat anti-rabbit IgG (KPL, USA) at 0.5 mg/ml in PBS were jetted onto a laminated nitrocellulose membrane at two separate zones; test line and control line, respectively. Subsequently, the conjugate pad and jetted membrane were incubated for 2 h at 37 °C and then dried in a dessicator at room temperature. After drying, the components of strip, i.e., sample application pad, anti-NVP–CGC sprayed conjugate pad, jetted nitrocellulose membrane and absorbent pad were assembled and then cut into individual strips (3.5 mm/strip), using a strip cutter (INDEX CUTTER, USA).

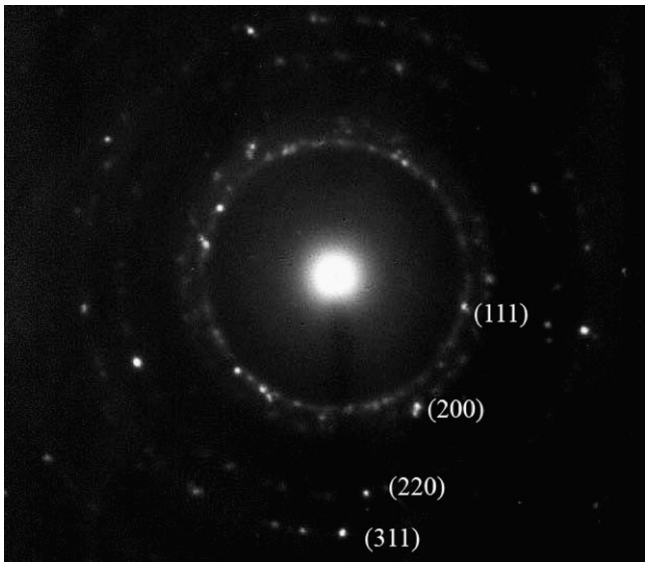


Fig. 4. Selected area diffraction (SAD) pattern derived from a conjugated antibody–colloidal gold particle.

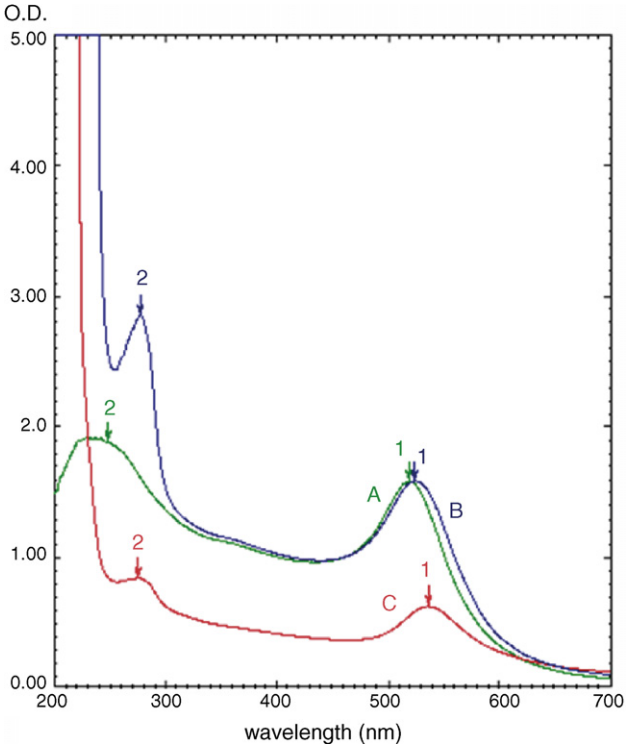


Fig. 5. UV–vis spectra of colloidal gold and antibody–colloidal gold conjugates. Curve A, colloidal gold solution; curve B, anti-NVP–CGC immediately after addition of antibody to gold solution; Curve C, anti-NVP–CGC after centrifugation to remove the unbound antibodies.

2.10. Detection of NVP by the Immunochromatographic strip test

Analysis of NVP by the IC strip test was performed by dipping the strip into standard solutions of NVP in PBS buffer pH 7.4 at 0, 0.1, 0.5, 1.0 and 3.0 μg/ml. The result was interpreted after a red-purple color appeared at the control line. At the test line, the presence of a red-purple color suggested no NVP was present in the sample and vice versa.

2.11. Cross-reactivity of the NVP immunochromatographic test strip

The procedure was performed as described in Section 2.10 excepted that the IC strip test was dipped into NVP and a set of commonly coadministered antiretroviral drugs in PBS buffer pH 7.4. A high drug concentration of 10 μg/ml, which is near the maximum concentration achieved in plasma for many of the antiretroviral drugs, was used. The drugs tested are described in Section 2.5.2. To evaluate the potential influence of the plasma matrix on the strip, human plasma spiked with 5.0 μg/ml of NVP was tested along with blank human plasma.

3. Results and discussion

3.1. Synthesis of NVP–BSA conjugate

NVP–BSA conjugate was synthesized according to Scheme 1 and the structures of the NVP linked methyl ester (compound **1**) and the NVP linked carboxylic acid (compound **2**) were confirmed by NMR (see Section 2.3).

3.2. Validation of polyclonal antibodies

Western immunoblotting in Fig. 1 showed immunoreactive bands of the synthesized NVP–BSA (lanes 1, 3, 5 and 6) in comparison with unconjugated BSA (lanes 2 and 4). NVP–BSA and BSA protein bands were observed in lanes 1 and 2 (set A) by Amido black B staining. The major protein band of BSA was located at 66 kDa. The proteins with higher molecular weight were regarded as impurities from the partially purified BSA fraction. Following incubation with rabbit serum (dilution 1:2000, Set B), the presence of polyclonal anti-NVP antibodies in the serum was demonstrated by the positive signal observed with NVP–BSA (lane 3). No signal was observed with BSA alone (lane 4). This result suggested that anti-BSA antibodies present

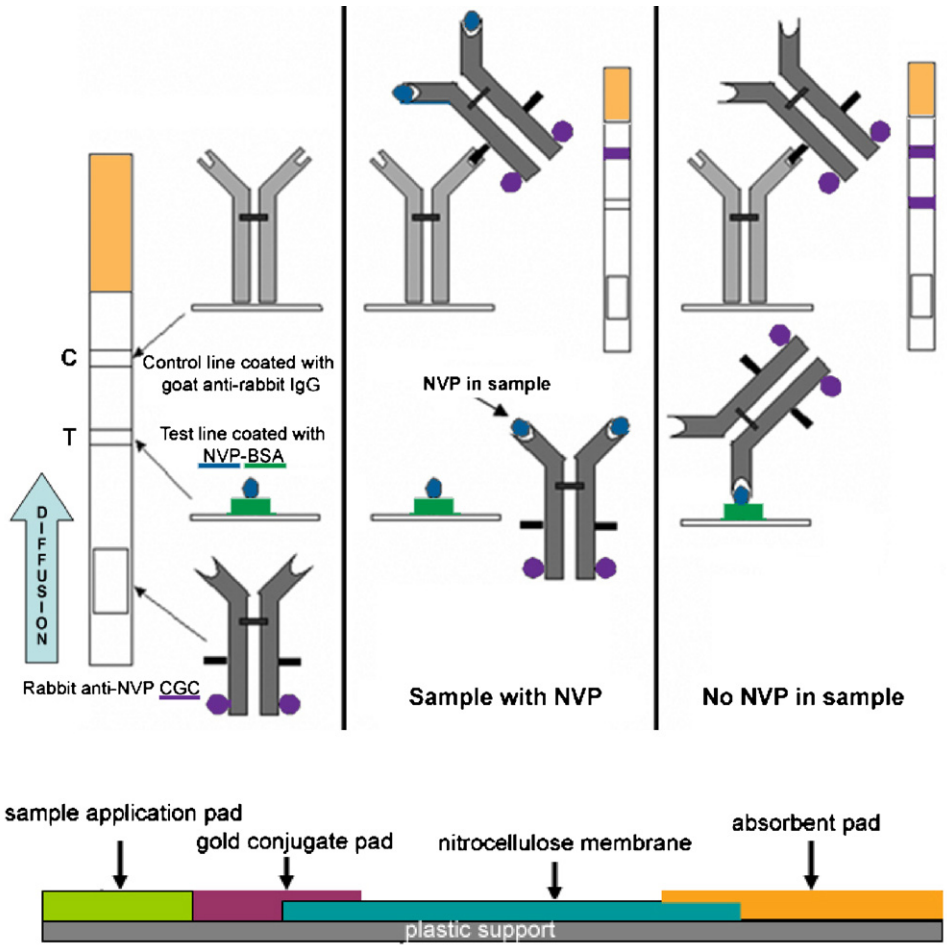


Fig. 6. Configuration of the IC NVP strip test. The schematic diagram shows the areas where rabbit anti-NVP–CGC, NVP–BSA and goat anti-rabbit IgG are immobilized (left panel). The reactions which occur on the IC strip in the presence of NVP (middle panel), and in the absence of NVP (right panel) are shown. A red-purple color appears at the test and/or control lines depending on the presence of NVP.

in the hyperimmune serum were neutralized by BSA in the serum diluting buffer. Furthermore, mixing the hyperimmune serum with 10 μg/ml NVP reduced the intensity of the 66 kDa band and the higher molecular weight proteins (lane 5) confirming the presence of polyclonal anti-NVP antibodies.

The specificity of antibodies was analyzed by competitive indirect ELISA (Fig. 2). Several commonly administered anti-HIV drugs (AZT, 3TC, ddI, ABC, d4T, EFV, IDV, SQV, APV, RTV, NFV (plus NFV metabolite, M8) and LPV) were tested. The O.D. of the well containing NVP as the competitor was significantly lower than that obtained in the control well (no drug). In contrast, the O.D. of the wells with the other antiretroviral-drugs was similar to the control well. This data suggested that the anti-NVP antibodies produced were highly specific to NVP.

3.3. Characterization of the colloidal gold particles and antibody–gold conjugates

3.3.1. TEM imaging

The TEM images of gold colloid and anti-NVP–CGC are shown in Fig. 3(a and b). Both forms of gold particles were homogeneous in size and shape, and there was no marked difference in the size distribution of colloidal gold before and after conjugation. The gold particles obtained showed narrow size distribution with a mean diameter of 15.0 ± 3.05 nm and this is within the typical range of colloidal gold used in IC assays (10–20 nm) [23]. The selected area diffraction (SAD) pattern taken from an antibody gold particle (Fig. 4) shows the central intense direct beam and an array of diffraction spots from different atomic planes. These spots were assigned to the 1 1 1, 2 0 0, 2 2 0 and 3 1 1 planes of a face centered cubic (fcc) lattice of gold, according to JCPDS File No. 4-784 [24]. This result confirms that colloidal gold was successfully produced.

3.3.2. UV–vis spectra

The presence of antibody on the gold surface was characterized using UV–vis spectroscopy. Spectra of the colloidal gold solution were recorded without antibody and immediately after the addition of antibody (Fig. 5a and b). A peak at ~519 nm in curve A was due to surface plasmon resonance of colloidal gold. Immediately following the addition of antibody (curve B), red shift of this band occurred as a result of antibody–colloidal gold interaction and a new band appeared at ~280 nm which corresponded to a protein absorption band. After centrifugation and removal of unbound antibody from antibody–colloidal gold conjugate (curve C) showed two absorption bands at ~510 and 280 nm indicating that antibody was presented on the gold surface. The absorption band at 510 nm was much lower for the antibody–colloidal gold conjugate than for the unbound colloidal gold as some gold particles were lost during the washing step to remove unbound antibodies.

3.4. Construction of Immunochromatographic strip test system using anti-NVP–CGC

A schematic diagram showing the areas where the components are immobilized on the IC-test strip is illustrated in Fig. 6. Dipping the strip into a test solution will cause the liquid to move upward by capillary action and dissolve the dried rabbit anti-NVP–CGC on the conjugate pad. The anti-NVP–CGC complex subsequently migrates up the surface of nitrocellulose membrane. If no NVP is present in the sample, rabbit anti-NVP–CGC will bind to NVP–BSA streaked at the test line (T). The immobilized anti-NVP–CGC generates a red-purple color line caused by colloidal gold particle accumulation. In contrast, if the sample contains NVP, rabbit anti-NVP–CGC will be neutralized by free NVP. Consequently, the intensity of the red-purple color observed will be reduced. For the control line (C), a red-purple color will appear independently of the presence of NVP in the test sample since the amount of rabbit anti-NVP–CGC is in excess. When the rabbit anti-NVP–CGC reaches C, it will be captured by the goat anti-rabbit IgG. The control line is used to monitor whether the anti-NVP–CGC has passed over the test line and the result can be interpreted.

3.5. Analysis of NVP standards with the IC test strips

Results from the IC strip assessing NVP in PBS are shown in Fig. 7. In the absence of NVP, the binding of anti-NVP–CGC with the solid-phase NVP–BSA produced an intense red-purple

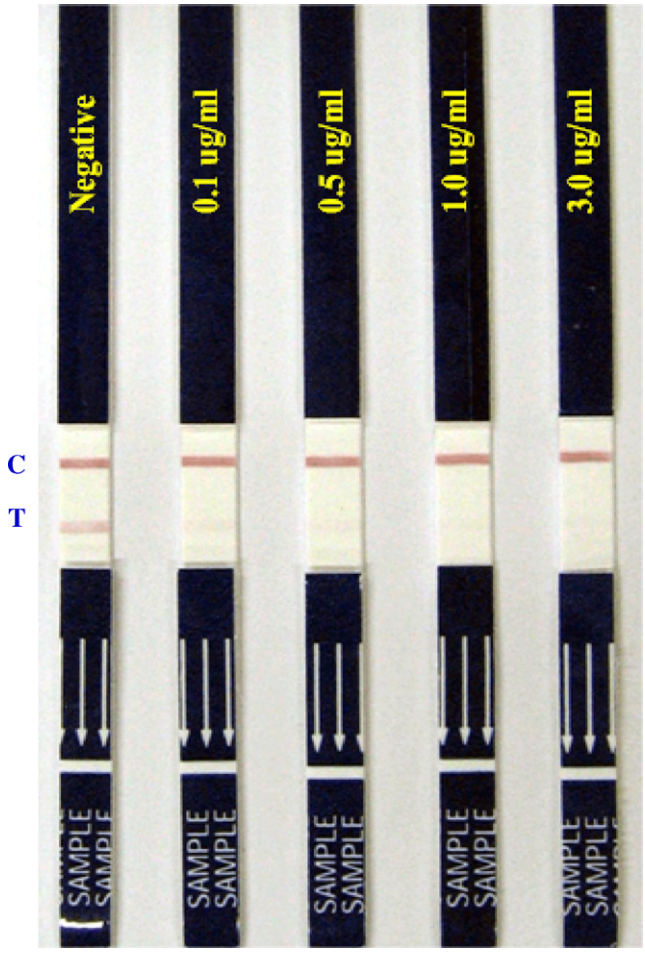


Fig. 7. IC strip test results at NVP concentrations of 0, 0.1, 0.5, 1.0 and 3.0 μg/ml in PBS pH 7.4. C, control line; T, test line.

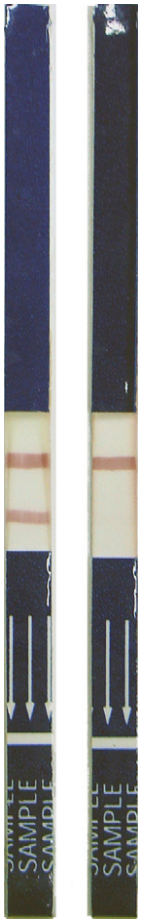


Fig. 8. Evaluation of IC strip with blank human plasma (left strip) and human plasma and spiked with NVP at a concentration of 5.0 μg/ml (right strip).

band at the test line. The intensity of the color faded when the concentrations of NVP were increased. At NVP concentrations of 1.0 and 3.0 μg/ml, no color was observed at the test line. The limit of NVP detection in PBS using the IC strip test was 1.0 μg/ml. The results of the IC strip test could be read within 10 min.

To determine if components in the plasma matrix could interfere with the IC strip test result, human plasma spiked with NVP at a therapeutic drug concentration of 5.0 μg/ml, in addition to blank human plasma were tested. The results showed that NVP could be detected and no interference of the plasma matrix in blank samples was observed (Fig. 8); however, clearly assessment of the strip in plasma samples from HIV-infected patients receiving HAART needs to be conducted.

3.6. Cross reactivity test of the IC strip test

To study the effect of other commonly administered anti-HIV drugs on the IC strip test, twelve other HIV drugs (AZT, 3TC, ddI, ABC, d4T, EFV, IDV, SQV, APV, RTV, NFV and LPV) were tested. A high drug concentration of 10 μg/ml, which is near the maximum concentration achieved in plasma for many of the antiretroviral drugs, was used. The intensity of red-purple color at test line was as the similar to that observed in the absence of NVP (data not shown). This suggested that the presence of these antiretroviral drugs in a test sample will not interfere with the detection of NVP.

4. Conclusion

Herein, we have successfully developed an IC strip test for the rapid detection of NVP. Preliminary results show that it was possible to detect the presence of NVP at a concentration as low as 1.0 μg/ml in PBS, and no cross-reactivity from other commonly administered HIV drugs or components in the human plasma was observed. Following the standard nevirapine 200 mg twice daily dose, plasma nevirapine concentrations range between 3.0 and 10.0 μg/ml, thus the IC test strip should be able to detect NVP concentrations in patients using a NVP based HAART regimen. The established assay is simple and easy to interpret without requirement of any sophisticate instruments. This low cost method could be routinely used in developing countries for drug adherence purposes (potentially including urine specimens) and TDM, and could be extended to other anti-HIV drugs, in particular the protease inhibitors where high interpatient variability has been reported and the use of TDM has been suggested [5]. Overall, this report describes the construction and preliminary assessment of the first immunochromatographic strip test for nevirapine but detailed assessment of this IC strip in plasma samples from HIV-infected patients receiving HAART is needed.

Acknowledgements

This work was supported by the Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UR 174, Program for HIV Prevention and Treatment (PHPT), *i*+MED LABORATORIES, Thailand, and The Thailand Research Fund.

References

[1] F. van Leth, P. Phanuphak, K. Ruxrungtham, et al., Lancet 363 (2004) 1253.
[2] M. Lallemant, G. Jourdain, S. Le Coeur, et al., N. Eng. J. Med. 351 (2004) 217.
[3] D.D. Richman, D. Havlir, J. Corbeil J, et al., J. Virol. 68 (1994) 1660.
[4] A.I. Veldkamp, G.J. Weverling, J.M. Lange, et al., AIDS 15 (2001) 1089.
[5] D. Back, G. Gatti, C. Fletcher, et al., AIDS 16 (Suppl. 1) (2002) 5.
[6] P.W. Hugen, D.M. Burger, R.E. Aarnoutse, et al., Ther. Drug Monit. 24 (2002) 579.
[7] B.S. Kappelhoff, H. Rosing, A.D. Huitema, J.H. Beijnen, J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 792 (2003) 353.
[8] W. Egge-Jacobsen, M. Unger, C.U. Niemann, et al., Ther. Drug Monit. 26 (2004) 546.
[9] J.G. Dubuisson, J.R. King, J.S.A. Stringer, M.L. Turner, C. Bennetto, E.P. Acosta, J. Acquir. Immune Defic. Syndr. 35 (2004) 155.
[10] S. Azoulay, M.C. Nevers, C. Créminon, Antimicrob. Agents Chemother. 48 (2004) 104.
[11] S.H. Paek, C.W. Lee, S.H. Yook, O.H. Kwon, Y.N. Park, Anal. Lett. 32 (1999) 335.
[12] S.H. Paek, S.H. Lee, J.H. Cho, Methods 22 (2000) 53.
[13] D.J. Chiao, R.H. Shyu, C.S. Hu, H.Y. Chiang, S.S. Tang, J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 809 (2004) 37.
[14] Y.J. Cho, D.H. Lee, D.O. Kim, W.K. Min, K.T. Bong, G.G. Lee, J.H. Seo, J. Agric. Food Chem. 53 (2005) 8447.

[15] I.A. Liubavina, A.A. Zinchenko, I.S. Salomatina, A.V. Zherdev, B.B. Dzantiev, Bioorg. Khim. 30 (2004) 201.
[16] B. Johne, K. Hansen, E. Mark, J. Holtlund, J. Immunol. Methods 183 (1995) 167.
[17] W.P. Faulk, G.M. Taylor, Immunochemistry 8 (1971) 1081.
[18] U.K. Laemmli, Nature 227 (1970) 680.
[19] H. Tawbin, T. Stachelin, J. Gordon, Proc. Nat. Acad. Sci. 76 (1979) 4350.
[20] E.P. Acosta, J.R. King, Clin. Infect. Dis. 36 (2003) 373.
[21] M. Turkevich, P.L. Stevenson, J. Hillier, Discuss. Faraday Soc. 11 (1951) 55.
[22] D.B. Williams, C.B. Carter, Transmission Electron Microsc. Diffraction II N.Y. (1996) 265–287.
[23] X. Sun, X. Zhao, J. Tang, Z. Jun, F.S. Chu, Int. J. Food Microbiol. 99 (2005) 185.
[24] JCPDS Powder Diffraction File: Inorganic Phases, International Centre for Diffraction Data, Swarthmore, Pennsylvania, 1985.