

Abstract

A temperature sensitive dopamine-imprinted polymer was prepared in 80% aqueous methanol solution by free-radical crosslinking copolymerisation of methacrylic acid and acrylamide at 60°C in the presence of *N,N*-methylene-bis-acrylamide as the cross-linker and dopamine hydrochloride as template molecule. The resulting molecularly imprinted polymer (MIP) formed temperature responsive materials which could be used for the selective separation of appropriate dopamine and adrenergic compounds from a liquid matrix at ambient temperatures. The thermoresponsive MIP exhibited a swelling-deswelling transition in 80% aqueous methanol solution at about 35°C. The capacity of the thermoresponsive MIP to recognise the template molecule when present in aqueous methanol solution changed with temperature, with the highest selectivity found at 35°C. Additionally, binding parameters obtained from Scatchard analyses indicate that increasing temperature resulted in an increased affinity and binding capacity of specific binding sites, but had less effect on non-selective binding sites. Subsequently, the thermoresponsive MIP was tested for its application as a sorbent material, utilisable in the selective solid-phase extraction (SPE) of dopamine and other adrenergic compounds (epinephrine, isoproterenol, salbutamol and serotonin) from urine samples. It was shown that the compounds that were structurally related to dopamine could be removed by elution, while dopamine and serotonin, the analytes of interest, remained strongly adsorbed to the adsorbent during SPE applications. The thermoresponsive MIP displayed different efficiency in clean-up and enrichments using the SPE protocol at different temperatures.

A dopamine and serotonin molecularly imprinted polymer (DS-MIP) artificial receptor is designed and has been successfully used in fluorescent molecularly imprinted binding polymer assay for ergot binding studies. The dopamine and serotonin which are the printed molecules is bound by the DS-MIP and the ergot analyte

competes with dopamine/serotonin probe for the same binding site. The artificial receptor obtained showed to be highly specific and affinity was similar to natural receptors. A series of ergot derivatives (ergocryptine, ergocornine, ergocristine, ergonovine, agroclavine, pergolide and terguride) has been characterized as to their ligand binding activities with the DS-MIP. The affinity for the dopamine/serotonin binding site of the model ergots was measured by observing the increase of the free dopamine or serotonin in the presence of increasing concentrations of the ergot specie. The utilization of the DS-MIP in a competitive fluorescent ligand binding assay for ergot produced results which were comparable to those obtained using a competitive immunoassay data obtained using dopamine/serotonin receptors derived from the rat hypothalamus. These results indicate the applicability of the assay in characterizing the ligand binding characteristics of ergot derived molecules. The developed assay does not require the separation of free/bound ligands could be used to determine the binding specificities of possible new ergot derivatives.

Keywords: Molecularly imprinted polymer; Dopamine; Serotonin; Ergots; Ligand binding assay; Fluorescent

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ได้เตรียมพอลิเมอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุลโดปามีน (D-MIP) ที่ออกแบบให้มีคุณสมบัติไวต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ จากปฏิกิริยาโคพอลิเมอไรเซชันระหว่างสารผสม methacrylic acid และ acrylamide ซึ่งทำหน้าที่เป็น functional monomers และ N,N' -methylene-bis-acrylamide ทำหน้าที่เป็น cross-linker และใช้โดปามีนเป็นโมเลกุลตัวพิมพ์ ที่อุณหภูมิ 60 °C ในตัวกลางผสมระหว่างเมทานอลและน้ำในสัดส่วน 1:4 พอลิเมอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุลโดปามีนที่เตรียมได้นี้สามารถนำไปใช้ในการแยกโมเลกุลโดปามีนและสารสารอะดีเนอร์จิก (adrenergic agents) ที่อยู่ในสารละลายตัวอย่างที่อุณหภูมิห้องได้อย่างมีความจำเพาะเจาะจง D-MIP สามารถบวมตัว-หดตัวได้ในตัวกลางผสมระหว่างเมทานอล, น้ำ และในตัวกลางผสมระหว่าง methanol และน้ำ D-MIP มีความสามารถจดจำโมเลกุลตัวพิมพ์ได้อย่างจำเพาะเจาะจงสูงสุดเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจนถึงอุณหภูมิ 35 °C จากการตรวจ Binding isotherm และทำ Scatchard analysis ซึ่งให้เห็นว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นมีผลทำให้ค่าสัมพันธภาพ (K_d) และปริมาณการจับ (B_{max}) ของ High-affinity binding site ของรีเซพเตอร์เพิ่มขึ้น แต่การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิจะไม่มีผลต่อ non-specific binding site ของรีเซพเตอร์ จากการประยุกต์ใช้พอลิเมอร์ D-MIP เป็นตัวดูดซับของคอลัมน์ SPE (solid phase extraction) เพื่อแยกโมเลกุลโดปามีนและสารอะดีเนอร์จิกอื่นๆ จากตัวอย่างปัสสาวะ สารประกอบที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับตัวพิมพ์ถูกชะออกจากคอลัมน์ SPE ขณะที่โมเลกุลโดปามีนและซีโรโทนินยังคงถูกดูดซับไว้ในคอลัมน์ และการสกัดที่อุณหภูมิใกล้เคียง 35 °C ให้ค่า recovery ของการสกัดดีกว่าอุณหภูมิอื่น ๆ จึงแสดงให้เห็นว่า D-MIP มีคุณสมบัติไวต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ โดยใช้งานใน SPE มีประสิทธิภาพในการ clean-up สารสารอะดีเนอร์จิก และโมเลกุลตัวพิมพ์ประทับ ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน

นอกจากนี้ได้เตรียมพอลิเมอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุลของโดปามีนและซีโรโทนิน (DS-MIP) เพื่อใช้เป็นรีเซพเตอร์เลียนแบบของโดปามีนและซีโรโทนินรีเซพเตอร์ ในการศึกษาสัมพันธภาพของสารในกลุ่มเออร์กอต (ergots) กับโดปามีนและซีโรโทนินรีเซพเตอร์ เนื่องจากรีเซพเตอร์เลียนแบบนี้มีรอยพิมพ์โมเลกุลของทั้งโดปามีนและซีโรโทนิน สารเออร์กอตจะแข่งขันกับโดปามีนหรือซีโรโทนินจับที่ตำแหน่งของการจับยาเดียวกัน พอลิเมอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุลของโดปามีนและซีโรโทนินที่สังเคราะห์ขึ้นนี้มีความจำเพาะเจาะจงสูงต่อโมเลกุลโดปามีนและซีโรโทนิน และมีการเลือกจดจำต่อสารที่มีโครงสร้างใกล้เคียงโดปามีนและซีโรโทนินได้บ้างเล็กน้อย เมื่อทำการตรวจลักษณะการจับกับรีเซพเตอร์ระหว่างสาร ergot alkaloids หลาย ๆ ชนิดซึ่งได้แก่ ergocryptine, ergocornine, ergocristine, ergonovine, agroclavine, pergolide และ terguride) ด้วยวิธี competitive fluorescent molecularly imprinted polymer ที่ใช้ DS-MIP เป็นรีเซพเตอร์ และใช้โดปามีนและซีโรโทนินเป็นโมเลกุลลาโพรบ (molecular probe) และทำการวัดค่าสัมพันธภาพ (K_d) ระหว่างสารเออร์กอตกับ ตำแหน่งของการจับยาของโมเลกุลโดปามีนหรือซีโรโทนิน โดยการวัดปริมาณโดปามีนหรือซีโรโทนินอิสระในสารละลายที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันของ ergot alkaloids จากการเปรียบเทียบค่าสัมพันธภาพ (K_d) ที่ได้จากการวิเคราะห์กับพอลิเมอร์ DS-MIP พบว่ามีความสอดคล้องกับค่าสัมพันธภาพ (K_d) ที่ได้จากการทำ competitive immunoassay กับรีเซพเตอร์ธรรมชาติที่ได้จากไฮโปทาลามัสของหนู การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าเทคนิค competitive fluorescent ligand binding assay กับพอลิเมอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุลของโดปามีนและซีโรโทนิน ก็เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ในการตรวจคุณสมบัติการจับรีเซพเตอร์โดปามีนและซีโรโทนินของสารอนุพันธ์เออร์กอตใหม่ๆ ได้ และวิธี competitive fluorescent ligand binding assay ที่พัฒนาขึ้นนี้ไม่จำเป็นต้องทำการแยกไลแกนด์อิสระและไลแกนด์ที่จับกับรีเซพเตอร์ออกจากกันก่อนการวิเคราะห์

กฤษฎา: พอลิเมอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุล; โดปามีน; ซีโรโทนิน; เอเอกอต; รีเซพเตอร์