Thesis Title Synthesis of Molecular Imprinted Polymers for Nevirapine Detection

Author Mr. Singha Komkham

Degree Master of Science (Chemistry)

Thesis Advisor Dr. Mookda Pattarawarapan

ABSTRACT

Nevirapine (NVP) is a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor which is widely used for the treatment of HIV infected patients. Maintaining sufficient NVP plasma drug levels is critical to reduce the risk of drug resistance and treatment failure. Although HPLC is generally applied for drug monitoring purpose, the technique which is often laborious, require highly specialized technicians and expensive instruments. Alternative simple, cheap and reliable methods for NVP detection are therefore needed, particularly in resource-limited settings.

Molecular imprinted polymer (MIP) is a polymeric material which can bind selectively to the compound of interest. Due to its ease of preparation and its stability, attempts in using MIP as a recognition element in place of biological antibody in drug monitoring assays have gradually increased. In this study, a series of MIPs were synthesized and their binding characteristics were investigated. Finally,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

the suitable MIP candidates that bind to NVP selectively with high affinity were used to develop an enzyme-link immunosorbent assay for NVP detection.

In preliminary experiments, nicotinamide (NAM) was used as the template molecule in MIP syntheses due to its structural similarity to NVP. NAM-imprinted polymers (P1-P11) were synthesized by bulk and precipitation polymerization methods by varying the type and ratio of functional monomers, crosslinkers and porogens. These polymers were screened for their binding activity toward NAM by UV rebinding experiments. The result showed that the methacrylic acid and itaconic acid are the best among other functional monomers while ethylene glycol dimethacrylate and trimethylopropane trimethacrylate are suitable for crosslinkers, when CH_2Cl_2 and a solvent mixture (tetrahydrofuran : methanol : water) were used as porogens. MIPs obtained showed better binding abilities, as deduced from the binding of P3, P4, P8 and P11.

The same conditions used in preparing the best NAM-imprinted polymers were adopted in the synthesis of MIPs using nevirapine as the template. Thus, NVP-imprinted polymers (P12-P16) were synthesized by bulk and precipitation polymerization methods. The UV binding study showed that P15 synthesized under the same condition as P11 exhibited the best binding ability to NVP in both organic and aqueous medium.

SEM technique was used to study the morphology of polymeric particles obtained from bulk and precipitation polymerization. The SEM micrographs showed the particles obtained from bulk method is irregular in shape with the size range of 5–15 μm. The particles from precipitation method are densely fused microspheres in the size of 100-200 nm.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

The selectivities of polymers P11 and P15 were evaluated by UV binding of their templates and other structurally related compounds. The results showed that P11 exhibited high selectivity for NVP compared with the other tested compounds whereas P15 showed high percent bound to NVP but also bound to NAM. This may be due to structural similarity of NAM and NVP in which NAM structure is actually part of NVP structure.

Finally, the polymer P11 and P15 were used to develop an enzyme-linked immunoassay for NVP detection. The antigen NVP was labeled with HRP enzyme and the colorimetric reaction of TMB was used for detection. The calibration curves were obtained corresponding to NVP concentrations ranging from 10-300 and 100-400 μg/ml for using P11 and P15, respectively.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การสังเคราะห์โมเลกุลาร์อิมพรินเทดพอลิเมอร์เพื่อการตรวจหานีวิราพีน

ผู้เขียน นายสิงหา คมขำ

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เคมี)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร. มุกดา ภัทราวราพันธ์

บทคัดย่อ

นีวิราพีน (เอ็นวีพี) เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์รีเวอร์สทรานสคลิปเทสชนิดนอนนิวคลิโอไซด์ที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายสำหรับรักษาผู้ป่วยติดเชื้อเอชไอวี การรักษาระดับของยาในพลาสมาให้เพียงพอเป็นสิ่งสำคัญที่จะลดความเสี่ยงของการดื้อยาและความล้มเหลวในการรักษา แม้ว่าปกติเทคนิคโครมาโทรกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงจะถูกประยุกต์ใช้ในการติดตามปริมาณยา อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้มักจะทำได้ยาก ต้องการนักเทคนิคที่มีความชำนาญเฉพาะด้านและเครื่องมือที่มีราคาแพง ดังนั้นวิธีการตรวจหานีวิราพีนที่ง่าย ราคาถูกและน่าเชื่อถือจึงเป็นสิ่งที่ต้องการโดยเฉพาะอย่างยิ่งในที่ที่มีทรัพยากรอย่างจำกัด

โมเลกุลาร์อิมพรินเทดพอลิเมอร์ (เอ็มไอพี) เป็นวัสดุพอลิเมอร์ซึ่งสามารถจับได้อย่างจำเพาะกับสารที่สนใจ เนื่องจากเตรียมได้ง่ายและมีความเสถียร ทำให้มีความพยายามในการใช้เอ็มไอพีเป็นส่วนตรวจวัดเพื่อใช้แทนที่แอนติบอดีในการตรวจวัดการติดตามปริมาณยามีมากขึ้น ในการศึกษานี้ได้สังเคราะห์เอ็มไอพีและทดสอบความสามารถการจับกับสารโมเลกุลต้นแบบ จากนั้นเอ็มไอพีที่เหมาะสมซึ่งสามารถจับกับนีวิราพีนได้อย่างจำเพาะด้วยสัมพรรคภาพที่สูงจะถูกใช้เพื่อพัฒนาวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์บเบนท์แอสเซย์ เพื่อใช้ในการตรวจหานีวิราพีน

ในการทดลองเบื้องต้น นิโคตินาไมด์ถูกใช้เป็นสารโมเลกุลต้นแบบในการสังเคราะห์เอ็มไอพี เนื่องจากมีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกับนีวิราพีน นิโคตินาไมด์-อิมพรินเทดพอลิเมอร์ (พี 1 - พี 11) ถูกสังเคราะห์โดยวิธีพอลิเมอร์ไรเซชันแบบบัลค์และแบบตกตะกอนโดยเปลี่ยนแปลงชนิดและอัตราส่วนของฟังก์ชันนัลมอนอเมอร์ ครอสลิงเกอร์และตัวทำละลาย พอลิเมอร์ทั้งหมดถูกคัดสรรความสามารถในการจับกับนิโคตินาไมด์โดยการทดสอบการจับของนิโคตินาไมด์กับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

พอลิเมอร์ด้วยเทคนิคอัลตราไวโอเลตสเปกโทรสโกปี ผลการทดลองพบว่าเมทาคริลิคแอซิดและอิทาโคนิคแอซิดให้ผลดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับฟังก์ชันนัลมอนอเมอร์ตัวอื่น ในขณะที่เอทิลลีนไกลคอลไดเมทาคริเลทและไตรเมทิลโลโพรเพนไตรเมทาคริเลทเป็นครอสลิงเกอร์ที่เหมาะสม เมื่อใช้ไดคลอโรมีเทนและสารละลายผสมของเตตระไฮโดรฟิวแรน เมทานอลและน้ำเป็นตัวทำละลาย พอลิเมอร์ที่ได้มีความสามารถการจับได้ดีซึ่งสรุปได้จากพอลิเมอร์ พี 3 พี 4 พี 8 และพี 11

สภาวะที่ดีที่สุดที่ใช้ในการเตรียมนิโคตินาไมด์-อิมพรินเทดพอลิเมอร์ถูกนำมาใช้ในการสังเคราะห์เอ็มไอพีซึ่งใช้นีวิราพีนเป็นโมเลกุลต้นแบบ ดังนั้นจึงได้สังเคราะห์นีวิราพีน-อิมพรินเทดพอลิเมอร์ (พี 12 - พี 16) โดยวิธีพอลิเมอร์ไรเซชันแบบบัลค์และแบบตกตะกอน จากการศึกษาการจับของนีวิราพีนกับพอลิเมอร์ด้วยเทคนิคอัลตราไวโอเลตสเปกโทรสโกปี แสดงให้เห็นว่าการสังเคราะห์ภายใต้สภาวะเดียวกันกับพี 11ให้พอลิเมอร์ที่แสดงความสามารถการจับกับนีวิราพีนได้ดีที่สุด ทั้งในตัวกลางอินทรีย์และตัวกลางที่เป็นน้ำ

เทคนิคกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราดใช้เพื่อศึกษาลักษณะรูปร่างของพอลิเมอร์ที่ได้จากวิธีแบบบัลค์และแบบตกตะกอน ภาพที่ได้จากเทคนิคนี้แสดงให้เห็นว่าพอลิเมอร์ที่ได้จากวิธีการสังเคราะห์แบบบัลค์มีลักษณะที่ไม่สม่ำเสมอและมีขนาดอยู่ในช่วง 5-15 ไมโครเมตร และพอลิเมอร์ที่ได้จากวิธีการสังเคราะห์แบบตกตะกอนมีลักษณะเป็นไมโครสเฟียร์ที่เชื่อมต่อกันอย่างหนาแน่น ซึ่งมีขนาด 100-200 นาโนเมตร

ความจำเพาะของพอลิเมอร์พี 11 และพี 15 ได้ถูกทดสอบโดยเปรียบเทียบการจับของพอลิเมอร์กับโมเลกุลต้นแบบกับสารประกอบอื่นๆที่มีโครงสร้างสัมพันธ์กัน ผลการทดลองพบว่าพี 11 แสดงความจำเพาะสูงกับนีวิราพีนเมื่อเปรียบเทียบกับสารตัวอื่น ในขณะที่พี 15 สามารถจับได้กับนีวิราพีนและนิโคตินาไมด์ เนื่องมาจากความคล้ายกันของโครงสร้างของทั้งสองโมเลกุล ซึ่งโครงสร้างของนิโคตินาไมด์เป็นส่วนหนึ่งของโครงสร้างนีวิราพีน

พอลิเมอร์พี 11 และพี 15 ถูกใช้เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจหานีวิราพีนโดยวิธีเอนไซม์ลิงค์-อิมมูโนแอสเซย์ นีวิราพีนแอนติเจนถูกติดฉลากด้วยเอนไซม์ฮอร์สแรดิสเปอร์ออกซิเดส (เอชอาร์พี) และปฏิกิริยาการเกิดสีของทีเอ็มบีถูกใช้เป็นตัวติดตามปฏิกิริยา กราฟมาตรฐานที่ได้สัมพันธ์กับความเข้มข้นของนีวิราพีนในช่วง 10-300 และ100-400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้พี11 และพี 15 ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved