SYNTHESIS OF BIOACTIVE COPPER PYRIDINE COMPLEXES AND PREPARATION OF NANOPARTICLES FOR BIOSEPARATION

THUMMARUK SUKSRICHAVALIT 4738067 MTMT/D

Ph.D. (MEDICAL TECHNOLOGY)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: VIRAPONG PRACHAYASITTIKUL, Ph.D., CHARTCHALERM ISARANKURA-NA-AYUDHYA, Ph.D., THEERAPHON PIACHAM, Ph.D.

ABSTRACT

The reactive oxygen species is the most radical species of free radicals in biological systems which causes damage to DNA, proteins, and lipids. Therefore, free radical scavengers (such as vitamin E, glutathione, flavonoids, superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase, and more) are essential to prevent abnormalities caused by oxidative stress. Because of this, antioxidants have been studied in attempts to find new antioxidants, to improve antioxidant activity, and to develop extraction yield as well as extraction processes. Our studies herein report the synthesis of antioxidant molecules based on copper pyridine complexes and the extraction of materials for antioxidants by molecularly imprinted polymer (MIP) and clicked boronic acid affinity Sepharose. Copper complexes of nicotinic acid (vitamin B3) with general metabolites were successfully synthesized. All complexes were characterized as tetragonally distorted geometries. The complexes exhibited superoxide-scavenging activity also known as SOD mimic. The SOD activities of the complexes were in the range of 34.42-130.20 µM. The best SOD mimic was the copper complex of nicotinic acid with phthalic acid. Moreover, the complexes also demonstrated having antimicrobial activity against B. subtilis ATCC 6633 and C. albicans ATCC 90028 with an MIC range of 128-256 µg/mL. A computer simulation was also applied to study the correlation between quantum chemical parameters and SOD activity. The results showed that the SOD activities of the complexes were well correlated with electron affinity (EA), highest occupied molecular orbital (HOMO) energy, and lowest unoccupied molecular orbital (LUMO) energy. In addition, this thesis also developed an extraction method based on molecularly imprinted polymer (MIP) for antioxidant separation. The MIP was used to generate binding pockets in the polymers by providing a specific cavity for tocopherol (vitamin E) and tocopherol acetate. The imprinted polymers for tocopherol (MIP-TP) and tocopherol acetate (MIP-TPA) were successfully prepared by using a bulk polymerization method. Moreover, tocopherol-imprinted polymer (MIP-TP) was also synthesized by the precipitation polymerization method. The MIP-TP displayed a two-fold greater binding capacity than the corresponding non-imprinted polymer and also exhibited specific binding with tocopherol as compared to MIP-TPA. While MIP-TP nanospheres were able to bind to the tocopherol template approximately 1.22-1.57 times greater as compared to the non-imprinted polymer, the highest binding capacity of the nanospheres was 1.85 times greater than the imprinted and non-imprinted polymer in the optimal rebinding solvent of ethanol:water (8:2, v/v). Furthermore, novel clicked affinity ligand based on boronic acid was successfully synthesized. The ligand was coupled to azide-functionalized Sepharose using a Cu(I)-catalyzed 1,3-cycloaddition reaction called click reaction. In this thesis, two common glycoproteins: ovalbumin and ribonuclease B (RNase B), were used as models of glycosylated and glycated biomolecules. Compared to unmodified Sepharose, the new clicked Sepharose showed good efficiency for glycoprotein separation in the presence of non-glycoproteins: bovine serum albumin (BSA), RNase A and crude bacterial proteins. The SOD mimics are expected to be useful as potential candidates for antioxidative therapeutics. The methods for bioseparation present an effective model for extracting antioxidants.

KEY WORDS: SUPEROXIDE DISMUTASE MIMIC/ NICOTINIC ACID/ MOLECULARLY IMPRINTED POLYMER/ VITAMIN E/ CLICK CHEMISTRY/ BORONIC ACID/ GLYCOPROTEIN

166 pages

การสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนโลหะของคอปเปอร์ด้วยอนุพันธ์ของไพริดีนที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพและการเตรียมโมเลกุลขนาดนาโนเพื่อใช้ในการแยกสารทางชีวภาพ

SYNTHESIS OF BIOACTIVE COPPER PYRIDINE COMPLEXES AND PREPARATION OF NANOPARTICLES FOR BIOSEPARATION

ธรรมรักษ์ สุขศรีชวลิต 4738067 MTMT/D

ปร.ด. (เทคนิคการแพทย์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : วีระพงศ์ ปรัชชญาสิทธิกุล, Ph.D., ฉัตรเฉลิม อิศรางกูร ณ อยุธยา, Ph.D., ธีรพล เปียฉ่ำ, Ph.D.

บทคัดย่อ

อนุมูลอิสระกลุ่มออกซิเจน เป็นกลุ่มของอนุมูลอิสระที่พบมากที่สุดในระบบของสิ่งมีชีวิต แล้วยังเป็นสาเหตุให้เกิดความเสีย หายของดีเอ็นเอ โปรตีน และไขมัน ดังนั้นสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น วิตามินอี กลูตาไทโอน เอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมูเตส เอนไซม์กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส เป็นต้น ถือว่าเป็นสิ่งจำเป็นที่ช่วยป้องกันความผิดปกติที่เกิดจากอนุมูลอิสระ ด้วยสาเหตุนี้สารต้านอนุมูลอิสระถูกนำมาศึกษาอย่างต่อเนื่อง เพื่อหาสารชนิดใหม่ๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระและเพื่อพัฒนาวิธีการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระ ก็ยังคงมีการศึกษาวิจัยอยู่จนถึงปัจจุบันในการศึกษาครั้งนี้ เราได้ทำการสังเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระจากสารประกอบเชิงซ้อนโลหะคอปเปอร์ของอนุพันธ์ไพริดีน และยังพัฒนากระบวนการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจาก 2 วิธีคือ โมเลกุลเชิงซ้อนที่มีคุณสมบัติจับจำเพาะ และโมเลกุลจับจำเพาะของอนุพันธ์กรดโบโรนิก ส่วนแรกของการศึกษาเราประสบความสำเร็จในการสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนโลหะคอปเปอร์ ของกรดนิโคตินิกหรือวิตามินบีสาม กับสารทั่วไปที่พบในกระบวนการสันดาบในร่างกาย หลังการวิเคราะห์พบว่าสารประกอบที่สังเคราะห์มีโครงสร้างเป็นปิรามิดฐานสามเหลี่ยม สารประกอบเชิงซ้อนดังกล่าวถูกพบว่ามีฤทธิ์ในการกำจัดซุปเปอร์ออกไซด์หรือสามารถเรียกได้อีกอย่างหนึ่งว่า มีฤทธิ์เสมือนเอนไซด์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมูเตส โดยฤทธิ์ในการกำจัดซุปเปอร์ออกไซด์ของสารประกอบเชิงซ้อนที่สังเคราะห์ได้อยู่ในช่วง 34.42-130.20 ไมโครโมลาร์ สารประกอบเชิงซ้อนโลหะคอปเปอร์ที่มีฤทธิ์กำจัดซุปเปอร์ ออกไซด์ได้ดีที่สุดคือสารประกอบเชิงซ้อนโลหะคอปเปอร์ของกรดนิโคตินิกกับกรดทาริก นอกจากนี้สารประกอบเชิงซ้อนโลหะที่สังเคราะห์ได้ยังมีฤทธิ์ ต้านจุลชีพ *B. subtilis* ATCC 6633 และ *C. albicans* ATCC 90028 ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้ที่ 128-256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจากนั้นฤทธิ์ในการกำจัดซุปเปอร์ออกไซด์ของสารประกอบเชิงซ้อนโลหะคอปเปอร์ยังถูกนำมาศึกษาปัจจัยต่อฤทธิ์ โดยใช้เทคนิคทางคอมพิวเตอร์ขั้นสูง ผลการทดลองพบว่าฤทธิ์ในการกำจัดซุปเปอร์ออกไซด์ของสารประกอบเชิงซ้อนโลหะคอปเปอร์ มีความสัมพันธ์กับอัตราการรับอิเล็กตรอนของโลหะ พลังงาน HOMO และพลังงาน LUMO งานวิจัยครั้งนี้ยังพัฒนาวิธีการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระคือ วิตามินอี และ อนุพันธ์ของวิตามินอี ด้วยวิธีการสังเคราะห์โมเลกุลเชิงซ้อน ที่มีคุณสมบัติจับจำเพาะ การสังเคราะห์โมเลกุลเชิงซ้อนดังกล่าวถูกเตรียมขึ้นจาก 2 วิธีคือ วิธีดั้งเดิม bulk และวิธีการตกตะกอน เพื่อให้ได้โมเลกุลเชิงซ้อนที่เป็นทรงกลมขนาดนาโนเมตร โมเลกุลเชิงซ้อนจับจำเพาะของวิตามินอีและของอนุพันธ์ของวิตามินอี ที่เตรียมจากวิธี bulk ให้ความสามารถในการจับจำเพาะกับวิตามินอีเป็น 2 เท่าของตัวควบคุม ขณะที่โมเลกุลเชิงซ้อนจับจำเพาะของวิตามินอี ทรงกลมขนาดนาโนเมตร สามารถจับจำเพาะกับวิตามินอีได้ 1.22-1.57 เท่าของตัวควบคุม และสามารถจับกับวิตามินอีได้สูงสุดที่ 1.85 เท่าในสารละลายผสมของแอลกอฮอล์กับน้ำ สัดส่วน 8:2 วิทยานิพนธ์ฉบับ นี้ในส่วนสุดท้าย เรายังศึกษาโมเลกุลจับจำเพาะของกรดโบโรนิก ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ได้ประสบความสำเร็จในการสังเคราะห์อนุพันธ์ของกรดโบโรนิก จากนั้นก็นำมาทำปฏิกิริยากับหมู่ azide ที่ตรึงอยู่บนโมเลกุลของเซฟฟาโรส ด้วยปฏิกิริยาเคมีคริ๊ก ในการศึกษาครั้งนี้ไกลโคโปรตีน 2 ชนิดคือ โอวอลบูมิน และเอนไซม์อาเอนเอสบี ถูกนำมาใช้เพื่อเป็นตัวแทนของสารไกลโคซิลเลสโมเลกุล และ สารไกลเคสโมเลกุล ผลการทดสอบความสามารถในการจับ จำเพาะกับไกลโคโปรตีน พบว่าสามารถแยกไกลโคโปรตีนออกจากโปรตีนที่ไม่ใช่ไกลโคโปรตีน คือ โบไวด์ซีรัมอัลบูมิน เอนไซม์อาเอนเอสเอ และ โปรตีนจากแบคทีเรีย จากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สารสังเคราะห์ที่มีคุณสมบัติเสมือนเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ และ กระบวนการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระ แสดงให้เห็นถึงตัวอย่างที่มีประสิทธิภาพ และคาดว่าน่าจะถูกนำมาใช้เป็นทางเลือกเพื่อการรักษา รวมถึงเพื่อใช้ในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระ

166 หน้า