

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5980063

ชื่อโครงการ: อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษแบบประหยัด สำหรับการวัดฤทธิ์ของไซโตโครม พี 450

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นันทนา นุชถาวร
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

อีเมล: nantana.nuc@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

บทคัดย่อ:

อุปกรณ์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษเป็นอุปกรณ์การวิเคราะห์ที่พกพาได้และราคาถูกใช้สำหรับการวิเคราะห์เชิงปริมาณและคุณภาพของสารได้หลายประเภท ในโครงการวิจัยนี้สร้างอุปกรณ์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษรูปแบบไมโครเฟลท 96 หลุมโดยวิธีการพิมพ์ด้วยหมึกซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และราคาถูก ใช้สำหรับการศึกษาฤทธิ์ของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ไอโซไซม์ 3A4 (CYP3A4) โดยใช้ resorufin benzyl ether เป็นสารตั้งต้นที่ทำให้เกิดฟลูออเรสเซนซ์ เนื่องจาก CYP3A4 เป็นไอโซไซม์ที่มีปริมาณมากที่สุดของ CYP450 และเกี่ยวข้องกับการเกิดอันตรกิริยาระหว่างยาที่สำคัญทางคลินิก ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาผลของสารที่มีศักยภาพในการเป็นยาต่อการออกฤทธิ์ของเอนไซม์ CYP3A4 ในช่วงต้นของการค้นพบยา เพื่อหลีกเลี่ยงไม่ให้เกิดอันตรกิริยากับเอนไซม์ สภาวะที่เหมาะสมในการทดลอง ได้แก่ โพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ (pH 7.4) ที่ประกอบด้วย dithiothreitol 0.1 มิลลิโมลาร์ NADPH 1.3 มิลลิโมลาร์ และ poloxamer188 ร้อยละ 0.02 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที การวัดฤทธิ์ของ CYP3A4 บนอุปกรณ์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษทำโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์และตรวจวัดความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ด้วยการถ่ายภาพและวิเคราะห์โดย ImageJ ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเฟลท นอกจากนี้ CYP3A4 ยังถูกตรึงไว้ในโซลเจลก่อนนำไปเคลือบบนอุปกรณ์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ ซึ่งช่วยเพิ่มความคงตัวของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสได้ถึง 3 สัปดาห์ โดยที่ยังมีฤทธิ์ร้อยละ 86.8 ซึ่งมีความคงตัวสูงกว่าเอนไซม์รูปแบบอิสระที่มีฤทธิ์เหลือเพียงร้อยละ 14.9 สำหรับขีดจำกัดการตรวจหาปริมาณมีค่าเท่ากับ 0.71 ไมโครโมลาร์และมีความแม่นยำที่ดี (ความเบี่ยงเบนสัมพัทธ์น้อยกว่าร้อยละ 5.2) วิธีที่พัฒนาขึ้นเป็นวิธีที่ง่าย ราคาถูก (น้อยกว่า 3 บาทต่อชิ้น) พกพาได้และจัดเป็นเคมีวิเคราะห์สีเขียว นอกจากนี้ได้วิธีนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์ รวมถึงการประเมินผลของยาและสารสกัดพืชสมุนไพรที่มีต่อการออกฤทธิ์ของเอนไซม์ วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้จะประโยชน์อย่างยิ่งในการประเมินสารที่มีศักยภาพเป็นยาใหม่

คำหลัก: อุปกรณ์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ ไซโตโครม พี450 โซลเจล จลนศาสตร์ของเอนไซม์ การค้นพบยา

Abstract

Project Code: MRG5980063

Project Title: Low-cost paper-based microfluidic devices for measurement of CYP450 activity

Investigator: Assistant Professor Nantana Nuchtavorn
Faculty of Pharmacy, Mahidol University

E-mail Address: nantana.nuc@mahidol.ac.th

Project Period: 2 years

Abstract:

Paper-based microfluidic devices (μ PADs) have emerged as inexpensive and portable analytical platforms for achieving qualitative and quantitative measurements of various analytes. Fabrication of μ PADs using wax printing method addresses well the simple, rapid and low-cost fabrication. A μ PAD design featuring a 96-well plate format was developed for the study of CYP450 subtype 3A4 (CYP3A4) activity using resorufin benzyl ether as a fluorogenic substrate. Since CYP3A4 is the most abundantly expressed CYP450 isozymes and it has also been involved in clinically significant drug-drug interaction. Thus, incorporation of CYP3A4 enzyme screening at an early stage of drug discovery is preferable in order to avoid drug interactions. The optimal condition for enzymatic assay was in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) containing 0.1 mM dithiothreitol, 1.3 mM NADPH and 0.02% poloxamer188, incubated at 37°C for 30 min. Measurement of CYP3A4 activity on μ PADs format using handheld fluorescence microscope and the fluorescence intensity can be accurately quantified by taking a photo of the test zone and measuring the intensity by image analysis freeware (ImageJ). The method provided comparable results with those obtained from microplate reader. Furthermore, CYP3A4 was immobilized in sol-gel and coated on μ PADs. The immobilized enzyme was stable for 3 weeks (activities of 86.8%) at 4°C, which offered an increased storage stability comparing to the free solution (activities of 14.9%). The limit of quantitation was 0.71 μ M with good precision (RSDs < 5.2%). The developed μ PADs provide simplicity, low cost (cost~3 Baht/ μ PAD) and portability and approaches green analytical chemistry. The method was successful applied for enzyme kinetic study and assessment of drugs and herbal extracts in the alteration of CYP3A4 activity. Finally, it would be useful for assessment of potential new drug candidates.

Keywords: paper-based microfluidic devices, cytochrome P450, sol-gel, enzyme kinetic, drug discovery