



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษแบบประหยัด
สำหรับการวัดฤทธิ์ของไซโตโครม พี 450

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

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นันทนา นุชถาวร

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษแบบประหยัด
สำหรับการวัดฤทธิ์ของไซโตโครม พี 450

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

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นันทนา นุชถาวร
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และ มหาวิทยาลัยมหิดล

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

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

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	i
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ii
สารบัญตาราง	iii
สารบัญรูปภาพ	iv
บทสรุปผู้บริหาร	1
• ที่มาและความสำคัญของปัญหา-ทบทวนวรรณกรรม	1
• วัตถุประสงค์	4
• วิธีทดลอง	5
• แผนการดำเนินงาน	11
ผลการทดลอง	12
• การพัฒนาวิธีวิเคราะห์	12
• การประเมินความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์	15
• การพัฒนาตำรับ sol-gel และการ immobilize เอนไซม์ลงใน sol-gel	15
• การศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ที่ immobilize ใน sol-gel	20
• การประยุกต์ใช้วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น	21
สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต	22
เอกสารอ้างอิง	24
Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.	26
ภาคผนวก	27

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตัวยับยั้งและตัวเหนี่ยวนำสำหรับการทดลองในหลอดทดลอง	2
2	สารตั้งต้นเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์สำหรับการประเมินฤทธิ์ของเอนไซม์ CYP3A4 ในหลอดทดลอง และความยาวคลื่นกระตุ้น/ปลดปล่อย (excitation/emission wavelength) ของเมแทบอลิต์	3
3	ปัจจัยที่ศึกษาสำหรับการหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์	6
4	แผนการดำเนินงานและผลผลิตที่คาดว่าจะได้รับ	11
5	ความเข้ากันระหว่างตัวทำละลายต่างๆกับไมโครเพลทบนแผ่นกระดาษ	13
6	ความสัมพันธ์เส้นตรง	15
7	ความแม่นยำของการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน	15
8	การพัฒนาตำรับ sol-gel	17

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
1	การออกแบบไมโครเฟลททบนแผ่นกระดาษแบบ 96 หลุม	5
2	การออกแบบฐานใส่ไมโครเฟลททบนแผ่นกระดาษแบบ 96 หลุม	6
3	เมแทบอลิซึมของเอนไซม์ CYP3A4 โดยใช้ resorufin benzyl ether เป็นสารตั้งต้น	7
4	การวิเคราะห์บนอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษที่ตรวจวัดด้วย การถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์	8
5	การเก็บรักษาอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษที่เคลือบด้วย sol- gel ที่มีการ immobilize เอนไซม์ในภาชนะปิดสนิทที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	9
6	Lineweaver-Burk plot	11
7	ไมโครเฟลททบนแผ่นกระดาษแบบ 96 หลุม ที่พิมพ์ด้วยหมึกพิมพ์สีฟ้า และฐาน อะคริลิก	12
8	การศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์บนไมโครเฟลททบนแผ่นกระดาษด้วย เครื่องอ่านปฏิกิริยาในไมโครเฟลท	14
9	ลักษณะการเกิดเจล 4 ระดับ: 1) ไม่เกิดการก่อเจล (no detectable gel formed) 2) เจลเนื้อเหลวและไหลตามภาชนะบรรจุ (flowing gel) 3) เจลไม่ไหลไหลตามภาชนะ บรรจุ (non-flowing gel) 4) เจลเนื้อแข็ง (rigid gel)	16
10	การศึกษาคูณลักษณะเอนไซม์ใน sol-gel ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่อง ผ่าน	18
11	การศึกษาคูณลักษณะเอนไซม์ใน sol-gel ที่เคลือบบนกระดาษด้วยกล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด	19
12	ลักษณะภายนอกของ 1) เอนไซม์รูปแบบอิสระที่หยดลงบนอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ 2) เอนไซม์ที่ immobilize ลงใน sol-gel หลังจากเคลือบ ลงบนอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ	20
13	ความคงตัวของเอนไซม์รูปแบบอิสระและเอนไซม์ที่ immobilize ใน sol-gel สัปดาห์ที่ 0-8	20
14	Lineweaver-Burk plot ของเอนไซม์ CYP3A4 ที่ immobilize ใน sol-gel และนำไป เคลือบบนกระดาษ	22

บทสรุปผู้บริหาร (executive summary)

1. ที่มาและความสำคัญของปัญหา-ทบทวนวรรณกรรม

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ไซโตโครม พี 450 (CYP450) ในร่างกายมนุษย์เป็นเอนไซม์หลักในการเมแทบอลิซึม เฟส 1 ที่เกิดขึ้นในตับ ซึ่งใช้ในกระบวนการเปลี่ยนแปลงสารต่างๆจากภายนอก (xenobiotics) ที่เข้าสู่ร่างกาย เช่น ยารักษาโรค พืชสมุนไพร (medicinal plant) สารเคมี เป็นต้น CYP3A4 เป็นไอโซไซม์ (isoenzyme) ของ CYP450 ที่มีปริมาณมากที่สุดและเกี่ยวข้องกับการเกิดอันตรกิริยาระหว่างยา พืชสมุนไพรและยา ซึ่งนำไปสู่การเกิดอาการไม่พึงประสงค์ การออกฤทธิ์ของยาที่สูงขึ้นหรือลดลงกว่าปกติ เช่น การให้ยา cisapride ที่เกิดเมแทบอลิซึมโดย CYP3A4 ร่วมกับ ketoconazole ซึ่งเป็นตัวยับยั้ง CYP3A4 จะทำให้เกิดอันตรกิริยาระหว่างยาและมีอาการไม่พึงประสงค์ที่เป็นพิษต่อหัวใจ (cardiotoxicity) ตามมา ดังนั้น จึงควรมีการศึกษาผลของสารที่มีศักยภาพในการเป็นยา (drug candidates) ต่อการออกฤทธิ์ของเอนไซม์ CYP3A4 ในช่วงต้น (early stage) ของการค้นพบยา (drug discovery) เพื่อหลีกเลี่ยงไม่ให้เกิดอันตรกิริยากับเอนไซม์ [1, 2] โดยสามารถทำการทดลองในหลอดทดลอง (*in vitro*) เบื้องต้นก่อน เพื่อนำผลการทดลองที่ได้ไปใช้ในการออกแบบการศึกษาอันตรกิริยาของยาทางคลินิก [3]

อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ (paper-based microfluidic analytical devices, μ PADs) เป็นระบบการวิเคราะห์ขนาดเล็กที่จัดเป็นเทคโนโลยีสีเขียว (green technology) และได้รับความสนใจเป็นอย่างสูง จึงมีการนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์สารหลากหลายประเภท เช่น การตรวจการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ ซี (hepatitis C virus) [4] ในเตรทและไนโตรที่ในน้ำดื่มและสิ่งแวดล้อม [5] แลคโตเฟอริน (lactoferrin) ในน้ำตา [6] เป็นต้น เทคนิคนี้มีข้อดี คือ ราคาถูก พกพาได้ (portable) ใช้สารตัวอย่างและตัวทำละลายปริมาณน้อย นอกจากนี้กระดาษที่นำมาใช้ในการสร้างระบบของไหลจุลภาคมีความเข้ากันได้กับสารเคมีหลายชนิดและทำการดัดแปลงพื้นผิวเพื่อให้เหมาะสมกับการนำไปประยุกต์ใช้งานได้ง่าย [7]

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษที่มีการ immobilize เอนไซม์ CYP450 ลงใน sol-gel แล้วเคลือบบนกระดาษและสารตั้งต้นที่ทำให้เกิดการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ (fluorogenic substrate) เมื่อเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์จะมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มสีของสารตั้งต้นเรืองแสงที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า และวัดปริมาณโดยการถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนต์และวิเคราะห์ความเข้มสี ซึ่งวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นเป็นวิธีที่ง่าย

รวดเร็ว และราคาไม่แพง สำหรับการประเมินอันตรกิริยาของสารที่มีศักยภาพในการเป็นยาหรือพืชสมุนไพรต่อการออกฤทธิ์ของ CYP450

1.2 ทบทวนวรรณกรรม

การเมแทบอลิซึมของยาเป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงสารที่ละลายได้ในไขมัน (lipophilic compound) ไปเป็นสารที่มีการละลายน้ำได้ดีขึ้นโดย CYP450 ทำให้สามารถขับออกจากร่างกายได้ง่ายขึ้น ไอโซไซม์ของ CYP450 ในร่างกายมนุษย์ที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของยาที่มีใช้ทางคลินิกมากกว่าร้อยละ 90 ได้แก่ CYP1A2 CYP2C9 CYP2C19 CYP2D6 และ CYP3A4 [8, 9] โดย CYP3A4 เป็นไอโซไซม์ที่พบมากที่สุด ซึ่งมีปริมาณร้อยละ 30-40 ของ CYP450 ทั้งหมดที่อยู่ในตับและลำไส้เล็ก นอกจากนี้ CYP3A4 เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของยาที่มีจำหน่ายในท้องตลาดประมาณร้อยละ 50 และมีผลต่อการเกิดอันตรกิริยาของยาเป็นอย่างมาก [10] ดังนั้น การทดลองในหลอดทดลองเพื่อประเมินสารที่มีศักยภาพในการเป็นยาต่อการออกฤทธิ์ของ CYP450 โดยเฉพาะอย่างยิ่ง CYP3A4 จึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง เพื่อใช้เป็นแนวทางสำหรับการทดลองในร่างกายสิ่งมีชีวิต (*in vivo*) และการศึกษาอันตรกิริยาระหว่างยาทางคลินิก U.S. Food and Drug Administration (FDA) แนะนำตัวยับยั้งและตัวเหนี่ยวนำสำหรับการทดลองในหลอดทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตัวยับยั้งและตัวเหนี่ยวนำสำหรับการทดลองในหลอดทดลอง [11]

CYP	ตัวยับยั้ง	ตัวเหนี่ยวนำ
1A2	furafylline, α -naphthoflavone	omeprazole, lansoprazole
2C9	sulfaphenazole, fluconazole fluvoxamine, fluoxetine	rifampin
2C19	ticlopidine, nootkatone	rifampin
2D6	quinidine	none identified
3A4/5	ketoconazole, itraconazole troleandomycin, verapamil	rifampin

สารตั้งต้นที่ทำให้เกิดการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่มีการใช้อย่างแพร่หลายสำหรับการศึกษาการยับยั้งหรือเหนี่ยวนำการออกฤทธิ์ของ CYP450 เพื่อประเมินสารที่มีศักยภาพในการเป็นยาที่อาจจะเกิดอันตรกิริยาระหว่างยาได้ สารตั้งต้น (ตารางที่ 2) ถูกเมแทบอลิซึมโดย CYP3A4 และทำให้เกิดสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ [12-14] และวิเคราะห์โดยเครื่องอ่านปฏิกิริยาในไมโครเพลท [15]

ตารางที่ 2 สารตั้งต้นเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์สำหรับการประเมินฤทธิ์ของเอนไซม์ CYP3A4 ในหลอดทดลอง และความยาวคลื่นกระตุ้น/ปลดปล่อย (excitation/emission wavelength) ของเมแทบอไลต์ [12-14]

สารตั้งต้น	เมแทบอไลต์	ความยาวคลื่นกระตุ้น/ ปลดปล่อย (นาโนเมตร)
7-benzyloxy-trifluoromethylcoumarin	7-hydroxy-7-benzyloxy- trifluoromethylcoumarine	410/538
7-benzyloxyquinoline	7-hydroxyquinoline	410/538
7-benzyloxy-methyloxy-3- cyanocoumarin	3-cyano-7-hydroxycoumarin	415/460
7-benzyloxy-methyloxy-4- (trifluoromethyl)-coumarin	7-hydroxy-4- trifluoromethylcoumarin	415/520
di(benzyloxymethoxy)fluorescein	fluorescein	485/538
dibenzylmethylfluorescein	fluorescein	485/520
resorufin benzyl ether or benzyloxy resorufin	resorufin	535/590
benzyloxy-methyl-resorufin	resorufin	535/590

เทคนิคการวิเคราะห์หลายประเภทถูกนำมาใช้ในการตรวจวัดฤทธิ์ของ CYP450 เช่น ไฮเพอร์ฟอร์แมนส์ลิควิดโครมาโทกราฟี (high performance liquid chromatography, HPLC) และตัวตรวจวัดการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ [16] ลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (mass spectrometry, MS) [17] ลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี/แมสสเปกโตรเมตรี [18, 19] เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลทที่ใช้ตัวตรวจวัดการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ [15, 20] อย่างไรก็ตาม การวิเคราะห์แบบระบบของไหลจุลภาคและอุปกรณ์การวิเคราะห์แบบพกพาได้ความสนใจอย่างมาก เนื่องจากเป็นวิธีแบบใหม่ที่ใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อย มีประสิทธิภาพสูง และใช้สารตัวอย่างและสารเคมีอื่นๆ ปริมาณน้อย อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษเป็นระบบการวิเคราะห์ขนาดเล็กรูปแบบใหม่ที่ใช้ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณได้อย่างรวดเร็ว ราคาถูก ใช้งานง่าย จึงมีการประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หลายประเภท เช่น การตรวจวินิจฉัยโรค การตรวจสอบสารตกค้างในอาหารและสิ่งแวดล้อม การตรวจสอบสารสำคัญในอาหารและเครื่องสำอาง เป็นต้น [4, 21, 22]

กระดาษที่นำมาใช้ในการสร้างระบบของไหลจุลภาคมีความเข้ากันได้กับสารเคมีหลายชนิดและทำการดัดแปลงพื้นผิวได้ง่าย พกพาได้ ราคาถูก นอกจากนี้ของเหลวสามารถเคลื่อนที่บนกระดาษด้วยแรงแคปิลลารี (capillary force) โดยไม่อาศัยอุปกรณ์อื่นๆ [7, 23] หลักการสร้างอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษใช้การสร้างช่องการไหล (channel) และ reservoir โดยใช้ทางกันไม่ชอบน้ำ (hydrophobic barrier) บนกระดาษ [24, 25] การพิมพ์ด้วยหมึกพิมพ์ขี้ผึ้ง (wax printing) เป็นวิธีการสร้างที่นิยมใช้ เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็ว [26] หลังจากการพิมพ์แบบลงบนกระดาษจะต้องมีขั้นตอนให้ความร้อนเพื่อให้หมึกขี้ผึ้งซึมผ่านรูพรุนของกระดาษและเกิดเป็นทางกันไม่ชอบน้ำอย่างสมบูรณ์

ในปัจจุบันยังไม่มีรายงานการใช้อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษสำหรับการศึกษาฤทธิ์ของ CYP3A4 งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นในการพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษรูปแบบใหม่ โดยการ immobilize เอนไซม์ CYP3A4 ลงใน sol-gel แล้วเคลือบบนกระดาษสำหรับการศึกษาผลของสารที่มีศักยภาพในการเป็นยาหรือพืชสมุนไพรที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ CYP3A4 โดยการใช้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ในการถ่ายภาพและวิเคราะห์รูปภาพโดย ImageJ ซึ่งเป็นวิธีที่ไม่ซับซ้อนและพกพาได้ CYP3A4 ที่ถูก immobilized ลงใน sol-gel ถูกที่ทำจากซิลิกาเคลือบเป็นฟิล์มบางบนกระดาษ ซึ่งช่วยให้เอนไซม์มีความคงตัวและสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยายังสามารถแพร่ผ่านรูพรุนของซิลิกาได้ ฟิล์มซิลิกามีคุณสมบัติโปร่งแสงจึงใช้ร่วมกับตัวตรวจวัดเชิงแสงได้ (optical detection) นอกจากนี้ ซิลิกาเป็นสารเฉื่อย (inert) มีความเข้ากันได้กับน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ [27] ดังนั้น วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นจึงมีประโยชน์ต่อการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหรือสารชีวโมเลกุลอื่นๆ ด้วย เช่น แอนติบอดี โปรตีน เอนไซม์ เป็นต้น

2. วัตถุประสงค์

โครงการนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษแบบประหยัด พกพาได้ สำหรับการวัดฤทธิ์ของ CYP450 ได้อย่างรวดเร็ว โดยใช้ CYP3A4 เป็นเอนไซม์ต้นแบบ โดยมีวัตถุประสงค์ย่อยดังนี้

- เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการตั้งตำรับ sol-gel สำหรับการ immobilize เอนไซม์
- เพื่อพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษที่มีการเคลือบด้วย sol-gel ที่มีเอนไซม์ immobilize อยู่โดยใช้ตัวตรวจวัดเชิงแสง
- เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์บนอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษที่พัฒนาขึ้น

- เพื่อประยุกต์ใช้วิธีวิเคราะห์สำหรับการประเมินยาใหม่หรือสารสกัดสมุนไพรที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของเอนไซม์

3. วิธีทดลอง

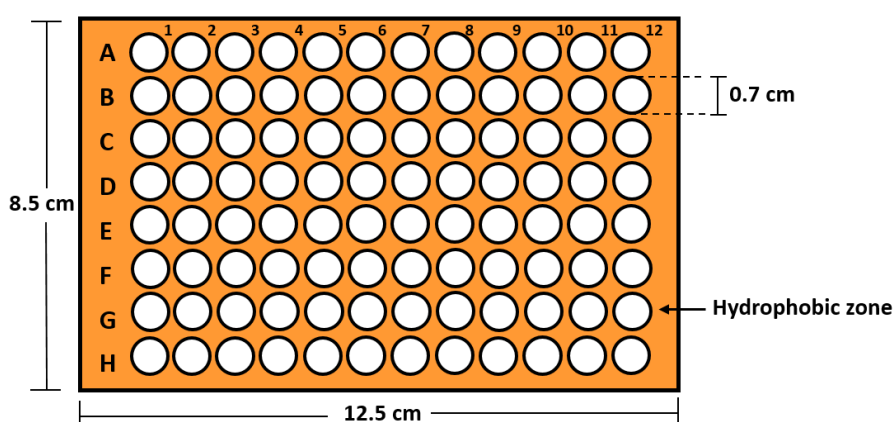
3.1 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับศึกษาฤทธิ์ของเอนไซม์ เริ่มจากการศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการวิเคราะห์บนไมโครเพลทบนแผ่นกระดาษ (paper microzone plate) โดยการตรวจวัดด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาในไมโครเพลท (microplate reader) ที่มีตัวตรวจวัดเชิงแสงชนิดฟลูออเรสเซนซ์ จากนั้นหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ไปใช้ในการศึกษาฤทธิ์ของเอนไซม์บนอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ โดยการตรวจวัดด้วยกล้องจุลทรรศน์ขนาดเล็กและพกพาได้ ซึ่งมีขั้นตอน ดังนี้

3.1.1 การสร้างไมโครเพลทบนแผ่นกระดาษและอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ

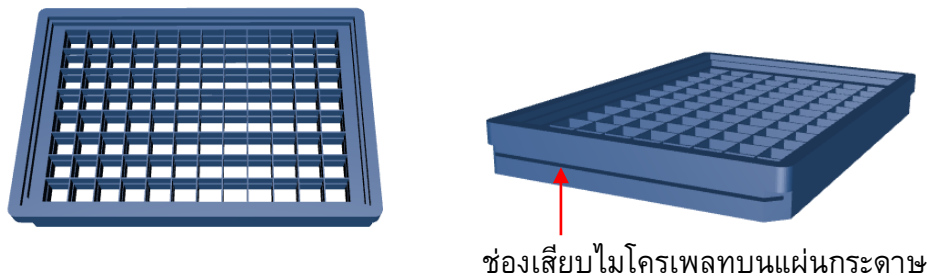
- ออกแบบไมโครเพลทบนแผ่นกระดาษที่มีความกว้าง 8.5 เซนติเมตร และยาว 12.5 เซนติเมตร และประกอบด้วยวงกลมที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร จำนวน 96 วง ด้วยโปรแกรม Microsoft Powerpoint ดังรูปที่ 1 โดยบริเวณสีทึบเป็นพื้นที่ไม่ชอบน้ำซึ่งพิมพ์ด้วยหมึกพิมพ์สีฟ้า

- พิมพ์ไมโครเพลทที่ออกแบบไว้ด้วยเครื่องพิมพ์หมึกสีฟ้า (Fuji Xerox® ColorQube 8870) โดยใช้กระดาษชนิด Whatman® qualitative filter paper grade 1 ที่มีความหนา 180 ไมโครเมตร ขนาดรูปทรง 11 ไมโครเมตร จากนั้นนำไปเคลือบด้วยแผ่นพลาสติก (laminating film) เพื่อให้ฐานมีความแข็งแรง โดยใช้เครื่องเคลือบ (laminator) ที่อุณหภูมิประมาณ 120 องศาเซลเซียส ในขณะเดียวกันหมึกสีฟ้าจะละลายลงสู่กระดาษและเกิดเป็นทางกันไม่ชอบน้ำ



รูปที่ 1 การออกแบบไมโครเพลทบนแผ่นกระดาษแบบ 96 หลุม

- ออกแบบและสร้างฐานใส่ไมโครเพลทบนแผ่นกระดาษแบบ 96 หลุม (96-well paper microzone plate holder) ด้วยวัสดุอะคริลิก (รูปที่ 2) สำหรับใส่ไมโครเพลทบนแผ่นกระดาษไปตรวจวัดด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาในไมโครเพลท



รูปที่ 2 การออกแบบฐานใส่ไมโครเพลทบนแผ่นกระดาษแบบ 96 หลุม [28]

- การสร้างอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษรูปแบบอื่นๆ มีวิธีทำเช่นเดียวกับการสร้างไมโครเพลทบนแผ่นกระดาษ แต่ไม่ต้องใช้ฐานอะคริลิก

3.1.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์

- ศึกษาความเข้ากันได้ของไมโครเพลทบนแผ่นกระดาษและตัวทำละลายชนิดต่างๆ โดยการหยดตัวทำละลาย ได้แก่ ethanol, methanol, acetonitrile, dimethyl sulfoxide, ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และทริสบัฟเฟอร์ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงบนหลุมบนไมโครเพลทบนแผ่นกระดาษแบบ 96 หลุม และสังเกตการแพร่ของตัวทำละลายผ่านทางกันไม่ชอบน้ำ
- ศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อปฏิกิริยาที่ใช้ในการวิเคราะห์ ดังแสดงในตารางที่ 3 ในการทดลองใช้ resorufin benzyl ether เป็นสารตั้งต้น และเอนไซม์ CYP3A4 เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นผลิตภัณฑ์ฟลูออเรสเซนต์ resorufin ที่ตรวจวัดได้ด้วยความยาวคลื่นกระตุ้นและปลดปล่อย 570 และ 600 นาโนเมตร ตามลำดับ [13, 14] (รูปที่ 3)

ตารางที่ 3 ปัจจัยที่ศึกษาสำหรับการหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์

ปัจจัย	ช่วงหรือชนิดที่ศึกษา
ชนิดของบัฟเฟอร์	ฟอสเฟตบัฟเฟอร์และทริสบัฟเฟอร์
ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์	50-200 มิลลิโมลาร์
ระยะเวลาในการป่ม	0-50 นาที

เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ 1 ไมโครลิตร และสารละลายบัพเฟอร์ที่ประกอบด้วยเอนไซม์ CYP3A4 ความเข้มข้น 5 นาโนโมลาร์ 5 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0-50 นาที

นำสภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์บนไมโครเพลททบนแผ่นกระดาษแบบ 96 หลุมมาใช้ในการวิเคราะห์บนอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ ซึ่งตรวจวัดด้วยการถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ (Dyno-Lite® รุ่น AM4115T-YFGW) ที่ใช้ light emitting diodes (LEDs) สีเขียวเป็นแหล่งกำเนิดแสง และวิเคราะห์ภาพถ่ายด้วยโปรแกรม ImageJ (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 การวิเคราะห์บนอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษที่ตรวจวัดด้วยการถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์

3.1.3 การประเมินความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

การประเมินความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์บนอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษที่ตรวจวัดด้วยการถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ มีดังนี้

- ความสัมพันธ์เส้นตรง

สร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ของสารละลายมาตรฐาน resorufin benzyl ether จำนวน 5 ความเข้มข้น (2.5-15 ไมโครโมลาร์) โดยแต่ละความเข้มข้นทำ 3 ซ้ำ จากนั้นคำนวณหา correlation coefficient (r^2), ร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (percent relative standard deviation, %RSD) ของความชัน และจุดตัดแกน y

$$\text{ร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์} = (\text{ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน/ค่าเฉลี่ย}) \times 100 \quad (1)$$

- ความแม่นยำ

ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์คำนวณจากร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ ความแม่นยำของการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน (intra-day precision)

ศึกษาที่ 3 ระดับความเข้มข้นของกราฟมาตรฐาน (2.5, 7.5 และ 15 ไมโครโมลาร์) โดยวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน ส่วนความแม่นยำของการวิเคราะห์ระหว่างวัน (inter-day precision) ศึกษาที่ 3 ระดับความเข้มข้นของกราฟมาตรฐาน (2.5, 7.5 และ 15 ไมโครโมลาร์) โดยวิเคราะห์ใน 6 วัน ที่แตกต่างกัน จากนั้นคำนวณหาร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์

- ลิมิตการตรวจหาและลิมิตการวิเคราะห์ปริมาณ

ลิมิตการตรวจหาเป็นความเข้มข้นที่ให้ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์เป็น 3.3 เท่าของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของจุดตัดแกน y/ค่าเฉลี่ยของความชัน ($3.3SD_{y-intercept}/slope$) ลิมิตการวิเคราะห์ปริมาณเป็นความเข้มข้นที่ให้ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ เป็น 10 เท่าของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของจุดตัดแกน y/ค่าเฉลี่ยของความชัน ($10SD_{y-intercept}/slope$)

- ความถูกต้อง

ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ได้จากการเปรียบเทียบผลอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษกับไมโครเพลทบนแผ่นกระดาษด้วยการทดสอบทางสถิติ แบบ t-test

3.2 การพัฒนาตำรับ sol-gel และการ immobilize เอนไซม์ลงใน sol-gel

ผสมสารละลาย sodium silicate ความเข้มข้น 0.125-2.5 โมลาร์ และ Ludox® colloidal silica ความเข้มข้น 8.3 โมลาร์ ในอัตราส่วนต่างๆ ลงในบีกเกอร์และผสมให้เข้ากันโดยใช้ magnetic stirrer วัด pH เริ่มต้นและปรับให้ได้ pH 7.4 ด้วย HCl ความเข้มข้น 4 โมลาร์ สังเกตลักษณะการเกิดเจลที่อุณหภูมิห้องและปริมาณน้ำที่เหลืออยู่ในตำรับ sol-gel (9) จากนั้นนำตำรับ sol-gel ที่เหมาะสมมา immobilize เอนไซม์ โดยการปิเปต sol-gel 950 ไมโครลิตร และเอนไซม์ 1,000 พิโคโมล 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จะได้ sol-gel ที่ประกอบด้วยเอนไซม์ 50 พิโคโมลแล้วจึงปิเปต 10 ไมโครลิตรลงบนอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ ซึ่งจะเกิดการเคลือบเป็นฟิล์มบนกระดาษ โดยในแต่ละ reservoir จะมีเอนไซม์ 0.5 พิโคโมล นำอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษที่เคลือบด้วย sol-gel ที่มีการ immobilize เอนไซม์ CYP3A4 เก็บในภาชนะปิดสนิทที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 การเก็บรักษาอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษที่เคลือบด้วย sol-gel ที่มีการ immobilize เอนไซม์ในภาชนะปิดสนิทที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

นำมารับ sol-gel ที่เหมาะสมในการ immobilize เอนไซม์ CYP3A4 เคลือบลงบนกระดาษไปตรวจสอบลักษณะด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope, SEM) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope, TEM)

3.3 การศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ที่ immobilize ใน sol-gel

นำอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษที่มีการเคลือบด้วยเอนไซม์ที่ immobilize ใน sol-gel ใส่ภาชนะปิดสนิทเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาวิเคราะห์ฤทธิ์ของเอนไซม์ด้วยวิธีวิเคราะห์ที่ผ่านการประเมินความถูกต้องแล้วในสัปดาห์ที่ 0-8 เปรียบเทียบฤทธิ์ของเอนไซม์ในรูปแบบอิสระที่เก็บรักษาในสภาวะเดียวกัน

$$\text{ฤทธิ์ของเอนไซม์ (ร้อยละ)} = (\text{ฤทธิ์ของเอนไซม์สัปดาห์ที่ } x / \text{ฤทธิ์ของเอนไซม์สัปดาห์ที่ } 0) \times 100 \quad (2)$$

3.4 การประยุกต์ใช้วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น

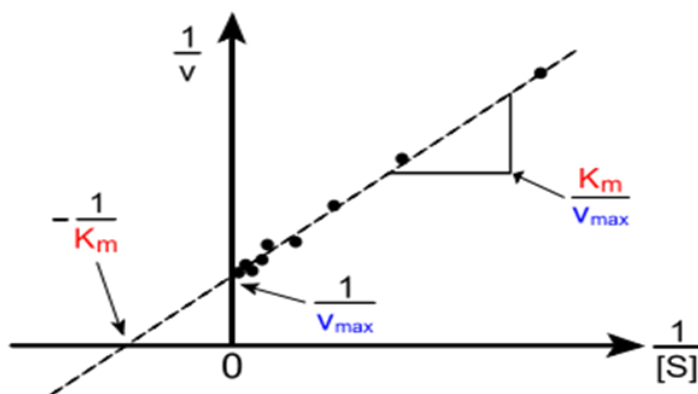
3.4.1 การประเมินผลของยาและสารสกัดพืชสมุนไพรที่มีต่อเอนไซม์

นำอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษมาทดสอบกับสารละลายยา ketoconazole เป็นตัวยับยั้ง [29] และ phenytoin, carbamazepine เป็นตัวเหนี่ยวนำการออกฤทธิ์ของ CYP3A4 ตามลำดับ เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ

จากนั้นนำอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษมาทดสอบกับสารสกัดพืชสมุนไพร ได้แก่ เมล็ดหมาก (*Areca catechu*) ใบชา (*Camellia sinensis*) และส่วนเหนือดินกะเม็ง (*Eclipta prostrata*) การวิเคราะห์ control ทำโดยการเติมสารละลายบัฟเฟอร์ลงบนกระดาษ สารตั้งต้นจะเกิดการปฏิกิริยาเปลี่ยนแปลงเป็นสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ที่มีเอนไซม์ CYP3A4 เป็นตัวกระตุ้น

3.4.2 การศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์ (enzyme kinetic)

การวัดฤทธิ์ของเอนไซม์ในสภาวะที่เหมาะสม โดยใช้สารตั้งต้นที่ความเข้มข้นต่างๆ ในช่วง 0-20 ไมโครโมลาร์ และนำไปป้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตรวจวัดฤทธิ์ของเอนไซม์ทุกๆ 5 นาที เป็นเวลาทั้งหมด 40 นาที นำข้อมูลมาสร้างกราฟ Lineweaver-Burk plot โดยแกน x เป็นค่า $1/\text{ความเข้มข้นของสารตั้งต้น}$ และแกน y เป็นค่า $1/\text{ความเร็ว}$ (รูปที่ 6) จากนั้นหาค่า maximum velocity ($V_{\max}$) ของเอนไซม์ซึ่งเป็นค่าอัตราความเร็วสูงสุด และ Michaelis constant (K_m) เป็นค่าคงที่เฉพาะของเอนไซม์และสารตั้งต้น และมีค่าเท่ากับค่าความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่มีผลให้ปฏิกิริยามีอัตราเร็วเท่ากับครึ่งหนึ่งของ $V_{\max}$



รูปที่ 6 Lineweaver-Burk plot

3. แผนการดำเนินงาน

แผนการดำเนินงานและผลผลิต (output) ที่คาดว่าจะได้รับแสดงในตารางที่ 4

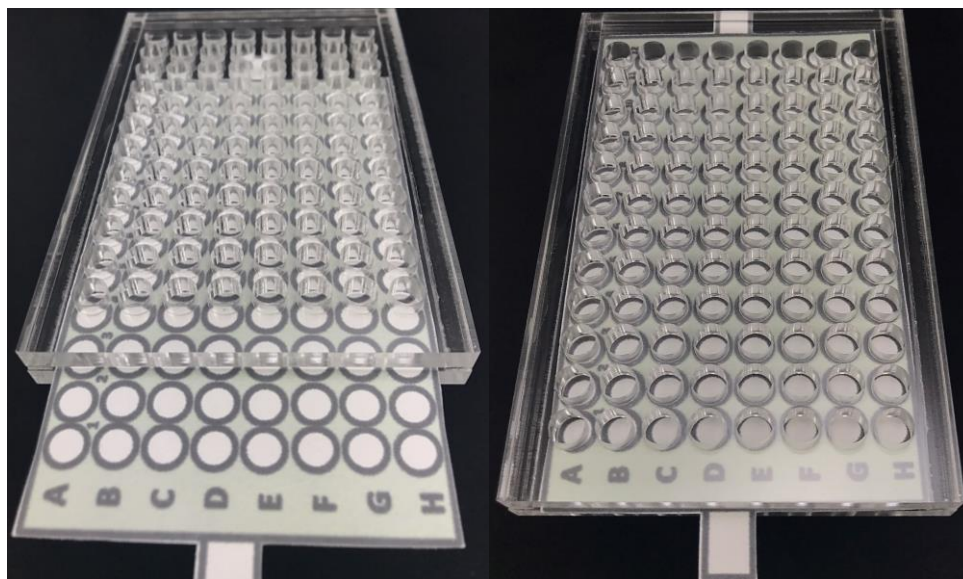
ตารางที่ 4 แผนการดำเนินงานและผลผลิตที่คาดว่าจะได้รับ

ขั้นตอน	แผนการดำเนินงานวิจัย	ระยะเวลา (เดือน)							ผลผลิตที่คาดว่าจะได้รับ
		1-2	3-6	7-9	10-12	13-15	16-18	19-21	
1	ทบทวนวรรณกรรม								งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับโครงการนี้เป็นปัจจุบัน
2	การพัฒนาตำรับ sol-gel และการ immobilize CYP3A4 ลงใน sol-gel								ตำรับ sol-gel ที่เหมาะสมสำหรับการ immobilized CYP3A4
3	การศึกษาคุณลักษณะของ CYP3A4 ที่ immobilize ใน sol-gel matrix								
4	การศึกษาฤทธิ์ของ CYP3A4 ใน sol-gel								
5	การเคลือบ CYP3A4 ที่ immobilize ใน sol-gel บนกระดาษ การประเมินความถูกต้องของวิธี								วิธีที่เหมาะสมในการเคลือบ CYP3A4 ที่ immobilize ใน sol-gel บนกระดาษ
6	การศึกษาความคงตัวของ CYP3A4 ที่ immobilize ใน sol-gel บนกระดาษ								ระยะเวลาและสภาวะการเก็บรักษา CYP3A4
7	การประยุกต์ใช้วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นกับตัวอย่างยาและพืชสมุนไพร การศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์								ข้อมูลตัวอย่างยาและพืชสมุนไพรที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของ CYP3A4
8	การวิเคราะห์ข้อมูล วิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง								- รายงานความก้าวหน้า - รายงานฉบับสมบูรณ์ - ส่งต้นฉบับสำหรับตีพิมพ์
9	การจัดทำรายงานและเขียนต้นฉบับสำหรับตีพิมพ์ (manuscript)								

ผลการทดลอง

1. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์

1.1 การสร้างไมโครเพลทบนแผ่นกระดาษและอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ ไมโครเพลทบนแผ่นกระดาษพิมพ์ด้วยหมึกขี้ผึ้งพิมพ์บนกระดาษ Whatman[®] qualitative filter paper grade 1 และเคลือบฐานด้วยแผ่นพลาสติก จากนั้นนำไปใส่ในฐานที่ทำจากอะคริลิก (รูปที่ 7)



รูปที่ 7 ไมโครเพลทบนแผ่นกระดาษแบบ 96 หลุม ที่พิมพ์ด้วยหมึกพิมพ์ขี้ผึ้ง และฐานอะคริลิก

1.2 ศึกษาความเข้ากันได้ของไมโครเพลทบนแผ่นกระดาษและตัวทำละลายชนิดต่างๆ พบว่าไมโครเพลทบนแผ่นกระดาษมีความเข้ากันได้กับฟอสเฟตบัพเฟอ์ ทริสบัพเฟอ์ แต่มีความเข้ากันได้กับ ethanol, methanol, acetonitrile, dimethyl sulfoxide ได้ในอัตราส่วนสูงสุด 5:5 9:1 7:3 และ 9:1 ตามลำดับ เมื่อใช้ตัวทำละลายสูงกว่าอัตราส่วนดังกล่าว จะเกิดการแพร่ของตัวทำละลายออกนอกทางกันไม่ชอบน้ำ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ความเข้ากันระหว่างตัวทำละลายต่างๆกับไมโครเฟลทบนแผ่นกระดาษ

อัตราส่วนตัวทำ ละลายและน้ำ	ตัวทำละลาย/บัฟเฟอร์					
	Ethanol	Methanol	Acetonitrile	Dimethyl sulfoxide	ฟอสเฟต บัฟเฟอร์	ทริส บัฟเฟอร์
0:10	✓	✓	✓	✓	-	-
1:9	✓	✓	✓	✓	-	-
2:8	✓	✓	✓	✓	-	-
3:7	✓	✓	✓	✓	-	-
4:6	✓	✓	✓	✓	-	-
5:5	✓	✓	✓	✓	-	-
6:4	✗	✓	✓	✓	-	-
7:3	✗	✓	✓	✓	-	-
8:2	✗	✓	✗	✓	-	-
9:1	✗	✓	✗	✓	-	-
10:0	✗	✗	✗	✗	✓	✓

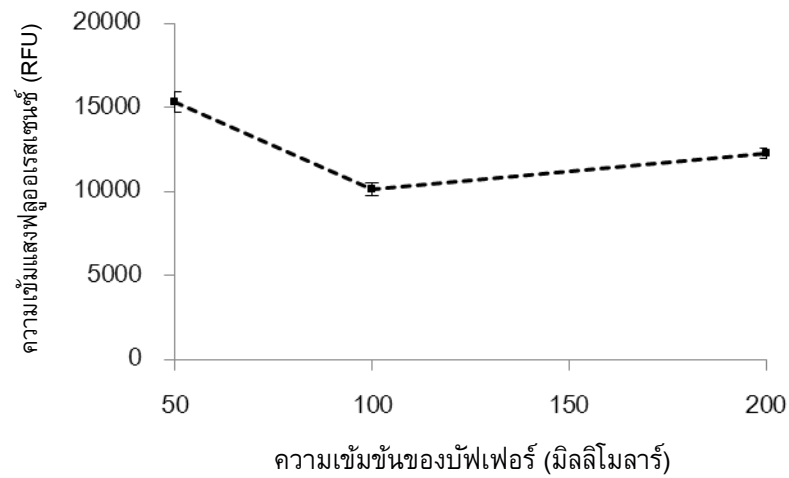
หมายเหตุ: ✓ = สารเคมีที่ใช้ในการทดลองมีความเข้ากันได้ของไมโครเฟลทบนแผ่นกระดาษและไม่แพร่
ออกนอกส่วนที่ขอบน้ำ

✗ = สารเคมีที่ใช้ในการทดลองเกิดการแพร่ออกนอกส่วนที่ขอบน้ำ

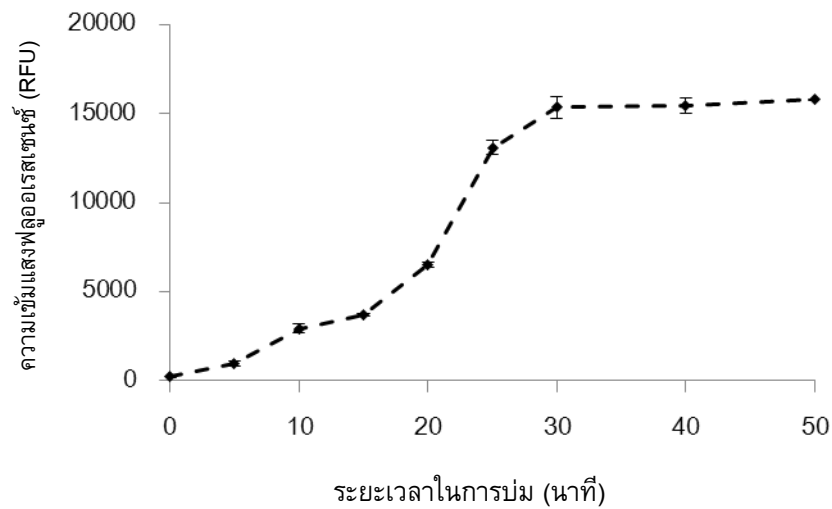
- = ไม่ได้ทำการทดลอง

1.3 ศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อปฏิกิริยาที่ใช้ในการวิเคราะห์ โดยใช้ resorufin benzyl ether เป็นสารตั้งต้น ซึ่งให้ผลิตภัณฑ์ resorufin เป็นสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ พบว่า ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (15,349±614.62) ให้ค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์สูงกว่าทริสบัฟเฟอร์ (12,044±460.97) จากนั้นนำฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 50 100 และ 200 มิลลิโมลาร์มาศึกษาและบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 0-50 นาที (รูปที่ 8) พบว่า ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ให้ค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์สูงสุดและการบ่มที่เวลา 30 นาทีค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์สูงสุดและมีค่าคงที่จนถึงเวลา 50 นาที ดังนั้น สภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์บนไมโครเฟลทบนแผ่นกระดาษ ได้แก่ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.4 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสระยะเวลา 30 นาที จากนั้นนำสภาวะที่เหมาะสมมาใช้นออุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษที่ตรวจวัดโดยการถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนต์

1) ความเข้มข้นของบีฟเฟอร์



2) ระยะเวลาในการบ่ม



รูปที่ 8 การศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์บนไมโครเพลทบนแผ่นกระดาษด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาในไมโครเพลท

2. การประเมินความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

ประเมินความถูกต้องของการวิเคราะห์บนอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษที่ตรวจวัดโดยการถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ ดังนี้

ตารางที่ 6 ความสัมพันธ์เส้นตรง

วันที่	ความชื้น	จุดตัดแกน	Correlation coefficient
1	0.7407	8.7798	0.9941
2	0.7185	8.8164	0.9974
3	0.6478	8.7176	0.9963
ค่าเฉลี่ย	0.7023	8.7713	0.9959
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.0485	0.0499	0.0017
ร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	6.91	0.57	0.17

ตารางที่ 7 ความแม่นยำของการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน

ความเข้มข้น (ไมโครโมลาร์)	ร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (n=6) ภายในวันเดียวกัน	ระหว่างวัน
2.5	4.81	0.81
7.5	1.96	4.32
15	4.91	5.12

- จำกัดการตรวจหา 0.23 ไมโครโมลาร์ และจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณ 0.71 ไมโครโมลาร์ (ร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์น้อยกว่า 6.91)

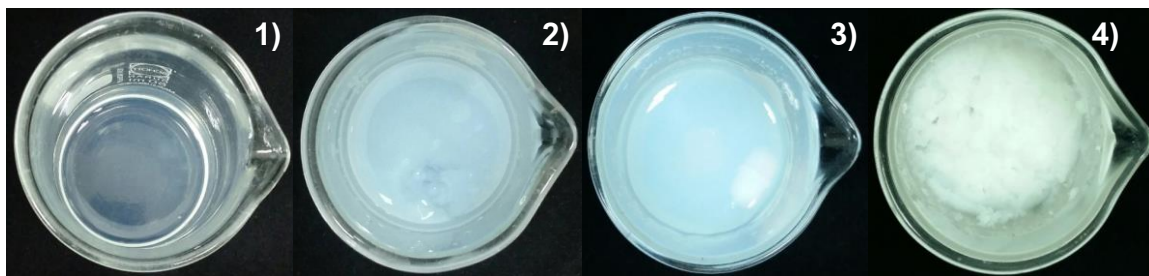
- ความถูกต้อง

นำอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษและกล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์มาตรวจหาคุณสมบัติเฉพาะของเอนไซม์ (V_{max} และ K_m) เปรียบเทียบกับผลการทดลองที่ได้จากไมโครเพลทบนแผ่นกระดาษที่ตรวจวัดด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาในไมโครเพลท พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แสดงว่าวิธีวิเคราะห์บนอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษมีความถูกต้อง

3. การพัฒนาตำรับ sol-gel และการ immobilize เอนไซม์ลงใน sol-gel

การพัฒนาตำรับ sol-gel ด้วยการปรับเปลี่ยนอัตราส่วนระหว่าง Ludox[®] colloidal silica และสารละลาย sodium silicate และปรับให้ได้ pH 7.4 (ตารางที่ 8) ซึ่งตำรับ sol-gel ที่เหมาะสมสำหรับการนำไป immobilize เอนไซม์ จะต้องมีลักษณะการเกิดเจลในระดับที่ 3 เจลไม่ไหลตามภาชนะบรรจุ และไม่มีน้ำเหลืออยู่ในตำรับ ดังแสดงในรูปที่ 9 จากการทดลองพบว่า ตำรับที่ 20 เป็นตำรับที่เหมาะสม ซึ่งมี

ประกอบด้วย Ludox® colloidal silica 8.3 โมลาร์ และ สารละลาย sodium silicate 0.125 โมลาร์ ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำ sol-gel ดำรับที่ 20 มา immobilize เอนไซม์และเคลือบลงบนกระดาษ โดยการผสม sol-gel กับ เอนไซม์ในอัตราส่วน 95:5 หรือ 90:10 พบว่า sol-gel สามารถดูดซับเอนไซม์ได้ทั้งหมด เนื่องจากไม่มีน้ำเหลืออยู่ในตำรับ เมื่อเอนไซม์ถูก immobilize ลงใน sol-gel แล้วจึงบีบตลงบนอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ ซึ่งจะเกิดการเคลือบเป็นฟิล์มบนกระดาษ และเก็บในภาชนะปิดสนิทที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



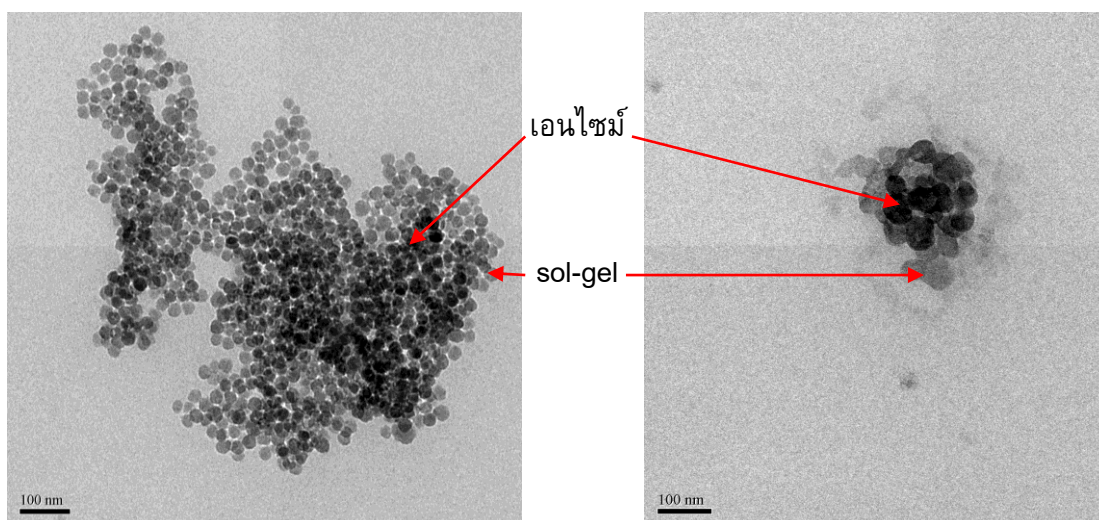
รูปที่ 9 ลักษณะการเกิดเจล 4 ระดับ: 1) ไม่เกิดการก่อเจล (no detectable gel formed) 2) เจลเนื้อเหลวและไหลตามภาชนะบรรจุ (flowing gel) 3) เจลไม่ไหลไหลตามภาชนะบรรจุ (non-flowing gel) 4) เจลเนื้อแข็ง (rigid gel)

ตารางที่ 8 การพัฒนาตำรับ sol-gel

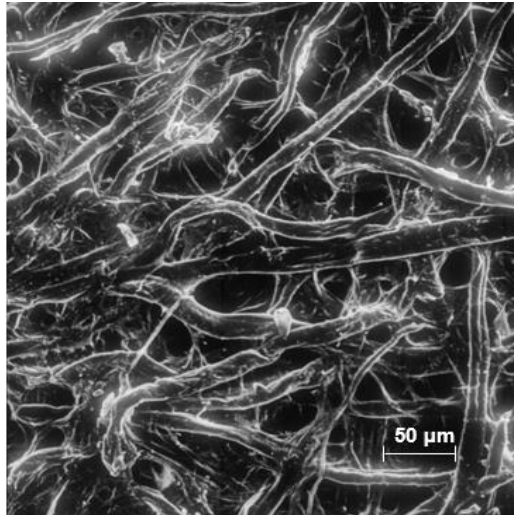
ตำรับ ที่	อัตราส่วน										ลักษณะการเกิดเจล		
	Ludox® colloidal silica 8.3 โมลาร์	สารละลาย sodium silicate (โมลาร์)								pH เริ่มต้น	pH สุดท้าย	น้ำที่เหลืออยู่ใน ตำรับ	ระดับการเกิด เจล*
		2.5	0.4	0.25	0.2	0.18	0.15	0.125					
1	1	1								-	-	มี	4
2	1	2								-	-	มี	4
3	1	3								-	-	มี	4
4	1	4								12.1	10.7	มี	3
5	2	1								-	-	มี	4
6	3	1								-	-	มี	4
7	4	1								-	-	มี	4
8	1		1							11.4	-	มี	4
9	1		4							-	10.0	มี	2
10	1		12							11.8	10.0	มี	2
11	1		24							12.0	9.8	มี	2
12	1		124							11.9	9.7	มี	2
13	1			124						11.8	9.0	มี	2
14	1				1					11.2	8.8	ไม่มี	2
15	1					1				11.1	8.1	ไม่มี	2
16	1						1			11.0	8.0	มี	1
17	1							124		11.7	7.6	มี	2
18	1							62		11.7	7.4	มี	2
19	1							31		11.6	7.4	มี	2
20	1							1		10.9	7.4	ไม่มี	3
21	1							2		11.1	7.4	มี	2
22	2							3		11.1	7.5	มี	2
23	1							1.25		11.1	7.7	มี	2

*ตำรับที่มีการเกิดเจลระดับ 4 เป็นเจลเนื้อแข็ง ทำให้ไม่สามารถวัด pH ได้

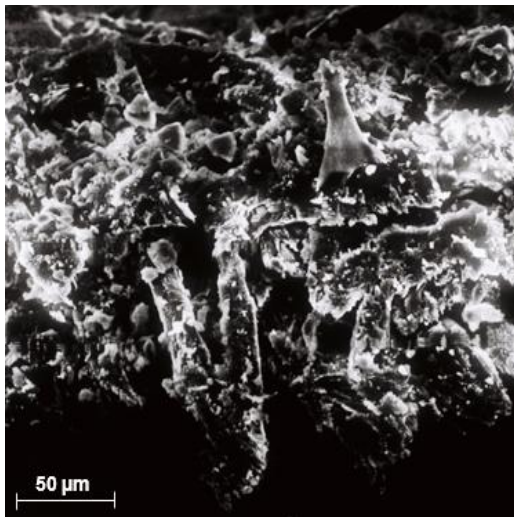
การศึกษาคุณลักษณะเอนไซม์ CYP3A4 ที่ถูก immobilize ลงใน sol-gel ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน โดยเตรียมตำรับ sol-gel ที่ประกอบด้วย Ludox® colloidal silica 8.3 โมลาร์ และ สารละลาย sodium silicate 0.125 โมลาร์ ในอัตราส่วน 1:1 และปรับให้ได้ pH 7.4 ด้วย HCl ความเข้มข้น 4 โมลาร์ จากนั้นเติมเอนไซม์ลงใน sol-gel เพื่อให้ได้เอนไซม์ความเข้มข้น 50 พิโคโมล และเคลือบลงบนกระดาษเก็บในภาชนะปิดสนิทที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำไปศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ใน sol-gel ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่านและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด พบว่า เอนไซม์อยู่ในลักษณะที่ล้อมรอบด้วย sol-gel (รูปที่ 10) เมื่อเอนไซม์ที่ immobilize ใน sol-gel ถูกนำมาเคลือบเป็นฟิล์มบนกระดาษ นอกจากการเคลือบที่พื้นผิวด้านบนกระดาษแล้วยังมีการซึมผ่านของ sol-gel ไปตามรูพรุนและเคลือบที่เส้นใยกระดาษด้วย (รูปที่ 11) ทำให้ช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์



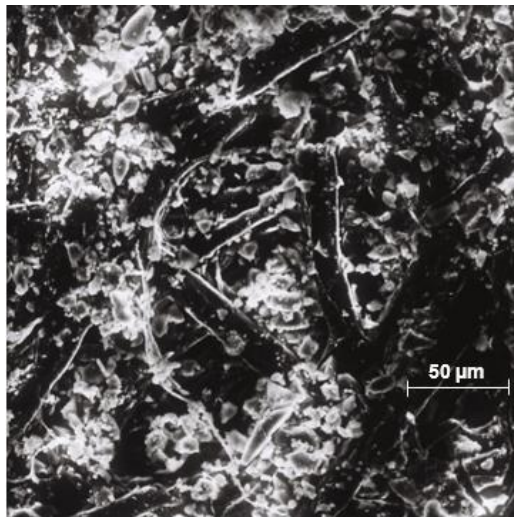
รูปที่ 10 การศึกษาคุณลักษณะเอนไซม์ใน sol-gel ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน
(● เอนไซม์ ● sol-gel)



1) รูปเส้นใยกระดาศเซลลูโลสที่ไม่มีการเคลือบด้วย sol-gel



2) รูปตัดขวางเอนไซม์ immobilize ใน sol-gel ที่เคลือบบนกระดาศ

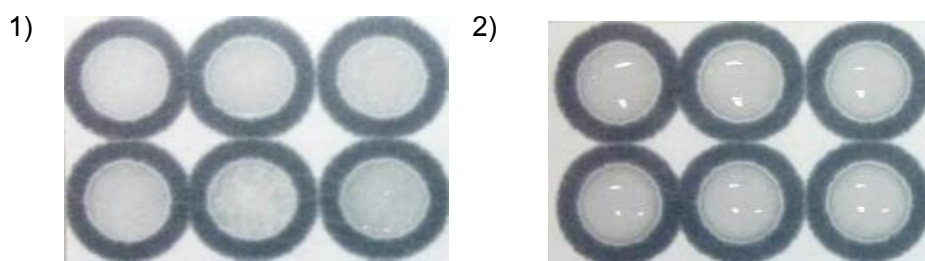


3) รูปพื้นผิวด้านบนของเอนไซม์ immobilize ใน sol-gel ที่เคลือบบนกระดาศ

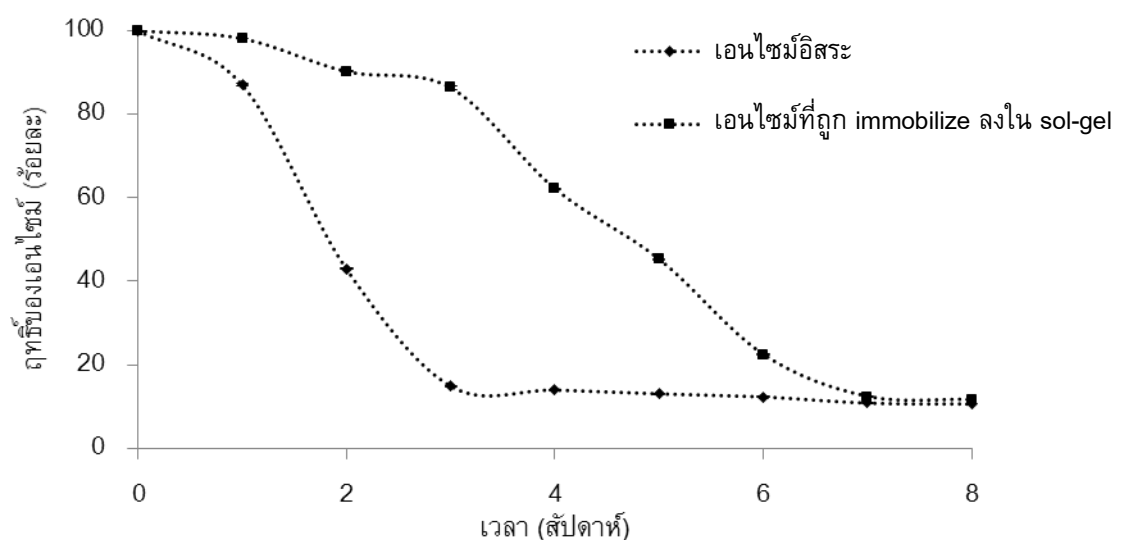
รูปที่ 11 การศึกษาคุณลักษณะเอนไซม์ใน sol-gel ที่เคลือบบนกระดาศด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด

4. การศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ที่ immobilize ใน sol-gel

นำอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษที่มีการเคลือบด้วยเอนไซม์ CYP3A4 ที่ immobilize ใน sol-gel (รูปที่ 12) มาวิเคราะห์ฤทธิ์ของเอนไซม์สัปดาห์ที่ 0-8 พบว่าเอนไซม์ที่ immobilize ใน sol-gel มีความคงตัวมากกว่าเอนไซม์รูปแบบอิสระ เอนไซม์รูปแบบอิสระมีฤทธิ์ลดลงอย่างรวดเร็วในสัปดาห์ที่ 2 โดยมีฤทธิ์ของเอนไซม์เพียงร้อยละ 42.9 ขณะที่เอนไซม์ที่ immobilize ใน sol-gel ยังคงมีฤทธิ์ของเอนไซม์ร้อยละ 86.8 ในสัปดาห์ที่ 3 และลดลงเหลือร้อยละ 62.1 ในสัปดาห์ที่ 4 (รูปที่ 13)



รูปที่ 12 ลักษณะภายนอกของ 1) เอนไซม์รูปแบบอิสระที่หยดลงบนอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ 2) เอนไซม์ที่ immobilize ลงใน sol-gel หลังจากเคลือบลงบนอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ

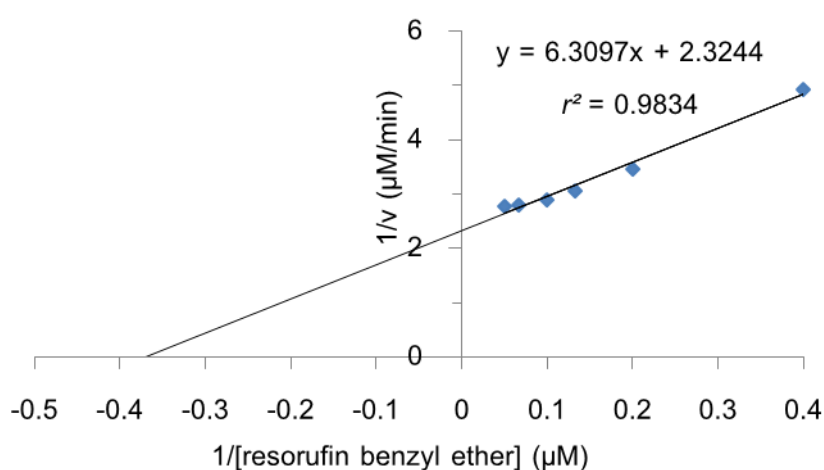


รูปที่ 13 ความคงตัวของเอนไซม์รูปแบบอิสระและเอนไซม์ที่ immobilize ใน sol-gel สัปดาห์ที่ 0-8

5. การประยุกต์ใช้วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น

เมื่อนำอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษมาทดสอบกับสารละลายยา ketoconazole ความเข้มข้น 6 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร พบว่าออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP3A4 ร้อยละ 60.5 ± 0.16 ซึ่งเปรียบเทียบกับรายงานวิจัยที่ทดสอบยา ketoconazole ความเข้มข้น 6.84 ± 1.02 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ($5.82-7.86$ ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร) โดยใช้วิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนส์ลิควิดโครมาโทกราฟี พบว่าออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP3A4 ร้อยละ 50 [29] นอกจากนี้ได้นำอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษมาทดสอบกับยาและสารสกัดสมุนไพรที่มีรายงานว่าออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP 3A4 ได้แก่ สารสกัด *Areca catechu*, *Eclipta prostrata*, *Camellia sinensis* และยาที่ออกฤทธิ์เหนี่ยวนำเอนไซม์ CYP3A4 ได้แก่ phenytoin, carbamazepine พบว่าระดับความเข้มข้นของยาและสารสกัดสมุนไพรที่ออกฤทธิ์ยับยั้งหรือเหนี่ยวนำเอนไซม์ CYP3A4 ได้ร้อยละ 50 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับผลการวิจัยที่มีการตีพิมพ์แล้ว โดยการทดสอบด้วย t-test ($P > 0.05$) ซึ่งแสดงว่า อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษมีประสิทธิภาพที่ดีในการใช้ทำนายการออกฤทธิ์ของยาหรือสารออกฤทธิ์ต่างๆ ที่มีอาจจะมีผลต่อการยับยั้งหรือเหนี่ยวนำการออกฤทธิ์ของเอนไซม์ CYP450

การศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์ CYP3A4 ที่ immobilize ใน sol-gel และนำไปเคลือบบนกระดาษ แสดงในรูปแบบ Lineweaver-Burk plot (รูปที่ 14) จุดตัดแกน Y เป็นค่า $1/V_{\max} = 2.304$ และค่าความชันของกราฟเป็นค่า $K_m/V_{\max} = 6.3097$ ดังนั้น ค่า $V_{\max} = 0.43$ ไมโครโมลาร์ต่อนาที และ $K_m = 2.71$ ไมโครโมลาร์ ค่า K_m บ่งถึงความสามารถของเอนไซม์ในการจับกับสารตั้งต้น (affinity) เมื่อ K_m ต่ำ แสดงว่าเอนไซม์มีความสามารถในการจับกับสารตั้งต้นสูง



รูปที่ 14 Lineweaver-Burk plot ของเอนไซม์ CYP3A4 ที่ immobilize ใน sol-gel และนำไปเคลือบบนกระดาษ

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นที่ในการพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ ซึ่งเป็นศาสตร์การวิเคราะห์รูปแบบใหม่ที่มีความรวดเร็ว ประหยัด และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม [30] มาใช้ในการวัดฤทธิ์ของ CYP450 โดยใช้ CYP3A4 เป็นเอนไซม์ต้นแบบ CYP3A4 เป็นเอนไซม์หลักในตับสำหรับการเมแทบอลิซึมสารต่างๆ เช่น ยารักษาโรค สมุนไพร สารเคมี และสารชีวโมเลกุลในร่างกาย [1, 2] โดยยาที่มีจำหน่ายในท้องตลาดประมาณร้อยละ 50 จะผ่านกระบวนการเมแทบอลิซึมโดยใช้ CYP3A4 ดังนั้น จึงมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดอันตรกิริยาระหว่างยาเป็นจำนวนมาก [10] ในการทดลองใช้ resorufin benzyl ether เป็นสารตั้งต้น ซึ่งจะเกิดเมแทบอลิซึมแบบออกซิเดชัน โดยการกระตุ้นของเอนไซม์ CYP3A4 แล้วเปลี่ยนเป็นเมแทบอลไลต์ resorufin ที่สามารถตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดเชิงแสงแบบฟลูออเรสเซนซ์ [12, 14] สภาวะที่เหมาะสมในการศึกษาฤทธิ์ของเอนไซม์บนอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ มีดังนี้ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที ตรวจวัดด้วยการถ่ายภาพโดยกล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ที่มีขนาดเล็กและพกพาได้แล้ววิเคราะห์ภาพถ่ายเชิงปริมาณด้วยโปรแกรม ImageJ และประเมินความถูกต้องของวิธี โดยมีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของ resorufin benzyl ether ในช่วงความเข้มข้น 2.5-15 ไมโครโมลาร์ที่มี $y = 0.7023x + 8.7713$, $r^2 = 0.9959$ ความแม่นยำที่วิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและระหว่างวันมีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์น้อยกว่าร้อยละ 5.2 วิธีมีความถูกต้องเมื่อเปรียบเทียบกับไมโครเพลทบนแผ่นกระดาษโดยใช้ t-test ($P < 0.05$) ลิมิตการตรวจหา 0.23 ไมโครโมลาร์ และลิมิตการวิเคราะห์ปริมาณ 0.71 ไมโครโมลาร์ (ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์น้อยกว่าร้อยละ 6.9)

เนื่องด้วยเอนไซม์ในรูปแบบอิสระมีความคงตัวต่ำ จึงพัฒนาตำรับ sol-gel สำหรับการ immobilize เอนไซม์ เพื่อให้มีความคงตัวเพิ่มขึ้น ตำรับ sol-gel ที่เหมาะสมประกอบด้วย Ludox® colloidal silica ความเข้มข้น 8.3 โมลาร์ และ silicate solution 0.125 โมลาร์ ในอัตราส่วน 1:1 ปรับให้ได้ pH 7.4 จากนั้นนำ sol-gel ที่ได้ผสมกับเอนไซม์ในอัตราส่วน 95:5 ก่อนที่จะนำไปเคลือบลงบนกระดาษ และทำการศึกษาความคงตัวที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าสัปดาห์ที่ 2 และ 3 เอนไซม์ที่ถูก immobilize ใน sol-gel ยังมีฤทธิ์ร้อยละ 90.2 และ 86.8 ตามลำดับ ขณะที่เอนไซม์รูปแบบอิสระมีฤทธิ์เพียงร้อยละ 42.9 และ 14.9 ตามลำดับ เมื่อนำอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษที่พัฒนาขึ้นไปทดสอบกับสารละลายยาและสารสกัดสมุนไพรทั้งหมด 6 ชนิด ซึ่งเป็นยาและสารสกัดสมุนไพรที่มีรายงานว่าออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP3A4 ได้แก่ ketoconazole สารสกัด *Areca catechu*, *Eclipta prostrata*, *Camellia sinensis* และยาที่ออกฤทธิ์เหนี่ยวนำเอนไซม์ CYP3A4 ได้แก่ phenytoin, carbamazepine พบว่าได้ผลเช่นเดียวกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ใช้วิธีวิเคราะห์แบบดั้งเดิม แสดงว่า อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษที่พัฒนาขึ้นมามีแนวโน้มที่จะนำมาใช้ใน

การศึกษาเอนไซม์ CYP450 ไอโซไซม์อื่นๆ เพื่อใช้ในการประเมินสารสังเคราะห์หรือสารสกัดสมุนไพรที่มีแนวโน้มเป็นยา

เนื่องจากกล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนส์มีข้อจำกัดของแหล่งกำเนิดแสงที่มี LEDs เพียง 1 ชนิดเท่านั้น จึงขอเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคตให้พัฒนาระบบการตรวจวัดทดแทนการใช้กล้องจุลทรรศน์ โดยในระบบควรมี LEDs หลายสีเป็นแหล่งกำเนิดแสง เพื่อจะได้ครอบคลุมช่วงความยาวคลื่นได้กว้าง ทำให้นำไปประยุกต์ใช้งานที่ต้องการตรวจวัดแสงฟลูออเรสเซนส์ได้หลากหลายมากขึ้น สำหรับการวัดเชิงปริมาณสามารถใช้โทรศัพท์มือถือในการถ่ายภาพทดแทนการถ่ายภาพโดยกล้องจุลทรรศน์ก่อนจะนำไปวิเคราะห์ความเข้มข้น

เอกสารอ้างอิง

1. Galetin A, Ito K, Hallifax D, Houston JB. CYP3A4 substrate selection and substitution in the prediction of potential drug-drug interactions. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2005;314(1):180-90.
2. Zhou S, Gao Y, Jiang W, Huang M, Xu A, Paxton JW. Interactions of herbs with cytochrome P450. *Drug Metabolism Reviews*. 2003;35(1):35-98.
3. Cho H-J, Yoon I-S. Pharmacokinetic interactions of herbs with cytochrome P450 and P-glycoprotein. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2015;2015:10.
4. Mu X, Zhang L, Chang S, Cui W, Zheng Z. Multiplex microfluidic paper-based immunoassay for the diagnosis of hepatitis C virus infection. *Anal Chem*. 2014;86(11):5338-44.
5. Jayawardane BM, Wei S, McKelvie ID, Kolev SD. Microfluidic Paper-Based Analytical Device for the Determination of Nitrite and Nitrate. *Anal Chem*. 2014;86(15):7274-9.
6. Yamada K, Takaki S, Komuro N, Suzuki K, Citterio D. An antibody-free microfluidic paper-based analytical device for the determination of tear fluid lactoferrin by fluorescence sensitization of Tb3+. *Analyst*. 2014;139(7):1637-43.
7. Li X, Ballerini DR, Shen W. A perspective on paper-based microfluidics: Current status and future trends. *Biomicrofluidics*. 2012;6(1):11301-1130113.
8. Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & Therapeutics*. 2013;138(1):103-41.
9. Baranczewski P, Stanczak A, Sundberg K, Svensson R, Wallin A, Jansson J, et al. Introduction to in vitro estimation of metabolic stability and drug interactions of new chemical entities in drug discovery and development. *Pharmacol Rep*. 2006;58(4):453-72.
10. de Wildt S, Kearns G, Leeder JS, van den Anker J. Cytochrome P450 3A. *Clin Pharmacokinet*. 1999;37(6):485-505.
11. Drug Development and Drug Interactions: Table of Substrates, Inhibitors and Inducers [Available from: <http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DevelopmentResources/DrugInteractionsLabeling/ucm093664.htm>.
12. Jurica J, Sulcova A. Determination of cytochrome P450 metabolic activity using selective markers. In: Paxton J, editor. *Topics on drug metabolism*: InTech; 2012. p. 191-220.
13. Johansson M, Tomankova J, Li S, Zamaratskaia G. Simultaneous determination of cytochrome P450 1A, 2A and 3A activities in porcine liver microsomes. *Interdiscip Toxicol*. 2012;5(3):150-4.
14. Stresser DM, Turner SD, Blanchard AP, Miller VP, Crespi CL. Cytochrome P450 fluorometric substrates: identification of isoform-selective probes for rat CYP2D2 and human CYP3A4. *Drug Metab Dispos*. 2002;30(7):845-52.
15. Nomeir AA, Ruegg C, Shoemaker M, Favreau LV, Palamanda JR, Silber P, et al. Inhibition of CYP3A4 in a rapid microtiter plate assay using recombinant enzyme and in human liver microsomes using conventional substrates. *Drug Metab Dispos*. 2001;29(5):748-53.
16. Jerdi MC, Daali Y, Oestreicher MK, Cherkaoui S, Dayer P. A simplified analytical method for a phenotyping cocktail of major CYP450 biotransformation routes. *J Pharm Biomed Anal*. 2004;35(5):1203-12.

17. Prueksaritanont T, Ma B, Yu N. The human hepatic metabolism of simvastatin hydroxy acid is mediated primarily by CYP3A, and not CYP2D6. *Br J Clin Pharmacol.* 2003;56(1):120-4.
18. Nicoli R, Bartolini M, Rudaz S, Andrisano V, Veuthey JL. Development of immobilized enzyme reactors based on human recombinant cytochrome P450 enzymes for phase I drug metabolism studies. *J Chromatogr A.* 2008;1206(1):2-10.
19. Foti RS, Rock DA, Wienkers LC, Wahlstrom JL. Selection of Alternative CYP3A4 Probe Substrates for Clinical Drug Interaction Studies Using In Vitro Data and In Vivo Simulation. *Drug Metab Dispos.* 2010;38(6):981-7.
20. Sakai-Kato K, Kato M, Homma H, Toyo'oka T, Utsunomiya-Tate N. Creation of a P450 Array toward High-throughput Analysis. *Anal Chem.* 2005;77(21):7080-3.
21. Klasner Sa, Price AK, Hoeman KW, Wilson RS, Bell KJ, Culbertson CT. Paper-based microfluidic devices for analysis of clinically relevant analytes present in urine and saliva. *Anal Bioanal Chem.* 2010;397(5):1821-9.
22. Tee-ngam P, Nunant N, Rattanarat P, Siangproh W, Chailapakul O. Simple and rapid determination of ferulic acid levels in food and cosmetic samples using paper-based platforms. *Sensors.* 2013;13(10):13039-53.
23. Ellerbee AK, Phillips ST, Siegel AC, Mirica Ka, Martinez AW, Striehl P, et al. Quantifying colorimetric assays in paper-based microfluidic devices by measuring the transmission of light through paper. *Anal Chem.* 2009;81(20):8447-52.
24. Curto VF, Lopez-Ruiz N, Capitan-Vallvey LF, Palma AJ, Benito-Lopez F, Diamond D. Fast prototyping of paper-based microfluidic devices by contact stamping using indelible ink. *RSC Adv.* 2013;3(41):18811-6.
25. Dungchai W, Chailapakul O, Henry CS. A low-cost, simple, and rapid fabrication method for paper-based microfluidics using wax screen-printing. *Analyst.* 2011;136(1):77-82.
26. Taudte RV, Beavis A, Wilson-Wilde L, Roux C, Doble P, Blanes L. A portable explosive detector based on fluorescence quenching of pyrene deposited on coloured wax-printed μ PADs. *Lab Chip.* 2013;13(21):4164-72.
27. Jacques L, Thibaud C, Cécile R. Encapsulation of biomolecules in silica gels. *J Phys: Condensed Matter.* 2001;13(33):R673.
28. NIH 3D print exchange [cited 2016 20 Jun]. Available from: <http://3dprint.nih.gov/discover/3dpx/000430/x3d>.
29. Ahmmed SM, Mukherjee PK, Bahadur S, Harwansh RK, Kar A, Bandyopadhyay A, et al. CYP450 mediated inhibition potential of *Swertia chirata*: An herb from Indian traditional medicine. *J Ethnopharmacol.* 2016;178:34-9.
30. Yang Y, Noviana E, Nguyen MP, Geiss BJ, Dandy DS, Henry CS. Paper-based microfluidic devices: Emerging themes and applications. *Anal Chem.* 2017;89(1):71-91.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. การนำเสนอผลงานวิจัยในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

1.1 การนำเสนอแบบปากเปล่าเรื่อง A cost-effective alternative lab-on-paper for food and pharmaceutical applications ในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ the 13th Asian Conference on Analytical Sciences (ASIANALYSIS XIII) ณ the Empress International Convention Center จังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย ระหว่างวันที่ 8-11 ธันวาคม 2559

1.2 การนำเสนอแบบโปสเตอร์เรื่อง Low-cost and sensitive lab-on-paper-based devices for measurement of CYP3A4 activity ในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ Pittcon 2017 จัดที่ McCormick Place, Chicago, IL, USA ระหว่างวันที่ 5-9 มีนาคม 2560

2. Manuscript สำหรับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

2.1 Yanawut Manmana, Boonta Chutvirasakul, Leena Suntornsuk, Nantana Nuchtavorn*, Cost effective paper-based colorimetric devices for a simple assay of dopamine in pharmaceutical formulations using 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine – silver nitrate as a chromogenic reagent, Analytical Letters, impact factor 1.150 (submitted)*

*งานวิจัยนี้ใช้สารเคมีและอุปกรณ์ต่างๆที่ได้รับทุนสนับสนุนจาก สกว.

2.2 Nantana Nuchtavorn*, Jiraporn Leanpolchareanchai, Leena Suntornsuk, Paper-based sol-gel thin films immobilized cytochrome P450 for measurement of enzyme activity, (in preparation for submitting to Sensors and Actuators B: Chemical, impact factor 5.401)

3. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์เชิงวิชาการ

3.1 มีการพัฒนาการเรียนการสอนในระดับปริญญาตรีและบัณฑิตศึกษา ในหัวข้อต่อไปนี้

- การพัฒนาวิธีวิเคราะห์โดยใช้อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษ
- Microfabrication
- Microfluidics for pharmaceutical and biomedical applications

3.2 การสร้างนักวิจัยใหม่ โดยการให้คำแนะนำปรึกษาในการทำวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาค ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโทและเอก ดังนี้

- อาจารย์ที่ปรึกษาหลักวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท หัวข้อ Development of an integrated micro-solid phase extraction on microfluidic paper-based analytical devices
- อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาเอก หัวข้อ Development of microfluidic device based on polydiacetylene sensor and its applications for biomolecule detection

ทั้งนี้ได้ช่วยให้นักวิจัยรุ่นใหม่มีองค์ความรู้และระเบียบวิธีวิจัยโดยเฉพาะอย่างยิ่งงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาค เพื่อนำไปพัฒนาต่อยอดงานวิจัยในอนาคตได้

ภาคผนวก

1. การนำเสนอผลงานวิจัยในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

1.1 การนำเสนอแบบปากเปล่าเรื่อง A cost-effective alternative lab-on-paper for food and

pharmaceutical applications ในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ the 13th Asian Conference on Analytical Sciences (ASIANALYSIS XIII) ณ the Empress International Convention Center จังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย ระหว่างวันที่ 8-11 ธันวาคม 2559

A cost-effective alternative lab-on-paper for food and pharmaceutical applications

Nantana Nuchtavorn^{1*}, Mananya Laosuksakul¹, Jiraporn Leanpolchareanchai², Leena Suntornsuk¹

¹Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, 447 Sri-Ayudhaya Rd., Rajathevee, Bangkok 10400, Thailand

²Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, 447 Sri-Ayudhaya Rd., Rajathevee, Bangkok 10400, Thailand

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

Microfluidic analysis platforms are enabling technologies for portable, rapid and high throughput analysis. Lab-on-paper / paper-based microfluidic devices (μ PADs) are particularly attractive as a low cost, easy to fabricate and enabling a wide range of colorimetric and fluorometric assay applications. The fabrication relies on patterning hydrophobic regions on a hydrophilic filter paper in order to create reservoirs or capillary channels within impermeable fluidic brakes. We have fabricated several designs of μ PADs either by a desktop digital craft plotter/cutter with technical drawing pens, or wax printer. With these devices, assays can be performed within minutes to an hour to allow for quantitative colorimetric/fluorometric analysis by use of a microplate reader or a camera phone/handheld fluorescence microscope with ImageJ to measure color intensity. These methods found applicability in the areas of food and pharmaceutical analysis i.e. determination of active pharmaceutical ingredients (e.g. paracetamol, salicylic acid, memantine and phenytoin) in dosage forms and screening of antioxidant activity in food and cytochrome P450 activity of potential drug candidates. The developed μ PADs provides short fabrication time, simplicity and low cost and have capability for determining a variety of analytes.

Keywords portable; paper-based microfluidics; food, pharmaceuticals

1.2 การนำเสนอแบบโปสเตอร์เรื่อง Low-cost and sensitive lab-on-paper-based devices for measurement of CYP3A4 activity ในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ Pittcon 2017 จัดที่ McCormick Place, Chicago, IL, USA ระหว่างวันที่ 5-9 มีนาคม 2560

Low-cost and sensitive lab-on-paper-based devices for measurement of CYP3A4 activity

Nantana Nuchtavorn^a, Mananya Laosuksakul^a, Jiraporn Leanpolchareanchai^b, Leena Suntornsuk^a

^a *Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, 447 Sri-Ayudhaya Rd., Rajathevee, Bangkok 10400, Thailand*

^b *Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, 447 Sri-Ayudhaya Rd., Rajathevee, Bangkok 10400, Thailand*

Email: nantana.nuc@mahidol.ac.th

Lab-on-paper-based devices or paper-based microfluidic devices (μ PADs) have emerged as inexpensive, disposable and portable analytical platforms for achieving rapid quantitative measurements of various analytes. Fabrication of μ PADs relies on patterning hydrophilic-hydrophobic regions on a sheet of paper. 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 CYP3A4 activity using resorufin benzyl ether as an enzyme substrate. Since CYP3A4 is the most abundantly expressed CYP450 isozymes and it has also been involved in the drug metabolism as well as 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 using the fluorescent detection at excitation/emission wavelength of 570/600 nm, on μ PADs format provided comparable results with those obtained from plastic 96-well plates. However, μ PADs offered higher sensitivity than well plates due to the greater facilitating the enzymatic reaction. Moreover, μ PADs (cost~\$0.1/ μ PAD) is more cost effective than plastic well plates (cost~\$2.6/plate). The optimal condition was then transfer to determine the enzyme activity on μ PADs using handheld fluorescence microscope. The fluorescence intensity can be accurately quantified by taking a photo of the test zone measuring the intensity by image analysis freeware (ImageJ). The limit of quantitation was 0.71 μ M with good precision (RSDs < 5.2%). Moreover, CYP3A4 was immobilized in sol-gel formulation containing 8.3 M Ludox[®] TM-50 colloidal silica and 0.125 M sodium silicate solution with the ratio of 1:2, then coated on μ PADs. The immobilized enzyme was stable for at least 1 week at 4°C, which offered an increased storage stability comparing to the free solution. The developed μ PADs provide simplicity, low cost and portability and approaches green analytical chemistry. The method would be useful for assessment of potential new drug candidates.

Low-cost and sensitive lab-on-paper-based devices for measurement of CYP3A4 activity

Nantana Nuchtavorn^a, Mananya Laosuksakul^a, Jiraporn Leanpolchareanchai^b, Leena Suntornsuk^a

^aDepartment of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, 447 Sri-Ayudhaya Rd., Rajathevee, Bangkok 10400, Thailand

^bDepartment of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, 447 Sri-Ayudhaya Rd., Rajathevee, Bangkok 10400, Thailand

*Email: nantana.nuc@mahidol.ac.th

Introduction

Cytochrome P450 (CYP450) enzymes are the main enzymes that catalyze drug and other xenobiotics metabolism. The most abundant CYP450 isoenzyme is CYP3A4, which metabolize about 50% of all drugs available in the markets. It also plays roles in clinical drug-drug interaction. Measurement of CYP450 activity is essential at an early stage of drug discovery. Paper-based microfluidic devices (μ PADs) in a 96-well format was developed for the enzyme assay because of its low-cost, portability and low reagent consumption.

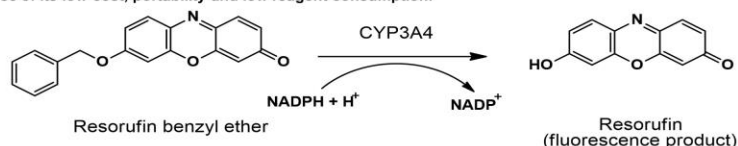


Figure 1 Metabolism of CYP3A4 using resorufin benzyl ether as a substrate

Objectives

- To develop μ PADs coated with CYP3A4 entrapping film and a microscope-based optical detection
- To validate the developed method based on μ PADs
- To assess the stability of μ PADs coated with CYP3A4 entrapping

Fabrication method

The 96-well pattern were drawn using Microsoft® Powerpoint and printed on quantitative filter paper by wax printer (Fuji Xerox Colorcube 8870). The printed papers were then heated in order to make wax penetrating through paper and create the fluidic brakes.

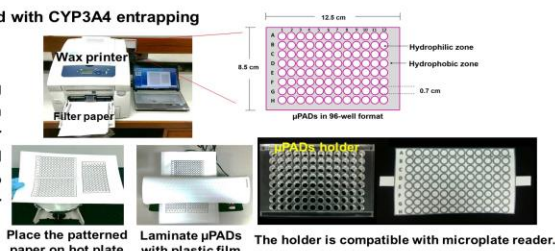


Figure 2 Design and fabrication of μ PADs in 96-well format

Results and Discussion

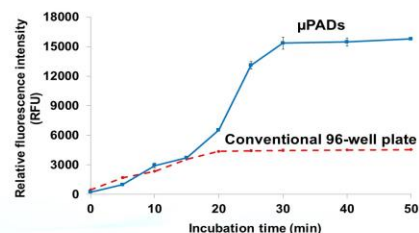


Figure 3 Comparison of the measurement of CYP3A4 activity on conventional 96-well plate (plastic plate) and μ PADs using microplate reader

Optimal conditions : 50 mM phosphate buffer (pH 7.4) containing 0.1 mM dithiothreitol, 0.13 mM β -NADPH, 0.02% poloxamer, 5 μ M resorufin benzyl ether, incubation at 37 $^{\circ}$ C, fluorescence detection at λ_{ex} 570 nm and λ_{em} 600 nm.

The enzyme activity on μ PADs was superior to the conventional 96-well plate due to the high surface to volume ratio of the paper. Therefore, substrate could penetrate through pores of paper to bind enzyme, resulting in the enhanced enzyme activity.

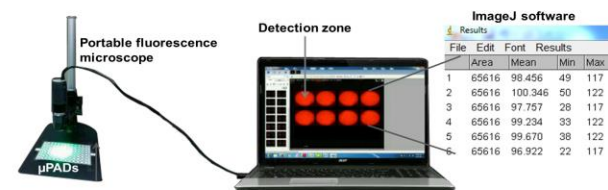


Figure 4 Measurement of CYP3A4 activity using portable fluorescence microscope

The optimized μ PADs condition was transferred to measure CYP3A4 activity using portable fluorescence microscope. The images taking by the microscope were analyzed by the ImageJ software (Figure 4).

The developed method was validated in term of linearity, precision, LOD and LOQ. Responses were linear with $r^2 = 0.9959$ in range of 2.5-15 μ M of resorufin benzyl ether. Precisions showed RSDs of $\leq 5.2\%$. The LOD and LOQ were 0.23 μ M and 0.71 μ M, respectively.

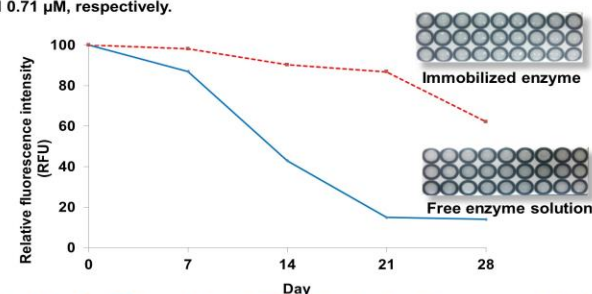


Figure 5 Stability study of μ PADs coated with CYP3A4 entrapping film compared with free enzyme solution

CYP3A4 was immobilized in sol-gel formulation containing 8.3 M Ludox® TM-50 colloidal silica and 0.125 M sodium silicate solution with the ratio of 1:2, then coated on μ PADs.

The immobilized enzyme offered an increased storage stability at 4 $^{\circ}$ C comparing with the free enzyme solution.

Conclusions

The developed μ PADs provide simplicity, low cost (cost-\$0.1/ μ PAD) and portability and approaches green analytical chemistry. The method would be useful for assessment of potential new drug candidates.

Acknowledgements

This work was financially supported by the Thailand Research Fund, the Office of the Higher Education Commission (Thailand) and Mahidol University through Research Grant for New Scholar (Grant No. MRG5980063) and Faculty of Pharmacy, Mahidol University.

References

1. Zanger U.M., Schwab M., Pharmacol. Ther. 138 (2013) 103-141.
2. Baranczewski P., Stanczak A., Sundberg K., Svensson R., Wallin A., Jansson J., Garberg P., Postlind H., Pharmacol. Rep. 58 (2006) 453-472.



2. Manuscript สำหรับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

2.1 Yanawut Manmana, Boonta Chutvirasakul, Leena Suntornsuk, Nantana Nuchtavorn*, Cost effective paper-based colorimetric devices for a simple assay of dopamine in pharmaceutical formulations using 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine – silver nitrate as a chromogenic reagent, Analytical Letters, impact factor 1.150 (submitted)

2.2 Nantana Nuchtavorn*, Jiraporn Leanpolchareanchai, Leena Suntornsuk, Paper-based sol-gel thin films immobilized cytochrome P450 for measurement of enzyme activity, (in preparation for submitting to Sensors and Actuators B: Chemical, impact factor 5.401)

Cost effective paper-based colorimetric devices for a simple assay of dopamine in pharmaceutical formulations using 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine – silver nitrate as a chromogenic reagent

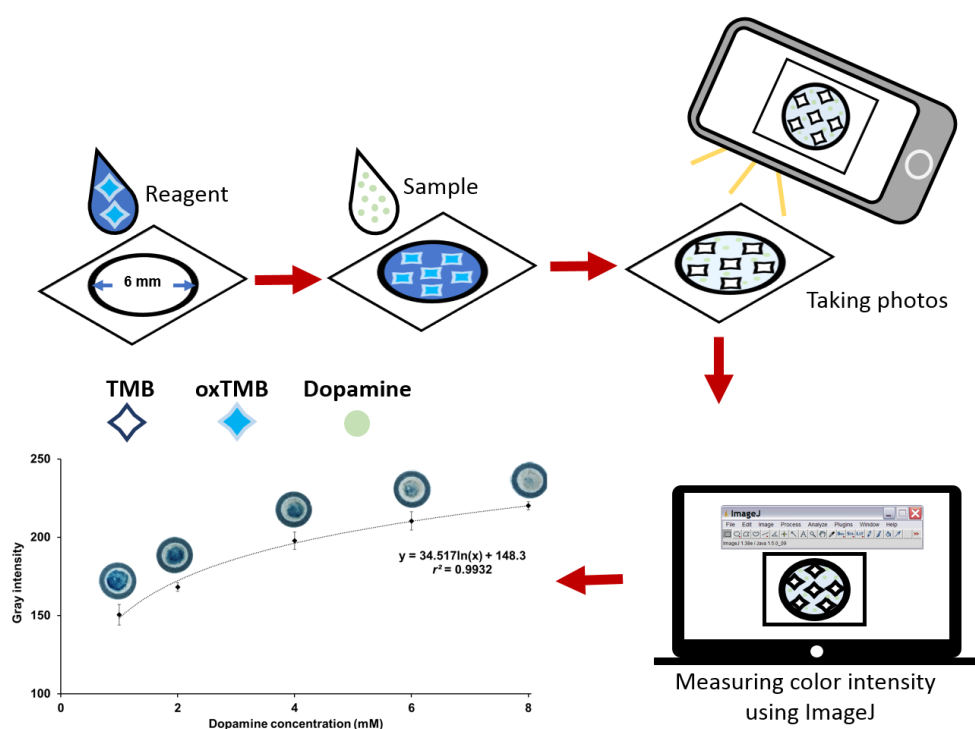
Yanawut Manmana,^a Boonta Chutvirasakul,^{a,b} Leena Suntornsuk,^a Nantana Nuchtavorn^{a*}

^aDepartment of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, 447 Sri-Ayudhaya Rd., Rajathevee, Bangkok 10400, Thailand

^bDepartment of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Srinakharinwirot University, 63 Moo 7 Rangsit-Nakornnayok Rd., Ongkharak, Ongkharak, Nakornnayok 26120, Thailand

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

Graphical abstract



Abstract

Paper-based devices using smartphone-based detection has been widely used for colorimetric analysis due to its simplicity, ease of operation, and handheld capability. Here, we present a simple and low-cost colorimetric measurement of dopamine on paper-based devices, which was based on the 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB)-silver nitrate redox reaction. In the presence of dopamine, the detection mechanism was based on the decrease blue color of the oxidized TMB according to the reduction of the oxidized TMB and the binding of dopamine to silver ions. The responses were fit to the logarithmic curve with r^2 of 0.9932. The method shows good precision (%RSD<6.6%), and recovery (92.8-106.2%) with the detection limit of <0.6 mM. The method did not require any complex or time-consuming preparation and was successfully employed for the determination of dopamine injections. This work shows the potential of paper-based devices with the smartphone as convenient and low-cost methods for the quality control of pharmaceutical products, which could be an alternative for resource-limited setting.

Keywords: dopamine; 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB); paper-based devices; colorimetry

Introduction

Dopamine belongs to a group of catecholamine neurotransmitters which plays an important role in mammalian cardiovascular, endocrine and central nervous system (CNS).¹ Several disorders of the nervous system are associated with the disturbances of dopamine transmission including Parkinson's disease, depression, and schizophrenia.²⁻³ Therefore, determination of dopamine in biological fluids has a great importance for clinical purposes. Moreover, dopamine hydrochloride intravenous injection has been prescribed for the treatment of the shock syndrome due to various serious conditions such as low blood pressure, myocardial infarction, trauma and renal failure.⁴⁻⁵ Hence, efficient analytical methods for quality control of dopamine dosage forms is mandatory. The United States and British Pharmacopeias recommend non-aqueous titration for the assay of dopamine in raw material and high performance liquid chromatography (HPLC) for the assay of dopamine injections.⁶⁻⁷ In addition, several analytical methods have been investigated for determination of dopamine in biological fluids and pharmaceutical products e.g. spectrophotometry,⁸ fluorescence,⁹ electrochemistry,¹⁰ chemiluminescence,¹¹ electroluminescence,¹² capillary electrophoresis-electrochemical detection (ECD),¹³ and HPLC-ECD/fluorescence detection.¹⁴ These methods are time consuming, high cost and require skilled operators, complicated maintenance. Thus, a simple, rapid and low-cost method for determination of dopamine becomes essential.

Microfluidic paper-based analytical devices were firstly introduced by Whiteside group,¹⁵ which have gained attention due to their simplicity, low-cost, low reagent and sample consumption, portability and disposability.¹⁶⁻¹⁸ Several detection techniques have been implemented to paper-based devices i.e. colorimetry, fluorescence, electrochemistry, electrochemiluminescence, and chemiluminescence.¹⁹⁻²³ Among these detection techniques, the colorimetric detection is the most commonly used because it is

easy to perform and requires simple equipment.¹⁸ The color products can be visually observed or quantitated using a smartphone or a scanner to take the images of the colored area and analyzing by image processing software.²⁴ ImageJ is an image analysis freeware developed by National Institutes of Health (NIH) which can be used to convert RGB to grayscale images. Then, the mean grayscale intensities are plotted against the analyte concentration.

A simple colorimetric method for the determination of dopamine has been reported, which based on the 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB)-silver nitrate (AgNO_3) redox reaction.²⁵ Subsequently, the blue color solution was generated from the oxidized TMB (oxTMB). The presence of dopamine could cause the fading of the blue color that can be quantitatively measured by UV-Vis spectrophotometer.²⁵ Herein, we demonstrate a simple and low-cost paper-based device using the colorimetric reaction of AgNO_3 -TMB for the measurement of dopamine in pharmaceutical formulations. Then, a smartphone photograph of colored areas was taken and analyzed by ImageJ. Up to the present, colorimetric measurement of dopamine on paper-based devices based on the TMB- AgNO_3 redox reaction has not been reported.

Experimental

Chemicals

TMB, 3-hydroxytyramine hydrochloride (dopamine hydrochloride) and dimethylsulfoxide (DMSO) were purchased from Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan). AgNO_3 was obtained from POCH (Gliwice, Poland). Acetic acid was purchased from RCI Lab scan (Bangkok, Thailand). Sodium acetate was obtained from Ajax Finechem (New South Wales, Australia). All chemicals were of analytical grade. Sterile water was purchased from Thai Nakorn Pattana (Nonthaburi, Thailand). Whatman[®] filter paper

No.1 was supplied by GE Healthcare Life Sciences (Chicago, USA) and laminating film with the thickness of 125 μm was purchased from HIC (Osaka, Japan).

Stock solutions of 40 mM TMB and 40 mM AgNO_3 was separately prepared by dissolving 0.0481 g TMB and 0.0339 g AgNO_3 in 5 mL DMSO and sterile water, respectively. The stock standard solution of dopamine was prepared by dissolving 0.0189 g dopamine in 10 mL sterile water (10 mM). Working standard solutions were diluted from the stock solution with water to obtain 1-8 mM dopamine. The stock solutions were protected from light and stored at room temperature, while the stock solution of dopamine was kept at 4° C.

Fabrication of paper-based devices

Fabrication of paper-based devices relies on patterning of hydrophilic-hydrophobic regions on a Whatman[®] paper in order to create capillary channels or reservoirs on the paper.¹⁸ The patterns of paper-based devices were drawn using Microsoft[®] PowerPoint software. Whatman[®] qualitative filter paper sheet grade 1 with pore size of 11 μm and thickness of 180 μm was cut into the A4 size (21.0 x 29.7 cm). The designed paper featuring a number of circular shapes with a diameter of 6 mm and line thickness of 0.8 mm (2.25 pt) was printed on the filter paper (ca 300 circular shapes/A4 paper size) using Fuji Xerox[®] Colorcube8870 wax printer (Bangkok, Thailand). Subsequently, the patterned paper was heated on a hot plate for 5 min to allow the wax to penetrate through the paper. Finally, the paper-based devices were laminated underneath with a clear laminating film (Fig. S1).

Determination of dopamine on paper-based devices

Firstly, 100 μL of 40 mM TMB and 100 μL of 40 mM AgNO_3 were mixed in 300 μL of 0.2 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) and vortexed for 1 min. Then, 5 μL of the mixture

was added to the reservoir on the paper-based devices using micropipette and allowed to dry for 3 min using a hair dryer. Next, 3 μ L of dopamine solution was added and dried for 3 min. After 12 min (total reaction time of 15 min), a color change on the paper-based devices was visually observed and photos of the colored areas were taken in a light box using smartphone camera (Samsung Galaxy A7 (2015) model (Seoul, the Republic of Korea)). The setup for taking photo including the position of the desk lamps, the paper-based devices and smartphone was fixed in order to control the light intensity for reproducible measurement (Fig. S2). Then, the images were converted to grayscale and the color intensity was analyzed using the freeware ImageJ (version 1.51g).

Various parameters affecting the dopamine determination on paper-based devices were investigated including the concentrations of TMB (5 – 10 mM), reaction times (3 – 23 min), and stoichiometric ratios of TMB and AgNO_3 (1:3, 1:2, 3:4, 1:1, 4:3, 2:1). The optimized condition was evaluated from the color intensity and the stability of the color product.

Method validation

The optimized condition for the analysis of dopamine on the paper-based devices was validated in terms of accuracy, precision, limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ). A calibration curve fitted to a logarithmic model was established by plotting the gray intensity against five different concentrations of dopamine (1-8 mM). Triplicate analyses were done for each concentration. Method precision was determined from intra-day (n=3) and inter-day (n=3) experiments, calculated from the relative standard deviations (RSDs) of the gray intensity. Recovery of the method was estimated by spiking different concentrations (80, 100, 120 percent of nominal concentration, 1 mM

dopamine) into the sample solutions (n=3). The LOD and LOQ were based on the gray intensity of blank and SD of blank, which were calculated from eq. 1 and eq. 2.²⁶

$$\text{LOD} = 3.3\text{SD}_{\text{blank}} + \text{gray intensity of blank} \quad (1)$$

$$\text{LOQ} = 10\text{SD}_{\text{blank}} + \text{gray intensity of blank} \quad (2)$$

Applications

The validated method was applied for the assay of two strengths of dopamine injections (10 and 25 mg/mL). Sample solutions were freshly prepared by pipetting 303 μL and 153 μL of 10 and 25 mg/mL dopamine injections, respectively into a 5-mL volumetric flask and adjusted to volume with water. Then, 3 μL of sample solution was added on the paper based-device.

Results and discussion

Determination of dopamine on paper-based devices

The determination of dopamine based on the TMB- AgNO_3 redox reaction using UV-Vis spectrophotometry has been demonstrated by Zhu et al.²⁵ Firstly, the oxidation of TMB by silver ions yielded the blue charge-transfer complex of diamine in TMB and the diimine in the oxidation product (oxTMB)²⁷, which can be observed by naked eyes and can be quantitatively measured using spectrophotometry at the wavelength of 655 nm. Subsequently, the color of the reaction mixture from colorless to blue was observed. Then, addition of dopamine resulted in the fading of blue color because it acted as the reducing agent to oxTMB (Fig. 1). In the presence of dopamine, the absorbance gradually decreased with an increasing concentration of dopamine. However, transferring the UV-Vis spectrophotometric condition to the paper-based devices could not be achieved because of the lower capacity of the reservoirs on the paper. The mass of reagents (TMB

and AgNO₃) and dopamine on the paper reservoirs were 19-25 times and 5 times fewer than those in the spectrophotometry, which were insufficient to produce the blue colored product on the paper. Therefore, factors affecting the colorimetric reaction on the paper-based devices were further investigated.

Effects of TMB concentrations

Initially, 1 mM TMB and 0.75 mM AgNO₃ (stoichiometric ratio of 4:3) was utilized in the reaction mixture in order to produce the blue charge-transfer complex. The blue color intensity on the paper-based devices was directly proportional to the amounts of oxTMB. However, the blue color was not observed when the concentrations of TMB were less than 1 mM. Therefore, varying TMB concentrations to 5-40 mM with 3.75-30 mM AgNO₃ using the constant stoichiometric ratio of 4:3 was investigated. After the addition of 5 μ L of TMB and AgNO₃ mixture, the reaction zone was dried with the hair dryer for 3 min. The images of the colored areas were taken at 3 to 60 min in order to investigate the color stability since TMB is light and air sensitive.²⁸ The photos taken by the smartphone camera were converted from red, green, blue (RGB) color to grayscale mode by the ImageJ software, which has the intensity in the range of 0-255. The display intensity of zero represents that the image is totally dark, while the completely bright image possesses the intensity of 255. Fig. 2 shows the effects of TMB concentrations on the blue color complex, it was found that the color intensity of blue charge transfer complex obtained from the low concentrations of TMB (5 - 10 mM) significantly decreased over time from 216.31 $\pm$ 1.73 to 248.78 $\pm$ 0.45 for 5 mM TMB and from 178.63 $\pm$ 0.69 to 242.46 $\pm$ 0.41 for 10 mM TMB. The decreasing rates were 0.4%/min and 0.9%/min for 5 and 10 mM TMB, respectively. Whereas the reaction mixture containing TMB concentrations in the range of 20-40 mM offered the stable color product for

approximately 30 min with the remaining color intensity of 91.8- 97.9%. Then, the intensity slightly decreased about 6.7-14.7% during 30 - 60 min with the rate of 0.1-0.3%/min. TMB at the concentration of 40 mM was selected as the optimal concentration for further optimization since it provided the highest blue intensity.

Effects of reaction times

Effects of reaction times on the colorimetric measurement of dopamine using TMB- AgNO_3 redox reaction was investigated. The mixture of 40 mM TMB and 30 mM AgNO_3 (5 μL) was added into the reservoirs and the photos were taken after the addition of 1 mM dopamine (3 μL) from 3 to 23 min. The gray intensity showed a gradual increase from 3-11 min and the maximum color intensity was obtained during 15-23 min. Therefore, 15 min was selected as the optimized reaction time.

Stoichiometric ratios of TMB and AgNO_3

TMB is a chromogenic substrate that can be readily oxidized by AgNO_3 , to form the blue charge-transfer complex between the neutral amine (TMB) as a donor and diiminium structure (dication, oxTMB) as an acceptor via the π - π interaction (Fig. 1).²⁹ The proposed mechanism indicated that two moles of TMB requires one mole of AgNO_3 for the complete reaction. However, excessive amounts of AgNO_3 could be generated side products such as silver nanoparticle, which may interfere the blue color formation.²⁵ Stoichiometric ratios of TMB and AgNO_3 at 1:2, 3:4, 1:1, 4:3 and 2:1 were examined. The TMB: AgNO_3 of 2:1 provided the lower blue color product with the gray intensity of 150.8 ± 3.91 comparing with the ratio of 1:1 with the gray intensity of 117.3 ± 2.53 (Fig.4). The blue intensity rapidly increased when the ratio of TMB and AgNO_3 changed from 2:1 to 1:1 and remain stable at ratio of 3:4. When the stoichiometric ratio of TMB

and AgNO₃ was 3:4, the color change from blue to purple. With the excess amount of AgNO₃ may cause the conversion from the silver ions to the neutral silver. Subsequently, the silver aggregates into nanostructure possessed the purple color and could interfere the colorimetric assay.²⁵ Therefore, the stoichiometric ratio of 1:1 was selected as the optimal stoichiometric ratio. The optimal condition for the measurement of dopamine on paper-based devices was in 40 mM TMB and 40 mM AgNO₃ using the reaction time of 15 min after the introduction of dopamine on the paper-based device.

Method validation

A calibration curve was established by plotting the gray intensity against the dopamine concentration in the range of 1-8 mM. The responses fitted the logarithmic model with $r^2 = 0.9932$ (Fig.5). Precision, recovery, LOD, and LOQ of the developed method were evaluated (Table 1). The intra-day (n = 3) and inter-day (n = 9) precision showed RSDs of < 3.5% and < 4.4%, respectively. The LOD and LOQ calculated from eq.1 and 2 were 0.57 and 1.01 mM (RSDs of < 4.4%), respectively. The mean recoveries of dopamine (n = 3) was 99.9 with RSDs of < 6.8%. The recovery data indicates that there was no sample matrix effect on the quantitation of dopamine in the samples. The validation data shows that the method was appropriate for the analysis of dopamine in pharmaceutical formulations.

Applications

Applications of the developed method was illustrated in the assay of dopamine in pharmaceutical formulations. The method was applied to determine dopamine in injections with strengths of 10 and 25 mg/mL. Percent label amounts of the samples (n

= 3) were within 100.5-100.8% (RSDs <1.7%), which was in the USP limit of 95.0 – 105.0%.

Conclusions

Colorimetric assay on the paper-based devices for the determination of dopamine in pharmaceutical formulations using smartphone-based optical detection offers reliability, simplicity, low-cost, portability and environmentally friendliness. The cost of paper-based devices with the reagents for assay of dopamine in triplicate was approximately 0.04 USD. This method illustrates the TMB- AgNO_3 redox reaction on the paper-based devices that could be applied for the determination of various analytes e.g. thiols, epinephrine and norepinephrine. Also, the reaction product could be alternatively detected by an electrochemical detector, which is an alternative for paper-based devices. Furthermore, the method shows the potential for equipment-free detection because the chemical reaction on the paper is visible to naked eyes. The analytical platform is made from cellulosic material, which is compatible with many chemicals, easily functionalized and easy to store. Therefore, the devices can be used for other chemical reactions involving in the analytical methods. From practical aspect, the simple and reliable method using less equipment is desirable for the quality control of pharmaceutical products and also other analytical purposes in the resource-limited setting.

Acknowledgements

YM would like to acknowledge the Development and Promotion Of Science And Technology Talents project (DPST) scholarship for financial support. NN acknowledges the financial support from Faculty of Pharmacy, Mahidol University and the Thailand Research Fund, the Office of the Higher Education Commission (Thailand) and Mahidol University through Research Grant

for New Scholar (Grant No. MRG5980063). The technical support from Faculty of Pharmacy, Mahidol University is gratefully acknowledged.

References:

1. Wightman, R. M., May, L. J. and Michael, A. C., Detection of dopamine dynamics in the brain. *Anal Chem.* 1988, 60, 769A-793A.
2. Nieoullon, A., Dopamine and the regulation of cognition and attention. *Prog Neurobiol.* 2002, 67, 53-83.
3. Beaulieu, J. M. and Gainetdinov, R. R., The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev.* 2011, 63, 182-217.
4. Bryant, B. and Knights, K., *Pharmacology for health professionals*, 4 ed.; Elsevier Health Sciences, Melbourne, 2014.
5. Bhatt-Mehta, V. and Nahata, M. C., Dopamine and dobutamine in pediatric therapy. *Pharmacotherapy.* 1989, 9, 303-314.
6. Commission, B. P., *British pharmacopoeia 2017*, Stationery Office, London, 2016.
7. Convention, U. S. P., *Usp 29, nf 24: The united states pharmacopeia, the national formulary*, United States Pharmacopeial Convention, Maryland, 2005.
8. Chen, Z., Zhang, C., Zhou, T. and Ma, H., Gold nanoparticle based colorimetric probe for dopamine detection based on the interaction between dopamine and melamine. *Microchim Acta.* 2015, 182, 1003-1008.
9. Teng, Y., Jia, X., Li, J. and Wang, E., Ratiometric fluorescence detection of tyrosinase activity and dopamine using thiolate-protected gold nanoclusters. *Anal Chem.* 2015, 87, 4897-4902.
10. Suzuki, A., Ivandini, T. A., Yoshimi, K., Fujishima, A., Oyama, G., Nakazato, T., Hattori, N., Kitazawa, S. and Einaga, Y., Fabrication, characterization, and application of boron-doped diamond microelectrodes for in vivo dopamine detection. *Anal Chem.* 2007, 79, 8608-8615.
11. Sun, Y., Lin, Y., Ding, C., Sun, W., Dai, Y., Zhu, X., Liu, H. and Luo, C., An ultrasensitive and ultraselective chemiluminescence aptasensor for dopamine detection based on aptamers modified magnetic mesoporous silica @ graphite oxide polymers. *Sens Actuators B Chem.* 2018, 257, 312-323.
12. Li, L., Liu, H., Shen, Y., Zhang, J. and Zhu, J.-J., Electrogenerated chemiluminescence of au nanoclusters for the detection of dopamine. *Anal Chem.* 2011, 83, 661-665.
13. Wu, C.-C., Wu, R.-G., Huang, J.-G., Lin, Y.-C. and Chang, Three-electrode electrochemical detector and platinum film decoupler integrated with a capillary electrophoresis microchip for amperometric detection. *Anal Chem.* 2003, 75, 947-952.
14. Patel, B. A., Arundell, M., Parker, K. H., Yeoman, M. S. and O'Hare, D., Simple and rapid determination of serotonin and catecholamines in biological tissue using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2005, 818, 269-276.
15. Martinez, A. W., Phillips, S. T., Butte, M. J. and Whitesides, G. M., Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2007, 46, 1318-1320.
16. Martinez, A. W., Phillips, S. T., Whitesides, G. M. and Carrilho, E., Diagnostics for the developing world: Microfluidic paper-based analytical devices. *Anal Chem.* 2010, 82, 3-10.

17. Liana, D. D., Raguse, B., Gooding, J. J. and Chow, E., Recent advances in paper-based sensors. *Sensors (Basel)*. 2012, 12, 11505-11526.
18. Nuchtavorn, N. and Macka, M., A novel highly flexible, simple, rapid and low-cost fabrication tool for paper-based microfluidic devices (μ pads) using technical drawing pens and in-house formulated aqueous inks. *Anal Chim Acta*. 2016, 919, 70-77.
19. Dungchai, W., Chailapakul, O. and Henry, C. S., Use of multiple colorimetric indicators for paper-based microfluidic devices. *Anal Chim Acta*. 2010, 674, 227-233.
20. Taudte, R. V., Beavis, A., Wilson-Wilde, L., Roux, C., Doble, P. and Blanes, L., A portable explosive detector based on fluorescence quenching of pyrene deposited on coloured wax-printed μ pads. *Lab Chip*. 2013, 13, 4164-4172.
21. Li, L., Li, W., Yang, H., Ma, C., Yu, J., Yan, M. and Song, X., Sensitive origami dual-analyte electrochemical immunodevice based on polyaniline/au-paper electrode and multi-labeled 3d graphene sheets. *Electrochim Acta*. 2014, 120, 102-109.
22. Delaney, J. L., Hogan, C. F., Tian, J. and Shen, W., Electrogenerated chemiluminescence detection in paper-based microfluidic sensors. *Anal Chem*. 2011, 83, 1300-1306.
23. Zhou, F., Noor, M. O. and Krull, U. J., Luminescence resonance energy transfer-based nucleic acid hybridization assay on cellulose paper with upconverting phosphor as donors. *Anal Chem*. 2014, 86, 2719-2726.
24. Komatsu, T., Mohammadi, S., Busa, L. S. A., Maeki, M., Ishida, A., Tani, H. and Tokeshi, M., Image analysis for a microfluidic paper-based analytical device using the cie l*a*b* color system. *Analyst*. 2016, 141, 6507-6509.
25. Zhu, S., Yang, J., Zhao, X.-e., Kong, R., Wang, H. and You, J., Simple and fast determination of catecholamines in pharmaceutical samples using ag+-3,3',5,5'-tetramethylbenzidine as a colorimetric probe. *Anal Methods*. 2015, 7, 6785-6790.
26. Armbruster, D. A. and Pry, T., Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *Clin Biochem Rev*. 2008, 29, S49-S52.
27. Josephy, P. D., Eling, T. and Mason, R. P., The horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of 3,5,3',5'-tetramethylbenzidine. Free radical and charge-transfer complex intermediates. *J Biol Chem*. 1982, 257, 3669-75.
28. Frey, A., Meckelein, B., Externest, D. and Schmidt, M. A., A stable and highly sensitive 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine-based substrate reagent for enzyme-linked immunosorbent assays. *J Immunol Methods*. 2000, 233, 47-56.
29. Yang, J., Wang, H. and Zhang, H., One-pot synthesis of silver nanoplates and charge-transfer complex nanofibers. *J Phy Chem C*. 2008, 112, 13065-13069.

Table 1. Validation data

Precision (%RSD)			%Recovery (n = 3)					
Concentratio	Intra-	Inter-	LOD	LOQ	%Added			Average
n (mM)	day (n =	day	(mM)	(mM, n = 9)	80	100	120	
	3)	(n = 9)						(%RSD)
1	1.8	4.4						99.9 (6.8)
4	2.7	2.8	0.57	1.0 (4.4)	110.8	106.2	92.8	
8	1.1	1.2						

Figure 1. Mechanism of the TMB- AgNO_3 redox reaction for colorimetric measurement of dopamine.

Figure 2. Effects of TMB concentrations on the blue color of colorimetric probe and their color stability after exposed to the ambient atmosphere for 3-60 min: a) a photograph of the blue charge transfer complex on the paper-based device b) the remaining percentages of the blue color product.

Figure 3. Effects of the reaction times.

Figure 4. Effects of the stoichiometric ratios of TMB and AgNO_3 .

Figure 5. A calibration curve of dopamine.

Figure 1.

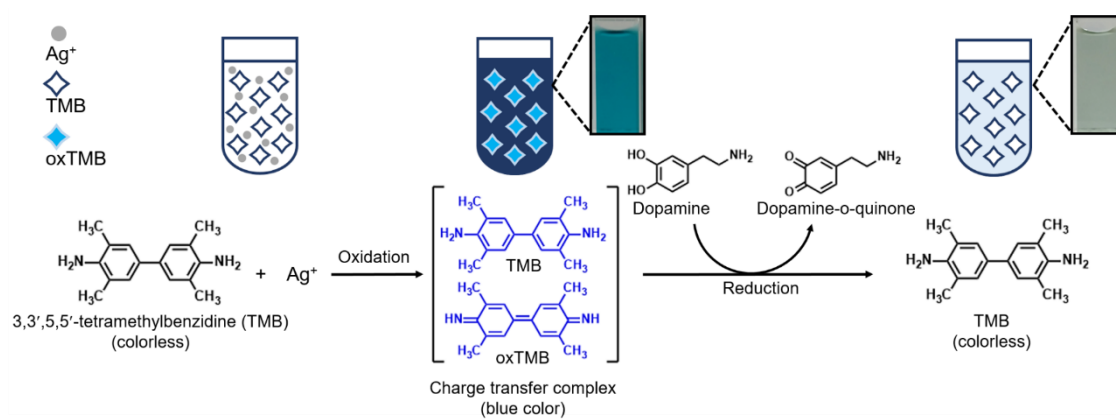
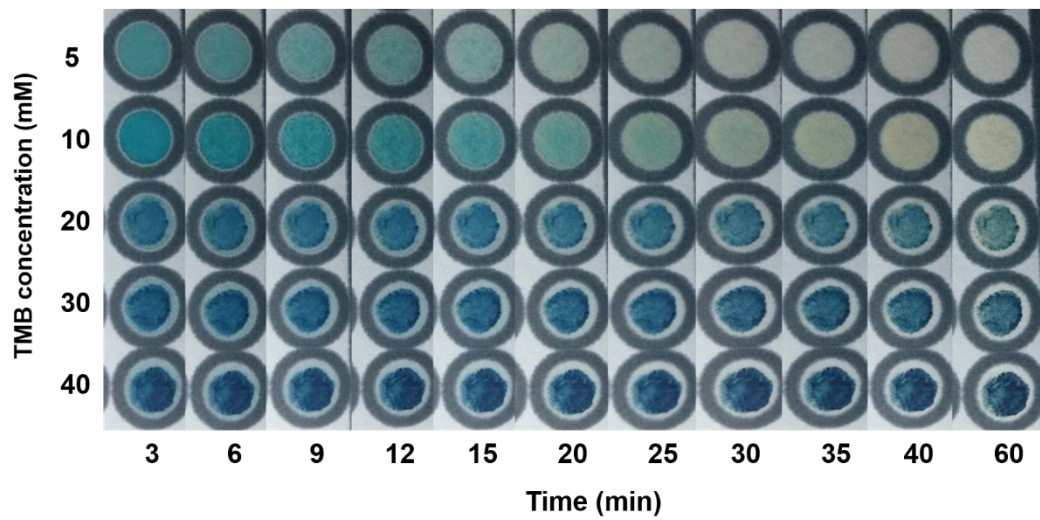


Figure 2.

a)



b)

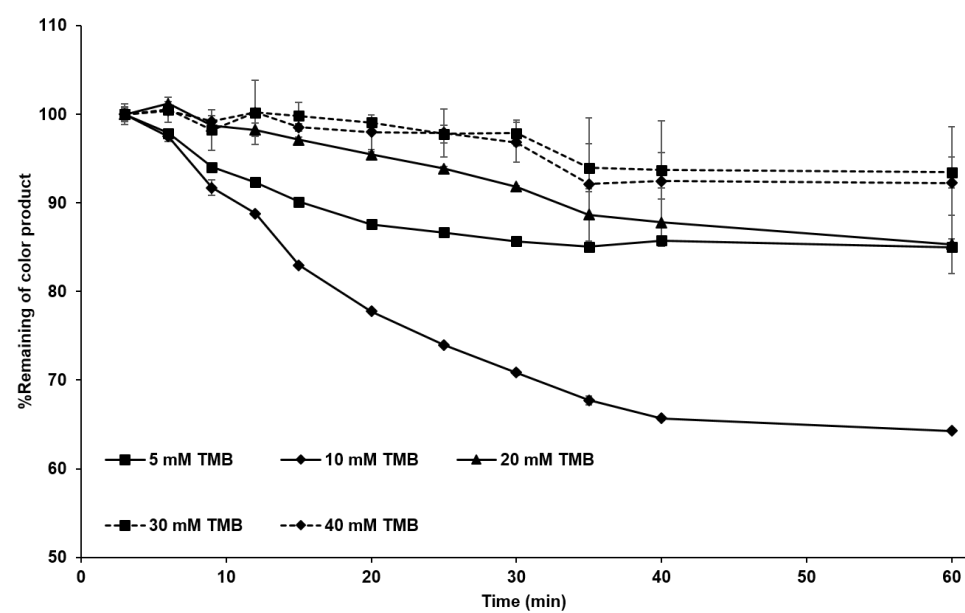


Figure 3.

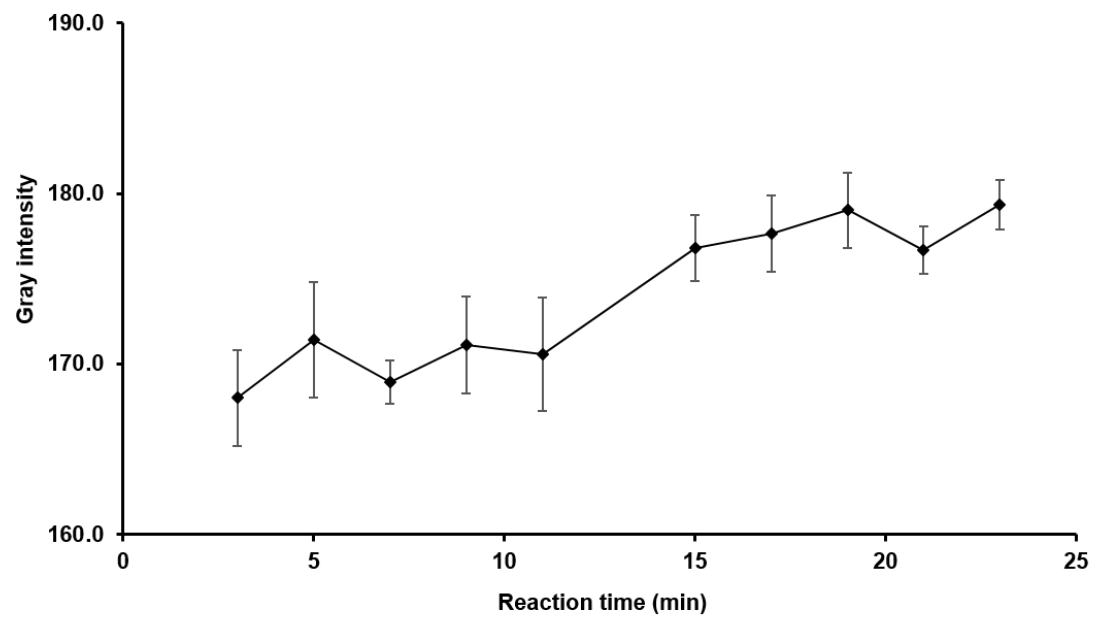


Figure 4.

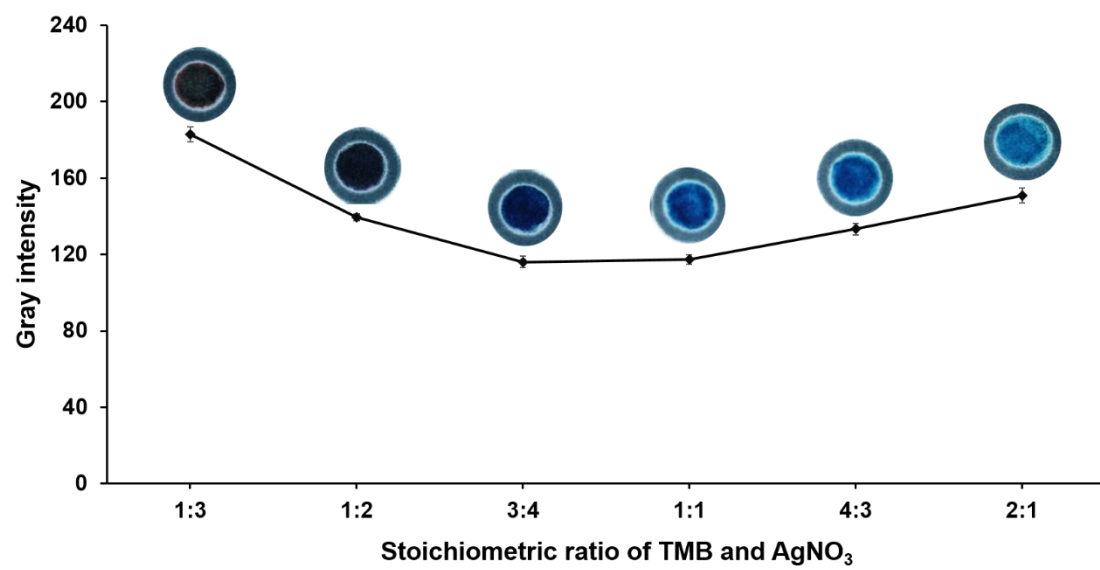


Figure 5.

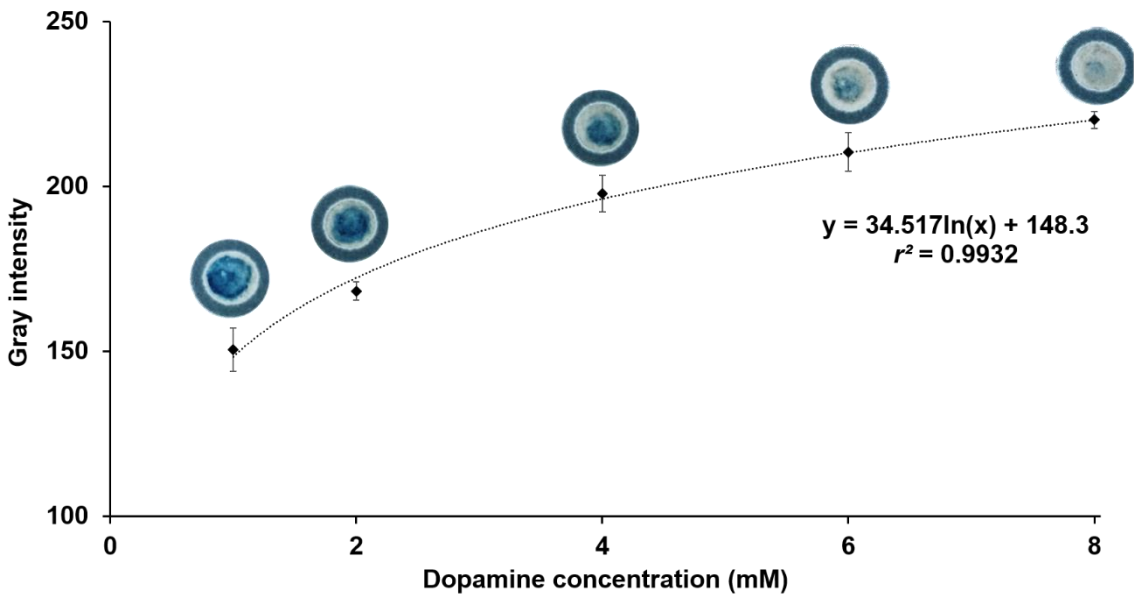


Figure S1 Fabrication of paper-based devices using wax printing technique.

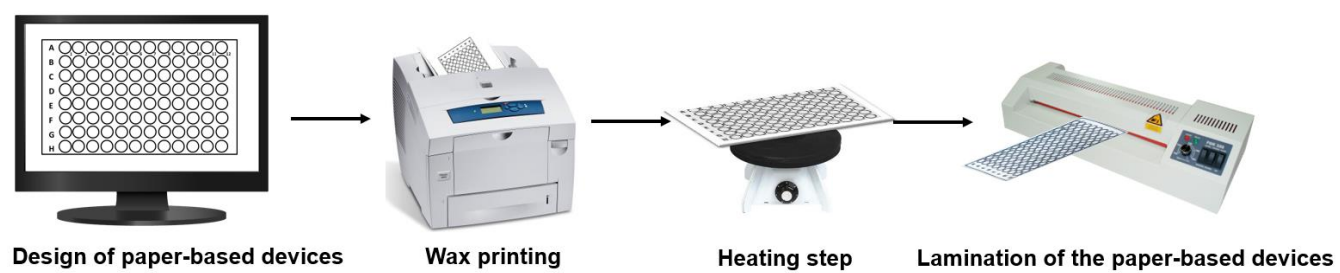
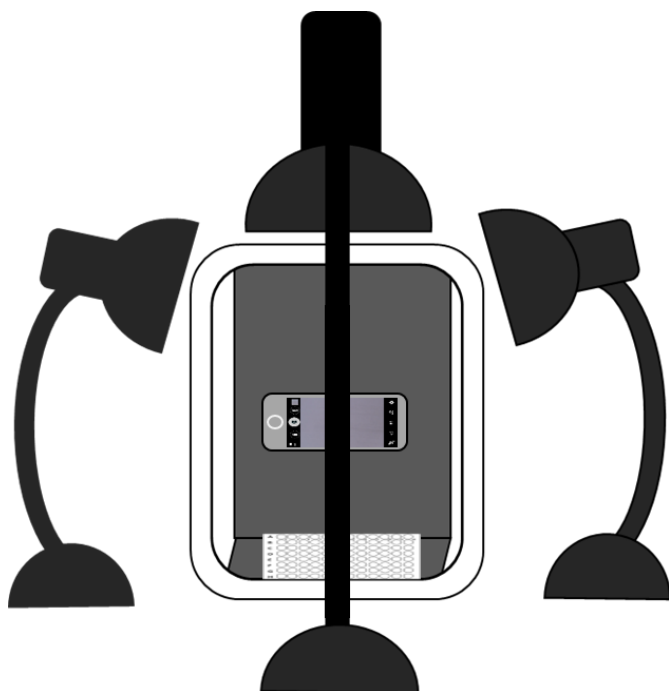
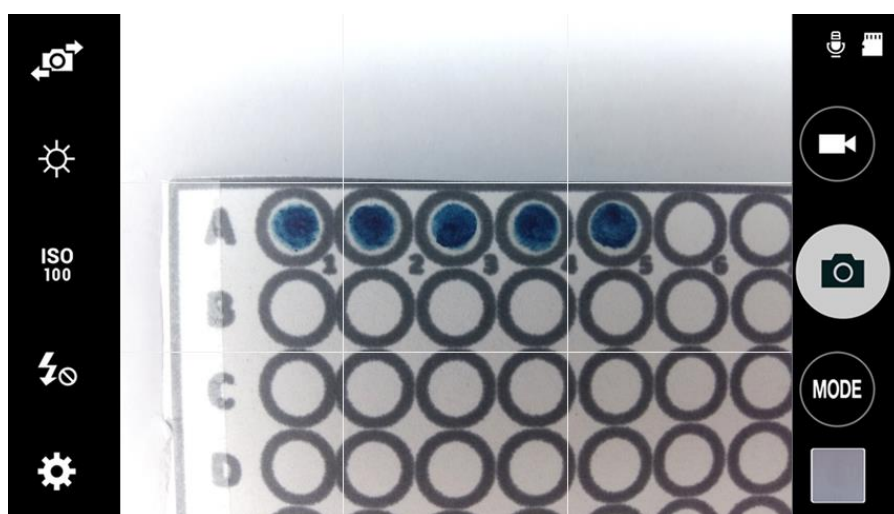


Figure S2 The setup condition for taking images of the colored areas on paper-based devices; a) the positions of lamps around the light box and b) the screen of smartphone camera demonstrating the camera mode and the grid line.

a)



b)



Paper-based sol-gel thin films immobilized cytochrome P450 for measurement of enzyme activity

Nantana Nuchtavorn^{a*}, Jiraporn Leanpolchareanchai^b, Leena Suntornsuk^a

^aDepartment of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, 447 Sri Ayudhaya Rd., Bangkok, 10400, Thailand

^bDepartment of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, 447 Sri Ayudhaya Rd., Bangkok, 10400, Thailand

***Corresponding author**

Assist. Prof. Dr. Nantana Nuchtavorn, Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, 447 Sri Ayudhaya Rd., Bangkok, 10400, Thailand

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

Phone: +66 2 6448695; Fax: +66 2 6448695

Keywords: cytochrome P450, sol-gel, microfluidic paper-based analytical devices, fluorescence microscope

Outline

1. Introduction
2. Materials and methods
 - 2.1 Chemicals and reagents
 - 2.2 Fabrication of μ PADs
 - 2.3 Fabrication of μ PADs
 - 2.3.1 Buffer preparation
 - 2.3.2 Substrate and enzyme solution preparation
 - 2.4 Preparation of sol-gel immobilized CYP3A4
 - 2.5 Scanning electron microscope (SEM) and Transmission Electron Microscope (TEM)
 - 2.6 Stability studies of immobilized enzyme
 - 2.7 Kinetic studies of immobilized enzyme
 - 2.8 Applications: assessment of drugs/herbal extracts in the alteration of enzyme activities
3. Results and discussion
 - 3.1 Optimization
 - 3.2 Validation
 - 3.3 Sol-gel formulation
 - 3.4 Stability
 - 3.5 Enzyme kinetic
 - 3.6 Applications
4. Conclusions
- Acknowledgements

Figure draft

Fig.1 The setup of paper-based microfluidic devices using fluorescence microscope for taking the images of test zones and quantitative measurement of the intensity by image analysis software (ImageJ)

Fig.2 Gel states of sol-gel formulations: 1) no detectable gel formed 2) flowing gel) 3) non-flowing gel 4) rigid gel

Fig.3 Transmission electron microscope and scanning electron microscope images of the immobilized CYP3A4 in sol-gel coating on paper

Fig.4 Stability studies of free enzyme solution and immobilized enzyme

Fig.5 Lineweaver-Burk plot of the immobilized CYP3A4 in sol-gel and coated on paper

Supplementary data

Figure S1 Excitation (λ_{ex}) and emission spectra (λ_{em}) of resorufin

Figure S2 The design of 96-well paper microzone plate

Fig.1

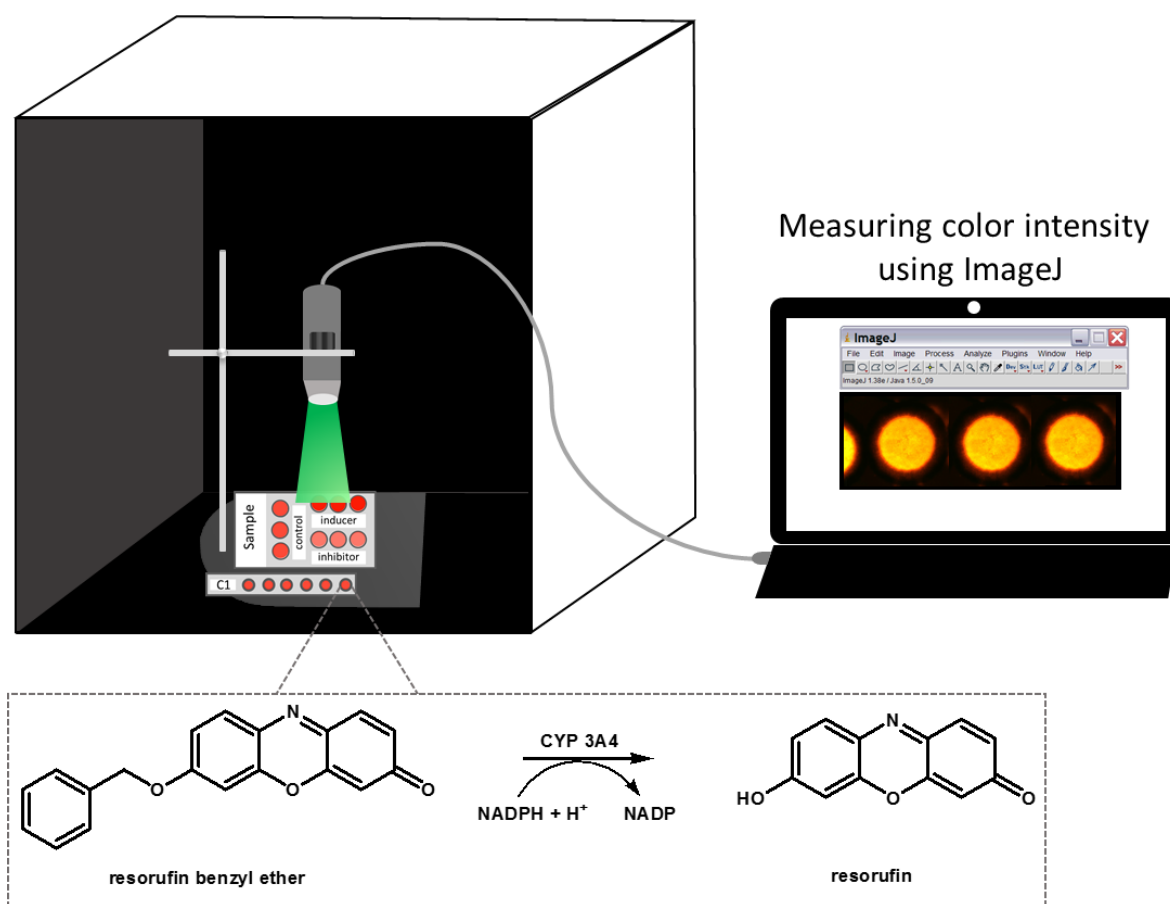


Fig.2

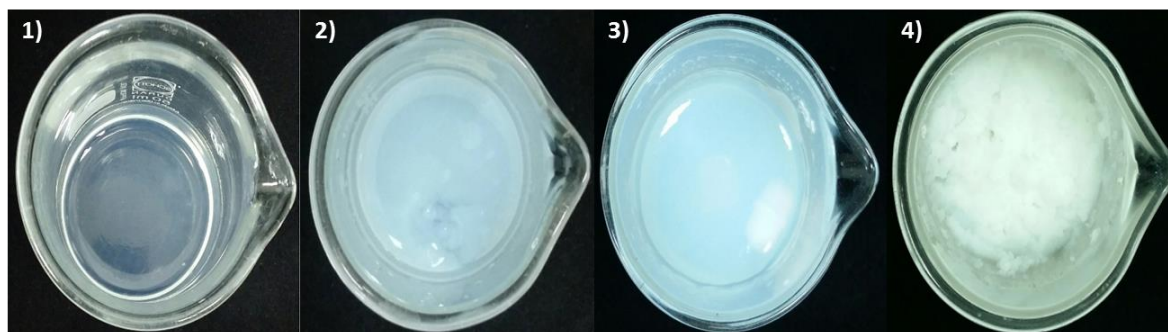


Fig.3

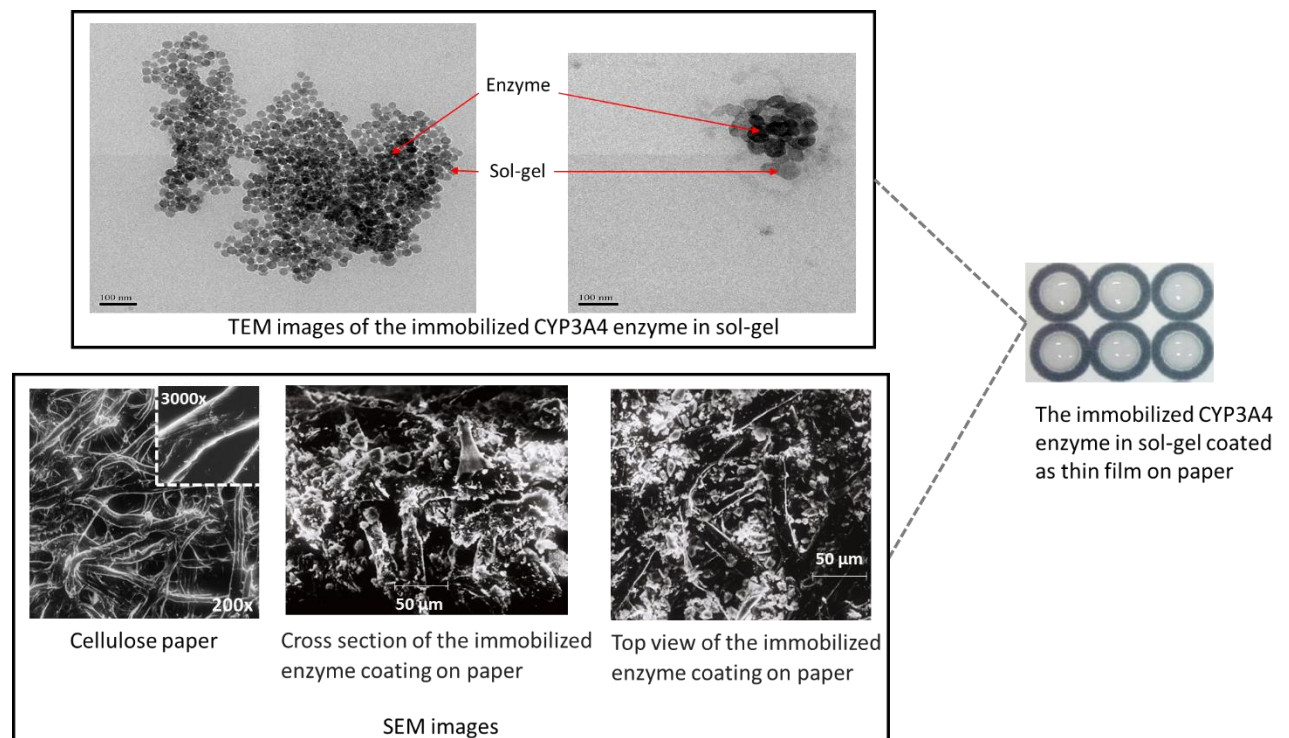


Fig.4

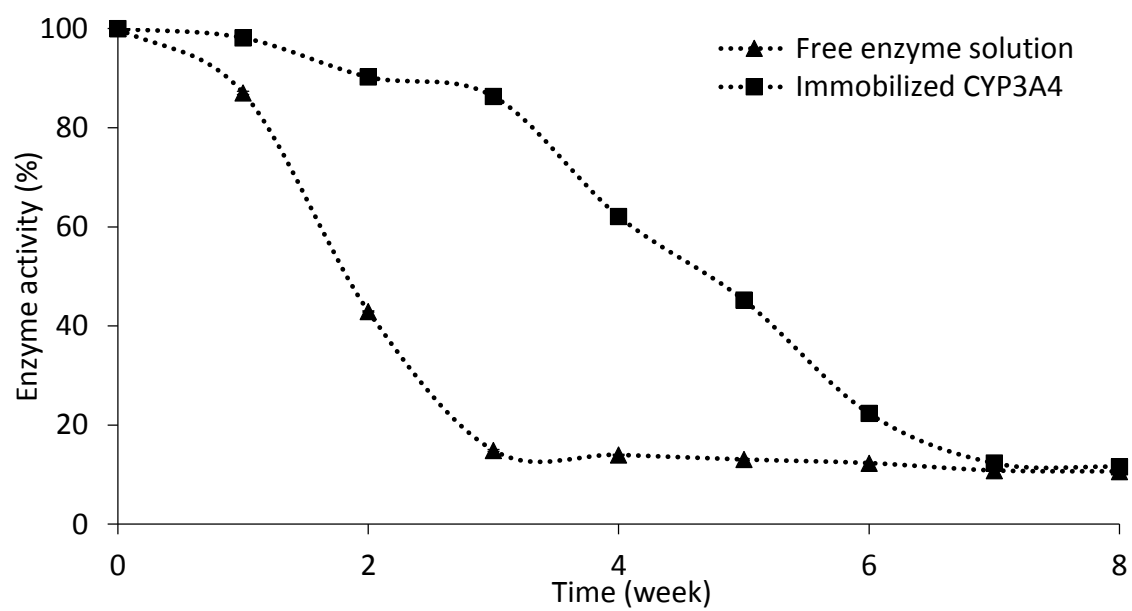


Fig.5

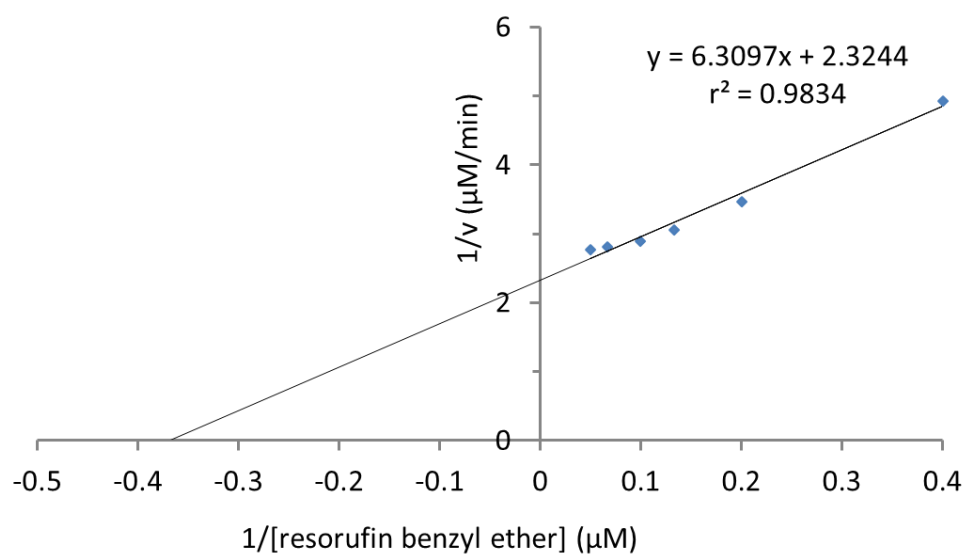


Figure S1

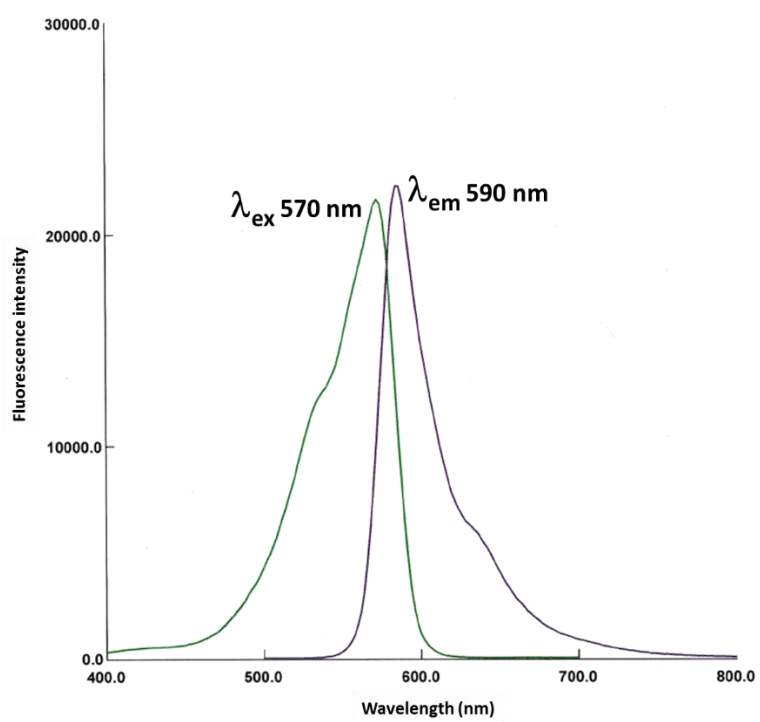


Figure S2

