

การเตรียมรีโอฟิล์ดลินคิตดลาคด้วยเอนไซม์ฮอร์ชแรคิส เปอร์ออกซิเดส

สำหรับงานวิเคราะห์รีโอฟิล์ดลินในหลักการเอนไซม์อิมมูโนวิทยา



นางสาวธำปณีย์ หงส์รัตนาวรกิจ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเกษตรศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาเกษตรเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2538

ISBN 974-632-624-4

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

116215254

PREPARATION OF HORSERADISH PEROXIDASE LABELED
THEOPHYLLINE AVAILABLE FOR ENZYME
IMMUNOASSAY OF THEOPHYLLINE



MISS TAPANEE HONGRATANAWORAKIT

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy
Department of Pharmaceutical Chemistry
Graduate School

Chulalongkorn University

1995

ISBN 974-632-624-4

Copyright of the Graduate School, Chulalongkorn University

Thesis Title Preparation of Horseradish Peroxidase Labeled
Theophylline Available for Enzyme Immunoassay
of Theophylline

By Miss Tapanee Hongratanaworakit

Department Pharmaceutical Chemistry

Thesis Advisor Assoc.Prof. Phensri Thongnopnua, Ph.D.

Thesis Coadvisor Assoc.Prof. Vimolmas Lipipun, Ph.D.



Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn
University in Partial Fulfillment of the Requirement for the
Master's Degree.

Santi Thongsuwan
.....Dean of Graduate School
(Assoc.Prof. Santi Tungsuwan , Ph.D.)

Thesis Committee

Boonardt Saisorn
..... Chairman
(Assoc.Prof. Boonardt Saisorn , M.Sc. in Pharm.)

Phensri Thongnopnua
..... Thesis Advisor
(Assoc.Prof. Phensri Thongnopnua , Ph.D.)

Vimolmas Lipipun
..... Thesis Coadvisor
(Assoc.Prof. Vimolmas Lipipun , Ph.D.)

Chamnan Patarapanich
..... Member
(Assis.Prof. Chamnan Patarapanich , Ph.D.)

Piyawan Surintarat
..... Member
(Asso.Prof. Piyawan Surintarat , Ph.D.)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว



รายนาม หงส์รัตนาวรกิจ : การเตรียมฮีโอฟิลลินติดฉลากด้วยเอนไซม์ฮอร์ชแรติส เปอร็อกซิเดส สำหรับงานวิเคราะห์ฮีโอฟิลลินในหลักการเอนไซม์อิมมูโนวิทยา (PREPARATION OF HORSE RADISH PEROXIDASE LABELED THEOPHYLLINE AVAILABLE FOR ENZYME - IMMUNOASSAY OF THEOPHYLLINE) อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : รศ.ดร.เพ็ญศรี ทองนพเนื่อ , อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : รศ.ดร.วิมลมาศ ลิปิพันธ์ , ๑๓๒ หน้า ISBN 974-632-624-4

ในการศึกษานี้ ได้ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ฮีโอฟิลลินและติดฉลากด้วยเอนไซม์ฮอร์ชแรติส เปอร็อกซิเดส เพื่อใช้ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ฮีโอฟิลลินโดยใช้หลักการเอนไซม์อิมมูโนวิทยา โดย 7-(3-คาร์บอกซีโพรพิล)-1,3-ไดเมธิลแซนทีน ถูกสังเคราะห์และติดฉลากด้วยเอนไซม์ฮอร์ชแรติส เปอร็อกซิเดส และ 7-(3-คาร์บอกซีโพรพิล)-1,3-ไดเมธิลแซนทีน กับ 7-(3-คาร์บอกซีโพรพิล)-1,3-ไดเมธิลแซนทีน ถูกสังเคราะห์และคอนจูเกตกับโบรินซีรัมอัลบูมิน เพื่อใช้เป็นอิมมูโนเจนเอ และ บี ตามลำดับ สำหรับการกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีในกระต่าย

จากผลการศึกษาทดลอง พบว่าที่ความเข้มข้น ๐.๒ มก./มล. ของฮีโอฟิลลินติดฉลากด้วยเอนไซม์ฮอร์ชแรติส เปอร็อกซิเดส เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดในการที่จะนำไปใช้เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาการแย่งที่กับฮีโอฟิลลินในตัวอย่างในช่วงความเข้มข้น ๐-๔๐ มก./มล. ในการจับกับแอนติบอดี เอ (อัตราส่วนความเข้มข้นที่เหมาะสม ๑:๑,๐๐๐) หรือแอนติบอดี บี (อัตราส่วนความเข้มข้นที่เหมาะสม ๑:๑๐,๐๐๐) การใช้อัตราส่วนความเข้มข้นของแอนติบอดี บี ในปฏิกิริยาน้อยกว่าแอนติบอดี เอ เป็นเครื่องบ่งชี้ถึงค่าไทเตอร์ของแอนติบอดี บีที่สูงกว่าแอนติบอดี เอ และบอกถึงความสามารถของแอนติบอดี บี ในการจับกับฮีโอฟิลลินติดฉลากด้วยเอนไซม์ฮอร์ชแรติส เปอร็อกซิเดส ดีกว่าแอนติบอดี เอ ทั้งแอนติบอดี เอ และ บี ที่เตรียมขึ้นนี้ มีความจำเพาะเจาะจงกับฮีโอฟิลลินเท่านั้น และไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับคาเฟอีน ในระดับความเข้มข้นปกติที่อาจตรวจพบในร่างกาย

ดังนั้นในการศึกษานี้ ไม่เพียงแต่สามารถทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ฮีโอฟิลลินติดฉลากด้วยเอนไซม์ฮอร์ชแรติส เปอร็อกซิเดสที่มีประสิทธิภาพเพียงพอในการนำไปใช้ และยังสามารถเตรียมแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับฮีโอฟิลลินด้วย ซึ่งผลจากการศึกษานี้ จะทำให้สามารถพัฒนาวิธีวิเคราะห์ฮีโอฟิลลินโดยใช้หลักการเอนไซม์อิมมูโนวิทยาต่อไปในอนาคต

ภาควิชา เกษษเคมี
สาขาวิชา เกษษเคมี
ปีการศึกษา ๒๕๓๕

ลายมือชื่อนิติกร งามพัชร์ หงส์รัตนาวรกิจ
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา เพ็ญศรี ทองนพเนื่อ
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม วิมลมาศ ลิปิพันธ์



#C575523
KEY WORD:

: MAJOR PHARMACEUTICAL CHEMISTRY

HORSERADISH PEROXIDASE LABELED THEOPHYLLINE / ENZYME IMMUNOASSAY/
THEOPHYLLINE

TAPANEE HONGRATANAWORAKIT : PREPARATION OF HORSERADISH PEROXIDASE
LABELED THEOPHYLLINE AVAILABLE FOR ENZYME IMMUNOASSAY OF
THEOPHYLLINE. THESIS ADVISOR : ASSO.PROF.PHENSRI THONGNOPNUA,
Ph.D. THESIS COADVISOR : ASSO.PROF.VIMOLMAS LIPIPUN, Ph.D. 132
pp. ISBN 974-632-624-4

HRP-labeled theophylline used as enzyme labeled hapten for future development of enzyme immunoassay for theophylline was prepared and proven for its suitability. While only 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine was synthesized and conjugated to aminated HRP, both 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine and 7-(3-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine were conjugated to bovine serum albumin and used as immunogen A and B, for inducing antibody A and B in rabbits, respectively.

HRP-labeled theophylline at the concentration of 0.2 mcg/ml is appropriate to compete with theophylline in sample in the concentration range of 0 - 40 mcg/ml for binding to antibody A (appropriate dilution 1:1,000) or antibody B (appropriate dilution 1:10,000). This ten fold diluted amount of antibody B indicated the higher titer value of antibody B than antibody A and also the more capability of antibody B in binding to HRP-labeled theophylline. No cross reaction of caffeine to theophylline was observed in both antibody.

Therefore, not only that HRP-labeled theophylline was successfully prepared, but also the specific antibody for theophylline was satisfactorily induced in this study.

ภาควิชา..... เกสัชเคมี
สาขาวิชา..... เกสัชเคมี
ปีการศึกษา..... 2538

ลายมือชื่อนิสิต..... จางพันธ์ นวลสีตารอดกิจ
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... วิมลมาส ลิปิพนธ์
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... วิมลมาส ลิปิพนธ์



ACKNOWLEDGMENTS

First I wish to express my deep indebtedness and profound gratitude to my excellent advisor, Associate Professor Dr. Phensri Thongnopnua for her valuable guidance, extremely pay attention, continual understanding and encouragement throughout my graduate study.

I am sincerely grateful to my thesis co-advisor, Associate Professor Dr. Vimolmas Lipipun, for her helpful guidance and valuable advice.

My thankfulness is also expressed to Associate Professor Suttatip Chantaraskul and the staff of Pharmaceutic Chemistry Department for their warm welcome and helpful assistance.

I am thankful to the members of thesis committee for their valuable suggestions and discussion.

I am indebted to all my friends for their encouragement.

Finally, my deepest gratitude goes to my parents

and my sister for their endless love , cheerfulness ,
understanding and supporting throughout my graduate study.



ศูนย์วิทยพัชร์พยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
LIST OF TABLES.....	ix
LIST OF FIGURES.....	xii
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xvi
CHAPTER	
I. INTRODUCTION.....	1
- Objective.....	4
- The Significance of the Study.....	5
II. MATERIALS AND METHODS.....	6
- Materials.....	6
- Methods.....	8
- Synthesis of HRP Labeled Theophylline.....	9
- Preparation of Antibody for Theophylline..	15
- Determination of HRP Labeled Theophylline Properties in Enzyme Immunoassay of Theophylline.....	28
III. RESULTS AND DISCUSSION.....	35
IV. CONCLUSION.....	116
REFERENCES.....	120
APPENDICS.....	129
VITA.....	132

LIST OF TABLES

Table No.	Page
1 Immunization schedule.....	22
2 Ultraviolet absorption data for amino group in HRP.....	38
3 Ultraviolet absorption and number for amino group data for aminated HRP.....	39
4 Assignment of IR spectrum of 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine.....	46
5 Assignment of ¹ H-NMR chemical shift of 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine.....	48
6 Assignment of IR spectrum of NHS ester of 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine.....	53
7 Assignment of ¹ H-NMR chemical shift of NHS ester 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine.....	55
8 Ultraviolet absorption data for aminated HRP.....	59
9 Ultraviolet absorption data for NHS ester of 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine.....	60
10 Ultraviolet absorption and mole ratio of theophylline to HRP.....	62
11 Ultraviolet absorption data of 7-(3-carboxypropyl)-1,3-dimethylxanthine.....	65

12 Determination of theophylline conjugate BSA mole ratio of immunogen A.....	66
13 Assignment of IR spectrum of 7-(3-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine.....	70
14 Assignment of ¹ H-NMR chemical shift of 7-(3-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine.....	72
15 Assignment of IR spectrum of NHS ester of 7-(3-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine.....	76
16 Assignment of ¹ H-NMR chemical shift of NHS ester of 7-(3-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine.....	78
17 Ultraviolet absorption Data of NHS ester of 7-(3-carboxybutyl)-1,3-dimethylxanthine.....	81
18 Determination of theophylline - BSA mole ratio of immunogen B.....	82
19 The absorbance values of HRP labeled theophylline in binding to different dilution of antibody	86
20 Capability of antibody A ,B and C in binding to HRP labeled theophylline	89
21 Cross reactivity of caffeine at 50% competition.....	91
22 The value of correlation coefficient from linear regression analysis of each antibody dilution.....	98

23 The value of correlation coefficient from linear regression analysis at the different dilution of HRP labeled theophylline.....	107
--	-----



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure No.	Page
1 Chemical reaction for aminating HRP.....	36
2 The UV spectrum of the aminated HRP aqueous solution concentration 4.0 mg /ml.....	37
3 Chemical reaction for synthesis of Theophylline ester Derivative.....	43
4 The UV spectrum of 7-(3- carboxypropyl) -1,3- dimethylxanthine aqueous solution concentration 0.03 mg /ml.....	44
5 The IR spectrum of 7-(3- carboxypropyl) -1,3- dimethylxanthine.....	45
6 The ¹ H-NMR spectrum of 7-(3- carboxypropyl) -1,3- dimethylxanthine in DMSO-d ₆	47
7 The UV spectrum of N- hydroxysuccinimide ester of 7-(3- carboxypropyl)-1,3- dimethylxanthine aqueous solution concentration 0.04 mg /ml.....	51
8 The IR spectrum of N- hydroxysuccinimide ester of 7-(3- carboxypropyl)-1,3- dimethylxanthine.....	52
9 The ¹ H-NMR spectrum of N-hydroxysuccinimide ester of 7-(3- carboxypropyl)-1,3- dimethylxanthine in CDCl ₃	54

10 Chemical reaction for synthesis of HRP labeled theophylline.....	57
11 The UV spectrum of HRP labeled theophylline aqueous solution concentration 0.20mg/ml.....	58
12 The UV spectrum of immunogen A aqueous solution concentration 0.286 mg/ml	64
13 The UV spectrum of 7-(3- carboxybutyl)-1,3- dimethylxanthine aqueous solution concentration 0.03 mg /ml.....	68
14 The IR spectrum of 7-(3- carboxybutyl)-1,3- dimethylxanthine.....	69
15 The ¹ H-NMR of 7-(3- carboxybutyl)-1,3- dimethylxanthine in DMSO-d ₆	71
16 The UV spectrum of N-hydroxysuccinimide ester of 7-(3- carboxybutyl)-1,3- dimethylxanthine aqueous solution concentration 0.03 mg /ml.....	74
17 The IR spectrum of N-hydroxysuccinimide ester of 7-(3- carboxybutyl)-1,3- dimethylxanthine.....	75
18 The ¹ H-NMR spectrum of N-hydroxysuccinimide ester of 7-(3- carboxybutyl)-1,3- dimethylxanthine in CDCl ₃	77

19 The UV spectrum of immunogen B aqueous solution concentration 0.286 mg/ml.....	80
20 The antibody dilution curve of antibody A and B.....	85
21 Dose response curve for theophylline at different dilution of antibody A.....	94
22 Dose response curve for theophylline at different dilution of antibody B.....	95
23 A logit-log plot of data from figure 21.....	96
24 A logit-log plot of data from figure 22.....	97
25 A represent curve from linear regression analysis of antibody A at antibody dilution 1 : 1,000.....	99
26 A represent curve from linear regression analysis of antibody B at antibody dilution 1 : 10,000.....	100
27 Dose response curve for theophylline at different dilution HRP labeled theophylline in the competition of antibody A.....	103
28 Dose response curve for theophylline at different dilution HRP labeled theophylline in the competition of antibody B.....	104
29 A logit-log plot of data from figure 27.....	105
30 A logit-log plot of data from figure 28.....	106

31 A represent curve from linear regression analysis of antibody A at HRP labeled theophylline dilution 1 : 5,000.....	108
32 A represent curve from linear regression analysis of antibody B at HRP labeled theophylline dilution 1 : 5,000.....	109
33 Standard curve for theophylline of antibody A at HRP labeled theophylline 1 : 5,000 and antibody 1 : 1,000.....	111
34 Standard curve for theophylline of antibody B at HRP labeled theophylline 1 : 5,000 and antibody 1 : 10,000.....	112
35 A logit-log plot of standard curve from linear regression analysis for theophylline of antibody A at HRP labeled theophylline dilution 1 : 5,000 and antibody dilution 1: 1,000.....	113
36 A logit-log plot of standard curve from linear regression analysis for theophylline of antibody B at HRP labeled theophylline dilution 1 : 5,000 and antibody dilution 1: 10,000.....	114



LIST OF ABBREVIATIONS

mcg	microgram
mcI	microlitre
mcmole	micromole
mg	milligram
ml	millilitre
g	gram
nm	nanometre
min	minute
hr	hour
M	molar
N	normal
%	percent
w/v	weight by volume
v/v	volume by volume
wt	weight
mw	molecular weight
sol	solution
HRP	horseradish peroxidase
m.p.	melting point

UV	ultra violet
IR	infrared
NMR	nuclear magnetic resonance
conc.	concentration
°c	degree Celcius
BSA	bovine serum albumin
NHS	N - hydroxysuccinimide
EDCI	1-ethyl 3-(3- ethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride
DMF	dimethylformamide
DMSO	dimethylsulfoxide
CHCl ₃	chloroform

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย