อภินันทนาการ

สำนักหอสมุด

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ชุดทดสอบแบบอิมมูโนโครมาโทกราฟิกต่อสารจีปีโนซายด์ ในการควบคุมคุณภาพสมุนไพรปัญจขันธ์

Immunochromatographic test for the rapid detection of gypenosides in *Gynostemma pentaphyllum* Makino

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 05 ส.ค. 2564
เลขทะเบียน 1034830
เลขเรียกหนังสือ ว QK 495 .C96 วชร 2562

โดย

วชู พรหมพิทยารัตน์.[1], กรกนก อิงคนินันท์[2],นันทกา โกรานา[2],

[1]คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร, [2]คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร,

[3]ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคเหนือตอนล่าง

มีนาคม 2562

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณรายได้ของมหาวิทยาลัยนเรศวร

และผลงานนี้เป็นความรับผิดชอบของผู้วิจัยแต่เพียงผู้เดียว

ปีงบประมาณ 2559

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณผู้บริหาร อาจารย์ และเจ้าหน้าที่ คณะสาธารณสุขศาสตร์ และคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคเหนือตอนล่าง จ.พิษณุโลก และ Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Fukuoka ประเทศญี่ปุ่น ที่ช่วยให้โครงการนี้สำเร็จลงด้วยดี

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณรายได้ของมหาวิทยาลัยนเรศวรปีงบประมาณ 2559 จึงขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้ด้วย

Immunochromatographic test for the rapid detection of gypenosides in *Gynostemma pentaphyllum* Makino

Watoo Phrompittayarat[a]*, Kornkanok Ingkaninan[b], Nantaka Khorana[b], Hiroyuki Tanaka[c],

[a]*Faculty of Public Health, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand*
[b]*Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences and Center of Excellence for Innovation in ChemistryFaculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand*
[c]*Department of Medicinal Plant Breeding, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University.Fukuoka 812-8582, Japan*

Abstract

Gynostemma pentaphyllum Makino or Jiaogulan is a medicinal plant that is widely used for a variety of health-promoting purposed such as neuroprotective, anti-inflammation, antioxidant, anticancer and adaptogen. Gypenosides has been reported as the major active compound in Jiaogulan. In this study we aimed to control quality of Jiaogulan to ensure the active compound contents in the raw material and Jiaogulan products. An immunochromatographic(IC) test has been developed for the rapid detection of gypenoosides in Jiaogulan by using anti-gypenosides polyclonal antibodies to detect gypenosides in theraw material and products from Jiaogulan.. The IC test kit was developed and validated for accuracy, specificity and limit of detection (LOD). The results showed that the developed IC detected gypenosides sensitivity and specificity. The LOD was 1.56 μg/ml. Finally, the IC test using an anti-gypenosides polyclonal antibodies could be used for screening gypenosides in plant materials and Jiaogulan products.

Keywords: Gypenoside XLIX, Polyclonal antibodies, *Gynostemma pentaphyllum*, immunochromatographic

สารบัญ

บทที่ 1 บทนำ 1

บทนำ 1

วัตถุประสงค์ของโครงการ 4

บทที่ 2 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย 5

1. อุปกรณ์และสารเคมี 5

2. การผลิตสารภูมิต้านทานแบบโพลีโคลนต่อ Gypenoside XLIX 7

3. การวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่ม saponin glycosides จากพืชปัญจขันธ์โดยวิธี ELISA

4. การพัฒนาชุดทดสอบแบบอิมมูโนโครมาโทกราฟีกต่อสารจีปีโนซายด์ 8

บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผล 13

1.การผลิตสารภูมิต้านทานแบบโพลีโคลนต่อ Gypenoside XLIX 13

2. การแยกแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ 14

3. การทดสอบโพลีโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธีอินไดเร็กอีไลซ่า (Indirect ELISA) 15

4. การตรวจสอบความถูกต้อง (validate) ของวิธีการวิเคราะห์สาร gypenosides โดยใช้เทคนิค Competitive ELISA 11

5. ชุดทดสอบแบบอิมมูโนโครมาโทกราฟีกต่อสารจีปีโนซายด์ 19

6. การทวนสอบวิธีทดสอบแบบอิมมูโนโครมาโทกราฟีกต่อสารจีปีโนซายด์ 19

บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง 21

บทที่ 5 บรรณานุกรม 22

ภาคผนวก

นำเสนอผลงาน ก

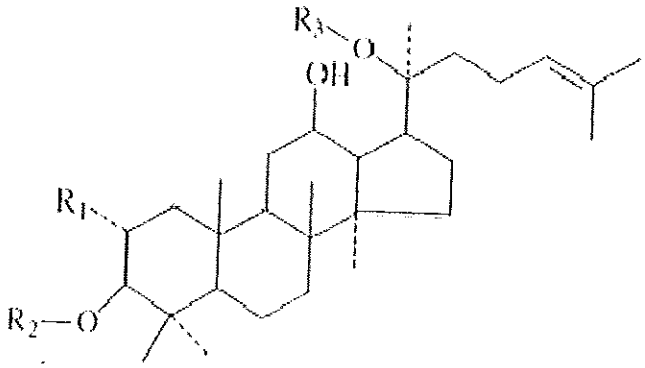
อนุสิทธิบัตร ข

บทที่ 1
บทนำ

ปัญจขันธ์ หรือ เจียวกู่หลาน มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Gynostemma pentaphyllum* Makino วงศ์ Cucurbitaceae ถือเป็นหนึ่งในพืชเศรษฐกิจส่งออกที่สำคัญของประเทศไทย และเป็นสมุนไพรที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลายทั้งในประเทศจีนและญี่ปุ่น โดยมีการใช้เป็นยาแก้ร้อนใน แก้ไอ ขับเสมหะ และยังนิยมนำมาเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพต่างๆ ทั้งในรูปแบบชาชงสมุนไพร รูปแบบสารสกัดชนิดเม็ด และชนิดแคปซูล มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสมุนไพรชนิดนี้ว่า สารกลุ่มซาโปนิน ที่ชื่อว่า จีปีโนซายด์ (Gypenosides) เป็นสารในกลุ่ม dammarane triterpenoid saponins ที่พบในสมุนไพรชนิดนี้ เป็นสารสำคัญที่มีฤทธิ์ในการช่วยเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกัน ปรับสมดุลร่างกาย กำจัดอนุมูลอิสระ ยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้องอก ช่วยปกป้องเซลล์ประสาท ช่วยปกป้องระบบหลอดเลือดหัวใจและสมอง ช่วยลดระดับไขมันในเลือด และช่วยรักษาแผลในกระเพาะอาหาร

จากการที่ปัญจขันธ์ถือเป็นพืชเศรษฐกิจส่งออกที่สำคัญของประเทศไทย การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ต่างๆ เพื่อนำมาใช้ในการควบคุมคุณภาพของสมุนไพรจึงเป็นสิ่งสำคัญ ซึ่งหากวิธีการเหล่านั้นสามารถทำได้ง่าย รวดเร็ว และสามารถใช้กับตัวอย่างสมุนไพรปริมาณมากได้ก็จะเป็นประโยชน์ในการควบคุมคุณภาพสมุนไพรเป็นอย่างมาก ซึ่งในปัจจุบันวิธีวิเคราะห์ที่ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อนำมาใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์และวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ในปัญจขันธ์นั้นมีเพียงวิธี ซึ่งสารสำคัญที่พบมากที่สุดในพืชชนิดนี้ คือ จีปีโนซายด์ ที่มีสมบัติในการดูดกลืนแสงได้น้อย จึงไม่นิยมวิเคราะห์ปริมาณด้วยวิธี UV-spectrophotometry วิธีวิเคราะห์สารจีปีโนซายด์ ที่นิยมใช้คือวิธี high performance liquid chromatography (HPLC) และ detect ด้วยวิธีดังต่อไปนี้ เช่น photodiode array (PDA), evaporative light scattering detector (ELSD), quadrupole mass spectrometer (LC/MS) หรือ quadrupole time-of-flightmass spectrometer (Q-TOF, LC/MS/MS) ซึ่งเป็นวิธีที่ต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์ และมีค่าใช้จ่ายสูง

ปัจจุบันวิธีการวิเคราะห์ทางด้านอิมมูโนโลยี โดยใช้สารภูมิต้านทานแบบโพลีโคลน เพื่อใช้ตรวจสอบสารสำคัญในสมุนไพร เป็นวิธีการที่มีความแม่นยำและความไวสูงเนื่องจากความสามารถในการจับกับสารได้อย่างจำเพาะเจาะจงและสามารถทำการวิเคราะห์ได้จำนวนมาก มีความสะดวกและรวดเร็ว สำหรับการผลิตสารภูมิต้านทานแบบโพลีโคลนต่อสารจีปีโนซายด์ ในขณะนี้ยังไม่มีผู้ทำการศึกษา จึงเป็นที่น่าสนใจในการประยุกต์ใช้สารภูมิต้านทานแบบโพลีโคลนต่อสาร gypenoside XLIX ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม Triterpenoid saponins มีส่วนโครงสร้างเป็น Dammarane และเป็นชนิดจีปีโนซายด์ดังโครงสร้าง



รูปที่ 1 เป็นโครงสร้าง Dammarane-Gypenoside type ของสารกลุ่ม Triterpenoid saponins โดยประกอบด้วยโครงสร้างสองส่วนคือ aglycone part และส่วนของน้ำตาลชนิดต่างๆ (R1 R2 และ R3) ทำให้แบ่งเป็นสารแต่ละชนิด

มาทำการพัฒนาวิเคราะห์ด้วยวิธี Enzyme linked immunosorbant assay; ELISA เพื่อดูปริมาณสารสำคัญในกลุ่มจีปีโนซายด์ โดยเทียบกับวิธีวิเคราะห์ HPLC โดยวิเคราะห์เทียบกับสารมาตรฐาน และทำการตรวจสอบวิธีการเคราะห์ด้วย และนอกจากนี้ สามารถทำ immunostaining membrane assay ที่มีความจำเพาะต่อสารจีปีโนซายด์ ของปัญจขันธ์ในแต่ละแหล่งการเพาะปลูก การประยุกต์ใช้แอนติบอดีต่อจีปีโนซายด์ มีประโยชน์เพื่อตรวจสอบมาตรฐานสมุนไพรปัญจขันธ์โดยการหาทั้งทางด้านปริมาณและคุณภาพ โดยการเก็บตัวอย่างปัญจขันธ์ในแต่ละแหล่งเพาะปลูก ส่วนต่างๆของปัญจขันธ์ มาทำการศึกษาความแตกต่างปริมาณของจีปีโนซายด์ ในปัญจขันธ์ในแต่ละแหล่งเพาะปลูก เพื่อจะได้ตรวจสอบปริมาณสารสำคัญในปัญจขันธ์ที่มีปริมาณสารจีปีโนซายด์ ที่มีปริมาณสูงและเป็นวิธีที่ทั้งประหยัดเรื่องปริมาณในการวิเคราะห์ ลดการใช้สารเคมีอันตรายและนำวิธีวิเคราะห์ทางอิมมูโนวิทยาไปใช้ในการศึกษาในระดับนาโนกรัมหรือพิโคกรัมเช่นการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์และอื่นๆ นอกจากนี้ยังเพิ่มคุณภาพของผลิตภัณฑ์จากปัญจขันธ์ที่ออกสู่ผู้บริโภค และองค์ความรู้ที่ได้สามารถนำไปใช้งานหรือไปรองรับกับนักวิจัยกลุ่มอื่นๆ ที่ทำการศึกษาและวิจัยปัญจขันธ์ และนำไปสู่การทำงานร่วมกันของนักวิจัยร่วมหรือต่างสถาบันในอนาคต

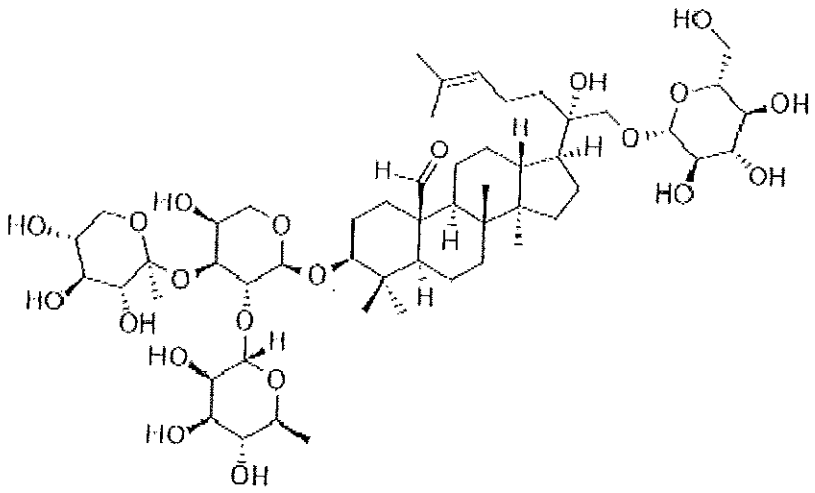
วิธีการตรวจสอบสารกลุ่ม saponins ในปัญจขันธ์ เพื่อใช้เป็นมาตรฐานในการตรวจสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในพืชชนิดนี้ได้มีรายงานการตรวจสอบสารกลุ่ม dammarane saponins ในปัญจขันธ์ โดยใช้วิธี High performance liquid chromatography (HPLC)[11] และ High performance liquid chromatography-Nuclear magnetic resonance-Mass spectrometry (HPLC-NMR-MS)[13] ซึ่งต้องใช้วิธีการในการเตรียมตัวอย่างก่อนทำการวิเคราะห์หาปริมาณ ปัจจุบันวิธีการวิเคราะห์ทางด้านอิมมูโนโลยี โดยใช้สารภูมิต้านทานแบบโพลีโคลนเพื่อใช้ตรวจสอบสารสำคัญในสมุนไพรเป็นวิธีการที่มีความแม่นยำสูงเนื่องจากความสามารถในการจับกับสารได้อย่างจำเพาะเจาะจงและสามารถทำการวิเคราะห์ได้จำนวนมากอีกทั้งยังเป็นวิธีที่มีความสะดวกและรวดเร็ว ในขณะนี้ยังไม่มีผู้ทำการศึกษาการผลิตสารภูมิต้านทานแบบโพลี

โคลนต่อสาร saponin glycoside ในปัญจขันธ์ จึงเป็นที่น่าสนใจในการประยุกต์ใช้สารภูมิต้านทานแบบโพลีโคลนต่อสาร gypenosides มาทำการพัฒนาการวิเคราะห์ด้วยวิธี Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) เพื่อใช้ในการหาปริมาณสาร gypenosides

จากสรรพคุณของสารจีปีโนซายด์ที่เป็นสารออกฤทธิ์ในปัญจขันธ์ เนื่องด้วยที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในการบำรุงร่างกายและชะลอความเสื่อมของร่างกาย ประกอบกับปัญจขันธ์เป็นหนึ่งในสิบของพืชสมุนไพรเศรษฐกิจของไทยและเป็นสมุนไพรที่มีการใช้และส่งออกในปริมาณที่มากและราคาสูง การปนเปื้อนหรือปนปลอมสมุนไพรอื่นเพื่อการเพิ่มปริมาณของสมุนไพร กระบวนการผลิตเห็นการอบแห้งหรือบรรจุภัณฑ์ที่ไม่เหมาะสมทำให้ปริมาณสารจีปีโนซายด์ลดลง ทำให้ผลิตภัณฑ์จากปัญจขันธ์ไม่ได้ประโยชน์อย่างเต็มที่ จึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีวิธีการตรวจวิเคราะห์สารจีปีโนซายด์จากปัญจขันธ์โดยเฉพาะ โดยที่ไม่ต้องใช้เครื่องมือที่ยุ่งยาก มีความสะดวก รวดเร็ว แม่นยำ และสามารถตรวจวิเคราะห์สารได้ ณ สถานที่คัดแยกวัตถุดิบหรือที่จำหน่ายผลิตภัณฑ์ เพื่อให้สะดวกต่อการทราบผลการวิเคราะห์สารจีปีโนซายด์จากปัญจขันธ์ได้ทันที ซึ่งจะทำให้สามารถคัดแยกวัตถุดิบที่ถูกต้องเข้าสู่กระบวนการผลิตได้อย่างถูกต้องและผู้บริโภคได้รับประโยชน์จากปัญจขันธ์อย่างเหมาะสม

จากข้อจำกัดของสารจีปีโนซายด์ที่เป็นสารกลุ่มซาโปนิน ที่มีข้อจำกัดของลักษณะโครงสร้างทางเคมีที่ไม่มีตำแหน่งในการดูดกลืนแสงในโมเลกุลของจีปีโนซายด์ ทำให้วิเคราะห์ทั้งในปริมาณและคุณภาพด้วยวิธีทางสเปคโทโครมาโทกราฟีไม่จำเพาะเจาะจง จึงมีการปรับไปใช้วิธีขั้นสูงเช่น เอลซีเอ็มเอส (LC-MS) ซึ่งเป็นวิธีที่ต้องใช้ความเชี่ยวชาญขั้นสูง เครื่องมือที่มีความซับซ้อนและค่าใช้จ่ายสูงในการทำการวิเคราะห์ ปัจจุบันวิธีการวิเคราะห์ทางด้านอิมมูโนโลยีเป็นทางเลือกใหม่ ที่ใช้หลักการการจับกันของแอนติเจนและแอนติบอดี โดยใช้สารภูมิต้านทานชนิดโพลีโคลนอลแอนติบอดี เพื่อใช้ตรวจสอบสารสำคัญในสมุนไพรเป็นวิธีการที่มีความแม่นยำและความไวสูงเนื่องจากความสามารถในการจับกับสารได้อย่างจำเพาะเจาะจงและสามารถทำการวิเคราะห์ได้จำนวนมาก มีความสะดวกและรวดเร็ว

การประดิษฐ์นี้ได้สร้างโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสาร gypenoside XLIX จากการกระตุ้นให้กระต่ายสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูงต่อสาร gypenoside XLIX ด้วยสารก่อภูมิคุ้มกันที่สร้างจากการเชื่อมสายโปรตีนชนิดโบวายด์ซีรั่มอัลบูมินกับจีปีโนซายด์ แล้วทำการเจาะเลือกระต่ายที่มีโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มีความจำเพาะต่อ gypenoside XLIX ซึ่งมีความสามารถในการจับจำเพาะกับสาร gypenoside XLIX และสารสเตอรอยด์ซาโปนินจากปัญจขันธ์ที่มีโครงสร้างส่วนอะไกลโคน (Aglycone) เหมือนกันหรือคล้ายคลึงกัน จึงทำให้มีความจำเพาะสูงต่อซาโปนินหลักในปัญจขันธ์ และยังสามารถผลิตได้ในปริมาณมาก ในลำดับต่อไปเป็นการอธิบายถึงรายละเอียดของการสร้างโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสารจีปีโนซายด์และการประยุกต์ใช้โพลีโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสาร gypenosidesในการวิเคราะห์สารซาโปนินในปัญจขันธ์



รูปที่ 2 เป็นโครงสร้าง gypenoside XLIX

โดยโครงการนี้ จะเป็นการร่วมมือและแลกเปลี่ยนความรู้ระหว่างกลุ่มนักวิจัยจากประเทศไทยและประเทศญี่ปุ่น การร่วมมือในการทำวิจัยครั้งนี้ ทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนความรู้ความชำนาญด้านการผลิตสารภูมิต้านทานแบบโพลีโคลนและการวิเคราะห์สมุนไพรโดยใช้เทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยา โดยเฉพาะนักวิจัยในประเทศไทยจะได้มีโอกาสเรียนรู้เทคนิคการใช้สารภูมิต้านทานแบบโพลีโคลนในการวิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA เพื่อตรวจสอบมาตรฐานสมุนไพร

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อผลิตสารภูมิต้านทานแบบโพลีโคลนต่อ gypenoside XLIX
2. เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสาร gypenoside โดยใช้สารภูมิต้านทานแบบโพลีโคลนต่อ gypenosides ที่ผลิตได้ด้วยวิธี ELISA และชุดทดสอบแบบอิมมูโนโครมาโทกราฟีกต่อสารจีปีโนซายด์
3. เพื่อสร้างความรู้ความชำนาญในการทำการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยาแก่นักวิจัยรุ่นใหม่ใน มหาวิทยาลัยนเรศวร ประเทศไทย
4. ก่อความร่วมมือในการวิจัยของกลุ่มนักวิจัยในประเทศไทยและนักวิจัยในประเทศญี่ปุ่น อันได้แก่ คณะสาธารณสุขศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และ คณะเภสัชศาสตร์ Kyushu University

บทที่ 2
อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1. อุปกรณ์และสารเคมี

Gypenoside XLIX และgypenoside XVII สั่งซื้อจากบริษัท Standford ประเทศสหรัฐอเมริกา Bovine serum albumin (BSA) และ human serum albumin (HSA) จากบริษัท Fluka Biochemika Steinheim ประเทศสวิตเซอร์แลนด์ Peroxidase-labeled IgG จากบริษัท MP Biomedicals ประเทศฝรั่งเศส Freund's complete และ incomplete adjuvants จากบริษัท Sigma Steinheim ประเทศเยอรมัน และ 2,2'-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6- sulfonic acid(ABTS) จากบริษัท Wako ประเทศญี่ปุ่น

Protein G column จาก Amersham Pharmacia Biotech ประเทศสวีเดน HPLC system , UV-detector, และ LC-10ATVP pump จากบริษัท Shimadzu ประเทศ ญี่ปุ่น HPLC column รุ่นLuna RP-18 และ guard column รุ่น Phenomenex RP-18 จากบริษัท Torrance ประเทศสหรัฐอเมริกา

2. การผลิตสารภูมิต้านทานแบบโพลีโคลนต่อ Gypenoside XLIX

ทำการผลิตสารภูมิต้านทานแบบโพลีโคลน สารภูมิต้านทานแบบโพลีโคลนต่อ Gypenoside XLIX ดังนั้นในการแสดงวิธีการทดลองนี้ จะกล่าวถึงขั้นตอนการผลิตสารภูมิต้านทานแบบโพลีโคลน ต่อ Gypenoside XLIX และเปรียบเทียบวิธีการวิเคราะห์กับ HPLC ในการหา Gypenosides

2.1 วิธีการเตรียมสารก่อภูมิต้านทาน (antigen)

ทำการเตรียมสารก่อภูมิต้านทาน (antigen) โดยทำการเชื่อมต่อ Gypenoside XLIX ซึ่งใช้เป็นสารก่อภูมิต้านทานนำมาทำการเชื่อมต่อกับโปรตีนที่มีโมเลกุลใหญ่เพื่อสร้างแฮปเทน (hapten) โดยทำการเชื่อมต่อกับโปรตีน BSA และ HSA โดยนำมาทำปฏิกิริยากับสาร sodium periodate ($NaIO_4$) แล้วทำการเชื่อมต่อกับโปรตีนโดยวิธีการสังเคราะห์และทำปฏิกิริยาเพื่อสร้างแฮปเทนมีดังนี้

1. เตรียมสารละลาย Gypenoside XLIX 5 mg ใน methanol 0.5 ml
2. เตรียมสารละลาย $NaIO_4$ ความเข้มข้น 5 mg/ml จำนวน 0.5 ml
3. ค่อยๆเติมสารลายลายในข้อ 1 ลงในสารละลายในข้อ 2 ช้าๆ และทำการคนสารละลายโดยใช้แม่เหล็กคนสารเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง
4. เติมสารละลาย BSA ความเข้มข้น 10 mg ใน สารละลาย carbonate buffer (pH 9.6) 1 ml และทำการคนสารละลายเป็นเวลา 5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง
5. สารละลายที่ได้นำไป dialysis โดยใช้น้ำและทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง lyophilizer

จากนั้นทำการตรวจสอบการเชื่อมต่อกับโปรตีนโดยใช้วิธี MALDI mass spectroscopy

2.2 การกระตุ้นกระต่ายให้สร้างสารภูมิต้านทาน

เตรียมและชั่งสารก่อภูมิคุ้มกันจาก ข้อ 2.1 ทำการกระตุ้นกระต่ายชนิด Newzeland White Rabbit เพศเมียน้ำหนักประมาณ 1,800 – 2,000 กรัม ฉีดกระตุ้นอย่างน้อย 3 ครั้ง ดังนี้

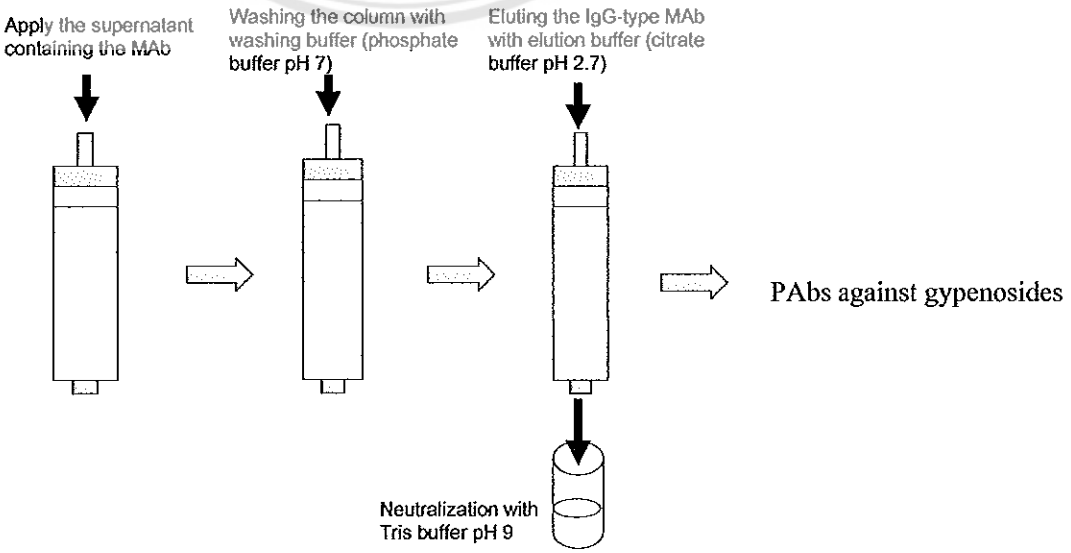
ครั้งที่ 1 ชั่งสารก่อภูมิคุ้มกัน 200 µg (จาก ข้อ 2.1) ละลายใน 0.5 ml PBS pH 7.4 มาผสมกับคอมพลีทฟรอยด์ส แอดจูแวนท์ (complete Freund's adjuvant) 0.5 ml จนเกิดเป็นสารแขวนตะกอนคล้ายนมข้นมาฉีดกระตุ้นกระต่าย โดยฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณหลังของกระต่ายโดยแบ่งฉีด แห่งละ 50-100 µl โดยในการฉีดแต่ละครั้งจะเปลี่ยนเข็ม และใช้ sterile technic จนกว่าจะหมดสาร และก่อนฉีดจะเช็ดตำแหน่งที่ฉีดด้วยแอลกอฮอล์ 70%

ครั้งที่ 2 จากนั้นฉีดกระตุ้นซ้ำในวันที่ 20 โดยใช้สารก่อภูมิคุ้มกัน 200 µg ละลายในละลายใน 0.5 ml PBS pH 7.4 ผสมกับอินคอมพลีทฟรอยด์ส แอดจูแวนท์ (incomplete Freund's adjuvant) 0.5 ml จนเป็น emulsion เข้าที่กล้ามเนื้อ ซ้ายและขวา จุดละ 0.5 ml

ตั้งแต่ครั้งที่ 3 จะใช้สารก่อภูมิคุ้มกัน 100 µg ละลายในละลายใน 0.5 ml PBS pH 7.4 ฉีดเข้าที่เส้นเลือดดำบริเวณใบหูกระต่ายจนกว่าจะสร้างภูมิคุ้นกันต่อ จีปีโนซายด์ ตรวจสอบสารภูมิคุ้มกันที่จำเพาะต่อจีปีโนซายด์โดยวิธีเอ็นไซม์ลิงเกตอิมมูโนซอร์แบนเอสเสย์ (Enzyme linked immunosorbant assay) ทุกวันที่ 3 ของการฉีดสารก่อภูมิคุ้มกัน จนได้อัตราส่วน ประมาณ 1:50,000 ถึง 1:150,000

2.3 การทำให้สารภูมิต้านทานแบบโพลีโคลนบริสุทธิ์

ทำการเลี้ยงโพลีโคลนจนได้ปริมาณสารภูมิต้านทานจำนวนมากเพียงพอจากนั้นนำ supernatant ของอาหารเพาะเลี้ยงที่มีสารภูมิต้านทานมาทำให้บริสุทธิ์ใช้ protein G column ในการแยกสารภูมิต้านทานออกมาโดยอาศัยหลักการในการจับกับ Fc ของสารภูมิต้านทานและแยกสารออกมาโดยใช้สารบัฟเฟอร์ (buffer) ที่มี pH ต่ำ วิธีการแยกโดยใช้ protein G column แสดงดังรูปที่ 4



รูปที่ 2 แผนภาพแสดงการทำให้สารภูมิต้านทานแบบโพลีโคลนบริสุทธิ์โดยใช้ protein G column

2.5 ทำการตรวจสอบคุณสมบัติของสารภูมิต้านทานแบบโพลีโคลน

ทำการตรวจสอบคุณสมบัติในการจับกับ Gypenoside XLIX และสารอื่นที่มีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงกันจากสารภูมิต้านทานที่บริสุทธิ์โดยวิธี competitive ELISA และนำมาคำนวณหาค่าความจำเพาะเจาะจงของสารภูมิต้านทานที่ได้ต่อสารชนิดต่างๆ (cross reactivity) ตามวิธีการของ Weiler และ Zenk (1976)

$$\% \text{ Cross reactivity} = \left(\frac{\begin{array}{l} concentration\ of\ bacopaside\ I \\ yeilding\ A/Ao = 50\% \end{array}}{\begin{array}{l} concentration\ of\ compound\ under \\ investigation\ yeilding\ A/Ao = 50\% \end{array}} \right) x\ 100$$

A is the absorbance in the presence of the test compound

A_0 is the absorbance in the absence of the test compound.

ส่วนการเตรียมสารก่อภูมิต้านทาน Gypenoside XLIX และการผลิตสารภูมิต้านทานแบบโพลีโคลน ต่อ Gypenoside XLIX นั้น มีขั้นตอนการทดลองเหมือนดังที่กล่าวมาข้างต้น เพียงแต่ใช้ สาร HSA แทน BSA

3. การวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่ม saponin glycosides จากพืชปัญจขันธ์โดยวิธี ELISA

ตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่ม Gypenosides จากพืชสมุนไพรปัญจขันธ์ ด้วยวิธีอีไลซาโดยใช้สารภูมิต้านทานโพลีโคลนที่จำเพาะต่อสาร Gypenoside XLIX ตามรายละเอียดวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณดังนี้

1. เติมสารละลาย Gypenoside XLIX -HSA ความเข้มข้น 1 μg/ml ที่ละลายด้วย carbonate buffer pH 9.6 ลงใน 96-well plate หลุมละ 100 μl บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง และล้างด้วย 0.02% tween ใน phosphate buffer saline (T-PBS) 3 ครั้ง

2. เติมหางนมผง (skim milk) ที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ใน phosphate buffer saline (PBS) หลุมละ 300 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง และล้างด้วย T-PBS 3 ครั้ง

3. เติมสารละลายมาตรฐานของ Gypenoside XLIX ที่ทำการเจือจางในเมทานอล 20 เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นต่างๆ หลุมละ 50 μl หรือเติมสารสกัดตัวอย่างที่ทำการเจือจางในเมทานอล 20% หลุมละ 50 μl ร่วมกับเติมแอนติบอดีตัวที่ 1 โพลีโคลนของ Gypenoside XLIX ที่ละลายด้วย T-PBS หลุมละ 50 μl ทำ

การผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่า 30 วินาที บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง และล้างด้วย T-PBS 3 ครั้ง

4. เติมแอนติบอดีตัวที่ 2, POD anti-rabbit IgG ละลายใน T-PBS หลุมละ100 µl บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง และล้างด้วย T-PBS 3 ครั้ง

5. เติมสารตั้งต้น ABTS 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, H_2O_2 0.03% ที่ละลายใน citrate buffer 0.1 M) หลุมละ100 µl บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านไม-โครเพลตชนิดมัลติโหมดที่ค่าความถี่ 405 nm

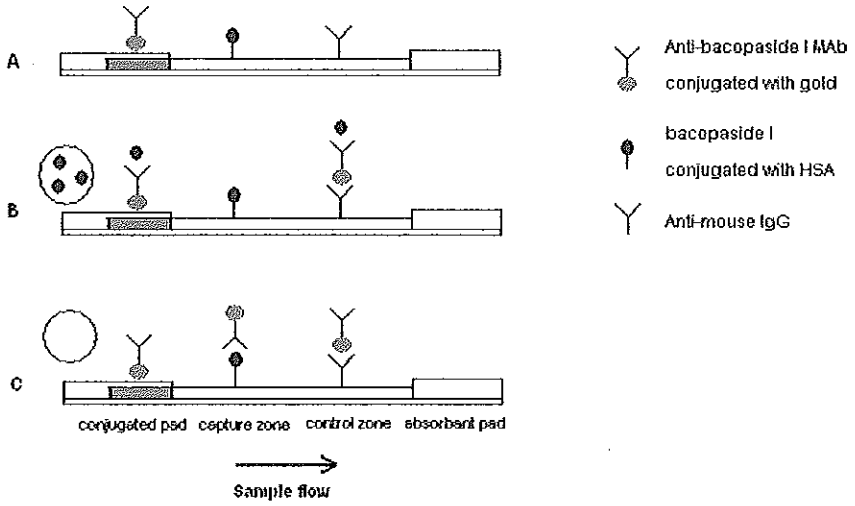
7.นำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดมาหาความเข้มข้นของปริมาณสารกลุ่ม pseudojujubogenin โดยเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน โดยคำนวณจากการทำกราฟของสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ

จากนั้นทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์โดยวิธี ELISA โดยวิธีการตรวจสอบความถูกต้องของการวิเคราะห์จะทำการพิจารณาจากพารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้คือ การหาความเที่ยงของวิธีการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน (within-day and between-day precision) ซึ่งสามารถทำได้โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐาน Gypenoside XLIX ที่ความเข้มข้น 7.81, 15.62, 31.25 และ 62.50 ng/ml ความแม่นของวิธีการวิเคราะห์สามารถทำได้โดยการเติมสารละลายมาตรฐาน Gypenoside XLIX ลงไปในสมุนไพรที่ความเข้มข้น 15.62, 31.25 และ 62.50 ng/ml ทำการสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณ และคำนวณเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของสาร (percent recovery)

การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์สาร saponin glycosides โดยวิธี ELISA ที่ใช้สารภูมิต้านทานแบบโพลีโคลน ต่อ Gypenoside XLIX นั้น มีขั้นตอนการทดลองเหมือนดังที่กล่าวมาข้างต้น เพียงแต่ใช้ สารสกัดจากปัญจขันธ์หรือตัวอย่างอื่นๆ แทน Gypenoside XLIX

4. การพัฒนาชุดตรวจสอบสารกลุ่ม Gypenoside XLIX โดยใช้ immunochromatographic strip test

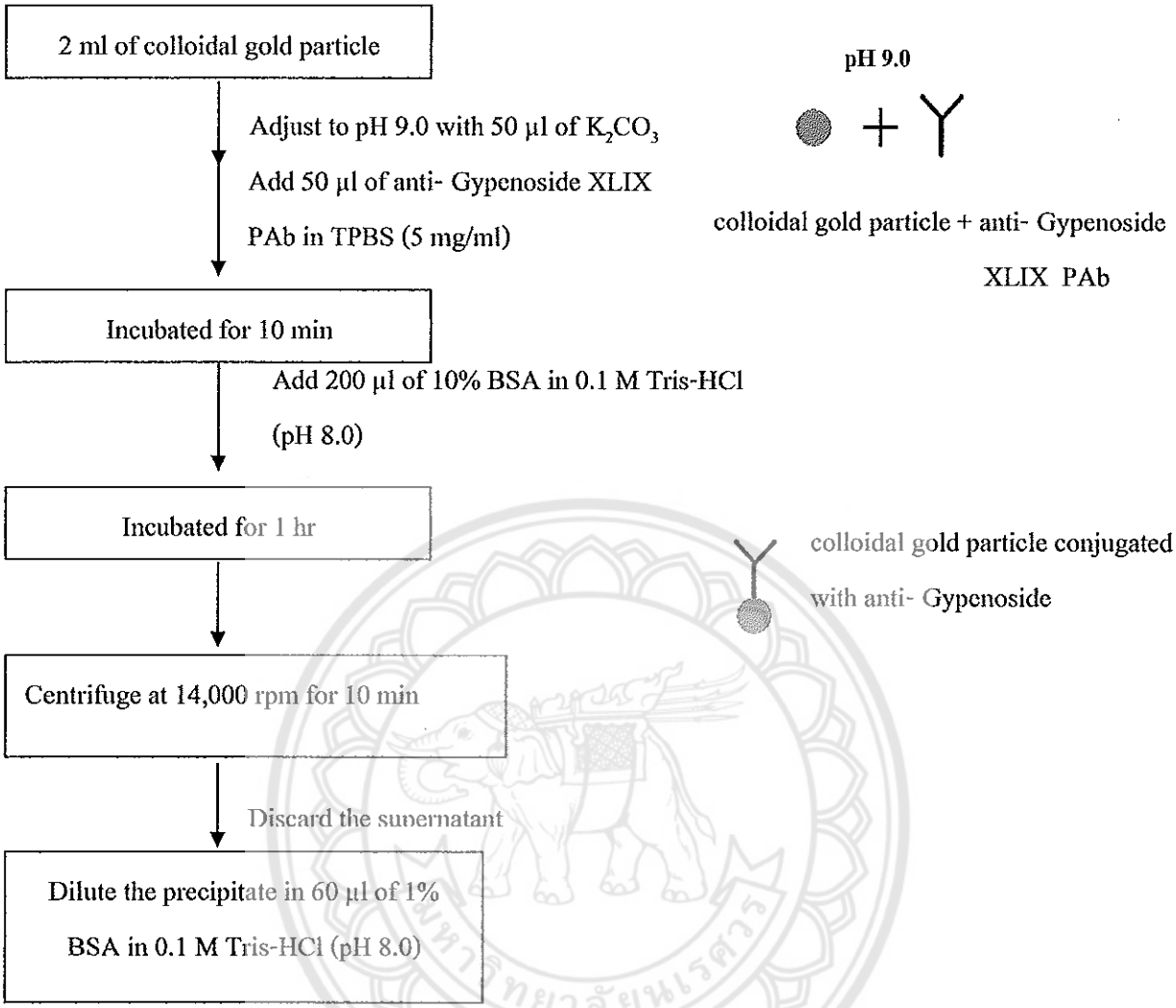
ชุดตรวจสอบสาร (strip test) ใช้หลักการจับกันของแอนติเจนและแอนติบอดี โดยหากในสารสกัดสมุนไพรนั้นมีสารสำคัญอยู่ซึ่งเปรียบเสมือนแอนติเจน สารสำคัญจะไปจับกับแอนติบอดีที่คอนจูเกตกับ detector reagent ตรงบริเวณ conjugated pad จากนั้นเคลื่อนที่ไปยัง capture zone ซึ่งมีแอนติเจนที่คอนจูเจตกับโปรตีน ในบริเวณนี้จะไม่มีการจับกันระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี เนื่องจากไม่มีแอนติบอดีอิสระจาก conjugate pad เหลือพอที่จะจับกับแอนติเจน ที่ test line ได้ จึงไม่เห็นแถบสี และเมื่อสารเคลื่อนที่ไปยัง control zone ซึ่งมี anti-mouse IgG จะเห็นแถบสี เนื่องจากแอนติบอดีที่ conjugated pad สามารถจับกับ IgG ได้ (บริเวณ control zone นี้จะเห็นแถบสีเสมอ) (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 แผนภาพของชุดตรวจสอบ (A) สีจะปรากฏเฉพาะบริเวณ control zone หากสารตัวอย่างมีสารที่สนใจตรวจสอบ (B) และสีจะปรากฏทั้งบริเวณ capture zone และ control zone หากสารตัวอย่างไม่มีสารที่สนใจตรวจสอบ (C)

การเตรียมแอนติบอดีให้เชื่อมต่อกับ colloidal gold

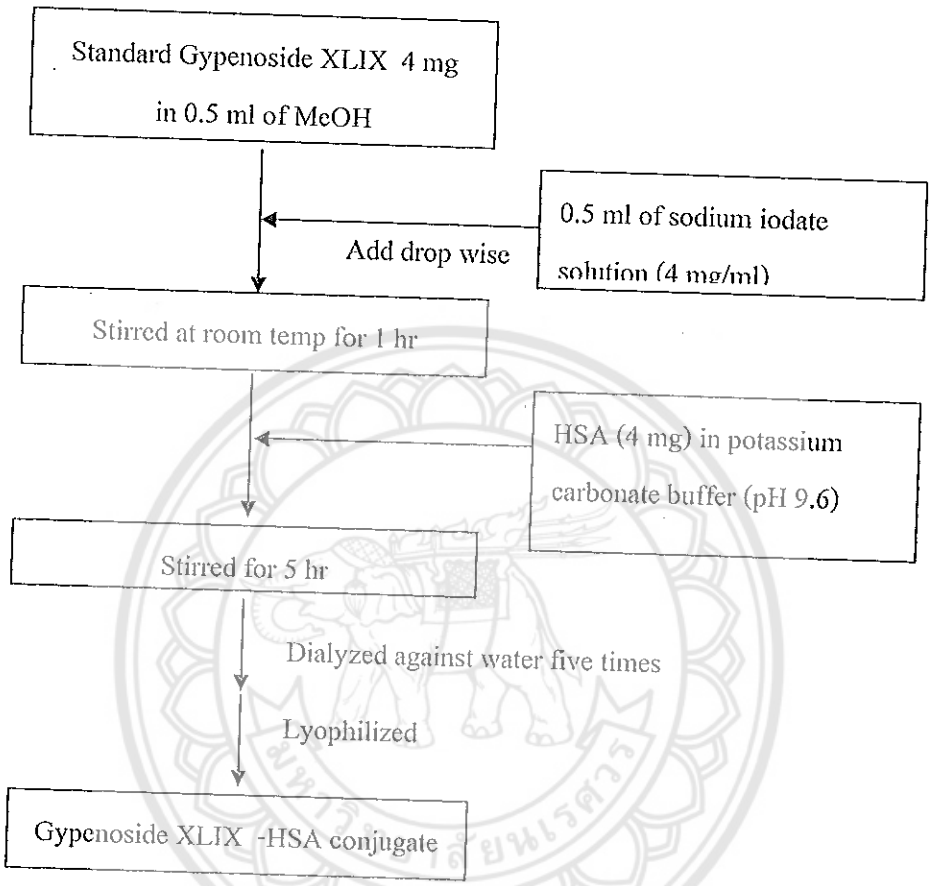
วิธีการเตรียมแอนติบอดีให้เชื่อมต่อกับสารละลาย colloidal gold แสดงดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 แผนภาพการเตรียมแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Gypenoside XLIX ให้เชื่อมต่อกับ colloidal gold

2. การเตรียม Capture reagent

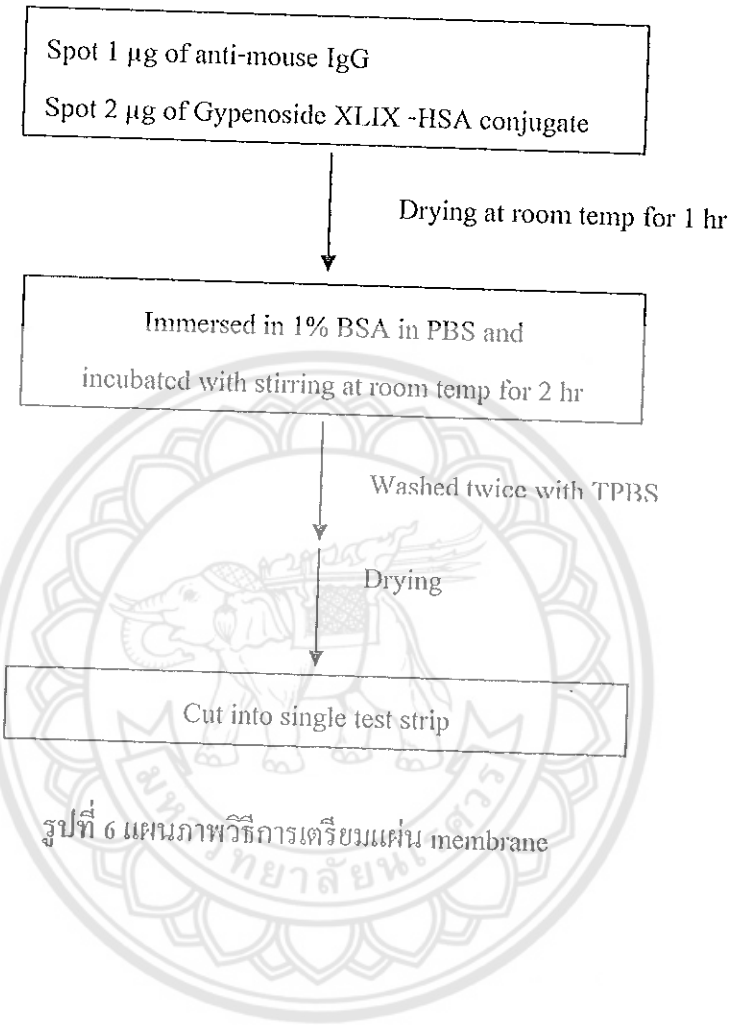
วิธีการ capture reagent โดยให้สาร Gypenoside XLIX ทำการเชื่อมต่อกับโปรตีน HSA แสดงดังรูปที่5



รูปที่ 5 แผนภาพการเตรียม capture reagent

3. การเตรียม membrane สำหรับประกอบชุดทดสอบ

วิธีการเตรียมแผ่น membrane เพื่อใช้ประกอบชุดทดสอบแสดงดังรูปที่ 6



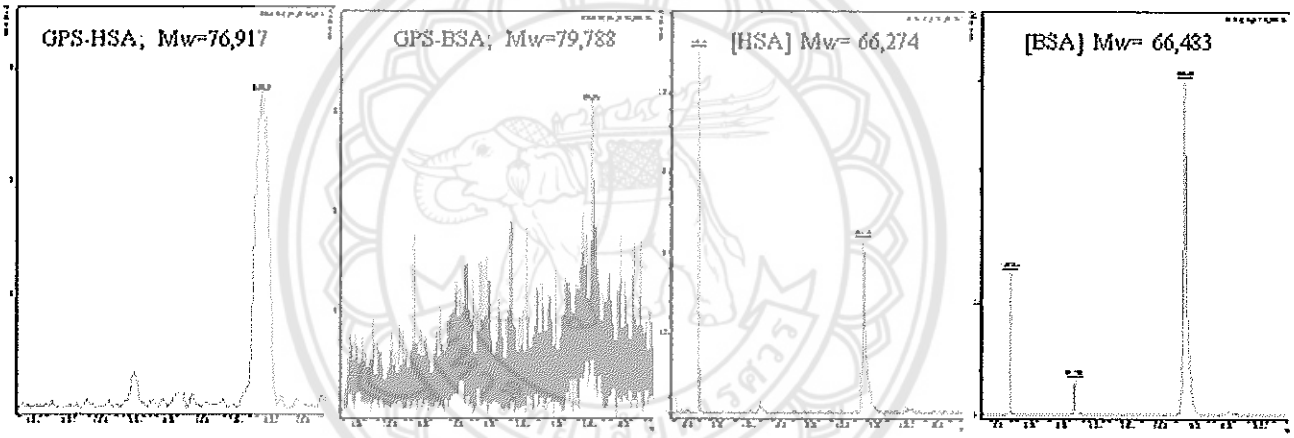
รูปที่ 6 แผนภาพวิธีการเตรียมแผ่น membrane

บทที่ 3
ผลการทดลองและอภิปรายผล

1. การผลิตสารภูมิต้านทานแบบโพลีโคลนต่อ Gypenoside XLIX

การเตรียมสารก่อภูมิต้านทาน (antigen)

จากการตรวจสอบการเชื่อมต่อกับโปรตีนพบว่าสารสามารถเกิดการเชื่อมต่อกับโปรตีนโดยในส่วนของ BSA พบว่าสาร Gypenoside XLIX มีการเชื่อมต่อกับโปรตีนประมาณ 7 โมเลกุล (รูปที่ 12a) ส่วน HSA พบว่า Gypenoside XLIX มีการเชื่อมต่อกับโปรตีนประมาณ 10 โมเลกุล ซึ่งเหมาะสมในการนำไปกระตุ้นให้หนูเกิดสารภูมิต้านทานได้ Gypenoside XLIX มีการเชื่อมต่อกับโปรตีนประมาณ 13 โมเลกุล (รูปที่ 3) ส่วน HSA พบว่า Gypenoside XLIX มีการเชื่อมต่อกับโปรตีนประมาณ 11 โมเลกุล



รูปที่ 3 MALDI-TOF mass spectrum ของสาร Gypenoside XLIX -HSA Gypenoside XLIX -BSA HAS และ BSA

การกระตุ้นกระต่ายให้สร้างภูมิคุ้มกัน (Immunization)

กระต่าย (New Zealand White Rabbit, เพศเมีย) น้ำหนัก 1,800- 2,000 กรัม จำนวน 2 ตัว ถูกกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกัน จำนวน 3 ครั้ง ทุกๆ 20 วัน โดยครั้งที่ 1 เตรียมสารฉีดสร้างภูมิคุ้มกันอัตราส่วน 1:1 จากซีเอฟเอ (Complete Freund's adjuvant; CFA) และ Gypenoside XLIX ที่เชื่อมต่อกับบีเอสเอ 0.4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง ส่วนครั้งที่ 2 ใช้ไอเอฟเอ (Incomplete Freund's adjuvant; IFA) แทนซีเอฟเอ ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ จากนั้น 3 วัน ตรวจสอบสารภูมิคุ้มกันที่จำเพาะต่อ จีปีโนซายด์โดยวิธีเอ็นไซม์ลิงเกตอิมมูโนซอร์แบนเอสเสย์ (Enzyme linked immunosorbant assay:ELISA) ซึ่งใช้หลักการการจับกันแบบเฉพาะเจาะจงของแอนติเจนและแอนติบอดี ฉีดกระตุ้นครั้งที่ 3 หรือ 4 ด้วยจีปีโนซายด์โฟร์ตีไนน์ที่เชื่อมต่อกับบีเอสเอ 0.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรที่ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ pH 7.0-7.4 ปริมาตร 1

มิลลิลิตร เข้าหลอดเลือดที่ใบหู จากนั้น 3 วัน ทดสอบความเข้มข้นของแอนติบอดีด้วยวิธี อีไลซ่าหลังจากการฉีดกระตุ้นในครั้งที่ 3 หรือ 4

2. การแยกแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

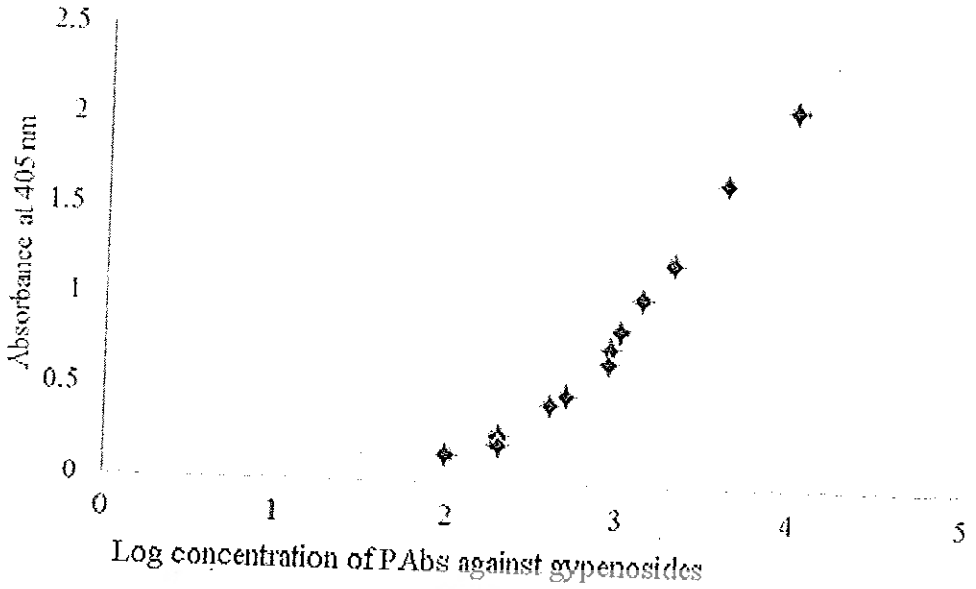
นำเลือดกระต่ายที่ได้จากการเจาะเลือดจากหัวใจ จะได้เลือดประมาณ 30- 50 มิลลิตรต่อกระต่ายหนึ่งตัว นำเลือดไปปั่นที่ความเร็วรอบ 2,000-3,000 รอบต่อนาที แยกเฉพาะส่วนบนหรือซีรั่มมาทำให้บริสุทธิ์ใช้คอลัมน์โปรตีนจี (column protein G) และแยกสารออกด้วยบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชต่ำ ไดอะไลซ์ที่อุณหภูมิในช่วง 4-8 องศาเซลเซียส และทำไลโอฟิลไลซ์ก็จะได้โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่บริสุทธิ์

3. การทดสอบโพลีโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธีอินไดเร็กอีไลซ่า (Indirect ELISA)

วิธีอินไดเร็กอีไลซ่าเป็นวิธีวิเคราะห์ปริมาณโพลีโคลนอลแอนติบอดีในการประดิษฐ์นี้ เพื่อทดสอบว่ามีการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสาร Gypenoside XLIX ขึ้นในซีรั่มของกระต่ายที่ถูกกระตุ้นมีการสร้างภูมิคุ้มกัน และใช้วิธีนี้ในการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Gypenoside XLIX ที่จะให้การดูดกลืนแสงในช่วงที่ตรวจวัดได้ กระบวนการอินไดเร็กอีไลซ่ามีรายละเอียดดังนี้

1) เคลือบเพลท 96 หลุมด้วย 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ของคอนจูเกต Gypenoside XLIX -HSA จากนั้นบ่มที่ 37องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง แล้วนำออกมาล้างด้วย TPBS
2) บล็อกเพลท (Block plate) ด้วย 0.2% เจลาติน จากนั้น บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง
3) ล้างเพลทด้วย TPBS จากนั้นเติมแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร
4) เติมสารละลายของเอนไซม์เพอรอกซิเดสที่เชื่อมต่อกับแอนตีบอดีทุติยภูมิ (Peroxidase-conjugated goat IgG fraction to mouse IgG Fc) ที่ความเข้มข้น 1:1000 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง แล้วนำออกมาล้างด้วย TPBS
5) เติม 0.3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เอบีทีเอส (ABTS) ในซิเตรทบัฟเฟอร์ (citrate buffer) (pH 4.0) ที่มี 0.003% H_2O_2 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37องศาเซลเซียส 15 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ด้วยไมโครเพลทรีดเดอร์ (microplate reader) แล้วบันทึกค่าที่ได้

เมื่อทดสอบโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Gypenoside XLIX ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธีอินไดเร็กอีไลซ่า (Indirect ELISA) ดังรูปที่ 3 พบว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อจีปีโนซายด์โฟร์ตีไนน์ที่ความเข้มข้นที่ 1:1000ให้ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) 1.0 ซึ่งเป็นค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสมในการตรวจวัด จึงใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ความเข้มข้นนี้ในการวิเคราะห์ต่อไป

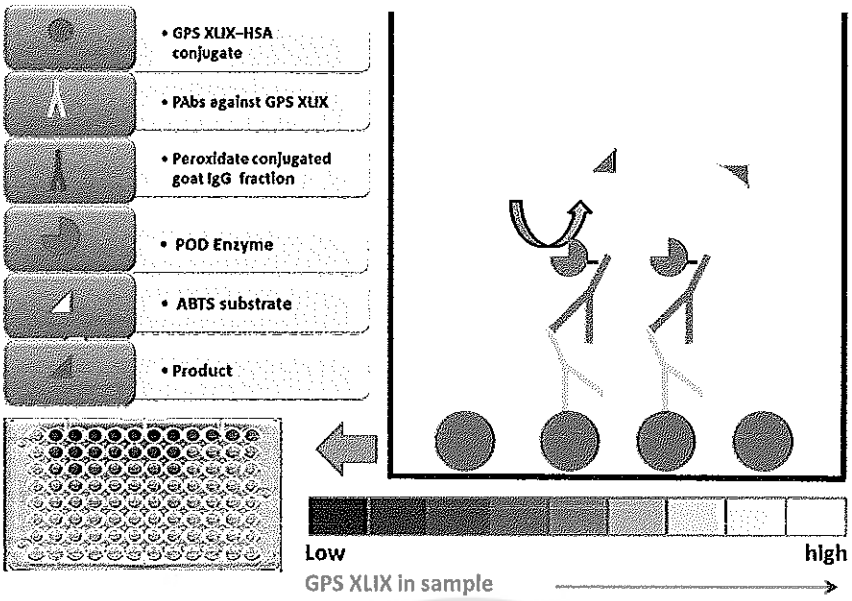


รูปที่ 3 กราฟแสดงโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Gypenoside XLIX ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธีอินไดเร็กอีไลซ่า (Indirect ELISA)

4. การตรวจสอบความถูกต้อง (validate) ของวิธีการวิเคราะห์สาร Gypenoside XLIX ด้วยโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Gypenoside XLIX โดยใช้เทคนิค Competitive ELISA

การทดสอบด้วยคอมเพ็ททิทีฟอีไลซ่า (Competitive ELISA)

วิธีคอมเพ็ททิทีฟอีไลซ่าเป็นวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจน (ในกรณีนี้คือ Gypenoside XLIX หรือสารที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับ Gypenoside XLIX) โดยการให้แอนติเจนที่อยู่ในตัวอย่างแย่งจับแอนติบอดีแทนที่แอนติเจนที่เคลือบอยู่ในไมโครเพลท (รูปที่ 4) ถ้ามีแอนติเจนในตัวอย่างมาก จะเหลือแอนติบอดีไปจับกับแอนติเจนที่เคลือบอยู่บนเพลทน้อย ทำให้การดูดกลืนแสงเกิดขึ้นน้อย แต่ถ้ามีแอนติบอดีในตัวอย่างน้อย จะเกิดการดูดกลืนแสงขึ้นมาก กระบวนการนี้มีรายละเอียดดังนี้



รูปที่ 4 แผนภาพของวิธีวิเคราะห์ด้วยวิธี competitive ELISA

1) เคลือบเพลท 96 หลุมด้วย 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร Gypenoside XLIX -HSA จากนั้น บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง แล้วนำออกมาล้างด้วย TPBS
2) บล็อกเพลท ด้วย 0.2% เจลลาติน จากนั้น บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง
3) ล้างเพลทด้วย TPBS จากนั้นเติมสารมาตรฐาน Gypenoside XLIX 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หรือสารอื่นที่ต้องการทดสอบปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตามด้วยสารละลายโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อจีปีโนซายด์โฟร์ตีไนน์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร
4) เติมสารละลายของเอนไซม์เพอรอกซิเดสที่เชื่อมต่อกับแอนติ้บอดีทุติยภูมิ (Peroxidase-conjugated goat IgG fraction to mouse IgG Fc) ที่ความเข้มข้น 1:1000 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง แล้วนำออกมาล้างด้วย TPBS
5) เติมสารละลาย 0.3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เอบีทีเอส (ABTS) ในซิเตรทบัฟเฟอร์ (citrate buffer) (พีเอช 4.0) ที่มี 0.003% H_2O_2 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 15 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ด้วยไมโครเพลทรีดเดอร์ แล้วบันทึกค่าที่ได้

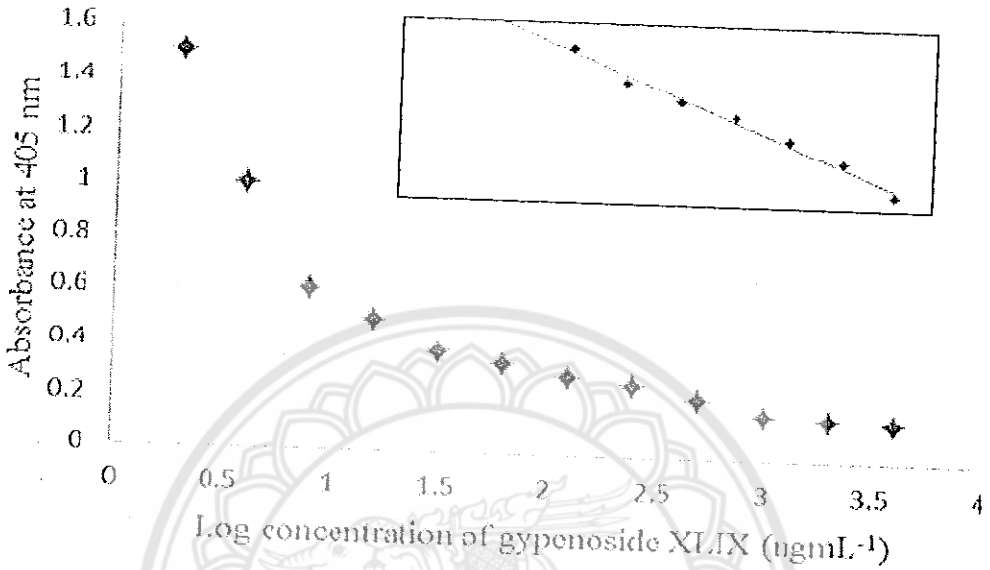
จากการทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross reactivity) ของโพลีโคลนอลแอนติบอดีตามการประดิษฐ์นี้ โดยการทดสอบกับสารจากธรรมชาติในหลายๆ กลุ่ม เช่น สารกลุ่มซาโปนินไกลโคไซด์ สเตอรอยด์ อัลคาลอยด์อิริดอยด์ คูมาริน ฟลาโวนอยด์ เทอร์ปีนอยด์ และฟีนิลโพรเพน พบว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อจีปีโนซายด์โฟร์ตีไนน์ที่สร้างขึ้นนี้ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross reactivity) กับสารที่ทดสอบทั้งหมด รูปที่ 6 แสดงว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีตามการประดิษฐ์มีความจำเพาะต่อสารที่ประกอบด้วยสเตอรอยด์อะไกลโคนที่ใกล้เคียงกับ Gypenoside XLIX ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์นี้จึงสามารถ

ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณซาโปนินทั้งหมดที่มีสเตอรอยด์อะไกลโคนใกล้เคียงกับจีปีโนซายด์โฟร์ตีไนน์ในตัวอย่างจากปัญจขันธ์ได้

ตารางที่ 1 ค่า cross reactivities (CRs) สารภูมิต้านทานแบบโพลีโคลนต่อสาร Gypenoside XLIX ต่อสารจากธรรมชาติชนิดต่างๆ

สาร	การแบ่งกลุ่ม (Classification)	ค่าCRs (%) (n=3)
จีปีโนซายด์โฟร์ตีไนน์ (Gypenoside XLIX)	ซาโปนิน ไกลโคไซด์ (Saponin glycosides)	100.00
จีปีโนซายด์โฟร์ตีไนน์ (Gypenoside XVII)	ซาโปนิน ไกลโคไซด์ (Saponin glycosides)	12.90
บาโคปาไซด์ทู (Bacopaside II)	ซาโปนิน ไกลโคไซด์ (Saponin glycosides)	< 0.01
จินเสนโนไซด์อาร์จีวัน(Ginsenoside Rg1)	ซาโปนิน ไกลโคไซด์ (Saponin glycosides)	< 0.01
จินเสนโนไซด์อาร์บีวัน(Ginsenoside Rb1)	ซาโปนิน ไกลโคไซด์ (Saponin glycosides)	< 0.01
กลีเซอร์ไรซิน (Glycyrrhizin)	ซาโปนิน ไกลโคไซด์ (Saponin glycosides)	< 0.01
ไซโคซาโปนินเอ (Saikosaponin A)	ซาโปนิน ไกลโคไซด์ (Saponin glycosides)	< 0.01
แอลฟา อะไมริน (α - Amyrin)	ซาโปนิน ไกลโคไซด์ (Saponin glycosides)	< 0.01
เพร็ดนิโซโลน (Prednisolone)	สเตียรอยด์ (Steroids)	< 0.01
แคฟเฟออิคแอสิด (Caffeic acid)	พิวรีนอัลคาลอยด์ (Purine alkaloids)	< 0.01
โซลานีน (Solanine)	สเตียรอยด์ อัลคาลอยด์ (Steroidal alkaloids)	< 0.01
สเวอร์เทียมาริน (Swertiamarin)	อิริดอยด์ ไกลโคไซด์ (Iridoid glycosides)	< 0.01
เจนิโพไซด์ (Geniposide)	อิริดอยด์ ไกลโคไซด์ (Iridoid glycosides)	< 0.01
เซนโนไซด์เอ (Sennoside A)	แอนทราควิโน ไกลโคไซด์ (Anthraquinones glycosides)	< 0.01
เอสคูเลติน (Aesculetin)	คูมาริน (Coumarins)	< 0.01
กริสสิโอฟุลวิน (Griseofulvin)	คูมาริน (Coumarins)	< 0.01
เฮสเพอริดิน (Hesperidin)	ฟลาโวนอยด์ ไกลโคไซด์ (Flavonoid glycosides)	< 0.01
แคมเฟอร์ (Camphor)	เทอร์ปีนอยด์ (Terpenoids)	< 0.01
ซินนามิคแอสิด (Cinnamic acid)	ฟีนิลโพรเพน (Phenyl propanes)	< 0.01

จากการตรวจสอบ (validate) วิธีการวิเคราะห์สาร Gypenoside XLIX โดยเทคนิคอีไลซ่าที่ใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Gypenoside XLIX ที่ประดิษฐ์ขึ้น พบว่าวิธีนี้สามารถตรวจวัดสาร Gypenoside XLIX และซาโปนินที่มีสเตอรอยด์อะไกลโคนใกล้เคียงกับ Gypenoside XLIX ในช่วงความเข้มข้น 1,000.00 ถึง 15.60 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร(รูปที่ 5) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบสารได้ (Limit of Detection, LOD) และ (Limit of Quantitation, LOQ) คือ 0.75 นาโนกรัม



รูปที่ 5 วิธีการวิเคราะห์สาร Gypenoside XLIX โดยเทคนิค competitive ELISA ที่ใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Gypenoside XLIX

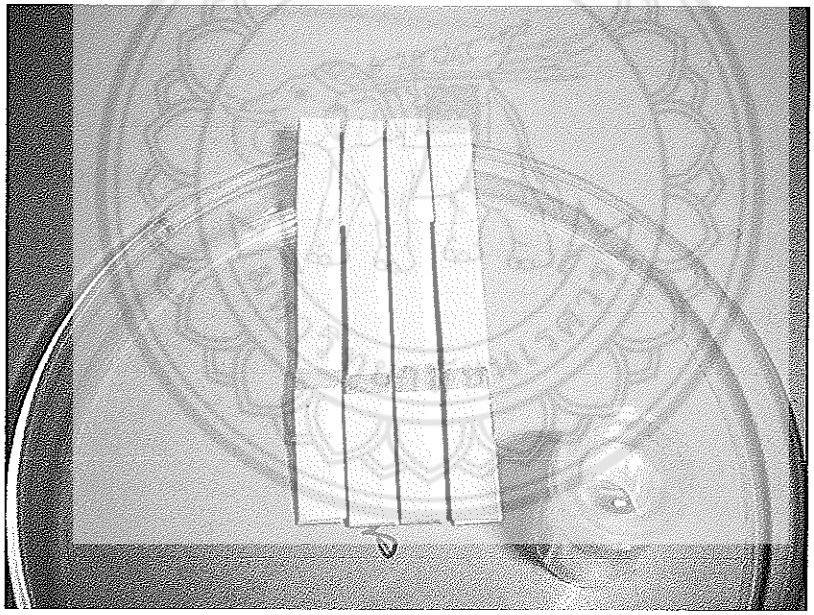
ซึ่งแสดงถึงความไว (sensitivity) ที่สูงมากเมื่อเทียบกับวิธีการตรวจวัดอื่นที่มีการใช้กันอยู่ เช่น วิธีรงคเลขผิวบางที่มีสมรรถนะสูง (High Performance Thin Layer Chromatography) และเอชพีแอลซี (HPLC) ที่ต่อกับอีแอลเอสดี (Evaporative Light Scattering Detector; ELSD) ซึ่งวิเคราะห์ได้ในช่วงไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Pennumaji และคณะ, 2009) เท่านั้น นอกจากนี้ เมื่อได้ทำการศึกษาความแม่นยำในเพลทเดียวกัน และต่างเพลท (Intra and Inter-assay precision) โดยทำการวัดสารมาตรฐานจีปีโนซายด์โฟร์ตีไนน์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในไมโครเพลทเดียวกัน (Intra-assay) ซ้ำกันห้าครั้งและไมโครเพลทต่างกัน (Inter-assay) ซ้ำกันสามครั้งแล้วคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, RSD) ที่เกิดขึ้น พบว่าร้อยละเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่เกิดขึ้นต่ำกว่าสิบ (ตารางที่ 2) แสดงว่าวิธีการวิเคราะห์นี้มีความแม่นยำเป็นที่ยอมรับได้

ตารางที่ 2 ค่าความเที่ยงของการวิเคราะห์หาปริมาณสาร Gypenoside XLIX ด้วยวิธี ELISA โดยใช้สารภูมิต้านทานแบบโมโนโคนอลต่อ Gypenoside XLIX

Gypenoside XLIX (ng mL^{-1})	Inter-assay %RSD (n=3)	Intra-assay %RSD (n=5)
125.0	2.95	4.34
62.5	5.44	6.89
31.3	3.90	1.84
15.6	5.62	4.79

5. ชุดทดสอบสาร Gypenoside XLI แบบ Immunochromatographic test

จากการพัฒนาชุดตรวจสอบสารกลุ่ม Gypenoside XLI แบบ Immunochromatographic test ดังรูป 7



รูปที่7 ชุดตรวจสอบสารกลุ่ม Gypenoside XLI

6. การทวนสอบวิธีของชุดตรวจสอบสาร Gypenoside XLI

จากการทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross reactivity) ของโพลีโคลนอลแอนติบอดีตามการประดิษฐ์นี้ โดยการทดสอบกับสารจากธรรมชาติในหลายๆ กลุ่ม เช่น สารกลุ่มซาโปนินไกลโคไซด์ สเตอรอยด์ อัลคาลอยด์อิริดอยด์ เทอร์ปีนอยด์ และฟีนิลโพรเพน พบว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อจีปี

บทที่ 4
สรุปผลการทดลอง

เพื่อเป็นการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์คุณภาพของปัญจขันธ์ ซึ่งเป็นสมุนไพรเศรษฐกิจที่มีการส่งออกเป็นอันดับต้นๆ รวมทั้งมีการใช้ประโยชน์หลากหลาย ทั้งที่เป็นชา อาหารเสริมสำหรับบำรุงร่างกาย แต่ปัจจุบันมีปัญจขันธ์หลายพันธุ์ ทั้งที่มีสารสำคัญและมีน้อยวางขายและส่งออก ในการตรวจสอบคุณภาพของปัญจขันธ์ ผู้วิจัยได้ผลิตสารภูมิต้านทานแบบโพลีโคลนต่อ Gypenoside XLIX ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงกับสารกลุ่ม gypenosides ที่พบใน ปัญจขันธ์ และพัฒนาวิธีวิเคราะห์ทางภูมิคุ้มกันวิทยาได้แก่ enzyme-linked immunosorbant assays (ELISA) โดยใช้สารภูมิต้านทานแบบโพลีโคลนที่ผลิตขึ้นมา ผลการทดลองพบว่า ให้ผลการการวิเคราะห์ที่มีความไวในการวิเคราะห์ โดยค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้สำหรับวิธี ELISA คือ 0.75 นาโนกรัม และมีความจำเพาะเจาะจงต่อสาร gypenosides และการพัฒนาชุดทดสอบสาร Gypenoside XLI แบบ Immunochromatographic test ที่มีความจำเพาะเจาะจงสูง โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบสารได้ (Limit of Detection, LOD) คือ 1.56 ไมโครกรัม

ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยนี้ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในเชิงอุตสาหกรรมเพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพสมุนไพรปัญจขันธ์ เพื่อสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์อื่น ได้แก่ Immunochromatographic test ที่เป็นวิธีทดสอบเบื้องต้นในการตรวจหาสาร gypenosides ที่มีในผลิตภัณฑ์ของปัญจขันธ์ที่วางขายและส่งออกต่างประเทศได้

บทที่ 5

บรรณานุกรม

1. Mishra RN, Joshi D. Jiao GuLan (*Gynostemma pentaphyllum*): The Chinese Rasayan-Current Research Scenario. IJRPBS 2011; 2(4): 1483-1502.
2. Aktan F, Henness S, Roufogalis BD, Ammit AJ. Gypenosides derived from Gynostemma pentaphyllum suppress NO synthesis in murine macrophages by inhibiting iNOS enzymatic activity and attenuating NF-kappaB-mediated iNOS protein expression. Nitric Oxide. 2003 Jun; 8(4): 235-42.
3. Huang TH, Tran VH, Roufogalis BD, Li Y. Gypenoside XLIX, a naturally occurring PPAR-α activator, inhibits cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression and activity in human endothelial cells. Eur J Pharmacol. 2007 Jun 22; 565(1-3): 158-65.
4. Zhang C, Yang X, Xu L. Immunomodulatory action of the total saponin of Gynostemma pentaphylla. Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi. 1990 Feb; 10(2): 96-8, 69-70.
5. Hau DM, Feng Y, Chen WC, Liu IH, Chen KT, Lin SS, Wang MI. Effects of Gypenosides on cellular immunity of gamma-ray-irradiated mice. Chin Med J (Engl). 1996 Feb; 109(2): 143-6.
6. Li L, Jiao L, Lau BH. Protective effect of Gypenosides against oxidative stress in phagocytes, vascular endothelial cells, and liver microsomes. Cancer Biother. 1993 Fall; 8(3): 263-72.
7. Tanner MA, Bu X, Steimle JA, Myers PR. The direct release of nitric oxide by Gypenosides derived from the herb Gynostemma pentaphyllum. Nitric Oxide. 1999 Oct; 3(5): 359-65.
8. Lu KW, Chen JC, Lai TY, Yang JS, Weng SW, Ma YS, et.al. Gypenosides causes DNA damage and inhibits expression of DNA repair genes of human oral cancer SAS cells. In Vivo 2010 May-Jun; 24(3): 287-91.
9. Lu KW, Chen JC, Lai TY, Yang JS, Weng SW, Ma YS, et.al. Gypenosides suppress growth of human oral cancer SAS cells in vitro and in a murine xenograft model: The role of apoptosis mediated by caspase-dependent and caspase-independent pathways. Integr Cancer Ther. 2012 Jun; 11(2):129-40.

10. Hong SW, Yang JH, Joh EH, Kim HJ, Kim DH. Gypenoside TN-2 ameliorates scopolamine-induced learning deficit in mice. J Ethnopharmacol. 2011 Apr 12;134(3):1010-3

11. Zhang G, Zhao Z, Gao L, Deng J, Wang B, Xu D, et.al. Gypenoside attenuates white matter lesions induced by chronic cerebral hypoperfusion in rats. Pharmacol Biochem Behav. 2011 Jul; 99(1): 42-51.

12. Megalli S, Aktan F, Davies NM, Roufogalis BD. Phytopreventative anti-hyperlipidemic effects of gynostemma pentaphyllum in rats. J Pharm Pharm Sci. 2005 Sep 16; 8(3): 507-15.

13. Hesse C, Razmovski-Naumovski V, Duke CC, Davies NM, Roufogalis BD. Phytopreventative effects of Gynostemma pentaphyllum against acute Indomethacin-induced gastrointestinal and renal toxicity in rats. Phytother Res. 2007 Jun; 21(6): 523-30.

14. Jirawattanapong W, Thongchin T, Chadchen N, Boonruad. Chemical Specification of *Gynostemmapentaphyllum* (Thunb.) Makino Extract. วารสารวิทยาศาสตร์ 2551; 50(3):174-184.

15. Lui F, Ren D, Guo DA, Pan Y, Zhang H, Hu P. Method development for Gypenosides fingerprint by high performance liquid chromatography with diode-array detection and the addition of internal standard. Chem Pharm Bull (Tokyo) 2008; 56(3): 389-393.

16. Lu, Y., Yang, X., Zhao, Y., Ruan, Y., Yang, Y., & Wang, Z. (2009). Separation and quantification of component monosaccharides of the tea polysaccharides from Gynostemma pentaphyllum by HPLC with indirect UV detection. Food Chemistry, 112, 742–746.

17. Geoffrey C.K, Elaine A.P, Monique S.J. Simmonds Chromatographic behaviour of steroidal saponins studied by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromtogr A* 2007; 1148: 177–183

18. Phrompittayarat, W., Putalun, W., Tanaka, H., Wittaya-areekul, S., Jetiyanon, K., and Ingkaninan, K. (2007) An enzyme-linked immunosorbant assay using polyclonal antibodies against bacopaside I. Anal. Chim. Acta. 584:1-6.

ภาคผนวก

QK
W45
.C96
2564
2562
05 มิ.ย. 2564
1034430

The 9th Pong Ding Yuen International Symposium on Traditional Chinese Medicine
Chinese Medicine for Mental Health: From Bedside to Bench
第九屆龐鼎元國際中醫藥研討會
中醫藥用於精神健康: 從臨床到實驗室
5-6/12/2015 | Hong Kong

ABSTRACT SUBMISSION FORM

*Completed abstract form must be submitted in **MS Word format** to the Symposium Secretariat by e-mail: pdysymposium@hku.hk on or before **September 30, 2015**. Registration to the Symposium should be made separately, please refer to the Symposium webpage at http://www.scm.hku.hk/pdy2015.*
Please complete this form in BLOCK letters in ENGLISH.

Instructions:
1. The abstract should be written in English only;
2. Please provide information of the Presenting author, First author, Correspondence author and other authors as required below;
3. The abstract should contain no more than 200 words in MS word format. Only textual contents will be accepted. No table and picture is allowed;
4. Please indicate if you wish the abstract to be selected for oral and/or poster presentation. Please note that abstracts which have been selected for oral and/or poster presentation will automatically be included in the programme book;
5. All blanks in this form are compulsory;
6. No amendment will be allowed after the abstract has been submitted. Please make sure all information are checked carefully before submission.

1. Presenting Author

Salutation *: ☐Prof 教授 / Dr 博士 ☐Mr 先生 ☐Mrs 太太 ☐Ms 女士
Surname: ____Phrompittayarat_____(English*)_____(中文)
Given Name: ___Watoo_____(English*)_____(中文)
Position: _____Lecturer_____(English*)_____(中文)
Department: ____Thai Traditional Medicine _____(English*)_____(中文)
Institution: ____Faculty of Public Health, Naresuan University_____(English*)_____(中文)
Mailing Address : ___99 M.9, Tapoh, Muang, Phitsanulok 65000, Thailand
Tel: +66 (81)-6713839_ Fax: +66 (55)--968607 E-mail:_watoop@nu.ac.th, watoop@yahoo.com
Registration to the Symposium is made:
/ Yes ☐ No (Please register and refer to http://www.scm.hku.hk/pdy2015 *No presentation is allowed without registration)
Assistant's contacts (if applicable): Name: Assoc.Prof.Dr.Kornkanok Ingkaninan Tel: +66 (81)--4817350_ E-mail: k_ingkaninan@yahoo.com

2. Correspondence Author *(If different from the above)*

Salutation : ☐ Prof / Dr ☐ Mr ☐ Mrs ☐ Ms
Surname : __ Phrompittayarat ___ Given Name : __Watoo_____
Position : ___ Lecturer __Department/Institution:_ Thai Traditional Medicine, Faculty of Public Health, Naresuan University _
Mailing Address : ____99 M.9, Tapoh, Muang, Phitsanulok 65000, Thailand _____
_____
Tel: +66 (81)-6713839_ Fax: +66 (55)--968607 E-mail:_watoop@nu.ac.th, watoop@yahoo.com

3. First and other authors *(If different from the above)*

First author:
Dr. Watoo Phrompittayarata (Salutation/Name) Lecturer/ Faculty of Public Health, Naresuan University, _(Position/institution)
Other authors
Assoc.Prof.Dr.Kornkanok Ingkaninan (Salutation/Name)) Lecturer/ Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences and Center of Excellence for Innovation in ChemistryFaculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University (Position/institution)
Assoc.Prof.Dr. Nantaka Khorana (Salutation/Name) Lecturer/ Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences (Position/institution)
Assoc.Prof.Dr. Hiroyuki Tanaka (Salutation/Name) Department of Medicinal Plant Breeding, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University (Position/institution)

4. Preferred form(s) of presentation* *(can choose more than one):*

/ Oral ☐ Poster
**please also see point 4 above*

5. Title and contents of the abstract

ABSTRACT *(in English only)*

A. Title

Immunochromatographic test for the rapid detection of gypenosides in *Gynostemma pentaphyllum* Makino

B. Contents (no more than 200 words)

Gynostemma pentaphyllum Makino or Jiaogulan is a medicinal plant that is widely used for a variety of health-promoting purposed such as neuroprotective, anti-inflammation, antioxidant, anticancer and adaptogen. Gypenosides has been reported as the major active compound in Jiaogulan. In this study we aimed to control quality of Jiaogulan to ensure the active compound contents in the raw material and Jiaogulan products. An immunochromatographic(IC) test has been developed for the rapid detection of gypenoosides in Jiaogulan by using anti-gypenosides polyclonal antibodies to detect gypenosides in theraw material and products from Jiaogulan.. The IC test kit was developed and validated for accuracy, specificity and limit of detection (LOD). The results showed that the developed IC detected gypenosides sensitivity and specificity. The LOD was 1.56 μg/ml. Finally, the IC test using an anti-gypenosides polyclonal antibodies could be used for screening gypenosides in plant materials and Jiaogulan products.

6. Declaration

I declare that:

a. The above information are checked and correct without needs for further amendments;
b. Submission of the above information is legitimate and legal from the best of my knowledge and I will be fully responsible for any legal issues arise in regard to this submission, if there shall be any;
c. Consents have been obtained from all related parties for the submission of the abstract and provision of personal information above, including but not limited to all authors of the submitted abstract;
d. I authorize the symposium organizer(s), the secretariat and other related parties to use the above submitted information for the purposes in relation to this particular symposium.

HOTEL JEN HONG KONG

Confirmation Signature:

(Signature)

(Dr. Watoo Phrompittayarat)

(30 Sep. 15)

ENQUIRIES

Symposium secretariat:

Address: 10 Sassoon Road
School of Chinese Medicine
The University of Hong Kong
Pokfulam, Hong Kong

Telephone: 852-8100 0538
Email: pdysymposium@hku.hk