

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์
เรื่อง

การผลิตสารต้านทานแบบโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอเชียติโคไซด์
เพื่อการควบคุมคุณภาพบัวบก
Production of monoclonal antibody against asiaticoside
for quality control of the *Centella asiatica* (L.) Urban

โดย
ผศ.ดร.ทวีศักดิ์ จีงวัฒนตระกูล

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานงบประมาณแผ่นดิน
ประจำปีงบประมาณ 2555
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย ม.อบ. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

คำนำ

รายงานการวิจัยเรื่อง การผลิตสารต้านทานแบบโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอชียติโคไซด์ เพื่อการควบคุมคุณภาพบัวบก ได้รับการสนับสนุนจากเงินอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2555 มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์เชิงคุณภาพและ ปริมาณของสารเอชียติโคไซด์ ซึ่งเป็นสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของบัวบก โดยการผลิตโคโน โคลนอลแอนติบอดีต่อสารดังกล่าว และทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ด้วยวิธีทาง Immunoassay ได้แก่ ELISA, Western blotting, Immunochromatographic strip ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่ารายงานฉบับนี้จะเป็น ประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจศึกษาต่อไปและผู้ประกอบการผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

ผศ.ดร. ทวีศักดิ์ จิ่งวัฒนตระกูล

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่สนับสนุนทุนวิจัยในการทำวิจัยเรื่อง การผลิตสารต้านทานแบบโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอชอีทีโคไซด์เพื่อการควบคุมคุณภาพบัวบก และขอขอบคุณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ได้สนับสนุนสถานที่ในการทำวิจัย ตลอดจนอุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในการทำวิจัย

ผู้วิจัยขอขอบคุณ Associate Professor Hiroyuki Tanaka คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยคิซูกะ ประเทศญี่ปุ่น รศ.ดร.วราภรณ์ ภูตะลุน คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น รศ.ดร.บุญชู ศรีตุลา รักษ์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้สนับสนุนสารเคมีและวัสดุวิทยาศาสตร์บางส่วนที่ใช้ในการวิจัย ตลอดจนให้คำแนะนำเพื่อให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วง และผู้วิจัยขอขอบคุณ รศ.ดร.มยุรี ดันตีสิริระ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์สารมาตรฐาน

บทคัดย่อ

เอเชียติโคไซด์เป็นสารประกอบกลุ่มไตรเทอร์ปีนอยด์ซาโปนิน ที่พบเป็นองค์ประกอบหลักใน บัวบก (*Centella asiatica* (L.) Urban) ซึ่งเป็นพืชพื้นบ้านของไทยที่มีการนำมาใช้ประโยชน์ทางยามาเป็น เวลานาน โดยสารเอเชียติโคไซด์แสดงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่สำคัญได้แก่ ช่วยเพิ่มความจำและป้องกันการ เกิดอัลไซเมอร์ สมานแผลและรักษาแผลเปื่อย ด้านการซึมเศร้า ด้านอนุมูลอิสระ กระตุ้นกระบวนการสร้าง คอลลาเจน กระตุ้นหรือเสริมภูมิคุ้มกัน ลดความดันโลหิต ด้านการอักเสบ ป้องกันการเกิดมะเร็ง และปกป้อง เซลล์ประสาท จากคุณสมบัติดังกล่าวทำให้มีการใช้บัวบกเป็นส่วนประกอบในเภสัชภัณฑ์ ผลิตภัณฑ์เสริม สุขภาพ และเครื่องสำอางหลายประเภทในปัจจุบัน ดังนั้นการควบคุมคุณภาพและปริมาณสารที่ออกฤทธิ์ใน วัตถุดิบบัวบกจึงเป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่งต่อผู้บริโภค ทั้งในด้านความปลอดภัยและเพื่อประสิทธิผลในการใช้ ใน การศึกษาวิจัยนี้ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสารเอเชียติโคไซด์ และพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ สารเอเชียติโคไซด์ด้วยวิธีทางอิมมูโนโลยี ได้แก่ เอนไซม์-ลิงค์ อิมมูโนแอสเซย์ (อีไลซา) และอิมมูโนสเทิร์น บล็อกทิง โดยวิธีอีไลซาสามารถตรวจวัดปริมาณสารเอเชียติโคไซด์ได้ในช่วง 0.78 - 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และวิธีอิมมูโนสเทิร์น บล็อกทิงสามารถตรวจวัดปริมาณสารเอเชียติโคไซด์ได้ในช่วง 62.5 - 500 นาโนกรัม เมื่อทำ การตรวจรับรองความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทั้งสองวิธี พบว่ามีความถูกต้องและแม่นยำ รวมถึงมีความ สอดคล้องกันกับวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงซึ่งใช้เป็นวิธีมาตรฐาน ดังนั้นวิธีอีไลซา สามารถใช้เป็น วิธีมาตรฐานในวิเคราะห์ปริมาณสารเอเชียติโคไซด์ในทั้งตัวอย่างพืชและผลิตภัณฑ์ ในขณะที่วิธีอิมมูโนสเทิร์น บล็อกทิงเหมาะกับการวิเคราะห์เฉพาะในตัวอย่างพืชเท่านั้น โดยทั้งสองวิธีเป็นวิธีที่มีความไวและม ี ความจำเพาะเจาะจงสูง ทำให้สามารถวิเคราะห์สารได้อย่างสะดวกรวดเร็วและประหยัดค่าใช้จ่ายเมื่อ เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน นอกจากนี้ยังได้ทำการพัฒนาชุดทดสอบสารเอเชียติโคไซด์เพื่อใช้คัดกรอง วัตถุดิบบัวบกเบื้องต้น ชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจสอบสารได้ในเวลา 10-15 นาทีโดยใช้ปริมาณ ตัวอย่างเพียงเล็กน้อย ปริมาณสารต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ด้วยชุดทดสอบคือ 12.5 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร

Abstract

Asiaticoside, triterpenoid saponin, is the major active component of Thai medicinal herb name as Bua bok (*Centella asiatica* (L.) Urban). Asiaticoside was reported to possess the effects of memory enhancer, prevention of Alzheimer's disease, wound healing activity, antidepressant, free radical scavenger, collagen enhancement, anti-hypertension, anti-inflammatory, anticancer and neuroprotection. According to the Pharmacological activities of asiaticoside, the use of products from Bua bok has been increasing in the form of food supplements, nutraceuticals and cosmetics. Therefore, the quality control of the raw material and finished products are necessary to concern about safety and efficacy of products. In order to quality control of Bua bok, a fast and accurate analytical procedure is required for estimating the asiaticoside content of individual plants and products. In this study, we produced the monoclonal antibody against asiaticoside and also developed the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Eastern Blotting for quantitative analysis of asiaticoside. The measuring range of asiaticoside by using ELISA and Eastern Blotting method was 0.78 - 25 µg/ml and 62.5 - 500 ng, respectively. The two methods were specificity, precision and accuracy and also correlated with High performance liquid chromatography (HPLC). Thus the ELISA method can be used as a standard method for quantitative analysis of asiaticoside in plants and finished products, whereas the Eastern Blotting is suitable for quantitative analysis in plants only. These immunoassays have several advantages that include high sensitivity, specificity, rapidity and ease of use for determination of asiaticoside. In addition, we also developed the immunochromatographic strip for screening of asiaticoside. This strip was developed due to the rapidity of analyzing using only 10 - 15 minute and small volume of sample. The limited detection of immunochromatographic strip is 12.5 µg/ml.

สารบัญ

เนื้อหา	หน้า
บทสรุปผู้บริหาร	ก
คำนำ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
บทคัดย่อ	ง
Abstract	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญรูป	ช
สารบัญตาราง	ซ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ณ
บทนำ	1
การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	5
วิธีการดำเนินงานวิจัย	10
ผลการวิจัย	18
อภิปรายผลการวิจัย	35
สรุปผลการวิจัย	38
บรรณานุกรม	40
ผลงานวิจัยเผยแพร่	47
ภาคผนวก	48
ประวัติผู้วิจัย	50

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1. บัวบก (<i>Centella asiatica</i> (L.) Urban)	5
2. สารกลุ่ม triterpenoid saponin ที่พบในบัวบก	6
3. โครงสร้าง Immunoglobulin G (IgG)	8
4. ปฏิกริยาการเกิด AS-BSA	10
5. ชุดตรวจสอบสาร immunochromatographic strip	17
6. MALDI-TOF mass spectrum ของ AS-BSA	18
7. ความสามารถในการเกิดปฏิกริยากับ AS ของ anti-AS MAbs (2B4)	20
8. ความจำเพาะในการจับกับ AS ของ anti-AS MAbs (2B4)	21
9. กราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ปริมาณ AS ด้วยวิธี ELISA	23
10. กราฟแสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ AS ในบัวบกที่วิเคราะห์โดยวิธี ELISA เทียบกับ HPLC	25
11. การวิเคราะห์ด้วยวิธี Eastern Blotting ของสารมาตรฐาน AS ที่ความเข้มข้นต่างๆ	27
12. กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน AS ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Eastern Blotting	27
13. การวิเคราะห์หาปริมาณสาร AS ในตัวอย่างพืชด้วยวิธี Eastern Blotting	28
14. กราฟแสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ AS ในบัวบกที่วิเคราะห์โดยวิธี Eastern Blotting เทียบกับ HPLC	30
15. การเกิดปฏิกริยาบน immunochromatographic strip	32
16. การสังเกตผลการตรวจด้วย immunochromatographic strip	33
17. การวิเคราะห์ตัวอย่างบัวบกและแวนแกว่ด้วยชุดทดสอบ immunochromatographic strip	34

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. สารสำคัญจากพืชสมุนไพรที่มีการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการวิเคราะห์	9
2. การตรวจประสิทธิภาพ hybridomas ด้วยวิธี ELISA	19
3. การหาชนิด (isotype) ของ MAb 2B4	20
4. % cross-reactivity (% CR) ของ anti-AS MAb (2B4) ต่อสารชนิดอื่นๆ	22
5. Intra- และ Inter-assay precisions ของการวิเคราะห์ AS ด้วยวิธี ELISA	24
6. Recovery ของการวิเคราะห์ AS ด้วยวิธี ELISA	24
7. ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างบวบกและแวนแก้วด้วยวิธี ELISA เปรียบเทียบกับ HPLC	25
8. ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างเภสัชภัณฑ์ที่มีบวบกเป็นส่วนประกอบด้วยวิธี ELISA	26
9. Intra- และ Inter-assay precisions ของการวิเคราะห์ AS ด้วยวิธี Eastern blotting	28
10.Recovery ของการวิเคราะห์ AS ด้วยวิธี Eastern blotting	29
11.ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างบวบกด้วยวิธี Eastern blotting เปรียบเทียบกับ HPLC	29
12.ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างเภสัชภัณฑ์ที่มีบวบกเป็นส่วนประกอบด้วยวิธี Eastern blotting	30
13.เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณ AS ในตัวอย่างบวบกด้วยวิธี ELISA, Eastern Blotting และ HPLC	31
14.ผลการวิเคราะห์สาร AS ในตัวอย่างบวบกและแวนแก้วด้วยชุดทดสอบ immunochromatographic strip และ ELISA	34

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

%	percentage
°C	degree Celsius
μg	microgram
μg/ml	microgram per milliliter
μl	microliter
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
AS	asiaticoside
AS-BSA	asiaticoside-bovine serum albumin
AS-OVA	asiaticoside-ovalbumin
AS-HSA	asiaticoside-human serum albumin
AS-MAb	monoclonal antibody against asiaticoside
BSA	bovine serum albumin
DMSO	dimethyl sulfoxide
dry wt	dry weight
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
HPLC	High performance liquid chromatography
HSA	Human serum albumin
IgG	immunoglobulin G
Kg	kilogram
M	molar
MA	madecassoside
MAb	monoclonal antibody
MALDI-TOF	matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight
ml	milliliter
mg	milligram
mg/g	milligram per gram
mg/ml	milligram per milliliter
mg/l	milligram per liter
ml/min	milliliter per minute
mM	millimolar
ng	nanogram
OVA	ovalbumin
PBS	phosphate-buffered saline
PES	polyethersulfone

PVDF	polyvinylidene difluoride
rpm	revolutions per minute
RSD	relative standard deviation
SD	standard deviation
TLC	thin layer chromatography
TPBS	0.05% tween 20 in phosphate-buffered saline
v/v	volume by volume
w/v	weight by volume

บทที่ 1 บทนำ (Introduction)

1. ความสำคัญ และที่มาของการทำการวิจัย

เอเชียติโคไซด์ (asiaticoside) เป็นสารประกอบกลุ่ม ไตรเทอร์พีนอยด์ซาโปนิน (triterpenoid saponins) พบเป็นองค์ประกอบหลักในบัวบก (*Centella asiatica* (L.) Urban) ซึ่งเป็นพืชพื้นบ้านของไทยและของประเทศในเขตร้อนถึงเขตอบอุ่น สรรพคุณตามตำราการแพทย์แผนไทย ใช้บัวบกรักษาอาการไข้ใน บำรุงหัวใจ บำรุงกำลัง รักษาอาการอ่อนเพลีย เมื่อยล้า ขับปัสสาวะ รักษาโรคผิวหนัง รักษาบาดแผล รักษาผดผื่น ระบายท้อง รักษาพิษเนื่องจากถูกงูกัด รักษาอาการเริ่มเป็นบิด รักษาอาการท้องร่วง ใช้ร่วมกับสมุนไพรอื่นๆ เป็นยารักษาอาการร้อนใน กระหายน้ำ รักษาเด็กที่เป็นซาง ตัวร้อนและผอมแห้ง รักษาโรคปากเปื่อย ปากเหม็น เจ็บคอ น้ำลายไหล (สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2550) ในตำรายาอายุรเวทใช้บัวบกเพื่อช่วยเพิ่มความจำ

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ asiaticoside ได้แก่ ช่วยเพิ่มความจำและป้องกันการเกิดอัลไซเมอร์ (Kuppurajan, 1978: Lee, 2000: Veerendra, 2002 and 2003: Gupta, 2003: Doknark, 2003: Salout, 2003: Soumyanath, 2005 and 2012: Dhanasekaran, 2009: Xu, 2008: Xu, 2012) สมานแผลและรักษาแผลเปื่อย (Suguna, 1996: Sunilkumar and Shivakumar, 1998: Shukla, 1999: Nganlasom, 2008) ด้านการซึมเศร้า (Chen, 2006: Wijeweera, 2006: Liang, 2008) ด้านอนุมูลอิสระ (Shukla, 1999: Jayashree, 2003: Subathra, 2005) กระตุ้นกระบวนการสร้างคอลลาเจน (Lu, 2004: Cheng, 2004: Lee, 2006: Ermertcan, 2008: Tang, 2011: Paolino, 2012: Nowwarote, 2012) กระตุ้นหรือเสริมภูมิคุ้มกัน (Plohmann, 1994: Jayathirtha, 2004: Punturee, 2005) ป้องกันการเกิดมะเร็ง (Bunpo, 2004: Huang, 2004: Yoshida, 2005: Park, 2005 and 2007: Babykutty, 2009) ปกป้องเซลล์ประสาท (Supawantanakul, 2005: Rao, 2005: Wattanathorn, 2008)

จากรายงานฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่น่าสนใจของสารเอเชียติโคไซด์ ทำให้มีการใช้บัวบกเป็นส่วนประกอบในเภสัชภัณฑ์ ผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพ และเครื่องสำอางหลายประเภทในปัจจุบัน ทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ แต่เนื่องจากปริมาณสารเอเชียติโคไซด์ที่พบขึ้นกับแหล่งของวัตถุดิบ ซึ่งจะพบสาร asiaticoside อยู่ระหว่าง 1-8% โดยจะพบในปริมาณสูงสุดในเดือนพฤษภาคมถึงเดือนมิถุนายน และมีปริมาณต่ำสุดในเดือนกุมภาพันธ์ อีกทั้งยังพบว่าปริมาณสารจะพบในส่วนใบมากกว่าลำต้น (สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2550) เนื่องจากบัวบกเป็นสมุนไพรที่มีแนวโน้มและศักยภาพสูงในปัจจุบันสำหรับตลาดผู้บริโภคต่างประเทศ (กรมเศรษฐกิจการพาณิชย์, 2532) จึงจำเป็นต้องมีการควบคุมคุณภาพของปริมาณสารที่ออกฤทธิ์ในวัตถุดิบบัวบก เพื่อป้องกันคุณภาพ ความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์และเพื่อประสิทธิภาพในการใช้

การควบคุมคุณภาพวัตถุดิบสมุนไพร บ่งถึงคุณภาพวัตถุดิบ และเป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภค ทั้งในด้านความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์และเพื่อประสิทธิภาพในการใช้ ดังนั้นการควบคุมคุณภาพและปริมาณสารที่ออกฤทธิ์ในวัตถุดิบสมุนไพรจึงเป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่ง การควบคุมคุณภาพวัตถุดิบสมุนไพรไทยนั้น ได้มีการวิจัยและพัฒนาภายใต้การสนับสนุนของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข โดยได้กำหนดเป็นมาตรฐานสมุนไพรในเภสัชตำรับสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia) โดยในส่วนของ การตรวจวิเคราะห์สารสำคัญหรือสารบ่งชี้มาตรฐาน (marker) ส่วนใหญ่มักตรวจโดยการตรวจเอกลักษณ์ด้วยวิธีแรงกล

ผิวบาง (thin layer chromatography) หรือตรวจปริมาณสารหรือกลุ่มสารสำคัญในพืชสมุนไพรด้วยวิธีทางเคมีวิเคราะห์ เช่น การเกิดสี การไทเทรตหรือการใช้เครื่องมือทางโครมาโทกราฟี แต่วิธีการเหล่านี้เป็นเพียงการตรวจวิเคราะห์เบื้องต้นที่ไม่สามารถบอกปริมาณของสารสำคัญในพืชสมุนไพรได้อย่างแม่นยำ

บัวบก เป็นสมุนไพรที่บรรจุอยู่ในมาตรฐานสมุนไพรขององค์การอนามัยโลก (WHO Monographs) นอกจากนี้ยังมีมาตรฐานสมุนไพร (Monographs) ของบัวบกอยู่ในเภสัชตำรับของหลายประเทศ เช่น จีน (Chinese Pharmacopoeia), เยอรมัน (HAB1), อังกฤษ (British Herbal Pharmacopoeia, Martindale), อินเดีย (Herba Ind) และไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia) สำหรับมาตรฐานสมุนไพรบัวบกของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้มีการตรวจเอกลักษณ์สารประกอบในสารสกัดบัวบกด้วยวิธีรังสีเลเซอร์ (TLC) โดยใช้สาร asiaticoside และ asiatic acid เป็นสารบ่งชี้มาตรฐาน (markers) ส่วนวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่ม triterpene saponins ที่พบในบัวบกเพื่อใช้เป็นมาตรฐาน นั้น ได้มีรายงานการตรวจสอบสาร asiaticoside และ madecassoside โดยใช้เครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) (Sahu, 1989; Jain, 2007; Prateek, 2008) และ High performance thin layer chromatography (HPTLC) (Singh, 2005)

การวิเคราะห์ปริมาณสารโดย HPLC เป็นวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารที่เป็นที่นิยมและยอมรับในปัจจุบัน เนื่องจากสามารถตรวจวัดสารในปริมาณต่ำ เทียบตรงและแม่นยำ แต่การวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้จำเป็นต้องมีการเตรียมสารสกัดก่อนการทดลองเนื่องจากข้อจำกัดในเรื่องอุปกรณ์แยกสาร จึงทำให้การวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้จึงจำเป็นต้องใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์นาน รวมถึงอุปกรณ์และเครื่องมือที่มีราคาแพง และต้องมีการดูแล บำรุงรักษาอยู่เสมอ วิธีนี้จึงเหมาะสำหรับหน่วยงานที่มีงบประมาณเพียงพอเท่านั้น อีกทั้งยังไม่สามารถนำเครื่องมือเหล่านี้ออกไปวิเคราะห์ในภาคสนามได้

ปัจจุบันวิธีการวิเคราะห์ทางด้านอิมมูโนโลยี โดยใช้แอนติบอดีเพื่อใช้ตรวจสอบสารสำคัญในสมุนไพรเป็นวิธีการที่มีความแม่นยำสูง เนื่องจากความสามารถในการจับกับสารได้อย่างจำเพาะเจาะจง และสามารถทำการวิเคราะห์ได้จำนวนมากเนื่องจากมีความสะดวกและรวดเร็วและสามารถวิเคราะห์ได้โดยไม่ต้องเตรียมตัวอย่างก่อน (Geoffrey, 2007; Phrompittayarat, 2007) จึงเป็นที่น่าสนใจในการประยุกต์ใช้แอนติบอดีต่อสารสำคัญในพืชสมุนไพรมาทำการพัฒนานิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA เพื่อใช้ในการหาปริมาณสารสำคัญในพืชสมุนไพร เนื่องจากสามารถหาปริมาณได้ในระยะเวลาอันสั้นและมีประสิทธิภาพสูง รวมทั้งการประยุกต์ใช้ชุดตรวจสอบสารสำคัญด้วยวิธี immunochromatographic strip เพื่อหามาตรฐานและคัดเลือกพืชสมุนไพร ซึ่งจะช่วยลดทั้งเวลาและค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ ซึ่งเหมาะสำหรับผู้ผลิตหรือหน่วยงานที่มีงบประมาณน้อย นอกจากนี้ยังสามารถพัฒนาการตรวจสอบโดยใช้เมมเบรน ด้วยวิธี Eastern blotting เพื่อช่วยในการวิเคราะห์หาปริมาณสารแต่ละชนิดได้ด้วย โดยวิธีนี้มีข้อดีเหนือกว่าวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ที่วิเคราะห์ปริมาณของสารประกอบในพืชที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันแบบโดยรวม (total content) นอกจากนี้ยังสามารถนำแอนติบอดีมาประยุกต์ใช้ในการทำการแยกสารสำคัญในพืชออกจากสารสกัดของพืชในขั้นตอนเดียวด้วยวิธี immunoaffinity column (ทวีศักดิ์, 2554)

ดังนั้นในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ จึงมุ่งเน้นการผลิตแอนติบอดีในรูปแบบโมโนโคลนอลที่จำเพาะต่อสาร asiaticoside เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการวิเคราะห์สาร asiaticoside รวมทั้งพัฒนานิเคราะห์ตรวจสอบหาปริมาณสารดังกล่าวเพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพสมุนไพรบัวบก ในโครงการนี้จะทำการพัฒนานิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA, Eastern blotting และชุดทดสอบด้วยวิธีการทางอิมมูโนโลยี เพื่อใช้เป็นมาตรฐานในการตรวจเอกลักษณ์ของสาร asiaticoside ซึ่งเป็นสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางยาของบัวบก

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 2.1 เพื่อผลิตสารภูมิต้านทานแบบโมโนโคลนอลต่อเอเชียติโคไซด์
- 2.2 พัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณและตรวจสอบคุณภาพสารเอเชียติโคไซด์ โดยใช้สารภูมิต้านทานแบบโมโนโคลนอล ที่ผลิตได้

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 3.1 ได้สารภูมิต้านทานแบบโมโนโคลนอลต่อเอเชียติโคไซด์ เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ
- 3.2 ได้วิธีวิเคราะห์ปริมาณและตรวจสอบคุณภาพสารเอเชียติโคไซด์ที่มีคุณภาพ สะดวก รวดเร็ว โดยใช้สารภูมิต้านทานแบบโมโนโคลนอลที่ผลิตได้
- 3.3 เกษตรกร ผู้ส่งออก หรือผู้ผลิตเภสัชภัณฑ์ สามารถใช้วิธีวิเคราะห์ที่คณะผู้วิจัยพัฒนาขึ้นมาเพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพวัตถุดิบได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งส่งผลต่อการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับผลผลิตของเกษตรกร

4. หน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

คณะเภสัชศาสตร์ หน่วยงานภาครัฐและเอกชนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เกษตรกร ผู้ผลิต ส่งออก ตลอดจนประชาชนทั่วไป

5. แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมายเมื่อสิ้นสุดการวิจัย

- 5.1 การเผยแพร่ผลงานวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย โดยการจัดทำรายงานการวิจัย การนำเสนอผลงานวิชาการผลการวิจัย เพื่อเผยแพร่ให้แก่ คณะเภสัชศาสตร์ หน่วยงานภาครัฐและเอกชนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพร ผู้ผลิต ส่งออกและประชาชนทั่วไป
- 5.2 การสร้างนักวิจัยรุ่นใหม่ โดยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาวิชาสารนิพนธ์สำหรับนักศึกษา ระดับปริญญาตรี และการทำวิทยานิพนธ์สำหรับนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา

6. ขอบเขตของโครงการวิจัย

ทำการผลิตสารภูมิต้านทานแบบโมโนโคลนอลต่อ asiaticoside โดยการเตรียมสารก่อภูมิต้านทาน asiaticoside ให้เชื่อมต่อกับโปรตีนที่มีโมเลกุลใหญ่เพื่อสร้างแฮปแทน (hapten) นำสารที่ได้มากระตุ้นหนูเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ทำการตรวจสอบคุณสมบัติของแอนติบอดีที่ผลิตได้โดยนำไปตรวจสอบคุณสมบัติในการจับกับสาร asiaticoside และสารอื่นที่มีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงกันโดยวิธี competitive ELISA พัฒนาวิธีวิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA ทำการหาความถูกต้อง ความไว และความแม่นยำในการวิเคราะห์ จากนั้นนำมาทำการตรวจสอบหาปริมาณสาร asiaticoside ที่พบในบัวบกและเภสัชภัณฑ์ที่มีบัวบกเป็นส่วนประกอบเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน พัฒนาวิธีวิเคราะห์ asiaticoside บนเมมเบรนด้วยวิธี Eastern blotting รวมถึงการพัฒนาชุดตรวจสอบสาร asiaticoside ด้วยวิธี immunochromatographic strip เพื่อใช้เป็นมาตรฐานในการตรวจเอกลักษณ์และปริมาณของสารชนิดนี้

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (Literature Review)

1. ข้อมูลทั่วไปของต้นบัวบก

ชื่อวิทยาศาสตร์ :	<i>Centella asiatica</i> (L.) Urban
วงศ์ :	Umbelliferae (Apiaceae)
ชื่อพ้อง :	<i>Hydrocotyle asiatica</i> L.
ชื่อสามัญ :	Asian Pennywort, Indian Pennywort
ชื่ออื่น :	ผักแว่น (ภาคใต้), ผักหนอก (ภาคเหนือ), จำปาเครือ, กะบังนอก (ลำปาง)

2. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

บัวบกเป็นพรรณไม้ล้มลุกเกาะ เลื้อยไปตามพื้นดินที่ชื้นแฉะ มีรากออกที่ข้อ เมื่ออ่อนมีขนประปราย ใบเดี่ยว มีลักษณะคล้ายรูปไต ใบกลม ขนาดกว้าง 0.8-5.5 เซนติเมตร ยาว 0.5-4.5 เซนติเมตร ขอบใบแบบจักซี่ฟันหรือหยักมนสม่ำเสมอ โคนใบเว้าลึก เส้นใบแตกแบบนิ้วมือ (รูปที่ 1) เรียงแบบกระจุกซ้อน มี 1-4 ใบ และอาจมีมากถึง 16 ใบ แต่ละกระจุกค่อนข้างห่างกัน ก้านใบยาว 0.5-40 เซนติเมตร มีปีกเล็กๆ ที่โคนก้าน ช่อดอกออกที่ซอกใบ แบบซี่ร่มเดี่ยว มี 3 ดอก ดอกกลางไม่มีก้านดอก ใบประดับมี 2 ใบ รูปไข่ ก้านช่อดอกยาว 0.5-5 เซนติเมตร ดอกอยู่รวมกัน 1-5 ดอก ดอกสมบูรณ์เพศ มี 5 กลีบ กลีบเลี้ยงฝ่อ กลีบดอก รูปเกือบกลมหรือไข่กว้าง ยาว 1-1.5 มิลลิเมตร สีขาว เขียว แดงเรื่อ หรือแกมชมพู เกสรเพศผู้ เรียงสลับกับกลีบดอก จานรองดอกมี 2 หยัก ลาดเอียงไปที่ยอด เกสรเพศเมีย ก้านเกสรมี 2 อัน รังไข่อยู่ใต้วงกลีบ มี 2 เซลล์ ผล มี 2 ผล (1 เมล็ดต่อผล) ติดกัน บางส่วนแยกจากกันเมื่อแก่ รูปกลม แป้นแกมกลม ขนาดกว้าง 0.3 เซนติเมตร ยาว 0.3-0.4 เซนติเมตร มีสัน 7-9 กลีบ แต่ละสันเชื่อมถึงกันด้วยเส้น คล้ายเส้นใบ มีขนตอนอ่อน แก่จะเกลี้ยง บัวบกมีเขตการกระจายพันธุ์ทั่วไปในเขตร้อนและกึ่งเขตร้อน ขึ้นเป็นวัชพืช จนถึงระดับความสูงกว่า 1500 เมตร (Hargono, 1999; Thai Herbal Pharmacopoeia Supplement, 2004)



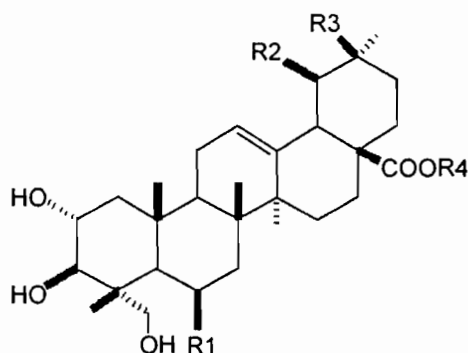
รูปที่ 1 บัวบก (*Centella asiatica* (L.) Urban)

3. สรรพคุณทางยาในตำรับยา

ในตำราอายุรเวทใช้บัวบกเพื่อช่วยเพิ่มความจำ ประเทศไทยมีการใช้ประโยชน์บัวบกในยาแผนโบราณ และยาพื้นบ้านมานานแล้ว เช่น ในตำรายาศิลาจารึกในวัดพระเชตุพนวิมลมังคลาราม ได้แก่ ตำรับยาสุ่ม ตำรับยาพอก ตำรับยาแก้ลมจุลเสียด ตำรับสมมิตรสวาทะ สรรพคุณตามตำราการแพทย์แผนไทย ใช้บัวบกทั้งต้น รักษาอาการไข้ใน เป็นยาบำรุง หัวใจและบำรุงกำลัง รักษาอาการอ่อนเพลีย เมื่อยล้า ขับปัสสาวะ เป็นยาขับโลหิตเสีย รักษาโรคผิวหนัง ใช้รักษาบาดแผล รักษาอุบัติเหตุ ระวังรักษา รักษาพิษเนื่องจากถูกงูกัด และรักษา อาการเริ่มเป็นบิด ทำให้โลหิตแผ่ผ่านรักษา อาการท้องร่วง นอกจากนี้ยังใช้ผสมในตำรับยาร่วมกับสมุนไพรอื่นๆ เป็นยารักษาอาการร้อนในกระหายน้ำ รักษาเด็กที่เป็นซาง ตัวร้อนและผอมแห้ง รักษาโรคปากเปื่อย ปากเหม็น เจ็บคอ น้ำลายไหล (สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2550) นอกจากนี้ยังมีการใช้บัวบกอยู่ในตำรายาหรือเภสัชตำรับในหลายประเทศ เช่น ในเอเชียใต้แก่ จีน อินเดีย เกาหลี กัมพูชา ลาว เวียดนาม ฟิลิปปินส์ ศรีลังกา อินโดนีเซีย ในแอฟริกาใต้แก่ แอฟริกา คาเมอรูน เคนยา ซาโมัว ตองก้า ฟิจิ มาดากัสกา ในยุโรปใต้แก่ อังกฤษ

4. องค์ประกอบทางเคมี

องค์ประกอบทางเคมีของบัวบก พบสารที่เป็นองค์ประกอบหลักกลุ่มไตรเทอร์พีนอยด์ซาโปนิน (triterpenoid saponin) ที่สำคัญได้แก่ asiaticoside, madecassoside และอะกลัยโคน (aglycone) (รูปที่ 2) โดยจะพบ asiaticoside ในปริมาณที่มากกว่าสารชนิดอื่น นอกจากนี้บัวบกยังประกอบด้วยกรดอะมิโน (amino acid) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) อัลคาลอยด์ (alkaloids) น้ำมันหอมระเหยและสารประกอบอื่นๆ (Leung & Foster, 1998: สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2550)



Compound	R1	R2	R3	R4
madecassoside	OH	CH ₃	H	Glc-Glc-Rha
asiaticoside-B	OH	H	CH ₃	Glc-Glc-Rha
asiaticoside	H	CH ₃	H	Glc-Glc-Rha
madecassic acid	OH	CH ₃	H	H
terminolic acid	OH	H	CH ₃	H
asiatic acid	H	CH ₃	H	H

รูปที่ 2 สารกลุ่ม triterpenoid saponin ที่พบในบัวบก

5. ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

สารในกลุ่ม triterpenoid saponins ที่มีการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยากันมากคือ asiaticoside และ madecassoside ซึ่งมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่สำคัญได้แก่ ช่วยเพิ่มความจำและป้องกันการเกิดอัลไซเมอร์ (Kuppurajan, 1978: Lee, 2000: Veerendra, 2002 and 2003: Gupta, 2003: Doknark, 2003: Salout, 2003: Soumyanath, 2005 and 2012: Dhanasekaran, 2009: Xu, 2008: Xu, 2012) สมานแผลและรักษาแผลเปื่อย (Suguna, 1996: Sunilkumar and Shivakumar, 1998: Shukla, 1999: Ngranlasom, 2008) ด้านการซึมเศร้า (Chen, 2006: Wijeweera, 2006: Liang, 2008) ด้านอนุมูลอิสระ (Shukla, 1999: Jayashree, 2003: Subathra, 2005) กระตุ้นกระบวนการสร้างคอลลาเจน (Lu, 2004: Cheng, 2004: Lee, 2006: Ermertcan, 2008: Tang, 2011: Paolino, 2012: Nowwarote, 2012) กระตุ้นหรือเสริมภูมิคุ้มกัน (Plohmann, 1994: Jayathirtha, 2004: Punturee, 2005) ป้องกันการเกิดมะเร็ง (Bunpo, 2004: Huang, 2004: Yoshida, 2005: Park, 2005 and 2007: Babykutty, 2009) ปกป้องเซลล์ประสาท (Supawantanakul, 2005: Rao, 2005: Wattanathorn, 2008)

6. การศึกษาที่เกี่ยวข้อง

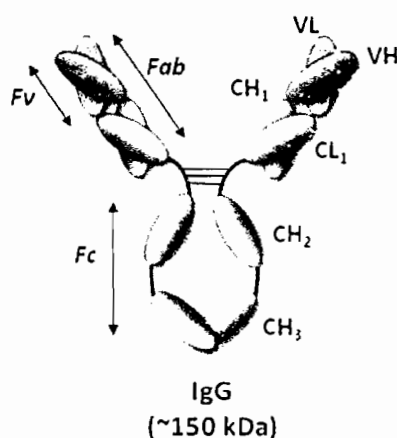
การควบคุมคุณภาพบัวบก ได้ถูกรายงานอยู่ในมาตรฐานสมุนไพรขององค์การอนามัยโลก (WHO Monographs) นอกจากนี้ยังมีมาตรฐานสมุนไพร (Monographs) ของบัวบกอยู่ในเภสัชตำรับของหลายประเทศ เช่น จีน (Chinese Pharmacopoeia), เยอรมัน (HAB1), อังกฤษ (British Herbal Pharmacopoeia, Martindale), อินเดีย (Herba Ind) และไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia) (สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2550)

มาตรฐานสมุนไพรบัวบกของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ได้รายงานอยู่ใน Thai Herbal Pharmacopoeia; supplement (2004) มีการตรวจเอกลักษณ์สารประกอบในสารสกัดบัวบกด้วยวิธีรังเคลซ ผิวนาง (thin layer chromatography, TLC) โดยใช้สาร asiaticoside และ asiatic acid เป็นสารบ่งชี้มาตรฐาน (markers) ส่วนวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่ม triterpene saponins ที่พบในบัวบกเพื่อใช้เป็นมาตรฐานนั้นยังไม่ได้ถูกระบุอยู่ใน Thai Herbal Pharmacopoeia มีเพียงรายงานการตรวจสอบสาร asiaticoside และ madecassoside โดยใช้เครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) (Sahu, 1989: Jain, 2007: Prateek, 2008) และ High performance thin layer chromatography (HPTLC) (Singh, 2005)

วิธีการวิเคราะห์ทางด้านอิมมูโนโลยี โดยใช้แอนติบอดีเพื่อใช้ตรวจสอบสารสำคัญในสมุนไพร เป็นวิธีการที่มีความแม่นยำสูง เนื่องจากความสามารถในการจับกับสารได้อย่างจำเพาะเจาะจง และสามารถทำการวิเคราะห์ได้จำนวนมากเนื่องจากมีความสะดวกและรวดเร็วและสามารถวิเคราะห์ได้โดยไม่ต้องเตรียมตัวอย่างก่อน (Geoffrey, 2007: Phrompittayarat, 2007) จึงเป็นที่น่าสนใจในการประยุกต์ใช้แอนติบอดีต่อสารสำคัญในพืชสมุนไพรมาทำการพัฒนาวิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA เพื่อใช้ในการหาปริมาณสารสำคัญในพืชสมุนไพร เนื่องจากสามารถหาปริมาณได้ในระยะเวลาอันสั้นและมีประสิทธิภาพสูง รวมทั้งการประยุกต์ใช้ชุดตรวจสอบสารสำคัญด้วยวิธี immunochromatographic strip เพื่อหามาตรฐานและคัดเลือกพืชสมุนไพร ซึ่งจะช่วยลดทั้งเวลาและค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ ซึ่งเหมาะสำหรับผู้ผลิตหรือหน่วยงานที่มีงบประมาณน้อย นอกจากนี้ยังสามารถพัฒนาการตรวจสอบโดยใช้เมมเบรน ด้วยวิธี Eastern blotting เพื่อช่วยในการวิเคราะห์หาปริมาณสารแต่ละชนิดได้ด้วย โดยวิธีนี้มีข้อดีเหนือกว่าวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ที่วิเคราะห์ปริมาณของสารประกอบในพืชที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันแบบโดยรวม (total content)

นอกจากนี้ยังสามารถนำแอนติบอดีมาประยุกต์ใช้ในการทำการแยกสารสำคัญในพืช ออกจากสารสกัดของพืชในขั้นตอนเดียวด้วยวิธี immunoaffinity column (ทวีศักดิ์, 2554)

โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibodies; MAbs) เป็นอิมมูโนโกลบูลินชนิด IgG ที่เหมือนกัน (homogeneous immunoglobulin) เนื่องจากถูกสร้างมาจากเซลล์หรือ clone ชนิดเดียวกัน (รูปที่ 3) คุณสมบัติที่ดีของ MAbs คือมีความจำเพาะสูง (high specificity) โดยจะเข้าทำปฏิกิริยากับ antigenic determinant เพียงตำแหน่งเดียวบนโมเลกุลของแอนติเจน (antigen; Ag) และมีความชอบจับสูง (high affinity) เนื่องจากในกระบวนการผลิต MAbs นั้นสามารถทำการคัดเลือก MAbs ที่มี affinity สูงต่อ Ag ได้ และ MAbs ที่มี affinity สูงนี้สามารถนำไปใช้ได้ในความเข้มข้นต่ำ (ไมโครกรัมถึงพิโคกรัม) ทำให้ลดปฏิกิริยารบกวน (background) ในการทดลองลงได้



รูปที่ 3 โครงสร้าง Immunoglobulin G (IgG)

มีรายงานการผลิตและประยุกต์ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณของสารธรรมชาติอยู่หลายชนิด ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณนั้น เทคนิคที่นำมาใช้ได้แก่ ELISA และ Eastern blotting ส่วนการวิเคราะห์เชิงคุณภาพนั้นจะใช้เทคนิค Eastern blotting และ immunochromatographic strip สารธรรมชาติที่มีรายงานการวิเคราะห์โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีแสดงในตารางที่ 1

สำหรับการผลิตแอนติบอดีแบบโมโนโคลนอลต่อสาร asiaticoside ซึ่งเป็นสารกลุ่มหลักที่พบในบัวบกนั้นในขณะนี้ยังไม่มีผู้ทำการศึกษา จึงเป็นที่น่าสนใจในการประยุกต์ใช้แอนติบอดีต่อสารดังกล่าวมาทำการพัฒนาวิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA เพื่อใช้ในการหาปริมาณสาร asiaticoside เนื่องจากสามารถหาปริมาณได้ในระยะเวลาอันสั้นและมีประสิทธิภาพสูง รวมทั้งการประยุกต์ใช้ชุดตรวจสอบสารกลุ่มนี้เพื่อหามาตรฐานและคัดเลือกพืชสมุนไพร

ตารางที่ 1 สารสำคัญจากพืชสมุนไพรที่มีการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีโนวิเคราะห์ (พัตกิต, 2554)

สารสำคัญ	ELISA		Eastern Blotting		Immunochromatographic strip	
	ปริมาณที่วิเคราะห์ได้	แหล่งอ้างอิง	ปริมาณที่วิเคราะห์ได้	แหล่งอ้างอิง	Detection limit	แหล่งอ้างอิง
Aconitine	0.1-1.5 µg/mL	Kido et al., 2008a				
Aristolochic acid-II	0.19-13 µg/mL	Tian et al., 2008				
Artemisinin	2-20 µg/mL	Tanaka et al., 2007				
Bacopaside I	1.95-62.5 ng/mL	Phrompittayarat et al., 2007				
Bacoside A(3)	3.05-97.7 ng/mL	Tothiam et al., 2011				
Baicalin	0.2-2 µg/mL	Kido et al., 2008b				
Berberine	1.56-50 µg/mL	Kim et al., 2004a				
Codeine	1-100 ng/mL	Shoyama et al., 1996				
Coptisine	1.56-25 µg/mL	Kim et al., 2004b				
Crocin	0.01-0.2 µg/mL	Xuan et al., 1999				
Forskolin	5 ng/mL - 5 µg/mL	Yanagihara et al., 1996				
Ginkgolic acid	10-40 µg/mL	Loungtatana et al., 2004				
Ginsenoside Rb1	3-8 µg/mL	Sritularak et al., 2009			125 ng/mL	Putalun et al., 2004a
Ginsenoside Re	0.08-0.7 µg/mL	Sritularak et al., 2009	0.25 - 4.0 µg	Morinaga et al., 2010		
Ginsenoside Rf	0.01-10 ng/mL	Nah et al., 2000			125 ng/mL	Putalun et al., 2004a
Ginsenoside Rg1	5-15 µg/mL	Fukuda et al., 2000			250 ng/mL	Putalun et al., 2005
Glycyrrhizin	20-200 µg/mL	Shan et al., 2001	1.0 - 8.0 µg	Morinaga et al., 2005		
Paeoniflorin	0.02-0.6 µg/mL	Lu et al., 2003				
Plumbagin	0.2-25 µg/mL	Sakamoto et al., 2008				
Saikosaponin A	0.02-0.2 µg/mL	Zhu et al., 2004	62.5 ng - 1.0 µg	Morinaga et al., 2006b		
Sennoside A	1.56-12.5 µg/mL	Morinaga et al., 2000, 2009b	> 62.5 ng	Morinaga et al., 2009a		
Sennoside B	0.5-15 ng/mL	Morinaga et al., 2001, 2009b	> 62.5 ng	Morinaga et al., 2009a	2 µg/mL	Putalun et al., 2004b
Solasodine glycosides	0.078-2.5 µg/mL	Putalun et al., 2000	> 1.6 ng	Tanaka et al., 1997	2 µg/mL	Putalun et al., 2004b
Tetrahydrocannabinolic acid	10-200 µg/mL	Tanaka and Shoyama, 1999				
Thebaine	0.06 - 1 ng/mL	Shoyama et al., 1996				

บทที่ 3

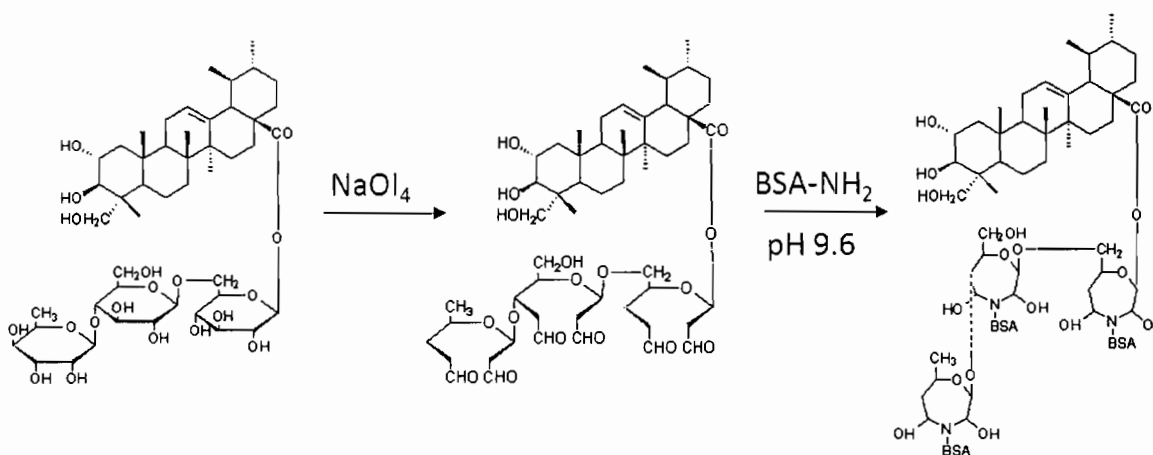
ระเบียบวิธีวิจัย

(Methodology)

1. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ asiaticoside

1.1 การเตรียมแอนติเจน (antigen)

นำสาร asiaticoside (AS) ซึ่งใช้เป็นแอนติเจนมาทำการเชื่อมต่อกับโปรตีนที่มีโมเลกุลใหญ่เพื่อสร้างแฮปเทน (hapten) โดยทำการเชื่อมต่อกับโปรตีน bovine serum albumin (BSA), human serum albumin (HSA) และ ovalbumin (OVA) ด้วยปฏิกิริยา periodate oxidation (Ishiyama, 1996) โดยนำ AS ละลายใน dimethyl sulfoxide (DMSO) และค่อยๆ หยดลงในสารละลาย sodium periodate (NaIO_4) ทำการกวนสารละลายผสมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย BSA ที่ละลายใน carbonate buffer (50 mM, pH 9.6) และกวนต่อเป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นนำมา dialysis ในน้ำ 5 ครั้งและนำไปทำให้แห้งด้วย lyophilizer สำหรับ AS-OVA และ AS-HSA ใช้กระบวนการเดียวกัน



รูปที่ 4 ปฏิกิริยาการเกิด AS-BSA

1.2 การหา hapten number ของ AS-BSA

ทำการตรวจสอบเพื่อยืนยันการเชื่อมต่อกับโปรตีนโดยใช้เครื่อง MALDI-TOF mass spectroscopy (Voyager-DE STR, Applied Biosystems, USA) และคำนวณจำนวน AS บน AS-BSA โดยการหักลบออกจากค่าที่วัดได้จาก BSA

1.3 การกระตุ้นหนูให้สร้างแอนติบอดี (immunization)

การทดลองนี้ได้รับการพิจารณาจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยง และใช้สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี และได้รับใบรับรองการอนุมัติให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์หมายเลข 9/2553/ Research

ทำการฉีดสารกระตุ้น AS-BSA เข้าที่บริเวณช่องท้อง (intraperitoneal) ของหนูเพศผู้ (mouse, BALB/c strain) ที่มีอายุ 5 สัปดาห์ โดยทำการฉีดกระตุ้นครั้งแรกด้วย AS-BSA (100

µg/ml) ร่วมกับ Freund's complete adjuvant หลังจากการกระตุ้นครั้งแรก 2 สัปดาห์ ทำการฉีดสารกระตุ้นครั้งที่ 2 โดยทำการฉีด AS-BSA (50 µg/ml) ร่วมกับ Freund's incomplete adjuvant จากนั้นอีก 2 สัปดาห์ทำการฉีดสารกระตุ้นครั้งที่ 3 โดยทำการฉีด AS-BSA (100 µg) เพียงอย่างเดียว ทำการตรวจสอบการสร้างสารภูมิต้านทานโดยนำซีรัม (serum) ของหนูหลังจากการกระตุ้นในวันที่ 3 ของแต่ละครั้งมาทำการตรวจสอบโดยวิธี direct ELISA และ competitive ELISA วันที่ 3 หลังกระตุ้นครั้งสุดท้าย ทำการฆ่าหนูและตัดเอาม้ามออกมาเพื่อทำการหลอมรวมเซลล์

1.4 การหลอมรวมเซลล์

นำม้ามของหนูที่สร้าง Ab มาทำการสกัดแยกเอา splenocytes แล้วนำไปหลอมรวมกับเซลล์ไมโอโลมา (HAT-sensitive mouse myeloma cell: SP 2/0 Ag14) ด้วยวิธี polyethylene glycol (PEG) (Galfré, 1981) โดยนำเซลล์ทั้งสองมาผสมกันในอัตราส่วน 5:1 (splenocyte:myeloma cell) และนำไปปั่นเหวี่ยง จากนั้นเติม polyethylene glycol (PEG) ลงไปในเซลล์ผสมเพื่อช่วยในการหลอมรวมกันของเซลล์ และทำการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยง hypoxanthine-aminopterin-thymidine medium (HAT) ที่ 37 °C ใน 5% CO₂ incubator เป็นเวลา 10-14 วัน เซลล์ myelomas ที่ไม่เกิดการหลอมรวมจะตายจากฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะ aminopterin ที่อยู่ใน HAT medium ส่วน splenocytes ที่ไม่เกิดการหลอมรวมจะตายไปเอง เซลล์ที่มีชีวิตอยู่ใน HAT medium จะเป็นเซลล์ที่เกิดจากการหลอมรวมที่เรียกว่า hybridoma cell ซึ่งจะแบ่งตัวเป็น colony มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

1.5 การคัดเลือกเซลล์เชื่อมต่อไฮบริโดมา (hybridoma)

ทำการคัดเลือกกลุ่มเซลล์ไฮบริโดมา (hybridoma) ที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อ asiaticoside โดยนำส่วน supernatant ของอาหารเลี้ยงมาทำการตรวจสอบการผลิตแอนติบอดีโดยวิธี direct ELISA และ competitive ELISA เมื่อได้กลุ่มเซลล์ที่ผลิตแอนติบอดีต่อ asiaticoside แล้วทำการแยกเซลล์ที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อ asiaticoside ได้ให้เป็นเซลล์เดี่ยว ด้วยวิธี limited dilution (Goding, 1980) โดยการเจือจางเซลล์ให้มีความเข้มข้นต่างๆ แล้วเพาะเลี้ยงลงใน tissue culture plate ชนิด 96 หลุม โดยให้ความเข้มข้นของเซลล์แต่ละหลุมมีปริมาณ 50, 20, 10, 5, 2, 1, 0.5 และ 0.25 cell ต่อหลุม ตามลำดับ แล้วเพาะเลี้ยงไว้นานประมาณ 10-15 วัน เลือก colony ที่เกิดขึ้นจากหลุม ในความเข้มข้น 1 cell/well และให้ผลบวกกับ antibody screening test จึงเก็บเอาสายพันธุ์นั้นมาเพาะเลี้ยงและเพิ่มจำนวนต่อไป

1.6 การแยกบริสุทธิ์สารภูมิต้านทานแบบโมโนโคลนอล

นำส่วน supernatant ของอาหารเลี้ยงไฮบริโดมาที่มีศักยภาพสูงในการสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ asiaticoside มาทำการแยกบริสุทธิ์สารภูมิต้านทานแบบโมโนโคลนอลต่อ asiaticoside โดยผ่านอาหารเลี้ยงที่ปรับ pH 7 ลงไปใน Protein A หรือ Protein G column ส่วนย่อย Fc ของ Ab จะจับกับ lectins ที่เคลือบอยู่กับเจลใน column หลังจากล้างด้วย phosphate buffer (pH 7) จะมีเฉพาะ IgG ที่ยังคงค้างอยู่ใน column จากนั้นชะเอา IgG ออกจาก column โดยการล้างด้วยสารละลาย citrate buffer (pH 2.7) ปรับสารละลาย MAb ที่ได้ให้เป็นกลาง และนำมา dialysis ในน้ำ 5 ครั้ง แล้วจึงทำให้แห้งด้วยวิธี lyophilize

2. ตรวจสอบคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอเซียติโคไซด์

2.1 ความสามารถในการเกิดปฏิกิริยากับ Ag (Reactivity)

ตรวจด้วยวิธี indirect ELISA โดยทำการเคลือบผิวของ 96-well immunoplate ด้วย AS-OVA (1 µg/ml) ที่ละลายใน 50mM carbonate buffer (pH 9.6) ทำการอบ plate ที่ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และล้างด้วย 0.05 % (v/v) Tween20 ใน phosphate-buffered saline (TPBS) จากนั้นทำการ block โปรตีนที่เป็น non-specific โดยใช้ 5% (w/v) skim milk ใน PBS ทำการอบ plate ที่ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และล้างด้วย TPBS แล้วทำการเติม anti-AS MAb ที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงไป ทำการอบ plate ที่ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และล้างด้วย TPBS จากนั้นจึงทำการเติม peroxidase-labeled anti-mouse IgG (1:1000 เท่า) ทำการอบ plate ที่ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และล้างด้วย TPBS และในขั้นตอนสุดท้ายทำการเติมสารละลาย substrate (0.1M citrate buffer (pH 4.0) ที่มี 0.003% (v/v) H₂O₂ และ 0.3 mg/ml ABTS) ทำการอบ plate ที่ 37 °C เป็นเวลา 15 นาที และทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 405nm และ 490nm ค่าความเข้มข้นของ MAb ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1 จะถูกนำไปใช้ในการทำ competitive ELISA

2.2 ความจำเพาะในการจับกับแอนติเจนเป้าหมาย (Specific binding activity)

ตรวจด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยทำการเคลือบผิว immunoplate ด้วย AS-OVA (1 µg/ml) ที่ละลายใน 50mM carbonate buffer (pH9.6) ทำการอบ plate ที่ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และล้างด้วย 0.05 % (v/v) Tween20 ใน phosphate-buffered saline (TPBS) จากนั้นทำการ block โปรตีนที่เป็น non-specific โดยใช้ 5% (w/v) skim milk ใน PBS ทำการอบ plate ที่ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และล้างด้วย TPBS แล้วทำการเติม anti-AS MAb ที่ความเข้มข้นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1 จากการทำ indirect ELISA ร่วมกับสารมาตรฐาน AS ที่ความเข้มข้นต่างๆ (200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56 µg/ml, 781.25, 390.63, 195.31, 97.66, 48.83, 24.41, 12.21 ng/ml) ทำการอบ plate ที่ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และล้างด้วย TPBS จากนั้นจึงทำการเติม peroxidase-labeled anti-mouse IgG (1:1000 เท่า) ทำการอบ plate ที่ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และล้างด้วย TPBS และในขั้นตอนสุดท้ายทำการเติมสารละลาย substrate (0.1M citrate buffer (pH4.0) ที่มี 0.003% (v/v) H₂O₂ และ 0.3 mg/ml ABTS) ทำการอบ plate ที่ 37 °C เป็นเวลา 15 นาที และทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 405nm และ 490nm กราฟที่ได้จากวิธีนี้จะใช้เป็นกราฟมาตรฐาน (standard curve) ในการวิเคราะห์หาปริมาณ AS ในตัวอย่าง

2.3 ความสามารถจับกับสารชนิดอื่นๆ (cross-reactivity)

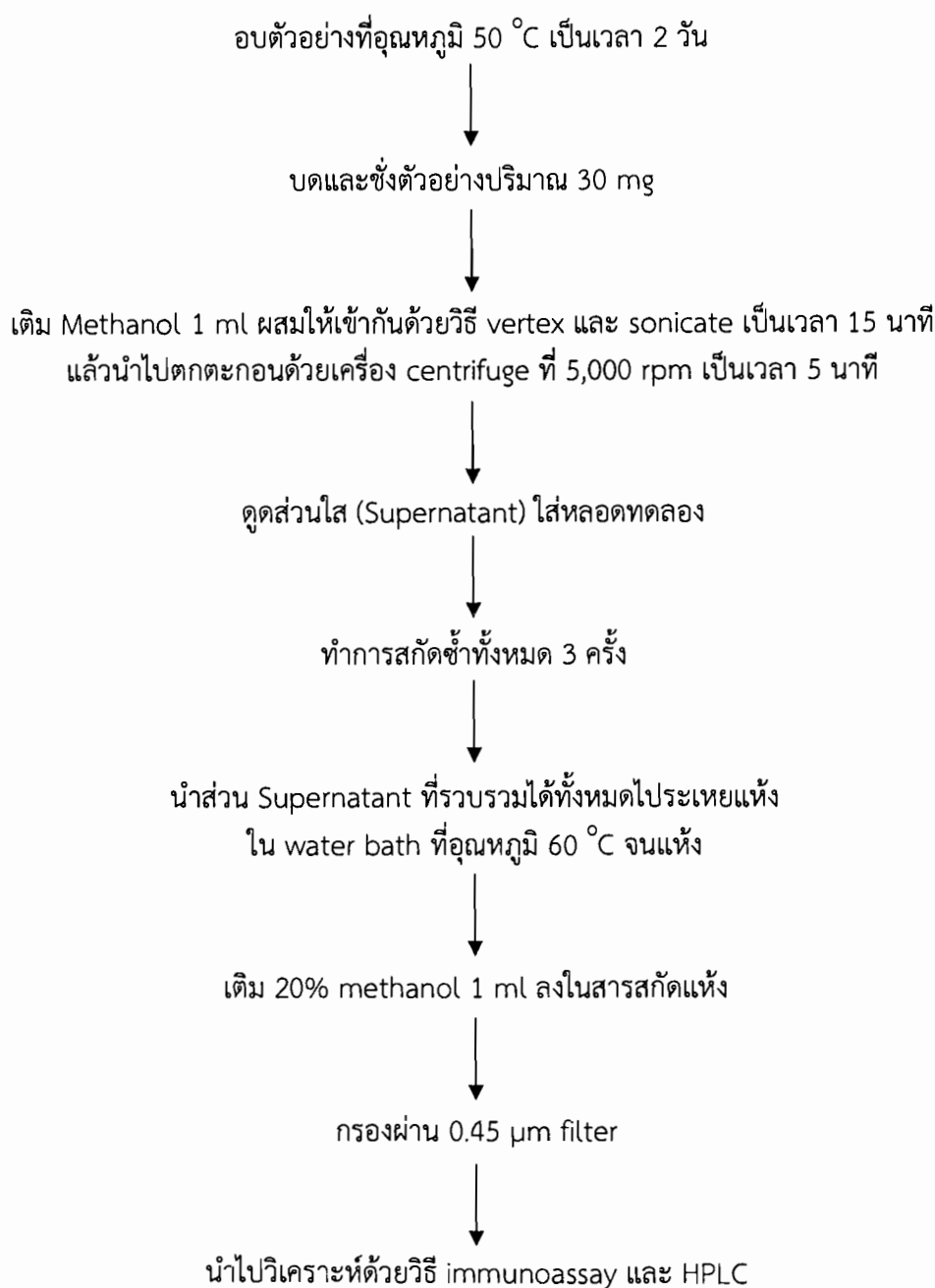
ตรวจด้วยวิธี Indirect competitive ELISA เหมือนการหา specific binding activity โดยในขั้นตอนการเติม MAb ร่วมกับสารที่มีโครงสร้างใกล้เคียงหรือสารชนิดอื่นๆ ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อได้ค่าการดูดกลืนแสงและนำไปสร้างกราฟแล้วจึงนำไปหาค่า % CR ตามสมการของ Weiler และ Zenk (1976) ดังสมการ

$$CR (\%) = \frac{IC_{50} \text{ for target compound}}{IC_{50} \text{ for compound under investigation}} \times 100$$

3. พัฒนาริธีวิเคราะห์หาปริมาณสาร asiaticoside โดยวิธี ELISA

3.1 การเตรียมตัวอย่างเพื่อใช้ในการวิเคราะห์

ตัวอย่างบัวบกถูกเก็บจากจังหวัดอุบลราชธานี ขอนแก่น กรุงเทพมหานคร นครปฐม สมุทรปราการ และภูเก็ต และตัวอย่างแว่นแก้ว (*Hydrocotyle umbellata*) จากจังหวัดอุบลราชธานี สระแก้ว และสุพรรณบุรี และตัวอย่างเภสัชภัณฑ์ที่มีบัวบกเป็นส่วนประกอบ ได้แก่ ชาขง 2 ตัวอย่าง, เจล 4 ตัวอย่าง, ยาแคปซูล 2 ตัวอย่าง, ครีม 1 ตัวอย่างและโทนเนอร์ 1 ตัวอย่างนำมาทำการเตรียมตัวอย่างพืชตามรายละเอียดดังนี้



3.2 การวิเคราะห์ปริมาณสาร AS ด้วยวิธี ELISA

พัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณสาร AS ในตัวอย่างพืชสมุนไพรบัวบกและแว่นแก้วที่สุ่มเก็บจากทั่วประเทศ และในเกสรชัณห์ที่มีบัวบกเป็นส่วนประกอบ ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้ anti-AS MAb ที่ผลิตได้ ตามวิธีในข้อ 2.2 โดยในขั้นตอนการเติม anti-AS MAb นั้นจะเติมร่วมกับสารสกัดตัวอย่างที่จะใช้วิเคราะห์หาปริมาณ ในความเข้มข้นต่างๆ และใช้กราฟมาตรฐานจากผลการวิเคราะห์ข้อ 2.2

3.3 การวิเคราะห์ปริมาณสาร AS ด้วยวิธี HPLC

ทำการวิเคราะห์ปริมาณสาร AS ในตัวอย่างเปรียบเทียบกับวิธีทาง immunoassay โดยมีสถานะในการวิเคราะห์ดังนี้

HPLC : PerkinElmer Series 200 LC pump connected to a PerkinElmer 785A UV/VIS detector (206 nm) and a PE Nelson computer

Column : RP-18 column (LiChroCART[®], 125 mm x 4 mm, 5 μ m particle size, Merck, Germany)

Mobile phase : 25% acetonitrile in H₂O

Flow rate : 1 mL/min

3.4 การตรวจรับรองความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation)

การศึกษานี้ได้ทำการตรวจรับรองความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ในการหาปริมาณสาร AS โดยวัดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้

3.4.1 ความสัมพันธ์เส้นตรง (linearity)

ช่วงความเข้มข้นสาร AS อยู่ในช่วง 0.78 – 50 μ g/mL จะอยู่ในช่วงที่มีความชันของกราฟ logarithm ที่ได้จากวิธี indirect competitive ELISA เป็นเส้นตรง ซึ่งกำหนดโดยสมการ $Y = -1.105\ln(X) + 1.871$ ซึ่งให้ค่า $r^2 = 0.9987$ ($Y = A/A_0 \times 100$; A_0 = absorbance with no AS present and A = absorbance with AS present, X = concentration)

3.4.2 ความแม่นยำ (accuracy)

ตรวจสอบความแม่นยำโดยวิธี Recovery method โดยเติม AS ปริมาณ 12.5, 25 และ 50 μ g ในตัวอย่างบัวบกและสกัดด้วยวิธีเดียวกันกับตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA จากนั้นคำนวณหาค่า % Coefficient of variation (CV) และ % recovery ดังนี้

$$CV (\%) = \frac{S.D.}{\text{mean}} \times 100$$

$$\text{Recovery} (\%) = \frac{\text{Measured amount} - 451.48 \text{ mg}}{\text{Added amount}} \times 100$$

3.4.3 ความเที่ยง (precision)

ตรวจสอบความความเที่ยงโดยทำกราฟมาตรฐาน AS ที่ความเข้มข้น 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25 $\mu\text{g/ml}$ ตัวอย่างละ 3 ครั้ง เปรียบเทียบการวิเคราะห์ภายใน plate เดียวกัน (well to well; intra-assay) และระหว่าง plate (plate to plate; inter-assay) แล้วนำผลวิเคราะห์มาคำนวณหา % CV (coefficient of variation)

4. พัฒนาวิธีวิเคราะห์สาร asiaticoside บนเมมเบรน โดยวิธี Eastern blotting

4.1 การวิเคราะห์สาร AS ด้วยวิธี Eastern blotting

ทำการพัฒนาวิธีตรวจเอกลักษณ์และปริมาณสาร AS บน PES (Polyethersulfone) เมมเบรน ด้วยวิธี Eastern blotting โดยในขั้นตอนแรกจะทำคล้ายกับวิธีทำ TLC คือทำการ spot สารมาตรฐาน AS และสารสกัดตัวอย่างบับกลบน PES membrane แล้วทิ้งให้แห้ง จากนั้นนำแผ่น PES membrane ใส่ลงใน tank ที่บรรจุสารละลาย 25% acetonitrile ซึ่งใช้เป็น mobile phase รอน mobile phase เคลื่อนที่ไปจนถึงส่วนปลาย PES membrane นำแผ่น membrane ออกมา ทำให้แห้งแล้วแช่ในสารละลาย NaIO_4 (10 mg/ml) เขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วย น้ำกลั่น แล้วแช่ใน 0.1% gelatin ใน 50 mM carbonate buffer (pH 9.6) เขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 ชั่วโมง ล้างโดยแช่ใน TPBS 5 นาที 2 รอบ แล้วจึงแช่ในสารละลาย anti-AS MAb เขย่าบน น้ำแข็งเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำการล้างด้วย TPBS 5 นาที 2 รอบ จากนั้นนำไปแช่ในสารละลาย peroxidase-labeled anti-mouse IgG ความเข้มข้น 1:1000 เท่าใน 0.5% gelatin ใน TPBS เขย่าบน น้ำแข็งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากล้างด้วย TPBS 5 นาที 2 รอบจึงนำแผ่น membrane ไปแช่ในสารละลาย 4-chloro-1-naphthol (10 mg/ml) ใน methanol ที่มี 0.01% H_2O_2 เขย่าที่ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นหยุดการเกิดปฏิกิริยาด้วยการนำไปแช่ในน้ำกลั่น ทำแผ่น membrane ให้แห้งและและนำมาตรวจหาปริมาณโดยโปรแกรม imageJ analysis จากนั้น เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์จากวิธี Eastern blotting กับวิธี HPLC

4.2 การตรวจรับรองความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation)

การศึกษานี้ได้ทำการตรวจรับรองความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ในการหาปริมาณสาร AS โดยวัดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้

4.2.1 ความสัมพันธ์เส้นตรง (linearity)

ช่วงความเข้มข้นสาร AS 12.5, 25, 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ ถูกใช้ความเข้มข้นมาตรฐานในการวิเคราะห์หาปริมาณ AS ด้วยวิธี Eastern blotting ซึ่งกำหนดโดยสมการ $Y = 38.86X + 27.8$ ซึ่งให้ค่า $r^2 = 0.997$ ($Y = \text{Area of spot}$, $X = \log \text{concentration}$)



4.2.2 ความแม่นยำ (accuracy)

ตรวจสอบความแม่นยำโดยวิธี Recovery method โดยเติม AS ปริมาณ 25, 50 และ 100 μg ในตัวอย่างบวบกและสกัดด้วยวิธีเดียวกันกับตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Eastern blotting จากนั้นคำนวณหาค่า % CV และ % recovery

4.2.3 ความเที่ยง (precision)

ตรวจสอบความความเที่ยงโดยทำกราฟมาตรฐาน AS ตัวอย่างละ 3 ครั้ง เปรียบเทียบการวิเคราะห์ภายใน membrane เดียวกัน (intra-assay) และระหว่าง membrane (inter-assay) แล้วนำผลวิเคราะห์มาคำนวณหา % CV

5. พัฒนาวิธีวิเคราะห์สาร asiaticoside โดยวิธี Immunochromatographic strip

5.1 การเตรียม detection reagent

ทำการปรับ pH ของสารละลาย Colloidal gold ให้ได้ 9.0 ด้วยสารละลาย 2% K_2CO_3 จากนั้นเติม anti-AS MAb (20 μg) ลงในสารละลาย Colloidal gold (1 ml) กวนที่อุณหภูมิห้อง (25°C) เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม BSA ใน 0.1M Tris-HCL (pH 8.0) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1% BSA ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ตะกอนที่ได้นำไปละลายใน 1% BSA ใน 0.1M Tris-HCL (pH 8.0) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

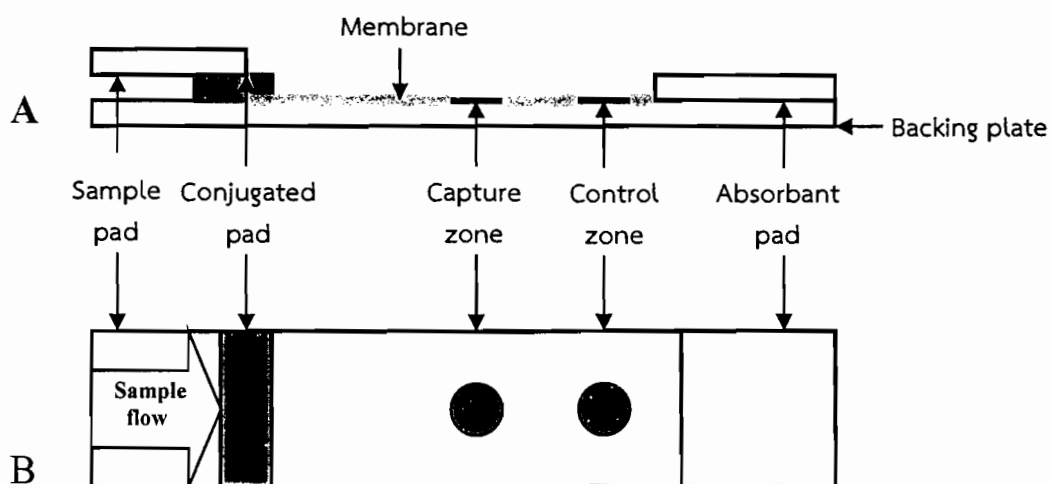
สารใช้ตรวจสอบ (detection reagent) ประกอบด้วย anti-AS MAb-colloidal gold (20 μl), 10% sucrose (15 μl), 1% Tween20 (7 μl) และน้ำ (8 μl) นำ detection reagent 2.5 μl หยดลงบน glass fiber conjugate pad (Millipore Temecula, CA, USA) ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง

5.2 การเตรียม capture reagent

ใช้ AS-HSA เป็น test capture reagent และใช้ anti-mouse IgG เป็น control capture reagent

5.3 การเตรียม chromatographic strip

หยด control (anti-mouse IgG; 1 μg) และ test capture (AS-HSA; 2 μg) ลงบนแผ่น nitrocellulose membrane (Millipore Temecula, CA, USA) ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปแช่ใน 1% BSA ใน PBS เขย่าที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง แล้วจึงล้างด้วย TPBS 10 นาที หลังจากนั้นทิ้งให้แห้งและตัดให้ได้ขนาดที่เหมาะสม ประกอบชุดตรวจดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 ชุดตรวจสอบสาร immunochromatographic strip: A; ด้านข้าง, B; ด้านบน

ในชุดตรวจประกอบด้วยแผ่น nitrocellulose membrane ที่หยด control และ test capture ด้านล่างประกอบเข้าด้วย conjugated pad และปิดทับด้วย sample pad ส่วนด้านบนจะติดด้วย absorbant pad

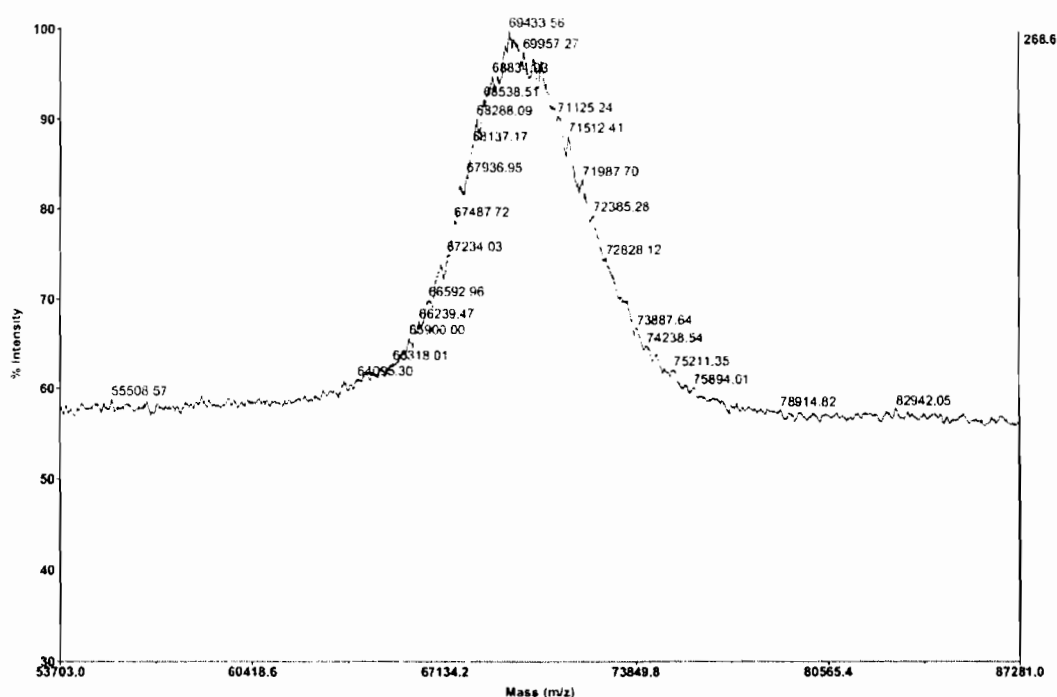
ทำการตรวจสอบสาร AS โดย นำสารสกัดบับกที่สกัดตามข้อ 3.1 มาทำการเจือจางลง 5 เท่า ปริมาณ 400 μl ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นจุ่ม strip ลงในสารสกัดโดยไม่ให้ส่วนของ conjugated pad สัมผัสกับสารสกัด สารสกัดจะเคลื่อนที่ขึ้นไปจนถึง absorbant pad รอตรวจผลเป็นเวลา 10 นาที หากสารสกัดมี AS อยู่จะปรากฏสีเพียงบริเวณ control zone เท่านั้น และหากสารสกัดไม่มี AS อยู่จะปรากฏสีทั้งบริเวณ capture zone และ control zone

การหาขีดจำกัดในการตรวจพบ (limit of detection) ทำโดยใช้ชุดตรวจจุ่มลงในสารละลายมาตรฐาน AS ที่ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นสังเกตผลโดยดูสีของผลที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าในความเข้มข้น AS มาตรฐานที่น้อยที่สุด

บทที่ 4 ผลการวิจัย (Results)

1. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ asiaticoside

Asiaticoside-BSA (AS-BSA), Asiaticoside-HSA (AS-HSA) และ Asiaticoside-OVA (AS-OVA) สามารถเตรียมด้วยการทำปฏิกิริยากับ sodium periodate (NaIO_4) และเกิดการเชื่อมต่อกันบริเวณตำแหน่งของน้ำตาล AS-BSA ที่ได้นำไปตรวจหาค่า hapten number ด้วยเครื่อง MALDI-TOF mass spectroscopy พบกราฟที่มีลักษณะฐานกว้างที่ $m/z = 69,433$ (รูปที่ 6) โดยเมื่อหักลบน้ำหนักโมเลกุลของ BSA (66,433) จะได้มวลที่เหลือเท่ากับ 959 เมื่อเทียบกับน้ำหนักโมเลกุลของ AS แล้วจะได้เท่ากับประมาณ 3 โมเลกุล ฉะนั้นค่า hapten number ของ AS-BSA เท่ากับ 3



รูปที่ 6 MALDI-TOF mass spectrum ของ AS-BSA

เมื่อฉีดกระตุ้นหนูเพศผู้ (BALB/c strain) ด้วย AS-BSA และทำการตรวจ Ab ต่อ AS ที่หนูสร้างจากซีรัมหนูแล้ว จึงทำการฆ่าหนูเพื่อนำเซลล์ม้ามออกมาทำการทำการหลอมรวมกับ myeloma cells (SP2/O-Ag14) ด้วยวิธี polyethylene glycol (PEG) เพื่อให้ได้เซลล์ hybridoma จากนั้นทำการคัดเลือกเฉพาะเซลล์ที่สามารถสร้าง anti-AS MAb ได้สูงที่สุดด้วยวิธี limited dilution โดยได้ผลการคัดเลือกดังตารางที่ 2 โคลนที่สามารถผลิต anti-AS MAb ได้ดีที่สุด คือ 2B4 นำโคลนนี้นำมาทำการเลี้ยงเพิ่มปริมาณและแยกบริสุทธิ์ MAb ที่ได้โดยใช้ protein G column

ตารางที่ 2 การตรวจประสิทธิภาพ hybridomas ด้วยวิธี ELISA

No.	indirect OVA	indirect AS-OVA	Comp. AS	Comp. MAC	No.	indirect OVA	indirect AS-OVA	Comp. AS	Comp. MAC
1A1	0.005	0.002	-0.004	0.002	1A2	-0.011	-0.021	-0.012	-0.009
1A3	0.003	-0.003	0.002	0.001	1A4	-0.007	-0.014	-0.005	-0.003
1A5	-0.001	-0.011	-0.003	-0.001	1A6	0.020	0.008	0.006	0.015
1B1	0.006	0.008	0.009	0.009	1B2	-0.004	-0.003	-0.002	-0.004
1B3	0.005	0.010	0.006	0.006	1B4	-0.001	0.000	-0.002	-0.001
1B5	0.001	0.005	0.001	0.003	1B6	0.016	0.017	0.015	0.025
1C1	0.010	0.005	0.011	0.005	1C2	0.009	0.002	0.014	0.007
1C3	0.000	-0.003	-0.004	0.000	1C4	-0.014	-0.020	-0.008	-0.006
1C5	-0.014	-0.020	-0.008	-0.006	1C6	-0.002	-0.006	-0.002	0.001
1D1	-0.004	-0.004	0.001	0.004	1D2	1.577	1.563	1.527	1.525
1D3	0.002	0.010	0.002	0.003	1D4	-0.005	-0.005	-0.005	-0.006
1D5	0.003	0.007	0.003	0.004	1D6	0.001	0.001	-0.001	0.000
2A1	0.001	0.027	0.004	0.005	2A2	0.020	0.013	0.012	0.020
2A3	0.003	-0.003	0.004	0.003	2A4	0.003	0.002	0.006	0.001
2A5	0.002	0.013	0.040	0.012	2A6	-0.002	-0.002	-0.011	-0.003
2B1	0.013	0.009	0.006	0.008	2B2	0.007	0.001	0.000	0.004
2B3	0.012	0.006	0.000	0.009	2B4	0.024	1.197	0.054	0.232
2B5	0.848	0.893	0.898	0.951	2B6	0.045	0.049	0.040	0.048
2C1	0.006	0.014	0.008	0.016	2C2	0.005	0.008	0.005	0.009
2C3	0.008	0.011	0.010	0.019	2C4	0.018	0.021	0.021	0.020
2C5	0.009	0.008	0.011	0.013	2C6	0.004	0.004	0.011	0.012
2D1	0.005	0.006	0.005	0.008	2D2	-0.003	0.000	-0.002	0.001
2D3	0.006	0.007	0.006	0.007	2D4	0.007	0.005	0.004	0.007
2D5	0.002	0.003	0.003	0.005	2D6	0.012	0.010	0.009	0.012
3A1	0.014	0.011	0.010	0.010	3A2	0.003	0.004	0.002	0.002
3A3	0.006	0.008	0.006	0.009	3A4	0.007	0.005	0.006	0.005
3A5	0.005	0.007	0.006	0.009	3B1	0.014	0.017	0.018	0.084
3B2	0.007	0.002	0.006	0.006	3B3	0.010	0.005	0.010	0.012
3B4	-0.002	-0.002	0.004	0.003	3B5	-0.012	-0.009	-0.002	-0.001
3C1	0.003	0.010	0.007	0.007	3C2	-0.006	0.001	0.002	0.004
3C3	-0.001	0.001	0.003	0.005	3C4	0.009	0.004	0.007	0.010
3C5	0.006	0.005	0.005	0.004	3D1	0.001	0.003	0.000	-0.002
3D2	0.008	0.011	0.009	0.006	3D3	0.002	0.005	0.002	0.002
3D4	0.004	0.005	0.004	0.002	3D5	0.013	0.015	0.013	0.010

2. ตรวจสอบคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอเซียติโคไซด์

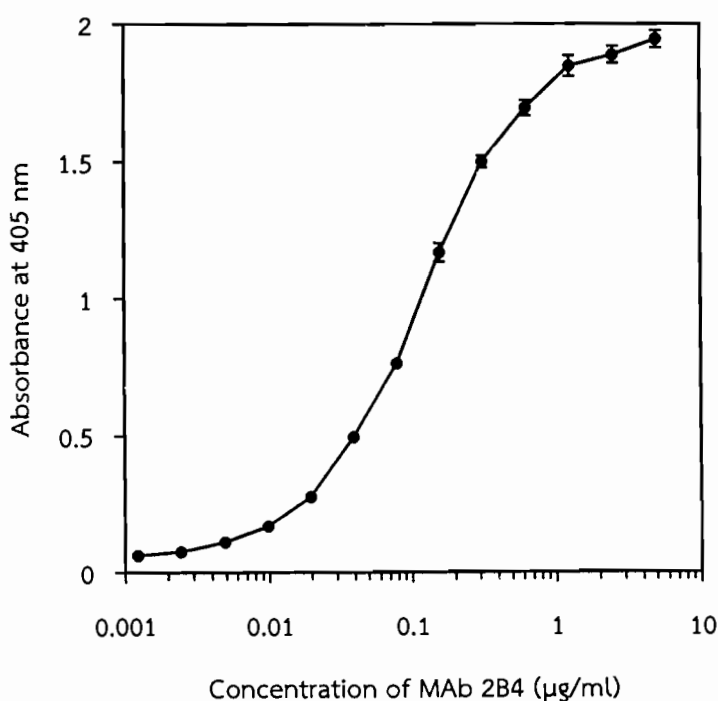
anti-AS MAb ที่ผลิตจากโคลน 2B4 เมื่อทำการตรวจสอบคุณสมบัติเฉพาะพบว่าเป็นชนิด IgG1 ซึ่งมีส่วน light chain เป็นชนิด λ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 การหาชนิด (isotype) ของ MAb 2B4

Type of IgG	Absorbance			Average
Rabbit anti-mouse IgG 1	2.005	1.990	1.984	1.993
Rabbit anti-mouse IgG 2a	0.080	0.066	0.069	0.072
Rabbit anti-mouse IgG 2b	0.026	0.014	0.015	0.018
Rabbit anti-mouse IgG 3	0.414	0.398	0.364	0.392
Rabbit anti-mouse λ chain	2.031	2.021	2.009	2.020
Affinity purified anti-mouse (kappa chain) (rabbit)	0.575	0.574	0.559	0.569

ความสามารถในการเกิดปฏิกิริยากับ AS

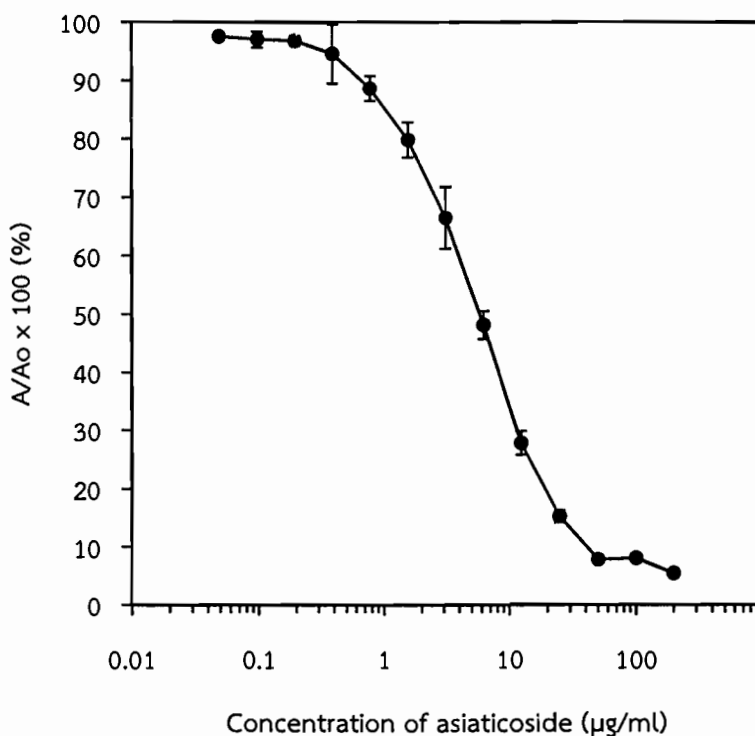
ตรวจสอบความสามารถในการเกิดปฏิกิริยากับ AS (reactivity) ทำโดยวิธี indirect ELISA ด้วยการเจือจาง MAb ในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ผลจากการตรวจวัดดังรูปที่ 7 พบว่าช่วงความเข้มข้นของ MAb ที่สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์คือ 0.08-0.8 $\mu\text{g/ml}$ โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ให้ค่า absorbance เท่ากับ 1 คือ 0.1 $\mu\text{g/ml}$



รูปที่ 7 ความสามารถในการเกิดปฏิกิริยากับ AS ของ anti-AS MAb (2B4)

ความจำเพาะในการจับกับ AS

การตรวจสอบความจำเพาะในการจับกับ AS (specific binding activity) ทำโดยวิธี indirect-competitive ELISA ด้วยการเจือจาง AS ในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ผลจากการตรวจวัดดังรูปที่ 8 พบว่าช่วงความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรงของกราฟอยู่ในช่วงเข้มข้นของ AS มาตรฐานที่ 0.78 - 25 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งเป็นช่วงความเข้มข้นของ AS ที่สามารถวิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA ได้



รูปที่ 8 ความจำเพาะในการจับกับ AS ของ anti-AS MAb (2B4)

($A/A_0 \times 100$; A_0 = absorbance with no AS present, A = absorbance with AS present)

ความสามารถจับกับสารชนิดอื่นๆ (cross-reactivity)

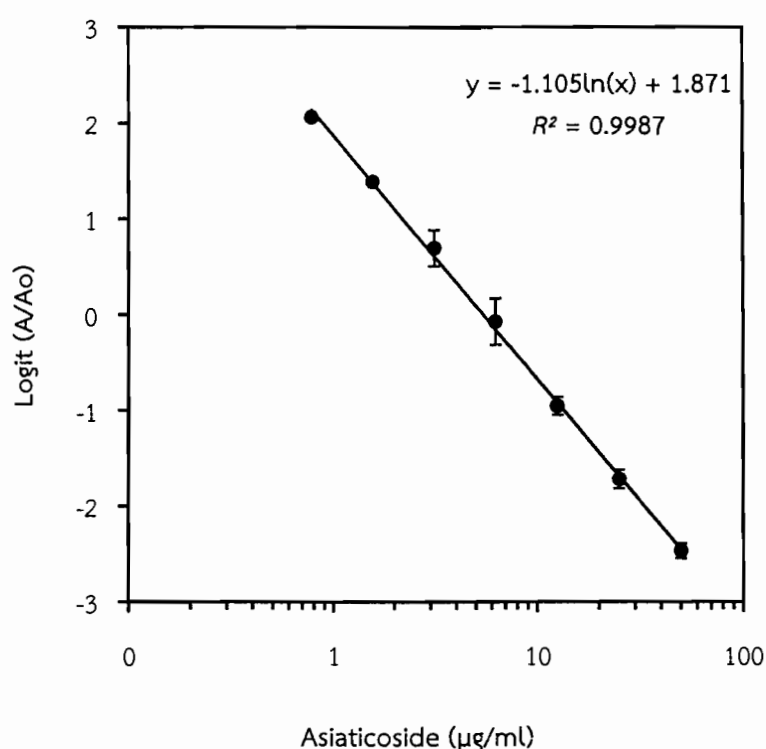
การตรวจสอบความสามารถจับกับสารชนิดอื่นๆ (cross-reactivity) ทำโดยวิธี indirect-competitive ELISA ด้วยการใช้สารที่มีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงที่พบในบัวบก และสารประกอบอื่นๆ เพื่อตรวจว่า MAb ที่ผลิตได้สามารถจับกับสารชนิดอื่นๆ ได้หรือไม่ โดยคำนวณออกมาในรูป % การจับเทียบกับสาร AS ผลจากการตรวจวัดแสดงในตารางที่ 4 พบว่า anti-AS MAb (2B4) สามารถจับกับสาร madecassoside (MC) ได้ 7.08% และไม่จับกับ aglycone ของ AS (Asiatic acid) และ MC (madecassic acid) รวมถึงสารประกอบชนิดอื่นๆ แสดงว่า anti-AS MAb (2B4) ที่ผลิตได้มีความจำเพาะต่อ AS ในเกณฑ์ที่น่าเชื่อถือได้ดี

ตารางที่ 4 % cross-reactivity (% CR) ของ anti-AS MAb (2B4) ต่อสารชนิดอื่นๆ

Compounds	CR (%)
<i>Triterpenoidsaponins</i>	
Asiaticoside	100
Madecassoside	7.08
Bacopaside I	<0.01
Ginsenoside Rb1	<0.01
Ginsenoside Rg1	<0.01
Glycyrrhizin	<0.01
<i>Triterpenoids</i>	
Asiatic acid	<0.01
Madecassic acid	<0.01
Lupeol	<0.01
<i>Steroidal alkaloids</i>	
Khasianine	<0.01
Solamargine	<0.01
Solasodine	<0.01
<i>Steroids</i>	
β -sitosterol	<0.01
<i>Sesquiterpene lactones</i>	
Artemisinin	<0.01
Artesunate	<0.01
<i>Anthraquinones</i>	
Sennoside A	<0.01
Sennoside B	<0.01
<i>Alkaloids</i>	
Colchicine	<0.01
Dicentrine	<0.01
Ephedrine	<0.01
Rutin	<0.01
Mangiferin	<0.01
Resveratol	<0.01

3. พัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสาร asiaticoside โดยวิธี ELISA

จากการตรวจสอบความจำเพาะในการจับกับ AS (specific binding activity) ที่ทำโดยวิธี indirect-competitive ELISA เมื่อนำกราฟในช่วงที่มีความเข้มข้นสูงมาทำการ plot ใหม่จะได้กราฟมาตรฐาน (รูปที่ 9) ที่สามารถนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ AS ได้ โดยผลจากการทดลองพบว่าความเข้มข้นของ anti-AS MAb (2B4) ที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ 0.1 $\mu\text{g/ml}$ และช่วงความเข้มข้นของ AS ที่สามารถวิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA ได้คือ 0.78 - 50 $\mu\text{g/ml}$ โดยมีสมการที่ใช้การวิเคราะห์คือ $Y = -1.105\ln(X) + 1.871$ ซึ่งให้ค่า $r^2 = 0.9987$ ($Y = \text{Logit } A/A_0$, $X = \text{concentration}$)



รูปที่ 9 กราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ปริมาณ AS ด้วยวิธี ELISA

การตรวจรับรองความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ด้วย ELISA (method validation)

Intra- และ Inter-assay precisions

เพื่อตรวจสอบ precision และ reproducibility ของวิธีวิเคราะห์จึงจำเป็นต้องทำ Intra- และ Inter-assay precision โดย Intra-assay เป็นการตรวจความเที่ยงในการวิเคราะห์ระหว่างหลุม (well to well) ส่วน Inter-assay เป็นการตรวจความเที่ยงในการวิเคราะห์ระหว่าง plate (plate to plate) และรายงานผลในรูปของ % coefficient of variation (%CV) ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 5 พบว่า Intra-assay precision ให้ % CV สูงสุดที่ 3.9 % ($n = 5$) ในขณะที่ inter-assay เป็น 4.5 % ($n = 3$) บ่งถึงวิธีวิเคราะห์ AS ด้วย ELISA โดยใช้ anti-AS MAb (2B4) มีความเที่ยงในการวิเคราะห์

ตารางที่ 5 Intra- และ Inter-assay precisions ของการวิเคราะห์ AS ด้วยวิธี ELISA

AS concentration (µg/ml)	Intra-assay CV (%) (n = 5)	Inter-assay CV (%) (n = 3)
1.56	3.90	4.11
3.12	2.31	4.02
6.25	2.10	4.50
12.5	1.45	1.44
25	1.45	1.85

Recovery ของ AS

เพื่อตรวจสอบความถูกต้อง (accuracy) และความน่าเชื่อถือ (reliability) ของการวิเคราะห์ จึงจำเป็นต้องหา % recovery ของ AS ด้วยการเติมสารมาตรฐาน AS ในความเข้มข้นต่างๆ ลงในตัวอย่างที่จะทำการวิเคราะห์ ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 6 โดย % recovery ของ AS ที่คำนวณได้อยู่ในช่วง 95.36 - 103.12 % ซึ่งมีค่า % CV ในระดับต่ำ (0.24–9.15 %) แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ AS ด้วย ELISA โดยใช้ anti-AS MAb (2B4) มีความถูกต้อง (accuracy) และความน่าเชื่อถือ (reliability)

ตารางที่ 6 Recovery ของการวิเคราะห์ AS ด้วยวิธี ELISA

Spiked level (µg/ml)	Measured amount of AS ^a (µg ± SD)	CV ^b (%)	Recovery ^c (%)
0	451.5 ± 20.2	4.48	-
12.5	464.4 ± 22.6	4.87	103.1
25	475.3 ± 43.5	9.15	95.4
50	501.4 ± 1.2	0.24	99.9

^aAll values were mean±S.D. from triplicate samples for each level.

^bCoefficient of variation=S.D./mean×100%.

^cRecovery (%)=[(measured amount–451.5 µg)/added amount]×100.

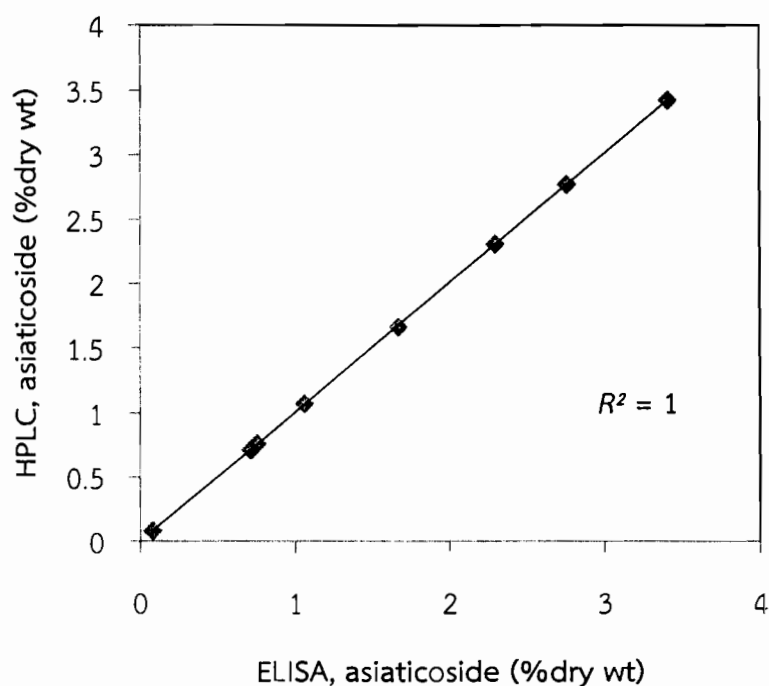
ความสัมพันธ์ของผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA เปรียบเทียบกับ HPLC

เพื่อยืนยันความถูกต้องในการวิเคราะห์หาปริมาณ AS ด้วยวิธี ELISA โดยใช้ anti-AS MAb (2B4) จึงมีการเปรียบเทียบกับวิธีวิเคราะห์ด้วย HPLC ผลการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 7 พบว่าปริมาณที่วิเคราะห์ได้ทั้ง 2 วิธีไม่มีความแตกต่างกัน โดยกราฟความสัมพันธ์ของปริมาณ AS ในบวบกที่วิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA เทียบกับ HPLC แสดงในรูปที่ 10 โดยมีค่า $r^2 = 1$ ดังนั้นวิธี ELISA เป็นอีกวิธีที่สามารถใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสาร AS ได้และสะดวก รวดเร็วกว่าวิธี HPLC

ตารางที่ 7 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างบัวบกและแว่นแก้วด้วยวิธี ELISA เปรียบเทียบกับ HPLC

Collection place	Concentration (% dry wt. $\pm$ SD)	
	ELISA	HPLC
<i>Centella asiatica</i>		
KhonKaen: whole plant	1.06 $\pm$ 0.04	1.07 $\pm$ 0.01
KhonKaen: arial part	0.75 $\pm$ 0.03	0.76 $\pm$ 0.03
KhonKaen: root	0.08 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.00
Bangkok	0.71 $\pm$ 0.02	0.71 $\pm$ 0.02
NakhonPathom	1.67 $\pm$ 0.04	1.66 $\pm$ 0.03
Phuket	2.30 $\pm$ 0.05	2.31 $\pm$ 0.03
Samutprakan	2.76 $\pm$ 0.06	2.77 $\pm$ 0.03
Ubon Ratchathani	3.41 $\pm$ 0.11	3.42 $\pm$ 0.11
<i>Hydrocotyle umbellate</i>		
KhonKaen	ND	ND
Ubon Ratchathani	ND	ND

ND = not detectable



รูปที่ 10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ AS ในบัวบกที่วิเคราะห์โดยวิธี ELISA เทียบกับ HPLC

การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างบับกจากแหล่งต่างๆ พบว่าปริมาณ AS ที่ตรวจวัดได้อยู่ในช่วง 7-35 mg/g โดยแหล่งวัตถุดิบบับกที่ให้ปริมาณสาร AS สูงที่สุดคือบับกจากจังหวัดอุบลราชธานี และไม่พบสาร AS ในแวนแก้ว สำหรับการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเภสัชภัณฑ์ที่มีบับกเป็นส่วนประกอบชนิดต่างๆ (ตารางที่ 8) พบว่าปริมาณ AS ที่ตรวจวัดได้อยู่ในช่วง 0.002-36 mg/g โดยเภสัชภัณฑ์ที่มีสาร AS สูงที่สุดคือผลิตภัณฑ์ชาขง

ตารางที่ 8 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างเภสัชภัณฑ์ที่มีบับกเป็นส่วนประกอบด้วยวิธี ELISA

No. of product	Preparation	Asiaticoside content $\pm$ SD
1	Tea bag	36.55 ± 0.54^a
2	Tea bag	14.98 ± 0.99^a
3	Capsule	$(120.88 \pm 1.22) \times 10^{-3}^a$
4	Capsule	$(46.28 \pm 0.23) \times 10^{-3}^a$
5	Gel	4.28 ± 0.33^b
6	Gel	1.28 ± 0.10^b
7	Gel	$(222.75 \pm 1.82) \times 10^{-3}^b$
8	Gel	$(6.18 \pm 0.73) \times 10^{-3}^b$
9	Cream	$(2.18 \pm 0.99) \times 10^{-3}^b$
10	Toner	$(1.99 \pm 0.02) \times 10^{-3}^c$

^aDried weight (mg/g)

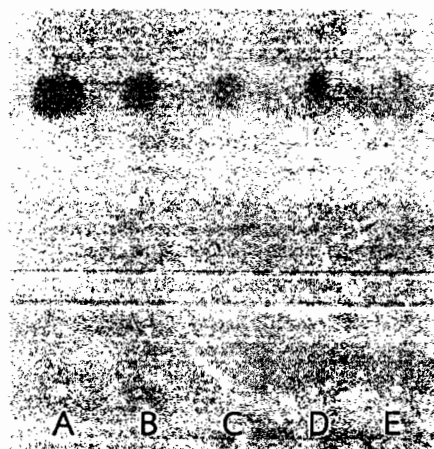
^bFresh weight (mg/g)

^cMeasured by volume of product (mg/ml)

จากผลการวิเคราะห์และตรวจรับรองความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ELISA สามารถสรุปได้ว่าวิธี ELISA ที่ใช้ anti-AS MAb (2B4) สามารถใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ AS ในตัวอย่างบับกและผลิตภัณฑ์ได้อย่างถูกต้องและเที่ยงตรง และเป็นวิธีที่รวดเร็วกว่าวิธี HPLC

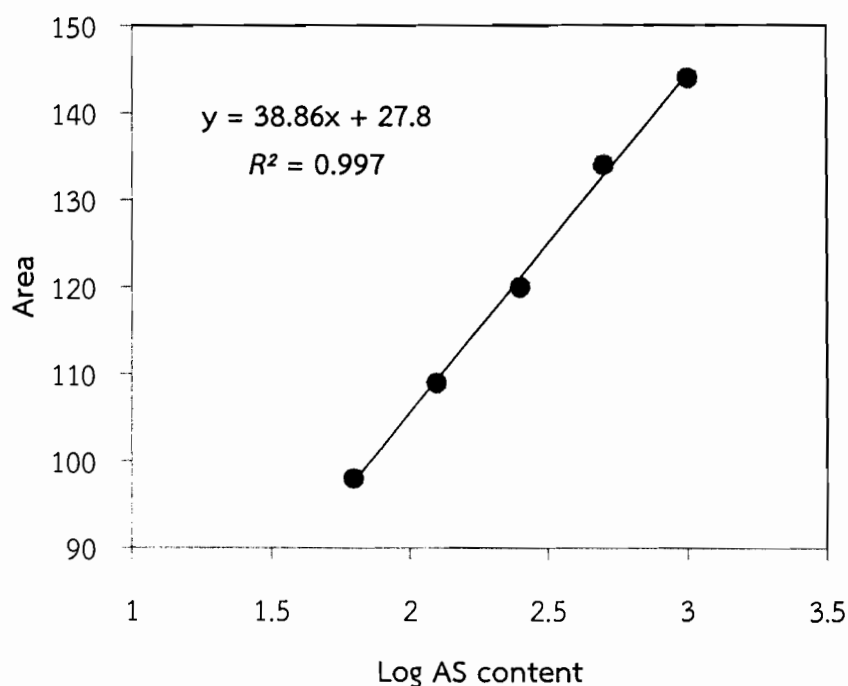
4. พัฒนาวิธีวิเคราะห์สาร asiaticoside บนเมมเบรน โดยวิธี Eastern blotting

รูปที่ 11 แสดงผลการวิเคราะห์สารมาตรฐาน AS ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี Eastern Blotting จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของความเข้มของจุดที่เกิดปฏิกิริยา กับความเข้มข้นโดยใช้โปรแกรม imageJ analysis จากนั้นนำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 12) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ AS ในตัวอย่าง



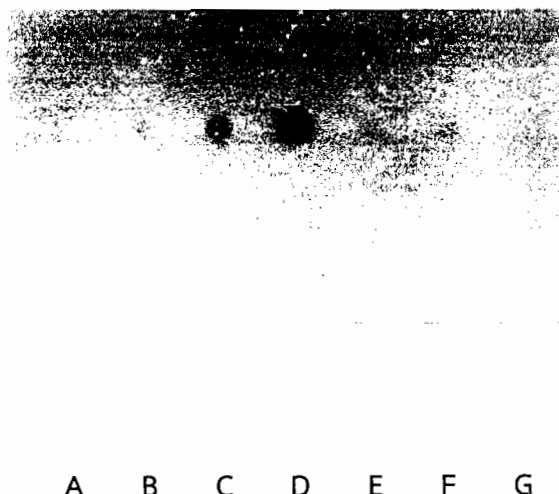
รูปที่ 11 การวิเคราะห์ด้วยวิธี Eastern Blotting ของสารมาตรฐาน AS ที่ความเข้มข้นต่างๆ;

A = 1000 ng, B = 500 ng, C = 250 ng, D = 125 ng, E = 62.5 ng



รูปที่ 12 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน AS ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Eastern Blotting

กราฟมาตรฐานที่ได้จากการวิเคราะห์ AS มาตรฐานให้สมการเส้นตรงที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ $Y = 38.86X + 27.8$ ซึ่งให้ค่า $r^2 = 0.997$ (Y = Area of spot, X = log concentration) โดยความเข้มข้นที่สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยวิธี Eastern Blotting อยู่ระหว่าง 62.5-500 ng โดยมี detection limit ที่ 31.25 ng ตัวอย่างการวิเคราะห์หาปริมาณสาร AS ในบัวบกแสดงในรูปที่ 13



รูปที่ 13 การวิเคราะห์หาปริมาณสาร AS ในตัวอย่างพืชด้วยวิธี Eastern Blotting;

A = 62.5 ng, B = 125 ng, C = 250 ng, D = 500 ng,

E = sample from Phuket, F = sample from Samutprakan, G = sample from Bangkok

การตรวจรับรองความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ด้วย Eastern Blotting (method validation)

Intra- และ Inter-assay precisions

ตรวจสอบ precision และ reproducibility ของวิธีวิเคราะห์โดยทำ Intra- และ Inter-assay โดย Intra-assay เป็นการตรวจความเที่ยงในการวิเคราะห์ภายใน membrane แผ่นเดียวกัน และระหว่างแผ่น membrane ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 9 พบว่า Intra-assay precision ให้ % CV สูงสุดที่ 1.99 % ($n = 3$) ในขณะที่ inter-assay เป็น 4.85 % ($n = 3$) บ่งถึงวิธีวิเคราะห์ AS ด้วย Eastern Blotting โดยใช้ anti-AS MAb (2B4) มีความเที่ยงในการวิเคราะห์

ตารางที่ 9 Intra- และ Inter-assay precisions ของการวิเคราะห์ AS ด้วยวิธี Eastern Blotting

AS concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Intra-assay CV (%) ($n = 3$)	Inter-assay CV (%) ($n = 3$)
500	0.88	1.02
250	1.55	2.84
125	1.89	4.85
62.5	1.99	2.01

Recovery ของ AS

ตรวจสอบความถูกต้อง (accuracy) และความน่าเชื่อถือ (reliability) ของการวิเคราะห์โดยหา % recovery ของ AS ด้วยการเติมสารมาตรฐาน AS ในความเข้มข้นต่างๆ ลงในตัวอย่างที่จะทำการวิเคราะห์ ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 10 โดย % recovery ของ AS ที่คำนวณได้อยู่ในช่วง 96.22 - 103.05 % ซึ่งมีค่า % CV ในระดับต่ำ (0.82–3.30 %) แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ AS ด้วย Eastern Blotting โดยใช้ anti-AS MAb (2B4) มีความถูกต้อง (accuracy) และความน่าเชื่อถือ (reliability)

ตารางที่ 10 Recovery ของการวิเคราะห์ AS ด้วยวิธี Eastern Blotting

Spiked level (µg/ml)	Measured amount of AS ^a (µg ± SD)	CV ^b (%)	Recovery ^c (%)
0	60.08 ± 1.98	3.30	-
62.5	122.52 ± 1.00	0.82	99.82
125	188.90 ± 3.97	2.10	103.05
250	300.64 ± 8.11	2.70	96.22

^aAll values were mean±S.D. from triplicate samples for each level.

^bCoefficient of variation=S.D./mean×100%.

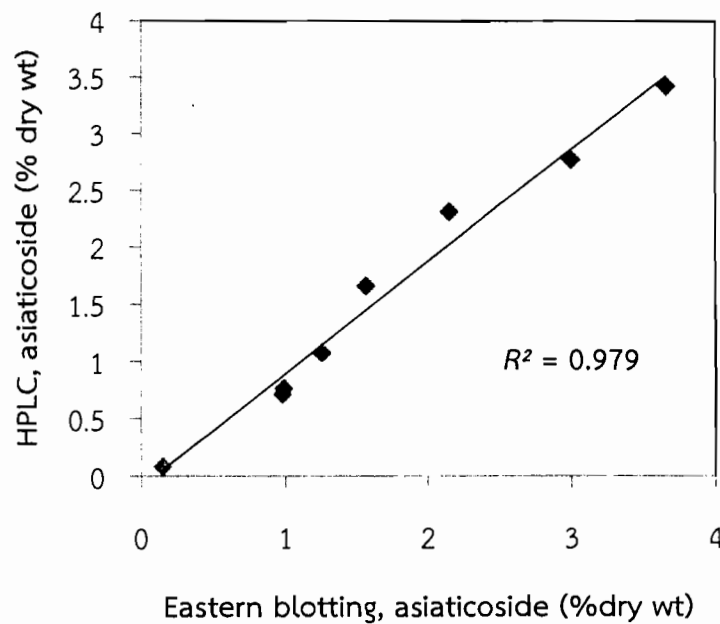
^cRecovery (%)=[(measured amount–60.08 µg)/added amount]×100.

ความสัมพันธ์ของผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี Eastern Blotting เปรียบเทียบกับ HPLC

เพื่อยืนยันความถูกต้องในการวิเคราะห์หาปริมาณ AS ด้วยวิธี Eastern Blotting โดยใช้ anti-AS MAb (2B4) จึงมีการเปรียบเทียบกับวิธีวิเคราะห์ด้วย HPLC ผลการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 11 พบว่าปริมาณที่วิเคราะห์ได้ทั้ง 2 วิธีไม่มีความแตกต่างกัน โดยกราฟความสัมพันธ์ของปริมาณ AS ในบับกที่วิเคราะห์โดยวิธี Eastern Blotting เทียบกับ HPLC แสดงในรูปที่ 14 โดยมีค่า $r^2 = 0.979$ ดังนั้นวิธี Eastern Blotting เป็นอีกวิธีที่สามารถใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสาร AS ได้

ตารางที่ 11 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างบับกด้วยวิธี Eastern Blotting เปรียบเทียบกับ HPLC

Collection place	Concentration (% dry wt. ± SD)	
	Eastern Blotting	HPLC
KhonKaen: whole plant	1.26 ± 0.22	1.07 ± 0.01
KhonKaen: arial part	0.99 ± 0.56	0.76 ± 0.03
KhonKaen: root	0.15 ± 0.24	0.08 ± 0.00
Bangkok	0.98 ± 0.12	0.71 ± 0.02
NakhonPathom	1.57 ± 0.04	1.66 ± 0.03
Phuket	2.15 ± 0.15	2.31 ± 0.03
Samutprakan	3.00 ± 0.36	2.77 ± 0.03
Ubon Ratchathani	3.66 ± 0.18	3.42 ± 0.11



รูปที่ 14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ AS ในบัวบกที่วิเคราะห์โดยวิธี Eastern blotting เทียบกับ HPLC

ตารางที่ 12 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างเภสัชภัณฑ์ที่มีบัวบกเป็นส่วนประกอบด้วยวิธี Eastern Blotting

No. of product	Preparation	Asiaticoside content $\pm$ SD	
		Eastern Blotting	ELISA
1	Tea bag	3.55 ± 1.45^a	36.55 ± 0.54^a
2	Tea bag	0.98 ± 1.29^a	14.98 ± 0.99^a
3	Capsule	ND	$(120.88 \pm 1.22) \times 10^{-3}^a$
4	Capsule	ND	$(46.28 \pm 0.23) \times 10^{-3}^a$
5	Gel	0.34 ± 0.46^b	4.28 ± 0.33^b
6	Gel	0.18 ± 0.19^b	1.28 ± 0.10^b
7	Gel	ND	$(222.75 \pm 1.82) \times 10^{-3}^b$
8	Gel	ND	$(6.18 \pm 0.73) \times 10^{-3}^b$
9	Cream	ND	$(2.18 \pm 0.99) \times 10^{-3}^b$
10	Toner	ND	$(1.99 \pm 0.02) \times 10^{-3}^c$

^aDried weight (mg/g)

^bFresh weight (mg/g)

^cMeasured by volume of product (mg/ml)

ND = not detectable

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณ AS ในเกสรัดพันธุ์ที่มีบัวบกเป็นส่วนประกอบรูปแบบต่างๆ แสดงในตารางที่ 12 พบว่าสามารถตรวจวัดปริมาณ AS ได้เฉพาะตัวอย่างที่เป็นชาชงและเจลทาเท่านั้นโดยตรวจพบในช่วง 0.18-3.55 mg/g

จากการวิเคราะห์ AS ในเกสรัดพันธุ์ที่มีขายในท้องตลาดนั้น พบว่าการวิเคราะห์ด้วยวิธี Eastern Blotting ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่มีสาร AS ในความเข้มข้นต่ำได้ เนื่องจากความเข้มข้นเหล่านั้นไม่อยู่ในช่วงการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ และยังพบว่าวิธี Eastern Blotting สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณ AS ได้ในปริมาณน้อยกว่าวิธี ELISA

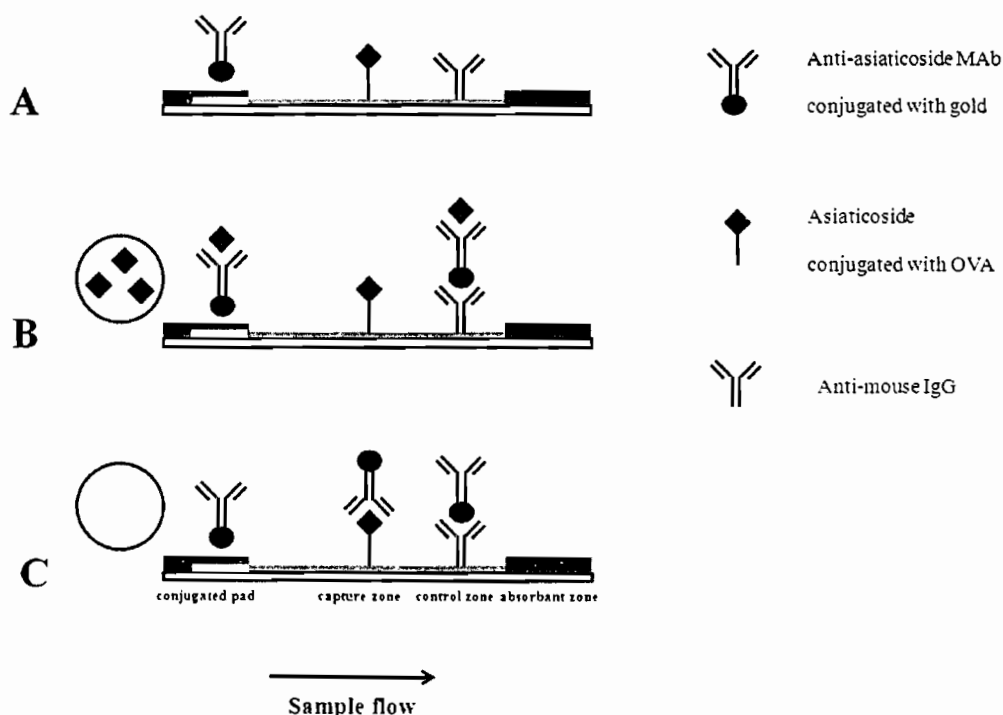
เมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณ AS ในตัวอย่างบัวบกด้วยวิธี Eastern Blotting กับ ELISA แล้วนั้น (ตารางที่ 13) พบว่าทั้ง 2 วิธีให้ผลการวิเคราะห์ที่ไม่แตกต่างกัน ($r^2 = 0.978$) ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ AS ด้วย anti-AS MAb (2B4) โดยวิธี Eastern Blotting สามารถใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ AS ในตัวอย่างพืชบัวบกได้อย่างถูกต้องและเที่ยงตรง แต่ไม่เหมาะที่จะใช้ตรวจวิเคราะห์ปริมาณ AS ในเกสรัดพันธุ์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารช่วยทางเภสัชกรรมบางชนิดในตำรับอาจส่งผลต่อการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้

ตารางที่ 13 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณ AS ในตัวอย่างบัวบกด้วยวิธี ELISA, Eastern Blotting และ HPLC

Collection place	Concentration (% dry wt. $\pm$ SD)		
	ELISA	Eastern Blotting	HPLC
KhonKaen: whole plant	1.06 $\pm$ 0.04	1.26 $\pm$ 0.22	1.07 $\pm$ 0.01
KhonKaen: arial part	0.75 $\pm$ 0.03	0.99 $\pm$ 0.56	0.76 $\pm$ 0.03
KhonKaen: root	0.08 $\pm$ 0.01	0.15 $\pm$ 0.24	0.08 $\pm$ 0.00
Bangkok	0.71 $\pm$ 0.02	0.98 $\pm$ 0.12	0.71 $\pm$ 0.02
NakhonPathom	1.67 $\pm$ 0.04	1.57 $\pm$ 0.04	1.66 $\pm$ 0.03
Phuket	2.30 $\pm$ 0.05	2.15 $\pm$ 0.15	2.31 $\pm$ 0.03
Samutprakan	2.76 $\pm$ 0.06	3.00 $\pm$ 0.36	2.77 $\pm$ 0.03
UbonRatchathani	3.41 $\pm$ 0.11	3.66 $\pm$ 0.18	3.42 $\pm$ 0.11

5. พัฒนาริธีวิเคราะห์สาร asiaticoside โดยวิธี Immunochromatographic strip

ชุดตรวจสาร AS (รูปที่ 15A) โดยใช้ anti-AS MAb (2B4) อาศัยหลักการ competitive immunoassay โดยเมื่อจุ่มสารสกัดบับกลงใน sample pad แล้ว สาร AS ที่อยู่ในตัวอย่างจะจับกับ anti-AS MAb-colloidal gold ที่ conjugated pad และจะเคลื่อนที่ขึ้นไปบนแผ่น PVDF membrane ไปจนถึง บริเวณ control zone ซึ่งมี anti-mouse IgG เกาะอยู่ anti-AS MAb-colloidal gold ที่จับกับ AS จะถูกจับด้วย anti-mouse IgG ซึ่งเห็นแถบสีม่วงของ detector reagent (gold particle) ตรงบริเวณนี้ (รูปที่ 15B) ในขณะที่ตัวอย่างที่ไม่มี AS จะแสดงสีทั้งบริเวณ control zone และ capture zone เนื่องจาก anti-AS MAb-colloidal gold อิสระจาก conjugate pad บางส่วนจะเคลื่อนที่ผ่าน membrane มาจับกับ AS-OVA ที่อยู่ capture zone และ anti-AS MAb-colloidal gold อิสระอีกส่วนหนึ่งจะเคลื่อนที่มาจับกับ anti-mouse IgG บน control zone จึงเห็นสีทั้งบริเวณ capture zone และ control zone (รูปที่ 15C) กล่าวคือหากสารสกัดมี AS อยู่จะปรากฏสีเพียงบริเวณ control zone เท่านั้น (positive test) และหากสารสกัดไม่มี AS อยู่จะปรากฏสีทั้งบริเวณ capture zone และ control zone (negative test) ดังตัวอย่างแสดงรูปที่ 16

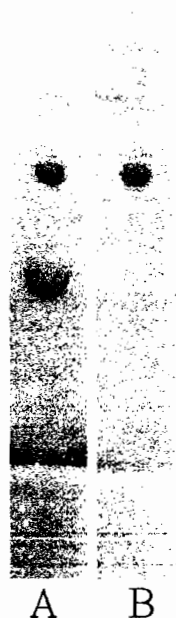


รูปที่ 15 การเกิดปฏิกิริยาบน immunochromatographic strip;

A: ชุดทดสอบ immunochromatographic strip

B: การเกิดปฏิกิริยาเมื่อมีสาร AS ในตัวอย่าง (positive test)

C: การเกิดปฏิกิริยาเมื่อไม่มีสาร AS ในตัวอย่าง (negative test)

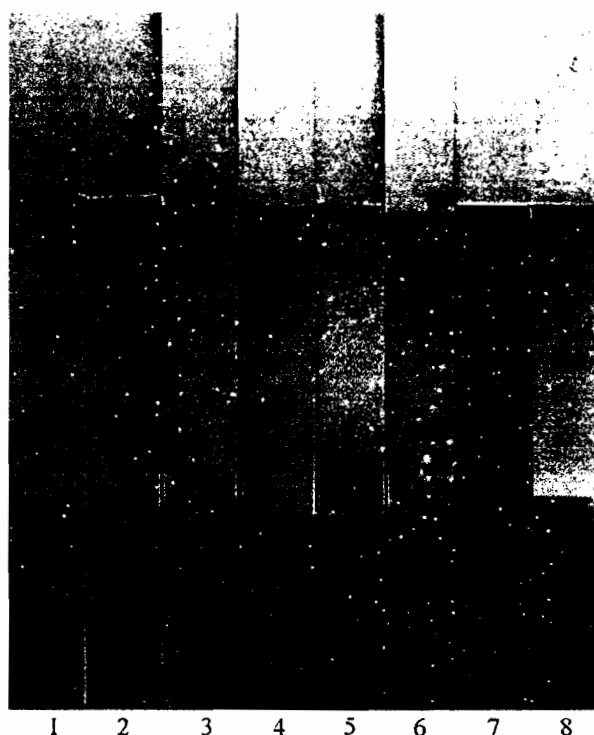


รูปที่ 16 การสังเกตผลการตรวจด้วย immunochromatographic strip;
A: negative sample, B: positive sample

ขีดจำกัดในการตรวจพบ (limit of detection) ของชุดตรวจ AS ทำโดยจุ่มชุดตรวจลงในสารละลายมาตรฐาน AS ที่ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นสังเกตผลโดยดูสีของผลที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ในความเข้มข้น AS มาตรฐานที่น้อยที่สุด ผลการทดสอบพบว่าชุดตรวจ AS มีขีดจำกัดในการตรวจพบที่ความเข้มข้นของ AS เท่ากับ 12.5 µg/ml

การตรวจหา AS ในตัวอย่างพืชสมุนไพรบัวบก และแว่นแก้ว โดยใช้ชุดทดสอบ immunochromatographic strip แสดงในรูปที่ 17 ผลการทดสอบด้วยชุดตรวจได้ยืนยันความถูกต้องโดยเปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณ AS ด้วยวิธี ELISA และแสดงตารางที่ 14 พบว่าตัวอย่างบัวบกทุกตัวอย่างให้ผลบวก ในขณะที่ตัวอย่างแว่นแก้วทุกตัวอย่างให้ผลลบและไม่ตรวจพบสาร AS ด้วยวิธี ELISA ในตัวอย่างแว่นแก้ว

จากผลการทดสอบชุดตรวจสาร AS และยืนยันความถูกต้องโดยเปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณ AS ด้วยวิธี ELISA สามารถสรุปเบื้องต้นได้ว่าชุดตรวจนี้สามารถใช้ตรวจสาร AS ในตัวอย่างพืชได้เบื้องต้น และการพัฒนายังต้องมีการทดสอบความคงตัว (stability) ของชุดตรวจด้วย



รูปที่ 17 การวิเคราะห์ตัวอย่างบัวบกและแว่นแก้วด้วยชุดทดสอบ immunochromatographic strip:
1: negative control, 2-6: ตัวอย่างบัวบก, 7-8: ตัวอย่างแว่นแก้ว

ตารางที่ 14 ผลการวิเคราะห์สาร AS ในตัวอย่างบัวบกและแว่นแก้วด้วยชุดทดสอบ
immunochromatographic strip และ ELISA

Collection place	Strip test [*]	ELISA (% dry wt $\pm$ SD)
Samples of <i>C. asiatica</i>		
Bangkok	+	0.66 $\pm$ 0.02
Nakhon Pathom	+	1.97 $\pm$ 0.16
Nonthaburi	+	2.82 $\pm$ 0.15
Samutprakan	+	1.63 $\pm$ 0.10
Satun	+	1.16 $\pm$ 0.05
Samples of <i>H. umbellata</i>		
Suphan Buri	-	ND
Sa Kaeo	-	ND

^{*} (+) presence detected; (-) sample negative for asiaticoside

ND = not detectable

บทที่ 5

อภิปรายผลการวิจัย (Discussion)

1. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ asiaticoside

AS-BSA, AS-HSA และ AS-OVA สามารถเตรียมด้วยการทำปฏิกิริยากับ sodium periodate (NaIO_4) และเกิดการเชื่อมต่อกันบริเวณตำแหน่งของน้ำตาล AS-BSA ที่ได้มีค่า hapten number เท่ากับ 3 แสดงว่ามี AS 3 โมเลกุลเกาะอยู่บน BSA ซึ่งถือว่าเกาะได้น้อย ซึ่งอาจมีผลต่อการก่อภูมิคุ้มกัน แต่ AS-BSA ที่มี hapten number น้อยก็สามารถก่อภูมิคุ้มกันในหนูทดลองได้ ซึ่งคล้ายกับผลการกระตุ้นหนูด้วย glycyrrhizin-BSA ที่มี hapten number น้อย (Tanaka and Shoyama, 1998)

เมื่อฉีดกระตุ้นหนูเพศผู้ (BALB/c strain) ด้วย AS-BSA และทำการตรวจ Ab ต่อ AS ที่หนูสร้างจากซีสเต็มแล้ว จึงทำการฆ่าหนูเพื่อนำเซลล์มาออกมาทำการทำการหลอมรวมกับ myeloma cells (SP2/O-Ag14) ด้วยวิธี polyethylene glycol (PEG) เพื่อให้ได้เซลล์ hybridoma จากนั้นทำการคัดเลือกเฉพาะเซลล์ที่สามารถสร้าง anti-AS MAb ได้สูงที่สุดด้วยวิธี limited dilution โคลนที่สามารถผลิต anti-AS MAb ได้ดีที่สุด คือ 2B4 นำโคลนนีมาทำการเลี้ยงเพิ่มปริมาณและแยกบริสุทธิ์ MAb ที่ได้โดยใช้ protein G column

2. ตรวจสอบคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอเชียติโคไซด์

anti-AS MAb (2B4) ที่ได้เป็นชนิด IgG1 ซึ่งมีส่วน light chain เป็นชนิด λ เมื่อตรวจสอบความสามารถในการเกิดปฏิกิริยากับ AS (reactivity) โดยวิธี indirect ELISA พบว่าช่วงความเข้มข้นของ MAb ที่สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์คือ 0.08-0.8 $\mu\text{g/ml}$ โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สามารถนำไปใช้ตรวจสอบความจำเพาะ (specific binding activity) และตรวจวัดปริมาณสาร AS ได้คือ 0.1 $\mu\text{g/ml}$ การตรวจสอบความจำเพาะในการจับกับ AS โดยวิธี indirect-competitive ELISA พบว่าช่วงความเข้มข้นของ AS ที่สามารถใช้วิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA ได้คือ 0.78 - 25 $\mu\text{g/ml}$

การตรวจสอบความสามารถจับกับสารชนิดอื่นๆ (cross-reactivity) anti-AS MAb (2B4) ที่ผลิตได้มีความจำเพาะต่อ AS และสามารถจับกับสาร madecassoside (MC) ได้ 7.08% โดยไม่จับกับ aglycone ของ AS (Asiatic acid) และ MC (madecassic acid) รวมถึงสารประกอบชนิดอื่นๆ แสดงว่าทั้งส่วน aglycone และน้ำตาลของ AS เป็นส่วนที่เกี่ยวข้องกับการจับ (epitopes) กับ anti-AS MAb (2B4) ได้ และการมีหมู่ hydroxyl บนตำแหน่ง C-6 ของ MC มีผลทำให้ anti-AS MAb (2B4) จับได้น้อยลง

3. พัฒนาริธีวิเคราะห์หาปริมาณสาร asiaticoside โดยวิธี ELISA

กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์หาปริมาณ AS ทำโดยวิธี indirect-competitive ELISA โดยความเข้มข้นของ anti-AS MAb (2B4) ที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ 0.1 $\mu\text{g/ml}$ และช่วงความเข้มข้นของ AS ที่สามารถวิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA ได้คือ 0.78 - 25 $\mu\text{g/ml}$ โดยมีสมการเส้นตรงที่ใช้การวิเคราะห์คือ $Y = -1.105\ln(X) + 1.871$ ซึ่งให้ค่า $r^2 = 0.9987$ ($Y = \text{Logit } A/A_0$, $X = \text{concentration}$)

การตรวจรับรองความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ด้วย ELISA (method validation) ทำโดยการตรวจสอบความเที่ยง (precision), ความถูกต้อง (accuracy) และยืนยันความถูกต้องในการวิเคราะห์หาปริมาณ AS โดยเปรียบเทียบกับวิธีวิเคราะห์ด้วย HPLC ให้ผลดังนี้

การตรวจสอบความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ทำโดยตรวจ Intra- และ Inter-assay precision โดย Intra-assay เป็นการตรวจสอบความเที่ยงในการวิเคราะห์ระหว่างหลุม (well to well) ส่วน Inter-assay เป็นการตรวจสอบความเที่ยงในการวิเคราะห์ระหว่าง plate (plate to plate) พบว่า Intra-assay precision ให้ % CV สูงสุดที่ 3.9 % (n = 5) ในขณะที่ inter-assay เป็น 4.5 % (n = 3) บ่งถึงวิธีวิเคราะห์ AS ด้วย ELISA โดยใช้ anti-AS MAb (2B4) มี precision และ reproducibility ในการวิเคราะห์

การตรวจสอบความถูกต้อง (accuracy) ของการวิเคราะห์พบค่า % recovery ของ AS ที่คำนวณได้อยู่ในช่วง 95.36 - 103.12 % และมีค่า % CV ในระดับต่ำ (0.24-9.15 %) แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ AS ด้วย ELISA โดยใช้ anti-AS MAb (2B4) มีความถูกต้อง (accuracy) และความน่าเชื่อถือ (reliability)

การยืนยันความถูกต้องในการวิเคราะห์หาปริมาณ AS ด้วยวิธี ELISA โดยใช้ anti-AS MAb (2B4) เปรียบเทียบกับวิธีวิเคราะห์ด้วย HPLC ผลการวิเคราะห์พบว่าปริมาณที่วิเคราะห์ได้ทั้ง 2 วิธีไม่มีความแตกต่างกัน ($r^2 = 1$) ดังนั้นวิธี ELISA เป็นอีกวิธีที่สามารถใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสาร AS ได้

การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างบวบจากแหล่งต่างๆ พบว่าปริมาณ AS ที่ตรวจวัดได้อยู่ในช่วง 7-35 mg/g โดยแหล่งวัตถุดิบบวบที่ให้ปริมาณสาร AS สูงที่สุดคือบวบจากจังหวัดอุบลราชธานี สำหรับแวนแก้ว ซึ่งมีคนเข้าใจผิดว่าเป็นบวบและนำแวนแก้วมาใช้แทนบวบกันนั้น แต่จากผลการวิเคราะห์ไม่พบปริมาณสาร AS ในแวนแก้ว สำหรับการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเภสัชภัณฑ์ที่มีบวบเป็นส่วนประกอบชนิดต่างๆ พบว่าปริมาณ AS ที่ตรวจวัดได้อยู่ในช่วง 0.002-36 mg/g โดยเภสัชภัณฑ์ที่มีสาร AS สูงที่สุดคือ ผลิตภัณฑ์ชาชง

จากผลการวิเคราะห์และตรวจรับรองความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ELISA สามารถสรุปได้ว่าวิธี ELISA ที่ใช้ anti-AS MAb (2B4) สามารถใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ AS ในตัวอย่างบวบและผลิตภัณฑ์ได้อย่างถูกต้องและเที่ยงตรง และเป็นวิธีที่รวดเร็วกว่าวิธี HPLC

4. พัฒนาริธีวิเคราะห์สาร asiaticoside บนเมมเบรน ด้วยวิธี Eastern blotting

วิธีตรวจเอกลักษณ์และปริมาณสาร AS บน PES (Polyethersulfone) เมมเบรน ด้วยวิธี Eastern blotting นั้นในขั้นตอนแรกจะทำคล้ายกับวิธีทำ TLC คือทำการ spot สารสกัดบวบลงบน PES membrane แล้ว run ให้เกิดการแยกสารองค์ประกอบ หลังจากเชื่อมต่อกับสาร AS กับ OVA ด้วยปฏิกิริยา periodate oxidation แล้วจึงทำขั้นตอนต่อไปคล้ายกับการทำ Western Blotting จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของความเข้มของจุดที่เกิดปฏิกิริยา กับความเข้มข้นโดยใช้โปรแกรม imageJ analysis และนำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ AS ในตัวอย่าง กราฟมาตรฐานที่ได้จากการวิเคราะห์ AS มาตรฐานให้สมการเส้นตรงที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ $Y = 38.86X + 27.8$ ซึ่งให้ค่า $r^2 = 0.997$ (Y = Area of spot, X = log concentration) โดยความเข้มข้นที่สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยวิธี Eastern Blotting อยู่ระหว่าง 62.5-500 ng โดยมี detection limit ที่ 31.25 ng

ผลการตรวจรับรองความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ Eastern blotting พบว่า intra-assay ให้ % CV สูงสุดที่ 1.99 % (n = 3) ในขณะที่ inter-assay เป็น 4.85 % (n = 3) บ่งถึงวิธีวิเคราะห์ AS ด้วย Eastern Blotting โดยใช้ anti-AS MAb (2B4) มี precision และ reproducibility ในการวิเคราะห์ และ % recovery ของ AS ที่คำนวณได้อยู่ในช่วง 96.22 - 103.05 % ซึ่งมีค่า % CV ในระดับต่ำ (0.82-3.30 %)

แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ AS ด้วย Eastern Blotting โดยใช้ anti-AS MAb (2B4) มีความถูกต้อง (accuracy) และความน่าเชื่อถือ (reliability) และเมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับวิธี HPLC พบว่าปริมาณที่วิเคราะห์ได้ทั้ง 2 วิธีไม่มีความแตกต่างกัน ($r^2 = 0.979$) ดังนั้นวิธี Eastern Blotting เป็นอีกวิธีที่สามารถใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสาร AS ได้

จากการวิเคราะห์ AS ในเกสรชัณห์ที่มีขายในท้องตลาดนั้น พบว่าสามารถตรวจวัดปริมาณ AS ได้เฉพาะตัวอย่างที่เป็นชาชงและเจลทาเท่านั้นโดยตรวจพบในช่วง 0.18-3.55 mg/g และพบว่าการวิเคราะห์ด้วยวิธี Eastern Blotting ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่มีสาร AS ในความเข้มข้นต่ำได้เนื่องจากความเข้มข้นเหล่านั้นไม่อยู่ในช่วงการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ และยังพบว่าวิธี Eastern Blotting สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณ AS ได้ในปริมาณน้อยกว่าวิธี ELISA ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารประกอบอื่นๆ ที่เป็นสารช่วยทางเภสัชกรรมในตำรับอาจมีผลรบกวนการเกิดปฏิกิริยา periodate oxidation ที่เชื่อม AS เข้ากับกับ gelatin บนแผ่น PES เมมเบรน

เมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณ AS ในตัวอย่างบัวบกด้วยวิธี Eastern Blotting กับ ELISA พบว่าทั้ง 2 วิธีให้ผลการวิเคราะห์ที่ไม่แตกต่างกัน ($r^2 = 0.978$) ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ AS ด้วย anti-AS MAb (2B4) โดยวิธี Eastern Blotting สามารถใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ AS ในตัวอย่างบัวบกได้อย่างถูกต้องและเที่ยงตรง แต่ไม่เหมาะที่จะใช้ตรวจวิเคราะห์ปริมาณ AS ในเกสรชัณห์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารช่วยทางเภสัชกรรมบางชนิดในตำรับอาจส่งผลต่อการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้

5. พัฒนาวิธีวิเคราะห์สาร asiaticoside โดยวิธี Immunochromatographic strip

ชุดตรวจเอกลักษณ์สาร AS โดยใช้ anti-AS MAb (2B4) อาศัยหลักการ competitive immunoassay มีขีดจำกัดในการตรวจพบที่ความเข้มข้นของ AS เท่ากับ 12.5 $\mu\text{g/ml}$

การตรวจหา AS ในตัวอย่างพืชสมุนไพรบัวบก และแว่นแก้ว โดยใช้ชุดทดสอบ immunochromatographic strip ผลการทดสอบด้วยชุดตรวจได้ยืนยันความถูกต้องโดยเปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณ AS ด้วยวิธี ELISA พบว่าตัวอย่างบัวบกทุกตัวอย่างให้ผลบวก ในขณะที่ตัวอย่างแว่นแก้วทุกตัวอย่างให้ผลลบและไม่ตรวจพบสาร AS ด้วยวิธี ELISA ในตัวอย่างแว่นแก้ว

จากผลการทดสอบชุดตรวจสาร AS และยืนยันความถูกต้องโดยเปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณ AS ด้วยวิธี ELISA สามารถสรุปเบื้องต้นได้ว่าชุดตรวจนี้สามารถใช้ตรวจสาร AS ในตัวอย่างพืชได้ และการพัฒนายังต้องมีการทดสอบความคงตัว (stability) ของชุดตรวจด้วย เพื่อหาอายุของชุดตรวจสอบต่อประสิทธิภาพการตรวจสอบของชุดตรวจ

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัย (Conclusion)

การวิจัยครั้งนี้สามารถผลิต monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อสาร asiaticoside (anti-AS MAb) โดย anti-AS MAb (2B4) ที่ได้เป็นชนิด IgG1 ซึ่งมีส่วน light chain เป็นชนิด λ ความเข้มข้นของ MAb ที่นำไปใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสาร AS คือ 0.1 $\mu\text{g/ml}$ และช่วงความเข้มข้นของ AS ที่สามารถวิเคราะห์ด้วยวิธี indirect-competitive ELISA ได้คือ 0.78 - 25 $\mu\text{g/ml}$ anti-AS MAb (2B4) ที่ผลิตได้มีความจำเพาะต่อ AS สูง โดยมี cross-reactivity กับ madecassoside (MC) 7.08% และไม่จับกับ aglycone ของ AS (Asiatic acid) และ MC (madecassic acid) รวมถึงสารประกอบชนิดอื่นๆ

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสาร AS โดยวิธี ELISA พบว่าวิธี ELISA สามารถใช้วิเคราะห์ปริมาณสาร AS ได้อย่างความถูกต้อง (accuracy) และความน่าเชื่อถือ (reliability) โดยให้ค่า % recovery อยู่ในช่วง 95.36 - 103.12 % และมีค่า % CV ในระดับต่ำ (0.24-9.15 %) นอกจากนั้นวิธีนี้ยังมีความเที่ยง (precision) และ reproducibility ในการวิเคราะห์ โดยให้ % CV ของ intra-assay precision สูงสุดที่ 3.9 % และ inter-assay ที่ 4.5 % และให้ผลการวิเคราะห์ที่ไม่แตกต่างกับวิธี HPLC ($r^2 = 1$) ดังนั้นวิธี ELISA เป็นอีกวิธีที่สามารถใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการวิเคราะห์หาปริมาณสาร AS ทั้งในตัวอย่างพืชและเภสัชภัณฑ์ได้ และมีความสะดวก รวดเร็วกว่าวิธี HPLC ที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน

การพัฒนาวิธีตรวจเอกลักษณ์และปริมาณสาร AS บน PES (Polyethersulfone) เมมเบรน ด้วยวิธี Eastern blotting นั้น สามารถวิเคราะห์ปริมาณ AS ได้ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 62.5-500 ng โดยมี detection limit ที่ 31.25 ng การตรวจรับรองความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ Eastern blotting พบว่า intra-assay ให้ % CV สูงสุดที่ 1.99 % ในขณะที่ inter-assay เป็น 4.85 % และ % recovery ของ AS ที่คำนวณได้อยู่ในช่วง 96.22 - 103.05 % ซึ่งมีค่า % CV ในระดับต่ำ (0.82-3.30 %) ป่งถึงวิธีวิเคราะห์ AS ด้วย Eastern Blotting โดยใช้ anti-AS MAb (2B4) มีความเที่ยง (precision), reproducibility, ความถูกต้อง (accuracy) และความน่าเชื่อถือ (reliability) ในการวิเคราะห์ และผลการวิเคราะห์ในตัวอย่างพืชไม่มีความแตกต่างกับวิธี HPLC ($r^2 = 0.979$) และ ELISA ($r^2 = 0.978$) แต่จากการวิเคราะห์ AS ในเภสัชภัณฑ์ที่มีขายในท้องตลาดนั้น พบว่าไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่มีสาร AS ในความเข้มข้นต่ำได้ เนื่องจากความเข้มข้นเหล่านั้นไม่อยู่ในช่วงการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ และยังพบว่าวิธี Eastern Blotting สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณ AS ได้ในปริมาณน้อยกว่าวิธี ELISA ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารช่วยทางเภสัชกรรมอื่นๆ ในตำรับอาจมีผลรบกวนการเกิดปฏิกิริยา periodate oxidation ที่เชื่อม AS เข้ากับกับ gelatin บนแผ่น PES เมมเบรน ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ AS ด้วย anti-AS MAb (2B4) โดยวิธี Eastern Blotting สามารถใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ AS ในตัวอย่างพืชได้เป็นอย่างดีและเที่ยงตรง แต่ไม่เหมาะที่จะใช้ตรวจวิเคราะห์ปริมาณ AS ในเภสัชภัณฑ์

การพัฒนาชุดตรวจเอกลักษณ์สาร AS โดยใช้ anti-AS MAb (2B4) โดยอาศัยหลักการ competitive immunoassay มีขีดจำกัดในการตรวจพบที่ความเข้มข้นของ AS เท่ากับ 12.5 $\mu\text{g/ml}$ การทดสอบประสิทธิภาพการตรวจของชุดตรวจสาร AS แสดงผลไปในทางเดียวกันกับการตรวจด้วยวิธี ELISA จึงสามารถสรุปเบื้องต้นได้ว่าชุดตรวจนี้สามารถใช้ตรวจสาร AS ในตัวอย่างพืชได้ และยังต้องมีการพัฒนาการ

ทดสอบความคงตัว (stability) ของชุดตรวจด้วย เพื่อหาอายุของชุดตรวจสอบซึ่งจะมีผลต่อประสิทธิภาพการ
ตรวจสอบของชุดตรวจ และจะสามารถนำไปพัฒนาใช้ในการตรวจเอกซเรย์ AS ในภาคสนามได้

เอกสารอ้างอิง

- Brinkhaus B, Lindner M, Schuppan D, Hahn EG. (2007) Chemical, pharmacological and clinical profile of the East Asian medical plant *Centella asiatica*. **Phytomedicine**. 5: 427-448.
- Bunpo P, Kataoka K, Arimochi H, Nakayama H, Kuwahara T, Bando Y, Izumi K, Vinitketkumnuen U, Ohnishi Y. (2004). Inhibitory effects of *Centella asiatica* on azoxymethane-induced aberrant crypt focus formation and carcinogenesis in the intestines of F344 rats. **Food Chem. Toxicol.** 42(12):1987-97.
- Chen SW, Wang WJ, Li WJ, Wang R, Li YL, Huang YN, Liang X. (2006). Anxiolytic-like effect of asiaticoside in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 85: 339-344.
- Cheng CL, Guo JS, John L, Marcel WL. (2004). The healing effects of centella extract and asiaticoside on acetic acid induced gastric ulcers in rats. **Life Sci.** 74(18): 2237-2249.
- Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Thailand. (2004). **Thai Herbal Pharmacopoeia Supplement**. Bangkok: Prachachon Publishing.
- Dhanasekaran M, Holcomb LA, Hitt AR, Tharakan B, Porter JW, Young KA, Manyam BV. (2009). *Centella asiatica* extract selectively decreases amyloid beta levels in hippocampus of Alzheimer's disease animal model. **Phytother. Res.** 23(1):14-9.
- Doknak S. (2003). Effect of Asiatic Pennywort (*Centella asiatica*) ethanolic extract on impairment of learning and memory induced by cerebral ischemia and induced by scopolamine in mice. (Thesis) Graduate School, Chulalongkorn University, Bangkok.
- Ermertcan AT, Inan S, Ozturkcan S, Bilac C, Cilaker S. (2008). Comparison of the effects of collagenase and extract of *Centella asiatica* in an experimental model of wound healing: an immunohistochemical and histopathological study. **Wound Repair Regen.** 16(5):674-81.
- Fukuda N, Tanaka H, Shoyama Y. (2000). Formation of monoclonal antibody against a major ginseng component, ginsenoside Rg1 and its characterization. **Cytotechnology**. 34(3):197-204.
- Galfrè G, Milstein C. (1981). Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. **Methods Enzymol.** 73(Pt B):3-46.
- Geoffrey CK, Elaine AP, Monique SJ. (2007). Simmonds Chromatographic behaviour of steroidal saponins studied by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr. A.** 1148: 177-183
- Goding JW. (1980). Antibody production by hybridomas. **J. Immunol. Methods.** 39(4):285-308.

- Gupta YK, Veerendra Kumar MH, Srivastava AK. (2003). Effect of *Centella asiatica* on pentylenetetrazole-induced kindling, cognition and oxidative stress in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 74(3):579-85.
- Hargono D, Lastari P, Astusi Y and van den Bergh MH. (1999). *Centella asiatica* (L.) Urb. In: de Padua LS, Bunyapraphatsara N and Lemmens RHMJ. (Editors): Plant Resources of South-East Asia No 12(1). **Medicinal and poisonous plants**. Buckhuys Publisher, Leiden, the Netherlands. pp. 191-4.
- Huang YH, Zhang SH, Zhen RX, Xu XD and Zhen YS. (2004). Asiaticoside inducing apoptosis of tumor cells and enhancing anti-tumor activity of vincristine. **AiZheng.** 23:1599-1604.
- Jayashree G, Kurup Muraleedhara G, Sudarslal S, Jacob VB. (2003). Anti-oxidant activity of *Centella asiatica* on lymphoma-bearing mice. **Fitoterapia.** 74(5):431-4.
- Jayathirtha MG, Mishra SH. (2004). Preliminary immunomodulatory activities of methanol extracts of *Eclipta alba* and *Centella asiatica*. **Phytomedicine.** 11(4):361-5.
- Jian P, Guiqing K, Chuanxun Y, Beibei Z, Risheng J, Yuan Y. (2007). Separation and Determination of Madecassic Acid in Extracts of *Centella asiatica* Using High Performance Liquid Chromatography with β -Cyclodextrin as Mobile Phase Additive. **Chin. J. Chromatogr.** 25(3): 316–318.
- Kido K, Edakuni K, Morinaga O, Tanaka H, Shoyama Y. (2008a). An enzyme-linked immunosorbent assay for aconitine-type alkaloids using an anti-aconitine monoclonal antibody. **Anal. Chim. Acta.** 616(1):109-114.
- Kido K, Morinaga O, Shoyama Y, Tanaka H. (2008b). Quick analysis of baicalin in *Scutellariae Radix* by enzyme-linked immunosorbent assay using a monoclonal antibody. **Talanta.** 77(1):346-350.
- Kim J, Tanaka H, Shoyama Y. (2004a). Immunoquantitative analysis for berberine and its related compounds using monoclonal antibodies in herbal medicines. **Analyst.** 129(1):87-91.
- Kim J, Tanaka H, Yuan C, Shoyama Y. (2004b). Development of monoclonal antibody against isoquinoline alkaloid coptisine and its application for the screening of medicinal plants. **Cytotechnology.** 44(3):115-123.
- Kuppurajan K, Srinivasan K, Janaki K. (1978). A double blind study of the effect of Mandookaparni on the general mental ability of normal children. **J. Res. Ind. Med. Yoga Homoeo.** 13: 37–41.
- Lee J, Jung E, Kim Y, Park J, Park J, Hong S, Kim J, Hyun C, Kim YS, Park D. (2006). Asiaticoside induces human collagen I synthesis through TGFbeta receptor I kinase (TbetaRI kinase)-independent Smad signaling. **Planta Med.** 72(4):324-8.

- Lee MK, Kim SR, Sung SH, Lim D, Kim H, Choi H, Park HK, Je S, Ki YC. (2000). Asiatic acid derivatives protect cultured cortical neurons from glutamate-induced excitotoxicity. **Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.** 108(1-2):75-86.
- Leung X and Foster S. (1998). **Encyclopedia of common natural ingredients: Used in food, drugs, and cosmetic.** 2nd ed. New York: John Wiley & Sons.
- Liang X, Yan NH, Si WC, Wen JW, Xu N, Cui S, Liu XH, Zhang H, Yue Nan Liu, Liu S, Yang M, Dong Y. (2008). Antidepressant-like effect of asiaticoside in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 89(3): 444-9.
- Lounggratana P, Tanaka H, Shoyama Y. (2004). Production of monoclonal antibody against ginkgolic acids in *Ginkgo biloba* Linn. **Am. J. Chin. Med.** 32(1):33-48.
- Lu L, Ying K, Wei S, Fang Y, Liu Y, Lin H, Ma L, Mao Y. (2004). Asiaticoside induction for cell-cycle progression, proliferation and collagen synthesis in human dermal fibroblasts. **Int. J. Dermatol.** 43(11):801-7.
- Lu Z, Morinaga O, Tanaka H, Shoyama Y. (2003). A quantitative ELISA using monoclonal antibody to survey paeoniflorin and albiflorin in crude drugs and traditional Chinese herbal medicines. **Biol. Pharm. Bull.** 26(6):862-866.
- Morinaga O, Fujino A, Tanaka H, Shoyama Y. (2005). An on-membrane quantitative analysis system for glycyrrhizin in licorice roots and traditional Chinese medicines. **Anal. Bioanal. Chem.** 383(4):668-672.
- Morinaga O, Nakajima S, Tanaka H, Shoyama Y. (2000). Production of monoclonal antibodies against a major purgative component, sennoside A, their characterization and use in ELISA. **Analyst.** 125: 1109-13.
- Morinaga O, Uto T, Sakamoto S, et al. (2009a). Development of eastern blotting technique for sennoside A and sennoside B using anti-sennoside A and anti-sennoside B monoclonal antibodies. **Phytochem. Anal.** 20(2):154-8.
- Morinaga O, Uto T, Sakamoto S, Tanaka H, Shoyama Y. (2009b). Enzyme-linked immunosorbent assay for total sennosides using anti-sennoside A and anti-sennoside B monoclonal antibodies. **Fitoterapia.** 80(1):28-31.
- Morinaga O, Uto T, Yuan CS, Tanaka H, Shoyama Y. (2010). Evaluation of a new eastern blotting technique for the analysis of ginsenoside Re in American ginseng berry pulp extracts. **Fitoterapia.** 81(4):284-288.
- Morinaga O, Zhu S, Tanaka H, Shoyama Y. (2006b). Visual detection of saikosaponins by on-membrane immunoassay and estimation of traditional Chinese medicines containing Bupleuri radix. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 346(3):687-692.
- Morinaga O., Nakajima S., Tanaka H., Shoyama Y. (2001). Production of monoclonal antibodies against a major purgative component, sennoside B, their characterization and use in ELISA, **Analyst.** 126(8):1372-6.

- Nah JJ, Song JY, Choi S, et al. (2000). Preparation of monoclonal antibody against ginsenoside Rf and its enzyme immunoassay. **Biol. Pharm. Bull.** 23(5):523-6.
- Nganlasom J, Suttitum T, Jirakulsomchok D, Puapairoj A. (2008). Effects of *Centella asiatica* Linn. Leaves and *Garciana mangostana* Linn. Hull on the healing of dermal wounds in diabetic rats. **Srinagarind Med. J.** 23(4): 402-407.
- Nowwarote N, Osathanon T, Jitjaturunt P, Manopattanasoontorn S, Pavasant P. (2012). Asiaticoside Induces Type I Collagen Synthesis and Osteogenic Differentiation in Human Periodontal Ligament Cells. **Phytother Res.** doi: 10.1002/ptr.4742.
- Paolino D, Cosco D, Cilurzo F, Trapasso E, Morittu VM, Celia C, Fresta M. (2012). Improved in vitro and in vivo collagen biosynthesis by asiaticoside-loaded ultradeformable vesicles. **J. Control Release.** 162(1):143-51
- Park BC, Bosire KO, Lee ES, Lee YS, Kim JA. (2005). Asiatic acid induces apoptosis in SK-MEL-2 human melanoma cells. **Cancer Lett.** 218(1):81-90.
- Park BC, Paek SH, Lee YS, Kim SJ, Lee ES, Choi HG, Yong CS, Kim JA. (2007). Inhibitory effects of asiatic acid on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene and 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate-induced tumor promotion in mice. **Biol. Pharm. Bull.** 30(1):176-9.
- Phrompittayarat W, Putalun W, Tanaka H, Jetiyanon K, Wittaya-Areekul S, Ingkaninan K. (2007). Determination of pseudojujubogenin glycosides from Brahmi based on immunoassay using a monoclonal antibody against bacopaside I. **Phytochem. Anal.** 18(5):411-418.
- Phrompittayarat W, Putalun W, Tanaka H, Wittaya-areekul S, Jetiyanon K, Ingkaninan K. (2007). Determination of pseudojujubogenin glycosides from Brahmi based on immunoassay using monoclonal antibody against bacopaside I. **Phytochem. Ana.** 18: 411-4
- Plohmann B, Bader G, Streich S, Hilter K, and Franz G. (1994). Immunomodulatory effects of triterpenoid saponins. **Eur. J. Pharm. Sci.** 2: 12-17.
- Prateek KJ and Ram KA. (2008). High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Asiaticoside in *Centella asiatica* (L.) Urban. **Chiang Mai J. Sci.** 35(3): 521-525
- Punturee K, Wild CP, Kasinrerker W, Vinitketkumnuen U. (2005). Immunomodulatory activities of *Centella asiatica* and *Rhinacanthus nasutus* extracts. **Asian Pac. J. Cancer Prev.** 6(3):396-400.
- Putalun W, Fukuda N, Tanaka H, Shoyama Y. (2004a). A one-step immunochromatographic assay for detecting ginsenosides Rb1 and Rg1. **Anal. Bioanal. Chem.** 378(5):1338-1341.
- Putalun W, Morinaga O, Tanaka H, Shoyama Y. (2004b). Development of a one-step immunochromatographic strip test for the detection of sennosides A and B. **Phytochem. Anal.** 15(2):112-116.

- Putalun W, Tanaka H, Shoyama Y. (1999). Rapid separation of solasodine glycosides by an immunoaffinity column using anti-solamargine monoclonal antibody. *Cytotechnology*. 31(1-2):153-158.
- Putalun W, Tanaka H, Shoyama Y. (2005). Rapid detection of glycyrrhizin by immunochromatographic assay. *Phytochem. Anal.* 16(5):370-4.
- Putalun W, Tanaka H, Yahara S, Lhieochaiphon S, Shoyama Y. (2000). Survey of solasodine-type glycoalkaloids by western blotting and ELISA using anti-solamargine monoclonal antibody. *Biol. Pharm. Bull.* 23(1):72-5.
- Rao SB, Chetana M, Uma DP. (2005). *Centella asiatica* treatment during postnatal period enhanced learning and memory in mice. *Physiol. & Behav.* 86(4): 449-457.
- Sahu NP, Roy SK, Mahato SB. (1989). Spectroscopic determination of structures of triterpenoid trisaccharides from *Centella asiatica*. *Phytochemistry*. 28: 2852–2854.
- Sakamoto S, Putalun W, Tsuchihashi R, Morimoto S, Kinjo J, Tanaka H. (2008). Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using highly-specific monoclonal antibodies against plumbagin. *Anal. Chim. Acta.* 607(1):100-105.
- Salout A. (2003). Effect of Asiaticoside on cognitive deficits induced by β -amyloid protein in mice. (Thesis) Graduate School, Chulalongkorn University, Bangkok.
- Shan SJ, Tanaka H, Shoyama Y. (2001). Enzyme-linked immunosorbent assay for glycyrrhizin using anti-glycyrrhizin monoclonal antibody and an eastern blotting technique for glucuronides of glycyrrhetic acid. *Anal. Chem.* 73(24):5784-5790.
- Shoyama Y, Fukada T, Murakami H. (1996). Production of monoclonal antibodies and ELISA for thebaine and codeine. *Cytotechnology*. 19: 55-61.
- Shukla A, Rasik AM, Jain GK, Shankar R, Kulshrestha DK, Dhawan BN. (1999). In vitro and in vivo wound healing activity of asiaticoside isolated from *Centella asiatica*. *J. Ethnopharmacol.* 65(1): 1-11.
- Singh B, Tyagi A, De J, Agrawal S. (2005). HPTLC determination of asiaticoside in *Centella asiatica*. *Indian Drugs*. 42(2): 87-89.
- Soumyanath A, Zhong YP, Gold SA, Yu X, Koop DR, Bourdette D, Gold BG. (2005). *Centella asiatica* accelerates nerve regeneration upon oral administration and contains multiple active fractions increasing neurite elongation in-vitro. *J Pharm. Pharmacol.* 57(9):1221-9.
- Soumyanath A, Zhong YP, Henson E, Wadsworth T, Bishop J, Gold BG, Quinn JF. (2012). *Centella asiatica* Extract Improves Behavioral Deficits in a Mouse Model of Alzheimer's Disease: Investigation of a Possible Mechanism of Action. *Int. J. Alzheimers Dis.* doi: 10.1155/2012/381974.

- Sritularak B, Morinaga O, Yuan CS, Shoyama Y, Tanaka H. (2009). Quantitative analysis of ginsenosides Rb1, Rg1, and Re in American ginseng berry and flower samples by ELISA using monoclonal antibodies. *J. Nat. Med.* 63(3):360-3.
- Subathra M, Shila S, Devi MA, Panneerselvam C. (2005). Emerging role of *Centella asiatica* in improving age-related neurological antioxidant status. *Exp. Gerontol.* 40: 707–715.
- Suguna L, Sivakumar P, Chandrakasan G. (1996). Effect of *Centella asiatica* extract on dermal wound healing in rats. *Ind. J. Exp. Biol.* 34: 1208–1211.
- Sunikumar SP and Shivakumar HG. (1998). Evaluation of tropical formulations of aqueous extract of *Centella asiatica* on open wound in rats. *Ind. J. Exp. Biol.* 36: 569–572.
- Supawantanakul S. (2003). Effects of asiaticoside on low potassium medium induced cell death in cultured rat cerebellar granule neurons. (Thesis) Graduate School, Chulalongkorn University, Bangkok.
- Tanaka H, Putalun W, De-Eknamkul W, Matangkasombut O, Shoyama Y. (2007b). Preparation of a novel monoclonal antibody against the antimalarial drugs, artemisinin and artesunate. *Planta Med.* 73(10):1127-1132.
- Tanaka H, Putalun W, Tsuzaki C, Shoyama Y. (1997). A simple determination of steroidal alkaloid glycosides by thin-layer chromatography immunostaining using monoclonal antibody against solamargine. *FEBS Lett.* 404(2-3):279-82.
- Tanaka H, Shoyama Y. (1999). Monoclonal antibody against tetrahydrocannabinolic acid distinguishes *Cannabis sativa* samples from different plant species. *Forensic Sci. Int.* 106(3):135-46.
- Tanaka H, Shoyama Y. (1998). Formation of a monoclonal antibody against glycyrrhizin and development of an ELISA. *Biol. Pharm. Bull.* 21(12):1391-3.
- Tang B, Zhu B, Liang Y, Bi L, Hu Z, Chen B, Zhang K, Zhu J. (2011). Asiaticoside suppresses collagen expression and TGF- β /Smad signaling through inducing Smad7 and inhibiting TGF- β RI and TGF- β RII in keloid fibroblasts. *Arch Dermatol. Res.* 303(8):563-72.
- Tian M, Tanaka H, Shang M, et al. (2008). Production, characterization of a monoclonal antibody against aristolochic acid-II and development of its assay system. *Am. J. Chin. Med.* 36(2):425-36.
- Tothiam C, Phrompittayarat W, Putalun W, et al. (2011). An enzyme-linked immunosorbant assay using monoclonal antibody against bacoside A(3) for determination of jujubogenin glycosides in *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. *Phytochem. Anal.* 22(5):385-91.
- Veerendra Kumar MH, Gupta YK. (2002). Effect of different extracts of *Centella asiatica* on cognition and markers of oxidative stress in rats. *J. Ethnopharmacol.* 79(2):253-60.

- Veerendra Kumar MH, Gupta YK. (2003). Effect of *Centella asiatica* on cognition and oxidative stress in an intracerebroventricular streptozotocin model of Alzheimer's disease in rats. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.** 30(5-6):336-42.
- Wattanathorn J, Mator L, Muchimapura S, Tongun T, Pasuriwong O, Piyawatkul N. et al. (2008). Positive modulation of cognition and mood in the healthy elderly volunteer following the administration of *Centella asiatica*. **J. Ethnopharmacol.** 166(2): 325-332.
- Wijeweera P, Arnason JT, Koszycki D, Merali Z. (2006). Evaluation of anxiolytic properties of Gotukola -(*Centella asiatica*) extracts and asiaticoside in rat behavioral models. **Phytomedicine.** 13: 668-676.
- Xu J, Tanaka H, Shoyama Y. (2007). One-step immunochromatographic separation and ELISA quantification of glycyrrhizin from traditional Chinese medicines. **J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.** 850(1-2):53-8.
- Xu MF, Xiong YY, Liu JK, Qian JJ, Zhu L, Gao J. (2012). Asiatic acid, a pentacyclic triterpene in *Centella asiatica*, attenuates glutamate-induced cognitive deficits in mice and apoptosis in SH-SY5Y cells. **Acta Pharmacol. Sin.** 33(5):578-87.
- Xu Y, Cao Z, Khan I, Luo Y. (2008). Gotu Kola (*Centella Asiatica*) extract enhances phosphorylation of cyclic AMP response element binding protein in neuroblastoma cells expressing amyloid beta peptide. **J. Alzheimers Dis.** 13(3):341-9.
- Xuan L, Tanaka H, Xu Y, Shoyama Y. (1999). Preparation of monoclonal antibody against crocin and its characterization. **Cytotechnology.** 29(1):65-70.
- Yanagihara H, Sakata R, Shoyama Y, Murakami H. (1996). Rapid analysis of small samples containing forskolin using monoclonal antibodies. **Planta Med.** 62:169-172.
- Yoshida M, Fuchigami M, Nagao T, Okabe H, Matsunaga K, Takata J, Karube Y, Tsuchihashi R, Kinjo J, Mihashi K, Fujioka T. (2005). Antiproliferative constituents from Umbelliferae plants VII. Active triterpenes and rosmarinic acid from *Centella asiatica*. **Biol. Pharm. Bull.** 28(1):173-5.
- Zhu S, Shimokawa S, Tanaka H, Shoyama Y. (2004). Development of an assay system for saikosaponin a using anti-saikosaponin a monoclonal antibodies. **Biol. Pharm. Bull.** 27(1):66-71.
- ทวีศักดิ์ จีงวัฒนตระกูล (2554) การประยุกต์ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีและชิ้นส่วนแปรผันสายเดี่ยวในงานเภสัชเวท. วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน. 7(3): 1-13.
- สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (2550) สมุนไพรน่ารู้ (3) บัวบก, 151 หน้า.

ผลงานวิจัยเผยแพร่

1. Sritularak B, Juengwatanatrakul T, Putalun W, Tanaka H, Morimoto S. Rapid detection of asiaticoside by immunochromatographic assay. PHYTOPHARM 2012. 2012. St-Petersburg, Russia. (Poster Presentation)

ภาคผนวก

RAPID DETECTION OF ASIATICOSIDE BY IMMUNOCHROMATOGRAPHIC ASSAY

© **Sritularak B.¹, Juengwatanatrakul T.², Putalun W.³, Tanaka H.⁴, Morimoto S.⁴**

¹Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

²Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, 34190, Thailand

³Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

⁴Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan

Asiaticoside (AS), [6-[[[3,4-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)-5-(3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl)oxyoxan-2-yl]oxymethyl]-3,4,5-trihydroxyoxan-2-yl] 10,11-dihydroxy-9-(hydroxymethyl)-1,2,6a,6b,9,12a-hexamethyl-2,3,4,5,6,6a,7,8,8a,10,11,12,13,14b-tetradecahydro-1H-picene-4a-carboxylate, has been identified as the most active compound in *Centella asiatica* (L.) urb. In order to screen large numbers of samples for the presence of AS, a rapid and simple technique is required for application to small quantities of test samples. Immunoassays using monoclonal antibodies could be useful for the determination of small quantities of AS in plant extracts (1). In this study, an immunochromatographic strip test has been developed for the detection of AS in plant samples using monoclonal antibody against AS (2). The qualitative assay was based on a competitive immunoassay in which the detector re-

agent consisted of colloidal gold particles coated with the respective AS antibodies. The capture reagent was an AS-human serum albumin (HSA) conjugate immobilized onto a test strip membrane. The sample containing AS and the detection reagent were incubated with the immobilized capture reagent. The AS in the sample competed in binding to the limited amount of antibodies in the detection reagent with the immobilized AS-HSA conjugates and, hence, positive samples showed no color in the capture spot zone. The detection limit for the strip test was 12.5 µg/mL. The immunochromatographic strip test is useful as a rapid and simple screening method for the determination of small quantities of AS in plant extracts, body fluids and foods.

References: (1) Juengwatanatrakul T (2011) Analyst 136:1013-17. (2) Sritularak B (2012) J Nat Med 66:279-83.

THROMBOLYTIC PROPERTIES OF MEDICAL LEECH EXTRACT

© **Antipov A., Kamenev O.**

Hiruline laboratory, Ltd, Saint-Petersburg, Russia. E-mail: info@hiruline.ru

The purpose of this study was to determine the thrombolytic activity of the extract of bred medical leeches and to compare it with modern thrombolytic substances. The following in vitro model was used: the clots were made from 100 µl of rat blood drops. The clot formation time (CFT) was 1, 2, 4, 6 or 12 hours respectively. Every clot was placed in a cuvette of the spectrophotometer "Specord M-40" (Germany) with plasma at 37 °C (pH 7.4). The leech extract or one of the thrombolytic substances: Streptokinase, Urokinase (uPA), Alteplase (rt-PA), Lanoteplase (n-PA), were added at equal concentration of 1 mg/ml. The content of cuvette was constantly stirred. The degree of clot lysis was measured by the hemoglobin concentration in plasma at 560 nm with a help of the calibration curve. The measurements were made in 10 minutes. 0.5,

1.0 1.5, 3, 6, 9, 12 and 24 hours after adding of test substance. Each series for each CFT had 7 experiments for each substance. A control experiment with 1 hour clots was made without any substance. It showed that the hemoglobin is not released from the clot by itself. Statistical analysis was performed using STATISTICAL 6 software (Statsoft Inc.). The results of the research showed that thrombolytic substances were more effective than leech extract during the 1 hour for 1 and 1.5 hour for 2 hour clots. After 3 hours the extract had a stronger thrombolytic effect for 1 hour clots. The advantages of leech extract were more expressed for 4-, 6- and 12 hour clots. The study demonstrates the presence and efficiency of thrombolytic activity of the extract of bred medical leeches. A thrombolytic agent of a new type can be created.

ประวัติหัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ นายทวีศักดิ์ นามสกุล จิ๊งวัฒนตระกูล
 Name : Mr. Thaweesak Last name : Juengwatanatrakul
 ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์
 หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์ และโทรสาร
 คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อำเภอวารินชำราบ
 จังหวัดอุบลราชธานี 34190
 โทรศัพท์ 045-353670, 045-353671 โทรสาร 045-353626
 email thaweesakj@gmail.com

ประวัติการศึกษา

ปีที่สำเร็จการศึกษา	ระดับการศึกษา	อักษรย่อปริญญา	สาขา	สถาบันการศึกษา	ประเทศ
2550	เอก	Ph.D.	เภสัชศาสตร์ (Pharmaceutical Sciences)	มหาวิทยาลัยคิวชู (Kyushu University)	ญี่ปุ่น
2544	โท	ภ.ม.	เภสัชเวท (Pharmacognosy)	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Chulalongkorn University)	ไทย
2542	ตรี	ภ.บ.	เภสัชศาสตร์ (Pharmaceutical Sciences)	มหาวิทยาลัยขอนแก่น (Khon Kaen University)	ไทย

สาขาที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)

1. Purification and structure elucidation of bioactive compounds from medicinal plants of medicinal plants.
2. Biological activity screening of medicinal plants including antioxidant, cytotoxic activity.
3. Plant tissue culture and plant biotechnology of medicinal plants.
4. Production of monoclonal antibody and single chain Fv against naturally bioactive compounds and their application use for quantitative analysis and transgenic plants.

ผลงานวิจัยตีพิมพ์

1. Waraporn Putalun, Orapin Udomsin, Gorawit Yusakul, Seiichi Sakamoto, Thaweesak Juengwatanatrakul, Hiroyuki Tanaka. 2010. Enhanced plumbagin production from in vitro cultures of *Drosera burmanii* using elicitation. *Biotechnology Letters*, 32(5): 721-726.
2. Pongkitwitoon B, Sakamoto S, Morinaga O, Juengwatanatrakul T, Shoyama Y, Tanaka H, Morimoto S. 2010. Single-chain variable fragment antibody against ginsenoside Re as an effective tool for the determination of ginsenosides in various ginsengs. *Journal of Natural Medicine*. 65(1): 24-30.
3. Yusakul G, Putalun W, Udomsin O, Juengwatanatrakul T, Chaichantipyuth C. 2011. Comparative analysis of the chemical constituents of two varieties of *Pueraria candollei*. *Fitoterapia*. 82(2): 203-207.
4. Juengwatanatrakul T, Sritularak B, Amornnopparattanakul P, Tassanawat P, Putalun W, Tanaka H, Morimoto S. 2011. Preparation of a specific monoclonal antibody to asiaticoside for the development of an enzyme-linked immunosorbent assay. *Analyst*. 136(5): 1013-1017.
5. Juengwatanatrakul T, Sakamoto S, Tanaka H, Putalun W. 2011. Elicitation effect on production of plumbagin in *in vitro* culture of *Drosera indica* L. *J. Med. Plants Res*. 5(19): 4949-4953.
6. Sakamoto S, Putalun W, Pongkitwitoon B, Juengwatanatrakul T, Shoyama Y, Tanaka H, Morimoto S. 2011. Modulation of plumbagin production in *Plumbago zeylanica* using a single-chain variable fragment antibody against plumbagin. *Plant Cell Rep*. 31(1): 103-110.
7. Udomsuk L, Juengwatanatrakul T, Putalun W, Jarukamjorn K. 2012. Down regulation of gene related sex hormone synthesis pathway in mouse testes by miroestrol and deoxymiroestrol. *Fitoterapia*. 82(8): 1185-1189.
8. Udomsuk L, Juengwatanatrakul T, Putalun W, Jarukamjorn K. 2012. Bimodal action of miroestrol and deoxymiroestrol, phytoestrogens from *Pueraria candollei* var. *mirifica*, on hepatic CYP2B9 and CYP1A2 expressions and antilipid peroxidation in mice. *Nutr Res*. 32(1): 45-51.
9. Sritularak B, Juengwatanatrakul T, Putalun W, Tanaka H, Morimoto S. 2012. A rapid one-step immunochromatographic assay for the detection of asiaticoside. *J. Nat. Med*. 66(2): 279-283.
10. Latiporn Udomsuk, Thaweesak Juengwatanatrakul, Kanokwan Jarukamjorn and Waraporn Putalun. 2012. Increased miroestrol, deoxymiroestrol and isoflavonoid accumulation in callus and cell suspension cultures of *Pueraria candollei* var. *mirifica*. *Acta Physiol Plant*. 34(3):1093-1100.
11. Paudel MK, Takei A, Sakoda J, Juengwatanatrakul T, Sasaki-Tabata K, Putalun W, Shoyama Y, Tanaka H, Morimoto S. 2012. Preparation of a Single-Chain Variable Fragment

and a Recombinant Antigen-Binding Fragment against the Anti-Malarial Drugs, Artemisinin and Artesunate, and their Application in an ELISA. *Anal Chem.* 84: 2002-2008.

12. Udomsuk L, Juengwatanatrakul T, Putalun W, Jarukamjorn K. 2012. Suppression of BSEP and MRP2 in mouse liver by miroestrol and deoxymiroestrol isolated from *Pueraria candollei*. *Phytomedicine.* 19(14):1332-5.

13. Patcharin Tassanawat, Waraporn Putalun, Jukrapun Komaikul, Boonchoo Sritularak, Thaweesak Juengwatanatrakul, Hiroyuki Tanaka. 2012. Development of Anti-Asiaticoside Polyclonal Antibody-Based Immunoassay and Applications for *Centella asiatica* Products and Human Serum. *Food Anal Methods.* [In Press] DOI: 10.1007/s12161-012-9380-z

14. Tassanawat P, Putalun W, Yusakul G, Sritularak B, Juengwatanatrakul T, Tanaka H. 2012. Production of Polyclonal Antibody Against Madecassoside and Development of Immunoassay Methods for Analysis of Triterpene Glycosides in *Centella asiatica*. *Phytochem Anal.* [In Press] DOI: 10.1002/pca.2406

บทความวิชาการ

1. ทวีศักดิ์ จิวงวัฒนตระกูล (2554) การประยุกต์ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีและชิ้นส่วนแปรผันสายเดี่ยวในงานเภสัชเวช. *วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน.* 7(3): 1-13.

2. Hiroyuki Tanaka, Madan K. Paudel, Ayako Takei, Junichi Sakoda, Thaweesak Juengwatanatrakul, Kaori Sasaki-Tabata, Waraporn Putalun, Wanchai De-Eknamkul, Oraphan Matangkasombut, Yukihiro Shoyama and Satoshi Morimoto. 2012. Immunochemical Analysis of the Antimalarial Drugs Artemisinin and Artesunate. *Antibodies.* 1(3):273-283.

การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

1. Thaweesak Juengwatanatrakul, Osamu Morinaga, Hiroyuki Tanaka, Yukihiro Shoyama. Production of Single Chain Fv Fragment against Sennoside A. The 51th Annual Meeting of the Japanese Society of Pharmacognosy. 2004. Kobe, Japan.

2. Yukihiro Shoyama, Osamu Morinaga, Waraporn Putalun, Thaweesak Juengwatanatrakul, Hiroyuki Tanaka. New strategy for the analysis of traditional Chinese medicine using monoclonal antibodies. The 2nd Sino-Thai International Conference 2007. Khon Kaen, Thailand.

3. Naratip Udomchawee, Pacharapong Chomthong, Tawin Thianwan, Zongporn Jungmunkong, Thaweesak Juengwatanatrakul. Production of 9-hydroxycanthin-6-one from root culture of *Eurycoma longifolia* and *E. hamandiana*. The 2nd Annual International Conference of Northeast Pharmacy Research. 2010. Mahasarakham, Thailand.

4. Pawita Tupcheen, Kawalin Raksasorn, Maytaya Rangubpan, Thaweesak Juengwatanatrakul. Production of plumbagin from in vitro *Drosera indica*. The 2nd Annual International Conference of Northeast Pharmacy Research. 2010. Mahasarakham, Thailand.
5. Waraporn Putalun, Orapin Udomsin, Gorawit Yusakul, Seiichi Sakamoto, Thaweesak Juengwatanatrakul, Hiroyuki Tanaka. Enhanced plumbagin production from in vitro cultures of *Drosera burmanii* using elicitation. The 1st Current Drug Development International Conference (1st CDD). 2010. Phuket, Thailand.
6. Thaweesak Juengwatanatrakul, Patcharapong Chomthong, Gorawit Yusakul, Zongporn Jungmunkong, Tripetch Karnchanapoom, Waraporn Putalun. Methyl Jasmonate Enhanced 9-hydroxycanthin-6-one Production in Root Culture of *Eurycoma longifolia* and *E. harmandiana*. The 1st Current Drug Development International Conference (1st CDD). 2010. Phuket, Thailand.
7. Thaweesak Juengwatanatrakul, Seiichi Sakamoto, Hiroyuki Tanaka, Waraporn Putalun. Enhanced Plumbagin Production from in vitro cultures of *Drosera indica* L. by Elicitation. The 1st Current Drug Development International Conference (1st CDD). 2010. Phuket, Thailand.
8. Waraporn Putalun, Orapin Udomsin, Gorawit Yusakul, Seiichi Sakamoto, Thaweesak Juengwatanatrakul, Hiroyuki Tanaka. Enhanced plumbagin production from in vitro cultures of *Drosera burmanii* using elicitation. The 1st Current Drug Development International Conference (1st CDD). 2010. Phuket, Thailand.
9. Latiporn Udomsuk, Thaweesak Juengwatanatrakul, Waraporn Putalun, Kanokwan Jarukamjorn. Modulation of genes related-sex hormone synthesis pathway in mouse testes by miroestrol. The 4th Sino-Thai International Conference 2010. Khon Kaen, Thailand.
10. Patcharin Tassanawat, Jukrapun Komaikul, Boonchoo Sritularak, Thaweesak Juengwatanatrakul, Hiroyuki Tanaka, Waraporn Putalun. Production and characterization of polyclonal antibody against asiaticoside. The 4th Sino-Thai International Conference 2010. Khon Kaen, Thailand.
11. Jintra Kong-im, Daranee Khetchareon, Wannita Wannasut, Rawiwun Kaewamatawong, and Thaweesak Juengwatanatrakul. Antioxidant and antityrosinase activity of *Uvaria siamensis*. The 9th NRCT-JSPS Joint Seminar. 2010. Bangkok, Thailand.
12. Kanokwan Jarukamjorn, Benedikt Giessrigl, Walter Jaeger, Georg Krupitza, Thaweesak Juengwatanatrakul, Waraporn Putalun. Impact of major isoflavonoids from *pueraria candollei* on drug metabolizing enzyme activity in breast cancer cells. The 9th NRCT-JSPS Joint Seminar. 2010. Bangkok, Thailand.
13. Jira Jongcharoenkamol, Anyamanee Supamart, Hiroyuki Tanaka, Waraporn Putalun, Thaweesak Juengwatanatrakul. Sennoside A production in transgenic callus of *Cassia alata*. The 9th NRCT-JSPS Joint Seminar. 2010. Bangkok, Thailand.

14. Thaweesak Juengwatanatrakul, Boonchoo Sritularak, Waraporn Putalun, Hiroyuki Tanaka. Production and characterization of monoclonal antibody against asiaticoside. The 9th NRCT-JSPS Joint Seminar. 2010. Bangkok, Thailand.

15. Patcharin Tassanawat, Gorawit Yusakul, Boonchoo Sritularak, Thaweesak Juengwatanatrakul, Hiroyuki Tanaka, and Waraporn Putalun. Production and characterization of polyclonal antibody against madecassoside. The 9th NRCT-JSPS Joint Seminar. 2010. Bangkok, Thailand.

16. Jira Jongcharoenkamol, Anyamanee Supamart, Hiroyuki Tanaka, Waraporn Putalun, Thaweesak Juengwatanatrakul. Determination of Sennoside A in Transgenic Callus of Genus *Cassia*. The 3rd Annual Northeast Pharmacy Research Conference. 2011. Ubon Ratchathani, Thailand.

17. Jintra Kong-im, Daranee Khetchareon, Wannita Wannasut, Rawiwun Kaewamatawong, Thaweesak Juengwatanatrakul. Antioxidant and antityrosinase activity of *Melodorum siamensis* and *Cyathostema argenteum*. The 3rd Annual Northeast Pharmacy Research Conference. 2011. Ubon Ratchathani, Thailand.

18. Jarukamjorn K, Udomsuk L, Juengwatanatrakul T, Putalun W. Modulation of Hepatic Cytochrome P450s and Lipid Peroxidation by Miroestrol in Mouse. The 4th APISSX2011 "Bridging Drug Research to Regulatory Approval". 2011. National Cheng Kung University (NCKU), Tainan City, China.

19. Udomsuk L, Putalun W, Juengwatanatrakul T, Jarukamjorn K. Biological Activities of Miroestrol and Deoxymiroestrol, Highly Active Phytoestrogens, from *Pueraria candollei* var. *mirifica* in Mouse. The 7th Indochina Conference on Pharmaceutical Sciences "Advancing Pharmacy for Asean Community". 2011. Arnoma Hotel, Bangkok.

20. Tassanawat P, Komaikul J, Sritularak B, Juengwatanatrakul T, Tanaka H, Putalun W. The Application of Polyclonal Antibody against Asiaticoside to Determine Asiaticoside in *Centella asiatica* Products and Serum. AIMECS11_8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium "Frontier of Medicinal Science". 2011. Keio plaza hotel, Tokyo.

21. Juengwatanatrakul T, Sritularak B, Tassanawat P, Putalun W, Tanaka H. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibody against asiaticoside. The 59th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research. 2011. Antalya, Turkey.

22. Atcharaporn Sombatpol, Yardrun Sairam, Zongporn Jungmankong, Waraporn Putalun, Thaweesak Juengwatanatrakul. Factors Affecting the Accumulation of 9-hydroxycanthin-6-one in root cultures of *Eurycoma longifolia* Jack. The 4th Annual Northeast Pharmacy Research Conference of 2012 "Pharmacy Profession in Harmony". 2012. Khon Kean, Thailand.

23. Udomsin O, Juengwatanatrakul T, Putalun W. Effect of elicitors on chromene and total isoflavonoid accumulation in *P. candollei* var. *mirifica* hairy root culture. The 4th

Annual Northeast Pharmacy Research Conference of 2012 “Pharmacy Profession in Harmony”. 2012. Khon Kean, Thailand.

24.Udomsuk L, Putalun W, **Juengwatanatrakul T**, Jarukamjorn K. Biological evaluation of deoxymiroestrol, a potent phytoestrogen from *Pueraria candollei* var. *mirifica*. The 4th Annual Northeast Pharmacy Research Conference of 2012 “Pharmacy Profession in Harmony”. 2012. Khon Kean, Thailand.

25.จันทร์เพ็ญ อินทรประเสริฐ, ทวีศักดิ์ จิงวัฒนตระกูล, ประมุข เพ็ญสุด, ฉัตรทอง เจือจันทร์ และ ศันสนีย์ ชวนะกุล. ภูมิปัญญาพื้นบ้านกับการใช้ประโยชน์พืชสมุนไพร บริเวณแนวป่าพนมดงรัก-ผาแต้ม. การบริหารจัดการความหลากหลายทางชีวภาพแห่งชาติ ครั้งที่ 1 “วิจัยทรัพยากรชีวภาพ เพื่อพัฒนาชุมชนและระบบนิเวศ”. 2555. กรุงเทพฯ.

26.Sritularak B, **Juengwatanatrakul T**, Putalun W, Tanaka H, Morimoto S. Rapid detection of asiaticoside by immunochromatographic assay. PHYTOPHARM 2012. 2012. St-Petersburg, Russia.

27.Putalun W, Tassanawat P, Yusakul G, Sritularak B, **Juengwatanatrakul T**, Tanaka H production of anti-madecassoside polyclonal antibody and its application for quality control of *Centella asiatica*. PHYTOPHARM 2012. 2012. St-Petersburg, Russia.

