

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ



E47262



DETERMINATION OF PSEUDOJUBOGENIN  
GLYCOSIDES USING IMMUNOLOGICAL  
ASSAY

MISS NATNAPA IMSUNGNOEN

A THESIS FOR THE DEGREE OF MASTER OF PHARMACY  
KHON KAEN UNIVERSITY

2010



600251109

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ



# **DETERMINATION OF PSEUDOJUJUBOGENIN GLYCOSIDES USING IMMUNOLOGICAL ASSAY**



**MISS NATNAPA IMSUNGNOEN**

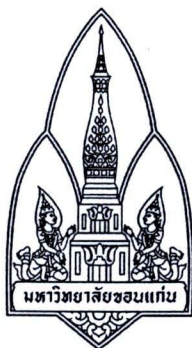
**A THESIS FOR THE DEGREE OF MASTER OF PHARMACY  
KHON KAEN UNIVERSITY**

**2010**

**DETERMINATION OF PSEUDOJUBOGENIN  
GLYCOSIDES USING IMMUNOLOGICAL  
ASSAY**

**MISS NATNAPA IMSUNGNOEN**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE  
REQUIREMENTS  
FOR THE DEGREE OF MASTER OF PHARMACY  
IN PHARMACEUTICAL SCIENCES  
GRADUATE SCHOOL KHON KAEN UNIVERSITY  
2010**



**THESIS APPROVAL**  
**KHON KAEN UNIVERSITY**  
**FOR**  
**MASTER OF PHARMACY**  
**IN PHARMACEUTICAL SCIENCES**


**Thesis Title:** Determination of pseudojupogenin glycosides using immunological assay


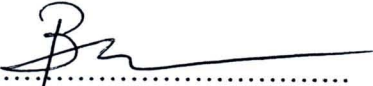
**Author:** Miss Natnapa Imsungnoen

**Thesis Examination Committee**

Asst.Prof. Dr. Srisomporn Preeprame	Chairperson
Assoc.Prof. Dr. Waraporn Putalun	Member
Dr. Thaweesak Juengwatanatrakul	Member

**Thesis Advisors:**

  
.....  
(Assoc.Prof. Dr. Waraporn Putalun)      Advisor

 ..... (Assoc.Prof. Dr. Lampang Manmart) Dean, Graduate School	 ..... (Assoc.Prof. Dr. Bung-orn Sripanidkulchai) Dean, Faculty of Pharmaceutical Sciences
--	---

เนตรนภา อิ่มสูงเนิน. 2553. การตรวจสอบสารซูโดจูโบจินินกลัยโคไซด์ด้วยเทคนิค  
วิเคราะห์ทางอิมมูโนโลยี. วิทยานิพนธ์ปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา  
เภสัชภัณฑ์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: รศ.ดร.วราภรณ์ ภูตะลุน

### บทคัดย่อ

E 47262

สารซูโดจูโบจินินกลัยโคไซด์เป็นสารสำคัญที่พบในพืชสมุนไพร ซึ่งมี การนำสมุนไพรชนิดนี้มาใช้เป็นยาและอาหารเสริมมากขึ้น ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องตรวจสอบสารสำคัญทั้งด้านคุณภาพและปริมาณ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการพัฒนาวิธีการตรวจสอบสารซูโดจูโบจินินกลัยโคไซด์ โดยสารกลุ่มซาโปนินกลัยโคไซด์ในต้นพรมมิแบ่งเป็น 2 ชนิด คือ ซูโดจูโบจินินกลัยโคไซด์ และจูโบจินินกลัยโคไซด์ ซึ่งได้มีการศึกษาและรายงานแล้วว่าเป็นสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา จากการศึกษาการหาปริมาณสารกลุ่มซูโดจูโบจินินกลัยโคไซด์โดยวิธีอีไลซา (ELISA) โดยใช้หลักการทำปฏิกิริยากันอย่างจำเพาะของแอนติเจนและแอนติบอดี ซึ่งมีความไวในการวิเคราะห์สูง โดยใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อสารกลุ่มซูโดจูโบจินินกลัยโคไซด์ ดังนั้นปริมาณสารที่ได้จากการวิเคราะห์จะถูกรายงานเป็นปริมาณสารซูโดจูโบจินินกลัยโคไซด์ทั้งหมด ดังนั้น การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารซูโดจูโบจินินกลัยโคไซด์ โดยหลักการของแอนติเจน-แอนติบอดี หรือเรียกว่าเทคนิควิเคราะห์ทางอิมมูโนโลยี ซึ่งมีความจำเพาะและความไวมากขึ้น การพัฒนาชุดทดสอบสารซูโดจูโบจินินกลัยโคไซด์ถูกประยุกต์ขึ้นเพื่อเป็นการคัดกรองเบื้องต้น เนื่องจากใช้สารตัวอย่างปริมาณน้อยและมีความรวดเร็วในการตรวจสอบใช้เวลาเพียง 10-15 นาที และพบว่า ชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถเก็บไว้ได้นานถึง 6 เดือนในตู้เย็น โดยปริมาณสารต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ด้วยชุดทดสอบคือ 125 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการพัฒนาวิธี eastern blotting สำหรับใช้ตรวจสอบปริมาณสารซูโดจูโบจินินกลัยโคไซด์แต่ละชนิดที่พบในพืช โดยพบว่า ปริมาณสารต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้คือ 3.125 นาโนกรัม ซึ่งมีความไวในการวิเคราะห์สูง นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารซูโดจูโบจินินกลัยโคไซด์ทั้งหมดที่ได้จากวิธีวิเคราะห์ด้วยวิธีอีไลซา และ eastern blotting แล้วมีค่าใกล้เคียงและสอดคล้องกันคิดเป็น  $R^2=0.972$  ดังนั้น วิธี eastern blotting จึงสามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณทั้งหมดของสารซูโดจูโบจินินกลัยโคไซด์และแต่ละชนิดได้ ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบเหนือวิธีอีไลซา นอกจากนี้ยังพัฒนาวิธีการแยกสารกลุ่มซูโดจูโบจินินกลัยโคไซด์โดยใช้ immunoaffinity column และนำมาทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณด้วยวิธีอีไลซา แต่อย่างไรก็ตามปริมาณสารมาตรฐาน bacopaside I ที่แยกสกัดจากการใช้วิธี immunoaffinity column ได้เพียง 847.07 นาโนกรัม ดังนั้นจึงควรมีการพัฒนาวิธีการแยกสารด้วยวิธีนี้เพิ่มมากขึ้น



Natnapa Imsungnoen. 2010. *Determination of Pseudojубogenin Glycosides Using Immunological Assay*. Master of Pharmacy Thesis in Pharmaceutical Sciences, Graduate School, Khon Kaen University.

**Thesis Advisor:** Assoc. Prof. Dr. Waraporn Putalun

## ABSTRACT

**E 47262**

Pseudojубogenin glycosides are one of the biological compounds in *Bacopa monnieri* extract which was used as the major source of pseudojубogenin glycosides. Due to the fact that herb and herbal product demands are rising, it is necessary to develop the method for analyzed both quality and quantity of these herb and product. The objective of this study is developing method for determination of pseudojубogenin glycosides. Saponin glycosides in *B. monnieri* including jубogenin glycosides and pseudojубogenin glycosides which are difference in aglycone structure. The previous study reported ELISA assay for determination of pseudojубogenin glycosides based on the specific binding of antigen and antibody using anti-bacopaside I antibodies which has cross reactivity to other pseudojубogenin glycosides. Therefore, the result from ELISA was reported as total pseudojубogenin glycosides. In this study, we developed the method based on antigen-antibody reaction called immunological assay that gave high specificity and sensitivity. Immunological assay including immunochromatographic strip, eastern blotting and immunoaffinity column were developed for analyzing of pseudojубogenin glycosides. For screening of pseudojубogenin glycosides, immunochromatographic strip was developed due to the rapid of analyzing using only ten to fifteen minute and small volume of sample. This strip can be used for six months under stored at 2-8°C. The detection limit of immunochromatographic strip is 125 ng.ml<sup>-1</sup>. Eastern blotting was developed for detection the amount of individual pseudojубogenin glycosides. The limit of detection using eastern blotting technique is 3.125 ng. The concentrations of pseudojубogenin glycosides determined by eastern blotting had a good correlation with those determined by ELISA. The coefficient of determination ( $r^2$ ) of 0.972 was obtained. The prior advantage of the newly developed eastern blotting over ELISA method is its can be analyzed

**E47262**

individual pseudojubogenin glycosides. In addition, immunoaffinity column was developed for the rapid separation of pseudojubogenin glycosides. Our result showed that only 847.07 ng bacopaside I was bound with anti-bacopaside I antibody which presented low column capacity. Therefore, the immunoaffinity column should be developed the column capacity more.

## ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deep gratitude to NRCT-JSPS and Graduate school, Khon Kaen University for the Master degree scholarship. The department of Pharmacy, Sikhiu hospital is acknowledged for giving me the opportunity to study at the faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University.

I am profoundly grateful to Assoc. Prof. Dr. Waraporn Putalun, my thesis advisor for giving beneficial guidance in both of my learning and my life all the way through my study. I am also indebted to Assoc. Prof. Dr. Hiroyuki Tanaka for his assistance and advice at various stage of my research development in Japan.

I would like to take my opportunity to express my graduate to Assoc. Prof. Dr. Kornkanok Ingkaninan, Faculty of Pharmaceutical Science, Naresuan university and Dr. Watoo Phrompittayarat for giving saponin standard reference, hybridoma supernatant of anti-bacopaside I monoclonal antibody (MAb), anti-bacopside I MAb and anti-bacopaside I polyclonal antibodies for this study.

Finally, my graduation would not be achieved without the best wish from my mother and sister, who help me for everything and always gives me greatest love, willpower and financial support until this study completion. Finally, I wish to gratefully special thanks to my relation and my friends for their help and encouragement.

Natnapa Imsungnoen



## TABLE OF CONTENTS

	<b>Page</b>
ABSTRACT (IN THAI)	i
ABSTRACT (IN ENGLISH)	ii
ACKNOWLEDGEMENTS	iv
TABLE OF CONTENTS	v
LIST OF TABLES	vii
LIST OF FIGURES	viii
LIST OF ABBREVIATIONS	xii
CHAPTER I INTRODUCTION	1
CHAPTER II LITERATURE REVIEWS	3
1. Botanical data of <i>Bacopa monnieri</i> (L.) Wettst.	3
2. Triterpenoid saponins in <i>B. monnieri</i>	4
3. Biological activity of <i>B. monnieri</i>	7
4. Analytical method of saponin glycosides in Brahmi	12
5. Application of immunological assay in phytochemical analysis	12
CHAPTER III IMMUNOCHROMATOGRAPHIC STRIP FOR DETECTION OF PSEUDOJUJUBOGENIN GLYCOSIDES	27
1. Introduction	27
2. Methodology	29
3. Results and discussion	34
CHAPTER IV DEVELOPMENT OF EASTERN BLOTTING FOR DETERMINATION OF PSEUDOJUJUBOGENIN GLYCOSIDES USING ANTI-BACOPASIDE I MONOCLONAL ANTIBODY	41
1. Introduction	41
2. Methodology	42
3. Results and discussion	45

## TABLE OF CONTENTS (Cont.)

	<b>Page</b>
CHAPTER V IMMUNOAFFINITY COLUMN FOR SEPARATION OF PSEUDOJUJUBOGENIN GLYCOSIDES	58
1. Introduction	58
2. Methodology	58
3. Results and discussion	64
CHAPTER VI CONCLUSIONS	67
REFERENCES	69
RESEARCH PUBLICATIONS	74
VITAE	75



## LIST OF TABLES

	<b>Page</b>
Table 1	Clinical studies of <i>Bacopa monnieri</i> 11
Table 2	Cross reactivities (CRs) of the anti-bacopaside I PAb against some naturally occurring compounds 13
Table 3	Cross reactivities (CRs) of the anti-bacopaside I MAb against some naturally occurring compounds 15
Table 4	The studies of immunochromatographic strip 21
Table 5	The study of a variable membrane for Eastern blotting technique 22
Table 6	The quantitative analysis of interested compound in plant samples using eastern blotting 23
Table 7	The limit of detection of strip test for pseudojubilogenin glycosides 36
Table 8	Pseudojubilogenin glycosides content in <i>Bacopa</i> species and <i>Zizyphus</i> species as determined by the immunochromatographic strip test and ELISA 38
Table 9	The stability at 2-8°C of immunochromatographic strip 39
Table 10	The limit of detection of pseudojubilogenin glycosides by eastern blotting analysis using standard bacopaside I 48
Table 11	Intra- and inter-assay precision of pseudojubilogenin glycosides analyzed by eastern blotting 50
Table 12	Total pseudojubilogenin glycosides in Brahmi extracts determined by Eastern blotting and ELISA using MAb against bacopaside I 51
Table 13	Each pseudojubilogenin glycosides content in <i>B. monnieri</i> extract using eastern blotting 55

## LIST OF FIGURES

		Page
Figure 1	Scheme of thesis conceptual framework	2
Figure 2	<i>Bacopa monnieri</i> (Brahmi)	3
Figure 3	Chemical structures of jujubogenin glycosides found in <i>B. monnieri</i>	5
Figure 4	Chemical structures of pseudojujubogenin glycosides found in <i>B. monnieri</i>	6
Figure 5	Dose-response curve of bacopaside I detected by competitive ELISA using anti-bacopaside I PAb at 405 nm	14
Figure 6	Dose-response curve of bacopaside I detected by competitive ELISA using anti-bacopaside I MAb at 405 nm	16
Figure 7	Immunochromatographic strip component	17
Figure 8	Principle of immunochromatographic strip based on direct reaction of antigen-antibody	19
Figure 9	Principle of immunochromatographic strip based on competitive reaction of antigen-antibody	20
Figure 10	The coupling of antibody with hydrazide gel	24
Figure 11	The separation of interested compound using immunoaffinity column	25
Figure 12	Elution profile of glycyrrhizin from the crude extracts of <i>Shakuyaku kanzo to</i> ( <i>Shaoyao gancao tang</i> ) with an immunoaffinity column coupled with the anti-glycyrrhizin-MAb	26
Figure 13	The strip test is based on a competitive immunoassay methodology using anti-bacopaside I MAb as a detection reagent (A). Color only appears in the control zone if a sample is positive for pseudojujubogenin glycosides (B), whilst color appears in both the capture zone and the control zone if a sample contains no pseudojujubogenin glycosides (C)	29



## LIST OF FIGURES (Cont.)

	<b>Page</b>
Figure 14	31
The conjugation of colloidal gold particle and anti-bacopaside I MAb	
Figure 15	32
The flow chart of capture reagent preparation	
Figure 16	33
The flow chart of immunochromatographic membrane preparation	
Figure 17	35
The positive result of immunochromatographic strip (lane A) and the negative result of immunochromatographic strip (lane B)	
Figure 18	36
The limit of detection of standard bacopaside I using immunochromatographic strip. Various concentration of standard bacopaside I were diluted 2-fold dilution. Lane A; 2 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ , lane B; 1 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ , lane C; 0.5 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ , lane D; 0.25 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ , lane E; 0.125 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ , lane F; 0.0625 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ and lane G; 0.03125 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$	
Figure 19	38
Immunochromatographic strip test assays for pseudojujubogenin glycosides in <i>Bacopa</i> and <i>Zizyphus</i> species. Lane 1, <i>Bacopa monnieri</i> (top); lane 2, <i>B. monnieri</i> (stem); lane 3, <i>B. monnieri</i> (root); lane 4, <i>B. monnieri</i> (in vitro plant); lane 5, <i>B. monnieri</i> (callus); lane 6, <i>B. diffusus</i> (leaf); lane 7, <i>B. cordifolia</i> (leaf); lane 8, <i>Zizyphus jujuba</i> (leaf); and lane 9, <i>Z. cambodiana</i> (leaf)	
Figure 20	42
Chemical structure of polyethersulphone (PES) membrane	
Figure 21	42
Fixing of bacopaside I-gelatin conjugate on PES membrane by periodate oxidation reaction	
Figure 22	44
Protocol of eastern blotting using PES membrane	
Figure 23	45
Standard curve of bacopaside I detected by Eastern blotting	
Figure 24	46
Eastern blotting assay for standard pseudojujubogenin glycosides and brahmi extract. Lane 1, standard bacopaside II; lane 2, standard bacopasaponin C; lane 3, standard bacopaside I; lane 4, standard bacopaside V; and lane 5, <i>B. monnieri</i> extract	

## LIST OF FIGURES (Cont.)

	<b>Page</b>
Figure 25	47
Eastern blotting assay for standard bacopaside I, jujubogenin glycosides and Brahmi extract. Lane 1, standard bacopaside I; lane 2, <i>B. monnieri</i> extract; lane 3, standard bacopaside A <sub>3</sub> ; lane 4, standard bacopasaponin C isomer; and lane 5, standard bacopaside IV	
Figure 26	48
The limit of detection of pseudojujubogenin glycosides by eastern blotting analysis using standard bacopaside I. Lane 1; 50 ng; lane 2; 25 ng; lane 3; 12.5 ng; lane 4; 6.25 ng; lane 5; 3.125 ng and lane 6; 1.5625 ng	
Figure 27	49
Eastern blotting profile of brahmi extracts and standard bacopaside I. Lane 1, <i>B. monnieri</i> (callus D0.5K1); lane 2, <i>B. monnieri</i> (regenerated plants from TDZ0.1); lane 3, <i>B. monnieri</i> (root); lane 4, <i>B. monnieri</i> (stem); lane 5, <i>B. monnieri</i> (top) and lane 6, standard bacopaside I	
Figure 28	52
Correlation of pseudojujubogenin glycosides content measured by Eastern blotting and ELISA assay	
Figure 29	53
Eastern blotting profile of standard bacopaside I and <i>Bacopa</i> species. Lane 1, standard bacopaside I; lane 2, <i>B. diffusus</i> extract (stem); lane 3, <i>B. diffusus</i> extract (leaf); lane 4, <i>B. cordifolia</i> (stem); lane 5, <i>B. cordifolia</i> (leaf) and lane 6, <i>B. cordifolia</i> (flower)	
Figure 30	53
Eastern blotting profile of standard bacopaside I and <i>Zizyphus</i> species. Lane 1, standard bacopaside I; lane 2, <i>Z. cambodiana</i> extract and lane 3, <i>Z. jujuba</i> extract	
Figure 31	54
Standard pseudojujubogenin glycosides and brahmi extract	
Figure 32	57
The eastern blotting profile of the aerial part of <i>B. monnieri</i>	
Figure 33	60
The coupling of anti-bacopaside I PAb with hydrazide gel	
Figure 34	61
The flow chart of Immunoaffinity column procedure	



## LIST OF FIGURES (Cont.)

	<b>Page</b>
Figure 35      The flow chart of immunoaffinity column for separate pseudojujubogenin glycosides	62
Figure 36      The procedure of TLC for confirmation of pseudojujubogenin glycosides separated by immunoaffinity column	63
Figure 37      The elution profile of bacopaside I by immunoaffinity column using anti-bacopaside I polyclonal antibody	64
Figure 38      The elution profile of pseudojujubogenin glycosides content in <i>Z. jujuba</i> extract	65
Figure 39      The chromatogram of the represented fractions from immunoaffinity column using TLC. Lane 1, <i>Z. jujuba</i> extract; lane 2, Washing fraction; lane 3, Eluting fraction and lane 4, After eluting fraction	66

## LIST OF ABBREVIATIONS

ABTS	2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium
ACN	Acetonitrile
BM	<i>Bacopa monnnieri</i>
BSA	Bovine serum albumin
bw	Body weight
CC	Column chromatography
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EtOAc	Ethyl acetate
EtOH	Ethanol
HPLC	High performance liquid chromatography
HPTLC	High performance thin layer chromatography
hr	Hour
HSA	Human serum albumin
IgG	Immunoglobulin type G
ip	Intraperitoneal
LOD	Limit of detection
MAb	Monoclonal antibody
MeOH	Methanol
min	Minute
ml	Milliliter
PAb	Polyclonal antibodies
PBS	Phosphate buffer saline
PO	Per orally
POD	Peroxidase
rpm	Round per minute
TPBS	Phosphate buffer saline containing 0.05% Tween 20
UV	Ultraviolet visible spectroscopy