



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์
เรื่อง
การผลิตสารต้านทานแบบโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอชียติโคไซด์
เพื่อการควบคุมคุณภาพบัวบก

โดย
ผศ.ดร.ทวีศักดิ์ จิ่งวัฒนตระกูล

กันยายน 2555



รายงานการวิจัยบัณฑิตย
เรื่อง

การผลิตสารต้านทานแบบโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอเชียติโคไซด์
เพื่อการควบคุมคุณภาพบัวบก

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

โดย
ผศ.ดร.ทวิศักดิ์ จิ่งวัฒนตระกูล

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานประมาณแผ่นดิน
ประจำปีงบประมาณ 2555
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย ม.อบ. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

คำนำ

รายงานการวิจัยเรื่อง การผลิตสารต้านทานแบบโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอชียติโคไซด์ เพื่อการควบคุมคุณภาพบัวบก ได้รับการสนับสนุนจากเงินอุดหนุนการวิจัย จากสำนักงานงบประมาณแผ่นดิน 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 การผลิตสารต้านทานแบบโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอชไอวีโคไซด์เพื่อการควบคุมคุณภาพบัวบก และขอขอบคุณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ได้สนับสนุนสถานที่ในการทำวิจัย ตลอดจนอุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในการทำวิจัย

ผู้วิจัยขอขอบคุณ Associate Professor Hiroyuki Tanaka คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยคิอู ประเทศญี่ปุ่น รศ.ดร.วราภรณ์ ภูตะลุน คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น รศ.ดร.บุญชู ศรีตุลา รัช คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้สนับสนุนสารเคมีและวัสดุวิทยาศาสตร์บางส่วนที่ใช้ในการวิจัย ตลอดจนให้คำแนะนำเพื่อให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วง และ ผู้วิจัยขอขอบคุณ รศ.ดร. มยุรี ต้นตีสระ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์สารมาตรฐาน

บทคัดย่อ

เอเชียติโคไซด์เป็นสารประกอบกลุ่มไตรเทอร์ปีนอยด์ซาโปนิน ที่พบเป็นองค์ประกอบหลักใน บัวบก (*Centella asiatica* (L.) Urban) ซึ่งเป็นพืชพื้นบ้านของไทยที่มีการนำมาใช้ประโยชน์ทางยามาเป็น เวลานาน โดยสารเอเชียติโคไซด์แสดงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่สำคัญได้แก่ ช่วยเพิ่มความจำและป้องกันการ เกิดอัลไซเมอร์ สมานแผล และรักษาแผลเปื่อย ด้านการซึมเศร้า ด้านอนุมูลอิสระ กระตุ้นกระบวนการสร้าง คอลลาเจน กระตุ้นหรือเสริมภูมิคุ้มกัน ลดความดันโลหิต ด้านการอักเสบ ป้องกันการเกิดมะเร็ง และปกป้อง เซลล์ประสาท จากคุณสมบัติดังกล่าวทำให้ มีการใช้บัวบกเป็นส่วนประกอบในเภสัชภัณฑ์ ผลิตภัณฑ์เสริม สุขภาพ และเครื่องสำอางหลายประเภทในปัจจุบัน ดังนั้นการควบคุมคุณภาพและปริมาณสารที่ออกฤทธิ์ใน วัตถุดิบบัวบกจึงเป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่งต่อผู้บริโภค ทั้งในด้านความปลอดภัยและเพื่อประสิทธิผลในการใช้ ใน การศึกษาวิจัยนี้ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสารเอเชียติโคไซด์ และพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ สารเอเชียติโคไซด์ด้วยวิธีทางอิมมูโนโลยี ได้แก่ เอนไซม์-ลิงค์ อิมมูโนแอสเซย์ (อีไลซา) และอิสเทิร์น บล็อกทิง โดยวิธีอีไลซาสามารถตรวจวัดปริมาณสารเอเชียติโคไซด์ได้ในช่วง 0.78 - 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และวิธีอิสเทิร์น บล็อกทิงสามารถตรวจวัดปริมาณสาร เอเชียติโคไซด์ได้ในช่วง 62.5 - 500 นาโนกรัม เมื่อทำ การตรวจรับรองความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทั้งสองวิธี พบว่ามีความถูกต้องและแม่นยำ รวมถึงมีความ สอดคล้องกันกับวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงซึ่งใช้เป็นวิธีมาตรฐาน ดังนั้นวิธีอีไลซา สามารถใช้เป็น วิธีมาตรฐานในวิเคราะห์ปริมาณสารเอเชียติโคไซด์ในทั้งตัวอย่างพืชและผลิตภัณฑ์ ในขณะที่วิธีอิสเทิร์น บล็อกทิงเหมาะกับการวิเคราะห์เฉพาะในตัวอย่างพืชเท่านั้น โดยทั้งสองวิธีเป็นวิธีที่มีความไวและมี ความจำเพาะเจาะจงสูง ทำให้สามารถวิเคราะห์สารได้อย่างสะดวกรวดเร็วและประหยัดค่าใช้จ่ายเมื่อ เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน นอกจากนี้ยังได้ทำการพัฒนาชุดทดสอบสาร เอเชียติโคไซด์เพื่อใช้คัดกรอง 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 ฌ	
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. ชุดตรวจสาร immunochromatographic strip	17
6. MALDI-TOF mass spectrum ของ AS-BSA	18
7. ความสามารถในการเกิดปฏิกิริยากับ AS ของ anti-AS MAb (2B4)	20
8. ความจำเพาะในการจับกับ AS ของ anti-AS MAb (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. การเกิดปฏิกิริยาบน immunochromatographic strip	32
16. การสังเกตผลการตรวจด้วย immunochromatographic strip	33
17. การวิเคราะห์ตัวอย่างบัวบกและแวนแก้วด้วยชุดทดสอบ immunochromatographic strip	34

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. สารสำคัญจากพืชสมุนไพรที่มีการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในวิเคราะห์	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