



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ไอโซฟลาโวนอยด์ในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงกวางเครือขาวและ
ผลของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450

โดย รศ. วราภรณ์ ภูตะลุน และคณะ

มีนาคม 2555

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ไอโซฟลาโวนอยด์ในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงกาวเครือขาวและ
ผลของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450

รศ.วราภรณ์ ภูตะลุน

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานฉบับนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ

เนื้อหา	หน้า
สารบัญรูป	ก
สารบัญตาราง	ค
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
สรุปโครงการ (Executive Summary)	3
บทนำ	5
การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	11
วิธีการดำเนินการวิจัย	18
ผลการวิจัย	27
สรุปผลการวิจัย	53
เอกสารอ้างอิง	55
ผลลัพธ์ที่ได้จากโครงการ	59
ภาคผนวก	62

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1 ลักษณะของต้นกวาวเครือขาว	11
2 โครงสร้างของสารกลุ่ม isoflavonoid ที่พบในกวาวเครือขาว	12
3 สูตรโครงสร้างของสารกลุ่ม chromenes	12
4 การกระตุ้นแอนติบอดีในกระต่าย	21
5 ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี competitive ELISA	23
6 ขั้นตอนการเตรียมไมโครโซมจากตับ	25
7 แสดงลักษณะของแคลลัสที่ได้จากอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มีฮอร์โมน NAA และ BA	27
8 แสดงลักษณะของแคลลัสที่ได้จากอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มีฮอร์โมน TDZ	28
9 ลักษณะของยอดอ่อนจากอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มีฮอร์โมน	29
10 รากลอยต้นกวาวเครือขาว	32
11 แสดงดีเอ็นเอของยีน <i>roIA</i> ที่ได้จาก PCR	32
12 แสดงอัตราการเจริญเติบโตและปริมาณสาร isoflavonoid ในรากลอย	33
13 แสดงการสร้างสารกลุ่ม isoflavonoid ในรากลอยกวาวเครือขาวที่ระยะเวลาต่างๆ	34
14 ผลของน้ำตาลต่อการเจริญเติบโตของรากลอย	35
15 ผลของ methyl jasmonate ต่อการสร้างสารกลุ่ม isoflavonoid ในรากลอยกวาวเครือขาว	37
16 ผลของ chitosan ต่อการสร้างสารกลุ่ม isoflavonoid ในรากลอยกวาวเครือขาว	37
17 ผลของ salicylic acid ต่อการสร้างสารกลุ่ม isoflavonoid ในรากลอยกวาวเครือขาว	38
18 ผลของ <i>Agrobacterium</i> ต่อการสร้างสารกลุ่ม isoflavonoid ในรากลอยกวาวเครือขาว	38
19 ผลของ yeast extract ต่อการสร้างสารกลุ่ม isoflavonoid ในรากลอยกวาวเครือขาว	39
20 การเชื่อมต่อแอนติเจนกับโปรตีน BSA	40
21 MALDI-TOF-MS spectrum ของ puerarin-BSA	40
22 MALDI-TOF-MS spectrum ของ daidzin-BSA	40
23 กราฟมาตรฐานของแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสาร puerarin และ daidzin	41
24 ความสัมพันธ์ในการตรวจวัดสาร puerarin และ daidzein ระหว่างวิธีวิเคราะห์ด้วย ELISA และ HPLC	45

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
25 ความสัมพันธ์ในการตรวจวัดสาร isoflavonoid รวม ระหว่างวิธีวิเคราะห์ด้วย ELISA และ HPLC	48
26 ผลของรากพะเลียงกวาวเครือขาวต่อการแสดงออกของระดับ hepatic CYP2B9 mRNA ในหนูเพศผู้	51
27 ผลของรากพะเลียงกวาวเครือขาวต่อระดับ thiobarbituric acid ในหนู	51

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ชนิดและปริมาณของฮอร์โมนในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS	18
2 เปอร์เซนต์การเกิดแคลลัส ยอดอ่อนและจำนวนยอดอ่อนต่อชิ้นส่วนพืชที่มีอายุ 8 สัปดาห์	30
3 ปริมาณสารกลุ่ม isoflavonoid ในแคลลัสที่มีอายุ 8 สัปดาห์	31
4 ผลของสูตรอาหารต่อการสร้างสารกลุ่ม isoflavonoid	34
5 ผลของน้ำตาลต่อการสร้างสารกลุ่ม isoflavonoid ในรากลอย	35
6 ค่า cross reactivity ของแอนติบอดีต่อสารชนิดต่างๆ	42
7 แสดงค่าความเที่ยงของวิธีการวิเคราะห์ puerarin โดยวิธี ELISA	43
8 แสดงค่าความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์ puerarin โดยวิธี ELISA	44
9 ปริมาณสาร puerarin และ daidzein รวมทั้งวิเคราะห์ได้จากวิธี ELISA และ HPLC	44
10 แสดงค่าความเที่ยงของวิธีการวิเคราะห์ isoflavonoid โดย ELISA	46
11 แสดงค่าความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์ isoflavonoid โดย ELISA	47
12 ปริมาณสาร isoflavonoid รวมทั้งวิเคราะห์ได้จากวิธี ELISA และ HPLC	48
13 ผลของรากเพาะเลี้ยงกวางเครือขาวต่อน้ำหนักและความยาวของมดลูก	49
14 ผลของรากเพาะเลี้ยงกวางเครือขาวต่อปริมาณ P450 และ benzyloxyresorufin O-dealkylase (BROD) ในตับหนู	50

บทคัดย่อ

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกวาวเครือขาวโดยการเหนี่ยวนำให้เกิดแคลลัสในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร Murashige และ Skoog (MS) ที่ประกอบด้วยฮอร์โมนพืชชนิดต่างๆ พบว่า ชิ้นส่วนก้านเมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย thidiazuron (TDZ) 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลการทดลองที่ดีที่สุด คือสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดแคลลัสได้ร้อยละ 100, เหนี่ยวนำให้เกิดยอดร้อยละ 15.63 และ สามารถผลิตสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ได้ประมาณ 50.39 ± 7.06 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง นอกจากนี้ยังได้มีการเหนี่ยวนำให้เกิดรากลอยโดยใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium rhizogenes* สายพันธุ์ ATCC15834 จากการทดลองนี้พบว่า การสร้างสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ในรากลอยมีปริมาณมากกว่าสารที่พบในธรรมชาติถึง 5.8 เท่า และพบว่า ความเข้มข้นของน้ำตาล 5% เหมาะสมที่ทำให้รากลอยเจริญเติบโตได้ดี และมีการสร้างสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ได้มากที่สุด โดยสูตรอาหารที่มีการสร้างสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ได้มากที่สุดคือ อาหารสูตร woody plant (WP) การสร้างสารไอโซฟลาโวนอยด์ในรากลอยกวาวเครือขาว จากการศึกษาผลของสารกระตุ้นต่อการผลิตสารไอโซฟลาโวนอยด์พบว่า สารกระตุ้นที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด ได้แก่ yeast extract ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ภายหลังจากเติมสารกระตุ้นลงไปเป็นเวลา 3 วัน สารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ที่ได้จากการกระตุ้นมีปริมาณสูงถึง 60 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง คิดเป็น 4.5 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม จากการศึกษาการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อสาร puerarin และ daidzin เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารกลุ่มนี้ด้วยเทคนิคอีไลซ่า โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อสาร puerarin ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สาร puerarin และ daidzein ซึ่งเป็นอะกลัยโคนของ puerarin โดยช่วงของการวิเคราะห์อยู่ที่ระดับ 6.10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร–1.56 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ของ puerarin และการผสมแอนติบอดีทั้งสองชนิดเพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณไอโซฟลาโวนอยด์รวมในขั้นตอนเดียว โดยมีช่วงการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 0.05–6.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร วิธีวิเคราะห์โดย ELISA ทั้งสองวิธี ให้ผลการวิเคราะห์สอดคล้องกับค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC จากการประเมินวิธีวิเคราะห์พบว่า ทั้งสองวิธีเป็นวิธีที่มีความถูกต้อง แม่นยำ ความจำเพาะเจาะจง และความไวสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ในกวาวเครือขาว นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาผลของกวาวเครือขาวต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ที่เกี่ยวข้อง ในหนูไมซ์ด้วยเทคนิค benzyloxyresorufin O-dealkylation และ real-time RT-PCR นอกจากนี้ยังทำการศึกษาผลต่อขนาด และน้ำหนักมดลูกของหนูเพศเมีย จากผลการศึกษาพบว่า เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงส่วนรากของกวาวเครือขาวมีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเพศหญิง โดยมีผลเพิ่มความยาวของ มดลูกหนูเพศเมีย และมีศักยภาพในการกระตุ้นการแสดงออกของ mRNA และ สมรรถนะของเอนไซม์ CYP2B9

คำหลัก: ไอโซฟลาโวนอยด์, กวาวเครือขาว, แคลลัส, รากลอย, ไซโตโครม พี 450

Abstract

Plant tissue cultures of *Pueraria candollei* was investigated for callus induction using Murashige and Skoog (MS) medium with different plant hormones. In this experiment we found that MS medium supplemented with 0.5 mg/l thidiazuron (TDZ) shows high efficiency for the callus induction (100%), shoot regeneration (15.63%) and enhances production of isoflavonoids in *P. candollei* (50.39 ± 7.06 mg/g dry wt). Transformed hairy root was established by using *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834. Hairy roots of *P. candollei* can increase the level of isoflavonoids production about 5.18-fold higher than in intact roots. The optimization of growth and isoflavonoids accumulation of *P. candollei* hairy roots was depended on sucrose concentration, 5% sucrose (w/v) was an optimum concentration for biomass and isoflavonoids accumulation, and woody plant medium is an optimal condition for isoflavonoid production. The effect of elicitors on total isoflavonoid accumulation was studied in the hairy root cultures of *Pueraria candollei*. The results showed that yeast extract (0.5 mg/ml) was the most efficient at enhancing total isoflavonoid production up to 60 mg/g dry wt, 4.5-fold higher than control hairy roots on day 3 of elicitation. To screen the level of isoflavonoids in plants, anti-puerarin and anti-daidzin polyclonal antibodies (PABs) were produced in order to develop enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) to determine major isoflavonoids in *P. candollei*. An ELISA for determination of puerarin and its aglycone, daidzein, was established and validated in the range of 6.10 ng/ml-1.56 μ g/ml of puerarin. In addition, a one-step ELISA method to determine total isoflavonoids in *P. candollei* using combination of two PABs was also developed in the range of 0.05-6.25 μ g/ml of isoflavonoids. Based on validation analysis, these analytical methods by ELISA are a precise, accurate, and sensitive method for the determination of major isoflavonoids in *P. candollei*. Furthermore, their effects on related P450 enzyme activities in mice were investigated by using benzyloxyresorufin O-dealkylation and real-time RT-PCR techniques. The uterus weight and length of female mice also evaluated. The results demonstrated that *P. candollei* possesses an estrogenic effect, increase uterus length and has potential to induce the expression of CYP2B9 mRNA and enzyme activity.

Key Words: isoflavonoid, *Pueraria candollei*, callus, hairy roots, CYP450

สรุปโครงการ (Executive Summary)

กวาวเครือขาว (*Pueraria candollei* Wall. Ex Benth) วงศ์ Leguminosae เป็นสมุนไพรไทยที่เป็นที่รู้จักและมีการนำมาใช้ในการแพทย์พื้นบ้านเป็นเวลานาน หัวกวาวเครือขาวเป็นแหล่งของไฟโตเอสโตรเจน โดยมีองค์ประกอบหลักเป็นสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ ได้แก่ puerarin, daidzin, genistin, daidzein และ genistein ซึ่งสารเหล่านี้มีฤทธิ์เป็นไฟโตเอสโตรเจน จากปัญหาที่พบคือ สารสำคัญที่พบในหัวกวาวเครือขาวมีความแปรปรวนอย่างมากตามสภาวะแวดล้อมส่งผลให้ปริมาณสารที่ได้นั้นไม่มีความแน่นอน ดังนั้นจึงได้มีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเข้ามาประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่มปริมาณการสร้างสารทุติยภูมิในกวาวเครือขาว ในการทดลองครั้งนี้พบว่า การเพาะเลี้ยงส่วนก้านของกวาวเครือขาวบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย thidiazuron 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลการทดลองที่ดีที่สุด คือสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดแคลลัสได้ร้อยละ 100 เหนี่ยวนำให้เกิดยอดร้อยละ 15.63 และสามารถผลิตสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ได้ปริมาณ 50.39 ± 7.06 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง นอกจากนี้ยังได้มีการเหนี่ยวนำให้เกิดรากลอยโดยใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium rhizogenes* สายพันธุ์ ATCC15834 จากการทดลองนี้พบว่า การสร้างสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์สูงสุดในรากลอยคือ 26.39 ± 3.80 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง ซึ่งมีปริมาณมากกว่าที่พบในธรรมชาติถึง 5.8 เท่า และพบว่าความเข้มข้นของน้ำตาล (sucrose) ที่เหมาะสมที่ทำให้รากลอยเจริญเติบโตได้ดี และมีการสร้างสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ได้มากที่สุดคือ ความเข้มข้นของน้ำตาลร้อยละ 5 โดยสูตรอาหารที่มีการสร้างสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ได้มากที่สุดคือ อาหารสูตร woody plant จากการศึกษาผลของสารกระตุ้น 5 ชนิด คือ methyl jasmonate, yeast extract, chitosan, salicylic acid และ *Agrobacterium rhizogenes* lysate ต่อการผลิตสารไอโซฟลาโวนอยด์พบว่า สารกระตุ้นที่ใช้ทุกชนิดมีผลในการกระตุ้นการสร้างสารกลุ่ม isoflavonoid ในรากลอยกวาวเครือขาว สารกระตุ้นที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มการสร้างสารมากที่สุด ได้แก่ yeast extract ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ภายหลังจากเติมสารกระตุ้นลงไปเป็นเวลา 3 วัน สารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ที่ได้จากการกระตุ้นมีปริมาณสูงถึง 60 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง คิดเป็น 4.5 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

จากการศึกษาการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อสาร puerarin และ daidzin เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารกลุ่มนี้ด้วยเทคนิคอิลซ่า โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสาร puerarin ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สาร puerarin และ daidzein ซึ่งเป็นอะกลัยโคนของ puerarin พบว่า ช่วงของการวิเคราะห์ puerarin อยู่ที่ระดับ 6.10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร–1.56 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และจากการพัฒนาชุดตรวจสอบโดยการผสมแอนติบอดีทั้งสองชนิดเพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณไอโซฟลาโวนอยด์รวมทั้ง 5 ชนิดในขั้นตอนเดียว พบว่า วิธีที่พัฒนาได้มีช่วงการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 0.05–6.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร วิธีวิเคราะห์โดย ELISA

ทั้งสองวิธี ให้ผลการวิเคราะห์สอดคล้องกับค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC จากการประเมินวิธีวิเคราะห์พบว่า ทั้งสองวิธีเป็นวิธีที่มีความถูกต้อง แม่นยำ ความจำเพาะเจาะจง และความไวสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ในกวางเครือขาว

การศึกษาผลของรากพะเลียงกวางเครือขาวต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ที่เกี่ยวข้อง ในหนูไม่ชดด้วยเทคนิค benzyloxyresorufin O-dealkylation และ real-time RT-PCR นอกจากนี้ยังทำการศึกษาผลต่อขนาด และน้ำหนักมดลูกของหนูเพศเมีย จากผลการศึกษาพบว่า เนื้อเยื่อพะเลียงส่วนรากของกวางเครือขาวมีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเพศหญิง โดยมีผลเพิ่มความยาวของ มดลูกหนูเพศเมีย และมีศักยภาพในการกระตุ้นการแสดงออกของ mRNA และ สมรรถนะของเอนไซม์ CYP2B9 จากการศึกษาผลของรากพะเลียงกวางเครือขาวต่อกระบวนการ lipid peroxidation ในสมองของสัตว์ทดลองพบว่า รากพะเลียงกวางเครือขาวมีผลลดการเกิด lipid peroxidation ด้วยการทดสอบ TBARS ตั้งแต่สัปดาห์แรกของการได้รับรากพะเลียงกวางเครือขาว แสดงให้เห็นว่ารากพะเลียงกวางเครือขาวมีผลในการต้านอนุมูลอิสระด้วย

บทที่ 1

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของการวิจัย

กวาวเครือขาวเป็นสมุนไพรไทยที่มีการนำมาใช้และเป็นที่รู้จักมานานในด้านที่ใช้เป็นยาอายุวัฒนะ กวาวเครือขาวได้จากพืชที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Pueraria candollei* Wall. ex Benth. var *mirifica* (Airy Shaw & Suvat.) Niyomdham จัดเป็นพืชในวงศ์ Leguminosae โดยพืชชนิดนี้จะพบมากในบริเวณป่าเบญจพรรณในภาคเหนือ ภาคตะวันตก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย (สุติมา อ้อมกึ่ง, 2546) ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกวาวเครือขาวคือ เป็นไม้เถาเลื้อยพาดพันต้นไม้ใหญ่ เถามีความยาวประมาณ 5 เมตร ลำต้นผิวเกลี้ยง เปลือกนอกของลำต้นมีสีน้ำตาลเข้ม ค่อนข้างแข็งมีหัวใต้ดินขนาดใหญ่ ลักษณะค่อนข้างกลม และคอดยาวเป็นตอนๆต่อเนื่องกัน หัวมีลักษณะกลมอยู่ใต้ดินคล้ายหัวมันแกวใบเป็นใบประกอบ 3 ใบย่อย (ใบประกอบแบบนิ้วมือ) ขนาดใหญ่ รูปไข่กว้าง 8-15 เซนติเมตร ยาว 10-20 เซนติเมตร มีสีเขียว ดอกสีน้ำเงินอมม่วง ออกเป็นช่อตามปลายกิ่งยาว 20-30 เซนติเมตร (ดอกย่อยคล้ายดอกแค) ประกอบด้วยกลีบดอก 5 กลีบ ดอกจะออกในระยะผลัดใบ ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ ถึง มีนาคม ผลเป็นฝักแบนรูปขอบขนาน เมื่อแก่จะเป็นสีน้ำตาลมีเมล็ด (มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมมาธิราช, 2547) หัวกวาวเครือตามตำรายาของหลวงอนุสรสุนทรใช้เป็นอายุวัฒนะได้ทั้งชายและหญิง ทำให้ผิวหนังที่เหี่ยวกลับมาเต่งตึง เสริมหน้าอก ทำให้เส้นผมดกดำ และ บำรุงเลือด จากรายงานการศึกษาพบว่าหัวกวาวเครือขาวมีองค์ประกอบหลักเป็นสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ (isoflavonoids) โดยแบ่งเป็น กลุ่ม isoflavones glycosides ได้แก่ puerarin, daidzin และ genistin กลุ่ม isoflavones ได้แก่ daidzein และ genistein (Chansakaow *et al.*, 2000a) กลุ่ม chromenes ได้แก่ miroestrol และ deoxymiroestrol (Chansakaow *et al.*, 2000b) ซึ่งสารเหล่านี้มีฤทธิ์เป็นไฟโตเอสโตรเจน (phytoestrogen) หรือฮอร์โมนเอสโตรเจนจากพืช โดยสารในกลุ่ม chromenes เป็นกลุ่มที่มีฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนสูงกว่ากลุ่มอื่นๆ แต่พบปริมาณน้อยในธรรมชาติ (0.002-0.004%) จากการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาจากสารสกัดกวาวเครือขาวพบว่า มีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนในเซลล์เพาะเลี้ยงและสัตว์ทดลอง (Chansakaew *et al.*, 2000a, 2000b; Trisomboon *et al.*, 2006; Cherdshewasart *et al.*, 2007a; Cherdshewasart *et al.*, 2008) และมีผลในการป้องกันการสูญเสียกระดูกในหนูที่ตัดรังไข่ (Urasopon *et al.*, 2008) โดยมีการศึกษาถึงประสิทธิภาพและความปลอดภัยเพื่อนำมาใช้เป็นฮอร์โมนทดแทนในสตรีวัยทอง (Chandeying, Lamlertkittikul, 2007; Manonai *et al.*, 2008) นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Cherdshewasart, Sutjit, 2008)

จากรายงานการศึกษาพบว่า กวาวเครือขาวที่ปลูกจากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทยมีปริมาณสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์โดยเฉลี่ยดังนี้ puerarin 0.23 mg/g, daidzin 0.15 mg/g,

genistin 0.35 mg/g, daidzein 0.06 mg/g และ genistein 0.01 mg/g น้ำหนักแห้ง ทั้งนี้พบว่า สารสำคัญที่พบในหัวกวาวเครือขาวจะมีความแปรปรวนอย่างมากตามสภาวะแวดล้อมทำให้ ปริมาณสารที่ได้นั้นไม่มีความแน่นอน ดังนั้น จึงได้มีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเข้ามา ประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่มปริมาณการสร้างสารทุติยภูมิที่พบในต้นกวาวเครือขาว เนื่องจากเทคนิคนี้ใช้ เวลาน้อยและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิที่สนใจและควบคุมการ ผลิตสารทุติยภูมิที่สนใจได้ นอกจากนี้ ในวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อผลิตสารทุติยภูมิโดย การเหี่ยวนำไปเกิดรากลอย โดยใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium rhizogenes* นับเป็นอีกแนวทาง หนึ่งในปัจจุบันเพื่อเพิ่มปริมาณของพืชที่สนใจศึกษาให้ได้สารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ในระยะเวลาอันสั้น เนื่องจากรากลอยมีความสามารถในการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว จึงเป็น ที่น่าสนใจในการประยุกต์วิธีการเหี่ยวนำไปเกิดรากลอยมาใช้เพื่อศึกษาศักยภาพในการผลิต สารกลุ่มนี้ในรากลอยของต้นกวาวเครือขาว เนื่องจากการสะสมสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางเภสัช- วิทยาพบได้ในส่วนรากและการเพาะเลี้ยงรากลอยสามารถเพิ่มผลิตผลได้ในระยะเวลาอันสั้น จากรายงานการศึกษาในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกวาวเครือขาวพบว่า มีศึกษาในรูปแบบการ เพาะเลี้ยงแคลลัส การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยและการเพาะเลี้ยงรากลอยโดยทำการศึกษาผล ต่อการสร้างสาร daidzein และ genistein ซึ่งเป็นกลุ่ม isoflavonoids ในรูปแบบของ aglycone ที่พบในกวาวเครือขาว แต่ยังไม่มีความชัดเจนของการศึกษาผลของสารกระตุ้นในการเพาะเลี้ยงราก ลอยต่อการสร้างสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์หลักที่พบในกวาวเครือขาวในรูปแบบของ isoflavones glycosides ซึ่งเป็นรูปแบบที่พบมากในธรรมชาติ ได้แก่ puerarin, daidzin, genistin ร่วมกับรูปแบบของ isoflavones ได้แก่ daidzein และ genistein

วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ที่พบในกวาวเครือขาวเพื่อใช้เป็น มาตรฐานนั้น ได้มีรายงานการตรวจสอบสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ ได้แก่ puerarin, daidzin, genistin, daidzein และ genistein โดยใช้วิธี HPLC ปัจจุบันวิธีการวิเคราะห์ทางด้านอิมมูโนโล- ยี โดยใช้แอนติบอดีเพื่อใช้ตรวจสอบสารสำคัญในสมุนไพรเป็นวิธีการที่มีความแม่นยำสูง เนื่องจากความสามารถในการจับกับสารได้อย่างจำเพาะเจาะจงและสามารถทำการวิเคราะห์ได้ จำนวนมากเนื่องจากมีความสะดวกและรวดเร็วและสามารถวิเคราะห์ได้โดยไม่ต้องเตรียม ตัวอย่างก่อน สำหรับการผลิตแอนติบอดีต่อสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ ได้มีการศึกษาวิจัยในแง่ ของการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงต่อสาร daidzein และ genistein ซึ่งเป็นสารกลุ่ม isoflavone และประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบโดยวิธี ELISA สำหรับการผลิตแอนติบอดีต่อสาร puerarin, daidzin, genistin ซึ่งเป็นสารกลุ่ม isoflavone glycosides และเป็นกลุ่มหลักที่พบใน กวาวเครือขาวนั้นในขณะนี้ยังไม่มีผู้ทำการศึกษา จึงเป็นที่น่าสนใจในการประยุกต์ใช้แอนติบอดี ต่อสารดังกล่าวมาทำการพัฒนาวิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA และการพัฒนาชุดทดสอบด้วยวิธีการ ทางอิมมูโนโลยี เพื่อใช้ในการหาปริมาณสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์และใช้ตรวจสอบโดยการ หาทั้งทางด้านปริมาณและคุณภาพเป็นอย่างดี เนื่องจากสามารถหาปริมาณได้ในระยะเวลาอัน

สิ้นและมีประสิทธิภาพสูงและนำไปประยุกต์ใช้ในการหาปริมาณสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์รวมทั้งพบในพืชทั้งจากต้นธรรมชาติและในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ รวมทั้งการประยุกต์ใช้ชุดตรวจสอบสารกลุ่มนี้เพื่อหามาตรฐานและคัดเลือกพืชสมุนไพร

นอกจากนี้เนื่องจากในปัจจุบันมีการใช้กาวเครือขาวในทางด้านยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารอย่างแพร่หลาย ทั้งนี้ส่วนใหญ่การใช้สมุนไพรจะมีการใช้ติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน ดังนั้นจึงควรต้องตระหนักถึงการศึกษาผลของสมุนไพรต่อร่างกายทั้งในแง่เภสัชวิทยาและพิษวิทยา โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลต่อกระบวนการเปลี่ยนแปลงยาในร่างกาย เอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักที่ทำหน้าที่ในกระบวนการดังกล่าว เทคนิค alkoxyresorufin O-dealkylation เป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะสูงที่นิยมนำมาใช้ทดสอบสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ในปัจจุบัน โดยเทคนิคนี้จะอาศัยความจำเพาะของสับสเตรทต่อไอโซฟอร์มเฉพาะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 และในปัจจุบันยังไม่มีรายงานการศึกษาผลของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงกาวเครือขาวต่อเอนไซม์ที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงยา ดังนั้นการศึกษาผลของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงกาวเครือขาวต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ที่เกี่ยวข้องจึงมีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อให้ได้ข้อมูลเบื้องต้นนำไปสู่การศึกษาของผลของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงกาวเครือขาวต่อกลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ในระดับอณูชีววิทยาต่อไป

ดังนั้น ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งเน้นการศึกษาการผลิตสารไอโซฟลาโวนอยด์ในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงกาวเครือขาวในรูปแบบแคลลัสและรากลอยและศึกษาผลสารกระตุ้นต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางยาของรากลอย ได้แก่ puerarin, daidzin, genistin, daidzein และ genistein การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงต่อสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ที่พบในกาวเครือขาวเพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารกลุ่มนี้ นอกจากนี้ยังทำการศึกษาผลของรากเพาะเลี้ยงกาวเครือขาวต่อเอนไซม์ที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงยา โดยศึกษาผลของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงรากกาวเครือขาวต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 เพื่อเป็นข้อมูลในการใช้สมุนไพรชนิดนี้ต่อไป

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 2.1 ศึกษาวิธีการและพัฒนาขั้นตอนการกระตุ้นให้เกิดแคลลัสและรากลอย เพื่อศึกษาศักยภาพ ในการผลิตสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์จากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงกาวเครือขาว โดยศึกษาผลของสารกระตุ้นชนิดต่างๆ ที่มีผลต่อการสร้างสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ในรากลอย
- 2.2 ผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงต่อสารไอโซฟลาโวนอยด์หลักที่มีในกาวเครือขาว ได้แก่ puerarin, daidzin, genistin, daidzein และ genistein เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารไอโซฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี ELISA

2.3 ศึกษาผลของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงกวางเครือขาวต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ที่เกี่ยวข้อง

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 3.1 ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและการสร้างสารไอโซฟลาโวนอยด์ในแคลลัสและต้นอ่อนกวางเครือขาว
- 3.2 ทราบปัจจัยและสภาวะที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารไอโซฟลาโวนอยด์ในรากลอยกวางเครือขาว
- 3.3 ทราบชนิดและความเข้มข้นของสารกระตุ้นที่มีผลในการเพิ่มการสร้างสารไอโซฟลาโวนอยด์ในรากลอยได้ดีที่สุด
- 3.4 ได้โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อสารสำคัญในกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์และสามารถนำมาประยุกต์ใช้วิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ในสมุนไพรร่วมด้วยวิธี ELISA
- 3.5 ทราบไอโซฟอร์มเฉพาะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ที่สามารถถูกเหนี่ยวนำหรือยับยั้งโดยเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงรากกวางเครือขาว และได้ข้อมูลผลของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงดังกล่าวต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ที่เกี่ยวข้อง

4. ขอบเขตของโครงการวิจัย

ทำการเพาะเมล็ดกวางเครือขาวบนอาหารแข็งสูตร MS ในสภาพปลอดเชื้อ จากนั้นนำต้นอ่อนของกวางเครือขาวที่ได้จากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อส่วนก้านและใบมาทำการเหนี่ยวนำให้เกิดแคลลัสและยอดโดยใช้ฮอร์โมน naphthaleneacetic acid (NAA), 6-benzylaminopurine (BA), และ thidiazuron (TDZ) สังเกตการเจริญเติบโตของแคลลัสและยอด จากนั้นหาปริมาณสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์หลักที่พบ 5 ชนิด ได้แก่ puerarin, daidzin, genistin, daidzein และ genistein ในแคลลัสด้วยวิธี HPLC (High performance liquid chromatography) ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารไอโซฟลาโวนอยด์ในรากลอย โดยใช้แบคทีเรีย *A. rhizogenese* ATCC 15834 เหนี่ยวนำให้ชิ้นส่วนของกวางเครือขาวเกิดรากลอย จากนั้นทำการคัดเลือกรากลอยที่มีการเจริญเติบโตรวดเร็วเพื่อนำมาศึกษาชนิดของสูตรอาหารและปัจจัยต่างๆ ต่อการสร้างสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ และผลของสารกระตุ้นในแง่ของชนิดและความเข้มข้นต่อการสร้างสารไอโซฟลาโวนอยด์ จากนั้นทำการหาปริมาณสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ในรากลอย และนำรากกวางเครือขาวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมาทดสอบผลต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ด้วยเทคนิค benzyloxyresorufin O-dealkylation นอกจากนี้ทำการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงต่อสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์หลักที่พบในกวางเครือขาวโดยใช้สาร puerarin และ daidzin เป็นสารที่ใช้เชื่อมกับ

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

1. ข้อมูลทั่วไปของต้นกวาวเครือขาว

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Pueraria candollei* ซึ่งมีสองสายพันธุ์ได้แก่ *Pueraria candollei* var. *mirifica* และ *Pueraria candollei* var. *candollei*

วงศ์ : Leguminosae

ชื่ออื่นๆ : กวาวเครือ, กวาว, ทองเครือ, ทองกวาว, กวาวหัวตามจอมทอง, จานเครือ, โปะตะกั่ว, ดานเครือ

2. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

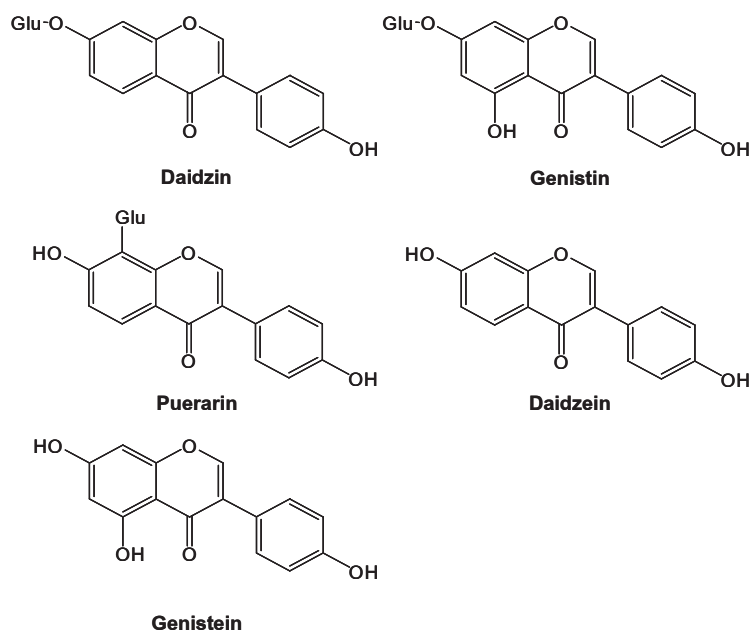
กวาวเครือขาวเป็นไม้เถาเลื้อยพาดพันต้นไม้ใหญ่ เถามีความยาวประมาณ 5 เมตร ลำต้นผิวเกลี้ยง เปลือกนอกของลำต้นมีสีน้ำตาลเข้ม ก่อนข้างแข็งมีหัวใต้ดินขนาดใหญ่ ลักษณะค่อนข้างกลม และทอดยาวเป็นตอนๆต่อเนื่องกัน หัวมีลักษณะกลมอยู่ใต้ดินคล้ายหัวมันแกวใบเป็นใบประกอบ 3 ใบย่อย (ใบประกอบแบบนิ้วมือ) ขนาดใหญ่ รูปไข่กว้าง 8-15 เซนติเมตร ยาว 10-20 เซนติเมตร มีสีเขียว ดอกสีน้ำเงินอมม่วง ออกเป็นช่อตามปลายกิ่งยาว 20-30 เซนติเมตร ประกอบด้วยกลีบดอก 5 กลีบ ดอกจะออกในระยะผลัดใบ ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ถึง มีนาคม ผลเป็นฝักแบนรูปขอบขนาน เมื่อแก่จะเป็นสีน้ำตาลมีเมล็ด (มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมมาธิราช, 2547) รากมีส่วนสะสมอาหารเรียกหัว โดยรากหนึ่งอาจเกิดหัวเป็นตอนๆ ขึ้นอยู่กับความสมบูรณ์ของสภาพดิน หัวรูปร่างค่อนข้างกลมถึงกลมรี มีสีขาวผิวเปลือกค่อนข้างเรียบ เนื้อในมีสีขาว ไม่มียาง แหล่งที่พบ พบได้ในป่าของพม่า ไทย และลาว ถิ่นที่อยู่คือที่ราบเชิงเขา กวาวเครือขาวเป็นพืชที่ต้องการแสงแดดรำไรถึงค่อนข้างมาก จึงพบมากในบริเวณป่าเต็งรังหรือป่าโปร่งในประเทศไทยพบได้ในจังหวัดกาญจนบุรี ตาก ลำปาง เชียงใหม่ สระบุรี ลพบุรี ชัยภูมิ เป็นต้น



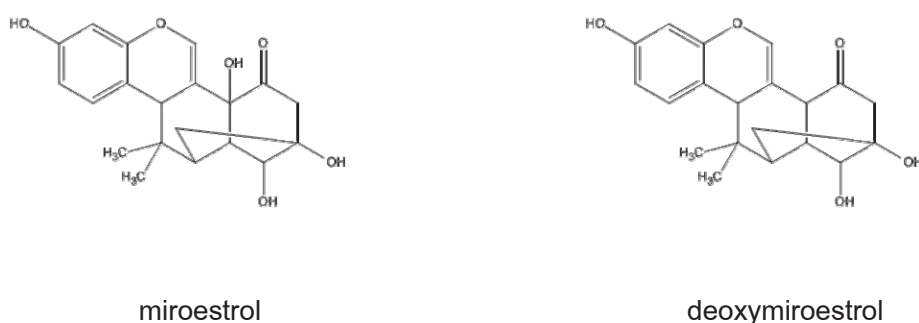
รูปที่ 1 ลักษณะของต้นกวาวเครือขาว

3. องค์ประกอบทางเคมี

หัวกวาวเครือขาวมีองค์ประกอบหลักเป็นสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ (isoflavonoids) (รูปที่ 2) โดยแบ่งเป็น กลุ่ม isoflavones glycosides ได้แก่ puerarin, daidzin และ genistin กลุ่ม isoflavones ได้แก่ daidzein และ genistein (Chansakaow *et al.*, 2000a) กลุ่ม chromenes ได้แก่ miroestrol และ deoxymiroestrol (Chansakaow *et al.*, 2000b) (รูปที่ 3) ซึ่งสารเหล่านี้มีฤทธิ์เป็นไฟโตเอสโตรเจน (phytoestrogen) หรือฮอร์โมนเอสโตรเจนจากพืช โดยสารในกลุ่ม chromenes เป็นกลุ่มที่มีฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนสูงกว่ากลุ่มอื่นๆ แต่พบปริมาณน้อยในธรรมชาติ (0.002-0.004%)



รูปที่ 2 โครงสร้างของสารกลุ่ม isoflavonoid ที่พบในกวาวเครือขาว



รูปที่ 3 สูตรโครงสร้างของสารกลุ่ม chromenes

4. ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

จากการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาจากสารสกัดกาวเครือขาวพบว่า มีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนในเซลล์เพาะเลี้ยงและสัตว์ทดลอง (Chansakaew *et al.*, 2000a, 2000b; Trisomboon *et al.*, 2006; Cherdshewasart *et al.*, 2007a; Cherdshewasart *et al.*, 2008) โดยมีผลในการป้องกันการสูญเสียกระดูกในหนูที่ตัดรังไข่ (Urasopon *et al.*, 2008) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงประสิทธิภาพและความปลอดภัยเพื่อนำมาใช้เป็นฮอร์โมนทดแทนในสตรีวัยทอง (Chandeying, Lamlerkittikul, 2007; Manonai *et al.*, 2008) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระซึ่งฤทธิ์ดังกล่าวสัมพันธ์กับปริมาณสารไอโซฟลาโวนอยด์ puerarin ที่พบในกาวเครือขาว (Cherdshewasart, Sutjit, 2008)

4.1 ฤทธิ์ป้องกันการเกิดโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน (*acute ischemic myocardial injury*)

Wu และคณะ (2007) ทำการทดสอบดำรับที่ผสมระหว่าง puerarin และ danshensu ในหนูทดลองที่ถูกผูกหลอดเลือดหัวใจ left anterior descending (LAD) เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด พบว่าการให้สารผสม puerarin และ danshensu ในอัตราส่วน 1:1 สามารถลดพื้นที่ที่เกิดกล้ามเนื้อหัวใจตายลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

4.2 ฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือด

Khitka และคณะ (2009) ศึกษาฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของสารสกัดหัวกาวเครือขาว โดยให้สารสกัดกาวเครือขาวปริมาณ 100 mg/kg แก่หนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นโรคเบาหวาน ชนิดที่ 1 ด้วย streptozotocin เป็นเวลาติดต่อกัน 30 วัน พบว่าสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นเดียวกับหนูกลุ่มที่ได้รับ glibenclamide 10 mg/kg เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำกลั่น 2 ml/kg

4.3 ฤทธิ์ป้องกันการสูญเสียมวลกระดูกในหญิงวัยหมดประจำเดือน

Morabito และคณะ (2002) ทำการทดสอบผลของ genistein ต่อมวลกระดูกในหญิงวัยหมดประจำเดือน โดยแบ่งอาสาสมัครออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนทดแทนประกอบด้วย estradiol 1mg/day ผสมกับ norethisterone กลุ่มที่ได้รับ genistein 54 mg/day และกลุ่มควบคุมที่ได้รับยาหลอก ติดต่อกันเป็นเวลา 1 ปี พบว่า กลุ่มคนไข้ที่ได้รับฮอร์โมนทดแทนและกลุ่มที่ได้รับ genistein มีค่าความหนาแน่นมวลกระดูก (Bone Mass Density, BMD) สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับยาหลอก โดยทำการวัดความหนาแน่นมวลกระดูกของ femoral neck, Ward's triangle และ lumbar spine อีกทั้งกลุ่มที่ได้รับ genistein ไม่พบอาการข้างเคียง คือ มีเลือดประจำเดือนกระปริดกระปรอย

5. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นกวาวเครือขาว

จากรายงานการศึกษาพบว่าสารกลุ่ม isoflavonoid ในกวาวเครือขาวที่ปลูกในประเทศไทยจากแหล่งต่างๆ มีปริมาณโดยเฉลี่ยดังนี้ puerarin 0.23 mg/g, daidzin 0.15 mg/g, genistin 0.35 mg/g, daidzein 0.06 mg/g และ genistein 0.01 mg/g น้ำหนักแห้ง (Cherdshewasart *et al.*, 2007b) จะเห็นได้ว่าสารสำคัญกลุ่ม isoflavonoid ที่พบในหัวกวาวเครือขาวจะมีความแปรปรวนอย่างมากตามสภาวะแวดล้อมทำให้ปริมาณสารที่ได้นั้นไม่มีความแน่นอน ปัจจุบันได้มีการประยุกต์ใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในการเพาะเลี้ยงพืชสมุนไพรเพื่อผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายชนิด สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกวาวเครือขาวมีผู้ทำการศึกษาดังนี้

ชุตินา อ้อมกิ่ง (2546) ได้ทำการศึกษาการเพิ่มปริมาณของกวาวเครือขาวในสภาพปลอดเชื้อ โดยทำการเพาะเลี้ยงส่วนตาข้างในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร woody plant medium (WPM) ที่มีฮอร์โมนชนิดต่างๆ พบว่า การเจริญเติบโตของแคลลัสในชั้นส่วนตาข้างที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM ที่มีฮอร์โมน naphthaleneacetic acid (NAA) 0.1 mg/l และ kinetin 1.5 mg/l แคลลัสที่ได้มีการเจริญเติบโตดีที่สุด

บุญส่ง หวังสินทวีกุล (2546) ได้ทำการเพาะเลี้ยงแคลลัสและเซลล์แขวนลอยกวาวเครือขาวต่อการผลิตสาร daidzein และ genistein พบว่า แคลลัสมีการสร้างสาร daidzein 7.6 mg/g และ genistein 0.5 mg/g น้ำหนักแห้ง เซลล์แขวนลอยมีการสร้างสาร daidzein 30.7 mg/g และ genistein 4.9 mg/g น้ำหนักแห้ง

Thanonkeo, Panichajakul (2006) ได้ทำการศึกษา โดยทำการเพาะเลี้ยงแคลลัสและศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต อุณหภูมิ ส่วนต่างๆ ของพืชที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสและให้ปริมาณสาร daidzein และ genistein มากที่สุด และเปรียบเทียบปริมาณสาร daidzein และ genistein ที่ได้จากแคลลัส กับหัวใต้ดินตามธรรมชาติ พบว่า แคลลัสที่ได้ให้ปริมาณสาร daidzein และ genistein มากกว่าหัวธรรมชาติ 50-200 เท่า โดยมีปริมาณ daidzein 5.12 mg/g น้ำหนักแห้งและ genistein 2.77 mg/g น้ำหนักแห้ง

สุภารัตน์ ถนนแก้ว (2549) ได้ทำการศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการกระตุ้นและสารกระตุ้นที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและผลิต สาร daidzein และ genistein ในเซลล์แขวนลอยพบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมที่สามารถกระตุ้นให้แคลลัสเจริญเติบโตและสร้างสารได้มากที่สุด คือ 12 วัน โดยการใช้สารกระตุ้น methyl jasmonate มีผลในการกระตุ้นการสร้างสาร daidzein และ genistein มากขึ้นเป็น 6 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงรากลอยของกวาวเครือขาวโดยพบว่ารากลอยที่ได้สร้างสาร daidzein 5.92 mg/g และ genistein 0.46 mg/g น้ำหนักแห้ง

Korsangruang และคณะ (2010) ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยกวาวเครือขาว ในอาหารเหลว MS ผสม 6-Benzyladenine (BA) ความเข้มข้น 0.56 μM และ 2,4-

dichlorophenoxyacetic acid ความเข้มข้น 4.52 μM ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ $25 \pm 3^\circ\text{C}$ และแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ในเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 110 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 วัน แล้วเติมสารกระตุ้นชนิดต่างๆ ได้แก่ CuSO_4 , methyl jasmonate, chitosan หรือ laminarin ในความเข้มข้นต่างๆ กัน หลังจากนั้น 21 วัน พบว่า เซลล์แขวนลอยกวาวเครือขาวที่ให้ปริมาณสารกลุ่ม isoflavonoid สูงที่สุด เท่ากับ 40.49 mg/g น้ำหนักแห้ง คือกลุ่มที่ได้สารกระตุ้น methyl jasmonate ความเข้มข้น 2.0 μM

ปัจจุบันวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อผลิตสารทุติยภูมิโดยการเหนี่ยวนำให้เกิดรากลอย โดยใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium rhizogenes* เป็นอีกแนวทางหนึ่งในการเพิ่มปริมาณของพืชที่สนใจศึกษา เพื่อให้ได้สารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ในระยะเวลาอันสั้น เนื่องจากรากลอยมีความสามารถในการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วและมีศักยภาพในการทำงานต่อเนื่องในเรื่องเกี่ยวกับพันธุกรรมมาใช้ประโยชน์เพื่อการเพิ่มผลผลิตในการสร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในพืช โดยการผลิตรากลอยจึงเป็นวิธีที่มีข้อดีเหนือกว่าพืชปกติ เนื่องจากรากลอยจะมีความต้านทานต่อการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและสามารถหาจุดที่ได้ผลการทดลองสูงสุด เช่น การหาสูตรอาหารหรือการเติมสารกระตุ้นต่างๆ ที่ให้ผลสูงสุดทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพ อีกทั้งยังเป็นแนวทางในการนำไปประยุกต์เพื่อศึกษาชีวสังเคราะห์ในการสร้างสารดังกล่าวในพืชโดยใช้รากลอยเป็นแบบอย่างในการผลิต จะเห็นได้ว่าจากรายงานการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกวาวเครือขาวจะพบในรูปแบบการเพาะเลี้ยงแคลลัส การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยและการเพาะเลี้ยงรากลอย โดยทำการศึกษาผลต่อการสร้างสาร daidzein และ genistein ซึ่งเป็นกลุ่ม isoflavonoids ในรูปแบบของ aglycone ที่พบในกวาวเครือขาว (บุญส่ง หวังสินทวีกุล, 2546; สударัตน์ ถนอมแก้ว, 2549; Thanonkeo, Panichajakul, 2006) แต่ยังไม่มีความรู้ของการศึกษาผลของสูตรอาหาร ปริมาณน้ำตาลและสารกระตุ้นในการเพาะเลี้ยงรากลอยต่อการสร้างสารกลุ่ม isoflavonoid หลักที่พบในกวาวเครือขาวในรูปแบบของ isoflavones glycosides ซึ่งเป็นรูปแบบที่พบมากในธรรมชาติ ได้แก่ puerarin, daidzin, genistin ร่วมกับรูปแบบของ isoflavones ได้แก่ daidzein และ genistein

6. การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่ม isoflavonoid ในกวาวเครือขาว

วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่ม isoflavonoid ที่พบในกวาวเครือขาวเพื่อใช้เป็นมาตรฐานในกวาวเครือขาวได้มีรายงานการตรวจสอบสารกลุ่ม isoflavonoid ได้แก่ puerarin, daidzin, genistin, daidzein และ genistein โดยใช้วิธี HPLC (Cherdshewasart et al., 2007b) ปัจจุบันวิธีการวิเคราะห์ทางด้านอิมมูโนโลยี โดยใช้แอนติบอดีเพื่อใช้ตรวจสอบสารสำคัญในสมุนไพรเป็นวิธีการที่มีความแม่นยำสูงเนื่องจากความสามารถในการจับกับสารได้อย่างจำเพาะเจาะจงและสามารถทำการวิเคราะห์ได้จำนวนมากเนื่องจากมีความสะดวกและรวดเร็วและสามารถวิเคราะห์ได้โดยไม่ต้องเตรียมตัวอย่างก่อน สำหรับการผลิตแอนติบอดีต่อสารกลุ่ม

isoflavonoid ได้มีการศึกษาวิจัยในแง่ของการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงต่อสาร daidzein และ genistein ซึ่งเป็นสารกลุ่ม isoflavone และประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบโดยวิธี ELISA (Kohen *et al.*, 1998; Tao He *et al.*, 2005; Bennetau-Pelissero *et al.*, 2003) สำหรับการผลิตแอนติบอดีต่อสาร daidzin ซึ่งเป็นสารกลุ่ม isoflavone glycosides และเป็นกลุ่มหลักที่พบในกาวเครือขาวนั้นในขณะนี้ยังไม่มีผู้ทำการศึกษา จึงเป็นที่น่าสนใจในการประยุกต์ใช้แอนติบอดีต่อสารดังกล่าว มาทำการพัฒนาวิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA เพื่อใช้ในการหาปริมาณสารกลุ่ม isoflavonoid และใช้ตรวจสอบโดยการหาทั้งทางด้านปริมาณและคุณภาพเป็นอย่างดี เนื่องจากสามารถหาปริมาณได้ในระยะเวลาอันสั้นและมีประสิทธิภาพสูงและนำไปประยุกต์ใช้ในการหาปริมาณสารกลุ่ม isoflavonoid รวมที่พบในพืชทั้งจากต้นธรรมชาติและในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

7. ผลของกาวเครือขาวต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450

ในปัจจุบันมีการใช้กาวเครือขาวในทางด้านยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารอย่างแพร่หลาย ทั้งนี้ส่วนใหญ่การใช้สมุนไพรจะมีการใช้ติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน ดังนั้นจึงควรต้องตระหนักถึงการศึกษาผลของสมุนไพรต่อร่างกายทั้งในแง่เภสัชวิทยาและพิษวิทยา (กนกวรรณ จารุกัจร และ เทวราช หล้าหา, 2547) โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลต่อกระบวนการเปลี่ยนแปลงยาในร่างกาย เอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักที่ทำหน้าที่ในกระบวนการดังกล่าว เทคนิค alkoxyresorufin O-dealkylation เป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะสูงที่นิยมนำมาใช้ทดสอบสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ในปัจจุบัน (Burke, 1976) โดยเทคนิคนี้จะอาศัยความจำเพาะของสับสเตรทต่อไอโซฟอรมเฉพาะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 และในปัจจุบันยังไม่มีรายงานการศึกษาผลของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงกาวเครือขาวต่อเอนไซม์ที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงยา ดังนั้นการศึกษาผลของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงกาวเครือขาวต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ที่เกี่ยวข้องจึงมีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อให้ได้ข้อมูลเบื้องต้นนำไปสู่การศึกษาผลของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงกาวเครือขาวต่อกลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ในระดับอณูชีววิทยาต่อไป

ดังนั้นจึงทำการศึกษาสภาวะในการเพาะเลี้ยงกาวเครือขาวเพื่อผลิตสารทุติยภูมิที่สำคัญโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกาวเครือในอาหารเพาะเลี้ยงสังเคราะห์ที่มีการเปลี่ยนแปลงฮอร์โมนในอาหารเพาะเลี้ยงสูตรต่างๆ เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการเหนี่ยวนำให้เกิดรากลอย แคลลัสและต้นอ่อน โดยทำการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและการสร้างสารสำคัญและทำการตรวจสอบหาปริมาณสารสำคัญกลุ่ม isoflavonoid ได้แก่ puerarin, daidzin, genistin, daidzein และ genistein จากรากลอย แคลลัสและต้นอ่อน รวมทั้งเปรียบเทียบศักยภาพในการผลิตสารทุติยภูมิของเนื้อเยื่อจากการเพาะเลี้ยงและการเพาะปลูกจากธรรมชาติ การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงต่อสารกลุ่ม isoflavonoid ที่พบ

ในกาวเครือขาวเพื่อพัฒนาวีธีวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่มนี้ นอกจากนี้ยังทำการศึกษาผลของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงกาวเครือขาวต่อเอนไซม์ที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงยาเพื่อเป็นข้อมูลในการใช้สมุนไพรชนิดนี้ต่อไป

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรกวาวเครือขาว

1.1 การเพาะเลี้ยงแคลลัส

1.1.1 การเพาะเมล็ดกวาวเครือขาวให้ได้ต้นอ่อนที่ปลอดเชื้อ

เมล็ดกวาวเครือขาวได้จากสวนสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น นำมาทำการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ โดยทำการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณส่วนผิวของเมล็ด กวาวเครือขาวด้วยน้ำยา sodium hypochloride 10% เป็นเวลา 20 นาที และใน ethanol 70% เป็นเวลา 1 นาที แล้วทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร $\frac{1}{2}$ MS โดยทำการเพาะเลี้ยงในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 1 °C และแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน

1.1.2 การเหนี่ยวนำให้เกิดแคลลัส

นำต้นอ่อนกวาวเครือขาวที่เพาะเลี้ยงไว้ทั้งส่วนใบและส่วนลำต้นมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ชิ้นละประมาณ 1 เซนติเมตร จากนั้นนำไปวางบนอาหารที่มีฮอร์โมน NAA, BA และ TDZ ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 1) ทำการเพาะเลี้ยงในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 1 °C และแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน สังเกตการเปลี่ยนแปลงหลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ สรุปเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส ต้นอ่อนและจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืช

ตารางที่ 1 ชนิดและปริมาณของฮอร์โมนในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS

สูตรอาหาร	ฮอร์โมน (mg/l)		
	TDZ	NAA	BA
TDZ _{0.1}	0.1	-	-
TDZ _{0.5}	0.5	-	-
TDZ _{1.0}	1.0	-	-
TDZ _{1.5}	1.5	-	-
N _{0.5} B _{1.0}	-	0.5	1.0
N _{1.0} B _{0.5}	-	1.0	0.5
N _{1.0} B _{1.0}	-	1.0	1.0

1.1.3 การหาปริมาณสารกลุ่ม isoflavonoids

นำแคลลัสและต้นอ่อนที่ได้ในแต่ละสูตรอาหารมาทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 50°C ซึ่งน้ำหนัก 30 mg จากนั้นทำการสกัดด้วย methanol ครั้งละ 500 μ l จำนวน 4 ครั้ง สารสกัดที่ได้นำมาทำให้แห้งและละลายใน methanol 1 ml สารสกัดที่ได้นำไปหาปริมาณสารกลุ่ม isoflavonoid puerarin, daidzin, genistin, daidzein และ genistein ในแคลลัสและต้นอ่อนด้วยวิธี HPLC (High performance liquid chromatography) โดยมีสภาวะในการวิเคราะห์ดังนี้

High performance liquid chromatography PerkinElmer Series 200 LC pump และ PerkinElmer 785A UV/VIS detector, PE Nelson computer

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

Mobile phase : acetonitrile : water 25 : 75 v/v , 1.5 % acetic acid

Flow rate : 1.0 ml/min

Detector wavelength : 254 nm

Injection volume : 20 μ l

1.2 การเพาะเลี้ยงรากลอย

1.2.1 การเหนี่ยวนำให้เกิดรากลอยของต้นกวาวเครือขาว

ต้นอ่อนของกวาวเครือขาวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนำมาทำการกระตุ้นให้เกิดรากลอยโดยใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium rhizogenes* (ATCC 15834) ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร yeast extract broth (YEB) ที่ 28°C เป็นเวลา 2 วัน แล้วทำให้บริเวณลำต้นและใบของต้นไม่เกิดบาดแผลโดยใช้เข็มฉีดยาที่จุ่มสารละลายของแบคทีเรียเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดรากลอย จากนั้น นำไปทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร 1/2 MS ที่มี cefotaxime 500 mg/l โดยวัตถุประสงค์ในการเติม cefotaxime เพื่อทำการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *Agrobacterium* หลังจากที่แบคทีเรียทำให้เซลล์พืชเกิดการกระตุ้นให้เกิดรากลอย ทำการเพาะเลี้ยงโดยควบคุมอุณหภูมิให้ได้ 25 $\pm$ 1°C เป็นเวลา 2-4 สัปดาห์ ทำการตัดรากลอยที่ได้ไปทำการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร 1/2 MS ที่มี cefotaxime 300 mg/l และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นทำการย้ายรากลอยที่ได้ลงในอาหารสูตร 1/2 MS ที่มี cefotaxime 100 mg/l แล้วเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ย้ายรากลอยลงในอาหารสูตร 1/2 MS ที่ไม่มี cefotaxime และทำการตรวจสอบสารกลุ่ม isoflavonoid ที่พบในรากลอยโดยใช้วิธี HPLC

1.2.2 การตรวจสอบยีนในรากลอยโดยวิธี *polymerase chain reaction (PCR)*

การตรวจสอบยีน *rolA* ในรากลอยสามารถทำการตรวจสอบได้โดยการสกัดดีเอ็นเอ (DNA) จากรากลอยโดยใช้ชุดสกัด DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) จากนั้นนำ DNA ที่ได้ไปทำการตรวจสอบยีนด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ดังนี้

rolA1 5'-CAGAATGGAATTAGCCGGACTA-3'

rolA2 5'-CGTATTAATCCCGTAGGTTTGT-3'

สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเครื่อง Thermal cycler มีดังนี้ 94°C 2 นาที, 58°C 2 นาที และ 72°C 2 นาที 1 รอบ ตามด้วย 94°C 1 นาที, 58°C 1 นาที และ 72°C 2 นาที, 24 รอบ จากนั้นทำการตรวจสอบ DNA ที่ได้โดยวิธี electrophoresis โดยใช้ agarose gel 1.5% จากนั้นทำการย้อมด้วย ethidium bromide และส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 260 nm

1.2.3 การศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของสารกระตุ้นต่อการสร้างสารกลุ่ม *isoflavonoid* ในรากลอย

นำรากลอยมาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวโดยทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารกลุ่ม *isoflavonoid* ในรากลอยโดยทำการเพาะเลี้ยงรากลอยในสูตรอาหารเหลว ½ MS บนเครื่องเขย่า อัตรา 100 รอบ/นาที โดยทำการเพาะเลี้ยงในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±1 °C และแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน จากนั้นทำการศึกษาผลของสารกระตุ้นชนิดต่างๆ ต่อการสร้างสารกลุ่ม *isoflavonoid* ในรากลอย โดยศึกษาชนิดและระยะเวลาที่เหมาะสมในการกระตุ้นโดยทำการเพาะเลี้ยงรากลอยเป็นเวลา 21 วันแล้วทำการเติมสารกระตุ้นชนิดต่างๆ ลงไป ได้แก่ methyl jasmonate, yeast extract, chitosan, salicylic acid และ *Agrobacterium rhizogenes* lysate จากนั้นเก็บรากลอยมาทำการชั่งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งและวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่ม *isoflavonoid* วันที่ 3 และ 6 หลังจากเติมสารกระตุ้น โดยความเข้มข้นของสารกระตุ้นชนิดต่างๆ มีดังนี้

1. methyl jasmonate (50, 100, 200 µM)
2. yeast extract (0.5, 1, and 2 mg/ml)
3. chitosan (50, 100, 150 mg/l)
4. salicylic acid (50, 100, 200 µM)
5. *A. rhizogenes* lysate (1, 2, 3%, v/v)

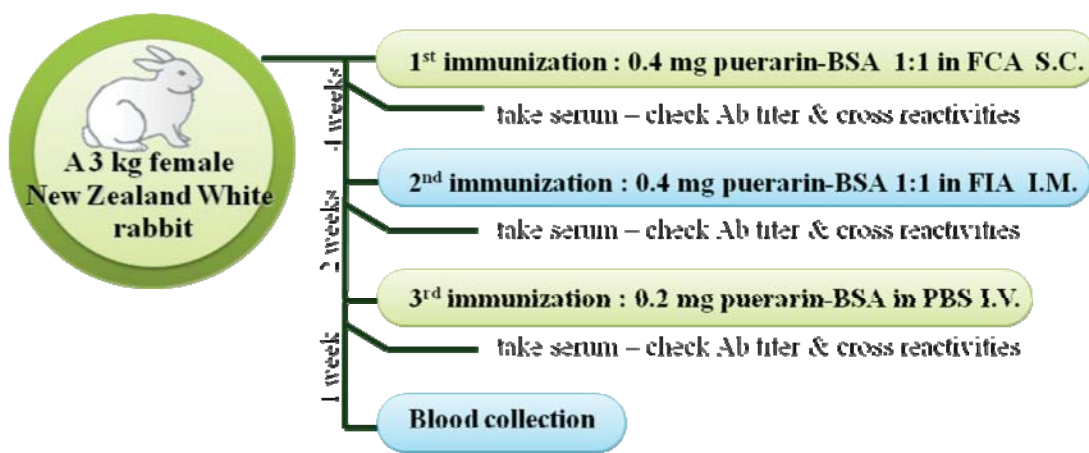
2. การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีและพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารกลุ่ม isoflavonoid ด้วยวิธี ELISA

2.1 การเตรียมแอนติเจน (antigen)

นำสาร daidzin และ puerarin ซึ่งใช้เป็นแอนติเจนมาทำการเชื่อมต่อกับโปรตีนที่มีโมเลกุลใหญ่เพื่อสร้างแฮปเทน (hapten) โดยทำการเชื่อมต่อกับโปรตีน bovine serum albumin (BSA) และ human serum albumin (HSA) โดยนำมาทำปฏิกิริยากับสาร sodium periodate (NaIO_4) ทำการเชื่อมต่อกับโปรตีน จากนั้นทำการตรวจสอบเพื่อยืนยันการเชื่อมต่อกับโปรตีนโดยใช้วิธี MALDI mass spectroscopy และคำนวณจำนวนแฮปเทนที่ได้จากการเชื่อมต่อ

2.2 การกระตุ้นกระต่ายให้สร้างแอนติบอดี (immunization)

- ทำการฉีดสารกระตุ้นเข้าที่บริเวณใต้ผิวหนัง (s.c.) กระต่าย (New Zealand White) โดยทำการฉีดร่วมกับ Freund's complete adjuvant
- หลังจากการกระตุ้นครั้งแรก 4 สัปดาห์ ทำการฉีดสารกระตุ้นครั้งที่ 2 เข้าที่บริเวณกล้ามเนื้อส่วนขาของกระต่าย (i.m.) โดยทำการฉีดร่วมกับ Freund's incomplete adjuvant ชนิด จากนั้น 1 สัปดาห์ นำซีรัม (serum) หนูที่ได้รับการฉีดสารกระตุ้นมาทำการตรวจสอบการเกิดแอนติบอดีโดยวิธี direct ELISA และ competitive ELISA
- ทำการฉีดสารกระตุ้นครั้งที่ 3 เข้าที่บริเวณเส้นเลือดของกระต่าย (i.v.) จากนั้น 1 สัปดาห์ นำซีรัม (serum) หนูที่ได้รับการฉีดสารกระตุ้นมาทำการตรวจสอบการเกิดแอนติบอดีโดยวิธี direct ELISA และ competitive ELISA
- เก็บเลือดจากกระต่ายเพื่อนำไปแยกให้บริสุทธิ์และตรวจสอบคุณสมบัติของแอนติบอดีที่ได้ แผนภาพการกระตุ้นกระต่ายให้สร้างแอนติบอดีแสดงดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 การกระตุ้นแอนติบอดีในกระต่าย

2.3 การทำให้แอนติบอดีบริสุทธิ์

นำเลือดกระต่ายที่ได้มาปั่นแยกซีรัมและนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ protein G column ในการแยกแอนติบอดีชนิด IgG ออกมาโดยอาศัยหลักการในการจับกับ Fc ของแอนติบอดีและแยกสารออกมาโดยใช้สารบัฟเฟอร์ (buffer) ที่มี pH ต่ำ

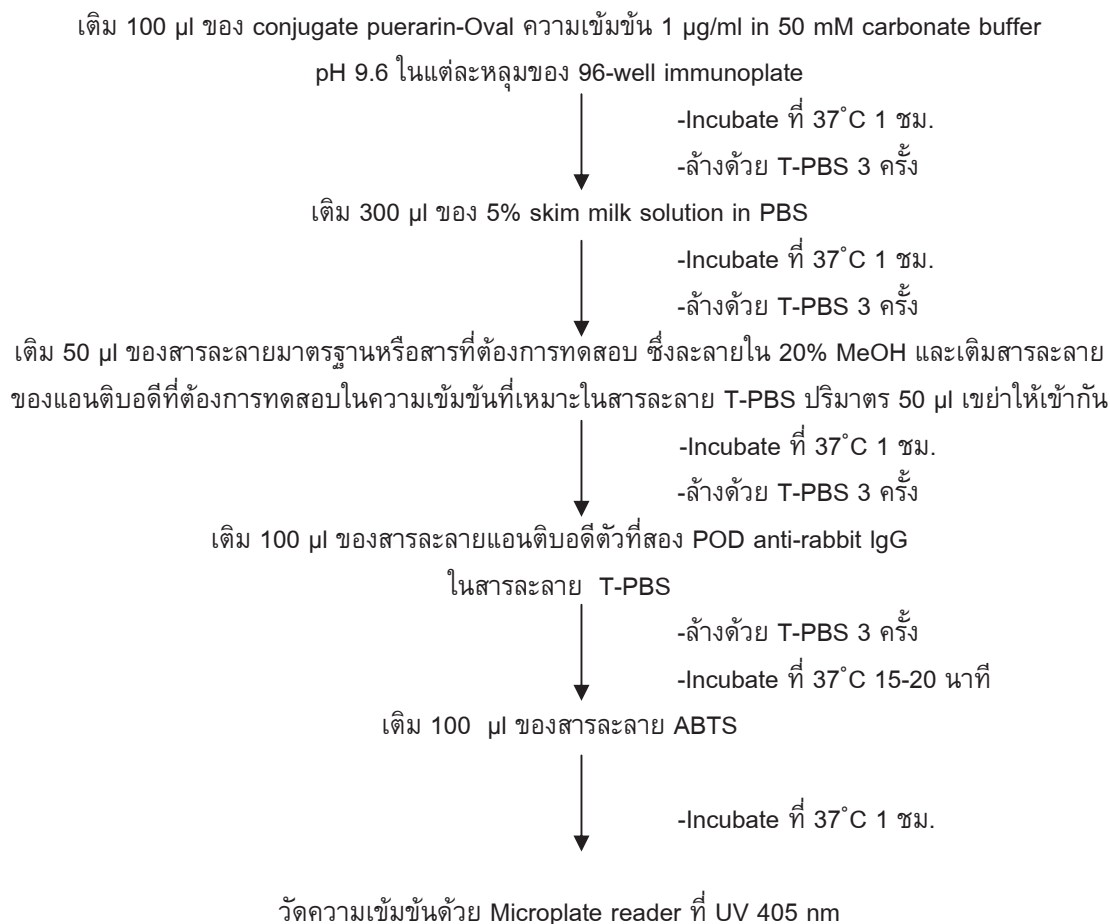
2.4 ตรวจสอบคุณสมบัติของแอนติบอดี

นำแอนติบอดีที่ได้ไปตรวจสอบคุณสมบัติในการจับกับสาร daidzin, puerarin และสารอื่นที่มีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงกันโดยวิธี competitive ELISA (รูปที่ 5) จากนั้นทำการคำนวณค่า cross reactivity ของแอนติบอดีที่ได้

2.5 พัฒนาวิธีวิเคราะห์สารกลุ่ม isoflavonoid โดยวิธี ELISA

ทำการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณสาร isoflavonoid ด้วยวิธี competitive ELISA โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้และตรวจสอบหาปริมาณสาร isoflavonoid ที่พบในพืชสมุนไพรกวาวเครือขาว

ขั้นตอนการวิเคราะห์หาปริมาณสาร isoflavonoid ด้วยวิธี competitive ELISA แสดงดัง แผนภาพที่ 5



รูปที่ 5 ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี competitive ELISA

2.6 การตรวจรับรองความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation)

ทำการตรวจรับรองความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โดย ELISA ในการหาปริมาณสารกลุ่ม
isoflavonoid โดยวัดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้

ความเที่ยง (precision)

ทำการวิเคราะห์สารกลุ่ม isoflavonoid ตัวอย่างละ 3 ครั้ง เปรียบเทียบการวิเคราะห์
ภายใน 96-well plate เดียวกัน (intra assay) และ ระหว่าง plate (inter assay) แล้วนำผล
วิเคราะห์หาคำนวณหา % RSD

ความแม่นยำ (accuracy)

ตรวจสอบความแม่นยำโดยวิธี recovery method โดยเติม สาร isoflavonoid ในตัวอย่างรากกวาวเครือขาวและสกัดด้วยวิธีเดียวกับตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณโดยวิธี ELISA

จากนั้นทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่ม isoflavonoid ที่พบในกวาวเครือขาวส่วนต่างๆ ด้วยวิธี ELISA และวิธี HPLC ทำการเปรียบเทียบค่าการวิเคราะห์ที่ได้กับวิธีที่พัฒนาขึ้น โดยดูจากค่าความสัมพันธ์ที่ได้

3. ศึกษาผลของรากพะเลียงเนื้อเยื่อกวาวเครือขาวต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 และการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของอวัยวะที่เกี่ยวข้อง

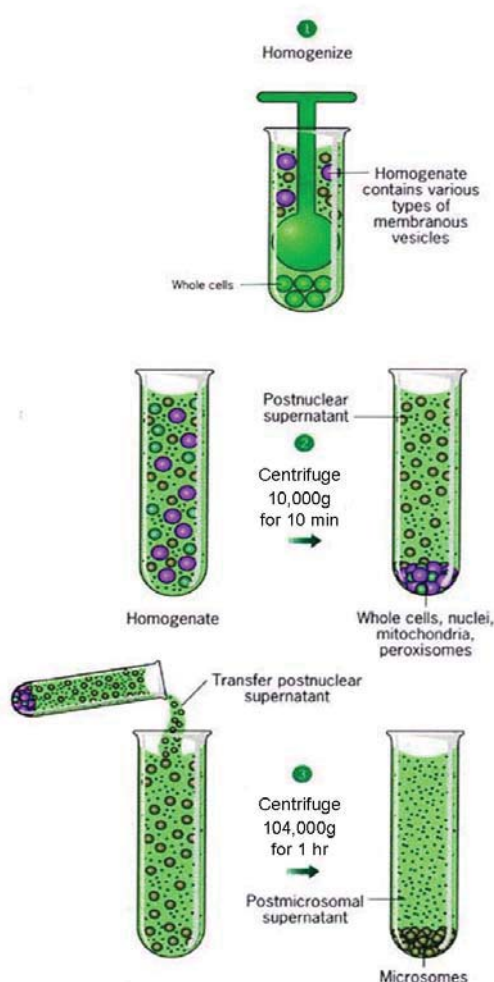
3.1 สัตว์ทดลอง

หนูไมซ์ สายพันธุ์ ICR อายุ 8 สัปดาห์ เพศผู้และเพศเมีย แบ่งออกเป็นเพศละ 6 กลุ่มๆ ละ 5 ตัว ดังนี้

- | | |
|------------|--|
| กลุ่มที่ 1 | กลุ่มควบคุมได้รับอาหารและน้ำดื่มตามปกติแต่ไม่ให้อาหารหรือยาใดๆ |
| กลุ่มที่ 2 | กลุ่มควบคุมเชิงบวกที่ 1 ให้ฮอร์โมนเอสตราไดโอด (estradiol benzoate) ขนาด 0.2 mg/kg/day โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (s.c.) ทุกวัน ติดต่อกันนาน 1 สัปดาห์ |
| กลุ่มที่ 3 | กลุ่มควบคุมเชิงบวกที่ 2 ให้ฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน (testosterone propionate) ขนาด 5 mg/kg/day โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (s.c.) ทุกวัน ติดต่อกันนาน 1 สัปดาห์ |
| กลุ่มที่ 4 | กลุ่มทดลองที่ 1 ให้ผงรากพะเลียงเนื้อเยื่อกวาวเครือขาว ขนาด 500 mg/kg/day โดยการป้อนทางปาก (p.o.) ทุกวัน ติดต่อกันนาน 1 สัปดาห์ |
| กลุ่มที่ 5 | กลุ่มทดลองที่ 2 ให้ผงรากพะเลียงเนื้อเยื่อกวาวเครือขาว ขนาด 500 mg/kg/day การป้อนทางปาก (p.o.) ทุกวัน ติดต่อกันนาน 2 สัปดาห์ |
| กลุ่มที่ 6 | กลุ่มทดลองที่ 3 ให้ผงรากพะเลียงเนื้อเยื่อกวาวเครือขาว ขนาด 500 mg/kg/day โดยการป้อนทางปาก (p.o.) ทุกวัน ติดต่อกันนาน 4 สัปดาห์ |

3.2 เตรียมไมโครโซมจากสัตว์ทดลอง

ภายหลังจากที่ครบกำหนดการให้สารหรือยาครบ 24 ชั่วโมง ทำการสลบสัตว์ทดลองด้วย Ketamine และทำการแยกเก็บตับของสัตว์ทดลองที่ -80 องศา เพื่อเตรียมไมโครโซม (Jarukamjorn *et al.*, 1999) (รูปที่ 6) ทำการบันทึกขนาดและชั่งน้ำหนักมดลูก (uterus) ของหนูเพศเมีย ตลอดจนสังเกตและบันทึกการเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางกายภาพของตับและไตของสัตว์ทดลอง จากนั้นทำการเตรียมไมโครโซมจากตับสัตว์ทดลองแต่ละตัวและวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของแบรดฟอร์ด (Bradford, 1976)



รูปที่ 6 ขั้นตอนการเตรียมไมโครโซมจากตับ

3.3 การเตรียมอาร์เอ็นเอรวม (total RNA)

เนื้อเยื่อตับ (ประมาณ 10 mg) นำมาทำการบดโดยใช้สารละลาย Trizol[®] จากนั้นเติม chloroform ลงในเนื้อเยื่อเขย่าและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 15,000 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที นำชั้นบนใสใน microtube อันใหม่ เติม isopropyl alcohol ลงไปทำการปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 15,000 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที จะได้ตะกอนของ RNA นำไปทำให้แห้งและละลายด้วย 0.5% SDS จากนั้นนำไปวัดความเข้มข้นของ RNA ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 nm

3.4 ตรวจสอบผลของรากแพะเลียงต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450

ทดสอบผลต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450, CYP2B ด้วยเทคนิค Penthoxyresorufin O-depentylation (PROD) และ benzyloxyresorufin O-dealkylation (BROD) alkoxyresorufin O-dealkylation (Sakuma *et al.*, 1999; Jarukamjorn *et al.*, 2002)

3.5 การตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของเอนไซม์ CYP2B9 mRNA โดยใช้วิธี การ

ทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบเวลาจริง (real time polymerase reaction)

ปริมาณ RNA รวมที่แยกได้นำไปสังเคราะห์ cDNA และเพิ่มปริมาณโดยใช้ TaKaRa[®] RT-PCR kit (Perfect Real Time) TaqMan[®] Gene Expression Assays (Inventoried) สำหรับ CYP2B9 (Mm00657910_ml) สภาวะที่ใช้ในการตรวจสอบมีดังนี้ 94°C 2 นาที, 58°C 2 นาที และ 72°C 2 นาที 1 รอบ 95°C, 35 วินาที และ 60°C, 90 วินาที DNA ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณนำไปตรวจสอบโดยปริมาณโดยใช้ fluorescence reporter dye (FAM) (Jaruchotikamol *et al.*, 2007)

3.6 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลจะใช้ one-way analysis of variance (ANOVA) ตามด้วย Fisher's least significant difference (LSD) และ independent sample T Test ($P < 0.05$ หรือ $P < 0.01$)

บทที่ 4

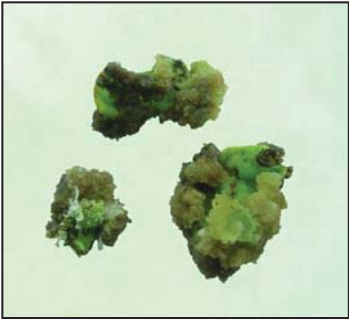
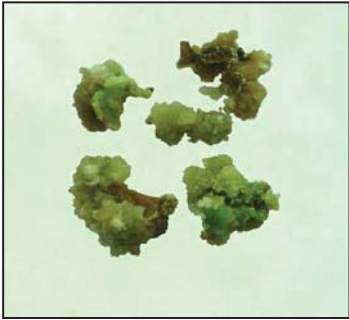
ผลการวิจัย

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรกวาวเครือขาว

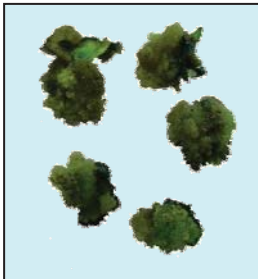
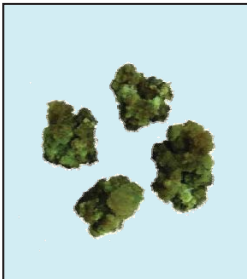
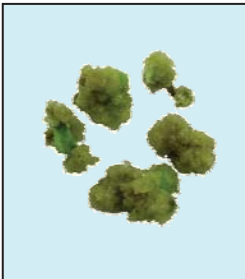
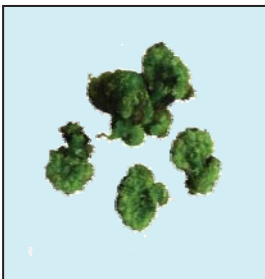
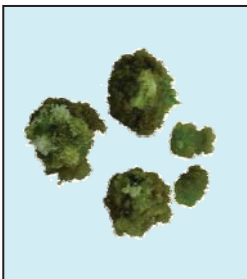
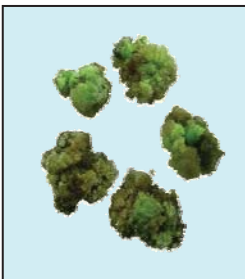
1.1 การเพาะเลี้ยงแคลลัส

1.1.1 ผลของสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเกิดแคลลัส ยอด และการสร้างสาร *isoflavonoid*

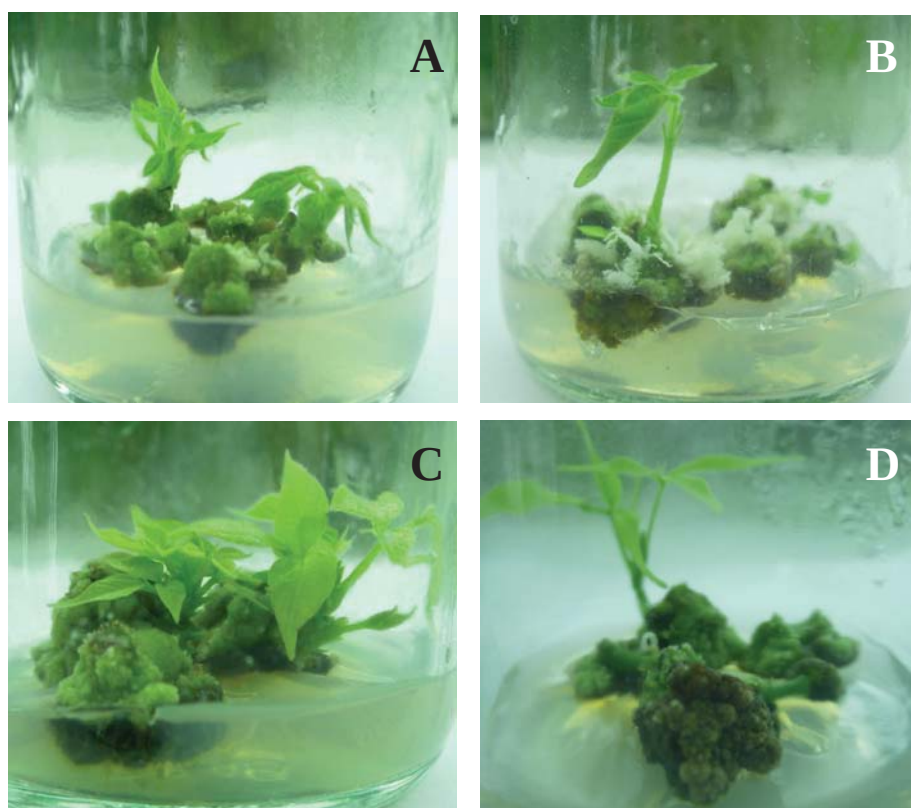
สูตรอาหารที่ประกอบไปด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 3 ชนิด คือ NAA, BA, และ TDZ ในสัดส่วนที่ต่างกัน ส่งผลต่อการเกิดแคลลัส ยอด จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืช แสดงดังตารางที่ 2 ลักษณะของแคลลัสและยอดอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแสดงดังรูปที่ 7-9

N _{0.5} B ₁		N ₁ B _{0.5}		N ₁ B ₁	
					
Leaf	71.88%	Leaf	93.75%	Leaf	100.00%
					
Stem	87.50%	Ste	100.00%	Ste	100.00%

รูปที่ 7 แสดงลักษณะของแคลลัสที่ได้จากอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มีฮอร์โมน NAA และ BA

	TDZ _{0.1}	TDZ _{0.5}	TDZ _{1.0}	TDZ _{1.5}
				
Leaf	84.38 %	65.63%	75.00%	87.50%
				
Stem	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%

รูปที่ 8 แสดงลักษณะของแคลลัสที่ได้จากอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มีฮอร์โมน TDZ



รูปที่ 9 ลักษณะของยอดอ่อนจากอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มีฮอร์โมน

(A) NAA 0.5 mg/ml และ BA 1.0 mg/ml

(B) NAA 1.0 mg/ml และ BA 0.5 mg/ml

(C) TDZ 0.5 mg/ml

(D) TDZ 1.5 mg/ml

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส ยอดอ่อนและจำนวนยอดอ่อนต่อชิ้นส่วนพืชที่มีอายุ 8 สัปดาห์

ฮอร์โมนพืช (mg/l)			ก้าน/ใบ ^a	เปอร์เซ็นต์การเกิด	เปอร์เซ็นต์การเกิด	จำนวนยอดต่อ ชิ้นส่วนพืช
NAA	BA	TDZ		แคลลัส (%)	ยอด (%)	
-	-	0.1	ก้าน	100.00	-	-
			ใบ	84.38	-	-
-	-	0.5	ก้าน	100.00	15.62	1.40
			ใบ	65.62	-	-
-	-	1.0	ก้าน	100.00	-	-
			ใบ	75.00	-	-
-	-	1.5	ก้าน	100.00	3.12	1.00
			ใบ	87.50	-	-
0.5	1.0	-	ก้าน	87.50	3.12	2.00
			ใบ	71.88	-	-
1.0	0.5	-	ก้าน	100.00	6.25	3.00
			ใบ	93.75	-	-
1.0	1.0	-	ก้าน	100	-	-
			ใบ	100	-	-

^a n = 32

จากตารางที่ 2 แสดงให้เห็นว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนก้านในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่มี TDZ 0.5 mg/l ให้ผลการศึกษาที่ดีที่สุด คือสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดแคลลัสได้ 100% เหนี่ยวนำให้เกิดยอดได้ 15.63% นอกจากนี้ยังพบว่า สูตรอาหารที่มี TDZ จะสามารถเกิดแคลลัสได้สูงถึง 100% ทุกความเข้มข้นเมื่อใช้ส่วนก้านเป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในการเหนี่ยวนำให้เกิดแคลลัส จากการศึกษาปริมาณสารกลุ่ม isoflavonoid คือ puerarin, daidzin, genistin, daidzein, และ genistein ในแคลลัสจากส่วนก้าน และใบ ด้วยวิธี HPLC พบว่า แคลลัสที่เกิดจากส่วนก้าน ในอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยฮอร์โมน TDZ ความเข้มข้น 0.5 mg/l สามารถสร้างสารกลุ่ม isoflavonoid ได้มากที่สุด ได้ปริมาณสารกลุ่ม isoflavonoid ทั้งหมด 50.39 ± 7.06 mg/g น้ำหนักแห้ง (puerarin 3.05 ± 0.58 , daidzin 39.58 ± 4.71 , genistin 5.64 ± 1.31 , daidzein 0.68 ± 0.42 , และ genistein 0.44 ± 0.09 mg/g น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ) ดังแสดงในตารางที่ 3 ปริมาณ isoflavonoid ที่พบในแคลลัสจากการศึกษาครั้งนี้มีปริมาณสูงกว่าที่พบในหัวกวาวเครือขาวจากธรรมชาติถึง 7 เท่า (7.04 ± 0.29 mg/g น้ำหนักแห้ง) นอกจากนี้ยังพบว่า สูตรอาหารที่มีฮอร์โมน TDZ จะสามารถผลิตสารกลุ่ม isoflavonoid ได้สูงกว่าสูตรอาหารที่มีฮอร์โมน BA และ NAA

ตารางที่ 3 ปริมาณสารกลุ่ม isoflavonoid ในแคลลัสที่มีอายุ 8 สัปดาห์

ฮอร์โมนพืช (mg/l)			ก้าน/ ใบ	ปริมาณสารกลุ่ม isoflavonoid (mg/g dry wt)					
NAA	BA	TDZ		Puerarin	Daidzin	Genistin	Daidzein	Genistein	Total
-	-	0.1	ก้าน	0.34 ± 0.01	40.37 ± 2.21	5.01±0.32	1.31 ± 0.33	0.38 ± 0.09	47.43 ± 2.65
			ใบ	0.34 ± 0.01	22.05 ± 0.85	2.61±0.24	1.17 ± 0.07	0.59 ± 0.02	26.76 ± 1.05
-	-	0.5	ก้าน	3.05 ± 0.58	39.58 ± 4.71	5.64±1.31	0.68 ± 0.42	0.44 ± 0.09	50.39 ± 7.06
			ใบ	0.35 ± 0.01	32.46 ± 6.64	4.54±0.48	1.42 ± 0.35	0.62 ± 0.06	39.37 ± 7.52
-	-	1.0	ก้าน	2.32 ± 0.02	24.11 ± 0.93	3.54±0.55	1.39 ± 0.16	0.42 ± 0.07	31.79 ± 1.35
			ใบ	1.42 ± 0.10	18.99 ± 1.27	2.73±0.61	0.92 ± 0.04	0.39 ± 0.02	24.45 ± 2.00
-	-	1.5	ก้าน	2.11 ± 0.21	24.34 ± 2.40	3.70±0.20	1.35 ± 0.22	0.34 ± 0.33	31.85 ± 2.25
			ใบ	1.75 ± 0.10	19.46 ± 2.18	2.96±0.14	1.08 ± 0.19	0.42 ± 0.14	25.67 ± 2.07
0.5	1.0	-	ก้าน	1.58 ± 0.07	15.71 ± 0.93	1.78±0.36	0.66 ± 0.08	0.34 ± 0.04	20.07 ± 1.16
			ใบ	2.21 ± 0.38	30.90 ± 4.64	5.08±0.85	1.21 ± 0.28	0.49 ± 0.04	39.91 ± 6.14
1.0	0.5	-	ก้าน	1.32 ± 0.03	11.69 ± 0.73	1.30±0.01	0.66 ± 0.04	0.35 ± 0.04	15.32 ± 0.80
			ใบ	1.93 ± 0.18	22.49 ± 1.34	2.49±0.30	0.91 ± 0.16	0.44 ± 0.02	28.26 ± 1.57
1.0	1.0	-	ก้าน	1.34 ± 0.14	8.03 ± 0.82	1.05±0.19	0.49 ± 0.02	0.30 ± 0.01	11.21 ± 1.15
			ใบ	1.34 ± 0.13	12.11 ± 2.26	1.51±0.39	0.86 ± 0.26	0.39 ± 0.07	16.22 ± 3.05

Values represent the mean ± S.D. (n = 3)

1.2 การเพาะเลี้ยงรากลอย

1.2.1 การเหนี่ยวนำให้เกิดรากลอยของต้นกวาวเครือขาว

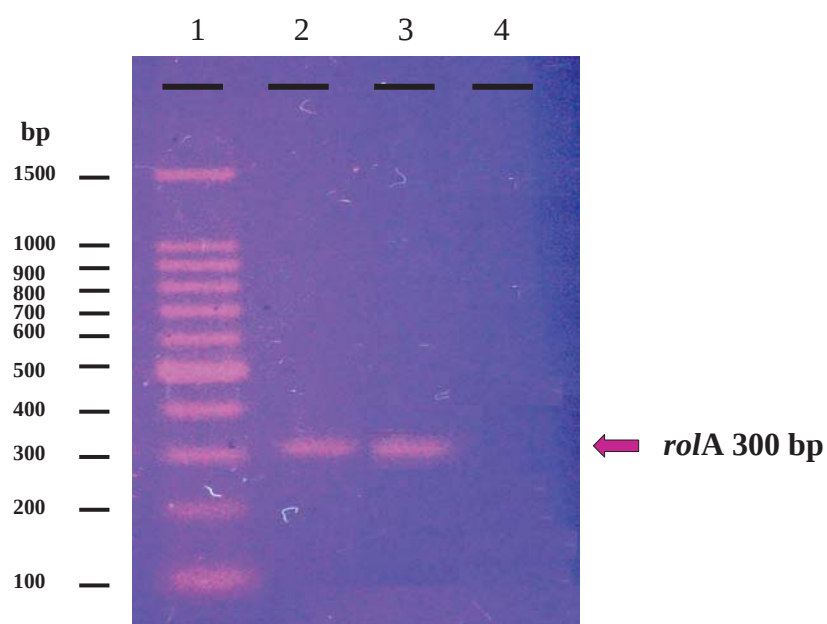
ทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดของกวาวเครือขาวในสภาพปลอดเชื้อ โดยทำการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณส่วนผิวของเมล็ดกวาวเครือขาวด้วยน้ำยา sodium hypochloride 10% เป็นเวลา 20 นาที และใน ethanol 70% เป็นเวลา 1 นาที แล้วทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร ½ MS โดยทำการเพาะเลี้ยงในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±1°C และแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน นำต้นอ่อนที่ได้มาทำการทดลองเพื่อกระตุ้นให้เกิดรากลอย โดยใช้แบคทีเรีย *A. rhizogenes* จากการศึกษาพบว่า รากลอยที่ได้สามารถแตกกิ่งก้านสาขาและสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วแสดงดังรูปที่ 10



รูปที่ 10 รากลอยต้นกวาวเครือขาว

1.2.2 การตรวจสอบยีน *rolA*

รากลอยที่ได้นำมาทำการสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณโดยวิธี PCR เพื่อตรวจสอบยีน *rolA* จากการตรวจสอบพบว่า รากลอยที่ได้สามารถตรวจพบยีน *rolA* โดยพบแถบ DNA ที่ 300 คู่เบส ตามที่คาดไว้ (รูปที่ 11) จากนั้นนำรากลอยมาทำการเพิ่มปริมาณและศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการสร้างสารกลุ่ม isoflavonoid

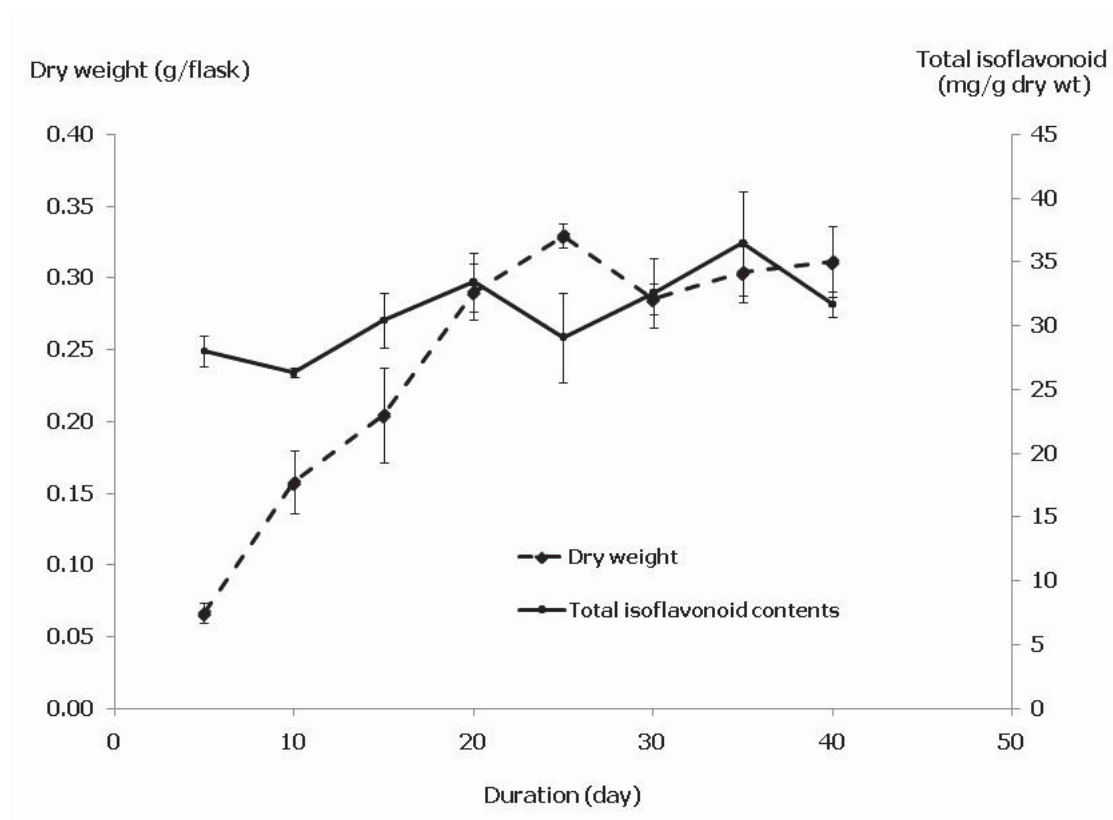


รูปที่ 11 แสดงดีเอ็นเอของยีน *rolA* ที่ได้จาก PCR

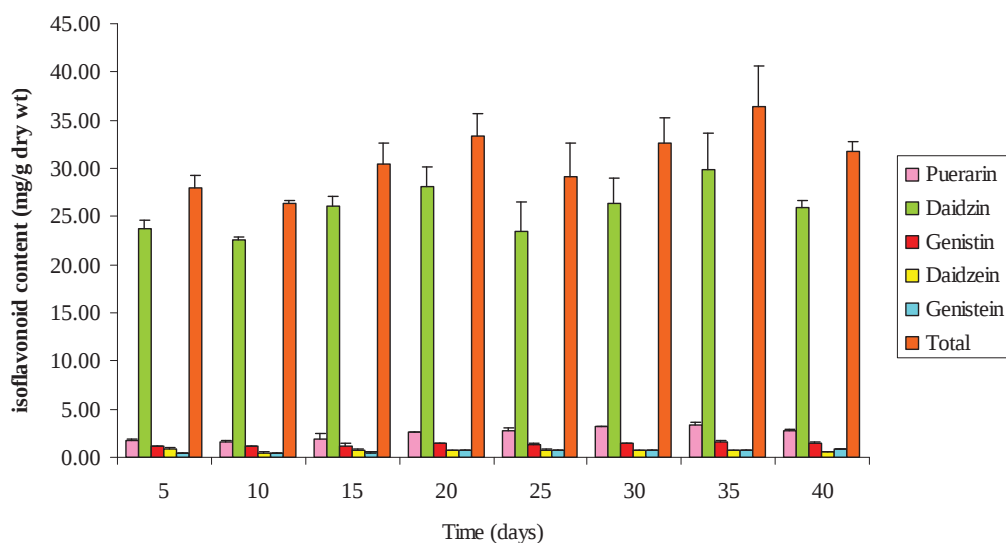
แถวที่ 1: MW 100-bp ladder; แถวที่ 2: DNA จาก *A. rhizogenes* ACTT 15834 (positive control); แถวที่ 3: hairy roots ; แถวที่ 4 non-transformed roots

1.2.2 การหาอัตราการเจริญเติบโต สูตรอาหารที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและการสร้างสาร isoflavonoid ในรากลอย

รากลอยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร ½ MS โดยทำการเพาะเลี้ยงในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ และแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน นำมาทำการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตและการสร้างสารกลุ่ม isoflavonoid โดยผลการศึกษาดังรูปที่ 12 และ 13 จากนั้นทำการศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารกลุ่ม isoflavonoid โดยทำการศึกษาผลของสูตรอาหารต่อการสร้างสาร isoflavonoid ผลการศึกษา แสดงดังตารางที่ 4 จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้น พบว่า สูตรอาหาร woody plant (WP) ส่งผลให้รากลอยกวางเครือขาวผลิตสารกลุ่ม isoflavonoid ได้มากที่สุดคือ ได้ปริมาณสาร isoflavonoid ทั้งหมด 26.39 ± 3.80 mg/g น้ำหนักแห้ง



รูปที่ 12 แสดงอัตราการเจริญเติบโตและปริมาณสาร isoflavonoid ในรากลอย



รูปที่ 13 แสดงการสร้างสารกลุ่ม isoflavonoid ในรากลอยกวาวเครือขาวที่ระยะเวลาต่าง ๆ

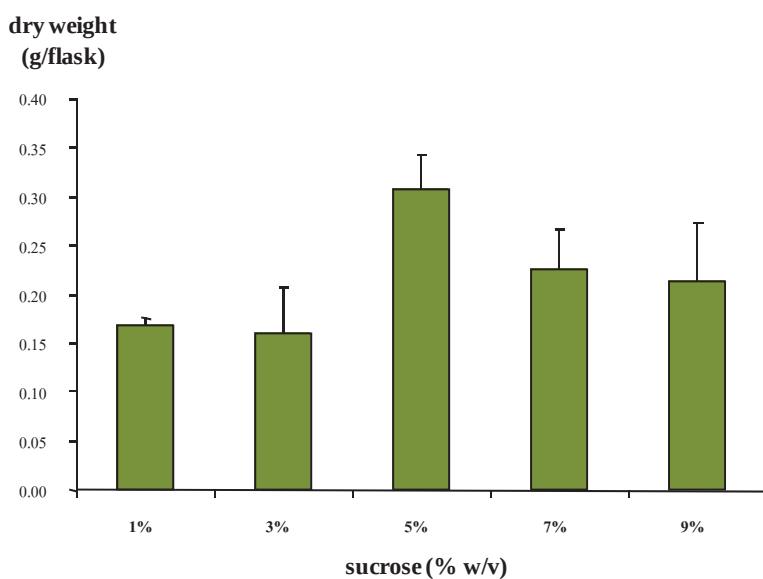
ตารางที่ 4 ผลของสูตรอาหารต่อการสร้างสารกลุ่ม isoflavonoid

Isoflavonoid	ปริมาณสารกลุ่ม isoflavonoid (mg/g dry wt)						
	½ MS	½ MS (dark)	MS	B5	½ B5	WP	½WP
Puerarin	2.22± 0.04	2.65±0.12	2.37±0.15	2.13±0.48	2.29±0.22	1.90±0.21	2.16±0.21
Daidzin	17.71±3.15	19.49±2.56	17.55±3.86	11.62±2.23	14.44±1.05	22.33±3.40	7.24±0.90
Genistin	1.09±0.05	1.16±0.07	1.02±0.13	0.95±0.16	1.09±0.05	1.14±0.13	0.70±0.04
Daidzein	0.72±0.01	1.04±0.05	0.67±0.06	0.85±0.12	0.73±0.03	0.51±0.01	1.63±0.05
Genistein	0.58±0.06	0.60±0.03	0.61±0.03	0.58±0.04	0.66±0.02	0.51±0.04	0.47±0.01
Total isoflavonoid	22.32±3.30	24.94±2.83	22.20±4.24	16.12±3.02	19.21±1.37	26.39±3.80	12.20±1.20

Values represent the mean ± S.D. (n = 3)

1.2.3 ผลของปริมาณน้ำตาลต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสาร isoflavonoid ในรากลอย

จากการศึกษาผลของปริมาณน้ำตาลในอาหารเพาะเลี้ยงต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสาร isoflavonoid ในรากลอย โดยทำการเติมน้ำตาลในปริมาณที่แตกต่างกันตั้งแต่ 1-9% พบว่าปริมาณน้ำตาล 5% จะมีผลทำให้รากลอยเกิดการเจริญเติบโตและสร้างสาร isoflavonoid ได้ดีที่สุด (รูปที่ 14 และ ตารางที่ 5)



รูปที่ 14 ผลของน้ำตาลต่อการเจริญเติบโตของรากลอย

ตารางที่ 5 ผลของน้ำตาลต่อการสร้างสารกลุ่ม isoflavonoid ในรากลอย

ความเข้มข้นของ น้ำตาล (w/v)	ปริมาณสารกลุ่ม isoflavonoid (mg/g dry wt)					
	Puerarin	Daidzin	Genistin	Daidzein	Genistein	Total
1%	2.51±0.35	16.78±3.57	1.04±0.12	0.94±0.08	0.48±0.02	21.76±4.16
3%	2.22±0.04	17.71±3.15	1.09±0.05	0.72±0.01	0.58±0.06	22.32±3.30
5%	2.71±0.25	25.67±2.70	1.40±0.11	0.51±0.01	0.59±0.03	30.87±3.10
7%	2.18±0.09	21.32±3.32	1.21±0.09	0.44±0.01	0.57±0.01	25.73±3.52
9%	2.25±0.29	24.62±3.42	1.20±0.16	0.44±0.00	0.63±0.04	29.14±3.91

Values represent the mean ± S.D. (n = 3)

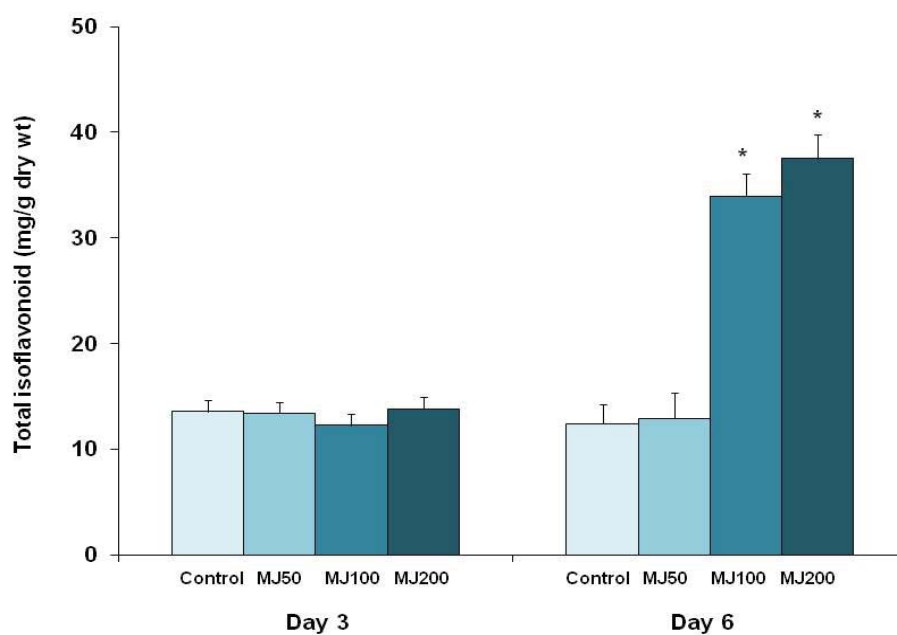
1.2.4 ผลของสารกระตุ้นต่อการสร้างสาร isoflavonoid ในรากลอยกวาวเครือขาว

การศึกษาผลของสารกระตุ้นชนิดและความเข้มข้นต่างๆ ต่อการสร้างสารกลุ่ม isoflavonoid ในรากลอยกวาวเครือขาว เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่น่าสนใจในการศึกษาในแง่ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อผลิตสารทุติยภูมิ สารกระตุ้นที่ใช้ในการศึกษารากลอยกวาวเครือขาว ได้แก่ methyl jasmonate, yeast extract, chitosan, salicylic acid และ *Agrobacterium* โดยทำ

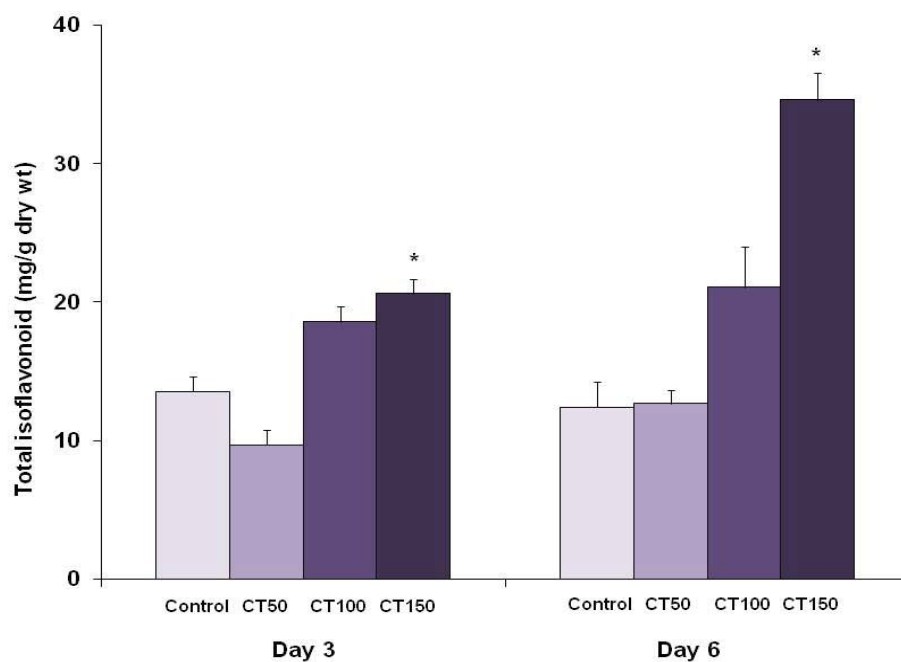
การเพาะเลี้ยงรากลอยในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร $\frac{1}{2}$ MS เป็นเวลา 21 วัน จากนั้นเติมสารกระตุ้นชนิดต่าง ๆ ในอาหารที่ทำการเพาะเลี้ยงและทำการเก็บรากลอยภายหลังจากการเติมสารกระตุ้นเป็นเวลา 3 และ 6 วัน โดยช่วงเวลา 21 วัน เป็นระยะที่รากลอยกวาวเครือขาวอยู่ในช่วงปลายของการเจริญเติบโตแบบเพิ่มจำนวน (late log phase) ซึ่งเป็นระยะที่รากลอยมีความพร้อมในการผลิตสารทุติยภูมิและสามารถตอบสนองต่อสารกระตุ้นได้ดี ผลการศึกษาพบว่า สารกระตุ้นที่ใช้ทุกชนิดมีผลในการกระตุ้นการสร้างสารกลุ่ม isoflavonoid ในรากลอยกวาวเครือขาว (รูปที่ 15-19)

จากรูปที่ 15 แสดงให้เห็นว่า methyl jasmonate สามารถกระตุ้นการสร้างสาร isoflavonoid ภายหลังจากการเติมสารกระตุ้นลงไป 6 วัน โดยความเข้มข้นที่ดีที่สุดในการกระตุ้นคือ 200 μ M ภายหลังจากการกระตุ้น 6 วัน ได้ปริมาณสาร isoflavonoid 37.5 ± 2.2 mg/g น้ำหนักแห้ง อย่างไรก็ตามไม่พบการกระตุ้นสารกลุ่ม isoflavonoid เมื่อเติม methyl jasmonate ไป 3 วัน ในทุกความเข้มข้น การกระตุ้นโดยใช้สาร chitasan (รูปที่ 16) พบว่า chitasan จะสามารถกระตุ้นการสร้างสารกลุ่ม isoflavonoid ได้มากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ chitasan เพิ่มขึ้น (50-150 mg/l) โดย chitasan ที่ความเข้มข้น 150 mg/l ที่ 6 วันหลังจากเติมสารกระตุ้น จะให้ปริมาณสาร isoflavonoid สูงสุดคิดเป็น 34.5 ± 2 mg/g น้ำหนักแห้ง สาร salicylic acid ที่ความเข้มข้น 100 mM เมื่อเติมลงไป 3 วัน ให้ปริมาณสาร isoflavonoid ดีที่สุดคือ 37.5 ± 2.2 mg/g น้ำหนักแห้ง (รูปที่ 17) สำหรับการกระตุ้นสารกระตุ้น *Agrobacterium* การเติม *Agrobacterium* ที่ความเข้มข้น 2% (v/v) ลงไป 6 วัน จะให้ปริมาณสาร isoflavonoid ดีที่สุดคือ 21 ± 3.3 mg/g น้ำหนักแห้ง (รูปที่ 18)

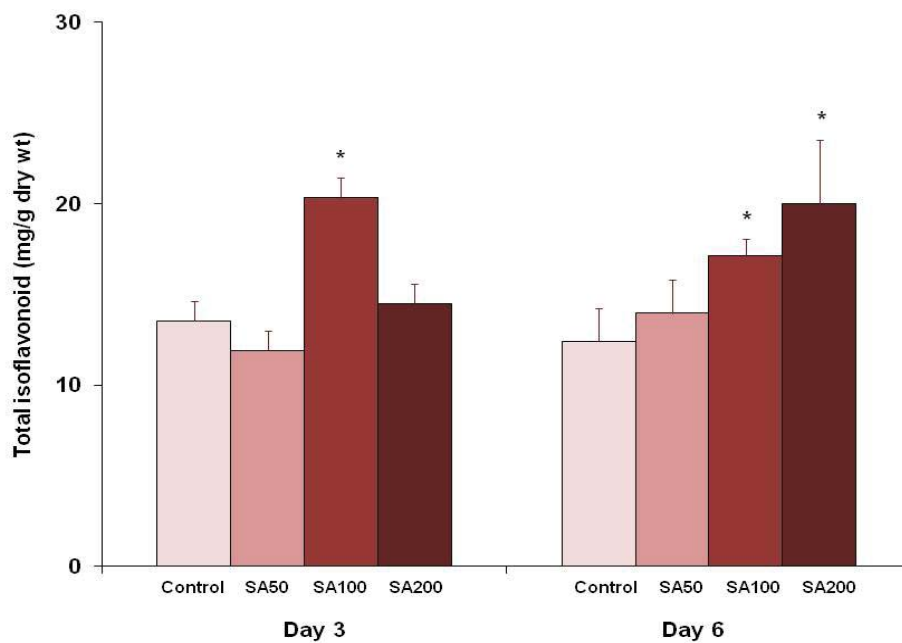
สารกระตุ้นที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มการสร้างสารมากที่สุดจากการศึกษาผลของสารกระตุ้นทั้ง 5 ชนิด คือ yeast extract ที่ความเข้มข้น 0.5 mg/ml ภายหลังจากเติมสารกระตุ้นลงไปเป็นเวลา 3 วัน สารกลุ่ม isoflavonoid ที่ได้จากการกระตุ้นมีปริมาณสูงถึง 60 mg/g น้ำหนักแห้ง (รูปที่ 19) เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาผลของสารกระตุ้นต่อการสร้างสาร isoflavonoid ในเซลล์แขวนลอยกวาวเครือขาว (Korsangruang *et al.*, 2010) พบว่า การศึกษาที่ได้จากการกระตุ้นในรากลอยมีปริมาณสาร isoflavonoid สูงกว่า นอกจากนี้ยังพบว่า การศึกษานี้สามารถกระตุ้นการผลิตสารในรากลอยสูงกว่าการศึกษาในพืช *Pueraria* สปีชีส์อื่น (Goyal and Ramawat, 2008; Kirakosyan *et al.*, 2006)



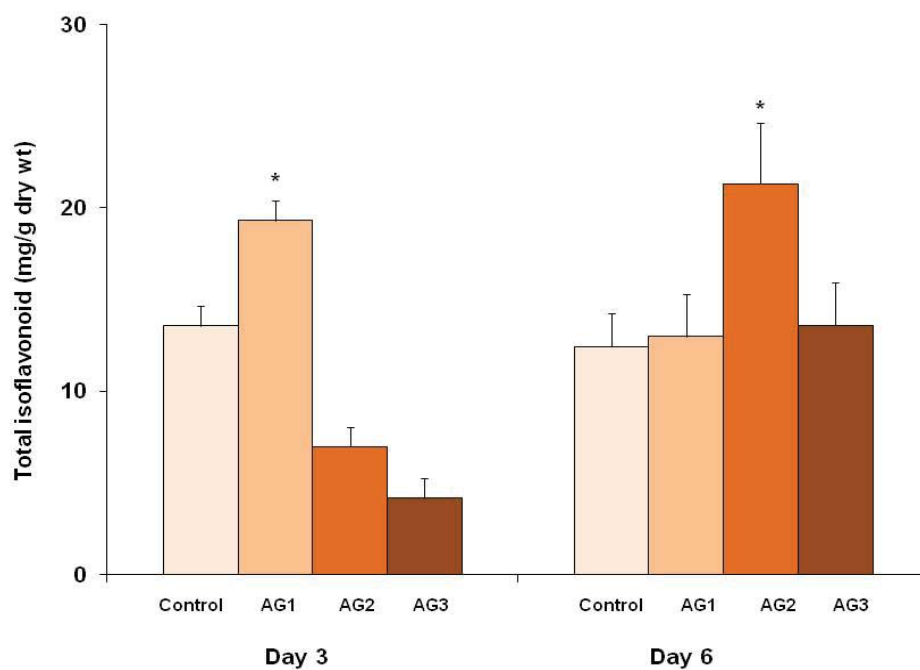
รูปที่ 15 ผลของ methyl jasmonate ต่อการสร้างสารกลุ่ม isoflavonoid ในรากลอยกวาวเครือขาว



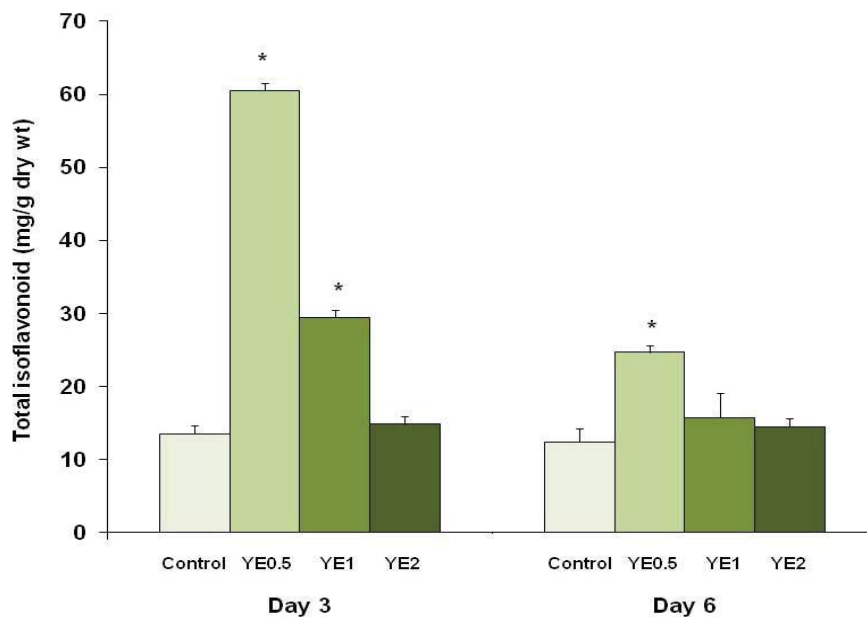
รูปที่ 16 ผลของ chitosan ต่อการสร้างสารกลุ่ม isoflavonoid ในรากลอยกวาวเครือขาว



รูปที่ 17 ผลของ salicylic acid ต่อการสร้างสารกลุ่ม isoflavonoid ในรากลอยกวาวเครือขาว



รูปที่ 18 ผลของ *Agrobacterium* ต่อการสร้างสารกลุ่ม isoflavonoid ในรากลอยกวาวเครือขาว

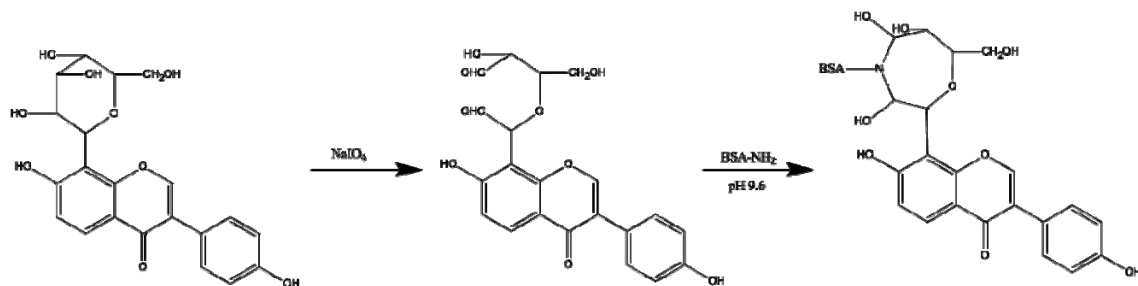


รูปที่ 19 ผลของสาร yeast extract ต่อการสร้างสารกลุ่ม isoflavonoid ในรากลอยกวาวเครือขาว

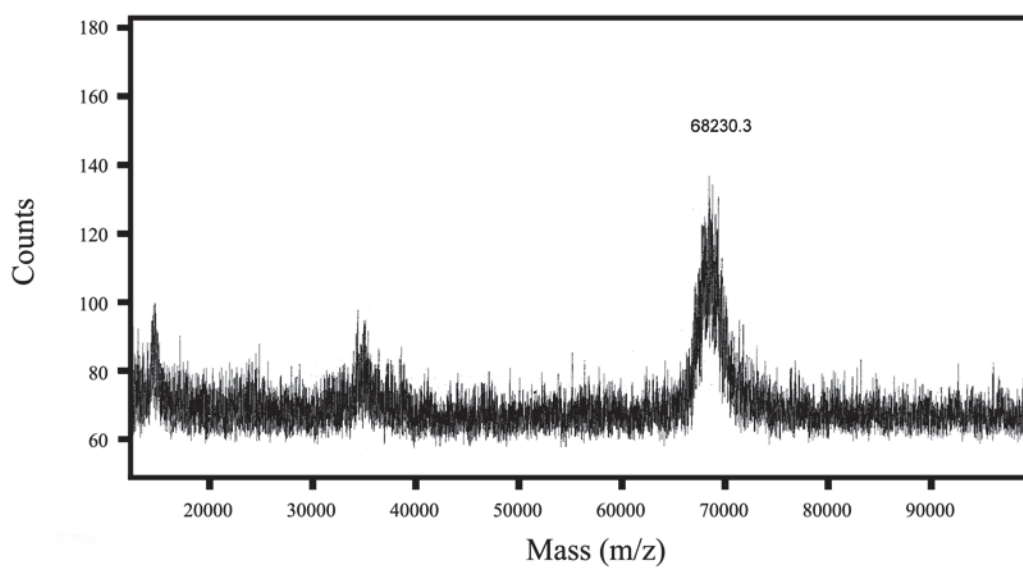
2. การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีและพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารกลุ่ม isoflavonoid ด้วยวิธี ELISA

2.1 การสังเคราะห์ hapten ของสาร puerarin และ daidzin และทำการเชื่อมต่อกับโปรตีน

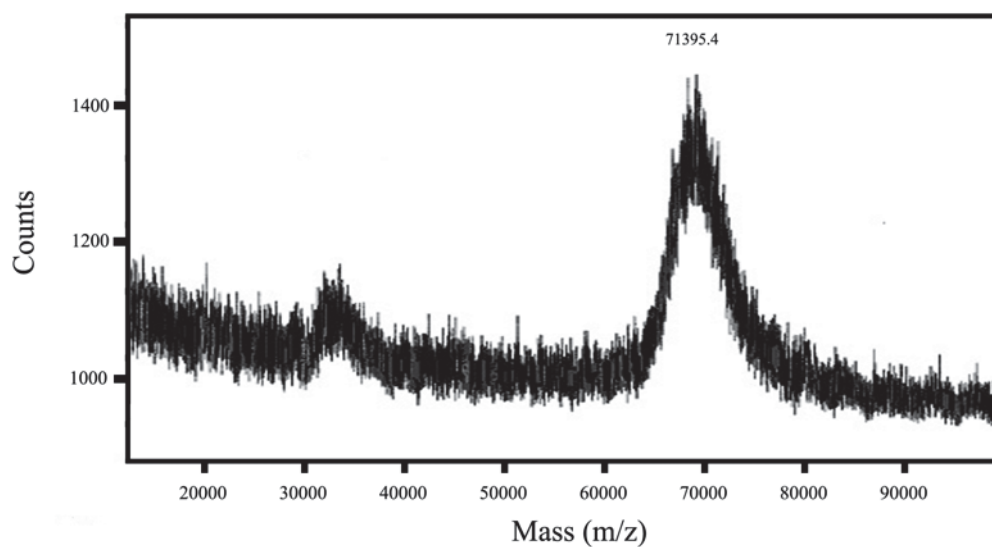
นำสาร puerarin และสาร daidzin ซึ่งใช้เป็นแอนติเจนมาทำการเชื่อมต่อกับโปรตีนที่มีโมเลกุลใหญ่เพื่อสร้างแฮปเทน (hapten) โดยทำการเชื่อมต่อกับโปรตีน bovine serum albumin (BSA) และ human serum albumin (HSA) โดยนำมาทำปฏิกิริยากับสาร sodium periodate (NaIO_4) เพื่อทำการเชื่อมต่อกับโปรตีนบริเวณโมเลกุลของน้ำตาล (รูปที่ 20) และทำการตรวจสอบเพื่อยืนยันการเชื่อมต่อกับโปรตีนโดยใช้วิธี MALDI mass spectroscopy จากนั้นทำการคำนวณจำนวนแฮปเทนที่ได้จากการเชื่อมต่อ จากผลการตรวจสอบโดย MALDI mass พบว่า puerarin-BSA hapten number เป็น 4 และ daidzin-BSA มีค่า hapten number เป็น 11 ซึ่งอยู่ในช่วงที่เหมาะสมในการนำไปกระตุ้นการผลิต antibody ในกระต่าย (รูปที่ 21 และ 22)



รูปที่ 20 การเชื่อมต่อกับโปรตีน BSA



รูปที่ 21 MALDI-TOF-MS spectrum ของ puerarin-BSA



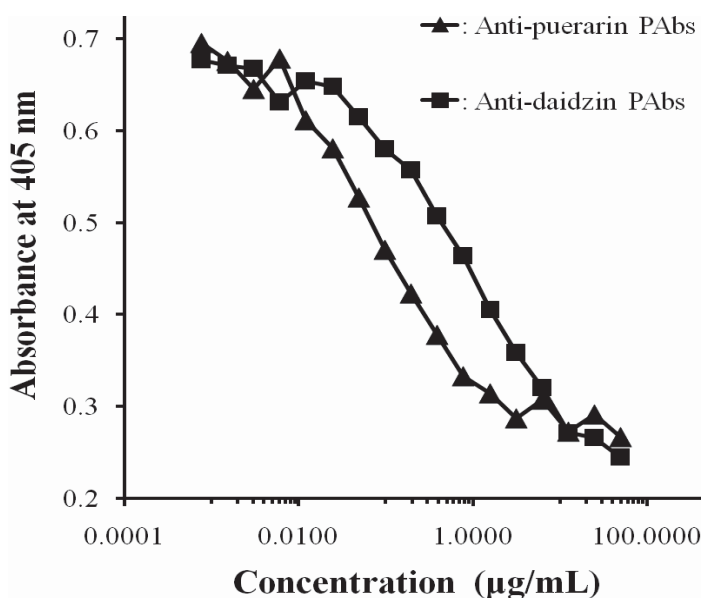
รูปที่ 22 MALDI-TOF-MS spectrum ของ daidzin-BSA

2.2 การกระตุ้นกระต่ายให้ผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีและทำให้บริสุทธิ์

จากการกระตุ้นกระต่ายให้ผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อสาร puerarin และ daidzin พบว่า ซีรัมจากเลือดกระต่ายสามารถผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสาร puerarin และ daidzin ได้ จึงนำซีรัมที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ protein G column ได้แอนติบอดีต่อสาร puerarin และ daidzin อย่างละ 20 mg

2.3 การตรวจสอบคุณสมบัติของแอนติบอดีที่ผลิตได้

แอนติบอดีต่อสาร puerarin และ daidzin ที่ผลิตได้นำไปทำการตรวจสอบคุณสมบัติ พบว่า ความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมในการนำไปพัฒนาวิธีวิเคราะห์ puerarin เป็น 5 $\mu\text{g/ml}$ และ daidzin เป็น 10 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ โดยช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมในการตรวจสอบด้วยวิธี competitive ELISA สำหรับ puerarin เป็น 6.10 ng/ml-1.56 $\mu\text{g/ml}$ และ daidzin เป็น 24 ng/ml - 12.5 $\mu\text{g/ml}$ (รูปที่ 23)



รูปที่ 23 กราฟมาตรฐานของแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสาร puerarin และ daidzin

เมื่อทำการตรวจสอบคุณสมบัติของแอนติบอดีที่ผลิตได้ต่อสาร isoflavonoid ชนิดต่างๆ และสารอื่นๆ จะเห็นได้ว่าแอนติบอดีต่อสาร puerarin มี cross reactivity ต่อสาร daidzein ซึ่งเป็น aglycone ของ puerarin เอง ในขณะที่แอนติบอดีต่อสาร daidzin มี cross reactivity ต่อสาร daidzein, genistin และ genistein (ตารางที่ 6) ดังนั้นแอนติบอดีต่อสาร puerarin จึงมีความเหมาะสมในการนำมาพัฒนาเพื่อตรวจสอบสาร puerarin และ daidzein ในพืชสมุนไพร ในขณะที่แอนติบอดีต่อ daidzin เหมาะสมในการนำไปตรวจสอบสาร daidzin, daidzein, genistin และ genistein

ตารางที่ 6 ค่า cross reactivity ของแอนติบอดีต่อสารชนิดต่างๆ

สารที่ตรวจสอบ	แอนติบอดีต่อ puerarin	แอนติบอดีต่อ daidzin
<i>Isoflavonoids ที่พบในกาวเครือขาว</i>		
Puerarin (8-glucosyl-4',7-dihydroxyisoflavone)	100	0.11
Daidzin (7-O-glucosyl-4'-hydroxyisoflavone)	<0.001	100
Daidzein (4',7-dihydroxyisoflavone)	127.79	93.38
Genistin (7-O-glucosyl-4',5-dihydroxy-isoflavone)	<0.001	49.01
Genistein (4',5,7-trihydroxyisoflavone)	5.12	45.13
<i>Isoflavonoids ที่ไม่พบในกาวเครือขาว</i>		
Tectorigenin (4',5,7-trihydroxy-6-methoxyisoflavone)	<0.001	66.59
Tectoridin (7-O-glucosyl-4',5-dihydroxy-6-methoxy isoflavone)	<0.001	32.69
Irisolidone (5,7-dihydroxy-4',6-dimethoxyisoflavone)	<0.001	<0.001
<i>Flavonoids</i>		
Rutin	<0.001	<0.001
Hesperidin	<0.001	<0.001
Naringin	<0.001	<0.001
<i>Anthraquinones</i>		
Sennoside A	<0.001	<0.001
Sennoside B	<0.001	<0.001
<i>Triterpenoids saponins</i>		
Ginsenoside Rb1	<0.001	<0.001
Ginsenoside Rg1	<0.001	<0.001
Glycyrrhizin	<0.001	<0.001
<i>Sesquiterpene lactones</i>		
Artemisinin	<0.001	<0.001
Artesunate	<0.001	<0.001
<i>Naphthoquinone</i>		
Plumbagin	<0.001	<0.001

2.4 พัฒนาวิธีการตรวจสอบสาร puerarin และ daidzein โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อสาร puerarin ด้วยวิธี ELISA

เมื่อทำการพัฒนาวิธีการตรวจสอบสาร puerarin และ daidzein ด้วยวิธี ELISA พบว่า มีค่าความเที่ยงสูง โดยมีค่า intra-assay และ inter-assay เป็น 1.93 % และ 3.10 % ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 แสดงค่าความเที่ยงของวิธีการวิเคราะห์ puerarin โดยวิธี ELISA

Puerarin (ng/ml)	CV (%)	
	Intra-assay	Inter-assay
1,000	1.66	3.10
500	1.12	2.46
250	1.93	0.77
125	1.84	2.07
62.5	0.21	0.98
31.3	1.27	1.58
15.6	1.46	2.97
7.8	0.57	1.14
0	0.70	1.36

จากการตรวจสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์โดยการเติมสารมาตรฐาน puerarin ที่ความเข้มข้นระหว่าง 12.5 – 50 µg/ml ลงไปในผงกวาวเครือขาวพบว่า สามารถตรวจสอบปริมาณสารที่เติมลงไปได้ในช่วง 98.6 – 102.0% (ตารางที่ 8) แสดงว่าวิธี ELISA ที่พัฒนาขึ้นมีความแม่นยำในการตรวจสอบสูง สามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อตรวจสอบปริมาณสาร puerarin และ daidzein ในพืชตัวอย่างได้

ตารางที่ 8 แสดงค่าความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์ puerarin โดยวิธี ELISA

ปริมาณที่เติม (µg/ml)	ปริมาณที่วัดได้ ^a (µg/ml)	CV ^b (%)	Recovery ^c (%)
0.0	96.6 ± 5.2	5.41	-
12.5	109.0 ± 7.0	5.98	101.0
25.0	121.0 ± 10.0	8.37	98.6
50.0	147.0 ± 6.0	4.11	102.0

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

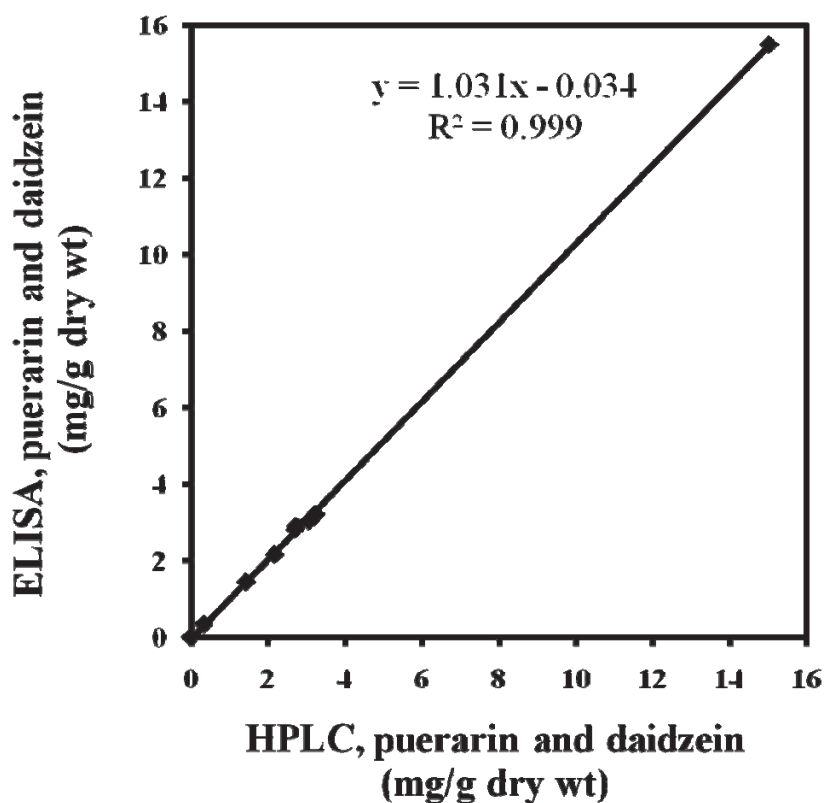
^b Coefficient of variation = (S.D./mean)×100%

^c Recovery (%) = (measured amount—96.6 µg/ml/added amount)×100

เมื่อทำการนำมาตรวจสอบหาปริมาณสารจากตัวอย่างพืชกวาวเครือด้วยวิธีการที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับวิธีการวิเคราะห์มาตรฐานโดยใช้ HPLC พบว่ามีความสัมพันธ์สูง (r^2 0.999) (ตารางที่ 9 และรูปที่ 24)

ตารางที่ 9 ปริมาณสาร puerarin และ daidzein รวมที่วิเคราะห์ได้จากวิธี ELISA และ HPLC

ตัวอย่างพืช	ความเข้มข้น (mg/g, dry weight)			
	ELISA	CV (%)	HPLC	CV (%)
<i>P. candollei</i> var. <i>candollei</i>				
Natural tuber (1 year old)	2.91 ± 0.25	8.60	2.72 ± 0.01	0.36
Marketed product (Nongkai)	1.44 ± 0.15	10.30	1.42 ± 0.16	11.30
Hairy roots 1	2.83 ± 0.15	5.11	2.70 ± 0.09	3.22
Hairy roots 2	2.17 ± 0.15	6.89	2.16 ± 0.05	2.19
Hairy roots 3	3.04 ± 0.28	9.10	3.06 ± 0.07	2.40
Hairy roots 4	3.22 ± 0.11	3.68	3.25 ± 0.07	2.11
<i>P. candollei</i> var. <i>mirifica</i>				
Natural tuber	3.15 ± 0.14	4.48	3.19 ± 0.01	0.08
Core tuber	0.35 ± 0.03	9.96	0.34 ± 0.01	0.82
Tuber bark	15.50 ± 0.20	1.52	15.04 ± 0.06	0.43



รูปที่ 24 ความสัมพันธ์ในการตรวจวัดสาร puerarin และ daidzein ระหว่างวิธีวิเคราะห์ด้วย ELISA และ HPLC

2.5 พัฒนาชุดตรวจสอบสาร puerarin, daidzin, genistin, genistein และ daidzein โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อสาร puerarin และ daidzin ด้วยวิธี ELISA

เมื่อทำชุดตรวจสอบสารกลุ่ม isoflavonoid รวม ได้แก่ puerarin, daidzin, genistin, genistein และ daidzein ด้วยวิธี ELISA โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อสาร puerarin และ daidzin พบว่า มีค่าความเที่ยงสูง โดยมีค่า intra-assay และ inter-assay เป็น 1.80 % และ 2.55 % ตามลำดับ (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 แสดงค่าความเที่ยงของวิธีการวิเคราะห์ isoflavonoid โดย ELISA

ปริมาณสารกลุ่ม isoflavonoid (µg/ml)	CV (%)	
	Intra-assay	Inter-assay
10	0.83	0.82
5	1.40	1.02
2.5	1.56	0.83
1.25	0.58	2.55
0.62	1.80	2.10
0.31	1.15	0.86
0.15	0.70	2.17
0	1.35	1.55

จากการตรวจสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์โดยการเติมสารมาตรฐาน isoflavonoid ทั้ง 5 ชนิด ที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงไปในผงกาวเคลือบขาวพบว่า สามารถตรวจสอบปริมาณสารที่เติมลงไปได้ในช่วง 93.78 – 103.99 % และมีค่าความแปรปรวนต่ำกว่า 15% (ตารางที่ 11) แสดงว่าวิธี ELISA ที่พัฒนาขึ้นมีความแม่นยำในการตรวจสอบสูง สามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อตรวจสอบปริมาณสาร isoflavonoid รวมในพืชตัวอย่างได้

ตารางที่ 11 แสดงค่าความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์ isoflavonoid โดย ELISA

Isoflavonoid	ปริมาณที่เติม ($\mu\text{g/ml}$)	ปริมาณที่วัดได้ ^a ($\mu\text{g/ml}$)	CV ^b (%)	Recovery ^c (%)
Natural tuber	0	206.92 $\pm$ 13.69	6.61	-
Puerarin (PR)	50	257.81 $\pm$ 17.00	6.59	101.80
	25	232.91 $\pm$ 11.41	4.90	103.99
Daidzin (DZ)	50	257.32 $\pm$ 21.68	8.42	100.80
	25	232.78 $\pm$ 9.85	4.23	103.45
Daidzein (DZe)	50	257.34 $\pm$ 25.05	9.74	100.85
Genistin (GT)	50	254.69 $\pm$ 2.07	0.81	95.55
Genistein (GTe)	50	253.81 $\pm$ 19.86	7.83	93.78
PR + DZe	20+20	248.03 $\pm$ 24.52	9.89	102.78
DZ + DZe + GT + GTe	20+20+20+20	286.54 $\pm$ 21.68	7.57	99.53
PR + DZ + DZe + GT + GTe	20+20+20+20+20	309.26 $\pm$ 31.73	10.26	102.34
	10+10+10+10+10	258.39 $\pm$ 33.83	13.09	102.94

^a All values were mean $\pm$ S.D. from triplicate samples for each level

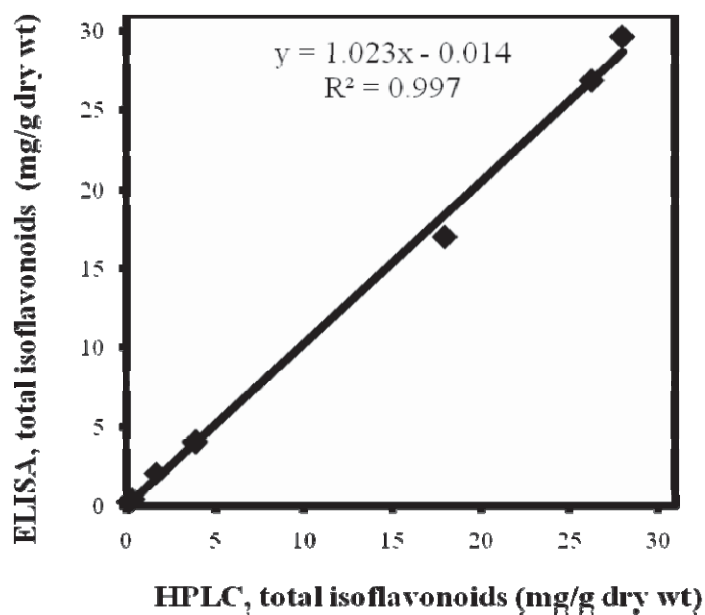
^b Coefficient of variation = (S.D./mean) $\times$ 100%

^c Recovery (%) = (measured amount—206.92 $\mu\text{g/ml}$ / spiked amount) $\times$ 100

เมื่อทำการนำมาตรวจสอบหาปริมาณสารจากตัวอย่างพืชกวาวเครือด้วยวิธีการที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับวิธีการวิเคราะห์มาตรฐานโดยใช้ HPLC พบว่ามีความสัมพันธ์สูง (r^2 0.997) (ตารางที่ 12 และรูปที่ 25) โดยวิธีการนี้สามารถพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบสารกลุ่ม isoflavonoid รวมทั้ง 5 ชนิดได้ด้วยวิธี ELISA โดยใช้แอนติบอดีสองชนิดผสมกันและสามารถทำการหาปริมาณสาร isoflavonoid รวมได้ในขั้นตอนเดียว ทำให้สะดวก รวดเร็วในการตรวจวิเคราะห์สารจากตัวอย่างพืชในแหล่งต่างๆ ทั้งจากธรรมชาติและจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ตารางที่ 12 ปริมาณสาร isoflavonoid รวมทั้งวิเคราะห์ได้จากวิธี ELISA และ HPLC

ตัวอย่างพืช	ความเข้มข้น (mg/g dry weight)			
	ELISA	CV (%)	HPLC	CV (%)
<i>P. candollei</i> var. <i>candollei</i>				
Natural tuber	4.05 ± 0.20	4.88	3.95 ± 0.00	0.09
Marketed product (Nongkai)	2.08 ± 0.13	6.39	1.70 ± 0.03	1.49
Hairy roots 1	29.61 ± 1.50	5.05	28.02 ± 1.04	3.72
Hairy roots 2	26.86 ± 2.43	9.05	26.31 ± 0.31	1.19
<i>P. candollei</i> var. <i>mirifica</i>				
Natural tuber	3.99 ± 0.33	8.30	3.91 ± 0.04	0.90
Core tuber	0.38 ± 0.04	9.65	0.34 ± 0.00	0.82
Tuber bark	16.99 ± 0.40	2.33	18.00 ± 0.06	0.33
Pod	0.26 ± 0.01	3.38	0.17 ± 0.01	5.53



รูปที่ 25 ความสัมพันธ์ในการตรวจวัดสาร isoflavonoid รวมทั้งระหว่างวิธีวิเคราะห์ด้วย ELISA และ HPLC

3. ศึกษาผลของรากพะเลียงเนื้อเยื่อขาวต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 และการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของอวัยวะที่เกี่ยวข้อง

จากการศึกษาในหนูไมซ์ (ICR) ทั้งสองเพศที่มีอายุ 8 สัปดาห์ โดยสัตว์ทดลองจะได้รับการเลี้ยงดูเป็นเวลา 7 วัน ในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองก่อนการศึกษา หนูไมซ์กลุ่มจะได้รับการป้อนผงรากกวาวเครือที่ได้จากการพะเลียงเนื้อเยื่อในหนูเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน estradiol และกลุ่มควบคุมเป็นเวลา 1, 2 และ 4 สัปดาห์ ภายหลังจากที่ครบกำหนดการให้สารหรือยาครบ 24 ชั่วโมง ทำการทดสอบสัตว์ทดลองและเก็บตัวอย่างตับเพื่อเติมไมโครโซมและบันทึกขนาดและชั่งน้ำหนักมดลูกของหนูเพศเมีย จากนั้นทำการทดสอบผลต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 เปรียบเทียบกับผลของฮอร์โมนเอสโตรเจนและเทสโทสเตอโรนด้วยเทคนิค penthoxyresorufin O-depentylation (PROD) และ benzyloxyresorufin O-dealkylation (BROD) alkoxyresorufin O-dealkylation และเทคนิคการทำให้ปฏิกิริยาถูกโซโฟลิเมอเรสแบบเวลาจริง (real time polymerase reaction) จากการศึกษพบว่า รากพะเลียงกวาวเครือขาวมีผลในการทำให้มดลูกสัตว์ทดลองเพศเมียมีขนาดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับรากพะเลียงกวาวเครือขาว (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 13 ผลของรากพะเลียงกวาวเครือขาวต่อน้ำหนักและความยาวของมดลูก

การศึกษา	น้ำหนักมดลูก [§] (mg)	ความยาวมดลูก [§] (cm)
Non treatment	160.44 ± 23.36	2.40 ± 0.19
Estradiol benzoate	207.62 ± 59.21	4.18 ± 0.48 **
<i>P. candollei</i> root cultures		
1 week treated	226.40 ± 46.80	3.90 ± 0.85 *
2 weeks treated	248.62 ± 67.49	4.00 ± 1.00 *
4 weeks treated	200.90 ± 22.16	4.35 ± 0.53 *

Note: [§] Results are expressed as mean±SD; * P<0.05, ** P<0.01 vs non-treatment.

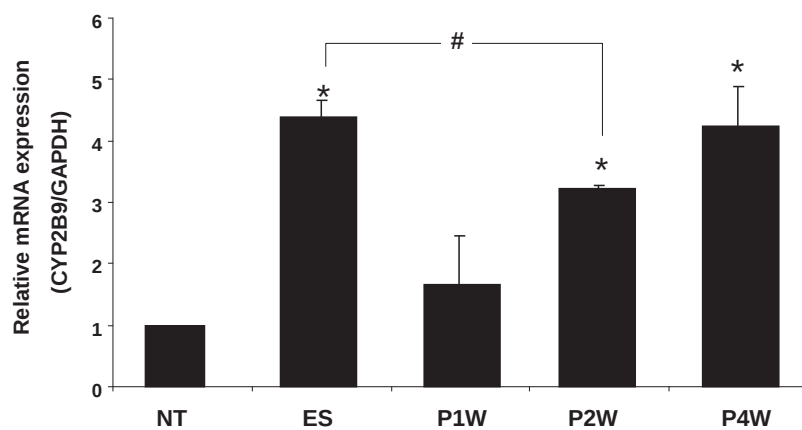
เมื่อทดสอบเอนไซม์ พี 450 พบว่า ปริมาณรวมของเอนไซม์ไม่แตกต่างในสัตว์ทดลองทั้งสองเพศในกลุ่มที่ได้รับรากพะเอียงและกลุ่มที่ได้รับ estradiol ผลการทดสอบด้วยเทคนิค BROD ซึ่งจำเพาะต่อเอนไซม์ CYP2B9/10 พบว่า สัตว์ทดลองที่ได้รับรากพะเอียงกวาวเครือขาวเป็นเวลา 2 และ 4 สัปดาห์มีผลเพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์จากการทดสอบด้วย BROD ในหนูเพศผู้ (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 14 ผลของรากพะเอียงกวาวเครือขาวต่อปริมาณ P450 และ benzyloxyresorufin O-dealkylase (BROD) ในตับหนู

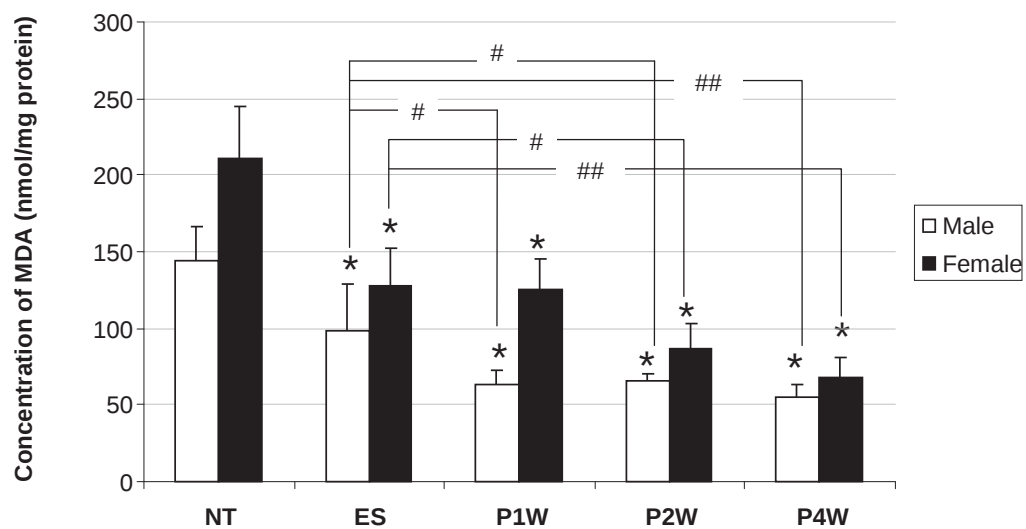
Treatment	Total P450 content (mol/mg protein)		Formation of resorufin [§] (pmol/mg protein/min)	
	Male	Female	Male	Female
Non treatment	0.48 ± 0.20	0.32 ± 0.15	13.04 ± 3.74	12.57 ± 4.33
Estradiol benzoate	0.18 ± 0.17	0.23 ± 0.11	37.16 ± 11.08 *	27.35 ± 4.89 **
<i>P. candollei</i> tissue cultures				
1 week treated	0.35 ± 0.06	0.43 ± 0.31	15.82 ± 1.87	13.97 ± 3.29
2 weeks treated	0.52 ± 0.17	0.40 ± 0.12	32.74 ± 7.59 *	12.46 ± 1.97
4 weeks treated	0.71 ± 0.24	0.25 ± 0.09	39.64 ± 5.65 **	20.96 ± 6.07

Note: [§] Results are expressed as mean±SD; *P<0.05; **P<0.01, vs non-treatment.

จากการศึกษาผลของรากพะเอียงกวาวเครือขาวต่อการแสดงออกของยีน CYP2B9 โดยการศึกษาระดับ mRNA ของยีน CYP2B9 ในหนูเพศผู้พบว่า การแสดงออกของระดับ mRNA CYP450 เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาที่ได้รับรากกวาวเครือขาวเพิ่มขึ้นที่ 4 สัปดาห์ (รูปที่ 26)



รูปที่ 26 ผลของรากพะเลียงกวาวเครือขาวต่อการแสดงออกของระดับ hepatic CYP2B9 mRNA ในหนูเพศผู้



รูปที่ 27 ผลของรากพะเลียงกวาวเครือขาวต่อระดับ thiobarbituric acid ในหนู

การศึกษาผลของรากพะเลียงกวาวเครือขาวต่อกระบวนการ lipid peroxidation ในสมองของสัตว์ทดลองด้วยการเทคนิค thiobarbituric acid พบว่า รากพะเลียงกวาวเครือขาวมีผลลดการเกิด lipid peroxidation ด้วยการทดสอบ TBARS ตั้งแต่สัปดาห์แรกของการได้รับรากพะเลียงกวาวเครือขาว นอกจากนี้ยังพบว่า ได้รับรากกวาวเครือขาวเป็นเวลานานขึ้นจะมีผลทำให้การเกิด lipid peroxidation ในสมองหนูลดลงมากขึ้น (รูปที่ 27) แสดงให้เห็นว่ารากพะเลียงกวาวเครือขาวมีผลในการต้านอนุมูลอิสระด้วย

จากการศึกษาจะเห็นได้ว่า การใช้รากพะเลียงกวาวเครือขาวควรมีการพิจารณาถึง การเกิดปฏิกิริยาต่อกันของยาเนื่องจากมีฤทธิ์กระตุ้นเอนไซม์ CYP2B9 อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาในเชิงลึกถึงผลของสาร isoflavonoid แต่ละตัวต่อต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม P450s เพิ่มเติมอีกด้วย

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

กวาวเครือขาวเป็นพืชสมุนไพรที่มีการนำมาใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบัน หัวกวาวเครือขาวมีองค์ประกอบหลักเป็นสารกลุ่ม isoflavonoids ได้แก่ puerarin, daidzin, genistin, daidzein และ genistein ซึ่งสารเหล่านี้มีฤทธิ์เป็นไฟโตเอสโตรเจน (phytoestrogen) หรือฮอร์โมนเอสโตรเจนจากพืช สารสำคัญที่พบในต้นกวาวเครือขาวมีความแปรปรวนอย่างมากตามสภาวะแวดล้อมส่งผลให้ปริมาณสารที่ได้นั้นไม่มีความแน่นอน ดังนั้นจึงได้มีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเข้ามาประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่มปริมาณการสร้างสารทุติยภูมิในกวาวเครือขาว ในการทดลองครั้งนี้พบว่า การเพาะเลี้ยงส่วนก้านบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลการทดลองที่ดีที่สุด คือสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดแคลลัสได้ร้อยละ 100 เหนี่ยวนำให้เกิดยอดร้อยละ 15.63 และ สามารถผลิตสารกลุ่ม isoflavonoid ได้ปริมาณ 50.39 ± 7.06 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง นอกจากนี้ยังได้มีการเหนี่ยวนำให้เกิดรากลอยโดยใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium rhizogenes* สายพันธุ์ ATCC15834 จากการทดลองนี้พบว่า การสร้างสารกลุ่ม isoflavonoid ในรากลอย 26.39 ± 3.80 มิลลิกรัม ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งมีปริมาณมากกว่าสารที่พบในธรรมชาติถึง 5.8 เท่า และพบว่า ความเข้มข้นของน้ำตาล 5% เหมาะสมที่ทำให้รากลอยเจริญเติบโตได้ดีและมีการสร้างสารกลุ่ม isoflavonoid ได้มากที่สุด โดยสูตรอาหารที่มีการสร้างสารกลุ่ม isoflavonoid ได้มากที่สุดคือ อาหารสูตร woody plant จากการศึกษาผลของสารกระตุ้น 5 ชนิด คือ methyl jasmonate, yeast extract, chitosan, salicylic acid และ *Agrobacterium rhizogenes* lysate ต่อการผลิตสาร isoflavonoid พบว่า สารกระตุ้นที่ใช้ทุกชนิดมีผลในการกระตุ้นการสร้างสารกลุ่ม isoflavonoid ในรากลอยกวาวเครือขาว สารกระตุ้นที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มการสร้างสารมากที่สุด ได้แก่ yeast extract ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ภายหลังจากเติมสารกระตุ้นลงไปเป็นเวลา 3 วัน สารกลุ่ม isoflavonoid ที่ได้จากการกระตุ้นมีปริมาณสูงถึง 60 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

จากการศึกษาการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อสาร puerarin และ daidzin เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารกลุ่มนี้ด้วยเทคนิค ELISA โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อสาร puerarin ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สาร puerarin และ daidzein ซึ่งเป็นอะกลัยโคของ puerarin โดยช่วงของการวิเคราะห์อยู่ที่ระดับ 6.10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร–1.56 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ของ puerarin และการผสมแอนติบอดีทั้งสองชนิดเพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ isoflavonoid รวมในขั้นตอนเดียว โดยมีช่วงการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 0.05–6.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร วิธีวิเคราะห์โดย ELISA ทั้งสองวิธี ให้ผลการวิเคราะห์สอดคล้องกับค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC จากการประเมินวิธีวิเคราะห์พบว่า ทั้งสองวิธีเป็นวิธีที่มีความถูกต้อง แม่นยำ ความจำเพาะเจาะจง และความไวสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่ม isoflavonoid ในกวาวเครือขาว

การศึกษาผลของกวาวเครือขาวต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ที่เกี่ยวข้องในหนูเมชด้วยเทคนิค BROD, real-time RT-PCR, ผลต่อขนาดและน้ำหนักมดลูกของหนูเพศเมีย จากผลการศึกษาพบว่า เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงส่วนรากของกวาวเครือขาวมีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเพศหญิง โดยมีผลเพิ่มความยาวของ มดลูกหนูเพศเมีย และมีศักยภาพในการกระตุ้นการแสดงออกของ mRNA และ สมรรถนะของเอนไซม์ CYP2B9 จากการศึกษาผลของรากเพาะเลี้ยงกวาวเครือขาวต่อกระบวนการ lipid peroxidation ในสมองของสัตว์ทดลองด้วยการเทคนิค thiobarbituric acid พบว่า รากเพาะเลี้ยงกวาวเครือขาวมีผลลดการเกิด lipid peroxidation ด้วยการทดสอบ TBARS ตั้งแต่สัปดาห์แรกของการได้รับรากเพาะเลี้ยงกวาวเครือขาว แสดงให้เห็นว่ารากเพาะเลี้ยงกวาวเครือขาวมีผลในการต้านอนุมูลอิสระด้วย

เอกสารอ้างอิง

- กนกวรรณ จารุกัจฉ และ เทวราช หล้าหา (2547) การศึกษาผลของยาสมุนไพรฟ้าทะลายโจร ต่อปริมาณเอนไซม์ พี450. รายงานการวิจัยงบประมาณการวิจัยสำหรับนักวิจัยรุ่นใหม่ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- ชุตินา อ้อมกิ่ง (2546) การเพิ่มปริมาณกวาวเครือขาวในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิตสาขาวิชาพืชสวน, บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าคุณทหารลาดกระบัง.
- บุญส่ง หวังสินทวีกุล (2546) สารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนของกวาวเครือขาวบางสายพันธุ์และเซลล์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ เกษตรศาสตรมหาบัณฑิตสาขาวิชาเกษตรศาสตร์, คณะเกษตรศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุตารัตน์ ถนนแก้ว (2549) การผลิตสารตาซิดเซอินและเจนิสเทอินในแคลลัส เซลล์แขวนลอย และแฮร์ริ่งเพาะเลี้ยงของกวาวเครือขาว. วิทยานิพนธ์ ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิตสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาราช. (2547) เอกสารการสอนชุดวิชา เกษตรพืชศาสตร์ (Pharmaceutical Botany). นนทบุรี: มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาราช.
- Bennetau-Pelissero C, Arnal-Schnebel B, Lamothe V, Sauvart P, Sagne JL, Verbruggen MA, Mathey J and Lavialle O. (2003) ELISA as a new method to measure genistein and daidzein in food and human fluids. Food Chemistry.82: 645–658.
- Bradford MM A. (1976) rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72: 248-254.
- Burke MD, Thompson S, Weaver RJ, Wolf CR, Mayer RT. (1994) Cytochrome P450 specificities of alkoxyresorufin O-dealkylation in human and rat liver. Biochemical Pharmacology. 48: 923-936.
- Chandeying V and Lamlertkittikul S. (2007) Challenges in the conduct of Thai herbal scientific study: efficacy and safety of phytoestrogen, *Pueraria mirifica* (Kwao Keur Kao), phase I, in the alleviation of climacteric symptoms in perimenopausal women. J Med Assoc Thai. 90(7): 1274-1280.
- Chansakaow S, Ishikawa T, Sekine K, Okeda M, Higuchi Y, Kudo M and Chaichantipyuth. (2000a) Isoflavonoids from *Pueraria mirifica* and their estrogenic activity. Planta Med. 66: 572-575.

- Chansakaow S, Ishikawa T, Sekine K, Okeda M, Higuchi Y and Chaichantipyuth. (2000b) Identification of deoxymiroestrol as the actual rejuvenating principle of “kwao keur”, *Pueraria mirifica*. The known miroestrol may be an artifact. J. Nat Prod. 63(2): 173-175.
- Cha-on U. (1996) Effect of liver-fuke (*Copisthorehis viverrini*) infection on the hepatic mixed function oxidase system in hamster. Master of Science thesis in medical biochemistry, Graduate School, Khon Kaen University.
- Cherdshewasart W, Kitsamai Y and Malaivijitnond S. (2007a) Evaluation of the estrogenic activity of the wild *Pueraria mirifica* by vaginal cornification assay. J Reprod Dev. 53(2):385-393.
- Cherdshewasart W and Sutjit W. (2008) Correlation of antioxidant activity and major isoflavonoid contents of the phytoestrogen-rich *Pueraria mirifica* and *Pueraria lobata* tubers. Phytomedicine. 15(1-2): 38-43.
- Cherdshewasart W, Traisup V and Picha P. (2008) Determination of the estrogenic activity of wild phytoestrogen-rich *Pueraria mirifica* by MCF-7 proliferation assay. J Reprod Dev. 54(1):63-67.
- Cherdshewasart W, Subtang S and Dahlan W. (2007b) Major isoflavonoid contents of the phytoestrogen rich-herb *Pueraria mirifica* in comparison with *Pueraria lobata*. J Pharm Biomed Anal. 43(2):428-434.
- Goyal S, Ramawat KG (2008) Enthrel treatment enhanced isoflavonoids accumulation in cell suspension cultures of *Pueraria tuberosa*, a woody legume. Acta Physiol Plant 30:849-853.
- Jarukamjorn K, Sakuma T, Miyaura J and Nemoto N. (1999) Different regulation of the expression of mouse hepatic cytochrome P450 CYP2B enzyme by glucocorticoid and phenobarbital. Archives of Biochemistry and Biophysics. 396: 89-99.
- Jarukamjorn K, Sakuma T, Miyaura J, and Nemoto N. (2002). Sexual dimorphic expression of mouse hepatic CYP2B: alterations during development or after hyposectomy. Biochem. Pharmacol., 63, 2037-2041.
- Jaruchotikamol A., Jarukamjorn M, Sirisangtrakul W, Sakuma T, Kawasaki Y, and Nemoto N. (2007). Strong synergistic induction of CYP1A1 expression by andrographolide plus typical CYP1A inducers in mouse hepatocytes. Toxicol. Appl. Pharmacol., 224, 156-162.

- Khitkal, B, Kupittayanant S, Rangsiwatananon K and Manakasema Y. (2009). Antioxidant properties of puerarin and genistein from White Kwao Krua induced by elicitors and their antihyperglycemic effect on rats. *Suranaree J. Sci. Technol.* 17(1): 27-37.
- Kirakosyan A, Kaufman P, Chang S, Warber S, Bolling S, Vardapetyan H (2006) Regulation of isoflavone production in hydroponically grown *Pueraria montana* (kudzu) by cork pieces, XAD-4, and methyl jasmonate. *Plant Cell Rep* 25:1387-1391.
- Kohen F, Lichter S, Gayer B, DeBoever J and Lu LJW. (1998) The measurement of the isoflavone daidzein by time resolved fluorescent immunoassay: a method for assessment of dietary soya exposure. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 64,(3-4) : 217-222.
- Korsangruang S, Soonthornchareonnon N, Chintapakorn Y, Saralamp P and Prathantururung, S. (2010). Effect of abiotic and biotic elicitors on growth and isoflavonoid accumulation in *Pueraria candollei* var. *candollei* and *P. candollei* var. *mirifica* cell suspension cultures. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 10: 333-342.
- Manonai J, Chittacharoen A, Udomsubpayakul U, Theppisai H and Theppisai U. (2008) Effects and safety of *Pueraria mirifica* on lipid profiles and biochemical markers of bone turnover rates in healthy postmenopausal women. *Menopause.* 15(3): 530-535.
- Morabito N, Crisafulli A, Vergara C, Gaudio A, Lasco A, Frisina N, D'Anna R, Corrado F, Pizzoleo MA, Cincotta M, Altavilla D, Lentile R and Squadrito F. (2002). Effects of genistein and hormone-replacement therapy on bone loss in early postmenopausal women: A randomized double-blind placebo-controlled study. *Journal of Bone and Mineral Research.* 17(10): 1904–1912.
- Sakuma T, Takai M, Endo Y, Kuroiwa M, Ohara A, Jarukamjorn K, Honma R and Nemoto N. (2000). A novel female-specific member of the CYP3A gene subfamily in the mouse liver. *Arch Biochem Biophys.* 377, 153–162.
- Tao He J, Shi ZH, Yan J, Zhao MP, Guo ZQ and Chang WB. (2005) Biotin–avidin amplified enzyme-linked immunosorbent assay for determination of isoflavone daidzein. *Talanta.* 65: 621–626.
- Thanonkeo S and Panichajakul S. (2006) Production of isoflavones, daidzein and genistein in callus cultures of *Pueraria candollei* Wall. ex Benth. var. *mirifica*. *Songklanakarin Journal of science and technology.* 28 (Suppl.1): 45-53.

- Trisomboon H, Malaivithnond S, Watanabe G, Cherdshewasart W and Taya K. (2006) The estrogenic effect of *Pueraria mirifica* on gonadotrophin levels in aged monkeys. *Endocrine*. 29(1): 129-134.
- Udomsuk L, Jarukamjorn K, Tanaka H and Putalun W. (2009) Production of isoflavonoids in callus cultures of *Pueraria candollei* Wall. ex Benth. var. *mirifica*. *Zeitschrift fur Naturforschung Section C-A Journal of Biosciences*. 64(3-4): 239-243.
- Udomsuk L, Jarukamjorn K, Tanaka H and Putalun W. (2011) Improved isoflavonoid production in *Pueraria candollei* hairy root cultures using elicitation. *Biotech. Letter*. 33(2): 369-374.
- Urasopan N, Hamada Y, Cherdshewasart W and Malaivijitnond S. (2008) Preventive effects of *Pueraria mirifica* on bone loss in ovariectomized rats. *Maturitas*. 59(2): 137-148.
- Wu L, Qiao H, Li Y and Li L. (2007). Protective roles of puerarin and Danshensu on acute ischemic myocardial injury in rats. *Phytomedicine*. 14(10): 652-658.

ผลลัพธ์ที่ได้จากโครงการ

1. ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

1. Udomsuk L, Jarukamjorn K, Tanaka H and Putalun W. (2009) Production of isoflavonoids in callus cultures of *Pueraria candollei* Wall. ex Benth. var. *mirifica*. *Zeitschrift fur Naturforschung Section C-A Journal of Biosciences*. 64(3-4): 239-243.
impact factor = 0.800 (ที่มา : Journal Citation Reports, 2009)
2. Udomsuk L, Jarukamjorn K, Tanaka H and Putalun W. (2009) Isoflavonoid production in hairy roots culture of *Pueraria candollei*. *Zeitschrift fur Naturforschung Section C-A Journal of Biosciences* 64(9-10): 687-691.
impact factor = 0.800 (ที่มา : Journal Citation Reports, 2009)
3. Pongkitwitoon B, Sakamoto S, Tanaka H, Tsuchihashi R, Kinjo J, Morimoto S and Putalun W. (2010) Enzyme-linked immunosorbent assay for total isoflavonoids in *Pueraria candollei* using anti-puerarin and anti-daidzin polyclonal antibodies. *Planta Medica*. 76: 831-836.
impact factor = 2.369 (ที่มา : Journal Citation Reports, 2010)
4. Udomsuk L, Churikawit K, Putalun W and Jarukamjorn K. (2010) Impact of *Pueraria candollei* root cultures on cytochrome P450 2B9 enzyme and lipid peroxidation in mouse. *J. Health Sci*. 56(2):182-187.
impact factor = 0.742 (ที่มา : Journal Citation Reports, 2010)
5. Pongkitwitoon B, Sakamoto S, Tanaka H, Tsuchihashi R, Kinjo J, Morimoto S and Putalun W. (2011) Development of an enzyme-linked immunosorbent assay to determine puerarin and its aglycone daidzein. *Journal of Natural Medicines* 65: 31-36.
impact factor = 1.469 (ที่มา : Journal Citation Reports, 2010)
6. Udomsuk L, Jarukamjorn K, Tanaka H and Putalun W. (2011) Improved isoflavonoid production in *Pueraria candollei* hairy root cultures using elicitation. *Biotech. Letter*. 33: 369-374.
impact factor = 1.768 (ที่มา : Journal Citation Reports, 2010)

2. กิจกรรมอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง ได้แก่

(1) ผลงานอื่นๆ เช่น การไปเสนอผลงาน การได้รับเชิญไปเป็นวิทยากร

1. Udomsuk L, Jarukamjorn K, Tanaka H and Putalun W. (2008) *In vitro* culture of *Pueraria candollei* : Potential for production of isoflavonoids. 2008 Shanghai International Symposium for Pharmaceutical Sciences, Shanghai, China, December. p.19 (Oral presentation)
2. Pongkitwitoon B, Sakamoto S, Tsuchihashi R, Kinjo J, Tanaka H and Putalun W. (2008) Production and characterization of polyclonal antibody against daidzin. In: The 8th NRCT-JSPS joint seminar: innovative research in natural products for sustainable development. Bangkok, Thailand, 3-4 December. p.131 (Poster presentation)
3. Udomsuk L, Jarukamjorn K, Tanaka H and Putalun W. (2008) Callus induction and isoflavonoids content in *Pueraria candollei* Wall. Ex Benth var. *mirifica* (Airy Shaw & Suvat.) Niyomgham. In: The 8th NRCT-JSPS joint seminar: innovative research in natural products for sustainable development. Bangkok, Thailand, 3-4 December. p. 159 (Poster presentation)
4. Pongkitwitoon B, Sakamoto S, Tanaka H, Tsuchihashi R, Kinjo J, Morimoto S and Putalun W. (2009) Determination of total isoflavonoids in *Pueraria candollei* by enzyme-lined immunosorbent assay using anti-puerarin and anti-daidzin polyclonal antibodies. In: Asian Federation for Pharmaceutical Sciences. Fukuoka, Japan, 15-18 October.
5. Udomsuk L, Putalun W and Jarukamjorn K. (2009) Impact of *Pueraria candollei* root tissue culture on mouse hepatic cytochrome P450 2B enzyme. In: The 26th Annual Research conference in Pharmaceutical Sciences, 4 Dec 2009; Bangkok, Thailand, BP-2
6. Udomsuk L, Jarukamjorn K and Putalun W. (2010) Effect of thidiazuron (TDZ) on isoflavonoids production in callus cultures of *Pueraria candollei* var. *mirifica*. In: CDD 2010 The 1st Current Drug Development International Conference; 6-8 May 2010; Phuket, Thailand. P. 62 (Poster presentation)
7. Pongkitwitoon B, Sakamoto S, Tanaka H, Tsuchihashi R, Kinjo J, Morimoto S and

Putalun W. (2010) Determination of puerarin and its aglycone daidzein by an enzyme-linked immunosorbent assay using anti-puerarin polyclonal antibody. In: CDD 2010 The 1st Current Drug Development International Conference; 6-8 May 2010; Phuket, Thailand. P. 95 (Poster presentation)

8. Udomsin O and Putalun W. (2010) Improvement of isoflavonoid production by abscisic acid in hairy root culture of *Pueraria candollei* var. *candollei*. In: The 9 th NRCT-JSPS Joint Seminar Natural Medicine Research for the Next Decade: New Challenges and Future Collaboration. 6 - 8 Dec 2010; Bangkok, Thailand. PP 111 (289-290) (Poster presentation)

(2) การเชื่อมโยงกับต่างประเทศหรือรางวัลที่ได้รับ

1. รศ.ดร.วราภรณ์ ภูตะลุน ได้รับรางวัลนักวิจัยดีเด่น ระดับเงิน มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปี 2553
2. นางสาวเบญญากาญจน์ พงศ์กิจวิฑูร นักศึกษาระดับปริญญาโทในความดูแลภายใต้ทุนพัฒนานักวิจัยของ สกว ได้รับรางวัลวิทยานิพนธ์ดีเด่น ประจำปี 2553 จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น หัวข้อวิทยานิพนธ์ “สารประกอบทุติยภูมิจากรากลอยพะละเลียงของต้น กวาวเครือขาวและการพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ด้วยเทคนิค อีไลซ่า”

ภาคผนวก

Production of Isoflavonoids in Callus Cultures of *Pueraria candollei* var. *mirifica*

Latiporn Udomsuk^a, Kanokwan Jarukamjorn^a, Hiroyuki Tanaka^b,
and Waraporn Putalun^{a,*}

^a Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand.

Fax: +66-43-202-379. E-mail: waraporn@kku.ac.th

^b Department of Medicinal Plant Breeding, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812-8582, Japan

* Author for correspondence and reprint requests

Z. Naturforsch. **64c**, 239–243 (2009); received October 9/November 13, 2008

Pueraria candollei Wall. ex Benth. var. *mirifica* (Airy Shaw & Suvat.) Niyomdham was investigated for callus induction using Murashige and Skoog (MS) medium containing different plant growth regulators. After 8 weeks of culture, 66–100% of leaf or stem explants formed calli. Calli from stem explants cultured on MS medium supplemented with 0.5 mg/l thidiazuron (TDZ) gave the maximum of shoot induction (16%) and the highest level of total isoflavonoids [(50.39 ± 7.06) mg/g dry wt], which was 7-fold higher than that of the native tuber [(7.04 ± 0.29) mg/g dry wt]. These results suggest that addition of TDZ to the culture medium markedly enhances the production of isoflavonoids in calli induced from stem explants of *P. candollei* var. *mirifica*.

Key words: *Pueraria candollei* var. *mirifica*, Isoflavonoids, Callus Cultures

Introduction

Pueraria candollei Wall. ex Benth. var. *mirifica* (Airy Shaw & Suvat.) Niyomdham (Leguminosae) has been used in Thai traditional medicine for rejuvenation. The tuberous root of this plant shows estrogenic activity (Chansakaow *et al.*, 2000a, b; Trisomboon *et al.*, 2006; Cherdshewasart *et al.*, 2007a; 2008), preventive action of bone loss (Urasopan *et al.*, 2008), and antioxidant activity (Cherdshewasart and Sutjit, 2008). The major chemical constituents isolated from the plant tuber are isoflavonoids, phytoestrogen compounds including puerarin, daidzin, genistin, daidzein and genistein (Chansakaow *et al.*, 2000a; Cherdshewasart *et al.*, 2007b). The concentration of isoflavonoids in the tuber of *P. candollei* var. *mirifica* is variable due to cultivation and harvest season (Cherdshewasart *et al.*, 2007b). Therefore, *in vitro* cultures are necessary for the selection of cell lines with high yield of bioactive phytoestrogen compounds. The establishment of callus cultures of *P. candollei* var. *mirifica* and the production of isoflavones like daidzein and genistein using 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and

kinetin as plant growth regulators has been reported previously (Thanonkeo and Panichajakul, 2006). However, the production of the major isoflavone glycosides, puerarin, daidzin and genistin, from *P. candollei* var. *mirifica* by means of a tissue culture has not yet been reported. Thidiazuron (TDZ) has been shown to be an efficient plant growth regulator enhancing the production of secondary metabolites in various plants such as asiaticoside in whole plant cultures of *Centella asiatica* (Kim *et al.*, 2005), artemisinin in regenerated shoots of *Artemisia annua* (Lualon *et al.*, 2008), glycyrrhizin in callus cultures of licorice (Wongwicha *et al.*, 2008), and pseudojubilogenin glycosides in plantlets of *Bacopa monnieri* (Kamonwannasit *et al.*, 2008). It would, therefore, be interesting to select calli yielding a high active compound through *in vitro* cultures using TDZ, compared with α -naphthaleneacetic acid (NAA) and 6-benzyladenine (BA), as plant growth regulator. In the present study, we investigated the efficacy of different plant growth regulators for optimizing the callus induction, a regeneration system, and isoflavonoids production in *P. candollei* var. *mirifica*.

Material and Methods

Chemicals

α -Naphthaleneacetic acid (NAA) and 6-benzyladenine (BA) were purchased from Fluka Chemical (Buchs, Switzerland). *N*-Phenyl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5'-yl urea (thidiazuron, TDZ) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Daidzin, genistin, daidzein and genistein were purchased from Nacalai Tesque, Inc. (Tokyo, Japan). Puerarin was obtained from Chromadex Inc. (Irvine, CA, USA). All other chemicals were standard commercial products of analytical grade.

Plant materials

P. candollei var. *mirifica* seeds were obtained from Botanical Garden, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand. The seeds were washed with sterile distilled water and surface-sterilized in 10% sodium hypochlorite for 15–20 min. After being washed three times with sterilized water, the seeds were immersed in 70% ethanol for 1 min and then germinated on hormone-free Murashige and Skoog (MS) medium containing 3% sucrose (w/v), pH 5.5. Germination started within 7 d and was carried out at $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ under 16 h light/day.

Callus induction

Leaf and stem segments (0.5 cm) from *in vitro* plantlets fully grown within 4 weeks were cultured on MS medium with growth regulators, *i.e.*, TDZ alone (0.1–1.5 mg/l) and combinations of NAA (0.5–1 mg/l) and BA (0.5–1 mg/l). After 8 weeks, the calli were subcultured on the same medium. 8-Week-old calli were harvested for isoflavonoids analysis. The regenerated shoots were subcultured on MS medium without hormones for elongation and rooting. Shoot regeneration was observed for rooting at the end of the fourth week. The regenerated shoots were maintained on MS medium without hormones at $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ under 16 h light/day and subcultured every 6 weeks.

Extraction of callus samples and isoflavonoids analysis

Dried samples (30 mg) of 8-week-old calli were powdered and extracted five times with 0.5 ml methanol with sonication. The extracts were combined, evaporated and then redissolved with 1 ml methanol. Puerarin, daidzin, genistin, daidzein and genistein contents in the extracted solutions were determined by HPLC. The HPLC analysis was performed using a PerkinElmer Series 200 LC pump connected with a PerkinElmer 785A UV/VIS detector (254 nm) and a PE Nelson computer. An RP-18 column (LiChroCART[®],

Table I. Percentage of callus and shoot induction, and number of shoots per explant of *Pueraria candollei* var. *mirifica* after 8 weeks of culture.

Plant growth regulator [mg/l]			Stem ^a /leaf ^a	Callus induction (%)	Shoot induction (%)	Number of shoots/explant
NAA	BA	TDZ				
–	–	0.1	Stem	100.00	–	–
			Leaf	84.38	–	–
–	–	0.5	Stem	100.00	15.62	1.40
			Leaf	65.62	–	–
–	–	1.0	Stem	100.00	–	–
			Leaf	75.00	–	–
–	–	1.5	Stem	100.00	3.12	1.00
			Leaf	87.50	–	–
0.5	1.0	–	Stem	87.50	3.12	2.00
			Leaf	71.88	–	–
1.0	0.5	–	Stem	100.00	6.25	3.00
			Leaf	93.75	–	–
1.0	1.0	–	Stem	100	–	–
			Leaf	100	–	–

^a $n = 32$.

125 mm × 4 mm, 5 µm particle size, Merck, Germany) was used. The mobile phase consisted of 25% acetonitrile containing 1.5% acetic acid. The flow rate was 1.0 ml/min. Each determination was done in triplicate.

Results and Discussion

Callus induction from *P. candollei* var. *mirifica* was evaluated on MS medium with TDZ or a combination of NAA and BA. After 8 weeks of culture, we succeeded in inducing callus formation. The initial calli were subcultured for further studies after an 8-week induction. The percentages of callus and shoot induction are shown in Table I. 66–100% of leaf or stem explants had formed calli. In the case of the stem explants, the percentage of callus induction was ranging from 88–100%. This result indicated that stem explants are suitable for callus induction. Among these results, the percentage of callus induction from stem explants was 100% independent of the concentration of TDZ in the culture medium (Table I). This result suggested that TDZ was effective for callus induction from stem explants of *P. candollei* var. *mirifica*.

The maximum of shoot induction was achieved from the stem explant cultured on MS medium supplemented with 0.5 mg/l TDZ (16%) while medium with 1 mg/l NAA and 0.5 mg/l BA gave maximum shoots per explant (3 shoots per explant) (Table I). The initial regenerated shoots were subcultured on MS medium without hormones after 8 weeks of callus induction. After subcultured for 4 weeks, rooting of the regenerated shoots was observed. The regenerated plants were not different in appearance from the normally grown *P. candollei* var. *mirifica* plants. We investigated also total isoflavonoids content in leaves of regenerated plants compared with that in the native plant. We found that leaves of plants regenerated from 0.5 mg/l TDZ [(7.51 ± 0.22) mg/g dry wt] contain a slightly higher level of total isoflavonoids than those of the native plant [(5.72 ± 0.46) mg/g dry wt].

We determined the isoflavonoids contents of 8-week-old calli by HPLC as shown in Table II. The total isoflavonoids content in induced calli from stem explants cultured with TDZ was high (31.79–50.39 mg/g dry wt) while that with NAA and BA was lower (11.21–20.07 mg/g dry wt) (Table II). The highest level of total isoflavo-

Table II. Isoflavonoids content in calli from *Pueraria candollei* var. *mirifica* after 8 weeks of culture.

Plant growth regulator [mg/l]			Stem/leaf	Isoflavonoids content [mg/g dry wt]					
NAA	BA	TDZ		Puerarin	Daidzin	Genistin	Daidzein	Genistein	Total
–	–	0.1	Stem	0.34 ± 0.01	40.37 ± 2.21	5.01 ± 0.32	1.31 ± 0.33	0.38 ± 0.09	47.43 ± 2.65
			Leaf	0.34 ± 0.01	22.05 ± 0.85	2.61 ± 0.24	1.17 ± 0.07	0.59 ± 0.02	26.76 ± 1.05
–	–	0.5	Stem	3.05 ± 0.58	39.58 ± 4.71	5.64 ± 1.31	0.68 ± 0.42	0.44 ± 0.09	50.39 ± 7.06
			Leaf	0.35 ± 0.01	32.46 ± 6.64	4.54 ± 0.48	1.42 ± 0.35	0.62 ± 0.06	39.37 ± 7.52
–	–	1.0	Stem	2.32 ± 0.02	24.11 ± 0.93	3.54 ± 0.55	1.39 ± 0.16	0.42 ± 0.07	31.79 ± 1.35
			Leaf	1.42 ± 0.10	18.99 ± 1.27	2.73 ± 0.61	0.92 ± 0.04	0.39 ± 0.02	24.45 ± 2.00
–	–	1.5	Stem	2.11 ± 0.21	24.34 ± 2.40	3.70 ± 0.20	1.35 ± 0.22	0.34 ± 0.33	31.85 ± 2.25
			Leaf	1.75 ± 0.10	19.46 ± 2.18	2.96 ± 0.14	1.08 ± 0.19	0.42 ± 0.14	25.67 ± 2.07
0.5	1.0	–	Stem	1.58 ± 0.07	15.71 ± 0.93	1.78 ± 0.36	0.66 ± 0.08	0.34 ± 0.04	20.07 ± 1.16
			Leaf	2.21 ± 0.38	30.90 ± 4.64	5.08 ± 0.85	1.21 ± 0.28	0.49 ± 0.04	39.91 ± 6.14
1.0	0.5	–	Stem	1.32 ± 0.03	11.69 ± 0.73	1.30 ± 0.01	0.66 ± 0.04	0.35 ± 0.04	15.32 ± 0.80
			Leaf	1.93 ± 0.18	22.49 ± 1.34	2.49 ± 0.30	0.91 ± 0.16	0.44 ± 0.02	28.26 ± 1.57
1.0	1.0	–	Stem	1.34 ± 0.14	8.03 ± 0.82	1.05 ± 0.19	0.49 ± 0.02	0.30 ± 0.01	11.21 ± 1.15
			Leaf	1.34 ± 0.13	12.11 ± 2.26	1.51 ± 0.39	0.86 ± 0.26	0.39 ± 0.07	16.22 ± 3.05

Values represent the mean ± S.D. (*n* = 3).

noids was achieved in calli from stem explants cultured on medium with 0.5 mg/l TDZ [(50.39 ± 7.06) mg/g dry wt]. HPLC analysis revealed that daidzin displayed the highest concentration of the isoflavonoids in callus cultures, followed by genistin, puerarin, daidzein and genistein, respectively. These results suggest that 0.5 mg/l TDZ showed high efficiency for callus induction, shoot regeneration, and enhanced production of isoflavonoids in *P. candollei* var. *mirifica*. According to previous reports, *in vitro* cultures of various plants on medium with TDZ gave also high levels of secondary metabolites (Kim *et al.*, 2005; Lualon *et al.*, 2008; Wongwicha *et al.*, 2008; Kamonwannasit *et al.*, 2008). Therefore, TDZ may hold a potential to enhance the yield of isoflavonoids in callus cultures of *P. candollei* var. *mirifica*.

We also studied the total isoflavonoids content in the native tuber (2-year-old), which was found to (7.04 ± 0.29) mg/g dry wt [puerarin, (1.47 ± 0.09) mg/g; daidzin, (3.66 ± 0.15) mg/g; genistin, (1.10 ± 0.03) mg/g; daidzein, (0.48 ± 0.01) mg/g; and genistein, (0.32 ± 0.01) mg/g dry wt, respectively]. Daidzin was the isoflavonoid with the highest concentration in the native tuber, *i.e.* the isoflavonoids profile in calli from *in vitro* cultures was the same as that from the native tuber. The total isoflavo-

noids content in callus cultures was 7-fold higher than that of the native tuber. In addition, the total isoflavonoids content in callus cultures from our study showed a higher level than that found in *in vitro* cultures of *P. tuberosa* (Goyal and Ramawat, 2008), *P. lobata* (Matkowsk, 2004; Li and Zhang, 2006), and *P. candollei* var. *mirifica* (Thanonkeo and Panichajakul, 2006). Therefore, calli of *P. candollei* var. *mirifica* from the present study are suitable source for studying the biosynthesis pathway of isoflavonoids in cell suspension culture.

In conclusion, stem explants of *P. candollei* var. *mirifica* cultured on MS medium supplemented with 0.5 mg/l TDZ are optimum for induction of callus, shoot regeneration and increased yield of total isoflavonoids. The present study reports a high production of bioactive phytoestrogens in *P. candollei* var. *mirifica* calli cultures. The callus developed here will be useful for cell suspension cultures to select the cell line with a high yield of isoflavonoids and large scale cultures.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Thailand Research Fund (RSA5280012) and the Graduate School, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand.

- Chansakaow S., Ishikawa T., Sekine K., Okeda M., Higuchi Y., Kudo M., and Chaichantipyuth C. (2000a), Isoflavonoids from *Pueraria mirifica* and their estrogenic activity. *Planta Med.* **66**, 572–575.
- Chansakaow S., Ishikawa T., Sekine K., Okeda M., Higuchi Y., and Chaichantipyuth C. (2000b), Identification of deoxymiroestrol as the actual rejuvenating principle of “kwao keur”, *Pueraria mirifica*. The known miroestrol may be an artifact. *J. Nat. Prod.* **63**, 173–175.
- Cherdshewasart W. and Sutjit W. (2008), Correlation of antioxidant activity and major isoflavonoid contents of the phytoestrogen-rich *Pueraria mirifica* and *Pueraria lobata* tubers. *Phytomedicine* **15**, 38–43.
- Cherdshewasart W., Kitsamai Y., and Malaivijitnond S. (2007a), Evaluation of the estrogenic activity of the wild *Pueraria mirifica* by vaginal cornification assay. *J. Reprod. Dev.* **53**, 385–393.
- Cherdshewasart W., Subtang S., and Dahlan W. (2007b), Major isoflavonoid contents of the phytoestrogen rich-herb *Pueraria mirifica* in comparison with *Pueraria lobata*. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **43**, 428–434.
- Cherdshewasart W., Traisup V., and Picha P. (2008), Determination of the estrogenic activity of wild phytoestrogen-rich *Pueraria mirifica* by MCF-7 proliferation assay. *J. Reprod. Dev.* **54**, 63–67.
- Goyal S. and Ramawat K. G. (2008), Synergistic effect of morphactin on cytokinin-induced production of isoflavonoids in cell cultures of *Pueraria tuberosa* (Roxb. ex. Willd.) DC. *Plant Growth Regul.* **55**, 175–181.
- Kamonwannasit S., Phrompittayarat W., Ingkaninan K., Tanaka H., and Putalun W. (2008), Improvement of pseudojubilogenin glycosides production from regenerated *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. and enhanced yield by elicitors. *Z. Naturforsch.* **63c**, 879–883.
- Kim O. T., Kim M. Y., Ahn J. C., Li M. Y., and Hwang B. (2005), Effects of precursor and thidiazuron on triterpene saponin biosynthesis in *Centella asiatica* (L.) Urban. *Korean J. Med. Crop Sci.* **13**, 91–94.
- Li L. and Zhang C. R. (2006), Production of puerarin and isoflavonones in cell suspension cultures of *Pueraria lobata* (Willd.): effects of medium supplementation with casein hydrolysate and coconut milk. *J. Environ. Biol.* **27**, 21–26.
- Lualon W., De-Eknamkul W., Tanaka H., Shoyama Y., and Putalun W. (2008), Multiple shoot regeneration and artemisinin production in *Artemisia annua* L. using thidiazuron. *Z. Naturforsch.* **63c**, 96–100.
- Matkowsk A. (2004), *In vitro* isoflavonoid production in callus from different organs of *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi. *J. Plant Physiol.* **161**, 343–346.

- Thanonkeo S. and Panichajakul S. (2006), Production of isoflavones, daidzein and genistein in callus cultures of *Pueraria candollei* Wall. ex Benth. var. *mirifica*. Songklanakarin J. Sci. Tech. **28**, 45–53.
- Trisomboon H., Malaivithnond S., Watanabe G., Cherdshewasart W., and Taya K. (2006), The estrogenic effect of *Pueraria mirifica* on gonadotrophin levels in aged monkeys. Endocrine **29**, 129–134.
- Urasopan N., Hamada Y., Cherdshewasart W., and Malaivithnond S. (2008), Preventive effects of *Pueraria mirifica* on bone loss in ovariectomized rats. Maturitas **59**, 137–148.
- Wongwicha W., Tanaka H., Shoyama Y., Tuvshintokh I., and Putalun W. (2008), Production of glycyrrhizin in callus cultures of licolice. Z. Naturforsch. **63c**, 413–417.

Isoflavonoid Production in a Hairy Roots Culture of *Pueraria candollei*

Latiporn Udomsuk^a, Kanokwan Jarukamjorn^a, Hiroyuki Tanaka^b,
and Waraporn Putalun^{a,*}

^a Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand.
Fax: +66-43-2 02-3 79. E-mail: waraporn@kku.ac.th

^b Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812-8582,
Japan

* Author for correspondence and reprint requests

Z. Naturforsch. **64c**, 687–691 (2009); received April 6/May 8, 2009

A hairy roots culture of *Pueraria candollei* was established using *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834 and grown in half-strength Murashige and Skoog (MS) medium. The highest production of total isoflavonoids was found to be (36.48 ± 4.09) mg/g dry wt [(3.39 ± 0.20) mg/g dry wt puerarin, (29.91 ± 3.74) mg/g dry wt daidzin, (1.65 ± 0.09) mg/g dry wt genistin, (0.76 ± 0.03) mg/g dry wt daidzein, and (0.76 ± 0.03) mg/g dry wt genistein, respectively]. The total isoflavonoid content in hairy roots of *P. candollei* was 5.18-fold higher than that of the native tuber. Effects of sucrose content and medium type on growth and isoflavonoid production were investigated. 5% (w/v) Sucrose was an optimum content for the growth and isoflavonoid accumulation in *P. candollei* hairy roots. Half-strength MS medium had the highest effect for biomass production whereas woody plant medium had mostly stimulated isoflavonoid content in hairy roots.

Key words: Isoflavonoid, Hairy Roots Culture, *Pueraria candollei*

Introduction

Pueraria candollei Wall. ex Benth. (Leguminosae), a Thai indigenous herb with the local name White Kwao Krua, has long been used in traditional medicine for rejuvenation. A *P. candollei* tuberous extract exhibited dose-dependent estrogenic effects on the reproductive system (Cherdshewasart *et al.*, 2004, 2007). It also showed the ability to prevent bone loss (Urasopan *et al.*, 2008) and antioxidant activity (Cherdshewasart and Sutjit, 2008). The major chemical constituents isolated from the plant tuber are isoflavonoids, including puerarin, daidzin, genistin, daidzein, and genistein (Chansakaow *et al.*, 2000). These compounds are mainly accumulated in tuberous roots (Ingham *et al.*, 1986). The individual and total isoflavonoid contents among tubers collected from different places exhibited different levels caused by significant differences in active compounds. This variability in isoflavonoid levels in mature tubers could seriously affect the quality of any tuber-derived materials or even research results derived from the plants (Cherdshewasart and Sriwatcharakul, 2007).

Plant tissue cultures have been suggested as a potential tool for the production of useful secondary metabolites. Thus, using this technology, secondary metabolites can be produced under controlled and reproducible conditions, independent of geographical and climatic factors. Hairy roots cultures are another alternative method to produce isoflavonoids, because of their rapid growth, genetic stability, and capacity to synthesize secondary metabolites (Shanks and Morgan, 1999). It is known that many factors could affect cell growth and secondary metabolites production in plant tissue cultures including media components and carbon sources (Dicosmo and Misawa, 1995). Therefore, optimum conditions for hairy roots cultures are necessary for biomass and secondary metabolites production. There are many reports which have successfully presented the secondary metabolites production by optimizing the culture conditions such as sucrose content and medium type (Putalun *et al.*, 2004, 2006; Kittipongpatana *et al.*, 1998). In the present study, we established a hairy roots culture of *P. candollei* and investigated the effect of medium type and sucrose content in

the hairy roots culture on cell growth and isoflavonoid production.

Material and Methods

Chemicals

Daidzin, genistin, daidzein, and genistein were purchased from Nacalai Tesque, Inc. (Tokyo, Japan). Puerarin was obtained from Chromadex Inc. (Irvine, CA, USA). Cefotaxime (CF) sodium salt was purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan). All other chemicals were standard commercial products of analytical grade.

Plant material

P. candollei seeds were obtained from the Botanical Garden, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Thailand. The seeds were washed with sterile distilled water and were surface-sterilized in 10% sodium hypochlorite for 15–20 min. After being washed three times with sterilized water, the seeds were immersed in 70% ethanol for 1 min and then germinated on hormone-free Murashige and Skoog (MS) medium containing 3% sucrose (w/v), pH 5.5. Germination started within 7 d and was carried out at $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ under 16 h light/day. Plantlets were used for hairy roots induction.

Hairy roots induction

The young stems were infected with *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834, cultured on MS medium at 25°C for 48 h, and then transferred to $\frac{1}{2}$ MS medium with 500 mg/l CF. At 2-week-intervals, infected segments were transferred to $\frac{1}{2}$ MS medium with 300 mg/l and 100 mg/l CF, respectively. Transformed roots of *P. candollei* were grown in 125-ml flasks containing 30 ml of $\frac{1}{2}$ MS liquid medium. The medium was agitated on a rotary shaker (100 rpm at 25°C , under continuous light for 16 h/d). The hairy roots were subculture every 2 weeks into fresh medium.

Growth rate, effects of sucrose and medium type on isoflavonoid production in hairy roots

Fully grown hairy roots were subcultured into 125-ml flasks containing 30 ml of $\frac{1}{2}$ MS liquid medium. Hairy roots were harvest every 5 d to determine the fresh weight (wt), dry wt and isoflavonoid content. Various contents of sucrose (1–9%

w/v) and medium types [MS, B5 and woody plant medium (WP)] were used to test their effect on the growth of hairy roots and isoflavonoid production under light (16 h photoperiod) conditions at 25°C with agitation (100 rpm). After 30 d of culture, the dry wt and isoflavonoid contents were determined. Each experiment was done in triplicate.

Extraction of samples and isoflavonoid analysis

Hairy roots were measured, as dry wt, gravimetrically by harvesting the biomass and drying at 50°C in a hot air oven to a constant weight. Dried samples (30 mg) of hairy roots were powdered and extracted five times with 0.5 ml methanol with sonication. The extracts were combined, evaporated and then redissolved with 1 ml methanol. The extracted solutions were analyzed for their puerarin, daidzin, genistin, daidzein and genistein contents by HPLC using a PerkinElmer Series 200 LC pump connected with a PerkinElmer 785A UV/VIS detector (254 nm) and a PE Nelson computer. An RP-18 column (LiChroCART®, 125 mm $\times$ 4 mm, 5 μm particle size, Merck, Germany) was used. The mobile phase consisted of 25% acetonitrile containing 1.5% acetic acid. The flow rate was 1.0 ml/min. Each sample was examined in triplicate.

Results and Discussion

Stem parts of *P. candollei* were infected with *A. rhizogenes* ATCC15834. After 2 weeks of culture, the hairy roots were emerged from infection sites. The induced hairy roots were transferred to half-strength ($\frac{1}{2}$) MS medium with CF to eliminate *A. rhizogenes*. They grew vigorously in the medium and had characteristics of transformed roots, such as fast growth and high lateral branching. Transformed roots of *P. candollei* were grown in 30 ml of $\frac{1}{2}$ MS liquid medium. During incubation, the hairy roots changed gradually from white to brown, and some brown substance was secreted from them into the medium after 3–4 weeks of culture.

The growth pattern of *P. candollei* hairy roots revealed that the hairy roots grew slowly in the first 5 days of culture (Fig. 1). However, the hairy roots grew faster subsequently, and the fastest growth happened during days 10–20. After 20 d of culture, the growth rate began to slow down, but the biomass of the hairy roots still increased

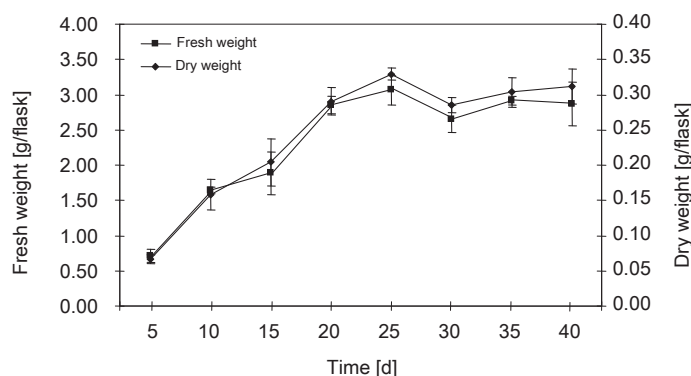


Fig. 1. Time course of the growth of a *P. candollei* hairy roots culture on liquid ½ MS medium for 40 days.

until day 25 of culture ($0.33 \text{ g dry wt/flask}$). After 20 days of culture, the colour of the hairy roots changed from white to brown, and the biomass decreased after 25 days of culture. These results were similar to those of previous studies on hairy roots cultures of *P. phaseoloides* (Shi and Kintzios, 2003). The production of the isoflavonoids puerarin, daidzin, genistin, daidzein, and genistein was different from the growth rate. The hairy roots produced isoflavonoids in the first 5 days of culture fast and after that the production rate only slightly increased. The highest production of isoflavonoids was found to be ($36.48 \pm 4.09 \text{ mg/g dry wt}$) [($3.39 \pm 0.20 \text{ mg/g dry wt puerarin}$, ($29.91 \pm 3.74 \text{ mg/g dry wt daidzin}$, ($1.64 \pm 0.09 \text{ mg/g dry wt genistin}$, ($0.76 \pm 0.03 \text{ mg/g dry wt daidzein}$, and ($0.76 \pm 0.03 \text{ mg/g dry wt genistein}$, respectively)] at day 35 (Table I). Furthermore, the total isoflavonoid content in native tuberous roots was investigated and found to be ($7.04 \pm 0.29 \text{ mg/g dry wt}$) [($1.47 \pm 0.09 \text{ mg/g dry$

wt puerarin , ($3.66 \pm 0.15 \text{ mg/g dry wt daidzin}$, ($1.10 \pm 0.03 \text{ mg/g dry wt genistin}$, ($0.48 \pm 0.01 \text{ mg/g dry wt daidzein}$, and ($0.32 \pm 0.01 \text{ mg/g dry wt genistein}$, respectively)]. The results showed that the isoflavonoid content in hairy roots was about 5.18-fold higher than that in native roots. The hairy roots culturing presented herein may be a promising tool for the large-scale production of isoflavonoids.

Among the nutritional factors, sucrose is a special significant factor for cell growth and secondary metabolites production. ½ MS media containing various sucrose contents were examined for their effects on biomass and isoflavonoid production. The biomass of hairy roots from ½ MS medium containing 3% sucrose was found to be ($0.15 \pm 0.05 \text{ g/flask}$). The maximum level of biomass was observed for the medium containing 5% sucrose [($0.31 \pm 0.04 \text{ g/flask}$]. The biomass of hairy roots decreased at higher sucrose contents (7% and 9%). The suppression of hairy roots

Table I. Time course of the isoflavonoid content in *P. candollei* hairy roots.

Time [d]	Isoflavonoid content [mg/g dry wt]					
	Puerarin	Daidzin	Genistin	Daidzein	Genistein	Total
5	1.80 ± 0.09	23.73 ± 0.95	1.17 ± 0.04	0.90 ± 0.07	0.43 ± 0.02	28.02 ± 1.18
10	1.65 ± 0.04	22.60 ± 0.31	1.14 ± 0.00	0.51 ± 0.02	0.41 ± 0.01	26.31 ± 0.38
15	1.93 ± 0.61	26.08 ± 1.04	1.15 ± 0.29	0.71 ± 0.12	0.55 ± 0.09	30.43 ± 2.15
20	2.59 ± 0.05	28.09 ± 2.12	1.40 ± 0.08	0.66 ± 0.02	0.68 ± 0.02	33.42 ± 2.29
25	2.25 ± 0.29	24.62 ± 3.42	1.20 ± 0.16	0.44 ± 0.00	0.63 ± 0.04	29.14 ± 3.91
30	2.83 ± 0.25	23.47 ± 3.10	1.32 ± 0.11	0.77 ± 0.05	0.71 ± 0.02	29.11 ± 3.52
35	3.39 ± 0.20	29.91 ± 3.74	1.65 ± 0.09	0.76 ± 0.03	0.76 ± 0.03	36.48 ± 4.09
40	2.83 ± 0.14	25.88 ± 0.76	1.50 ± 0.01	0.62 ± 0.02	0.85 ± 0.03	31.69 ± 1.04

Values represent the mean $\pm$ S.D. ($n = 3$).

growth in the media containing 7% and 9% sucrose could be due to the high osmotic pressure at high sucrose contents. The isoflavonoid accumulation in hairy roots appeared to be closely related to biomass accumulation; 5% sucrose produced the highest level of isoflavonoids which was found to be (30.87 ± 3.10) mg/g dry wt (Table II). These results suggested that 5% sucrose was an optimum content for a hairy roots culture of *P. candollei*.

Besides, the medium type is one of the factors that can affect the biomass and isoflavonoid production. The effect of different medium types was investigated. Fig. 2 shows that $\frac{1}{2}$ MS medium produced the highest dry wt of hairy roots $[(0.13 \pm 0.03)$ g/flask]. The lowest dry wt of biomass of hairy roots was observed with $\frac{1}{2}$ B5 medium. The isoflavonoid contents in hairy roots were determined as shown in Table III. The maximum isoflavonoid content in hairy roots was found in woody plant medium $[(26.39 \pm 3.80)$ mg/g dry wt]. These results indicated that woody plant medium had the highest effect on isoflavonoid accumulation in hairy roots.

In conclusion, hairy roots of *P. candollei* can up-regulate the level of isoflavonoid content to about

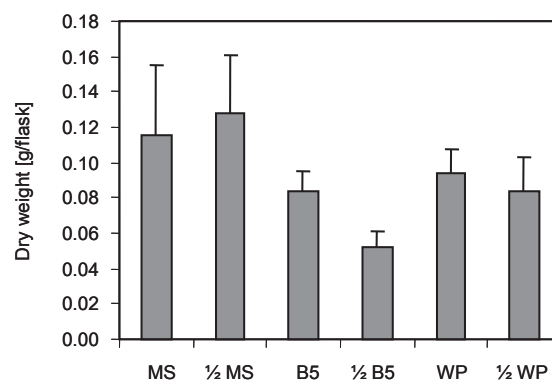


Fig. 2. Effect of medium type on dry weight of *P. candollei* hairy roots.

5.18-fold of that in intact roots. The optimization of growth and isoflavonoid accumulation of *P. candollei* hairy roots depend on the sucrose content – 5% sucrose (w/v) was optimum for biomass and isoflavonoid accumulation. $\frac{1}{2}$ MS medium had the highest effect on biomass production whereas woody plant medium was suitable for isoflavonoid accumulation in hairy roots.

Table II. Effect of sucrose in medium on isoflavonoid content in *P. candollei* hairy roots.

Sucrose content (% w/v)	Isoflavonoid content [mg/g dry wt]					
	Puerarin	Daidzin	Genistin	Daidzein	Genistein	Total
1	2.51 ± 0.35	16.78 ± 3.57	1.04 ± 0.12	0.94 ± 0.08	0.48 ± 0.02	21.76 ± 4.16
3	2.22 ± 0.04	17.71 ± 3.15	1.09 ± 0.05	0.72 ± 0.01	0.58 ± 0.06	22.32 ± 3.30
5	2.71 ± 0.25	25.67 ± 2.70	1.40 ± 0.11	0.51 ± 0.01	0.59 ± 0.03	30.87 ± 3.10
7	2.18 ± 0.09	21.32 ± 3.32	1.21 ± 0.09	0.44 ± 0.01	0.57 ± 0.01	25.73 ± 3.52
9	2.25 ± 0.29	24.62 ± 3.42	1.20 ± 0.16	0.44 ± 0.00	0.63 ± 0.04	29.14 ± 3.91

Values represent the mean ± S.D. ($n = 3$).

Table III. Effect of medium type on isoflavonoid content in *P. candollei* hairy roots.

Medium type	Isoflavonoid content [mg/g dry wt]					
	Puerarin	Daidzin	Genistin	Daidzein	Genistein	Total
MS	2.37 ± 0.15	17.55 ± 3.86	1.02 ± 0.13	0.67 ± 0.06	0.61 ± 0.03	22.20 ± 4.24
$\frac{1}{2}$ MS	2.22 ± 0.04	17.71 ± 3.15	1.09 ± 0.05	0.72 ± 0.01	0.58 ± 0.06	22.32 ± 3.30
B5	2.13 ± 0.48	11.62 ± 2.23	0.95 ± 0.16	0.85 ± 0.12	0.58 ± 0.04	16.12 ± 3.02
$\frac{1}{2}$ B5	2.29 ± 0.22	14.44 ± 1.05	1.09 ± 0.05	0.73 ± 0.03	0.66 ± 0.02	19.21 ± 1.37
WP	1.90 ± 0.21	22.33 ± 3.40	1.14 ± 0.13	0.51 ± 0.01	0.51 ± 0.04	26.39 ± 3.80
$\frac{1}{2}$ WP	2.16 ± 0.21	7.24 ± 0.90	0.70 ± 0.04	1.63 ± 0.05	0.47 ± 0.01	12.20 ± 1.20

Values represent the mean ± S.D. ($n = 3$).

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Thailand Research Fund (RSA5280012) and the Graduate School, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand. The research in this paper was

also supported in part by a Grant in Aid from the JSPS Asian CORE Program, the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

- Chansakaow S., Ishikawa T., Sekine K., Okeda M., Higuchi Y., Kudo M., and Chaichantipyuth C. (2000), Isoflavonoids from *Pueraria mirifica* and their estrogenic activity. *Planta Med.* **66**, 572–575.
- Cherdshewasart W. and Sriwatcharakul S. (2007), Major isoflavonoid contents of the 1-year-cultivated phytoestrogen-rich herb, *Pueraria mirifica*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 2527–2533.
- Cherdshewasart W. and Sutjit W. (2008), Correlation of antioxidant activity and major isoflavonoid contents of the phytoestrogen-rich *Pueraria mirifica* and *Pueraria lobata* tubers. *Phytomedicine* **15**, 38–43.
- Cherdshewasart W., Cheewasopit W., and Picha P. (2004), The differential anti-proliferation effect of white (*Pueraria mirifica*), red (*Butea superba*), and black (*Mucuna collettii*) Kwao Krua plants on the growth of MCF-7 cells. *J. Ethnopharmacol.* **93**, 255–260.
- Cherdshewasart W., Panriansaen R., and Picha P. (2007), Pretreatment with phytoestrogen-rich plant decreases breast tumor incidence and exhibits lower profile of mammary ER alpha and ER beta. *Maturitas* **58**, 174–181.
- Dicosmo F. and Misawa M. (1995), Plant cell and tissue culture: alternatives for metabolite production. *Bio-technol. Adv.* **13**, 425–453.
- Ingham J., Markham K., Dzied S., and Pope G. S. (1986), Puerarin 6-*O*- β -apiofuranoside, a C-glycosylisoflavone *O*-glycoside from *Pueraria mirifica*. *Phytochemistry* **25**, 1772–1775.
- Kittipongpatana N., Hock R. S., and Porter J. R. (1998), Production of solasodine by hairy root, callus, and cell suspension cultures of *Solanum aviculare* Forst. *Plant Cell Tiss. Org.* **52**, 133–143.
- Putalun W., Prasarnsiwamai P., Tanaka H., and Shoyama Y. (2004), Solasodine glycoside production by hairy root cultures of *Physalis minima* Linn. *Biotechnol. Lett.* **26**, 545–548.
- Putalun W., Pimmeuangkao S., De-Eknamkul W., Tanaka H., and Shoyama Y. (2006), Sennosides A and B production by hairy roots of *Senna alata* (L.) Roxb. *Z. Naturforsch.* **61c**, 367–371.
- Shanks J. V. and Morgan J. (1999), Plant ‘hairy root’ culture. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 151–155.
- Shi H. P. and Kintzios S. (2003), Genetic transformation of *Pueraria phaseoloides* with *Agrobacterium rhizogenes* and puerarin production in hairy roots. *Plant Cell Rep.* **21**, 1103–1107.
- Urasopan N., Hamada Y., Cherdshewasart W., and Malaiwittnond S. (2008), Preventive effects of *Pueraria mirifica* on bone loss in ovariectomized rats. *Maturitas* **59**, 137–148.

Planta Medica

Journal of Medicinal Plant and Natural Product Research

Editor-in-Chief

Luc Pieters, Antwerp, Belgium

Senior Editor

Adolf Nahrstedt, Münster, Germany

Review Editor

Matthias Hamburger, Basel, Switzerland

Editors

Wolfgang Barz, Münster, Germany
Rudolf Bauer, Graz, Austria
Veronika Butterweck, Gainesville FL, USA
João Batista Calixto, Florianopolis, Brazil
Thomas Efferth, Mainz, Germany
Jerzy W. Jaroszewski, Copenhagen, Denmark
Ikhlas Khan, Oxford MS, USA
Wolfgang Kreis, Erlangen, Germany
Irmgard Merfort, Freiburg, Germany
Kurt Schmidt, Graz, Austria
Thomas Simmet, Ulm, Germany
Hermann Stuppner, Innsbruck, Austria
Yang-Chang Wu, Kaohsiung, Taiwan
Yang Ye, Shanghai, China

Editorial Offices

Claudia Schärer, Basel, Switzerland
Tess De Bruyne, Antwerp, Belgium

Advisory Board

Giovanni Appendino, Novara, Italy
John T. Arnason, Ottawa, Canada
Yoshinori Asakawa, Tokushima, Japan
Lars Bohlin, Uppsala, Sweden
Gerhard Bringmann, Würzburg, Germany
Reto Brun, Basel, Switzerland
Mark S. Butler, Singapore, R. of Singapore
Ihsan Calis, Ankara, Turkey
Salvador Cañigueral, Barcelona, Spain
Hartmut Derendorf, Gainesville, USA
Verena Dirsch, Vienna, Austria
Jürgen Drewe, Basel, Switzerland
Roberto Maffei Facino, Milan, Italy
Alfonso Garcia-Piñeres, Frederick MD, USA
Rolf Gebhardt, Leipzig, Germany
Clarissa Gerhäuser, Heidelberg, Germany
Jürg Gertsch, Zürich, Switzerland
Simon Gibbons, London, UK
De-An Guo, Shanghai, China
Leslie Gunatilaka, Tuscon, USA
Solomon Habtemariam, London, UK
Andreas Hensel, Münster, Germany
Werner Herz, Tallahassee, USA
Kurt Hostettmann, Geneva, Switzerland
Peter J. Houghton, London, UK
Jinwoong Kim, Seoul, Korea
Gabriele M. König, Bonn, Germany
Ulrich Matern, Marburg, Germany
Matthias Melzig, Berlin, Germany
Dulcie Mulholland, Guildford, UK
Eduardo Munoz, Cordoba, Spain
Kirsi-Maria Oksman-Caldentey, Espoo, Finland
Ana Maria de Oliveira, São Paulo, Brazil
Nigel B. Perry, Dunedin, New Zealand
Joseph Pfeilschifter, Frankfurt, Germany
Peter Proksch, Düsseldorf, Germany
Thomas Schmidt, Münster, Germany
Volker Schulz, Berlin, Germany
Hans-Uwe Simon, Bern, Switzerland
Leandros Skaltsounis, Athens, Greece
Han-Dong Sun, Kunming, China
Benny K. H. Tan, Singapore, R. of Singapore
Ren Xiang Tan, Nanjing, China
Deniz Tasdemir, London, UK
Nunziatina de Tommasi, Salerno, Italy
Arnold Vlietinck, Antwerp, Belgium
Angelika M. Vollmar, München, Germany
Heikki Vuorela, Helsinki, Finland
Jean-Luc Wolfender, Geneva, Switzerland
De-Quan Yu, Beijing, China

Publishers

Georg Thieme Verlag KG
Stuttgart · New York
Rüdigerstraße 14
D-70469 Stuttgart
Postfach 30 11 20
D-70451 Stuttgart

Thieme Publishers
333 Seventh Avenue
New York, NY 10001, USA
www.thieme.com

Reprint

© Georg Thieme Verlag KG
Stuttgart · New York
Reprint with the permission
of the publishers only

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Total Isoflavonoids in *Pueraria candollei* Using Anti-Puerarin and Anti-Daidzin Polyclonal Antibodies

Authors

Benyakan Pongkitwitoon¹, Seiichi Sakamoto², Hiroyuki Tanaka², Ryota Tsuchihashi³, Junei Kinjo³, Satoshi Morimoto², Waraporn Putalun¹

Affiliations

¹ Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

² Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan

³ Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University, Fukuoka, Japan

Key words

- daidzin
- enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
- isoflavonoids
- Leguminosae
- *Pueraria candollei*
- puerarin

Abstract

Pueraria candollei (White Kwao Khuer) is a medicinal plant containing puerarin, daidzin, genistin, daidzein, and genistein as major isoflavonoids used for its rejuvenating and estrogenic effects. In order to analyze these compounds, a single enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for total isoflavonoids was developed using anti-puerarin and anti-daidzin polyclonal antibodies (PABs). The range for calibration of isoflavonoids by ELISA was 0.05–6.25 µg/mL. Total isoflavonoid concentrations in *P. candollei* samples determined by the newly developed assay system showed good agreement with those analyzed by HPLC. Based on validation analysis, this analytical method by ELISA is a precise, accurate, and sensitive

method for the determination of total isoflavonoids in *P. candollei*.

Abbreviations

ABTS:	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
BSA:	bovine serum albumin
CR:	cross reactivities
ELISA:	enzyme-linked immunosorbent assay
GPBS:	0.2% gelatin in phosphate buffered saline
MS:	Murashige and Skoog
OVA:	ovalbumin
PABs:	polyclonal antibodies
TPBS:	0.05% Tween 20 in phosphate buffered saline

Introduction

Pueraria candollei (Leguminosae), locally called "White Kwao Khuer", is a famous Thai traditional herbal plant recorded to be used for rejuvenating and estrogenic effects. It has long been consumed among Thai women for similar purposes as modern hormone replacement therapy. Puerarin, daidzin, genistin, daidzein and genistein were identified as its major isoflavonoids [1,2]. Based on the structural similarity to the endogenous estrogens, 17β-estradiol (Fig. 1), isoflavonoids have been found to be a major class of phytoestrogens. These compounds possess estrogen-like properties and are associated with a wide range of human health benefits including lower incidences of certain cancers, osteoporosis, cardiovascular diseases, and postmenopausal symptoms in animal models and some human trials [3,4]. Due to great pharmacological benefits, high isoflavonoid-producing plants are needed as a

source for pharmaceutical material. As a consequence, a fast, sensitive and reliable analytical method is required to screen the level of these compounds in plants. Until recently, isoflavonoids were classically assayed using chromatographic methods including gas chromatography (GC), high-performance liquid chromatography (HPLC), and capillary electrophoresis (CE) coupled with various detections such as ultraviolet absorption (UV), electrochemical detection (ED), fluorescence detection, mass spectrometry (MS), and nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) [5]. Some immunological assays for isoflavonoids have also been developed [6–8]. Although immunoassays, which have the advantages of use in high throughput screening purposes, potential of high sensitivity, specificity, and relatively low cost, have become popular in recent years, an immunoassay to determine total isoflavonoids in *P. candollei* has not been reported to date. In this paper, we report a new approach for the single analysis of 5 major isoflavonoids in *P. candollei* sam-

received Sept. 16, 2009
revised Nov. 17, 2009
accepted Nov. 30, 2009

Bibliography

DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0029-1240725>
Published online December 23, 2009
Planta Med 2010; 76: 1–6
© Georg Thieme Verlag KG
Stuttgart · New York ·
ISSN 0032-0943

Correspondence

Assoc. Prof. Waraporn Putalun
Faculty of Pharmaceutical
Sciences
Khon Kaen University
Friendship Highway
40002 Khon Kaen
Thailand
Phone: + 66 43 20 23 78
Fax: + 66 43 20 23 79
waraporn@kku.ac.th

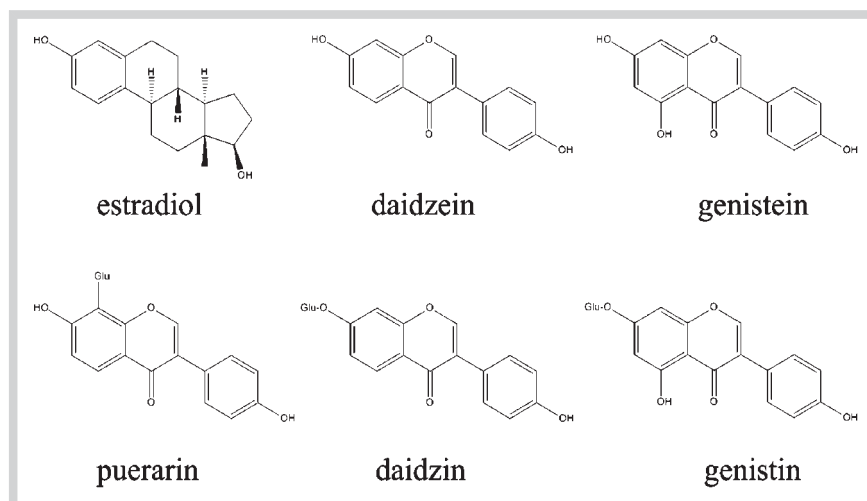


Fig. 1 Structure of estradiol compared with isoflavonoids found in *P. candollei*.

ples by using the combination of anti-puerarin and anti-daidzin polyclonal antibodies (PAb).

Materials and Methods

Reagents and chemicals

Puerarin (>97%), daidzin (99%), genistin (99%), tectoridin (>98%), irisolidone (>98%), daidzein (>98%), genistein (99%), and tectorigenin (>92%) were obtained from Fukuoka University, Japan. Bovine serum albumin (BSA) and ovalbumin (OVA) were provided by Sigma. Freund's complete and incomplete adjuvants were purchased from Difco. Peroxidase-labeled anti-rabbit IgG was obtained from MP Biomedicals. 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) was purchased from Wako. All other chemicals were standard commercial products of analytical-reagent grade.

Plant materials

The tuber of *Pueraria candollei* var. *mirifica* was collected from Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand. The tuber of *Pueraria candollei* var. *candollei* was collected from the Botanical Garden, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Thailand. The hairy roots of *P. candollei* var. *candollei* were induced by transformation using wild-type *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 and cultivated in half-strength Murashige and Skoog (MS) medium. Plant species were identified by Dr. W. Putalun, Khon Kaen University. The voucher specimens (NI-PSKKU 006-007) are deposited at the Herbarium of Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Thailand.

Sample preparation

Plant materials were dried in a hot air oven at 50°C for 48 h and then ground to a powder. Dried powdered samples (30 mg) were extracted with 0.5 mL methanol under sonication for 1 h. The extracts were then centrifuged at 2500 rpm for 1 min and the supernatants were transferred to a microtube. This extraction step was repeated three times. The extracted solutions were evaporated in a water-bath at 60°C to dryness. The residues were reconstituted in methanol (1 mL) and diluted appropriately for both ELISA and HPLC assays.

Synthesis of antigen conjugates

Puerarin-BSA conjugate was synthesized by the periodate oxidation method [9]. Puerarin (3 mg) in 0.4 mL dimethyl sulfoxide (DMSO) was added dropwise to 0.6 mL of a solution containing NaIO₄ (3 mg) and then stirred at room temperature for 1 h. After that, BSA (8 mg) in 1 mL carbonate buffer (50 mM, pH 9.6) was added and stirred for 5 h. The reaction mixture was dialyzed against five changes of H₂O and then lyophilized. Finally, puerarin-BSA (5.0 mg) was obtained. The same method was used to synthesize daidzin-BSA, puerarin-OVA, and daidzin-OVA.

Determination of hapten number in hapten-protein conjugates by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS)

The hapten numbers of the antigen conjugates were determined by MALDI-TOF-MS as previously described [10]. A small amount (1–10 pmol) of an antigen conjugate was mixed with a 10³-fold molar excess of sinapinic acid in an aqueous solution containing 0.15% trifluoroacetic acid. The mixture was subjected to MALDI-TOF-MS (Voyager Elite; Perspective Biosystems) and irradiated with a nitrogen laser (256 nm, 150 ns pulse). The ions formed by each pulse were accelerated by a 20 kV potential into a 2.0 m evacuated tube. The data were analyzed using GRAMS/386 software (Galactic Industries).

Immunization

Female New Zealand white rabbits at 10 weeks of age were obtained from National Animal Centre, Mahidol University, Nakhon Pathom, Thailand. All rabbits were acclimated for at least 7 days to their housing with a 12-h light:12-h dark cycle under controlled temperature (24±2°C) and humidity (45±2%) before dosing. Animal handling and the treatment protocol were approved by the Animal Ethic Committee of Khon Kaen University (Reference No. 0514.1.12.2/20, 23 April 2009). A 3-kg New Zealand White rabbit was immunized subcutaneously with 1 mL 1:1 emulsion mixture of puerarin-BSA (400 µg/mL) and Freund's complete adjuvant. After 4 weeks, 1 mL intramuscular booster of the same conjugate (400 µg/mL puerarin-BSA) emulsified with Freund's incomplete adjuvant was administered. The final immunization was carried out intravenously with 1 mL of puerarin-BSA (200 µg/mL). After 7 days, the presence of antibodies using ELISA was checked and the rabbit was bled. The serum was removed from the clot and centrifuged at 4000 rpm for 10 min to

Compound	Anti-puerarin PABs	Anti-daidzin PABs
Isoflavonoids found in <i>P. candollei</i>		
► Puerarin (8-glucosyl-4',7-dihydroxyisoflavone)	100	0.11
► Daidzin (7-O-glucosyl-4'-hydroxyisoflavone)	<0.001	100
► Daidzein (4',7-dihydroxyisoflavone)	127.79	93.38
► Genistin (7-O-glucosyl-4',5-dihydroxyisoflavone)	<0.001	49.01
► Genistein (4',5,7-trihydroxyisoflavone)	5.12	45.13
Isoflavonoids not found in <i>P. candollei</i>		
► Tectorigenin (4',5,7-trihydroxy-6-methoxyisoflavone)	<0.001	66.59
► Tectoridin (7-O-glucosyl-4',5-dihydroxy-6-methoxyisoflavone)	<0.001	32.69
► Irisolidone (5,7-dihydroxy-4',6-dimethoxyisoflavone)	<0.001	<0.001
Flavonoids		
► Rutin	<0.001	<0.001
► Hesperidin	<0.001	<0.001
► Naringin	<0.001	<0.001
Anthraquinones		
► Sennoside A	<0.001	<0.001
► Sennoside B	<0.001	<0.001
Triterpenoids saponins		
► Ginsenoside Rb1	<0.001	<0.001
► Ginsenoside Rg1	<0.001	<0.001
► Glycyrrhizin	<0.001	<0.001
Sesquiterpene lactones		
► Artemisinin	<0.001	<0.001
► Artesunate	<0.001	<0.001
Naphthoquinone		
► Plumbagin	<0.001	<0.001

Table 1 CRs of the PABs against some naturally occurring compounds.

remove any remaining blood cells and stored at -20°C until used. Daidzin-BSA was administered to another rabbit using the same protocol.

Purification of PABs

Anti-puerarin PABs were purified using a Protein G FF column (0.46×11 cm; Amersham Pharmacia Biotech). The serum was applied to the column and washed with 20 mM phosphate buffer (pH 7). Bound IgG was eluted with 100 mM citrate buffer (pH 2.7) at a flow rate of 1 mL/min. The eluted IgG was neutralized with 1 M Tris-HCl buffer (pH 9.0), then dialyzed against five changes of H_2O and finally lyophilized. Anti-daidzin PABs were purified using the same method.

Reactivities of the PABs

The reactivity of anti-puerarin PABs to puerarin-OVA was determined by indirect ELISA. The 96-well plate (Maxisorb Nunc) was coated with 100 μL of 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ puerarin-OVA in 50 mM carbonate buffer (pH 9.6) and incubated at 37°C for 1 h. The plate was washed three times with 0.05% Tween 20 in phosphate buffered saline (TPBS). After that, the plate was treated with 300 μL of 0.2% gelatin in phosphate buffered saline (GPBS) for 1 h to reduce non-specific adsorption. Then, the plate was washed three times with TPBS and reacted with 100 μL of the testing antibody for 1 h. Next, the plate was washed again with TPBS three times and then the PABs were combined with 100 μL of a solution of a 10^3 -fold diluted solution of peroxidase-conjugated goat IgG fraction to rabbit IgG Fc for 1 h. After washing the plate three times with TPBS, 100 μL of substrate solution consisting of 100 mM citrate buffer (pH 4.0) containing 0.003% H_2O_2 and 0.3 mg/mL of ABTS were added to each well and incubated for 15 min. Absorbance at 405 nm was measured using a microplate reader (Model 550 Microplate Reader; BioRad Laboratories). All reactions were car-

ried out at 37°C . The reactivity of anti-daidzin PABs to daidzin-OVA was determined by the same protocol.

Characterization of the PABs by competitive ELISA

The 96-well plate was coated with 100 μL of 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ puerarin-OVA in 50 mM carbonate buffer (pH 9.6) and treated with 300 μL of GPBS for 1 h. After three times washings with TPBS, 50 μL of various concentrations of standard compounds or samples in 20% methanol were incubated with 50 μL of the PABs solution for 1 h. The plate was washed three times with TPBS and then the PABs were combined with 100 μL of a 10^3 -fold diluted solution of peroxidase-conjugated goat IgG fraction to rabbit IgG Fc for 1 h. After washing the plate three times with TPBS, 100 μL of substrate solution were added and incubated for 1 h. Absorbance at 405 nm was measured using a microplate reader. The cross reactivities (CRs) of the anti-puerarin PABs with various compounds were calculated using the method of Weiler and Zenk [11], as follows:

$$\text{CR}(\%) = \frac{\text{IC}_{50} \text{ for puerarin} \times 100}{\text{IC}_{50} \text{ for compound under investigation}}$$

The CRs of the anti-daidzin PABs were calculated using the same method.

ELISA for total isoflavonoids concentration by using the combination of anti-puerarin and anti-daidzin PABs

Mixtures of puerarin-OVA and daidzin-OVA (100 μL ; 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ each in 50 mM carbonate buffer, pH 9.6) were adsorbed in the wells of the 96-well immunoplate. The plate was treated with 300 μL of GPBS for 1 h and then washed 3 times with TPBS. A 50 μL volume of various concentrations of puerarin and daidzin (ratio 1:1) or samples dissolved in 20% methanol was incubated with 50 μL of anti-puerarin and anti-daidzin mixture solution

(5 µg/mL and 1 µg/mL, respectively) for 1 h. The plate was washed three times with TPBS and then the PABs were combined with 100 µL of a 10³-fold diluted solution of peroxidase-conjugated goat IgG fraction to rabbit IgG Fc for 1 h. After washing the plate three times with TPBS, 100 µL of substrate solution were added and incubated for 1 h. Absorbance at 405 nm was measured using a microplate reader. All reactions were carried out at 37 °C. Reproducibility and precision of the assay were determined by a competitive ELISA. The variation between replicates from well-to-well (intra-assay) and plate-to-plate (inter-assay) were determined. Accuracy was evaluated by analyzing the mixture of *P. candollei* extracts and various known concentrations of isoflavonoids.

HPLC analysis

The HPLC was performed using the Agilent 1100 Series HPLC system equipped with a G1310A isopump, a G1314A UV-Vis detector (254 nm), and a G1328A manual injector with 20 µL loop (Agilent). An RP-18 column (125 mm × 4 mm, 5 µm particle size, Merck) was used. The mobile phase consisted of 20% acetonitrile. The flow rate was 1.00 mL/min. Mixtures of standards representing major isoflavonoids in *Pueraria candollei*, puerarin, daidzin, genistin, daidzein and genistein were prepared in methanol. Calibration curves were constructed in the concentration range of 5–50 µg/mL. The limits of detection (LOD) were 0.98 µg/mL for genistin and daidzein, 1.95 µg/mL for daidzin and genistein, and 3.90 µg/mL for puerarin. The analyses of the samples were run in triplicate.

Results and Discussion

A broad peak of puerarin-BSA conjugate appeared approximately at m/z = 68,230 while a peak of daidzin-BSA appeared at m/z = 71,395. According to molecular weights of BSA, puerarin, and daidzin which are 66, 433, 416, and 416, respectively, at least 4 molecules of puerarin, and at least 11 molecules in the case of daidzin, were conjugated with BSA. Generally, 3–21 molecules of hapten conjugated with carrier protein were sufficient for the immunization. ELISA experiments were set up using puerarin-OVA or daidzin-OVA conjugate as a coating antigen for each PAB. Sera obtained at different times of immunization showed the presence of the PABs. The rabbits were then bled and the sera were applied to a protein G column. The total IgGs were obtained and used for further analysis. The reactivities of the various concentrations of the specific PABs were tested by indirect ELISA. The antibody concentrations at which the absorbance was about 1.0 (5 µg/mL and 1 µg/mL for anti-puerarin and anti-daidzin, respectively) were selected for competitive ELISA.

Since CR is the most important factor for determining the value of the antibodies, a specific assay was performed in order to determine the CRs of PABs with various related compounds. As indicated in Table 1, anti-daidzin PABs had CRs against the major isoflavonoids found in *P. candollei*, except puerarin (0.11%), while anti-puerarin PABs had reactivities only against puerarin and daidzein, which is the aglycone form of puerarin (100% and 127.79%, respectively) with weak CRs against genistein (5.12%). Both PABs had no CRs against irisolidone, which has a methoxy group at C-4'. Although CRs against tectoridin and tectorigenin (32.69% and 66.59%, respectively) were found in anti-daidzin PABs, there is no record that these two isoflavonoids have been found in *P. candollei*. These results suggest that an ELISA using

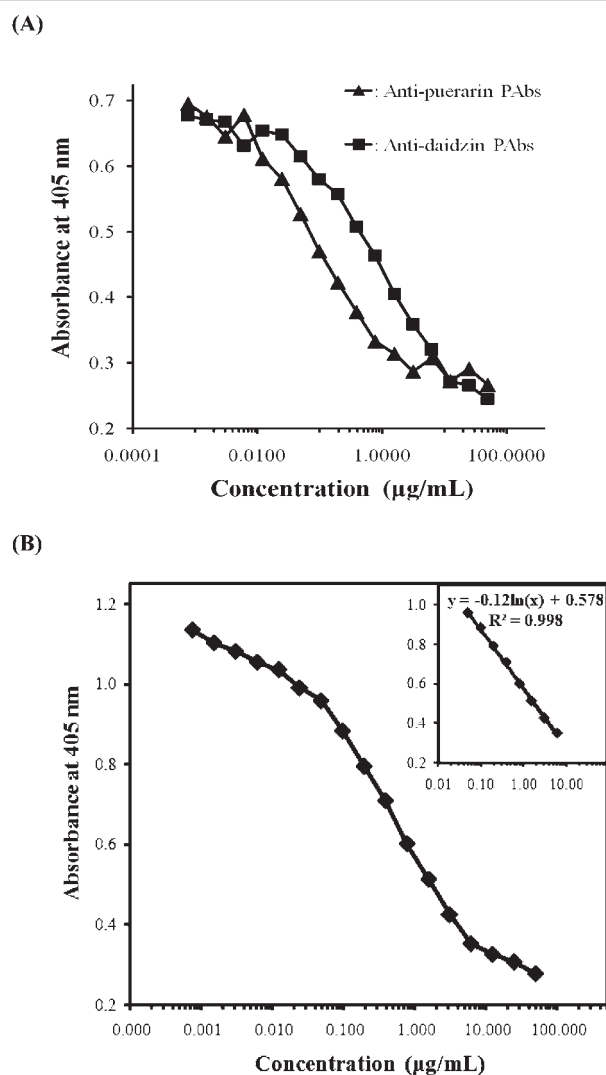


Fig. 2 Standard curves of inhibition by isoflavonoids using anti-puerarin and anti-daidzin PABs: **A** Various concentrations of isoflavonoids (ratio puerarin : daidzin = 1 : 1) were incubated with anti-puerarin (5 µg/mL) or anti-daidzin (1 µg/mL) in a 96-well immunoplate precoated with a mixture of puerarin-OVA and daidzin-OVA (1 µg/mL each). **B** Various concentrations of isoflavonoids (ratio puerarin : daidzin = 1 : 1) were incubated with a mixture of anti-puerarin and anti-daidzin (6 µg/mL) in a 96-well immunoplate precoated with a mixture of puerarin-OVA and daidzin-OVA (1 µg/mL each).

anti-puerarin and anti-daidzin possesses the specificity necessary for the detection of the 5 major isoflavonoids in *P. candollei*. In a new approach, we demonstrated a combination of both PABs in a single ELISA for the determination of total isoflavonoids in *P. candollei* as a one-step analysis. ● Fig. 2A shows individual standard curves of isoflavonoids (ratio of puerarin : daidzin = 1 : 1) using anti-puerarin (5 µg/mL) or anti-daidzin (1 µg/mL) PABs prepared in a 96-well immunoplate precoated with a mixture of puerarin-OVA and daidzin-OVA (1 µg/mL each). Although the assay sensitivities and specificities of both PABs are different, both full measuring ranges were almost the same from 0.02–6.25 µg/mL of isoflavonoids.

Next, we prepared the standard curves of isoflavonoids (ratio puerarin : daidzin = 1 : 1) using the mixture of both anti-puerarin and anti-daidzin PABs (6 µg/mL) in a 96-well immunoplate pre-

Table 2 Variations among ELISA runs for the analysis of isoflavonoids.

Isoflavonoids concentration ($\mu\text{g/mL}$)	CV (%)	
	Intra-assay	Inter-assay
10	0.83	0.82
5	1.40	1.02
2.5	1.56	0.83
1.25	0.58	2.55
0.62	1.80	2.10
0.31	1.15	0.86
0.15	0.70	2.17
0	1.35	1.55

coated with the mixture of puerarin-OVA and daidzin-OVA ($1 \mu\text{g/mL}$ each). Under these conditions, the full measuring range of the assay extended from 0.05 – $6.25 \mu\text{g/mL}$ of isoflavonoids, as indicated in **Fig. 2B**. Intra-assay and inter-assay precisions were studied. Intra-assay precision was evaluated by the variation of the measurement of standard isoflavonoids from well-to-well ($n = 3$) and inter-assay precision was obtained from the variation from different plates ($n = 3$) expressed as coefficient of variation (CV). From the results of **Table 2**, the maximum CV of intra-assay was 1.80% , while that of inter-assay was 2.55% .

A recovery experiment was performed to evaluate the accuracy. After spiking solutions of various concentrations of various isoflavonoids into *P. candollei* samples, the sample extracts were prepared, and the content of total isoflavonoids in each sample was determined by the developed ELISA method. The percent-

tages of recovery in the range of 93.8 – 103% with coefficients of variation less than 15% were obtained (**Table 3**). Normally, a combination of isoflavonoids was found in *P. candollei*. Each recovery of spiked total isoflavonoids from each sample was obtained close to 100% which indicates a good accuracy of this ELISA system. These results demonstrate that this ELISA system using anti-puerarin and anti-daidzin PABs could be used for accurate determination of total isoflavonoids in *P. candollei* samples.

Table 4 shows the results of quantitative analysis of total isoflavonoids contents in 2 varieties of *P. candollei* in different parts (natural tuber, and hairy roots of *P. candollei* var. *candollei* and natural tuber, tuber bark, core tuber, and pods of *P. candollei* var. *mirifica*) obtained by ELISA compared with HPLC. The concentrations of total isoflavonoids determined by ELISA had a good correlation with those determined by HPLC. A coefficient of determination (R^2) of 0.997 was obtained (**Fig. 3**).

Phytoestrogens in plant samples can be represented by total isoflavonoids content. Many analytical techniques have been investigated for the determination of isoflavonoids in plant material and marketed formulations. HPLC is a traditional chromatographic technique for investigation of these compounds [5]. However, for extensive experiments with numerous samples, HPLC analysis can become a limiting factor that seriously reduces analytical throughput. A rapid, high-throughput method with significantly shorter analysis time is required to facilitate more extensive studies with large samples. The prior advantages of the newly developed ELISA system employing the combination of anti-puerarin and anti-daidzin PABs in a single assay over tra-

Isoflavonoids spiked	Spiked level ($\mu\text{g/mL}$)	Measured amount ^a ($\mu\text{g/mL}$)	CV ^b (%)	Recovery ^c (%)
Natural tuber	0	206.92 ± 13.69	6.61	–
Puerarin (PR)	50	257.81 ± 17.00	6.59	101.80
	25	232.91 ± 11.41	4.90	103.99
Daidzin (DZ)	50	257.32 ± 21.68	8.42	100.80
	25	232.78 ± 9.85	4.23	103.45
Daidzein (DZe)	50	257.34 ± 25.05	9.74	100.85
Genistin (GT)	50	254.69 ± 2.07	0.81	95.55
Genistein (GTe)	50	253.81 ± 19.86	7.83	93.78
PR + DZe	20 + 20	248.03 ± 24.52	9.89	102.78
DZ + DZe + GT + GTe	20 + 20 + 20 + 20	286.54 ± 21.68	7.57	99.53
PR + DZ + DZe + GT + GTe	20 + 20 + 20 + 20 + 20	309.26 ± 31.73	10.26	102.34
	10 + 10 + 10 + 10 + 10	258.39 ± 33.83	13.09	102.94

^a All values were mean $\pm$ S.D. from triplicate samples for each level; ^b Coefficient of variation = $(\text{S.D.}/\text{mean}) \times 100\%$; ^c Recovery (%) = $(\text{measured amount} - 206.92 \mu\text{g/mL/spiked amount}) \times 100$

Table 3 Recovery of isoflavonoids determined by ELISA.

Samples	Concentration (mg/g, dry weight)			
	ELISA	CV (%)	HPLC	CV (%)
<i>P. candollei</i> var. <i>candollei</i>				
Natural tuber	4.05 ± 0.20	4.88	3.95 ± 0.00	0.09
Marketed product (Nongkai)	2.08 ± 0.13	6.39	1.70 ± 0.03	1.49
Hairy roots 1	29.61 ± 1.50	5.05	28.02 ± 1.04	3.72
Hairy roots 2	26.86 ± 2.43	9.05	26.31 ± 0.31	1.19
<i>P. candollei</i> var. <i>mirifica</i>				
Natural tuber	3.99 ± 0.33	8.30	3.91 ± 0.04	0.90
Core tuber	0.38 ± 0.04	9.65	0.34 ± 0.00	0.82
Tuber bark	16.99 ± 0.40	2.33	18.00 ± 0.06	0.33
Pod	0.26 ± 0.01	3.38	0.17 ± 0.01	5.53

Table 4 Determination of total isoflavonoids in *P. candollei* var. *candollei* and *P. candollei* var. *mirifica* using ELISA and HPLC.

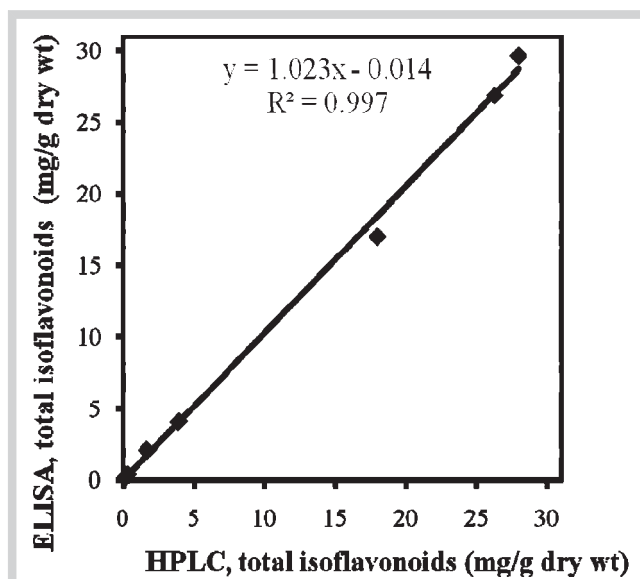


Fig. 3 Correlation between the total isoflavonoids ELISA and HPLC assays.

ditional analytical methods are its simplicity, rapidity, sensitivity, increasing sample throughput and effective cost-performance. Moreover, it is a more environmentally benign determination method when considering organic solvents as mobile phase and waste fluids. In conclusion, the combination assay system of anti-puerarin and anti-daidzin PAb by competitive ELISA represents a useful methodology for the screening of total isoflavonoid concentrations from a large number of *P. candollei* samples which requires only a small amount of materials and reagents.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Thailand Research Fund (RSA5280012). The research in this paper was also supported in part by a Grant in Aid from the JSPS Asian CORE Program, the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

References

- 1 Ingham JL, Tahara S, Dziedzic SZ. A chemical investigation of *Pueraria mirifica* roots. *Z Naturforsch* 1986; 41c: 403–408
- 2 Ingham JL, Tahara S, Pope GS. Chemical components and pharmacology of the rejuvenating plant *Pueraria mirifica*. In: Keung WM, editor. *Pueraria: the genus Pueraria*. New York: Taylor & Francis; 2002: 97–118
- 3 Davis SR, Murkies AL, Wilcox G. Phytoestrogen in clinical practice. *Int Med* 1998; 1: 27–34
- 4 Tempfer CB, Bentz EK, Leodolter S, Tscherne G, Reuss F, Cross HS, Huber JC. Phytoestrogens in clinical practice: a review of the literature. *Fertil Steril* 2007; 1: 1243–1249
- 5 Wu Q, Wang M, Simon JE. Analytical methods to determine phytoestrogenic compounds. *J Chromatogr B* 2004; 812: 325–355
- 6 Lapcik O, Hampl R, Al-Maharik N, Salakka A, Wahala K, Adlercreutz H. A novel radioimmunoassay for daidzein. *Steroids* 1997; 62: 315–320
- 7 Bennetau-Pelissero C, Arnal-Schnebelen B, Lamothe V, Sauvant P, Sagne JL, Verbruggen MA, Mathey J, Lavielle O. ELISA as a new method to measure genistein and daidzein in food and human fluids. *Food Chem* 2003; 82: 645–658
- 8 Talbot DC, Ogbourne RM, Dadd T, Adlercreutz H, Barnard G, Bugel S, Kohlen F, Marlin S, Piron J, Cassidy A, Powell J. Monoclonal antibody-based time-resolved fluorescence immunoassays for daidzein, genistein, and equol in blood and urine: application to the isoheart intervention study. *Clin Chem* 2007; 53: 748–756
- 9 Ishiyama M, Shoyama Y, Murakami H, Shinohara H. Production of monoclonal antibodies and development of an ELISA for solamargine. *Cytotechnology* 1996; 18: 153–158
- 10 Putalun W, Tanaka H, Muranaka T, Shoyama Y. Determination of aculeatisides based on immunoassay using a polyclonal antibody against aculeatiside A. *Analyst* 2002; 127: 1328–1332
- 11 Weiler E, Zenk MH. Radioimmunoassay for the determination of digoxin and related compounds in *Digitalis lanata*. *Phytochemistry* 1976; 15: 1537–1545

Development of an enzyme-linked immunosorbent assay to determine puerarin and its aglycone daidzein

Benyakarn Pongkitwitoon · Seiichi Sakamoto ·
Hiroyuki Tanaka · Ryota Tsuchihashi ·
Junei Kinjo · Satoshi Morimoto · Waraporn Putalun

Received: 3 February 2010 / Accepted: 22 June 2010 / Published online: 24 July 2010
© The Japanese Society of Pharmacognosy and Springer 2010

Abstract *Pueraria candollei* (White Kwao Khuer) is a medicinal plant containing puerarin (8-*C*-glucosyl-4',7-dihydroxyisoflavone) and its aglycone, daidzein, as major isoflavonoids used for its rejuvenating and estrogenic effects. In order to analyze these isoflavonoids, an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed using polyclonal antibody (PAb) against puerarin. Puerarin was conjugated with bovine serum albumin (BSA) to be used as an immunogen for production of PAb from a rabbit. The PAb has been shown to be specific to puerarin and its aglycone, daidzein. An ELISA was then performed using anti-puerarin PAb in the range of 6.10 ng/ml–1.56 µg/ml of puerarin. Based on validation analysis, this analytical method by ELISA is a precise, accurate, and sensitive method for determining puerarin and daidzein in plant samples.

Keywords Puerarin · Daidzein · Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) · Polyclonal antibody · *Pueraria candollei*

Introduction

Puerarin (8-*C*-glucosyl-4',7-dihydroxyisoflavone) and its aglycone, daidzein (4',7-dihydroxyisoflavone) (Fig. 1), are the major isoflavonoids isolated from *Pueraria* spp., family Leguminosae, which have long been traditionally used for various purposes in Asian herbal medicines. *Pueraria candollei*, locally called White Kwao Khuer, is a famous Thai traditional plant recorded to be used for rejuvenating and estrogenic effects. A large number of studies have been carried out on the pharmacological activities of its major bioactive compounds. Puerarin has been shown to be useful in managing various disorders, including diabetes [1], coronary artery disease [2], dyslipidemia [3], liver fibrosis [4], neurotoxicity, and Alzheimer's disease [5, 6]. Recently, Cherdshewasart and Sutjit [7] reported that puerarin and its aglycone, daidzein, exhibited the same level of antioxidant activity as α -tocopherol, suggesting that puerarin and daidzein in the plant tubers may play an important role in antioxidant activity. Due to these pharmacological benefits, high compound-producing plants are needed as a source for pharmaceutical proposes. As a consequence, a fast, sensitive, and reliable analytical method is required to screen the level of puerarin and daidzein in plants. Until now, several methods for determining puerarin have been reported, including high-performance liquid chromatography (HPLC) [8–10], liquid chromatography coupled with electrospray ionization–ion trap mass spectrometry [11], flow-injection chemiluminescence [12], and capillary electrophoresis with chemiluminescence detection [13]. Determining puerarin and daidzein in *P. radix* by micellar electrokinetic capillary chromatography with electrochemical detection (MECC-ED) were also reported [14]. Furthermore, immunoassays have become popular in recent years due to their

B. Pongkitwitoon · W. Putalun (✉)
Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand
e-mail: waraporn@kku.ac.th

S. Sakamoto · H. Tanaka · S. Morimoto
Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Kyushu University, Fukuoka 812-8582, Japan

R. Tsuchihashi · J. Kinjo
Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Fukuoka University, Fukuoka 814-0180, Japan

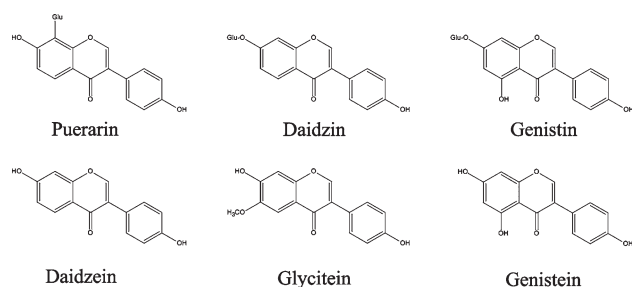


Fig. 1 Structure of puerarin (8-glucosyl-4',7-dihydroxyisoflavone) and its related compounds

advantages of high throughput screening purposes, potential of high sensitivity and specificity, and relatively low cost. He et al. [15] reported a biotin–avidin-amplified enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for determining daidzein in serum, urine, and *P. radix*. Bennetau-Pelissero et al. [16] also reported ELISA to measure genistein and daidzein in food and human fluids. However, immunoassay to determine puerarin has not been reported to date. In this study, we developed an analytical method for determining puerarin and its aglycone, daidzein, using an immunochemical technique. Polyclonal antibody (PAb) against puerarin was prepared and used in ELISA for analyzing puerarin and daidzein in *P. candollei*. The method of development, validation, and application are demonstrated in this paper.

Materials and methods

Chemicals

Daidzin, genistin, daidzein, and genistein were purchased from Nacalai Tesque, Inc., Tokyo, Japan. Puerarin was obtained from Chromadex Inc., CA, USA. Tectorigenin, tectoridin, and irisolidone were obtained from Fukuoka University, Japan. Bovine serum albumin (BSA) and ovalbumin (OVA) were provided by Sigma Steinheim, Germany. Freund's complete and incomplete adjuvants were purchased from Difco, Detroit, MI, USA. Peroxidase-labeled anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) was obtained from MP Biomedicals, OH, USA; 2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) was purchased from Wako, Osaka, Japan. All other chemicals were standard commercial products of analytical-reagent grade.

Plant materials

The tuber of *P. candollei* var. *mirifica* was collected from Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand. The tuber of *P. candollei* var. *candollei* was collected from the Botanical Garden, Faculty of

Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Thailand. The identification of the plants was confirmed by Dr. Waraporn Putalun, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Thailand. The voucher specimens (NI-PSKKU 006-007) are kept at the herbarium of the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand. The hairy roots of *P. candollei* var. *candollei* were induced by transformation of wild-type *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 and cultivated in half-strength Murashige and Skoog (MS) medium, as described previously [17].

Sample preparation

Plant materials were dried in a hot-air oven at 50°C for 48 h and ground to become powder. Dried powdered samples (30 mg) were extracted with 0.5 ml methanol under sonication for 1 h. The extracts were then centrifuged at 2,500 rpm for 1 min, and the supernatants were transferred to a microtube. This extraction step was repeated three times. The extracted solutions were evaporated in a water bath at 60°C to dryness. The residues were reconstituted in methanol (1 ml) and diluted appropriately for both ELISA and HPLC assays.

Synthesis of antigen conjugates

Puerarin–BSA conjugate was synthesized by the periodate oxidation method [18]. Puerarin (3 mg) in 0.4 ml dimethyl sulfoxide (DMSO) was added dropwise to 0.6 ml of a solution containing sodium periodate (NaIO_4) (3 mg) and then stirred at room temperature for 1 h. After that, BSA (8 mg) in 1 ml carbonate buffer (50 mM, pH 9.6) was added and stirred for 5 h. The reaction mixture was dialyzed against five changes of water (H_2O) and then lyophilized. Finally, puerarin–BSA (5.0 mg) was obtained. The same method was used to synthesize puerarin–OVA.

Determining hapten number in puerarin-protein conjugate by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI–TOF–MS)

The hapten numbers of puerarin–BSA were determined by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI–TOF–MS) (Voyager Elite, Perspective Biosystems, Framingham, MA, USA), as previously described [19]. A small amount (1–10 pmol) of an antigen conjugate was mixed with a 10^3 -fold molar excess of sinapinic acid in an aqueous solution containing 0.15% trifluoroacetic acid. The mixture was subjected to the MALDI–TOF–MS and irradiated with a nitrogen laser (256 nm, 150 ns pulse). The ions formed by each pulse were accelerated by a 20-kV potential into a 2.0-m

evaluated tube. Data were analyzed using GRAMS/386 software (Galactic Industries, Salem, NH, USA).

Immunization

Female New Zealand white rabbits were obtained from the National Animal Centre, Mahidol University, Nakhon Pathom, Thailand. Animal handling and the treatment protocol were conducted according to Khon Kaen University's Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the Animal Ethic Committee of Khon Kaen University (Reference No. 0514.1.12.2/20, 23 April 2009). Rabbits were immunized subcutaneously with 1 ml 1:1 emulsion mixture of puerarin–BSA (400 µg/ml) and Freund's complete adjuvant. After 4 weeks, 1 ml intramuscular booster of the same conjugate (400 µg/ml puerarin–BSA) emulsified with Freund's incomplete adjuvant was administered. The final immunization was carried out intravenously with 1 ml of puerarin–BSA (200 µg/ml) 2 weeks after intramuscular booster. After bleeding the rabbit, the serum was removed from the clot by centrifugation and stored at -20°C until used.

Purification of antibody

PAb was purified using a Protein G FF column (0.46×11 cm, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). The serum was applied to the column and washed with 20 mM phosphate buffer (pH 7). Bound IgG was eluted with 100 mM citrate buffer (pH 2.7) at a flow rate of 1 ml/min. The eluted IgG was neutralized with 1 M Tris–hydrochloride (Tris–HCl) buffer (pH 9.0), then dialyzed against five changes of H_2O and finally lyophilized.

Enzyme-linked immunosorbent assay

Reactivity of the PAb to puerarin–OVA was determined by indirect ELISA. The 96-well plate (Maxisorb Nunc, Roskilde, Denmark) was coated with 100 µl of 1 µg/ml puerarin–OVA in 50 mM carbonate buffer (pH 9.6) and incubated at 37°C for 1 h. The plate was washed three times with 0.05% Tween 20 in phosphate-buffered saline (TPBS). After that, the plate was treated with 300 µl of 0.2% gelatin in phosphate-buffered saline (GPBS) for 1 h to reduce nonspecific adsorption. Then, the plate was washed three times with TPBS and reacted with 100 µl of the testing antibody for 1 h. Next, the plate was washed again with TPBS three times and then the PAb was combined with 100 µl of a solution of a 10^3 -fold diluted solution of peroxidase-conjugated goat IgG fraction to rabbit IgG Fc for 1 h. After washing the plate three times with TPBS, 100 µl of substrate solution consisted of

100 mM citrate buffer (pH 4.0) containing 0.003% hydrogen peroxide (H_2O_2), and 0.3 mg/ml of ABTS was added to each well and incubated for 15 min. Absorbance at 405 nm was measured using a microplate reader (Model 550 Microplate Reader BioRad Laboratories, CA, USA). All reactions were carried out at 37°C .

Competitive ELISA

The 96-well plate was coated with 100 µl of 1 µg/ml puerarin–OVA in 50 mM carbonate buffer (pH 9.6) and treated with 300 µl of GPBS for 1 h. After three times washing with TPBS, 50 µl of various concentrations of puerarin or samples in 20% methanol were incubated with 50 µl of the PAb solution for 1 h. The plate was washed three times with TPBS and then the antibody was combined with 100 µl of a 10^3 -fold diluted solution of peroxidase-conjugated goat IgG fraction to rabbit IgG Fc for 1 h. After washing the plate three times with TPBS, 100 µl of substrate solution was added and incubated for 15 min. Absorbance at 405 nm was measured using a microplate reader.

Method validation

The immunoassay was validated for sensitivity, precision, specificity, and accuracy. The absorbance of 17 concentration levels (0.76, 1.53, 3.05, 6.10, 12.21, 24.41, 48.83, 97.66, 195.31, 390.63, 781.25 ng/ml, 1.56, 3.12, 6.25, 12.50, 25.00, and 50.00 µg/ml) of puerarin were measured using the ELISA method we developed. The specificity of the assay was evaluated by cross-reactivities (CRs) of PAb with various compounds calculated using the method of Weiler and Zenk [20]. Reproducibility and precision of the assay were determined by a competitive ELISA. The variation between replicates from well to well (intra-assay) and plate to plate (interassay) were determined. Accuracy was evaluated by analyzing the mixture of various *P. candollei* extracts and the known concentration of puerarin.

HPLC analysis

The HPLC was performed using the Agilent 1100 Series HPLC system equipped with a G1310A isopump, a G1314A UV–Vis detector (254 nm), and a G1328A manual injector with 20 µl loop (Agilent, USA). RP-18 column (125 mm $\times$ 4 mm, 5 µm particle size, Merck, Germany) was used. The mobile phase consisted of 20% acetonitrile. The flow rate was 1.0 ml/min. Mixtures of standard puerarin and daidzein were prepared in methanol. Calibration curves were constructed in the concentration range of 5–50 µg/ml. Analyses of the samples were run in triplicate.

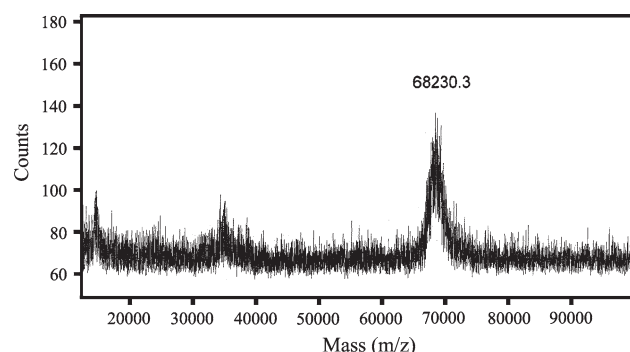


Fig. 2 Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) spectrum of puerarin-bovine serum albumin (BSA) conjugate

Results and discussion

To prepare an immunogen, the glucose moiety of puerarin was oxidized with NaIO_4 and conjugated with a free amine in BSA by the formation of a Schiff base to obtain puerarin-BSA conjugate. Figure 2 shows the MALDI-TOF-MS spectrum of puerarin-BSA conjugate. A broad peak of the conjugate of puerarin and BSA appeared approximately at m/z 68,230. According to molecular weights of BSA (66,433) and puerarin (416), at least four molecules of puerarin were conjugated with BSA. Generally, 3–21 molecules of hapten conjugated with carrier protein were sufficient for immunization. ELISA experiments were set up using puerarin-OVA conjugate as a coating antigen. Sera obtained at different times of immunization showed the presence of antibody against puerarin. The rabbit was then bled and the serum applied to a Protein G column. Total IgG was obtained and used for further analysis. Reactivity of the various concentrations of PAb against puerarin was tested by indirect ELISA (Fig. 3). The antibody concentration at which the absorbance was about 1.0 (5 $\mu\text{g/ml}$) was selected for competitive ELISA.

The competitive ELISA was validated for sensitivity, specificity, precision, and accuracy. The competitive binding was obtained from the antibody bound to either free puerarin or puerarin-OVA conjugate adsorbed on a polystyrene microtiter plate. The higher free puerarin presented, the lower antibody left for puerarin-OVA conjugate and vice versa. The amount of antibody bound to puerarin-OVA conjugate was calculated by the amount of labeled peroxidase to those using secondary antibody. The full measuring range of the assay extends from 6.10 ng/ml –1.56 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 4). Compared with reported ELISA assay for determining daidzein [15], the method described here has almost the same sensitivity.

The specificity of the assay was determined by the CRs of antibody with other compounds using the competitive ELISA. Table 1 shows the CRs of antipuerarin PAb against

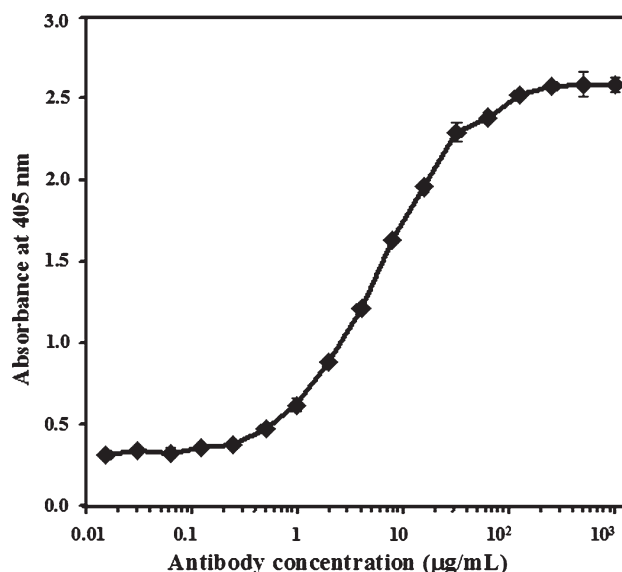


Fig. 3 Reactivity of polyclonal antibody against puerarin

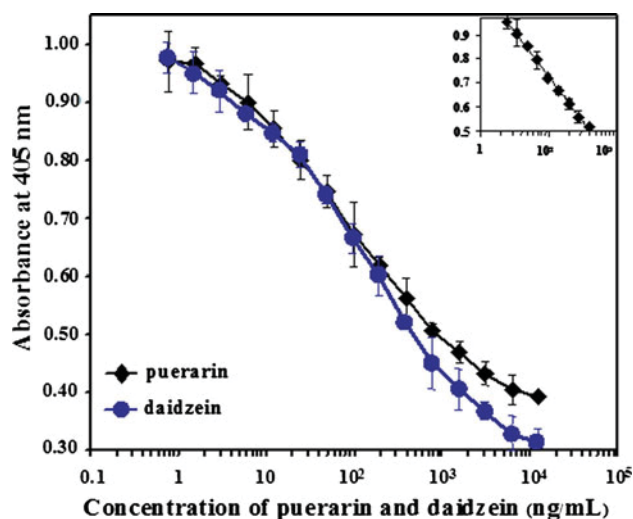


Fig. 4 Standard enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) curve for determining puerarin and daidzein

various compounds. The CR against its aglycone, daidzein, was calculated to be 127.79%, whereas there were very low CRs (<0.001–5.12%) found in other isoflavonoids (Table 1). These results indicate that the aglycone part (4',7-dihydroxyisoflavone) is essential and functions as binding site for PAb reactivity. Other substitution groups except the glucosyl group on C8 affect recognition by PAb. It is concluded that this method is specific and thus could be applied for determining puerarin and its aglycone, daidzein.

Intra- and interassay precisions were studied. Intra-assay precision was evaluated by validating the measurement of puerarin from well to well ($n = 3$), and interassay precision was obtained from the variation from different plates

Table 1 Cross-reactivities (CRs) of the polyclonal antibody (PAb) against some naturally occurring compounds

Compound	Classification	CR (%)
Puerarin	Isoflavone- <i>C</i> -glycoside	100
Daidzein	Isoflavone aglycone	128
Genistein	Isoflavone aglycone	5.12
Glycitein	Isoflavone aglycone	0.01
Irisolidone	Isoflavone aglycone	<0.001
Tectorigenin	Isoflavone aglycone	<0.001
Daidzin	Isoflavone- <i>O</i> -glycoside	<0.001
Genistin	Isoflavone- <i>O</i> -glycoside	<0.001
Tectoridin	Isoflavone- <i>O</i> -glycoside	<0.001
Rutin	Flavonoid	<0.001
Hesperidin	Flavonoid	<0.001
Naringin	Flavonoid	<0.001
Sennoside A	Anthraquinone	<0.001
Sennoside B	Anthraquinone	<0.001
Ginsenoside Rb1	Triterpenoid saponin	<0.001
Ginsenoside Rg1	Triterpenoid saponin	<0.001
Glycyrrhizin	Triterpenoid saponin	<0.001
Artemisinin	Sesquiterpene lactone	<0.001
Artesunate	Sesquiterpene lactone	<0.001
Plumbagin	Naphthoquinone	<0.001

Table 2 Variations among enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) runs for analyzing puerarin

Puerarin (ng/ml)	Coefficient of variation (%)	
	Intra-assay	Interassay
1,000	1.66	3.10
500	1.12	2.46
250	1.93	0.77
125	1.84	2.07
62.5	0.21	0.98
31.3	1.27	1.58
15.6	1.46	2.97
7.8	0.57	1.14
0	0.70	1.36

($n = 3$) expressed as coefficient of variation (CV). From the result of Table 2, the maximum CVs of intra-assay and interassay were 1.93% and 3.10%, respectively. In addition, recovery experiment was performed to evaluate the accuracy of the ELISA. After spiking solutions of puerarin standard at the concentration of 12.5–50 µg/ml into *P. candollei* samples, the sample extracts were prepared, and the content of puerarin and daidzein in each sample was determined by the developed ELISA method. The percentages of recovery in the range of 98–102% with low variations (2.46–3.15% CV) were obtained (Table 3).

Table 3 Recovery of puerarin determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Spiked level (µg/ml)	Measured amount ^a (µg/ml)	CV ^b (%)	Recovery ^c (%)
0.0	96.6 ± 5.2	5.41	–
12.5	109.0 ± 7.0	5.98	101.0
25.0	121.0 ± 10.0	8.37	98.6
50.0	147.0 ± 6.0	4.11	102.0

^a All values were mean ± standard deviation (SD) from triplicate samples for each level

^b Coefficient of variation = (SD/mean) × 100%

^c Recovery (%) = (measured amount – 96.6 µg/ml/added amount) × 100

Table 4 Determination of total puerarin and daidzein in *Pueraria candollei* var. *candollei* and *P. candollei* var. *mirifica* using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and high-performance liquid chromatography (HPLC)

Samples	Concentration (mg/g, dry weight)			
	ELISA	CV (%)	HPLC	CV (%)
<i>P. candollei</i> var. <i>candollei</i>				
Natural tuber (1 year old)	2.91 ± 0.25	8.60	2.72 ± 0.01	0.36
Marketed product (Nongkai)	1.44 ± 0.15	10.30	1.42 ± 0.16	11.30
Hairy roots 1	2.83 ± 0.15	5.11	2.70 ± 0.09	3.22
Hairy roots 2	2.17 ± 0.15	6.89	2.16 ± 0.05	2.19
Hairy roots 3	3.04 ± 0.28	9.10	3.06 ± 0.07	2.40
Hairy roots 4	3.22 ± 0.11	3.68	3.25 ± 0.07	2.11
<i>P. candollei</i> var. <i>mirifica</i>				
Natural tuber	3.15 ± 0.14	4.48	3.19 ± 0.01	0.08
Core tuber	0.35 ± 0.03	9.96	0.34 ± 0.01	0.82
Tuber bark	15.50 ± 0.20	1.52	15.04 ± 0.06	0.43

CV coefficient of variation

Recoveries of spiked puerarin from each sample were obtained at almost 100%, which indicates a good accuracy of this ELISA system. These results demonstrate that this ELISA system using PAb against puerarin could be used to accurately determine puerarin and daidzein in plant samples.

Table 4 shows the results of quantitative analysis of puerarin and daidzein contents in two varieties of *P. candollei* in different parts (natural tuber and hairy roots of *P. candollei* var. *candollei*; and natural tuber, tuber bark, and core tuber of *P. candollei* var. *mirifica*) obtained by ELISA compared with HPLC. The concentrations of puerarin and daidzein determined by ELISA had a good correlation with those determined by HPLC. The coefficient of determination (r^2) of 0.999 was obtained (Fig. 5).

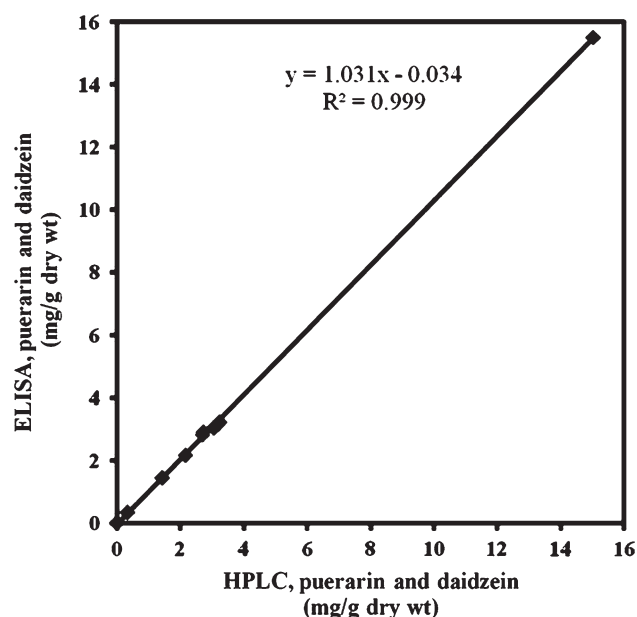


Fig. 5 Correlation between the total puerarin and daidzein from enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and high-performance liquid chromatography (HPLC) assays

This validated ELISA method using PAb against puerarin could be applied for analyses of the major active compounds, puerarin and daidzein, in *Pueraria* spp. plants and products distributed worldwide. The advantages of the ELISA are its effective cost performance, increasing sample throughput, rapidity, and sensitivity. Therefore, this analysis system would provide an alternative method for screening numerous plant samples and requires only a small amount of materials and reagents.

Acknowledgments This work was supported by a grant from the Thailand Research Fund (RSA5280012). The research in this paper was also supported in part by a Grant in Aid from the JSPS Asian CORE Program, the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

References

- Hsu FL, Liu IM, Kuo DH, Chen WC, Su HC, Cheng JT (2003) Antihyperglycemic effect of puerarin in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nat Prod* 66:788–792
- Zhang S, Chen S, Shen Y, Yang D, Liu X, Sun-chi AC, Xu H (2006) Puerarin induces angiogenesis in myocardium of rat with myocardial infarction. *Biol Pharm Bull* 29:945–950
- Yan LP, Chan SW, Chan AS, Chen SL, Ma XJ, Xu HX (2006) Puerarin decreases serum total cholesterol and enhances thoracic aorta endothelial nitric oxide synthase expression in diet-induced hypercholesterolemic rats. *Life Sci* 79:324–333
- Zhang S, Ji G, Liu J (2006) Reversal of chemical-induced liver fibrosis in Wistar rats by puerarin. *J Nutr Biochem* 17:485–491
- Xu X, Zhang S, Zhang L, Yan W, Zheng X (2005) The neuroprotection of puerarin against cerebral ischemia is associated with the prevention of apoptosis in rats. *Planta Med* 71:585–591
- Zhang HY, Liu YH, Wang HQ, Xu JH, Hu HT (2008) Puerarin protects PC12 cells against beta-amyloid-induced cell injury. *Cell Biol Int* 32:1230–1237
- Cherdshewasart W, Sutjit W (2008) Correlation of antioxidant activity and major isoflavonoid contents of the phytoestrogen-rich *Pueraria mirifica* and *Pueraria lobata* tubers. *Phytomedicine* 15:38–43
- Prasain JK, Jones K, Brissie N, Moore R, Wyss JM, Barnes S (2004) Identification of puerarin and its metabolites in rats by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 52:3708–3712
- Ren F, Jing Q, Shen Y, Ma H, Cui J (2006) Quantitative determination of puerarin in dog plasma by HPLC and study on the relative bioavailability of sustained release tablets. *J Pharm Biomed Anal* 41:549–553
- Ma Z, Wu Q, Lee DYW, Tracy M, Lukas SE (2005) Determination of puerarin in human plasma by high performance liquid chromatography. *J Chromatogr B* 823:108–114
- Zhang HJ, Yang XP (2009) Profiling and quantification of isoflavone-C-glycosides impurities in puerarin injection by liquid chromatography coupled to ESI-ion trap mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 49:843–847
- Zhang Q, Myint A, Liu L, Ge X, Cui H (2004) Flow injection-chemiluminescence determination of puerarin in pharmaceutical preparations. *J Pharm Biomed Anal* 36:587–592
- Han S (2009) Determination of puerarin by capillary electrophoresis with chemiluminescence detection. *J Chromatogr B* 887:1591–1594
- Cao Y, Lou C, Zhang X, Chu Q, Fang Y, Ye J (2002) Determination of puerarin and daidzein in *Pueraria radix* and its medicinal preparations by micellar electrokinetic capillary chromatography with electrochemical detection. *Anal Chim Acta* 452:123–128
- He JT, Shi ZH, Yan J, Zhao MP, Guo ZQ, Chang WB (2005) Biotin-avidin amplified enzyme-linked immunosorbent assay for determination of isoflavone daidzein. *Talanta* 65:621–626
- Bennetau-Pelissero C, Arnal-Schnebel B, Lamothe V, Sauvaut P, Sagne JL, Verbruggen MA, Mathey J, Lavialle O (2003) ELISA as a new method to measure genistein and daidzein in food and human fluids. *Food Chem* 82:645–658
- Udomsuk L, Jarukamjorn K, Tanaka H, Putalun W (2009) Isoflavonoid production in a hairy roots culture of *Pueraria candollei*. *Z Naturforsch C* 64(9–10):687–691
- Putalun W, Tanaka H, Muranaka T, Shoyama Y (2002) Determination of aculeatisides based on immunoassay using a polyclonal antibody against aculeatiside A. *Analyst* 127:1328–1332
- Ishiyama M, Shoyama Y, Murakami H, Shinohara H (1996) Production of monoclonal antibodies and development of an ELISA for solamargine. *Cytotechnology* 18:153–158
- Weiler EW, Zenk MH (1976) Radioimmunoassay for the determination of digoxin and related compounds in *Digitalis lanata*. *Phytochemistry* 15:1537–1545

Improved isoflavonoid production in *Pueraria candollei* hairy root cultures using elicitation

Latiporn Udomsuk · Kanokwan Jarukamjorn ·
Hiroyuki Tanaka · Waraporn Putalun

Received: 12 August 2010 / Accepted: 15 September 2010 / Published online: 25 September 2010
© Springer Science+Business Media B.V. 2010

Abstract The effect of abiotic and biotic elicitors (methyl jasmonate, chitosan, salicylic acid, *Agrobacterium*, and yeast extract) at various concentrations on total isoflavonoid accumulation was studied in the hairy root cultures of *Pueraria candollei*. All elicitors stimulated isoflavonoid production. Yeast extract (0.5 mg/ml) was the most efficient giving total isoflavonoids at 60 ± 1 mg/g dry wt, which was 4.5-fold higher than control hairy roots on day 3 of elicitation.

Keywords *Pueraria candollei* · Isoflavonoid · Elicitation · Hairy root cultures

Introduction

Pueraria candollei Wall. ex Benth. (Leguminosae), a Thai indigenous herb with the local name of Kwao Kruea Khaw, has long been used in traditional medicine for rejuvenation (Cherdshewasart et al. 2007a). This plant possesses estrogen-like effects and has exhibited the ability to reduce incidences of

osteoporosis, cardiovascular disease, and post-menopausal symptoms (Cherdshewasart et al. 2007b). Its tuberous root contain numerous isoflavonoids: daidzin, daidzein, genistin, genistein and puerarin (Chansakaow et al. 2000). The isoflavonoid content in the tuber of *P. candollei* is variable due to cultivation and the harvest season (Cherdshewasart et al. 2007a). This difference in isoflavonoid levels could seriously affect the quality of any tuber-derived material or even research results derived from this plant (Cherdshewasart and Sriwatcharakul 2008). Plant tissue culture technologies were established to mitigate these problems. Thus, by using this technology, secondary metabolites could be produced under controlled conditions (Udomsuk et al. 2009). Hairy roots have been explored intensively for their ability to induce a stable and high rate of secondary metabolite production (Giri and Narasu 2000). Hairy roots obtained through the transformation of higher plants using *Agrobacterium rhizogenes* produced various higher amounts of secondary metabolites than normal field-grown plants did (Hwang 2006).

Our previous study showed that hairy roots of *P. candollei* can up-regulate the isoflavonoid content to about 5.2-fold of that in intact roots (Udomsuk et al. 2009). In addition, enhancing the accumulation of active compounds by adding elicitors to the liquid medium has been studied extensively in various plants. The cell cultures of legume plants have been studied for elicitor-induced manipulation of isoflavonoid production (Goyal and Ramawat 2008). These

L. Udomsuk · K. Jarukamjorn · W. Putalun (✉)
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen
University, Khon Kaen 40002, Thailand
e-mail: waraporn@kku.ac.th

H. Tanaka
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu
University, Fukuoka 812-8582, Japan

cell cultures include a fungal elicitor, *Penicillium citrium*, in *P. thomsonii* (Maojun et al. 2006), methyl jasmonate in *P. montana* (Kirakosyan et al. 2006) and salicylic acid in *Psoralea corylifolia* (Shinde et al. 2009a). Elicitation by methyl jasmonate has increased the production of total isoflavonoids in cell suspension culture of *P. candollei* var. *candollei* and *P. candollei* var. *mirifica* (Korsangruang et al. 2010). In a previous study, we established a hairy root culture of *P. candollei* and optimum conditions for the growth and isoflavonoid accumulation. To enhance the capacity of *P. candollei* hairy roots for secondary metabolite production, elicitor treatment was investigated to obtain appropriate elicitation conditions that produce a higher content of isoflavonoids. In the present article, we report the influence of elicitors on the total isoflavonoid accumulation of puerarin, daidzin, genistin, daidzein, and genistein in the hairy root cultures of *P. candollei*.

Materials and methods

Chemical reagents

Puerarin was obtained from Chromadex Inc. (Irvine, CA, USA). Daidzin and yeast extract were purchased from Nacalai Tesque, Inc. (Tokyo, Japan). Chitosan was obtained from Fluka Chemical (Buchs, Switzerland). Peroxidase-labeled anti-rabbit IgG was purchased from MP Biomedicals (OH, USA). All other chemicals were standard commercial products of analytical reagent grade.

Plant materials

P. candollei seeds were obtained from the Botanical Garden, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Thailand. They were washed with sterile distilled water and were surface-sterilized in 10% (w/v) sodium hypochlorite for 15–20 min. The seeds were washed three times with sterilized water, immersed in 70% (w/v) ethanol for 1 min and then germinated on hormone-free Murashige and Skoog (MS) medium containing 3% sucrose (w/v), pH 5.5, at (25 ± 1) °C under 16 h light/day. Germination started within 7 days and plantlets were used for hairy root induction.

Hairy roots induction

The young stems were infected with *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834, cultured on MS medium at 25°C for 48 h, and then transferred to ½ MS medium with 500 mg cefotaxime (CF)/l. At 2-week intervals, infected segments were transferred to ½ MS medium with 300 and 100 mg CF/l. Transformed roots of *P. candollei* were grown in 125 ml flasks containing 30 ml ½ MS liquid medium. The medium was agitated on a rotary shaker (100 rpm at 25°C, under continuous light for 16 h/day). The hairy roots were subcultured every 2 weeks into fresh medium.

Elicitor preparation

Elicitation was carried out with chitosan, methyl jasmonate, yeast extract, salicylic acid, or *A. rhizogenes*. Chitosan (10 mg/ml) was prepared by adding glacial acetic acid dropwise at 60°C in 15 min (final concentration 2%, v/v), then diluted with de-ionized water, adjusted to pH 5.5 and sterilized by autoclaving. Methyl jasmonate (10 mM) and salicylic acid (10 mM) stock solutions were prepared in 40% (v/v) ethanol and then filter-sterilized. Yeast extract was dissolved in de-ionized water to afford a stock solution of 100 mg/ml and autoclaved. Cultures of *A. rhizogenes* were grown in YEB medium at 25°C for 24 h. The suspension of bacteria (OD₆₀₀ = 1.2) was treated with toluene (100:1, v/v) and autoclaved. Before autoclaving, the bacterial suspension was left for 1 h for toluene evaporation.

Elicitor treatment

Hairy roots were subcultured into a 125 ml flask containing 30 ml ½ MS liquid medium, pH 5.5 and grown in a 16 h photo period at 25°C under agitation (100 rpm) to study the effect of elicitors. After 21 days of culture, various concentrations of elicitors, including methyl jasmonate (50, 100, or 200 µM), yeast extract (0.5, 1, and 2 mg/ml), chitosan (50, 100, or 150 mg/l), salicylic acid (50, 100, or 200 µM), or lysate of *A. rhizogenes* (1, 2, or 3%, v/v) were added to hairy root cultures. Then, hairy roots were harvested after 3 or 6 days of elicitor treatment. All treatments were performed in triplicate.

Extraction of samples and total isoflavonoids analysis

Hairy roots were harvested and dried at 50°C in a hot air oven to a constant weight. Dried samples (25 mg) of hairy roots were powdered and extracted 5 times with 0.5 ml ethanol and sonication. The extracts were combined, evaporated and then re-dissolved with 1 ml ethanol. The extracted solutions were analyzed for their total isoflavonoid content including puerarin, daidzin, genistin, daidzein and genistein by indirect competitive ELISA using the combination of anti-puerarin and anti-daidzin polyclonal antibodies (PABs) as described previously with some modification (Pongkitwitoon et al. 2010). Mixtures of puerarin-ovalbumin (OVA) and daidzin-OVA (100 µl; 0.5 µg/ml each) were adsorbed in the wells of the 96-well immunoplate and then treated with 300 µl phosphate buffered saline (PBS) containing 5% (w/v) skim milk (S-PBS) for 1 h. A 50 µl sample of various concentrations of puerarin and daidzin (1:1) or sample dissolved in 20% (v/v) ethanol was incubated with an anti-puerarin and anti-daidzin PABs mixture solution (5 and 2 µg/ml, respectively) for 1 h. The plate was washed three times with PBS containing 0.05% (v/v) Tween 20 (T-PBS) and then incubated with 100 µl of a 1,000-fold dilution of peroxidase-labeled goat anti-rabbit IgG for 1 h. After washing the plate with T-PBS, 100 µl of substrate solution [0.1 M citrate buffer, pH 4.0, containing 0.003% (v/v) H₂O₂ and 0.3 mg ABTS/ml] was added to each well and incubated for 15 min. Absorbance at 405 nm was measured using a microplate reader (Model 550 Microplate Reader BioRad Laboratories, CA, USA). All reactions were carried out at 37°C.

Statistical analysis

Results were reported as the mean $\pm$ standard deviation (SD). The data were analyzed statistically by analysis of variance (ANOVA), and the difference between the means of samples was analyzed by the least significant difference (LSD) at probability level of 0.01.

Results and discussion

Secondary metabolites represent the adaptation of plants to environmental stress, or they may serve as

defensive, protective or offensive chemicals against microorganisms, insects, and higher herbivorous predators. We studied the biomass and total isoflavonoid production in hairy root cultures of *P. candollei* within 40 days. The results showed that the highest total isoflavonoid content was found within 35 days in hairy roots whereas the biomass production grew fastest during days 10–20 as shown in Fig. 1. In addition, hairy roots did not excrete any isoflavonoid into the medium suggesting that isoflavonoid were retained within the hairy root tissues.

From these results, adding elicitors at day 21 during hairy root culture was chosen for elicitation because this corresponded to the late log phase of hairy root growth.

In our study, the effect of elicitation on growth and total isoflavonoid production in *P. candollei* hairy roots were observed. There was no significant difference in biomass production between the control and all the treatment groups during elicitation, suggesting that elicitors did not effect to the growth of hairy roots. The effects of various elicitors at different concentrations on total isoflavonoid production in hairy roots of *P. candollei* were determined. Figure 2 shows the effect of methyl jasmonate on total isoflavonoid production. Methyl jasmonate significantly increased total isoflavonoid production after day 6 of treatment. Methyl jasmonate at 200 µM gave the highest amount of total isoflavonoid (37.5 ± 2.2 mg/g dry wt), which was 3-fold higher than the control at 6 days of elicitation. However, there was no significant difference between methyl jasmonate-treated roots and control roots at day 3.

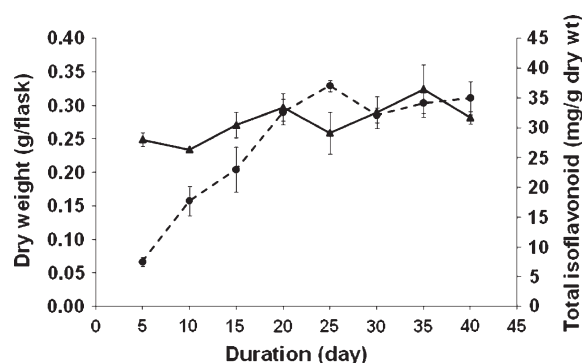


Fig. 1 Growth and total isoflavonoid production in *Pueraria candollei* hairy roots. Dry weight (filled circle) and total isoflavonoid content (filled triangle). Values are expressed as mean $\pm$ SD

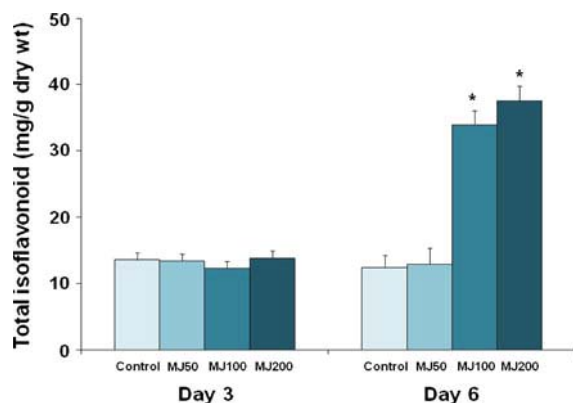


Fig. 2 Effect of methyl jasmonate (MJ) on total isoflavonoid production in hairy root cultures. Methyl jasmonate (50, 100, or 200 μ M) was added to 21-day-old hairy root cultures and cultivated at 25°C with light 16 h/day for an additional 3 or 6 days. The values are expressed as mean $\pm$ SD. * Indicates statistical significance at the $P < 0.01$ level

Similar to Kirakosyan et al. (2006), methyl jasmonate increased accumulation of daidzein, daidzin, genistein, genistin, and puerarin to about five times higher than that for control shoots of *P. montana*. The results from methyl jasmonate show a similar pattern to those of chitosan (Fig. 3) in this experiment. Our results show a clear correlation between the concentration of chitosan and total isoflavonoid level. A low concentration of chitosan (50 mg/l) did not significantly change the levels of total isoflavonoid but did enhance isoflavonoid production at higher

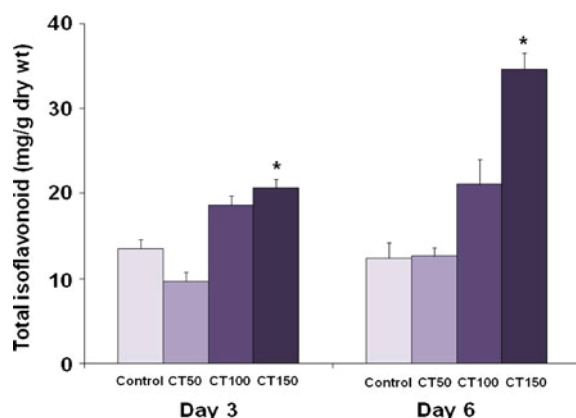


Fig. 3 Effect of chitosan (CT) on total isoflavonoid production in hairy root cultures. Chitosan (50, 100, or 150 mg/l) was added to 21-day-old hairy root cultures and cultivated at 25°C with light 16 h/day for an additional 3 or 6 days. The values are expressed as mean $\pm$ SD. * Indicates statistical significance at the $P < 0.01$ level

concentrations (100 and 150 mg/l). Chitosan at 100 or 150 mg/l produced total isoflavonoid of 21 ± 2.9 (1.7-fold) and 34.5 ± 2 mg/g dry wt (2.8-fold), respectively, at day 6. In addition, total isoflavonoid increased dependent on treatment duration. Similar stimulatory effects of chitosan on isoflavonoid were reported in *Psoralea corylifolia* (Shinde et al. 2009a).

The effect of salicylic acid (50–200 μ M) on isoflavonoid production is shown in Fig. 4. Salicylic acid at 100 μ M gave a higher content of total isoflavonoid (20 ± 1 mg/g dry wt) on day 3 than 200 μ M salicylic acid treatment on day 6 (20 ± 3.5 mg/g dry wt). These results showed that elicitation by salicylic acid did not depend on concentration or duration of treatment. This observation is similar to previous reports on isoflavone in cell cultures of *P. corylifolia* (Shinde et al. 2009b) and baicalin production in hairy roots of *Scutellaria baicalensis* (Hwang 2006). Figure 5 shows that *Agrobacterium* significantly increased total isoflavonoid content regardless of treatment duration. The highest total isoflavonoid production was found after adding 2% *Agrobacterium* (v/v) for 6 days (21 ± 3.3 mg/g dry wt). This enhancement is similar to that seen in another leguminous plant, *Albizia kalkora* (Park et al. 2006).

Yeast extract was the most efficient elicitor for the enhancement of total isoflavonoid in hairy root cultures of *P. candollei* (Fig. 6). The highest level of total isoflavonoid (60.5 ± 1 mg/g dry wt) was

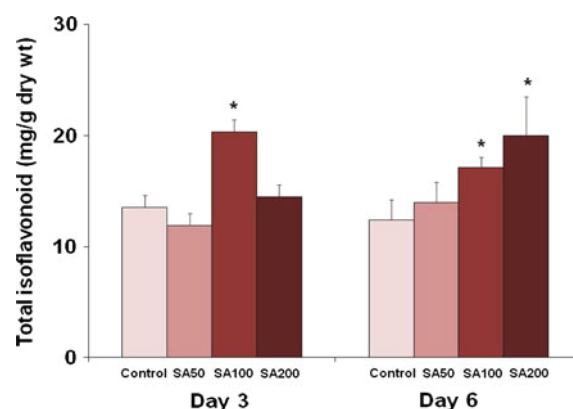


Fig. 4 Effect of salicylic acid (SA) on total isoflavonoid production in hairy root cultures. Salicylic acid (50, 100, or 200 μ M) was added to 21-day-old hairy root cultures and cultivated at 25°C with light 16 h/day for an additional 3 or 6 days. The values are expressed as mean $\pm$ SD. * Indicates statistical significance at the $P < 0.01$ level

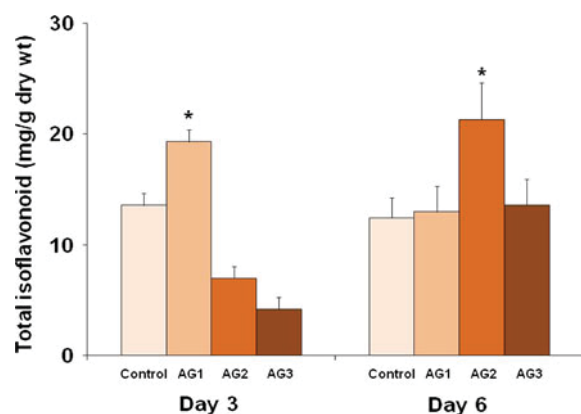


Fig. 5 Effect of *Agrobacterium* (AG) on total isoflavonoid production in hairy root cultures. *Agrobacterium* (1, 2, or 3%, v/v) was added to 21-day-old hairy root cultures and cultivated at 25°C with light 16 h/day for an additional 3 or 6 days. The values are expressed as mean $\pm$ SD. * Indicates statistical significance at the $P < 0.01$ level

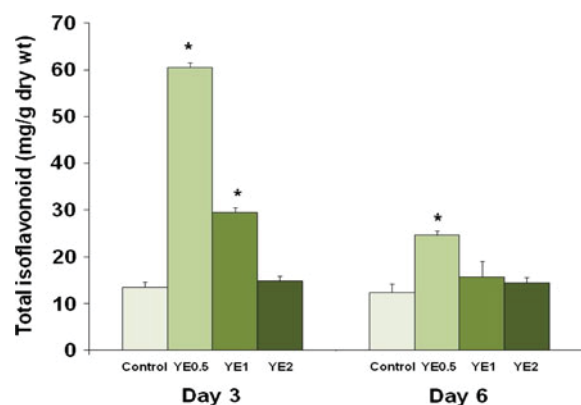


Fig. 6 Effect of yeast extract (YE) on total isoflavonoid production in hairy root cultures. Yeast extract (0.5, 1, or 2 mg/ml) was added to 21-day-old hairy root cultures and cultivated at 25°C with light 16 h/day for an additional 3 or 6 days. The values are expressed as mean $\pm$ SD. * Indicates statistical significance at the $P < 0.01$ level

obtained after adding 0.5 mg yeast extract/ml for 3 days, which was 4.5-fold higher than control. Adding 1 mg yeast extract/ml also significantly increased the level of total isoflavonoid whereas 2 mg/ml of yeast extract did not affect total isoflavonoid production during all durations of treatment. Interestingly, the level of total isoflavonoid at day 6 decreased to half of that at day 3. These results correspond to a previous study, which reported that yeast extract was the most effective elicitor for

inducing isoflavone production in *P. corylifolia* (Shinde et al. 2009b).

In comparison with elicitation in cell suspension culture of *P. candollei* var. *candollei* and *P. candollei* var. *mirifica* (Korsangruang et al. 2010), elicitor treatment in our experiment enhanced the production of total isoflavonoid up to 60.5 mg/g dry wt in *P. candollei* var. *candollei* hairy root cultures, which is higher than that obtained from *P. candollei* var. *mirifica* cell suspension culture (40.5 mg/g dry wt). Furthermore, the present study shows that the level of isoflavonoid in hairy roots of *P. candollei* using elicitation can enhance more isoflavonoid production than in other species such as by using ethrel treatment in *P. tuberosa* (1 mg/g dry wt) (Goyal and Ramawat 2008), and XAD-4 in *P. montana* (20 mg/g dry wt) (Kirakosyan et al. 2006).

In conclusion, these results suggest that total isoflavonoid accumulation in hairy roots of *P. candollei* was influenced by elicitation. All elicitors used in this experiment significantly increased total isoflavonoid production. Yeast extract was the most effective elicitor at enhancing the level of total isoflavonoid. The maximum concentration of total isoflavonoid was achieved from hairy roots treated with 0.5 mg yeast extract/ml for 3 days (60.5 ± 1 mg/g dry wt), which was 4.5-time higher than control hairy roots. Our results show that the application of elicitors allows the optimized production of isoflavonoid in hairy root cultures of *P. candollei*.

Acknowledgments This work was accomplished through a grant by the Office of the Higher Education Commission. Latiporn Udomsuk (CHE 510636) was supported by the CHE-Ph.D. scholarship. The Thailand Research Fund (RSA5280012) is greatly acknowledged.

References

- Chansakaow S, Ishikawa T, Sekine K, Okada M, Higushi Y, Kudo M, Chaichantipyuth C (2000) Isoflavonoids from *Pueraria mirifica* and their estrogenic activity. *Planta Med* 66:572–574
- Cherdshewasart W, Sriwatcharakul S (2008) Metabolic activation promotes estrogenic activity of the phytoestrogen-rich plant. *Maturitas* 59(2):128–136
- Cherdshewasart W, Kitsamai Y, Malaivijitnond S (2007a) Evaluation of the estrogenic activity of the wild *Pueraria mirifica* by vaginal cornification assay. *J Reprod Dev* 53(2):385–393

- Cherdshewasart W, Subtang S, Dahlan W (2007b) Major isoflavonoid contents of the phytoestrogen rich-herb *Pueraria mirifica* in comparison with *Pueraria lobata*. J Pharm Biomed Anal 43(2):428–434
- Giri A, Narasu ML (2000) Transgenic hairy roots: recent trends and applications. Biotechnol Adv 18:1–22
- Goyal S, Ramawat KG (2008) Enthrel treatment enhanced isoflavonoids accumulation in cell suspension cultures of *Pueraria tuberosa*, a woody legume. Acta Physiol Plant 30:849–853
- Hwang SJ (2006) Baicalin production in transformed hairy root clones of *Scutellaria baicalensis*. Biotechnol Bioprocess Eng 11:105–109
- Kirakosyan A, Kaufman P, Chang S, Warber S, Bolling S, Vardapetyan H (2006) Regulation of isoflavone production in hydroponically grown *Pueraria montana* (kudzu) by cork pieces, XAD-4, and methyl jasmonate. Plant Cell Rep 25:1387–1391
- Korsangruang S, Soonthornchareonnon N, Chintapakorn Y, Saralamp P, Prathanurung S (2010) Effects of abiotic and biotic elicitors on growth and isoflavonoid accumulation in *Pueraria candollei* var. *candollei* and *P. candollei* var. *mirifica* cell suspension culture. Plant Cell Tissue Organ Cult (in press). doi:[10.1007/s-11240-010-9785-6](https://doi.org/10.1007/s-11240-010-9785-6)
- Maojun XU, Jufang D, Mujuan Z (2006) Nitric oxide mediates the fungal elicitor-induced puerarin biosynthesis in *Pueraria thomsonii* Benth suspension cell through a salicylic acid (SA)-dependent and a jasmonic acid (JA)-dependent signal pathway. Sci China C Life Sci 49:1–11
- Park SY, Lee WY, Park Y, Ahn JK (2006) Effect of nitrogen source and bacterial elicitor on isoflavone accumulation in root cultures of *Albizia kalkora* (Roxb.) Prain. J Integr Plant Biol 48(9):1108–1114
- Pongkitwitoon B, Sakamoto S, Tanaka H, Tsuchihashi R, Kinjo J, Morimoto S, Putalun W (2010) Enzyme-linked immunosorbent assay for total isoflavonoids in *Pueraria candollei* using anti-puerarin and anti-daidzin polyclonal antibodies. Planta Med 76:831–836
- Shinde AN, Malpathak N, Devanand PF (2009a) Enhanced production of phytoestrogenic isoflavonoids from hairy root cultures of *Psoralea corylifolia* L. using elicitation and precursor feeding. Biotechnol Bioprocess Eng 14:288–294
- Shinde AN, Malpathak N, Devanand PF (2009b) Optimized production of isoflavonoids in cell cultures of *Psoralea corylifolia* L. using elicitation and precursor feeding. Biotechnol Bioprocess Eng 14:612–618
- Udomsuk L, Jarukamjorn K, Tanaka H, Putalun W (2009) Isoflavonoid production in hairy roots culture of *Pueraria candollei*. Z Naturforsch 64c:687–691