เลขที่สิทธิบัตร 99857

สป/200 - ข

สิทธิบัตรการประดิษฐ์

อาศัยอำนาจตามความในพระราชบัญญัติสิทธิบัตร พ.ศ. 2522
อธิบดีกรมทรัพย์สินทางปัญญาออกสิทธิบัตรฉบับนี้ให้แก่

สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
มหาวิทยาลัยนเรศวร

สำหรับการประดิษฐ์ตามรายละเอียดการประดิษฐ์ ข้อถือสิทธิ และรูปเขียน (ถ้ามี) ดังที่ปรากฏในสิทธิบัตรนี้

เลขที่คำขอ	**1101000354**
วันขอรับสิทธิบัตร	**10 มีนาคม 2554**
ผู้ประดิษฐ์	**นายเนติ วระนุช และคณะ**
ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์	**โมโนโคลนัลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อสารชาตาวารินโฟร์ เพื่อใช้ในการวิเคราะห์สารชาตาวารินโฟร์และซาโปนินในรากสามสิบ**

ให้ผู้ทรงสิทธิบัตรนี้มีสิทธิและหน้าที่ตามกฎหมายว่าด้วยสิทธิบัตรทุกประการ

ออกให้ ณ วันที่ **27** **เดือน** **มีนาคม** **พ.ศ.** **2567**

หมดอายุ ณ วันที่ **9** **เดือน** **มีนาคม** **พ.ศ.** **2574**

(นายกิตติวัฒน์ ปัจฉิมนันท์)
รองอธิบดีกรมทรัพย์สินทางปัญญา ปฏิบัติราชการแทน
อธิบดีกรมทรัพย์สินทางปัญญา
ผู้ออกสิทธิบัตร

พนักงานเจ้าหน้าที่

หมายเหตุ
1. ผู้ทรงสิทธิบัตรต้องชำระค่าธรรมเนียมรายปีเริ่มตั้งแต่ปีที่ 5 ของอายุสิทธิบัตร มิฉะนั้น สิทธิบัตรนี้จะสิ้นอายุ
2. ผู้ทรงสิทธิบัตรจะขอชำระค่าธรรมเนียมรายปีล่วงหน้าโดยชำระทั้งหมดในคราวเดียวได้
3. การอนุญาตให้ใช้สิทธิตามสิทธิบัตรและการโอนสิทธิบัตรต้องทำเป็นหนังสือและจดทะเบียนต่อพนักงานเจ้าหน้าที่

Ref.256701026222458

รายละเอียดการประดิษฐ์

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

โมโนโคลนัลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อสารซาตาวารินโฟร์ เพื่อใช้ในการวิเคราะห์สารซาตาวารินโฟร์และซาโปนินในรากสามสิบ

สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

สาขาเทคโนโลยีชีวภาพในส่วนที่เกี่ยวข้องกับโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อสารซาตาวารินโฟร์ เพื่อใช้ในการวิเคราะห์สารซาตาวารินโฟร์และซาโปนินในรากสามสิบ

ภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

สามสิบ หรือ *Asparagus racemosus* Wild เป็นพืชสมุนไพรที่พบในประเทศไทยและประเทศในภูมิภาคเอเชีย ส่วนรากของสามสิบมีลักษณะยาวคล้ายกระชาย ออกเป็นพวง จึงมีผู้เรียกว่า รากสามสิบ หรือ สามร้อยราก มีการนำรากสามสิบมาใช้เป็นยาในประเทศอินเดียและในไทยเป็นเวลานาน โดยเฉพาะในด้านรักษาความสมดุลของร่างกาย บำรุงและฟื้นฟูระบบสืบพันธุ์เพศหญิง โดยช่วยทำให้ประจำเดือนมาปกติ และช่วยฟื้นฟูสมรรถภาพทางเพศ

สามสิบเป็นพืชในวงศ์แอสพารากาซี (Asparagaceae) เป็นไม้พุ่ม มีเหง้าและรากใต้ดินคล้ายรากกระชาย ลำต้นบนดินเลื้อยพัน มีหนามแหลม สูง 1.5-4 เมตร ใบเดี่ยวเรียงสลับ ลดรูปลงเป็นเส้นแคบยาว กว้าง 0.5-1 มิลลิเมตร ยาว 10-36 มิลลิเมตร ดอกช่อออกที่ปลายกิ่งหรือซอกใบ กลีบรวมสีขาว ผลสดรูปค่อนข้างกลมสีแดงหรือม่วงแดง (เต็ม สมิตินันทน์, 2544; นันทวัน บุณยะประภัศร, 2543) รากสามสิบมีสรรพคุณพื้นบ้านไทยคือ ขับปัสสาวะ, บำรุงครรภ์, แก้กระษัย, บำรุงกำลัง, บำรุงตับปอด, แก้ท้องเสีย, แก้โรคเกี่ยวกับลำไส้, แก้บิด, ทำให้เยื่อเมือกภายในอ่อนนุ่มและชุ่มชื้น, เป็นยาบำรุงกำหนัด, แก้กำเดา, แก้โรคตา, แก้ไอ และ แก้ข้อหักช้ำ (นันทวัน บุณยะประภัศร, 2543)

มีการรายงานฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของรากสามสิบอย่างหลากหลายเช่น ฤทธิ์ต้านการซึมเศร้า (antidepressant) (Singh และคณะ, 2009), ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (Kamat และคณะ, 2000), ฤทธิ์ป้องกันโรคกระเพาะ (Sairam และคณะ, 2003), ฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Gautam และคณะ, 2004; Gautam และคณะ, 2009) และ ฤทธิ์แก้ไอ (Subhash และคณะ, 2000) นอกจากนี้ ยังมีรายงานด้านการออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเพศหญิง (Phytoestrogenic effect), ฤทธิ์ปรับสมดุลในร่างกาย (Adaptogenic effect), ฤทธิ์บำรุงหัวใจ (Cardio protective effect) และฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Anti-bacterial effect) อีกด้วย (Bopana และ Saxena, 2007)

องค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญในรากสามสิบ เป็นสารกลุ่มสเตียรอยด์ซาโปนิน (steroid saponin) ที่ประกอบด้วยสารซาตาวารินโฟร์วันถึงเท็น (Shatavarin I-X) โดยมีสารซาตาวารินโฟร์ (Shatavarin IV) (รูปที่ 1) เป็นองค์ประกอบหลัก ประมาณ 0.1% ของน้ำหนักพืชแห้ง แตกต่างกันไปตามแหล่งผลิต (Hayes และคณะ, 2006 a,b, 2008) สารซาตาวารินโฟร์นี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์คอร์ทูอะเซติลกลูโคซามินิลทรานสเฟอร์เรส (Core 2 acetylglucosaminyltransferase) ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Chibber, 2005) และมีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลอง (Satti และคณะ, 2006) ที่ผ่านมามีรายงานการศึกษาการใช้ซาตาวารินโฟร์เป็นสารเครื่องหมายโมเลกุล (biomaker compound) เพื่อควบคุมคุณภาพของรากสามสิบ (Jain และ Agrawal, 2009; Penumajji และคณะ, 2010, Madhavan และคณะ, 2010) โดยใช้วิธีโครมาโตกราฟีแบบบางที่มีสมรรถนะสูง (High Performance Thin Layer

นายสุวัจชัย บุญอารี

Chromatography; HPTLC) และเอชพีแอลซี (HPLC) ที่ต่อกับอีแอลเอสดี (Evaporative Light Scattering Detector; ELSD)

ด้วยสรรพคุณที่น่าสนใจของรากสามสิบดังกล่าวข้างต้น จึงทำให้รากสามสิบเป็นสมุนไพรที่มีศักยภาพในการใช้ในทางอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและเครื่องสำอาง อย่างไรก็ดี กระบวนการวิเคราะห์สารเพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพวัตถุดิบและสารสกัดยังคงมีปัญหา เนื่องจากในปัจจุบันยังขาดเทคนิคที่มีประสิทธิภาพ สะดวก รวดเร็ว และราคาไม่สูงในการวิเคราะห์คุณภาพสารสำคัญกลุ่มซาโปนินในรากสามสิบ โดยเฉพาะสารซาตาวารินโฟร์ที่เป็นองค์ประกอบหลักที่น่าสนใจดังกล่าวข้างต้น นอกจากนี้ ในขั้นตอนการคัดเลือกวัตถุดิบรากสามสิบเข้าสู่กระบวนการสกัดสารเพื่อผลิตในอุตสาหกรรมยังคงมีปัญหาการปะปนของวัตถุดิบที่ไม่ต้องการ เนื่องจากสมุนไพรรากสามสิบมีลักษณะภายนอกที่คล้ายหนอนตายหยาก *Stemona sp.* โดยที่ในภาคเหนือของประเทศไทย ได้เรียก *Stemona sp.* ว่ารากสามสิบเช่นกัน แต่หนอนตายหยากมีองค์ประกอบทางเคมีและสรรพคุณแตกต่างจากรากสามสิบโดยสิ้นเชิง โดยที่หนอนตายหยากมีสารประกอบหลักเป็นพวกอัลคาลอยด์ (alkaloids) และมีสรรพคุณในการฆ่าแมลงและฆ่าหนอน ดังนั้น จึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีวิธีการตรวจวิเคราะห์สารซาโปนินจากรากสามสิบที่รวดเร็ว และแม่นยำสูง ณ สถานที่คัดแยกวัตถุดิบ (on site) เพื่อให้สะดวกต่อการทราบผลการวิเคราะห์สารซาโปนินจากรากสามสิบได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งจะทำให้สามารถคัดแยกวัตถุดิบที่ถูกต้องเข้าสู่กระบวนการผลิตได้อย่างถูกต้อง รวดเร็ว และไม่ต้องแบกรับภาระการขนส่งวัตถุดิบที่ไม่ต้องการไปยังโรงงาน

ที่ผ่านมามีการใช้เทคนิคโครมาโตกราฟฟี่ (Chromatography) ในการวิเคราะห์สารกลุ่มสเตียรอยด์ซาโปนินในรากสามสิบ ซึ่งวิธีดังกล่าวใช้วิเคราะห์สารชนิดนี้ได้ค่อนข้างยาก เนื่องจากสารชนิดนี้มีคุณสมบัติเป็นสารที่ไม่มีโครโมฟอร์ (non-chromophores) จึงมีการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) ได้น้อยทำให้ไม่สามารถใช้เอชพีแอลซีที่ต่อกับเครื่องตรวจวัดแสงแบบอัลตราไวโอเล็ตซึ่งเป็นเครื่องมือที่มีทั่วไปในห้องปฏิบัติการในการวิเคราะห์ปริมาณได้ จำเป็นต้องใช้เครื่องตรวจวัดอื่นเช่น อีแอลเอสดี หรือแมสสเปคโตรมีเตอร์ (Mass Spectrometer, MS) มาต่อกับเอชพีแอลซี แต่เครื่องมือดังกล่าวมีราคาสูง และไม่สามารถใช้วิเคราะห์สารได้สะดวก ณ สถานที่คัดแยกวัตถุดิบ รวมทั้งมีความไวในการตรวจวัดต่ำ นอกจากนี้ ยังมีรายงานถึงการพัฒนาวิธีที่ไม่ใช่โครมาโตกราฟฟี่ (Non-chromatography) โดยนำเทคนิคการวิเคราะห์ทางอิมมูโนวิทยา (Immunoassays) มาใช้ในการวิเคราะห์สารซาโปนินในพืชอื่น ดังกรณีที่มีรายงานการตรวจสารกลุ่มซาโปนินจากต้นพรมมิโดยใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสารสำคัญชื่อ "บาโคพาไซด์วัน" (Bacopaside I) ซึ่งเป็นสารในกลุ่มซาโปนินจากพรมมิ (Phrompittayarat และคณะ, 2007) แต่เนื่องจากโครงสร้างของสารซาโปนินหลักจากพรมมิมีความแตกต่างจากสารซาโปนินที่มีในรากสามสิบมาก ดังนั้นโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะสูงต่อสารบาโคพาไซด์วันดังกล่าวจึงไม่สามารถใช้ตรวจสารซาโปนินในรากสามสิบได้ จากข้อจำกัดดังกล่าวประกอบกับความต้องการในการตรวจวิเคราะห์สารซาตาวารินโฟร์และซาโปนินในรากสามสิบโดยเฉพาะ จึงมีความจำเป็นต้องมีการประดิษฐ์นี้เพื่อพัฒนาสารโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะในการตรวจวิเคราะห์สารซาโปนินในรากสามสิบโดยเฉพาะ

ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์

การประดิษฐ์นี้เป็นการสร้างเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะสูงต่อสารซาตาวารินโฟร์ เพื่อจะนำโมโนโคลนัลแอนติบอดีดังกล่าวไปใช้ในการวิเคราะห์สารซาตาวารินโฟร์และสารสเตียรอยด์ซาโปนินที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกัน (saponins equivalent) ในรากสามสิบ ด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางอิมมูโนวิทยา อาทิ วิธีอีไลซ่า และอีสเทิร์นบลอท ซึ่งจะช่วยวิเคราะห์สารซาตาวารินโฟร์และสารสเตียรอยด์ซาโปนินอื่นซึ่ง

นายสุวัจชัย บุญอารี

เป็นสารสำคัญที่มีอยู่ในรากของสมุนไพรรากสามสิบได้อย่างรวดเร็วมีประสิทธิภาพ มีความแม่นยำสูง และช่วยลดเวลาการเตรียมตัวอย่างในการวิเคราะห์ เนื่องจากโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ใช้ในการวิเคราะห์ถูกสร้างขึ้นให้มีความจำเพาะกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ จึงสามารถใช้ในการวิเคราะห์ได้ทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณ นอกจากนี้ ยังช่วยในการแยกหนอนตายหยากซึ่งมีลักษณะภายนอกคล้ายคลึงกับรากสามสิบได้อย่างรวดเร็วและถูกต้อง แม่นยำ จากการวิเคราะห์ความแตกต่างในส่วนของสารชาตาวารินโฟร์ที่พบเฉพาะในรากสามสิบอีกด้วย

คำอธิบายรูปเขียนโดยย่อ

รูปที่ 1 โครงสร้างของชาตาวารินโฟร์

รูปที่ 2 ผลการตรวจสอบการคอนจูเกตของสารชาตาวารินโฟร์กับบีเอสเอ (Bovine serum albumin; BSA) ด้วยมัลดิ-ทอฟ-เอ็มเอส (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry; MALDI-TOF-MS), รูปบน คือ มัลดิ-ทอฟ-เอ็มเอสสเปกตรัมของบีเอสเอ, รูปล่างคือมัลดิ-ทอฟ-เอ็มเอสสเปกตรัมของคอนจูเกตของชาตาวารินโฟร์กับบีเอสเอ

รูปที่ 3 ผลการตรวจสอบการคอนจูเกตของสารชาตาวารินโฟร์กับเอชเอสเอ (Human serum albumin; HSA) ด้วยมัลดิ-ทอฟ-เอ็มเอส, รูปบน คือ มัลดิ-ทอฟ-เอ็มเอสสเปกตรัมของเอชเอสเอ, รูปล่าง คือ มัลดิ-ทอฟ-เอ็มเอสสเปกตรัมของคอนจูเกตของชาตาวารินโฟร์กับเอชเอสเอ

รูปที่ 4 ขั้นตอนการเตรียมเซลล์ไฮบริโดมา (Hybridoma cell)

รูปที่ 5 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ของโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อชาตาวารินโฟร์ที่ค่าความเข้มข้นต่างๆ ที่วัดด้วยวิธีอินไดเร็คอีไลซ่า (Indirect ELISA)

รูปที่ 6 แผนภูมิการทดสอบด้วยคอมเพ็ททิทีฟอีไลซ่า (Competitive ELISA)

รูปที่ 7 ผลการทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (Cross reactivity; CRs) ของโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อชาตาวารินโฟร์

รูปที่ 8 โครงสร้างของสารดิจิโทนิน (Digitonin)

รูปที่ 9 กราฟค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ของชาตาวารินโฟร์ที่ความเข้มข้น 20000-1.22 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ที่วัดโดยเทคนิคคอมเพ็ททิทีฟอีไลซ่าโดยช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ที่ 2500.00-78.13 นาโนกรัม/มิลลิลิตร

รูปที่ 10 ผลการตรวจสอบความแม่นยำในเพลทเดียวกัน (intra-assay precision) และต่างเพลท (inter-assay precision) ของชาตาวารินโฟร์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธีอีไลซ่า โดยใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อชาตาวารินโฟร์ในการวิเคราะห์

รูปที่ 11 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างรากสามสิบและสารมาตรฐานชาตาวารินโฟร์ด้วยเทคนิคอีสเทิร์นบลอทบนแผ่นพีอีเอสเมมเบรน (PES membrane) โดย A และ B คือ ตัวอย่างรากสามสิบ, หมายเลข 1-17 คือ สารมาตรฐานชาตาวารินโฟร์ที่ปริมาณ 1000-0.01 นาโนกรัม

รูปที่ 12 กราฟของชาตาวารินโฟร์ที่ 1000 – 0.01 นาโนกรัม วัดโดยเทคนิคอีสเทิร์นบลอทโดยช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ที่ 1000-3.9 นาโนกรัม

รูปที่ 13 ผลการตรวจสอบความแม่นยำในการทดสอบบนเมมเบรนเดียวกัน (intra-assay precision) และต่างเมมเบรน (inter-assay precision) ของชาตาวารินโฟร์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธีอีสเทิร์นบลอทบนแผ่นพีอีเอสเมมเบรน โดยใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อชาตาวารินโฟร์

นายสุวัจชัย บุญอารี

รูปที่ 14 ผลจากการวิเคราะห์ตัวอย่างซาตาวารินโฟร์ (SH IV) จากรากสามสิบ (AR) หนอนตายหยาก รวมทั้งสารดิจิโทนิน (Digitonin) และไดออสเจนนิน (Diosgenin) โดยเทคนิคอีสเทอร์นบลอทที่ใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อซาตาวารินโฟร์

การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

จากความต้องการในการใช้ประโยชน์จากสารซาโปนินหลักในรากสามสิบเนื่องจากมีสรรพคุณเฉพาะประกอบกับในขั้นตอนการคัดเลือกวัตถุดิบรากสามสิบเข้าสู่กระบวนการสกัดสารเพื่อผลิตในอุตสาหกรรมยังคงมีปัญหาการปะปนของวัตถุดิบที่ไม่ต้องการ เนื่องจากสมุนไพรรากสามสิบมีลักษณะภายนอกที่คล้ายหนอนตายหยาก *Stemona sp.* แต่หนอนตายหยากมีองค์ประกอบทางเคมีและสรรพคุณแตกต่างจากรากสามสิบโดยสิ้นเชิง โดยที่หนอนตายหยากมีสารประกอบหลักเป็นพวกอัลคาลอยด์ (alkaloids) และมีสรรพคุณในการฆ่าแมลงและหนอน หากวัตถุดิบมีหนอนตายหยากปะปนเข้ามาในกระบวนการผลิตจะทำให้ได้ผลผลิตสารซาโปนินจากรากสามสิบในปริมาณต่ำและอาจมีผลข้างเคียงต่อร่างกายเมื่อนำไปใช้ ดังนั้น จึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีวิธีการตรวจวิเคราะห์สารซาโปนินจากรากสามสิบโดยเฉพาะ โดยที่ไม่ต้องใช้เครื่องมือที่ยุ่งยาก มีความสะดวก รวดเร็ว แม่นยำ และสามารถตรวจวิเคราะห์สารได้ ณ สถานที่คัดแยกวัตถุดิบ (on site) เพื่อให้สะดวกต่อการทราบผลการวิเคราะห์สารซาโปนินจากรากสามสิบได้ทันที ซึ่งจะทำให้สามารถคัดแยกวัตถุดิบที่ถูกต้องเข้าสู่กระบวนการผลิตได้อย่างถูกต้อง รวดเร็ว โดยไม่ต้องมีภาระขนส่งวัตถุดิบที่ไม่ต้องการไปยังโรงงาน

อย่างไรก็ดี ด้วยข้อจำกัดของวิธีการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มซาโปนินโดยเฉพาะซาตาวารินโฟร์ในรากสามสิบ ซึ่งวิธีการวิเคราะห์ดั้งเดิมนั้นต้องใช้เครื่องมือราคาแพง รวมทั้งมีความไวในการวิเคราะห์ต่ำ และแม้ว่าจะมีรายงานถึงการสร้างโมโนโคลนัลแอนติบอดี (Monoclonal antibody; MAb) ที่มีความจำเพาะกับสารซาโปนินชนิดอื่นจากพืชอื่นเพื่อใช้ในการวิเคราะห์สารซาโปนินในพืชดังกล่าวแล้ว แต่เนื่องจากลักษณะโครงสร้างทางเคมีของซาโปนินหลักในรากสามสิบมีความแตกต่างจากซาโปนินจากพืชอื่นๆ เช่น สารบาโคพาไซด์วัน (Bacopaside I) ในพรมมิ สารจิงเซ็นโนไซด์ (Gingsenoside) ในโสม เป็นต้น ดังนั้น จึงไม่สามารถนำโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับโครงสร้างสารที่เคยมีรายงานก่อนหน้านี้มาใช้กับการวิเคราะห์สารซาโปนินหลักในรากสามสิบได้ ในการประดิษฐ์นี้จึงได้ทำการสร้างโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อสารซาตาวารินโฟร์ที่เป็นสารซาโปนินหลักในรากสามสิบโดยเฉพาะ เพื่อจะนำไปใช้สำหรับการตรวจวิเคราะห์สารซาโปนินหลักในรากสามสิบ ด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางอิมมูโนวิทยา (Immunoassay) อาทิ วิธีอีไลซ่า และอีสเทิร์นบลอท ซึ่งการวิเคราะห์สารซาโปนินด้วยวิธีนี้จะมีความรวดเร็ว มีประสิทธิภาพความไวในการวิเคราะห์สูง มีความแม่นยำ และยังช่วยลดเวลาการเตรียมตัวอย่างในการวิเคราะห์ และให้ผลการวิเคราะห์ดีกว่าเอชพีแอลซี เนื่องจากโมโนโคลนัลแอนติบอดีดังกล่าวถูกสร้างขึ้นให้มีความจำเพาะสูงกับสารซาโปนินที่ต้องการวิเคราะห์ โดยที่ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross reaction) กับสารกลุ่มอื่นๆ ในรากสามสิบ จึงสามารถใช้ในการวิเคราะห์สารสเตียรอยด์ซาโปนินในสารสกัดรากสามสิบได้ทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณ รวมทั้งใช้ในการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากรากสามสิบ หรือในตัวอย่างอื่นๆ ซึ่งอาจมีสารสเตียรอยด์ซาโปนินที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับซาตาวารินโฟร์เป็นองค์ประกอบ นอกจากนี้ ยังช่วยในการแบ่งแยกหนอนตายหยากซึ่งมีลักษณะภายนอกคล้ายคลึงกับรากสามสิบได้อย่างรวดเร็วและถูกต้อง แม่นยำ จากการวิเคราะห์ความแตกต่างในส่วนของสารซาตาวารินโฟร์ที่พบเฉพาะในรากสามสิบอีกด้วย ซึ่งจะกล่าวถึงผลการทดลองสนับสนุนข้อดีของการประดิษฐ์นี้ในลำดับต่อไป

17 03 2554

นายสุวัจชัย บุญอารี

การประดิษฐ์นี้ได้สร้างโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสารชาตาวารินโฟร์ จากการกระตุ้นให้หนูเมาส์สร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูงต่อสารชาตาวารินโฟร์ แล้วหลอมรวมบี-เซลล์ (B cell) จากหนู กับเซลล์มะเร็งหรือไมอิโลมา (myeloma) ได้เป็นเซลล์ลูกผสมไฮบริโดมา (hybridoma) จากนั้นทำการเลือกโคลนที่สามารถหลั่งแอนติบอดีเพียงชนิดเดียว โมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ได้มีความจำเพาะต่อสารชาตาวารินโฟร์ ซึ่งมีความสามารถในการจับจำเพาะกับสารชาตาวารินโฟร์และสารสเตียรอยด์ซาโปนินจากรากสามสิบที่มีโครงสร้างส่วนอะไกลโคน (Aglycone) เหมือนกันหรือคล้ายคลึงกัน จึงทำให้มีความจำเพาะสูงต่อซาโปนินหลักในรากสามสิบ หรือกล่าวอีกนัยหนึ่ง คือ โมโนโมโนโคลนัลแอนติบอดีตามการประดิษฐ์นี้มีความสามารถในการจับจำเพาะกับสารชาตาวารินโฟร์และสเตียรอยด์ซาโปนินจากรากสามสิบในบริเวณอะไกลโคน (Aglycone part) และยังสามารถทำการผลิตได้ในปริมาณมากเท่าที่ต้องการโดยการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาเพิ่มขึ้น ในลำดับต่อไปเป็นการอธิบายถึงรายละเอียดของการสร้างโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสารชาตาวารินโฟร์และการประยุกต์ใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสารชาตาวารินโฟร์ในการวิเคราะห์สารสเตียรอยด์ซาโปนินในรากสามสิบ

การสร้างโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสารชาตาวารินโฟร์

1. การสังเคราะห์คอนจูเกตของชาตาวารินโฟร์กับบีเอสเอและคอนจูเกตของชาตาวารินโฟร์กับเอชเอสเอ (Shatavarin IV-BSA conjugates/ Shatavarin IV-HSA conjugates)

การสังเคราะห์คอนจูเกตของชาตาวารินโฟร์กับบีเอสเอ (Bovine serum albumin; BSA) ใช้วิธีเพอริโอเดทออกซิเดชัน (Periodate oxidation) เพื่อใช้เตรียมเป็นอิมมูโนเจน (immunogen) กระตุ้นภูมิคุ้มกันดังนี้ ใช้สารมาตรฐานชาตาวารินโฟร์ 2.5 มิลลิกรัม เติมเมทานอล 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมเพอริโอเดต ($NaIO_4$) (2.5 มิลลิกรัมในน้ำ 0.5 มิลลิลิตร) ลงไปทีละหยด ผสมให้เข้ากันด้วยแท่งแม่เหล็กสำหรับกวน (magnetic stirrer) ที่อุณหภูมิ 25^{o}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลายบีเอสเอ 5.0 มิลลิกรัม ใน 50 มิลลิโมลาร์ บัฟเฟอร์คาร์บอเนต (พีเอช 9.6) 2.0 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากันที่อุณหภูมิ 25 ^{o}C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้นั้นมาไดอะไลซ์ (dialyzed) ในน้ำกลั่น 5 ครั้ง ที่อุณหภูมิ 4^{o}C และไลโอฟิลไลซ์ (lyophilize) ได้คอนจูเกตของชาตาวารินโฟร์กับบีเอสเอ 4.25 มิลลิกรัม ส่วนการสังเคราะห์คอนจูเกตของชาตาวารินโฟร์กับเอชเอสเอ (Human serum albumin; HSA) ก็ใช้วิธีเดียวกันนี้ เพียงแต่ใช้เอชเอสเอแทนบีเอสเอ

2. ตรวจสอบการเชื่อมต่อกับโปรตีนด้วยมัลดิ-ทอฟ-เอ็มเอส (MALDI-TOF-MS)

การเชื่อมต่อชาตาวารินโฟร์กับบีเอสเอและการเชื่อมต่อชาตาวารินโฟร์กับเอชเอสเอวิเคราะห์โดยมัลดิ-ทอฟ-เอ็มเอส (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry; MALDI-TOF-MS) จากรูปที่ 2 แสดงมัลดิ-ทอฟ-เอ็มเอสสเปกตรัมของคอนจูเกตของชาตาวารินโฟร์กับบีเอสเอ (Shatavarin IV- BSA) ประมาณที่ m/z เท่ากับ 67052 โดยบีเอสเอมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 66137 และชาตาวารินโฟร์มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 886 ดังนั้นจึงมีอย่างน้อย 1 โมเลกุลของชาตาวารินโฟร์ที่เชื่อมต่อกับบีเอสเอ และด้วยวิธีเดียวกันนี้ จากรูปที่ 3 มวลโมเลกุลของคอนจูเกตของชาตาวารินโฟร์กับเอชเอสเอ (Shatavarin IV- HSA) วัดได้ที่ 68312 มวลโมเลกุลของเอชเอสเอเท่ากับ 66210 ดังนั้นมีอย่างน้อย 2 โมเลกุลของชาตาวารินโฟร์ที่เชื่อมต่อกับเอชเอสเอ

3. การกระตุ้นหนูทดลองให้สร้างภูมิคุ้มกัน (Immunization)

หนู (BALB/c stain, เพศเมีย) อายุ 3 สัปดาห์ จำนวน 2 ตัว ถูกกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันเข้าที่บริเวณหน้าท้องหนูทดลอง 3 ครั้ง ทุกๆ 10 วัน จำนวนสามครั้ง โดยครั้งที่ 1 เตรียมสารฉีดสร้างภูมิคุ้มกันอัตราส่วน 1:1 จากซีเอฟเอ (Complete Freund's adjuvant; CFA) และคอนจูเกตของชาตาวารินโฟร์-บีเอสเอ 0.4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ส่วนครั้งที่ 2

นายสุวัจชัย บุญอารี

และ 3 ใช้ไอเอฟเอ (Incomplete Freund's adjuvant; IFA) แทนซีเอฟเอ และทำการทดลองเช่นเดียวกับครั้งที่ 1 จากนั้น 3 วัน ทดสอบการสร้างแอนติบอดีโดยใช้วิธีอินไดเร็กอีไลซ่า (Indirect ELISA)

4. การผลิตเซลล์ไฮบริโดมา

4.1 การเตรียมการก่อนวันผลิตเซลล์ไฮบริโดมา

1) ตรวจสอบการผลิตแอนติบอดีของหนูแต่ละตัว สามวันหลังจากการกระตุ้นหนูทดลองให้สร้างภูมิคุ้มกันครบสามครั้ง

2) ก่อนการผลิตไฮบริโดมา 1 สัปดาห์ขยายเพิ่มจำนวนเซลล์ไลน์ไมอีโลมา (myeloma cell line) Sp2/O-Ag14 ให้อยู่ในระยะล็อก (log) จำนวน 10^7 เซลล์ในวันที่จะทำการผลิตไฮบริโดมา

4.2 การผลิตและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา

นำเซลล์จากม้ามของหนูที่สร้างแอนติบอดีต่อสารชาตาวารินโฟร์และเซลล์ไมอีโลมา ที่อยู่ในระยะล็อกมาหลอมรวมกันโดยใช้พอลิเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol; PEG) จากนั้นเลี้ยงและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาด้วย HAT medium ที่ 37°C, 5% CO_2 อินคูเบเตอร์ (incubator) ทดสอบการสร้างแอนติบอดีด้วยวิธีอีไลซ่า เมื่อได้เซลล์ที่สร้างแอนติบอดีแล้วแยกให้ได้เซลล์เดี่ยวๆ ด้วยวิธีลิมิตติ้งไดลูชัน (Limiting dilution) ทดสอบการสร้างแอนติบอดีด้วยวิธีอีไลซ่า และเลี้ยงให้ได้ปริมาณมากขึ้น ดังแสดงในแผนผังรูปที่ 4 ในการทำให้บริสุทธิ์ ใช้คอลัมน์โปรตีนจี (column protein G) และแยกสารออกด้วยบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชต่ำ ไดอะไลซ์ที่อุณหภูมิ 4°C และทำไลโอฟิลไลซ์ก็จะได้โมโนโคลนัลแอนติบอดีที่บริสุทธิ์

ผลการเตรียมโมโนโคลนัลแอนติบอดีจำเพาะต่อสารชาตาวารินโฟร์

การประดิษฐ์นี้สามารถเตรียมโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อชาตาวารินโฟร์ได้ 225 มิลลิกรัม และสามารถเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาเพื่อเพิ่มโมโนโคลนัลแอนติบอดีชนิดนี้ได้จากสต็อกที่มีเก็บไว้ที่ -80°C หากต้องการปริมาณเพิ่มขึ้น

การทดสอบโมโนโคลนัลแอนติบอดีด้วยวิธีอินไดเร็กอีไลซ่า (Indirect ELISA)

ในที่นี้ใช้วิธีอินไดเร็กอีไลซ่าเป็นวิธีวิเคราะห์ปริมาณโมโนโคลนัลแอนติบอดีในการประดิษฐ์นี้ เพื่อทดสอบว่ามีการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสารชาตาวารินโฟร์ขึ้นในซีรั่มของหนูทดลองที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันหรือไม่ และใช้วิธีนี้ในการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อชาตาวารินโฟร์ ที่จะให้การดูดกลืนแสงในช่วงที่ตรวจวัดได้ กระบวนการอินไดเร็กอีไลซ่ามีรายละเอียดดังนี้

1) เคลือบเพลท 96 หลุมด้วย 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ของคอนจูเกตชาตาวารินโฟร์-เอชเอสเอ จากนั้น บ่มที่ 37°C 1 ชั่งโมง แล้วนำออกมาล้างด้วย TPBS

2) บล็อกเพลท (Block plate) ด้วย 0.2% เจลลาติน จากนั้น บ่มที่ 37°C 1 ชั่งโมง

3) ล้างเพลทด้วย TPBS จากนั้นเติมแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

4) เติมสารละลายของเอนไซม์เพอรอกซิเดสที่เชื่อมต่อกับแอนติบอดีทุติยภูมิ (Peroxidase-conjugated goat IgG fraction to mouse IgG Fc) ที่ความเข้มข้น 1:1000 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°C 1 ชั่งโมง แล้วนำออกมาล้างด้วย TPBS

นายสุวัจชัย บุญอารี

5) เติม 0.3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เอบีทีเอส (ABTS) ในซิเตรทบัฟเฟอร์ (citrate buffer) (พีเอช 4.0) ที่มี 0.003% H_2O_2 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°C 15 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ด้วยไมโครเพลทรีดเดอร์ (microplate reader) แล้วบันทึกค่าที่ได้

เมื่อทดสอบโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อชาตาวารินโฟร์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธีอินไดเร็กอีไลซ่า ดังรูปที่ 5 พบว่าโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อชาตาวารินโฟร์ที่ความเข้มข้นที่ 1:750 ให้ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) 1.332 ซึ่งเป็นค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสมในการตรวจวัด จึงใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ความเข้มข้นนี้ในการวิเคราะห์ต่อไป

การวิเคราะห์สารชาตาวารินโฟร์ด้วยโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อชาตาวารินโฟร์ โดยใช้เทคนิคคอมเพ็ททิทีฟอีไลซ่า (Competitive ELISA)

<u>การทดสอบด้วยคอมเพ็ททิทีฟอีไลซ่า</u>

วิธีคอมเพ็ททิทีฟอีไลซ่าเป็นวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจน (ในกรณีนี้คือชาตาวารินโฟร์หรือสารที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับชาตาวารินโฟร์) โดยการให้แอนติเจนที่อยู่ในตัวอย่างแย่งจับแอนติบอดีแทนที่แอนติเจนที่เคลือบอยู่ในไมโครเพลท (ดังแสดงในรูปที่ 6) ถ้ามีแอนติเจนในตัวอย่างมาก จะเหลือแอนติบอดีไปจับกับแอนติเจนที่เคลือบอยู่บนเพลทน้อย ทำให้การดูดกลืนแสงเกิดขึ้นน้อย แต่ถ้ามีแอนติเจนในตัวอย่างน้อย จะเกิดการดูดกลืนแสงขึ้นมาก กระบวนการนี้มีรายละเอียดดังนี้

1) เคลือบเพลท 96 หลุมด้วย 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ชาตาวารินโฟร์-เอชเอสเอ จากนั้น บ่มที่ 37°C 1 ชั่งโมง แล้วนำออกมาล้างด้วย TPBS
2) บล็อกเพลท ด้วย 0.2% เจลลาติน จากนั้น บ่มที่ 37°C 1 ชั่งโมง
3) ล้างเพลทด้วย TPBS จากนั้นเติมสารมาตรฐานชาตาวารินโฟร์ 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หรือสารอื่นที่ต้องการทดสอบปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตามด้วยสารละลายโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อชาตาวารินโฟร์ปริมาตร 50 ไมโครลิตร
4) เติมสารละลายของเอนไซม์เพอรอกซิเดสที่เชื่อมต่อกับแอนตีบอดีทุติยภูมิ (Peroxidase-conjugated goat IgG fraction to mouse IgG Fc) ที่ความเข้มข้น 1:1000 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°C 1 ชั่งโมง แล้วนำออกมาล้างด้วย TPBS
5) เติมสารละลาย 0.3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เอบีทีเอส (ABTS) ในซิเตรทบัฟเฟอร์ (citrate buffer) (พีเอช 4.0) ที่มี 0.003% H_2O_2 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°C 15 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ด้วยไมโครเพลทรีดเดอร์ แล้วบันทึกค่าที่ได้

<u>การตรวจสอบความถูกต้อง (validate) ของวิธีการวิเคราะห์ด้วยคอมเพ็ททิทีฟอีไลซ่า</u>

จากการทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross reactivity) ของโมโนโคลนัลแอนติบอดีตามการประดิษฐ์นี้ โดยการทดสอบกับสารจากธรรมชาติในหลายๆ กลุ่ม เช่น สารกลุ่มซาโปนินไกลโคไซด์ สเตียรอยด์ อัลคาลอยด์ อิริดอยด์ คูมาริน ฟลาโวนอยด์ เทอร์ปีนอยด์ และฟีนิลโพรเพน (ดังรูปที่ 7) พบว่าโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อชาตาวารินโฟร์ที่สร้างขึ้นนี้ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับสารที่ทดสอบทั้งหมด ยกเว้นสารดิจิโทนินที่มีอยู่ในต้นดิจิทาลิส (*Digitalis purpurea* วงศ์สครอฟฟูราเลียซี) ซึ่งเป็นสารซาโปนินไกลโคไซด์ที่มีโครงสร้างในส่วนอะไกลโคนคล้ายคลึงกับอะไกลโคนของชาตาวารินโฟร์อย่างมาก ต่างกันที่มีหมู่ไฮดรอกซี (hydroxyl group) ที่

นายสุวัจชัย บุญอารี

ตำแหน่ง 2 และ 15 ของโมเลกุล (รูปที่ 8) แสดงว่าโมโนโคลนัลแอนติบอดีตามการประดิษฐ์มีความจำเพาะต่อสารที่ประกอบด้วยสเตียรอยด์อะไกลโคนที่ใกล้เคียงกับชาตาวาริน โฟร์ ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์นี้จึงสามารถใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณซาโปนินทั้งหมดที่มีสเตียรอยด์อะไกลโคนใกล้เคียงกับชาตาวาริน โฟร์ในตัวอย่างจากรากสามสิบได้

จากการตรวจสอบ (validate) วิธีการวิเคราะห์สารชาตาวาริน โฟร์โดยเทคนิคอีไลซ่าที่ใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อชาตาวาริน โฟร์ที่ประดิษฐ์ขึ้น พบว่าวิธีนี้สามารถตรวจวัดสารชาตาวาริน โฟร์และซาโปนินที่มีสเตียรอยด์อะไกลโคนใกล้เคียงกับชาตาวาริน โฟร์ในช่วงความเข้มข้น 2500 ถึง 78.13 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 9) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบสารได้ (Limit of Detection, LOD) คือ 1.0 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งแสดงถึงความไว (sensitivity) ที่สูงมากเมื่อเทียบกับวิธีการตรวจวัดอื่นที่มีการใช้กันอยู่ เช่น วิธีรงคเลขผิวบางที่มีสมรรถนะสูง (High Performance Thin Layer Chromatography) และเอชพีแอลซี (HPLC) ที่ต่อกับอีแอลเอสดี (Evaporative Light Scattering Detector; ELSD) ซึ่งวิเคราะห์ได้ในช่วงไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Pennumaji และคณะ, 2009) เท่านั้น นอกจากนี้ เมื่อได้ทำการศึกษาความแม่นยำในเพลทเดียวกัน และต่างเพลท (Intra and Inter-assay precision) โดยทำการวัดสารมาตรฐานชาตาวาริน โฟร์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในไมโครเพลทเดียวกัน (Intra-assay) ซ้ำกันห้าครั้งและไมโครเพลทต่างกัน (Inter-assay) ซ้ำกันสามครั้งแล้วคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, RSD) ที่เกิดขึ้น พบว่าร้อยละเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่เกิดขึ้นต่ำกว่าสิบ (รูปที่ 10) แสดงว่าวิธีการวิเคราะห์นี้มีความแม่นยำเป็นที่ยอมรับได้ ส่วนการทดสอบความถูกต้อง (accuracy) ของการวิเคราะห์โดยวิเคราะห์ร้อยละการคืนกลับ (% recovery) ของสาร ซึ่งหาได้จากการตรวจวัดสารมาตรฐานชาตาวาริน โฟร์ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนแล้วนำค่าที่ตรวจวัดได้มาคำนวณเป็นร้อยละเทียบกับค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์จริง จะเห็นได้ว่าร้อยละของการคืนกลับมีค่าอยู่ระหว่าง 90-110 แสดงว่าวิธีอีไลซ่าที่พัฒนาได้ มีความถูกต้องที่ยอมรับได้

การวิเคราะห์สารชาตาวาริน โฟร์ด้วยโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อชาตาวาริน โฟร์โดยวิธีอีสเทิร์นบลอท (eastern blotting)

วิธีอีสเทิร์นบลอทเป็นวิธีที่ผสมผสานการแยกสารโดยหลักการทางโครมาโตกราฟฟีแยกสารตัวอย่างบนแผ่นเมมเบรนพีอีเอสชนิดประจุบวก (positive charged PES membrane) และตรวจวัดสารที่แยกได้โดยใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสารที่ต้องการวิเคราะห์ ตามด้วยการจับกันกับแอนติบอดีทุติยภูมิ แล้วทำปฏิกิริยากับสารเคมีที่ทำให้เกิดสีที่ตรวจวัดได้ วิธีนี้สามารถใช้ตรวจวัดสารซาโปนินแต่ละตัวที่มีอยู่ในสารสกัดรากสามสิบได้ทั้งเชิงปริมาณและคุณภาพ

รายละเอียดของวิธีการวิเคราะห์มีดังนี้ นำสารละลายของชาตาวาริน โฟร์ และสารสกัดแอลกอฮอล์ของรากสามสิบมาจุดลงบนแผ่นเมมเบรนพีอีเอสชนิดประจุบวก จากนั้นทำให้แห้งแล้วนำแผ่นเมมเบรนจุ่มลงในอะซิโตไนไตรล์ (acetronitrile)–0.2% กรดฟอสฟอริก (phosphoric acid) พีเอช 3.0 (30:70 โดยปริมาตร) และทำให้แห้งอีกครั้ง จากนั้น แช่เมมเบรนลงในสารละลายโซเดียมเพอริโอเดต ($NaIO_4$) (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ที่ละลายอยู่ในน้ำ คนเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นล้างแผ่นเมมเบรนด้วยน้ำแล้วเติมบีเอสเอ (1%) ใน สารละลายคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ (พีเอช 9.6) คนเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นล้างเมมเบรนจำนวน 2 ครั้ง ด้วย TPBS และล้างด้วยน้ำ 1 แล้วเติม 5% skimmed milk ใน PBS (S-PBS) แช่ไว้ 2 ชั่วโมง จากนั้นจุ่มเมมเบรนพีอีเอสลงในสารละลายโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อชาตาวาริน โฟร์ และคนเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างแผ่น

นายสุวัจชัย บุญอารี

เมมเบรนจำนวน 2 ครั้ง ด้วย TPBS และล้างด้วยน้ำ แล้วเติมเอนไซม์เพอรอกซิเดสที่เชื่อมต่อกับแอนตีบอดีทุติยภูมิ (Peroxidase-conjugated goat IgG fraction to mouse IgG Fc) ที่ละลายอยู่ใน PBS ความเข้มข้น 1:1000 และคนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างเมมเบรนจำนวน 2 ครั้ง ด้วย TPBS และล้างด้วยน้ำ แล้วเติม 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร 4-chloro-1-naphthol–0.02% H_2O_2 ที่ละลายอยู่ใน PBS และคนเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง หยุดการเกิดปฏิกิริยาโดยการล้างด้วยน้ำแล้วทำแผ่นเมมเบรนให้แห้ง คำนวณหาพื้นที่การเกิดจุดสีบนแผ่นเมมเบรนโดยใช้ซอฟแวร์โฟโตชอป (Photoshop)

จากผลการวิเคราะห์สารสกัดรากสามสิบเทียบกับสารชาตาวารินโฟร์ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวิธีอีสเทิร์นบลอท (รูปที่ 11) พบว่าสามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพของสารซาโปนินแต่ละตัวที่มีอยู่ในรากสามสิบได้ โดยคำนวณเป็นความเข้มข้นเทียบเท่ากับความเข้มข้นของชาตาวาริน โฟร์ วิธีนี้ให้ค่าความไว (sensitivity) ในการตรวจวัดซึ่งแสดงจากค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบสาร (Limit of Detection, LOD) เท่ากับ 0.12 นาโนกรัม สามารถตรวจวัดสารซาโปนินที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับชาตาวารินโฟร์ในช่วงความเข้มข้น 1000 ถึง 3.9 นาโนกรัม (รูปที่ 12) เมื่อได้ทำการศึกษาความแม่นยำในการวิเคราะห์ในเมมเบรนเดียวกัน และต่างเมมเบรน (Intra and Inter-assay precision) โดยทำการวัดสารมาตรฐานชาตาวารินโฟร์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในเมมเบรนเดียวกัน (Intra-assay) ซ้ำกันห้าครั้งและเมมเบรนต่างกัน (Inter-assay) ซ้ำกันสามครั้งแล้วคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, RSD) ที่เกิดขึ้น พบว่าร้อยละเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่เกิดขึ้นต่ำกว่าสิบ (รูปที่ 13) แสดงว่าวิธีการวิเคราะห์นี้มีความแม่นยำเป็นที่ยอมรับได้

โดยสรุปแล้ว ผลจากการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนัลแอนติบอดีตามการประดิษฐ์นี้ ทั้งด้วยวิธีอีไลซ่าและอีสเทิร์นบลอทให้ผลที่สอดคล้องกัน โดยพบว่าโมโนโคลนัลแอนติบอดีมีความจำเพาะสูงต่อสารชาตาวารินโฟร์ และสารซาโปนินตัวอื่นๆในรากสามสิบ ที่มีโครงสร้างของอะไกลโคนใกล้เคียงกันกับชาตาวารินโฟร์ ดังนั้น โมโนโคลนัลแอนติบอดีนี้จึงเหมาะสมกับการใช้วิเคราะห์สารสเตียรอยด์ซาโปนินที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับชาตาวารินโฟร์ที่เป็นองค์ประกอบในตัวอย่าง ได้แก่ สารสเตียรอยด์ซาโปนินในสารสกัดรากสามสิบ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากรากสามสิบ และสารสเตียรอยด์ซาโปนินที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับชาตาวารินโฟร์ในพืชตระกูล *Asparagus* อื่นๆ ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้ทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณ โดยวิธีทางอิมมูโนวิทยา อาทิ อีไลซ่าและอีสเทิร์นบลอท

การประยุกต์ใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสารชาตาวารินโฟร์ในการวิเคราะห์สารซาโปนินในรากสามสิบเพื่อใช้แบ่งแยกความแตกต่างระหว่างรากสามสิบกับหนอนตายหยาก

จากการสำรวจแหล่งของรากสามสิบ พบว่าในเขตภาคเหนือตอนล่างและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ สมุนไพรที่ประชาชนเรียกว่ารากสามสิบ นั้น อาจเป็นได้ทั้ง *A. racemosus* และ *S. tuberose* (หนอนตายหยาก) และเนื่องจากรากสามสิบที่มีจำหน่ายใช้ส่วนราก ไม่เห็นใบและต้น จึงทำให้เป็นอุปสรรคต่อการพิสูจน์เอกลักษณ์ ความแตกต่างทางเคมีระหว่างรากสามสิบ (*A. racemosus*) และรากหนอนตายหยากคือ รากสามสิบมีสารซาโปนินชาตาวารินโฟร์เป็นองค์ประกอบหลัก ส่วนหนอนตายหยากจะมีอัลคาลอยด์เป็นองค์ประกอบ

การแยกความแตกต่างของรากสามสิบกับหนอนตายหยาก โดยใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อชาตาวารินโฟร์ตามการประดิษฐ์นี้เป็นตัวแบ่งแยกสารเคมีสำคัญที่แตกต่างกันของรากสามสิบกับหนอนตายหยาก จากการวิเคราะห์โดยวิธีอีไลซ่า จะไม่พบผลบวกในตัวอย่างสารสกัดรากหนอนตายหยาก และจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีอีสเทอร์นบลอทพบว่า สารสกัดหนอนตายหยากไม่แสดงสีบนแผ่นเมมเบรน (รูปที่ 14) แสดงว่าสารสกัดจากหนอนตายหยากนี้ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อชาตาวารินโฟร์ ดังนั้น การวิเคราะห์สาร

นายสุวัจชัย บุญอารี

ชาตาวารินโฟร์ด้วยโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อชาตาวารินโฟร์ตามการประดิษฐ์นี้ด้วยวิธีการทางอิมมูโนวิทยา ได้แก่ วิธีอีไลซ่า หรือ อีสเทอร์นบลอท ช่วยในการแบ่งแยกความแตกต่างระหว่างรากสามสิบกับหนอนตายหยากได้อย่างรวดเร็ว ถูกต้อง ซึ่งจะช่วยแก้ไขปัญหาการพิจารณาแบ่งแยกวัตถุดิบจากลักษณะภายนอกที่พิจารณาได้ยาก หรือการพิจารณาจากผลการสกัดสารสำคัญออกมาก็จะต้องใช้เวลาวิเคราะห์นาน ไม่เหมาะสมกับการนำมาใช้ในการคัดเลือกวัตถุดิบ

วิธีการในการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด

ดังที่ได้กล่าวไว้แล้วในหัวข้อการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

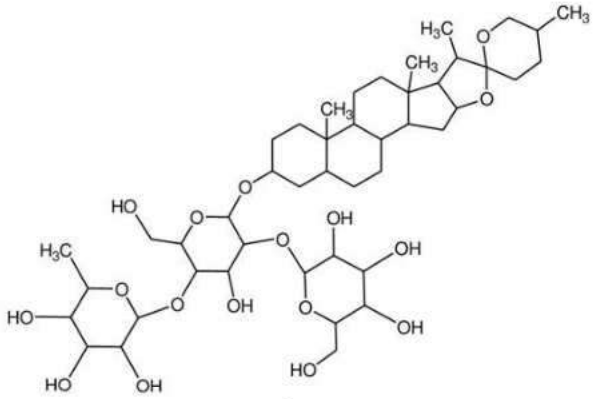
นายสุวัจชัย บุญอารี

ข้อถือสิทธิ

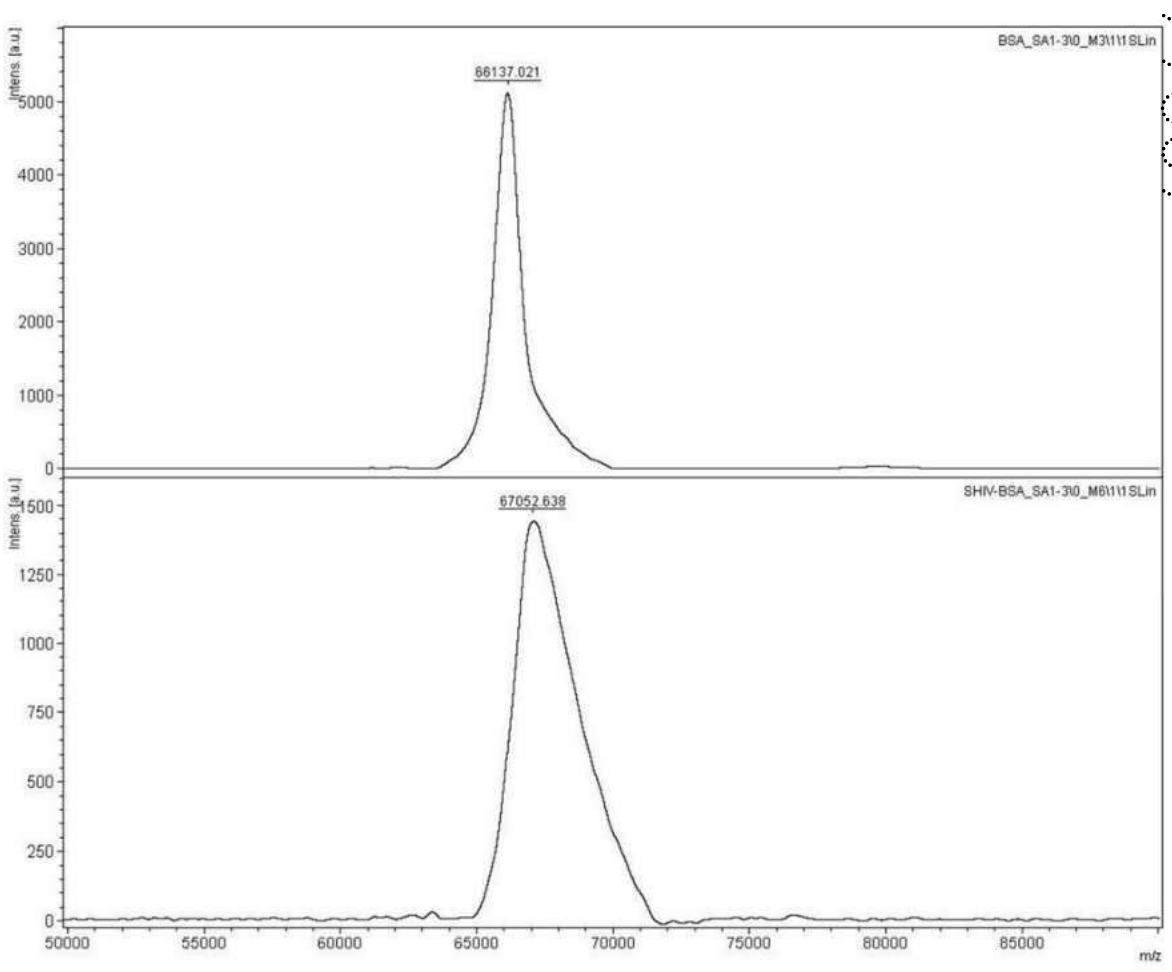
1. โมโนโคลนัลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อสารชาตาวารินโฟร์ ซึ่งมีความสามารถในการจับจำเพาะกับสารชาตาวารินโฟร์และสเตียรอยด์ซาโปนินจากรากสามสิบในบริเวณอะไกลโคน (Aglycone part)
2. เซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อสารชาตาวารินโฟร์ ตามข้อถือสิทธิ 1
3. การใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อสารชาตาวารินโฟร์ตามข้อถือสิทธิ 1 ด้วยวิธีการทางอิมมูโนวิทยาในการวิเคราะห์สารสเตียรอยด์ซาโปนินที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับชาตาวารินโฟร์ที่เป็นองค์ประกอบในตัวอย่าง
4. การใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อสารชาตาวารินโฟร์ตามข้อถือสิทธิ 1 ในการแบ่งแยกความแตกต่างระหว่างรากสามสิบกับหนอนตายหยาก

17 Oct 2013

นายสุวัจชัย บุญอารี

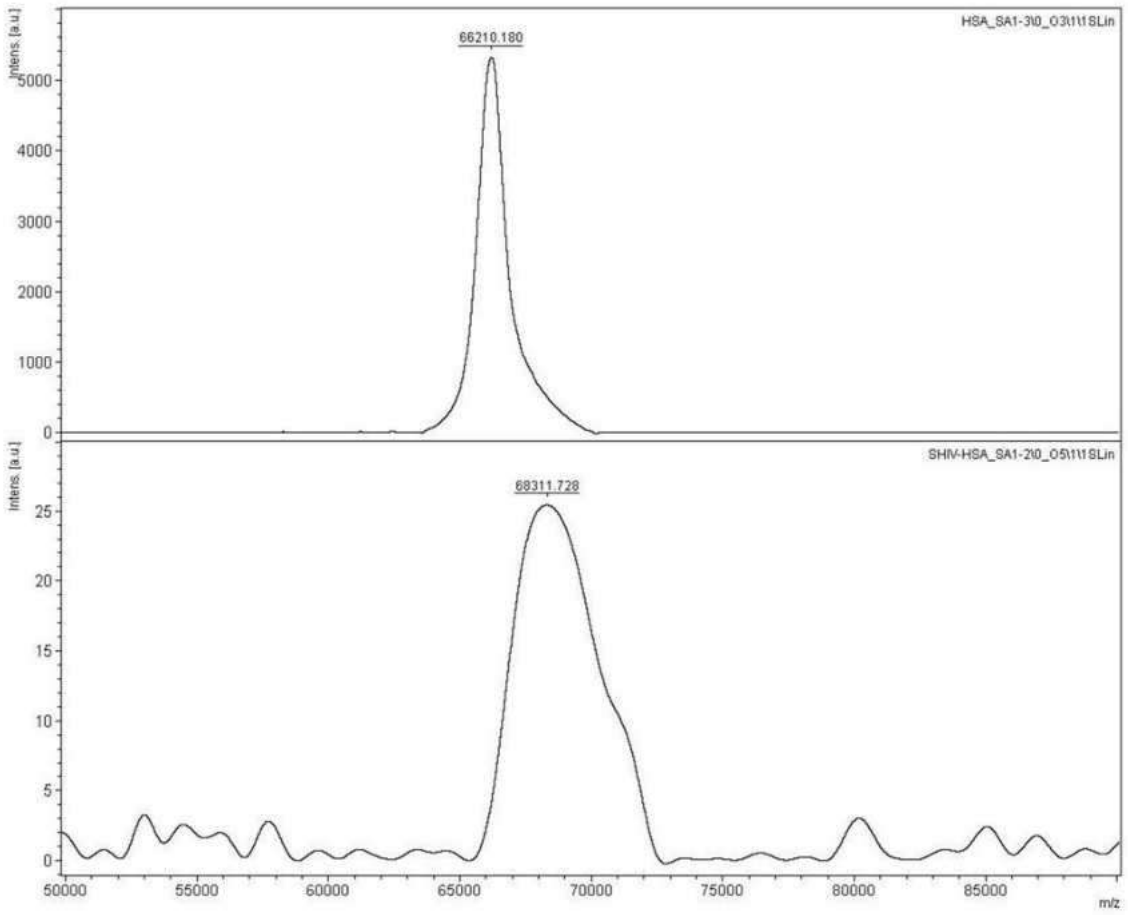


รูปที่ 1



รูปที่ 2

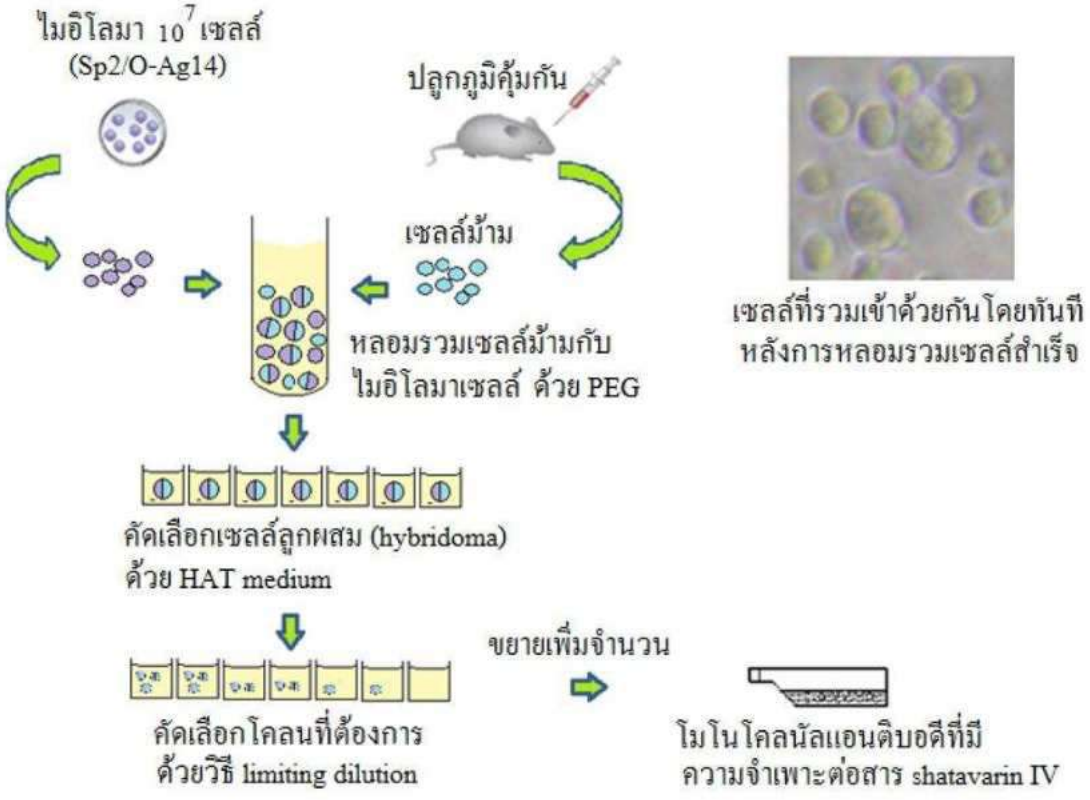
นายสุวัจชัย บุญอารี



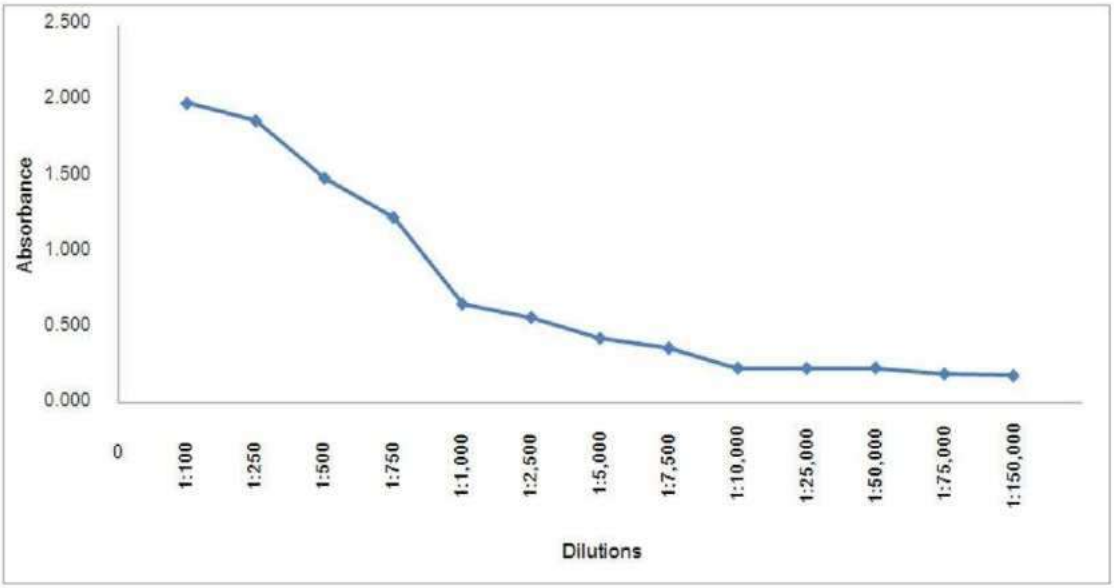
รูปที่ 3

17 ต.ค. 56

นายสุวัจชัย บุญอารี

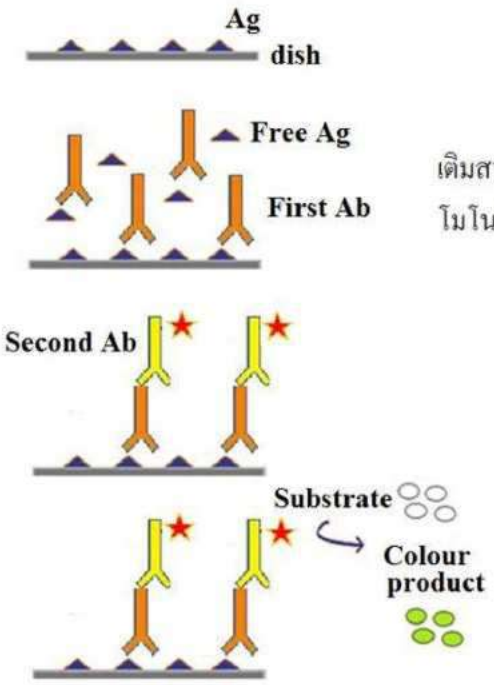


รูปที่ 4



รูปที่ 5

นายสุวัจชัย บุญอารี



เคลือบถาดหลุมด้วย shatavarin IV-HSA

⬇

เติมสารที่ต้องการวิเคราะห์ (สารตัวอย่าง/shatavarin IV) แล้วเติม โมโนโคนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสาร shatavarin IV

⬇

เติม POD anti-mouse IgG

⬇

เติม ABTS

⬇

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm

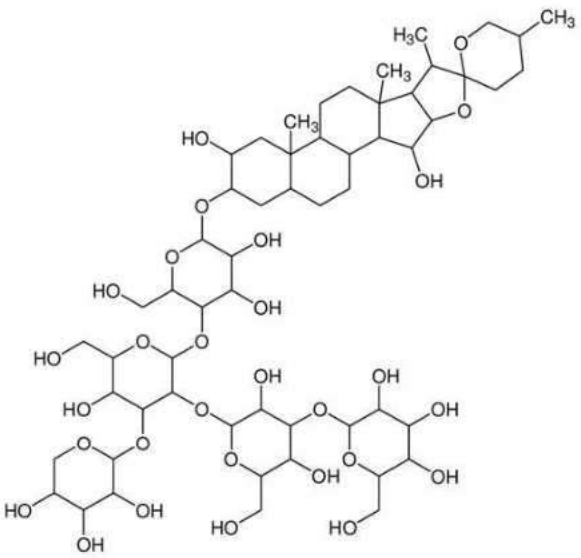
รูปที่ 6

นายสุวัจชัย บุญอารี

สาร	การแบ่งกลุ่ม (Classification)	ค่า CRs (%) (n=3)
ชาตาวารินโฟร์ (Shatavarin IV)	ซาโปนิน ไกลโคไซด์ (Saponin glycosides)	100.00
ดิจิโทนิน (Digitonin)	ซาโปนิน ไกลโคไซด์ (Saponin glycosides)	96.36 ± 3.76
บาโคปาไซด์ทู (Bacopaside II)	ซาโปนิน ไกลโคไซด์ (Saponin glycosides)	< 0.01
จินเสนโนไซด์อาร์จีวัน(Ginsenoside Rg1)	ซาโปนิน ไกลโคไซด์ (Saponin glycosides)	< 0.01
จินเสนโนไซด์อาร์บีวัน(Ginsenoside Rb1)	ซาโปนิน ไกลโคไซด์ (Saponin glycosides)	< 0.01
กลีเซอร์ไรซิน (Glycyrrhizin)	ซาโปนิน ไกลโคไซด์ (Saponin glycosides)	< 0.01
ไซโคซาโปนินเอ (Saikosaponin A)	ซาโปนิน ไกลโคไซด์ (Saponin glycosides)	< 0.01
แอลฟา อะไมริน (α - Amyrin)	ซาโปนิน ไกลโคไซด์ (Saponin glycosides)	< 0.01
ไดออสเจนนิน (Diosgenin)	ซาโปเจนิน (Sapogenins)	< 0.01
เพร็ดนิโซโลน (Prednisolone)	สเตียรอยด์ (Steroids)	< 0.01
แคฟเฟออิคแอสิด (Caffeic acid)	พิวรีนอัลคาลอยด์ (Purine alkaloids)	< 0.01
โซลานีน (Solanine)	สเตียรอยด์ อัลคาลอยด์ (Steroidal alkaloids)	< 0.01
สเวอร์เทียมาริน (Swertiamarin)	อิริดอยด์ ไกลโคไซด์ (Iridoid glycosides)	< 0.01
เจนิโพไซด์ (Geniposide)	อิริดอยด์ ไกลโคไซด์ (Iridoid glycosides)	< 0.01
เซนโนไซด์เอ (Sennoside A)	แอนทราควิโน ไกลโคไซด์ (Anthraquinones glycosides)	< 0.01
เอสคูเลติน (Aesculetin)	คูมาริน (Coumarins)	< 0.01
กริสสิโอฟุลวิน (Griseofulvin)	คูมาริน (Coumarins)	< 0.01
เฮสเพอริดิน (Hesperidin)	ฟลาโวนอยด์ ไกลโคไซด์ (Flavonoid glycosides)	< 0.01
แคมเฟอร์ (Camphor)	เทอร์ปีนอยด์ (Terpenoids)	< 0.01
ซินนามิคแอสิด (Cinnamic acid)	ฟีนิลโพรเพน (Phenyl propanes)	< 0.01

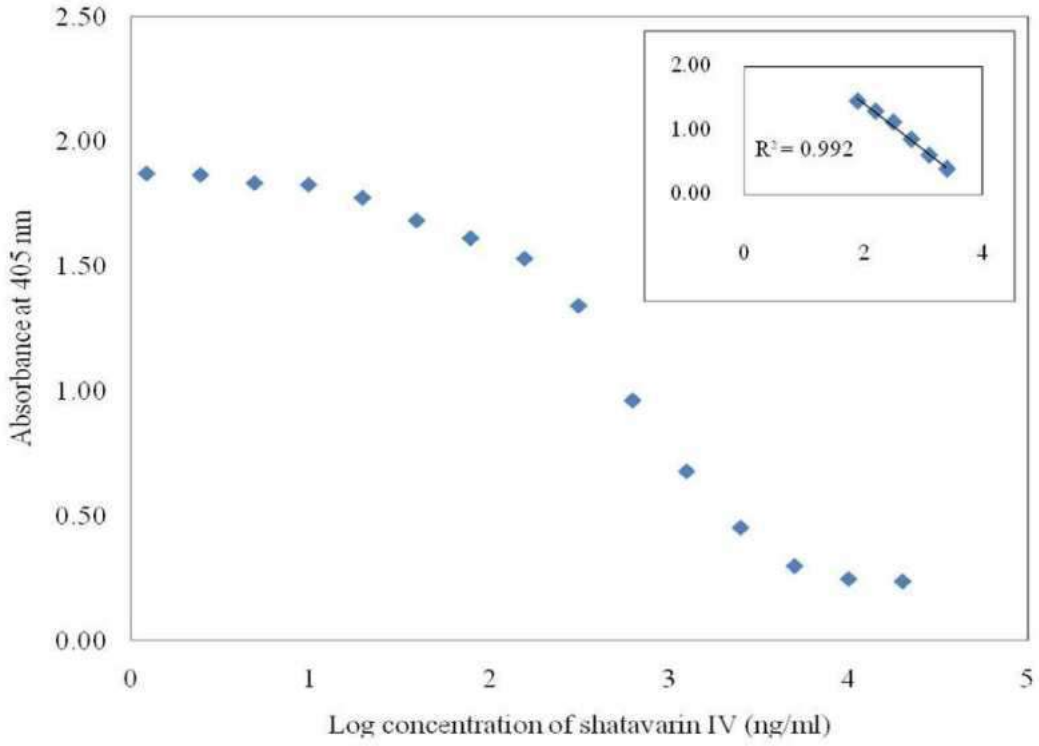
รูปที่ 7

นายสุวัจชัย บุญอารี



ดิจิโทนิน

รูปที่ 8



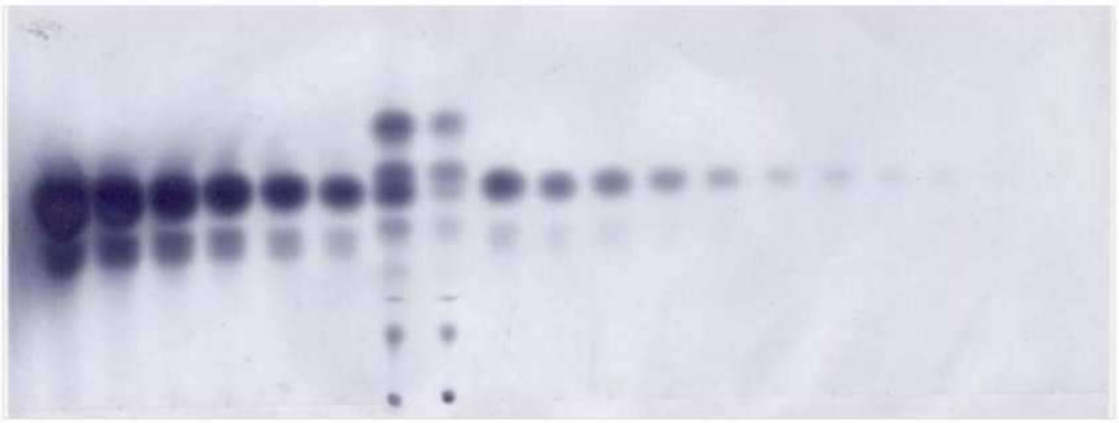
รูปที่ 9

นายสุวัจชัย บุญอารี

ความเข้มข้นของชาตาวารินโฟร์ (นาโนกรัม/มิลลิลิตร)	ร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์จากการวิเคราะห์ในเพลทต่างกัน (Inter-assay RSD) (%) (n=3)	ร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์จากการวิเคราะห์ในเพลทเดียวกัน (Intra-assay RSD) (%) (n=5)	ร้อยละการคืนกลับ (% recovery) (n=3)	ร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์จากการวิเคราะห์ร้อยละการคืนกลับ (RSD, %)
78.13	6.78	7.26	ND*	ND*
156.25	0.81	5.12	93.49	8.51
312.50	0.51	5.24	102.47	8.21
625.00	7.57	7.49	95.74	7.56
1250.00	6.77	6.41	97.01	1.09
2500.00	6.83	7.95	94.45	6.54

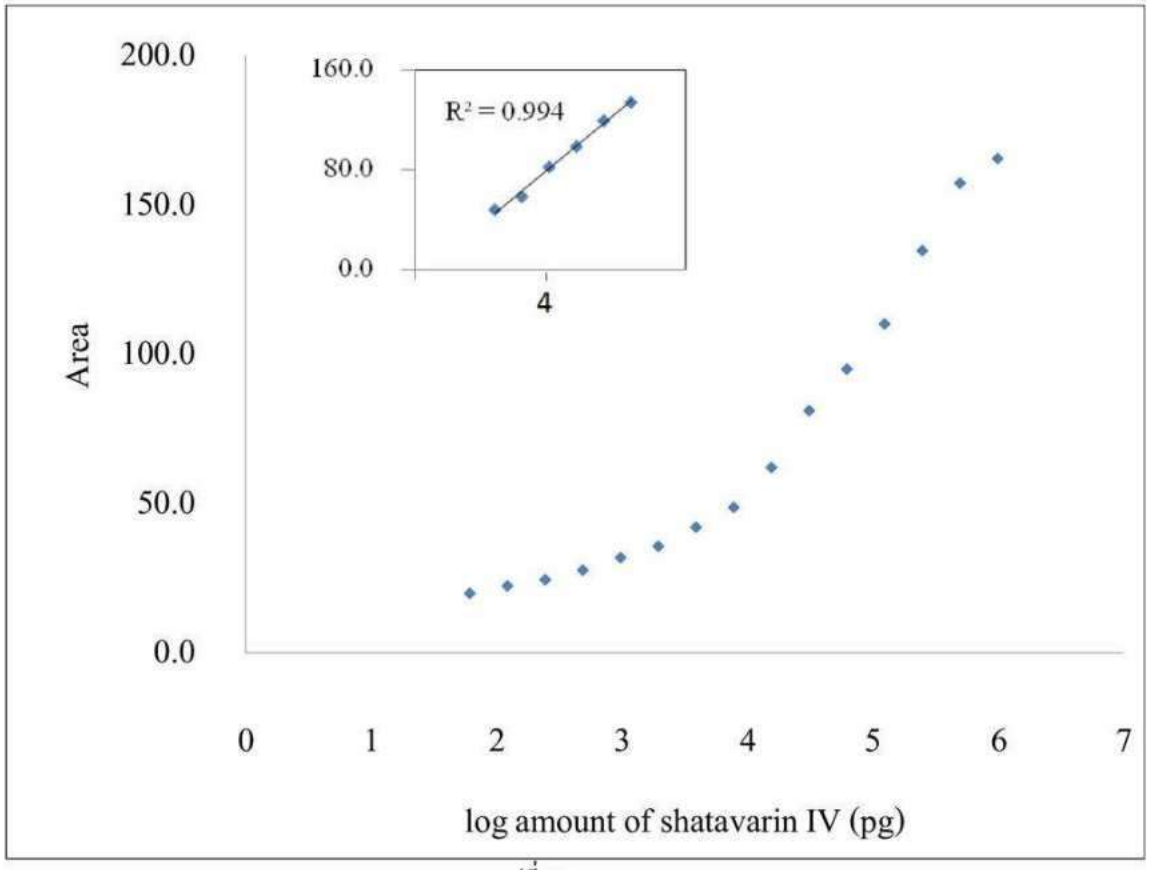
*ND คือไม่ได้ตรวจวัด

รูปที่ 10



รูปที่ 11

นายสุวัจชัย บุญอารี



รูปที่ 12

ปริมาณชาตาวารินโฟร์ (นาโนกรัม)	ร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์จากการวิเคราะห์ในเพลทต่างกัน (Inter-assay RSD) (%) (n=3)	ร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์จากการวิเคราะห์ในเพลทเดียวกัน (Intra-assay RSD) (%) (n=5)
250.00	4.41	2.16
125.00	4.12	2.49
62.50	5.33	3.15
31.25	5.31	3.96
15.67	4.76	5.73
7.81	2.56	3.98

รูปที่ 13

นายสุวัจชัย บุญอารี

รูปที่ 14

99857

นายสุวัจชัย บุญอารี

บทสรุปการประดิษฐ์

การประดิษฐ์นี้เป็นการสร้างโมโนโคลนัลแอนติบอดี (Monoclonal antibody; MAb) ที่จำเพาะต่อสารชาตาวารินโฟร์ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อจะนำโมโนโคลนัลแอนติบอดีดังกล่าวไปใช้สำหรับการวิธีวิเคราะห์สารชาตาวารินโฟร์และสารสเตียรอยด์ซาโปนินที่ผลิตขึ้นในรากสามสิบ ด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางอิมมูโนวิทยา (Immunoassay) อาทิ วิธีอีไลซ่า และอีสเทิร์มบลอท ซึ่งจะช่วยให้สามารถวิเคราะห์สารชาตาวารินโฟร์และสารสเตียรอยด์ซาโปนินที่เป็นสารสำคัญที่มีอยู่ในรากของสมุนไพรรากสามสิบได้อย่างรวดเร็ว การใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดีเพื่อตรวจสอบสารสำคัญในสมุนไพรนี้เป็นวิธีที่มีความไว แม่นยำสูง และช่วยลดเวลาการเตรียมตัวอย่างในการวิเคราะห์ เนื่องจากโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ใช้ในการวิเคราะห์ถูกสร้างขึ้นให้มีความจำเพาะกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ จึงสามารถใช้ในการวิเคราะห์ได้ทั้งในเชิงคุณภาพวิเคราะห์และปริมาณวิเคราะห์ นอกจากนี้ ยังช่วยในการแบ่งแยกหนอนตายหยากซึ่งมีลักษณะภายนอกคล้ายคลึงกับรากสามสิบได้อย่างรวดเร็วและถูกต้อง แม่นยำ จากการวิเคราะห์ความแตกต่างในส่วนของสารชาตาวารินโฟร์อีกด้วย

17 03 2554

นายสุวัจชัย บุญอารี