รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์
ชื่อโครงการ

การพัฒนาชุดทดสอบแบบอิมมูโนแอสเสย์สำหรับการตรวจสารมิตรากัยนีน
(Development of immunochromatographic test strip for detection of mitragynine)

ผู้วิจัย

รศ.ดร.จุไรทิพย์ หวังสินทวีกุล

ดร. สุพัตรา ลิ่มสุวรรณโชติ

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

งานวิจัยฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนจาก

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปีงบประมาณ 2558-2559

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

พฤศจิกายน 2559

สัญญาเลขที่ PHA580949S

ชื่อโครงการ: การพัฒนาชุดทดสอบแบบอิมมูโนแอสเสย์สำหรับการตรวจสารมิตรากัยนีน

บทคัดย่อ

โมโนโคลนอลแอนติบอดี้ (monoclonal antibody, mAb) ต่อสารมิตรากัยนีน (mitragynine, MG) (anti-MG mAb) ที่เตรียมได้จากวิธีการหลอมรวม (hybridization) ระหว่างเซลล์ม้ามหนูและเซลล์มะเร็งไมอิโลมา (myeloma cell) ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบสารมิตรากัยนีน โดยนำมาพัฒนาเป็นชุดทดสอบแบบ immunochromatographic test strip ซึ่งอาศัยหลักการจับกันระหว่างแอนติบอดี้และแอนติเจนแบบแข่งขัน (competitive immunoassay) บนแผ่นทดสอบประกอบด้วยบริเวณทดสอบ (test zone) ซึ่งประกอบด้วยสารคอนจูเกตระหว่างสารมิตรากัยนีนกับโปรตีน ovalbumin (MG-OVA) และบริเวณควบคุม (control zone) ที่ประกอบด้วยแอนติบอดี้ต่อแอนติบอดี้หนู (anti-mouse IgG) ตรึงอยู่ โดย anti-MG mAb ถูกนำไปเชื่อมต่อกับอนุภาคนาโนทองคำและใช้เป็นตัวตรวจจับ (detector) ชุดทดสอบนี้สามารถอ่านผลได้โดยการสังเกตด้วยตาเปล่า โดยหากสารตัวอย่างมีสารมิตรากัยนีนอยู่จะปรากฏสีแดงเฉพาะบริเวณ control zone หากตัวอย่างไม่มีสารมิตรากัยนีนจะปรากฏสีแดงทั้งบริเวณ control zone และ test zone ชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นนี้มีความไวในการตรวจวัดสารมิตรากัยนีนที่ความเข้มข้น 1.5 mg/mL ซึ่งทำให้บริเวณ test zone ไม่มีสีเกิดขึ้น และจากการทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับสารชนิดต่าง ๆ พบว่า ชุดทดสอบสามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับสาร speciogynine, ajmaline, ajmalicine และ alprazolam ได้ อย่างไรก็ตามเมื่อนำชุดทดสอบนี้ไปตรวจสอบสารมิตรากัยนีนในตัวอย่างใบพืชกระท่อมและน้ำต้มใบกระท่อม พบว่า ชุดทดสอบนี้ให้ผลการทดสอบที่สอดคล้องกับการทดสอบด้วยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ถึงแม้ว่าชุดทดสอบนี้จะมีข้อจำกัดในเรื่องความไวของการทดสอบ แต่มีข้อดี คือสาสารถทดสอบและอ่านผลได้ภายใน 15 นาที และใช้สารตัวอย่างเพียง 190 µL ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าชุดทดสอบแบบอิมมูโนแอสเสย์สำหรับการตรวจสาร mitragynine นี้สามารถใช้เป็นทางเลือกหนึ่งในการตรวจหา หรือ screening สารมิตรากัยนีนในตัวอย่างได้

Grant No. PHA580949S

Title: Development of immunochromatographic test strip for detection of mitragynine

---

Abstract

Monoclonal antibody (mAb) against mitragynine (MG) (anti-MG mAb) which has been established by fusing between spleen cells of mouse immunized with MG conjugated to protein and myeloma cells was applied for development of immunochromatographic test strip. This immunochromatographic test strip was based on competitive immunoassay. The immunochromatographic test strip was composed of the test zone and control zone. The MG coupled with ovalbumin (OVA) (MG-OVA) was immobilized on the membrane acting as a test zone whereas anti-mouse IgG was spotted latter that being a control zone. The anti-MG mAb was conjugated to colloidal gold nanoparticles and used as a detector for detection of MG. Using this immunochromatographic test strip, the present or absence of MG in samples could be observed by naked eye. In case of MG presented in sample, a red spot was shown only at a control zone. In contrast, two red spots at a control zone and test zone were observed in sample without MG. The sensitivity of the developed immunochromatographic test strip was at 1.5 mg/mL of MG which provided color of test zone disappeared. As a result of cross-reactivity test, this immunochromatographic test strip exhibited the cross-reactivity against speciogynine, ajmaline, ajmalicine and alprazolam. Nevertheless, it was applied for determination of MG in kratom leave samples and kratom cocktail samples. The results obtained from it were in agreement with those from enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Although, this immunochromatographic test strip had a limitation of its sensitivity, the major advantages were simple and rapid which could be run within 15 min and a small sample volume of 190 µL needed. Therefore, the developed immunochromatographic test strip could be used as an alternative method for screening of MG.

Acknowledgements

This research work was financially supported by the budget revenue of Prince of Songkla University (Grant No. 580949S) during the fiscal year 2015-2016. I am grateful to Assoc. Prof. Dr. Hiroyuki Tanaka, Department of Pharmacognosy, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan, for his assistance for supplying colloidal gold solution. I would like to thank the Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany for providing all lab facilities.

Juraithip Wungsintaweekul
Supattra Limsuwanchote
November 2016

CONTENTS

Page

บทคัดย่อ i

Abstract ii

ACKNOWLEDGEMENTS iii

CONTENTS iv

LIST OF FIGURES vi

LIST OF TABLES vii

CHAPTER 1 INTRODUCTION

1.1 Background and rationales 1

1.2 Literature reviews 2

1.2.1 *Mitragyna speciosa* (Roxb.) Korth. 2

1.2.2 Analytical methods of mitragynine 4

1.2.3 Lateral flow immunochromatographic assay 4

CHAPTER 2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Equipments 8

2.2 Materials 8

2.2.1 Chemicals and reagents 9

2.2.2 Immunoassay materials 9

2.2.3 Plant Materials 11

2.3 Preparation of monoclonal antibody against mitragynine 11

2.4 Preparation of immunochromatographic test strip 11

2.4.1 Conjugation of monoclonal antibody with colloidal gold nanoparticle 11

2.4.2 Optimization of immunochromatographic test strip 13

2.4.3 Procedure of immunochromatographic test strip 15

2.4.4 Characterization of immunochromatographic test strip 17

2.4.4.1 Sensitivity 17

2.4.4.2 Cross-reactivity 17

CONTENTS

Page

2.4.5 Application of immunochromatographic test strip 17

2.4.6 Stability of immunochromatographic test strip 18

CHAPTER 3 RESULTS AND DISCUSSION 19

3.1 Preparation of monoclonal antibody against mitragynine 19

3.2 Preparation of immunochromatographic test strip 19

3.2.1 Conjugation of monoclonal antibody with colloidal gold nanoparticle 19

3.2.2 Optimization of immunochromatographic test strip 22

3.2.3 Characterization of immunochromatographic test strip 25

3.2.3.1 Sensitivity 25

3.2.3.2 Cross-reactivity of immunochromatographic test strip 27

3.2.4 Application of immunochromatographic test strip 29

3.2.5 Stability of immunochromatographic test strip 30

CHAPTER 4 CONCLUSIONS 32

REFERENCES 33

LIST OF FIGURES

Page

Fig. 1.1 Chemical structure of mitragynine and its analogs 3

Fig. 1.2 Lateral flow immunochromatographic assay in competitive format 7

Fig. 1.3 Lateral flow immunochromatographic assay in sandwich format 7

Fig. 2.1 Immunochromatographic test strip compositions 9

Fig. 2.2 The visual assessment of the immunochromatographic test strip for MG detection 15

Fig. 2.3 ImageJ software 16

Fig. 2.4 Analysis of density of test zone using ImageJ software 16

Fig. 3.1 The color of colloidal gold solution in various buffer solutions 20

Fig. 3.2 Absorbance at 520 nm of colloidal gold solution exchanged into various buffer solutions 20

Fig. 3.3 Effect of the various amounts of anti-MG mAb to the conjugation 21

Fig. 3.4 Effect of various amounts of anti-MG mAb to absorbance 520 nm in the conjugation 21

Fig. 3.5 Effect of the addition of BSA solution during conjugation 22

Fig. 3.6 Reactivity of the anti-MG mAb-colloidal gold conjugate tested by ELISA 23

Fig. 3.7 Effect of methanol on the color intensity of immunochromatographic test strip 24

Fig. 3.8 Visualization of immunochromatographic test strip tested with MG standard 0-2 mg/mL 26

Fig. 3.9 Relative density of test zone analyzed by ImageJ software 26

Fig. 3.10 The influence of a) high density antibody and b) low density of antibody labeled on the colloidal gold surface on the intensity of test zone 27

Fig. 3.11 The representative cross-reactivity test of the constructed immunochromatographic test strip. C: control, 1: mitragynine, 2: speciogynine, 3: paynantheine, 4: mitraphylline, 5: mitraciliatine, 6: ajmaline, 7: ajmalicine, 8: hirsutine, 9: alprazolam, 10: lorazepam, 11: diazepam, 12: tramadol and 13: chlorpheniramine. 28

Fig. 3.12 ImageJ analysis of cross-reactivity test of the constructed immunochromatographic test strip 28

Fig. 3.13 The application of the constructed immunochromatographic test strip to a) kratom cocktail samples without pre-treatment, b) pre-treatment kratom cocktail samples

(C: negative control and no.1-8: kratom cocktail sample 001-008) and c) kratom leave sample (no.9-12: MS0102, MS0110, MS7-5 and MS0111). 29
Fig. 3.14 Stability of the immunochromatographic test strips stored at 4, 25 and 37°C analyzed by ImageJ analysis. 31

LIST OF TABLES

Page

Table 1.1 Chromatographic techniques used for analysis of kratom alkaloids 6
Table 3.1 MG content in kratom leave samples analyzed by ELISA..... 30
Table 3.2 Total alkaloid content (MG, paynantheine and speciogynine) in kratom cocktail samples analyzed by ELISA..... 30