

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG590174

ชื่อโครงการ: การพัฒนาระบบวิเคราะห์ที่ประกอบด้วยเครื่องลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์แมสสเปกโตรมิเตอร์เชื่อมต่อแบบออนไลน์กับฤทธิ์ต้านเอนไซม์ฟอสโฟไดเอสเทอเรสไฟว์เพื่อใช้ในการคัดกรองและจำแนกพืชสมุนไพรอย่างรวดเร็ว

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน: ดร. ประภาพรรณ เต็มกิจฉาว คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
รศ. ดร. กรกนก อิงคินันท์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
ดร. นิทรา เนื่องจำนงค์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
นางสาว Samajhana Bhandari คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

อีเมล: prapapantem@gmail.com

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

บทคัดย่อ:

เอนไซม์ฟอสโฟไดเอสเทอเรสไฟว์ (phosphodiesterase5, PDE-5) นับเป็นเป้าหมายหนึ่งที่สำคัญในการรักษาภาวะหย่อนสมรรถภาพทางเพศชาย (erectile dysfunction, ED) และภาวะความดันโลหิตสูงในปอด (pulmonary artery hypertension, PAH) มีความพยายามอย่างมากในการค้นหาสารที่มีความจำเพาะในการออกฤทธิ์ต้านเอนไซม์ชนิดนี้ทั้งจากสารสังเคราะห์และผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ปัจจุบันวิธีที่ได้รับความนิยมและเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ชนิดนี้คือเทคนิคทางกัมมันตภาพรังสี ซึ่งเป็นวิธีที่มีค่าใช้จ่ายสูง ไม่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และมีขั้นตอนการทดสอบหลายขั้นตอน จากข้อจำกัดเหล่านี้จึงยังคงมีความจำเป็นในการพัฒนาวิธีประเมินฤทธิ์ต้าน PDE5 ที่ประหยัดและรวดเร็ว งานวิจัยนี้มีเป้าหมายเพื่อพัฒนาวิธีทดสอบฤทธิ์ต้าน PDE5 ชนิดออฟไลน์ใน 96 microplate โดยอาศัยเทคนิคทางฟลูออเรสเซนซ์อันจะเป็นเทคนิคที่มีราคาถูกกว่าวิธีทางรังสี นอกจากนี้ยังพัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่ประกอบด้วยเครื่องลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์แมสสเปกโตรมิเตอร์เชื่อมต่อแบบออนไลน์กับฤทธิ์ต้านเอนไซม์ฟอสโฟไดเอสเทอเรสไฟว์เพื่อใช้ในการคัดกรองและระบุสารสำคัญในสารสกัดได้อย่างรวดเร็ว วิธีทดสอบฤทธิ์ต้าน PDE5 ชนิดออฟไลน์ที่พัฒนาขึ้นนี้ ถูกทำการตรวจสอบรับรองวิธีการทดสอบที่ได้ตามเกณฑ์มาตรฐานของ ICH โดยทุกพารามิเตอร์ที่ถูกกำหนดไว้ตามเกณฑ์ เช่น assay window (S/B), assay variability (S/N), inhibitor signal window (SW), reproducibility และ reliability (Z' factor) อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ ยิ่งไปกว่านั้นผลการทดสอบฤทธิ์ต้าน PDE5 ของสารสกัดพืชตัวอย่างหลายชนิดด้วยเทคนิคที่พัฒนาขึ้นมาใหม่มีความสอดคล้องกับผลที่ได้จากวิธีการทดสอบด้วยเทคนิคทางรังสี จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าสารสกัดว่านอึ้ง (*Eulophia macrobulbon*, Orchidaceae) และ สารสกัดเถาวัลย์เปรียง (*Derris scandens*, Fabaceae) แสดงฤทธิ์ยับยั้ง PDE5 ได้สูง ดังสารสกัดทั้ง 2 ชนิดนี้ถูกคัดเลือกเพื่อใช้ในการศึกษาสารสำคัญโดยใช้ LC/MS/MS เชื่อมต่อแบบออนไลน์กับฤทธิ์ต้านเอนไซม์ฟอสโฟไดเอสเทอเรสไฟว์ที่พัฒนาแล้ว

ระบบแอทไลน์ที่มีการเชื่อมต่อกับ LC/MS/MS และการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพนี้เป็นเครื่องมือหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสำหรับระบุสารสำคัญในการออกฤทธิ์ต้าน PDE5 ที่มีอยู่ในสารสกัดตัวอย่างได้อย่างรวดเร็วภายใน 1 ครั้งของการวิเคราะห์ โดยสารต่างๆที่ถูกแยกในคอลัมน์ LC จะถูกแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ในอัตราส่วน 1:9 เพื่อนำส่งเข้า mass detector และเก็บลงใน 96 microplate ตามลำดับ ตัวอย่างที่ได้ใน 96 microplate ถูกนำมาระเหยตัวทำละลายออกและทำการทดสอบฤทธิ์ต้าน PDE5 ต่อไป ข้อมูลที่ได้จาก mass spectrometry และการทดสอบฤทธิ์นี้ถูกนำมาเชื่อมโยงเพื่อระบุสารสำคัญในการออกฤทธิ์ จากการตัวอย่างสารสกัดทั้ง 2 ชนิดข้างต้น สามารถระบุสารสำคัญในสารสกัดว่านอึ้ง และเถาวัลย์เปรียงได้ โดยเป็นสารในกลุ่ม phenanthrenes และ flavonoids ตามลำดับ ข้อค้นพบนี้สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ ดังนั้นวิธีการแอทไลน์ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถเป็นวิธีที่รวดเร็วในการระบุสารยับยั้ง PDE5 ที่มีอยู่ในสารสกัดได้

คำหลัก : ฟอสโฟไดเอสเทอเรสไฟว์, แอทไลน์, ลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์แมสสเปกโตรมิเตอร์, ว่านอึ้ง, เถาวัลย์เปรียง

Abstract

Project Code : MRG590174

Project Title : Development of an LC/MS/MS coupled at-line with phosphodiesterase 5 for rapid screening and characterization of medicinal plants

Investigator : Dr. Prapapan Temkitthawon

Assoc.Prof. Dr. Kornkanok Ingkaninan

Dr. Nitra Nuengchamnong

Miss Samajhana Bhandari

E-mail Address : prapapantem@gmail.com

Project Period : 2 years

Abstract:

Phosphodiesterases-5 (PDE-5) is the important target for treatments of erectile dysfunction (ED) and pulmonary artery hypertension (PAH). Several attempts are focusing on finding the selective PDE5 inhibitors from either synthetic compounds or natural products. At the present, the conventional assay for PDE5 activity determination is radioactive assay which is costly and non-environmental friendly method. Therefore, the economic and rapid assay for PDE5 activity screening is still required. In this study, we aims to develop the economic offline fluorescent PDE5 assay and also establish an LC/MS/MS coupled at-line with phosphodiesterase 5 for rapid screening and identification on active compounds in plant extracts. The developed offline fluorescent PDE5 assay was validated according to ICH guideline. All validated parameters such as assay window (S/B), assay variability (S/N), inhibitor signal window (SW), reproducibility and reliability (Z' factor) were in acceptable ranges. Furthermore, this assay was applied for screening of PDE5 inhibitory activity from plant extracts and also comparable to the results from conventional radioactive PDE5 inhibitory activity assay. From screening at 50 µg/ml of plant extracts, *Eulophia macrobulbon* (Orchidaceae) and *Derris scandens* (Fabaceae) showed promising PDE5 inhibitory activity, these extracts were, therefore, selected for further study on the bioactive compounds using the developed LC/MS/MS coupled at-line PDE5 assay

The at-line coupling system for LC separation and bioactivity determination in crude extract is one powerful tool for rapid identification of PDE5 inhibitors in complex mixtures in a single run. The at-line bio affinity screening is the combination of liquid chromatography (LC), mass spectrometry (MS), and pharmacology together. In at-line after initial LC separation

of extract, the eluents splits into high resolution MS and fractionation device onto 96-well plates. These plates are successively removed the solvents and then screened for PDE5 inhibitory activity. Once the bioactive wells are identified, mass profiles from the parallel MS data were synchronized to the activities found. The results showed that the active compounds in *E. macrobulbon* and *D. scandens* were phenanthrenes and flavonoids, respectively. These findings were in agreement with previous study. Therefore, at-line method can be a rapid method for identification of potent PDE5 inhibitors in crude extracts.

Keywords : phosphodiesterase, at-line, LC/MS/MS, *Eulophia macrobulbon*, *Derris scandens*