



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการสารออกฤทธิ์ต้านไวรัสจากสาหร่าย

โดย นางบุษยา บุนนาคและคณะ

ธันวาคม 2546

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการสารออกฤทธิ์ต้านไวรัสจากสาหร่าย

คณะผู้วิจัย	สังกัด
1. รศ. บุษยา บุญนาค	ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
2. ผศ.ดร. มารศรี เรืองจิตชัยวาลย์	ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
3. ดร. ประสาท กิตตะคุปต์	ห้องปฏิบัติการวิจัยทรัพยากรชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
4. ผศ.ดร. สนทยา ลิ้มมัทวาทิธี	ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
5. น.ส. ณัฐยาภรณ์ ชีระสุวรรณ	สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

สนับสนุนโดย
สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
ชุดโครงการ.....

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ในปี พ.ศ. 2543 ถึงปี พ.ศ. 2546

ขอขอบพระคุณ ดร. ประสาท กิตตะคุปต์ ณ ห้องปฏิบัติการวิจัยทรัพยากรชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ในการอนุเคราะห์เครื่องมือเพื่อใช้ในการวิเคราะห์และพิสูจน์โครงสร้างสารสำคัญจากสาหร่ายสไปรูลีนา รวมทั้งกรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำในการทำงานวิจัยครั้งนี้ และขอขอบคุณนักวิจัย ณ ห้องปฏิบัติการวิจัยทรัพยากรชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ทุกท่านที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการดำเนินงานวิจัยครั้งนี้

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : RDG3/32/2543

ชื่อโครงการ : สารออกฤทธิ์ต้านไวรัสจากสาหร่าย

นักวิจัย : บุษยา บุญนาค¹, มารศรี เรืองจิตชัชวาลย์¹, ประสาท กิตตะคุปต์²,
สนทยา ลิ้มมัทวาทิธี³ และณัฐยาภรณ์ ชีระสุวรรณ⁴

¹คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี,

²ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

³คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร, ⁴สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

email address: boosya.bun@kmutt.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: กันยายน 2543 - กันยายน 2546

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาค่าประเภทประกอบทางเคมีของสารสกัดจากสาหร่ายสไปรูลีนา ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HSV-1 โดยใช้หลัก bioassay guided fractionation และศึกษาความคงตัวของสารออกฤทธิ์ รวมทั้งพัฒนาตำรับยาทาภายนอกจากสารสกัดที่ได้

สารสกัดจากสาหร่ายสไปรูลีนา 2 ชนิด คือ crude lipid และ crude hot water extract polysaccharide มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HSV-1 ที่ค่า IC₅₀ 17.28 และ 21.32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ทำเฉพาะ crude lipid เนื่องจากมีปริมาณมากกว่า crude hot water extract polysaccharide โดยใช้เทคนิคทาง gel filtration chromatography ในการแยกสารสกัดให้บริสุทธิ์ และใช้ NMR HPLC-MS และ GC ในการวิเคราะห์สูตรโครงสร้างทางเคมี พบว่า สารสำคัญที่ทำให้ crude lipid มีฤทธิ์เป็นสารต้านเชื้อ HSV-1 คือ สารกลุ่ม sulfoquinovosyl diacylglycerol ที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัว C18:2 และกรดไขมันอิ่มตัว C16:0 esterify อยู่ที่ตำแหน่ง sn-1 และ sn-2 ตามลำดับ ขณะที่ตำแหน่งที่ 3 ของ glycerol backbone เป็นน้ำตาล α -D-quinovose ที่มี sulfonic acid เป็นองค์ประกอบ โดยมีค่า IC₅₀ 7.62 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งยับยั้งเชื้อ HSV-1 ดีกว่า crude lipid ประมาณ 2.3 เท่า และจากการพัฒนาตำรับยาโดยใช้ crude lipid เป็น active ingredient ในปริมาณร้อยละ 10 พบว่า ตำรับยา SE 002 แสดงคุณสมบัติออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 ดีกว่ายาครีม ZEVIN ซึ่งมี acyclovir เป็นองค์ประกอบอยู่ร้อยละ 5 การศึกษาความคงตัวทางเคมีของสารออกฤทธิ์ในสารสกัด EtOAc ของ crude lipid และตำรับยา 3 ตำรับ (SE002 SE003 และ SE006) พบว่า สารสำคัญมีความคงตัวต่ำ

สำหรับ crude hot water extract polysaccharide พบว่า สารดังกล่าวมีน้ำตาล rhamnose เป็นองค์ประกอบหลัก โดยแคลเซียมและซัลเฟตไอออนมีบทบาทสำคัญต่อการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HSV-1 ของ polysaccharide

คำหลัก: สาหร่ายสไปรูลีนา, HSV-1, sulfoquinovosyl diacylglycerol

Abstract

Project Code : RDG3/32/2543

Project Title : Antiviral compounds from microalgae

Investigators : Bunnag, B.¹, Ruengjitchatchawalya, M.¹, Kittakoo, P.²,
Limmatvapirat, S.³ and Chirasuwan, N.⁴

¹School of Bioresources and Technology, King Mongkut's University of Technology Thonburi,

²National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology
Development Agency, ³Faculty of Pharmacy, Silpakorn University

⁴Pilot Plant Development and Training Institute, King Mongkut's University of Technology Thonburi

email address: boosya.bun@kmutt.ac.th

Project Duration : September 2000 - September 2003

This research project aims to detect anti HSV-1 compound from *Spirulina platensis* by bioassay guided fractionation. The stability of the bioactive compound was also tested. A study was also performed to formulate an *S.platensis* extract to be used topologically.

The results from the study showed that crude lipid extract and crude hot water extract of *S. platensis* had IC₅₀ values against HSV-1 of 17.28 and 21.32 µg/ml, respectively. Crude lipid was selected for further study on chemical structure analysis of the bioactive compound, due to the amount present in the cell. Purification of crude lipid was performed using gel filtration chromatography. The chemical structure of the bioactive compound was studied using NMR, HPLC-MS and GC. It was found that the chemical structure of the bioactive compound from crude lipid was sulfoquinovosyl diacylglycerol, which has C18:2 and C16:0 esterified at *sn*-1 and *sn*-2 respectively, while α-D-quinovose with sulfonic acid was found to link to the *sn*-3 position of glycerol backbone. The anti HSV-1 activity was IC₅₀ 7.62 µg/ml, which was 2.3 times higher than the activity of the crude lipid. Studies on formulation of the bioactive compound in order to be used topologically, found that the formulae SE 002 (10% active compound) had higher antiviral activity than ZEVIN cream (5% acyclovir). The stability of the EtOAc extract and 3 formulations (SE 002, SE 003 and SE 006) showed low stability.

The crude hot water extract was found to be a polysaccharide with rhamnose as the main sugar component. Calcium and sulfate ions in this polysaccharide also had major roles in the antiviral activity.

Keywords: *Spirulina platensis*, HSV-1, sulfoquinovosyl diacylglycerol

สารบัญ

	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 เหตุผลที่จำเป็นต้องมีการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	4
1.3 ขอบเขตงานวิจัย	4
1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย	6
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 สาหร่ายสไปรูลินา (<i>Spirulina platensis</i>)	7
2.2 ลิพิดและกรดไขมันในไซยาโนแบคทีเรีย	9
2.3 Herpes simplex virus (HSV)	12
2.4 สารสังเคราะห์ที่ใช้ในรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อ herpes simplex virus	13
2.5 สารที่มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อไวรัสที่ได้จากไซยาโนแบคทีเรีย	
2.5.1 Polysaccharide	18
2.5.2 Lipid	22
2.5.3 สารประกอบอื่น ๆ	27
2.6 สารที่มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อไวรัสที่ได้จากสาหร่ายและสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ	27
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	
3.1 การสกัด crude lipid และ crude polysaccharide	30
3.2 การแยก lipid class ของ crude lipid	31
3.3 การแยก crude lipid ให้บริสุทธิ์เพื่อหาโครงสร้างของสารสำคัญ ที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1	
3.3.1 การทำ partition ของ crude lipid	32
3.3.2 การแยกสารสกัด ethyl acetate ด้วยวิธี Gel-Filtration Chromatography	32
3.4 การวิเคราะห์	
3.4.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมัน	33
3.4.1.1 การเตรียม methyl ester ของกรดไขมัน	33
3.4.1.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของ methyl ester ของกรดไขมัน โดยใช้ Gas Chromatography	33

3.4.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำตาลของ crude hot water extract polysaccharide	
3.4.2.1 การเตรียมอนุพันธ์ของน้ำตาลสำหรับวิเคราะห์ด้วย Gas Chromatography	33
3.4.2.2 วิธีการ hydrolyzed polysaccharide	34
3.4.2.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำตาลโดย Gas Chromatography	34
3.4.3 การวิเคราะห์สารตัวอย่างด้วย NMR	34
3.5 การตรวจสอบหมู่ไฮดรอกซิลของน้ำตาลใน glycolipid โดยการทำให้ปฏิกิริยา Acetylation	34
3.6 การตรวจสอบพันธะคู่ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวโดยการทำให้ปฏิกิริยา Bromination	35
3.7 การแยก fraction ของ crude hot water polysaccharide โดยวิธี Gel-Filtration Chromatography	35
3.8 การศึกษาความคงตัวของสารสกัด Ethyl acetate และตำรับยา	35
3.9 การกำจัดสีออกจาก crude lipid	
3.9.1 การกำจัดสีโดยใช้ activated charcoal	36
3.9.2 การกำจัดสีโดยการเปลี่ยนอัตราส่วนของตัวทำละลาย MeOH:H ₂ O	37
3.10 การหาปริมาณคลอโรฟิลล์ของ crude lipid	37
3.11 การหาปริมาณโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต	
3.11.1 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry	37
3.11.2 การหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตโดยวิธี Phenol-Sulfuric	38
3.12 การหาปริมาณแก้วของสาหร่ายสไปรูลีนาและ crude hot water extract polysaccharide	38
3.13 การหาปริมาณแคลเซียมและซัลเฟตใน crude hot water extract polysaccharide	
3.13.1 การหาปริมาณแคลเซียมด้วยเครื่อง ICP	38
3.13.2 การหาปริมาณซัลเฟตใน crude hot water extract polysaccharide	39

3.14 การกำจัดแคลเซียมและซัลเฟตออกจาก crude hot water extract polysaccharide	
3.14.1 การกำจัดแคลเซียมออกจาก crude hot water extract polysaccharide	39
3.14.2 การกำจัดซัลเฟตออกจาก crude hot water extract polysaccharide	39
3.15 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านไวรัสก่อโรครีเม Herpes simplex virus type 1 (Anti HSV-1 assay) โดย colorimetric method	40
บทที่ 4 ผลการดำเนินงานวิจัย	
4.1 การเตรียม crude lipid และ crude polysaccharide จากสาหร่ายสไปรูลีนา	42
4.2 การตรวจสอบสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HSV-1 ใน crude lipid	45
4.3 การตั้งตำรับยาทาภายนอกจากสารสกัด lipid จากสาหร่ายสไปรูลีนา และการศึกษาความคงตัวของสารสกัด EtOAc และตำรับยา	
4.3.1 การตั้งตำรับยาทาภายนอกจากสารสกัด lipid จากสาหร่ายสไปรูลีนา	64
4.3.2 การศึกษาความคงตัวของสารสกัด EtOAc และตำรับยา	
4.3.2.1 การศึกษาความคงตัวทางเคมีของสารสำคัญ	66
4.3.2.2 การศึกษาคุณสมบัติการออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 ของสารสกัด EtOAc และตำรับยา	70
4.4 การกำจัดสีของ crude lipid	
4.4.1 การกำจัดสีโดยใช้ activated charcoal	75
4.4.2 การกำจัดสีของ crude lipid โดยการปรับเปลี่ยนอัตราส่วนของ ตัวทำละลาย MeOH:H ₂ O	77
4.5 การศึกษาองค์ประกอบและคุณสมบัติของ crude hot water extract polysaccharide	81
บทที่ 5 สรุปผลการดำเนินงานวิจัยและข้อเสนอแนะ	
5.1 สรุปผลการดำเนินงานวิจัย	87
5.2 ข้อเสนอแนะ	88
เอกสารอ้างอิง	89

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1 ผลการตรวจสอบคุณสมบัติการออกฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส HSV-1 ของ crude lipid และ crude polysaccharide ที่สกัดได้จากสาหร่ายสไปรูลินา	3
2.1 องค์ประกอบทางชีวเคมีของสาหร่ายชนิดต่าง ๆ	8
2.2 องค์ประกอบของ glycolipid ชนิดต่าง ๆ ในสาหร่ายสไปรูลินา	10
2.3 คุณสมบัติการต้านเชื้อไวรัส HSV-2 ของสารสกัดหลายชนิดที่ได้จาก <i>S. maxima</i> เมื่อใช้ตัวทำละลายต่างชนิดกัน	20
2.4 ผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase และ RNase ของ HIV-1 โดย sulfoglycolipids glycolipids และอนุพันธ์ต่าง ๆ	25
4.1 ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติการออกฤทธิ์เป็นสารยับยั้งเชื้อ HSV-1 ของ crude lipid crude hot water extract polysaccharide และ cold water extract polysaccharide	44
4.2 องค์ประกอบของ lipid class ที่แยกได้จากสาหร่ายสไปรูลินา	45
4.3 ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติของการเป็นสารยับยั้งเชื้อ HSV-1 ของ lipid class ที่แยกได้จาก crude lipid ของสาหร่ายสไปรูลินา	46
4.4 สัดส่วนของสารสกัด hexane, ethyl acetate และ methanol ที่ได้จากการนำ crude lipid ของสาหร่ายสไปรูลินามาทำ partition	46
4.5 ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติของการเป็นสารยับยั้งเชื้อ HSV-1 ของสารสกัดทั้งสามชนิดที่ได้จากการนำ crude lipid ของสาหร่ายสไปรูลินามาทำ partition	47
4.6 ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติของการเป็นสารยับยั้งเชื้อ HSV-1 ของสารทั้ง 10 fractions ที่แยกได้จากสารสกัด ethyl acetate ของสาหร่ายสไปรูลินา	48
4.7 องค์ประกอบกรดไขมันของสาหร่ายสไปรูลินาสายพันธุ์ปกติ (C1) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์กลาย (I 30/1)	49
4.8 ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติของการเป็นสารยับยั้งเชื้อ HSV-1 ของสาหร่ายสไปรูลินาสายพันธุ์ดั้งเดิม (C1) และสายพันธุ์กลาย (I 30/1)	49
4.9 องค์ประกอบของกรดไขมันใน Lipid Class ของสาหร่ายสไปรูลินา	50
4.10 องค์ประกอบของกรดไขมันของสาร fraction ที่ 7-10 (F7-F10) ที่แยกได้จากสารสกัด ethyl acetate ของสาหร่ายสไปรูลินา	51
4.11 เปรียบเทียบองค์ประกอบของกรดไขมันของสาร fraction ที่ 7-10 (F7-F10) และสาร fraction ที่ 5'-8' (F5'-F8') ที่สกัดได้จากสาหร่ายสไปรูลินา โดยใช้เทคนิค gas chromatography	57

	หน้า
4.12 องค์ประกอบของสารในตำรับยา SE 001, SE 002, SE 003, SE 004, SE 005 และ SE 006	65
4.13 สัดส่วนของสารออกฤทธิ์ SQDG ที่ลดลง (ร้อยละ) ของสารสกัด EtOAc และตำรับยา SE 002, SE 003 และ SE 006 เมื่ออยู่ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องเป็นระยะต่าง ๆ	67
4.14 องค์ประกอบของกรดไขมันของสารสกัด EtOAc เมื่ออยู่ในสภาวะอุณหภูมิห้องและที่สภาวะเร่งการสลายตัวอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ 75 เปอร์เซ็นต์	69
4.15 การวิเคราะห์คุณสมบัติการออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 ของสารสกัด EtOAc และตำรับยา SE 002, SE 003 และ SE 006 ที่อุณหภูมิห้อง	71
4.16 การวิเคราะห์คุณสมบัติการออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 ของสารสกัด EtOAc และตำรับยา SE 002 SE 003 และ SE 006 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ 75 เปอร์เซ็นต์	73
4.17 ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ของสารสกัด EtOAc ที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75 เปอร์เซ็นต์	74
4.18 ปริมาณของคลอโรฟิลล์และ crude lipid ที่คงเหลือเมื่อใช้ activated charcoal เป็นตัวกำจัดสี	76
4.19 ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์และปริมาณ crude lipid ที่สกัดได้ เมื่อใช้ตัวทำละลาย MeOH:H ₂ O ในอัตราส่วนต่าง ๆ เป็นตัวสกัด	78
4.20 ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติในการต้านเชื้อ HSV-1 ของ fraction ที่แยกได้จาก hot water extract polysaccharide ของสาหร่ายสไปรูลินา	83
4.21 องค์ประกอบน้ำตาลของ fraction SHP-F1 และ SHP-F2 ที่แยกได้จาก hot water extract polysaccharide และนำไปวิเคราะห์โดยเทคนิค Gas Chromatography	84
4.22 องค์ประกอบสำคัญของสาหร่ายแห้งและ crude hot water polysaccharide ที่สกัดได้จากสาหร่ายสไปรูลินา	84
4.23 ปริมาณคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนที่วิเคราะห์ได้หลังจากนำ crude hot water polysaccharide มาตกตะกอนด้วย TCA	85
4.24 ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติของการเป็นสารยับยั้งเชื้อ HSV-1 ของ crude hot water polysaccharide ปกติ และ hot water polysaccharide ที่ไม่มี Ca และ SO ₄ ²⁻ เป็นองค์ประกอบ	86

รายการรูปประกอบ

รูปที่	หน้า
2.1 รูปร่างลักษณะของสาหร่ายสไปรูลินา (<i>Spirulina (Arthrospira) sp.</i>)	7
2.2 โครงสร้างโมเลกุลของ glycerolipid ในไซยาโนแบคทีเรีย	9
2.3 ตำแหน่งของกรดไขมันในไซยาโนแบคทีเรีย	11
2.4 โครงสร้างของ HSV virion และ genome organization	12
2.5 โครงสร้าง Acyclovir	13
2.6 แสดง DNA chain termination เมื่อสาร acyclovir ถูกเปลี่ยนเป็น acyclovir triphosphate	14
2.7 โครงสร้าง Valacyclovir	15
2.8 โครงสร้างของ Ganciclovir	16
2.9 โครงสร้างของ Penciclovir	16
2.10 โครงสร้าง Famciclovir	17
2.11 โครงสร้างของ Foscarnet	18
2.12 โครงสร้างของสาร sulfolipids ที่แยกได้จากสาหร่าย <i>L. lagerheimii</i> และ <i>P. tenue</i>	23
2.13 โครงสร้างของสารประกอบ 12 ชนิด ที่สกัดแยกและสังเคราะห์จาก ไซยาโนแบคทีเรีย 5 ชนิด	24
3.1 วิธีการสกัด crude lipid, crude cold และ hot water extract polysaccharide จากสาหร่ายสไปรูลินา	30
4.1 Crude lipid ที่สกัดได้จากสาหร่ายสไปรูลินา	43
4.2 Crude cold water extract polysaccharide และ hot water extract polysaccharide ที่แยกได้จากสาหร่ายสไปรูลินา	43
4.3 ^1H NMR (400 MHz) spectrum (CDCl_3) ของสาร fraction ที่ 7-10	52
4.4 ^{13}C NMR (100 MHz) spectrum (CDCl_3) ของสาร fraction ที่ 7-10	53
4.5 HMQC spectrum (CDCl_3) ของสาร fraction ที่ 7-10	53
4.6 ^1H NMR (400 MHz) spectrum (CDCl_3) ของสาร fraction ที่ 7-10 เมื่อนำมาทำปฏิกิริยา Acetylation	54
4.7 ^{13}C NMR (100 MHz) spectrum (CDCl_3) ของสาร fraction ที่ 7-10 ภายหลังนำมาทำปฏิกิริยา Acetylation	55
4.8 HMQC spectrum (CDCl_3) ของสาร fraction ที่ 7-10 ภายหลังนำมาทำปฏิกิริยา Acetylation	55

	หน้า
4.9 COSY spectrum (CDCl_3) ของสาร fraction ที่ 7-10 ภายหลังจากนำมามีปฏิกิริยา Acetylation	56
4.10 Chromatogram ของ UV-detector 210 nm (A) และ MS-detector (B) ของสาร fraction 5'-8' เมื่อระบบของตัวทำละลายคือ acetonitrile: H_2O (80:20)	58
4.11 ค่า m/z (M-H) = 753 ของสารกลุ่มที่หนึ่ง ออกที่เวลาประมาณ 2.9 นาที	58
4.12 ค่า m/z (M-H) = 817 ของสารกลุ่มที่สอง ออกที่เวลา 7.2 นาที	59
4.13 ปฏิกิริยา Bromination ของสารสูตรโครงสร้าง (1) และ (2)	60
4.14 Chromatogram ของ UV-detector 210 nm (A) และ MS-detector (B) ของสาร fraction 5'-8' ที่ได้จากปฏิกิริยา Bromination เมื่อระบบตัวทำละลายคือ acetonitrile: H_2O (70:30)	61
4.15 ค่า m/z (M-H) = 1069, 1071, 1073, 1075 และ 1077 ของสารสูตรโครงสร้างที่ (3) ซึ่งออกที่เวลาประมาณ 3.6 นาที	62
4.16 ค่า m/z (M-H) = 1133, 1135, 1137, 1139 และ 1141 ของสารสูตรโครงสร้างที่ (4) ซึ่งออกที่เวลาประมาณ 8.4 นาที	62
4.17 สูตรโครงสร้างของสาร Sulfoquinovosyl diacylglycerol ที่แยกได้จากสาหร่ายสไปรูลินา	63
4.18 ผลของปริมาณ activated charcoal ที่ใช้ในการกำจัดสีต่อ chlorophyll a และ crude lipid	76
4.19 ผลของอัตราส่วน $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ ต่อปริมาณ chlorophyll a และ crude lipid	77
4.20 เปรียบเทียบสีของสารละลาย crude lipid ที่ได้จากการใช้ $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ ในอัตราส่วน 40:60 50:50 60:40 70:30 80:20 และ 90:10 เป็นตัวสกัดตามลำดับ	78
4.21 ^1H NMR (400 MHz) spectrum (CDCl_3) ของสารละลาย lipid ที่ได้จากการนำ crude lipid มาสกัดด้วย $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ ในอัตราส่วน 50:50 โดยปริมาตร	79
4.22 ^1H NMR (400 MHz) spectrum (CDCl_3) ของส่วนที่ไม่ละลายที่ได้จากการนำ crude lipid มาสกัดด้วย $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ ในอัตราส่วน 50:50 โดยปริมาตร	80
4.23 Elution profile ของ hot water extract polysaccharide ที่ผ่าน sepharose 6B column และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 485 นาโนเมตร	81
4.24 Elution profile ของ SHP-F1 ที่ผ่าน sepharose 6B column และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 485 นาโนเมตร	82
4.25 Elution profile ของ SHP-F2 ที่ผ่าน sepharose 6B column และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 485 นาโนเมตร	83

รายการสัญลักษณ์

α	แอลฟา
γ	แกมมา
Δ	เดลต้า
GLA	γ -Linolenic acid
TFA	Total fatty acid
DW	Dry weight
μg	ไมโครกรัม
<i>sn-1</i>	carbon ตำแหน่งที่ 1 ของ glycerol backbone
<i>sn-2</i>	carbon ตำแหน่งที่ 2 ของ glycerol backbone
HSV	Herpes simplex virus
HIV	Human immunodeficiency virus
DNA	Deoxyribonucleic acid
RT	Reverse transcriptases
GC	Gas chromatography
NMR	Nuclear magnetic resonance spectroscopy
HPLC	High performance liquid chromatography
LC-MS	Liquid chromatography-Mass spectroscopy
EC ₅₀	50% effective concentration
IC ₅₀	50% inhibitory concentration

บทที่ 1 บทนำ

1.1 เหตุผลที่จำเป็นต้องมีการวิจัย

ในประเทศไทย โรคเริมซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัส Herpes simplex ยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศ เนื่องจากคนทั่วไปมีอัตราการติดเชื้อค่อนข้างสูง การติดเชื้อเริมเกิดขึ้นได้ทั้งที่ปากและอวัยวะสืบพันธุ์ เชื้อเริม (Herpes simplex virus/HSV) มีอยู่ 2 ชนิด ได้แก่ HSV ชนิดที่ 1 (HSV-1) ซึ่งก่อให้เกิดเริมตามผิวหนังทั่วไปและบริเวณริมฝีปาก ช่องปากเป็นส่วนใหญ่ และ HSV ชนิดที่ 2 (HSV-2) ที่ก่อให้เกิดเริมบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์เป็นส่วนใหญ่ [1, 2, 3] เชื้อไวรัสนี้ติดต่อโดยการสัมผัสโดยตรง มีระยะฟักตัวประมาณ 1-2 สัปดาห์ สำหรับโรคเริมที่อวัยวะสืบพันธุ์ถือเป็นโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ชนิดหนึ่ง จากการสำรวจโดยใช้แอนติบอดีต่อไวรัส Herpes simplex ชนิด 1 และ ชนิด 2 พบว่าประชาชนทั่วไปร้อยละ 60 และ 55 เคยมีการติดเชื้อไวรัสดังกล่าวตามลำดับ [4, 5] ขณะที่ในประเทศสหรัฐอเมริกา มีรายงานว่า มีประชาชนติดเชื้อไวรัสนี้ถึง 60 ล้านคน [6] โดยเริมชนิด primary ที่ปากและที่อวัยวะสืบพันธุ์จะมีโอกาสเกิดโรคซ้ำประมาณร้อยละ 15 และ 70 ตามลำดับ [7, 8] นอกจากนี้โรคงูสวัดซึ่งเกิดจากการติดเชื้อไวรัส Varicella-zoster ก็พบบ่อยด้วยเช่นกัน โดยเฉพาะในประชากรสูงอายุและผู้ป่วยที่ภูมิคุ้มกันบกพร่อง จากข้อมูลของผู้ป่วยที่ได้รับการตรวจรักษาที่สถาบันโรคผิวหนัง กระทรวงสาธารณสุข พบว่าในประเทศไทยมีผู้ป่วยที่เป็นโรคงูสวัดประมาณร้อยละ 0.4 [9] ซึ่งประมาณได้ว่า คนไทยจะเป็นโรคงูสวัดจำนวนหลายหมื่นคนในแต่ละปี [5]

ปัจจุบันยาด้านไวรัสที่ใช้ในการรักษาโรคเริมและงูสวัด ได้แก่ Acyclovir (9-(2-hydroxyethoxy)methylguanine) เป็นสารสังเคราะห์ประเภท acyclic มีชื่อทางการค้าว่า โซวिरากซ์ (Zovirax) เป็นยาที่มีราคาแพงโดยมีทั้งแบบรับประทานและแบบครีมใช้ทาบริเวณที่ติดเชื้อ แต่การบริโภคยานี้ก็เพิ่มขึ้นทุกปีถึงประมาณร้อยละ 20 ต่อปี ในปัจจุบันประเทศไทยมีการใช้ยา acyclovir ปีละมากกว่า 100 ล้านบาท โดยใช้ในรูปของยาทาเฉพาะที่ปีละมากกว่า 30 ล้านบาท [5] และมีผู้ป่วยเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่ได้รับการรักษาด้วย acyclovir เนื่องจากยานี้มีราคาแพงมาก

สาหร่ายสไปรูลินา (*Spirulina platensis*) จัดเป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ที่มีศักยภาพสูงสำหรับผลิตเพื่อการค้า เพราะมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบถึงร้อยละ 60-70 [10] ขณะเดียวกันยังมีสารที่มีประโยชน์ในแง่ของโภชนาการ การแพทย์ สุขภาพ และใช้ในเครื่องสำอาง เป็นต้นว่า รงควัตถุ phycocyanin ที่มีการผลิตในเชิงการค้าในชื่อของ Lina blue [11] นอกจากนี้ยังมีกรดไขมันจำเป็นที่ไม่อิ่มตัว คือ กรดแกมมาลิโนลินิก (γ -Linolenic acid, GLA) ซึ่งในปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์ GLA ออกมาจำหน่ายในท้องตลาดในรูปของเครื่องสำอางและอาหารเสริมสุขภาพจำนวนมาก โดยแหล่งของ GLA ที่สำคัญคือ evening primrose, black currents, red currents, gooseberries และ borage [12] ซึ่งการใช้พืชเป็นแหล่งผลิตจะมีข้อจำกัดด้าน

ฤดูกาลและอัตราการเจริญเติบโตช้า ขณะที่เชื้อราในกลุ่มของ *Mucor* และ *Mortierella* ได้ถูกใช้เป็นแหล่งผลิต GLA เช่นกัน [13] แต่ต้นทุนการผลิตสูงทั้งนี้เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อมีราคาแพงและมีเส้นใยทำให้ควบคุมการผลิตลำบาก ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้สูงที่จะนำสาหร่ายสไปรูลินามาใช้เป็นแหล่งของ GLA ได้อย่างมีประสิทธิภาพเช่นเดียวกัน

เนื่องจาก polysaccharide ที่ผลิตจากแบคทีเรียบางชนิด มีความสำคัญทั้งทางด้านอุตสาหกรรมและการแพทย์ [14, 15] และบางชนิดได้ถูกนำมาใช้ในการพัฒนาสำหรับเป็นวัคซีน แบคทีเรียเพื่อป้องกันการเกิดการติดเชื้อ (infection) โดยพวก encapsulated pathogen แล้ว ยังมีคณะผู้วิจัยกลุ่มอื่นพบว่า calcium spirulan (Ca-SP) ซึ่งเป็น sulfated polysaccharide ในสาหร่ายสไปรูลินามีฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 และ HIV-1 (human immunodeficiency virus type 1) โดยมีค่า IC_{50} เป็น 9.7 ± 0.79 และ 9.3 ± 1.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยพบว่า calcium ion และ sulfate group มีส่วนสำคัญที่ทำให้ polysaccharide มีฤทธิ์ต้านเชื้อดังกล่าว [16] และยังพบว่า aqueous extraction ของสาหร่าย สไปรูลินที่มี polysaccharide เป็นองค์ประกอบอยู่ด้วยมีฤทธิ์ต้านเชื้อ HIV-1 โดยมีค่า EC_{50} อยู่ระหว่าง 0.3 และ 1.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้สารสกัดในส่วนของ water soluble ของสาหร่ายสไปรูลินาที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 ใน HeLa cells โดยสามารถยับยั้งการสังเคราะห์ Specific protein ของ virus และไม่มีผลกระทบต่อการทำงานของโปรตีนใน host cell ในกรณีที่เติมสารสกัดให้กับเซลล์ภายในเวลา 3 ชั่วโมง ก่อนเกิดการ infection [17] Baojiang และคณะ พบว่า polysaccharide จากสาหร่ายสไปรูลินาสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในหนูได้ [18] ขณะที่ Mishima และคณะพบว่า calcium spirulan จากสาหร่ายสไปรูลินาสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ heparanase ในเซลล์เนื้องอกได้ [19] สำหรับในส่วนของ lipid พบว่า สารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Lyngbya lagerheimii* และ *Phormidium tenue* ซึ่งมี sulfolipid เป็นองค์ประกอบอยู่ประมาณร้อยละ 10 มีฤทธิ์เป็นสาร anti-AIDS ใน CEM, MT-2, LDV-7 และ C3-44 cell line [20] ซึ่งสอดคล้องกันกับผลการศึกษาของคณะผู้ทำวิจัยห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีสาหร่าย คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรีที่พบว่า มีสารออกฤทธิ์ต้านไวรัส HSV-1 ในสารสกัดจากสาหร่ายสไปรูลินาทั้งในส่วนของ lipid และ polysaccharide ดังตารางที่ 1.1

ตารางที่ 1.1 ผลการตรวจสอบคุณสมบัติการออกฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส HSV-1 ของ crude lipid และ crude polysaccharide ที่สกัดได้จากสาหร่ายสไปรูลินา

สาร	Cytotoxicity to Vero cell line ($\mu\text{g/ml}$)	IC ₅₀ ต่อ HSV-1 ($\mu\text{g/ml}$)
crude lipid (CHCl ₃ /MeOH:2/1)	>50	15
crude lipid (95% Ethanol)	>50	15
polysaccharide (hot water extract)	>10	2.5
polysaccharide (cold water extract)	>10	2.5

เมื่อพิจารณาถึงเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินาที่ทางกลุ่มของคณะผู้วิจัย ฯ ได้พัฒนาขึ้นนั้นส่งผลให้ต้นทุนการเพาะเลี้ยงสาหร่ายชนิดนี้ถูกลง อีกทั้งในปัจจุบันมีบริษัทเอกชนภายในประเทศจำนวนมากที่ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินาออกจำหน่ายในเชิงการค้าอยู่แล้ว ดังนั้นสาหร่ายสไปรูลินาจึงมีศักยภาพสูงที่จะพัฒนาเป็นวัตถุดิบในการผลิตยาต้านไวรัสเริ่มได้เช่นเดียวกับสมุนไพรพญายอ เมื่อได้ทำการศึกษาถึงสารออกฤทธิ์ต้านไวรัสจากสาหร่ายสไปรูลินาอย่างละเอียดต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากสาหร่ายสไปรูลินาที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HSV-1
2. เพื่อศึกษา stability ของสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HSV-1 ที่สกัดได้จากสาหร่ายสไปรูลินา
3. พัฒนารับยาทาภายนอกจากสารสกัดจากสาหร่ายสไปรูลินาในรูปแบบครีมเพื่อใช้ในการทดลองทางคลินิกในการรักษาโรคเริม

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. เตรียมสารสกัดจากสาหร่ายสไปรูลินาสำหรับนำไปใช้ในการเตรียมตำรับยา

ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินาเพื่อนำมาสกัด crude lipid และ crude polysaccharide จากนั้นคัดเลือกสารสกัดเพียงชนิดเดียว (โดยพิจารณาจากคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 เป็นลำดับแรก ประกอบกับสารสกัดดังกล่าวต้องมีขั้นตอนในการสกัดที่ไม่ซับซ้อนและได้ปริมาณสารสกัดสูง) เพื่อส่งให้กลุ่มวิจัยภาควิชาเภสัชกรรมเป็นผู้เตรียมตำรับยาทาภายนอก

2. วิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากสาหร่ายที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส HSV-1

จากการศึกษาเบื้องต้น (ตารางที่ 1.1) พบว่า สารสกัดทั้งในส่วน crude lipid และ crude polysaccharide ที่ได้จากสาหร่ายสไปรูลินามีฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคเริม ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะเริ่มศึกษาสารสกัดใน 2 ส่วนดังกล่าวก่อน แล้วจึงพิจารณาเลือกศึกษาเพื่อหาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดเพียงชนิดเดียวที่เหมาะสม

2.1 Crude Lipid

เนื่องจากมีรายงานว่า sulfolipid ที่สกัดได้จากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีฤทธิ์เป็นสาร anti-AIDS และ anti-cancer ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่า สารออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 ของ crude lipid อาจอยู่ในส่วนของ sulfolipid ด้วยเช่นกัน ดังนั้นในการวิจัยจะทำการแยก crude lipid จากสาหร่ายสไปรูลินาออกเป็น lipid class ต่าง ๆ ด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี และทำการตรวจหาฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 ในแต่ละ lipid class จากนั้นใช้เทคนิคทาง NMR LC-MS และ GC เพื่อตรวจหาและพิสูจน์สูตรโครงสร้างของสารดังกล่าว

2.2 Crude Polysaccharide

ทำการแยก crude polysaccharide จากสาหร่ายสไปรูลินาออกเป็น fraction ต่าง ๆ ด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี และตรวจหาคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 ของสารในแต่ละ fraction

2.3 กรดแกมมาลิโนลินิก (γ-linolenic acid, C18:3, GLA)

เนื่องจาก GLA เป็นสารออกฤทธิ์ตัวหนึ่งที่มีการกล่าวถึงกันอย่างมาก ในการใช้เป็น anti-inflammatory ซึ่งใน crude lipid ของสาหร่ายสไปรูลินามี GLA เป็นองค์ประกอบถึงร้อยละ 20-30 ของกรดไขมันทั้งหมด ขณะเดียวกันทางห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงสาหร่ายมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ได้ทำการกลายพันธุ์สาหร่ายสไปรูลินาสายพันธุ์ปกติ (สายพันธุ์ C1) ได้สาหร่ายสายพันธุ์ที่ไม่สร้าง GLA คือ สายพันธุ์ I30/1 ดังนั้นจะทำการสกัด crude lipid จากสายพันธุ์ดังกล่าวข้างต้น เพื่อนำไปทดสอบการออกฤทธิ์เป็นสารต้านเชื้อ HSV-1 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ปกติที่มี GLA เป็นองค์ประกอบของ lipid ซึ่งอาจเป็นข้อมูลที่บ่งชี้ได้ว่า GLA มีส่วนช่วยในการต้านเชื้อ HSV-1 หรือไม่

3. การทดสอบความคงตัวของสารสกัดจากสาหร่ายสไปรูลินาที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส HSV-1

ทำการทดสอบ 2 สภาวะ คือ สภาวะเร่ง (อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75 เปอร์เซ็นต์) และอุณหภูมิห้องควบคู่กันไป โดยสุ่มเก็บตัวอย่างของสารสกัดทั้ง 2 สภาวะที่ช่วงระยะเวลาต่าง ๆ มาทดสอบความคงตัวทางเคมี โดยการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในสารสกัดที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 รวมทั้งนำสารสกัดดังกล่าวมาตรวจสอบคุณสมบัติการออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 โดยวิธี colorimetric assay ด้วย

4. การตั้งตำรับยาทาภายนอกของสารสกัดจากสาหร่ายสไปรูลินาในรูปแบบครีม

4.1 Preformulation เป็นขั้นตอนการศึกษาก่อนทำการตั้งตำรับยา ทั้งนี้เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีรวมทั้งคุณสมบัติอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการตั้งตำรับยา

4.1.1 การทดสอบการละลายของสารสกัด lipid จากสาหร่ายโดยใช้หลักการต่าง ๆ เช่น โดยการเติมตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ เช่น น้ำ ethanol และ propylene glycol เป็นต้น โดยการปรับความเป็นกรด-ด่างด้วยบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม และ/หรือโดยการเติมสารลดแรงตึงผิว เช่น Tween 60 และ Cremophore เป็นต้น

4.1.2 การเพิ่มความคงตัวของสารสกัดเมื่ออยู่ในรูปสารละลาย เนื่องจากสารสกัด lipid จากสาหร่ายสไปรูลินารวมทั้งสารอื่น ๆ ในตำรับยามีโครงสร้างที่อาจเกิดปฏิกิริยา hydrolysis และ oxidation ได้ง่าย ดังนั้นเพื่อลดปัญหาดังกล่าวจึงต้องมีการเติมสารที่มีคุณสมบัติช่วยเพิ่มความคงตัวลงไปด้วย

4.2 Formulation การตั้งตำรับยาในรูปแบบครีมโดยใส่สารสกัด lipid จากสาหร่าย

5. การทดสอบความคงตัวของตำรับยาที่ใส่สารสกัด lipid จากสาหร่าย ดำเนินการเช่นเดียวกับการทดสอบความคงตัวของสารสกัดจากสาหร่ายสไปรูลินา

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

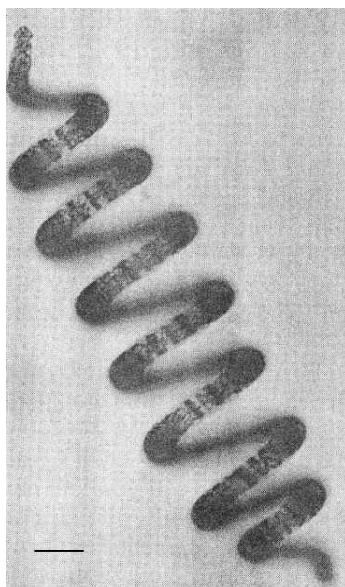
1. ทราบกลุ่มของสารเคมีที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HSV-1 ที่พบในสาหร่ายสไปรูลินา
2. ทราบว่า กรดแกมมาลิโนลินิก (γ-linolenic acid, GLA) ที่พบในสาหร่ายสไปรูลินามีส่วนช่วยให้สารสกัด crude lipid ออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 หรือไม่
3. ทราบสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HSV-1 ที่พบในสาหร่ายสไปรูลินา
4. สามารถเตรียมสารสกัดที่มีความคงตัวสำหรับการตั้งตำรับยา
5. ทราบปัจจัยที่เหมาะสมในการเก็บรักษาสารสกัดจากสาหร่ายสไปรูลินาเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการเตรียมตำรับยาทาภายนอก
6. สามารถตั้งตำรับยาทาภายนอกของสารสกัดจากสาหร่ายสไปรูลินาในรูปแบบครีมที่มีความสวยงาม มีความคงตัว และมีการปลดปล่อยตัวยาที่ดี

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สาหร่ายสไปรูลินา (*Spirulina platensis*)

Spirulina platensis หรือ *Arthrospira platensis* [21] เป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (cyanobacteria) ที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ จัดอยู่ใน Phylum Cyanophyta Family Oscillatoriaceae ลักษณะเป็นเซลล์หลายเซลล์ (multicellular) เรียงต่อกันเป็นสายยาว (filament) และบิดเป็นเกลียวเรียกว่า trichome ดังรูปที่ 2.1 ไม่มี heterocyst เซลล์มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-12 ไมโครเมตร ผนังเซลล์ประกอบด้วย outer membrane และ plasma membrane ซึ่งแยกออกจากกันโดยชั้นของ peptidoglycan เจริญเติบโตโดยการแบ่งเซลล์เท่านั้น ไม่มีนิวเคลียสและคลอโรพลาสต์ รงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงคือ คลอโรฟิลล์ เอ (chlorophyll a) แคโรทีนอยด์ (carotenoid) และไฟโคบิลิโซม (phycobilisome) ที่ประกอบด้วยไฟโคไซยานิน (phycocyanin) และอัลโลไฟโคไซยานิน (allophycocyanin) โดยรงควัตถุเหล่านี้พบอยู่บริเวณ thylakoid membrane [21, 22] ทำหน้าที่ในกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสง สาหร่ายสไปรูลินาพบได้ทั่วไปทั้งในน้ำจืด น้ำกร่อย น้ำเค็ม รวมทั้งทะเลสาบในแอฟริกาและอเมริกาที่มีค่าความเป็นด่างสูง [23]



รูปที่ 2.1 รูปร่างลักษณะของสาหร่ายสไปรูลินา (*Spirulina (Arthrospira) sp.*) [21]

— แสดงขนาด 20 μm

องค์ประกอบทางชีวเคมีเป็นข้อมูลที่บ่งชี้ถึงศักยภาพของสาหร่ายสไปรูลินาได้เป็นอย่างดี จากการที่สาหร่ายสไปรูลินามีปริมาณของโปรตีนสูงถึงร้อยละ 60-70 และมีองค์ประกอบของสารชีวเคมีที่จำเป็นต่อร่างกายมนุษย์อีกหลายชนิด จึงได้ถูกนำมาใช้เป็นอาหารมนุษย์และอาหารสัตว์อย่างแพร่หลาย ตารางที่ 2.1 เปรียบเทียบองค์ประกอบทางชีวเคมีของสาหร่ายสไปรูลินากับสาหร่ายชนิดอื่น

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทางชีวเคมีของสาหร่ายชนิดต่าง ๆ (ร้อยละของน้ำหนักแห้ง) [24]

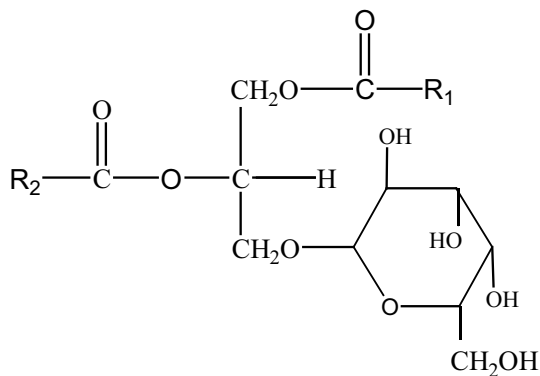
ชนิดสาหร่าย	โปรตีน	ไขมัน	คาร์โบไฮเดรต	กรดนิวคลีอิก
<i>Spirulina platensis</i>	46-50	4-9	8-14	2-5
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	6-7	13-16	2.9-4.5
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	14-22	12-17	4-5
<i>Scedesmus obliquus</i>	50-56	12-14	10-17	3-6
<i>Synechococcus</i> sp.	63.0	11.0	15.0	5.0
<i>Prymnesium parvum</i>	28.45	22-38	25-33	1-2

นอกจากนี้สาหร่ายสไปรูลินายังมีกรดแกมมาลิโนลิค (γ-linolenic acid, C18:3, GLA) ซึ่งเป็นกรดไขมันหลักชนิดหนึ่งในกรดไขมันทั้งหมด โดยมี GLA อยู่ประมาณร้อยละ 20-30 ของกรดไขมันทั้งหมด [25] มีรายงานจำนวนมากที่กล่าวถึงบทบาทของ GLA ทั้งแง่ของโภชนาการ การแพทย์ และสุขภาพ โดย Ciferri ได้เสนอให้นำสไปรูลินามาใช้เป็นแหล่งผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัว โดยเฉพาะ GLA เนื่องจากมีปริมาณของ GLA สูง การเพาะเลี้ยงไม่ยุ่งยาก วงจรชีวิตสั้นและเก็บเกี่ยวได้รวดเร็ว [26] ขณะเดียวกันในสาหร่ายสไปรูลินายังมีรงควัตถุไฟโคไซยานิน ซึ่งจัดเป็นสารเคมีที่มีศักยภาพสูงในเชิงการค้า โดยในปัจจุบันบริษัท Dainippon Ink & Chemicals, Inc ได้ผลิตไฟโคไซยานินภายใต้ชื่อ Lina-blue เพื่อใช้เป็นสีผสมอาหารในประเทศญี่ปุ่น อีกทั้งยังมีการศึกษาผลของไฟโคไซยานินกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายพบว่าสิ่งมีชีวิตที่บริโภครงควัตถุชนิดนี้มีอัตราการรอดจากโรคมะเร็งสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้บริโภค โดยดูจากกิจกรรมของเซลล์เม็ดเลือดขาว [27] และยังสามารถยับยั้งการเกิด inflammation ในหนูได้ [28, 29] มีคุณสมบัติเป็น anti-oxidant และ free radical scavenger ด้วย [30] นอกจากนี้ไฟโคไซยานินบริสุทธิ์ยังมีคุณสมบัติเป็นสารเรืองแสง จึงสามารถนำมาใช้ประโยชน์เป็นสารติดตาม [31, 32] จากที่กล่าวมาข้างต้น เห็นได้ว่าสาหร่ายสไปรูลินาเป็นสาหร่ายที่มีศักยภาพสูงในเชิงการค้า

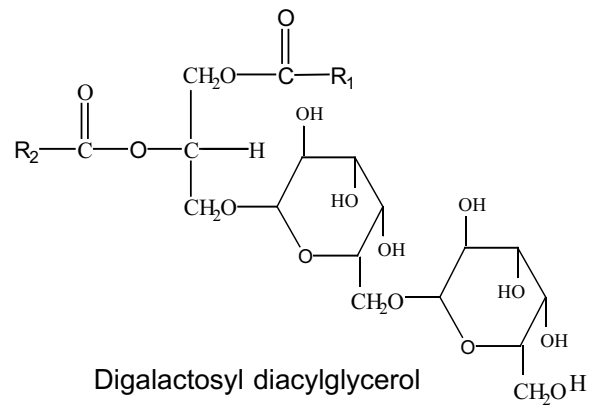
2.2 ลิพิดและกรดไขมันในไซยาโนแบคทีเรีย

ประเภทของ lipid ที่พบในสาหร่ายสไปรูลินาส่วนใหญ่จะอยู่ในรูป glycerolipid ถึงร้อยละ 40 โดยส่วนใหญ่ประกอบไปด้วยกรดไขมัน (fatty acid) ที่จับอยู่กับกลีเซอรอล (glycerol) และมี sulfolipid อยู่ประมาณร้อยละ 2-5 สำหรับ glycerolipid ที่พบในสาหร่ายสไปรูลินาส่วนใหญ่ประกอบด้วย 4 ชนิด (ดังรูปที่ 2.2) คือ

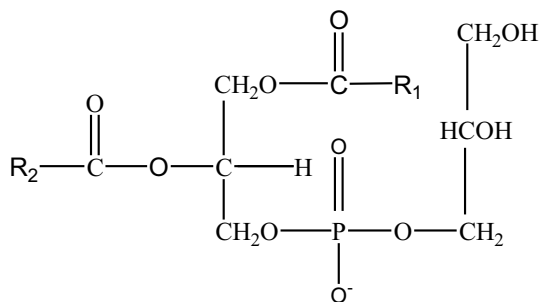
1. Monogalactosyl diacylglycerol (MGDG)
2. Digalactosyl diacylglycerol (DGDG)
3. Phosphatidyl diacylglycerol (PG)
4. Sulfoquinovosyl diacylglycerol (SQDG)



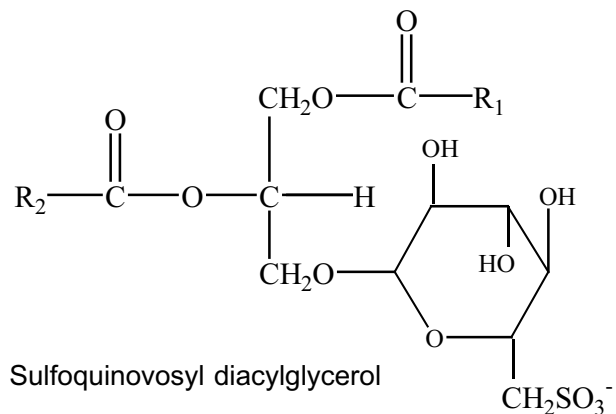
Monogalactosyl diacylglycerol
(MGDG)



Digalactosyl diacylglycerol
(DGDG)



Phosphatidyl diacylglycerol
(PG)



Sulfoquinovosyl diacylglycerol
(SQDG)

รูปที่ 2.2 โครงสร้างโมเลกุลของ glycerolipid ในไซยาโนแบคทีเรีย [33]

R_1 และ R_2 คือ กรดไขมัน

และมีส่วนประกอบย่อยของลิพิด คือ Monoglucosyl diacylglycerol (GlcDG) ซึ่ง glycerolipid เหล่านี้จะกระจายตัวอยู่ในเมมเบรนชนิดต่าง ๆ โดย MGDG มีปริมาณครึ่งหนึ่งของ glycerolipid ทั้งหมด ขณะที่ DGDG SQDG และ PG มีปริมาณแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และสภาวะในการเจริญเติบโต ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2.2 และมี GlcDG ไม่เกินร้อยละ 1 [33]

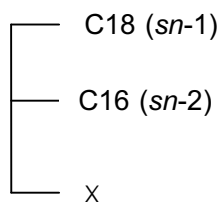
ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบของ glycerolipid ชนิดต่าง ๆ ในสาหร่ายสไปรูลินา [34]

Lipids	mole % of total lipids
MGDG	47
DGDG	16
SQDG	17
PG	20

Glycerolipid เป็นส่วนประกอบของเมมเบรน ส่วนใหญ่อยู่ในรูปของ membrane bilayer ใน thylakoid membrane ของไซยาโนแบคทีเรีย glycerolipid จัดว่ามีความสำคัญต่อการทำงานของโปรตีนที่อยู่บริเวณเมมเบรน นอกจากนี้ glycerolipid ในคลอโรพลาสต์ของพืชชั้นสูงและในไซยาโนแบคทีเรียมีความสำคัญต่อการรักษาสภาพระบบ photosynthetic electron transport โดย SQDG ส่งเสริมการทำงานของ ATP synthase และ MGDG ยึดติดกับ photosystem II (PSII) reaction center complex [35] โดยคุณสมบัติทางกายภาพ (physical property) ของ glycerolipids ขึ้นอยู่กับความไม่อิ่มตัวของกรดไขมันที่จับอยู่กับกลีเซอรอลด้วยพันธะเอสเทอร์ [36]

เนื่องจาก glycerolipid ที่พบในสาหร่ายสไปรูลินา ประกอบไปด้วยน้ำตาลและหมู่ฟอสเฟต จึงทำให้ลิพิดมีลักษณะเป็น amphipathic ดังนั้น ตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการสกัดลิพิดพวกนี้ จึงควรเป็นตัวทำละลายที่มีความเป็นโพลาร์สูง

กรดไขมันที่พบในไซยาโนแบคทีเรีย ได้แก่ palmitic acid (C16:0), palmitoleic acid (C16:1, Δ^9), stearic acid (C18:0), oleic acid (C18:1, Δ^9), linoleic acid (C18:2, $\Delta^{9,12}$), γ -linolenic acid (C18:3, $\Delta^{6,9,12}$), α -linolenic acid (C18:3, $\Delta^{9,12,15}$) และ stearidonic acid (C18:4, $\Delta^{6,9,12,15}$) โดยทั่วไปกรดไขมันในกลุ่ม C18 มีการ esterify ที่ตำแหน่ง sn-1 ของ glycerol ในขณะที่กรดไขมันในกลุ่ม C16 มีการ esterify ที่ตำแหน่ง sn-2 ของ glycerol [33] ดังแสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 ตำแหน่งของกรดไขมันในไตรยาโนแบคทีเรีย

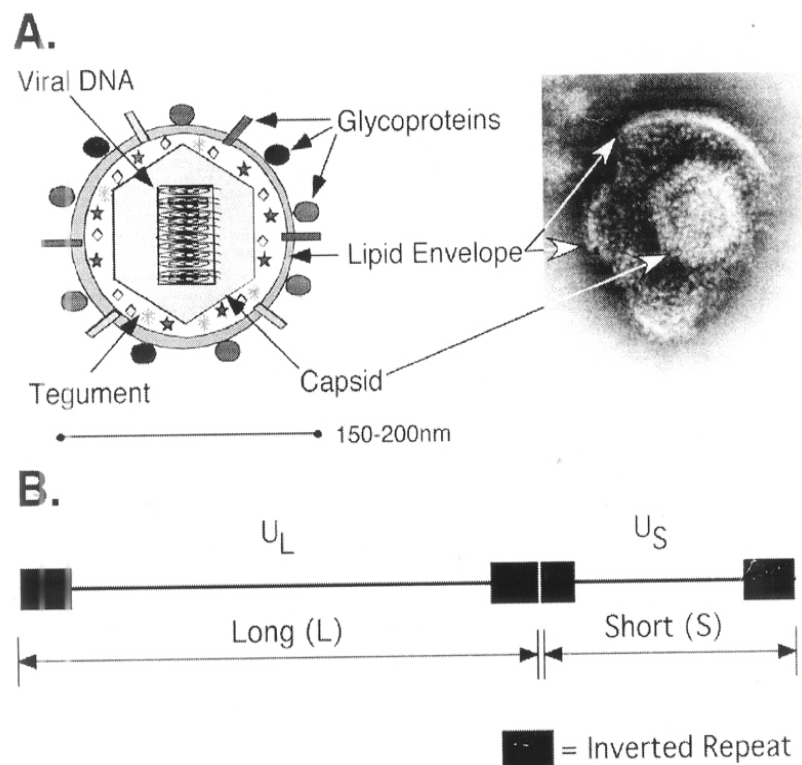
X ส่วนที่เป็น polar head ของลิพิด [33]

กรดไขมันจำเป็นอย่างยิ่งที่มีความสำคัญต่อร่างกายมนุษย์ คือ polyunsaturated fatty acids (PUFAs) โดยเฉพาะกรดลิโนเลอิก (linoleic acid, LA, C18:2), กรดลิโนลินิก (linolenic acid, GLA, C18:3), dihomono- γ -linolenic acid (DGLA, C20:3), arachidonic acid (AA, C20:4) และ eicosapentaenoic acid (EPA, C20:5) ซึ่ง GLA, DGLA, AA และ EPA เป็นสารตั้งต้น (precursor) ของสารคล้ายฮอร์โมนพรอสตาแกลนดิน (prostaglandins, PGs) ซึ่งถูกสังเคราะห์และหลั่งออกมาจากเนื้อเยื่อหลายชนิดในระดับความเข้มข้นต่ำ (1-2 มิลลิกรัม ใน 24 ชั่วโมง) [37] และทำหน้าที่เป็นตัวควบคุม (regulators หรือ modulators) กระบวนการสำคัญต่าง ๆ ภายในเซลล์ เช่น กลไกของแรงดันโลหิต การสังเคราะห์คอเลสเตอรอล และการอักเสบของเซลล์ [38, 39] ไม่ค่อยพบ GLA ในอาหารทั่วไป แหล่งของ GLA ที่สำคัญได้แก่ น้ำมันที่สกัดได้จากเมล็ดของ evening primrose ซึ่งพบ GLA ร้อยละ 8-12 ของกรดไขมันทั้งหมดที่มีอยู่ในน้ำมัน [12, 39] แต่มีข้อจำกัดในการใช้เนื้อที่ในการเพาะปลูกมาก ต้นทุนในการเก็บเกี่ยวสูง ส่วนในรา เช่น *Mortierella* sp. จะมี GLA น้อยกว่าร้อยละ 15 ของกรดไขมันทั้งหมดและเป็นเส้นใยจึงทำให้ควบคุมการผลิตได้ลำบากและมีการปะปนของกรดไขมันชนิดอื่น เช่น stearidonic acid (C18:4) แต่มีกลุ่มวิจัยได้พัฒนาวีธีการสกัดเพื่อเพิ่มปริมาณ GLA ในราชชนิดนี้ [40] สำหรับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิดอื่น ๆ เช่น *Microcystis aeruginosa* มี GLA ประมาณร้อยละ 33 ของกรดไขมันทั้งหมด [41] แต่ไม่เหมาะสำหรับนำมาบริโภคเพราะเป็นที่ทราบโดยทั่วกันว่าสาหร่ายชนิดนี้ผลิตสาร microcystins ซึ่งเป็นสารพิษประเภท heptapeptide [42] ขณะที่ *Synechocystis* PCC 6803 มี GLA ประมาณร้อยละ 13 ของกรดไขมันทั้งหมด [43] ซึ่งมีปริมาณต่ำเมื่อพิจารณาเทียบกับสาหร่ายสไปรูลินา ขณะที่สาหร่ายสไปรูลินามี GLA เป็นกรดไขมันหลักชนิดหนึ่งในกรดไขมันทั้งหมด โดยมีอยู่ประมาณร้อยละ 20-30 ของกรดไขมันทั้งหมดหรือร้อยละ 1.5 ของน้ำหนักแห้ง [25] Ciferri ได้เสนอให้นำสไปรูลินามาใช้เป็นแหล่งผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวโดยเฉพาะ GLA เนื่องจากมีปริมาณของ GLA สูง การเพาะเลี้ยงไม่ยุ่งยาก วงจรชีวิตสั้นและเก็บเกี่ยวได้รวดเร็ว [26] มีรายงานว่า GLA ช่วยในการลดระดับคอเลสเตอรอลได้ดีกว่ากรดลิโนลิก การบริโภค GLA ช่วยบำบัดรักษา

โรคต่าง ๆ เช่น โรคข้ออักเสบ โรคอ้วน โรคหัวใจ และลดระดับคอเลสเตอรอลในผู้ป่วยที่มีระดับคอเลสเตอรอลสูง นอกจากนี้ยังมีการนำ GLA มาใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางด้วย และมีรายงานว่า สามารถใช้ GLA หรือกรดไขมันไม่อิ่มตัวอื่น ๆ ร่วมกับ interferons ในการบำบัดรักษาการติดเชื้อไวรัส โรคเมะเร็ง และอาการอักเสบต่าง ๆ [44]

2.3 Herpes simplex virus (HSV)

Herpes simplex virus จัดอยู่ใน genus *Simplexvirus* subfamily *Alphaherpesvirinae* family *Herpesviridae* ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 150-200 นาโนเมตร มีมากกว่า 80 ชนิด แต่ที่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์มีอยู่ 8 ชนิดด้วยกัน คือ HSV ชนิดที่ 1-8 ขณะที่เชื้อไวรัสซึ่งก่อให้เกิดโรคเริ่มมีอยู่ 2 ชนิด คือ Herpes simplex virus ชนิดที่ 1 (HSV-1) และ Herpes simplex virus ชนิดที่ 2 (HSV-2) โครงสร้างของ HSV virion ประกอบด้วย 4 ส่วนหลัก คือ 1. electron-opaque core ที่ประกอบด้วย viral double-stranded DNA 2. icosahedral capsid 3. intermediate phase หรือ tegument ที่ประกอบด้วย additional viral proteins และ 4. outer membrane viral glycoproteins [45] ดังรูปที่ 2.4

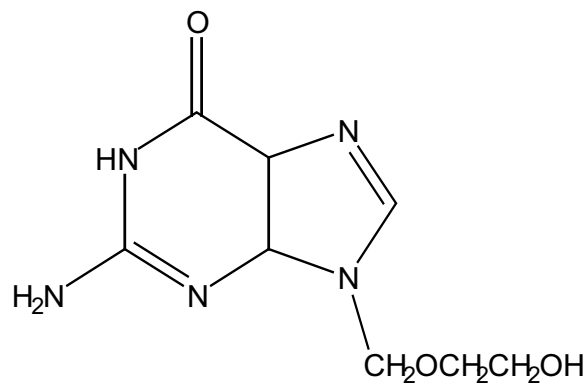


รูปที่ 2.4 โครงสร้างของ HSV virion (A) และ genome organization (B) [45]

Genome ของ HSV มีขนาดค่อนข้างใหญ่ประกอบด้วยประมาณ 150,000 basepairs [46] ซึ่งจะแปลรหัสให้ยีนอย่างน้อยที่สุด 80 ยีน ภายใน genome ประกอบไปด้วย 2 segments ที่เชื่อมต่อกันแบบพันธะโควาเลนต์ คือ ส่วนที่เรียกว่า Long (L) และ Short (S) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ relative length โดยแต่ละ segment ประกอบด้วย sequence regions ที่เรียกว่า U_L หรือ U_S ที่มีลักษณะเป็น inverted repeat sequence [47]

2.4 สารสังเคราะห์ที่ใช้ในรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อ herpes simplex virus

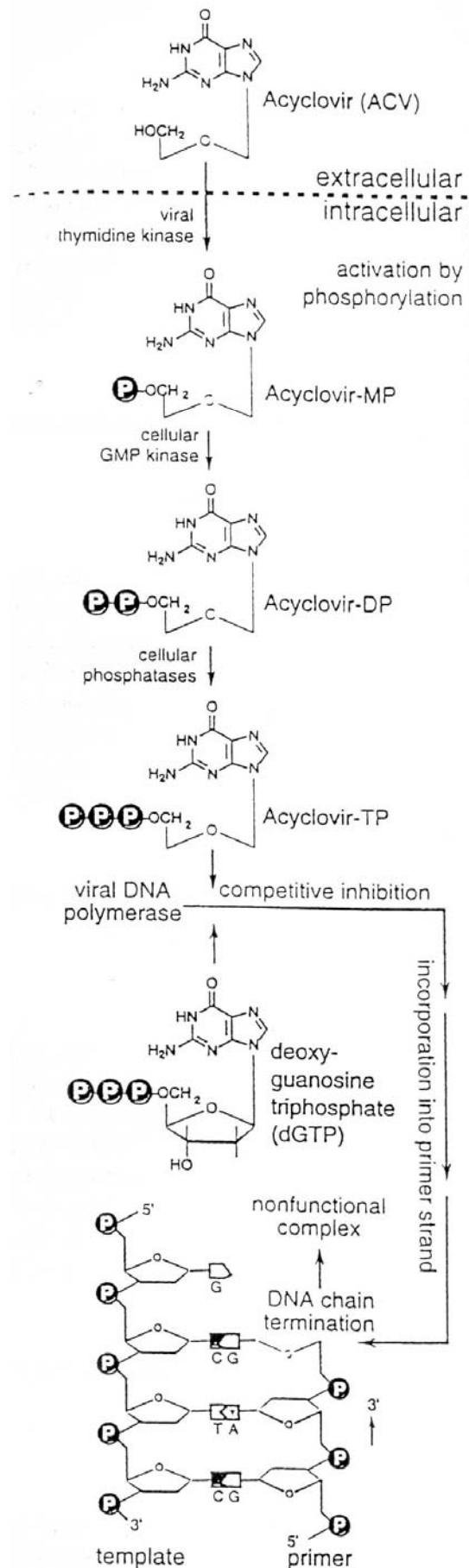
Acyclovir (ACV) เป็นสารสังเคราะห์ประเภท nucleoside analog ชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพและมีความจำเพาะเจาะจงสูงในการยับยั้งการ replication ของ herpes simplex virus ทั้งในเซลล์และในหลอดทดลอง โดยจะยับยั้งเฉพาะการทำงานของ herpes simplex virus ในเซลล์ที่ถูก infect ด้วย HSV เท่านั้น (ไม่มีผลข้างเคียงต่อเซลล์ที่ไม่ถูก infects) [48, 49]



รูปที่ 2.5 โครงสร้าง Acyclovir [50]

การทำงานของ acyclovir แสดงดังรูปที่ 2.6 คือ ขั้นแรก acyclovir ถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูป acyclovir monophosphate (ACV-MP) โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ thymidine kinase [49, 51] จากนั้นจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ acyclovir diphosphate (ACV-DP) และ acyclovir triphosphate (ACV-TP) ด้วยเอนไซม์ guanosine monophosphate (GMP) kinase และ phosphatase ที่อยู่ภายในเซลล์ [52] เมื่อ ACV ถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูป ACV-TP ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ไวต่อการทำปฏิกิริยา ดังนั้นจึงชักนำให้เกิดปฏิกิริยาการยับยั้งแบบแข่งขันกับ deoxyguanosine triphosphate (dGTP) ในการเป็นสารตั้งต้น (substrate) เพื่อจับกับเอนไซม์ DNA polymerase ของ HSV และรวมเข้ากับสาย DNA primer template ทำให้

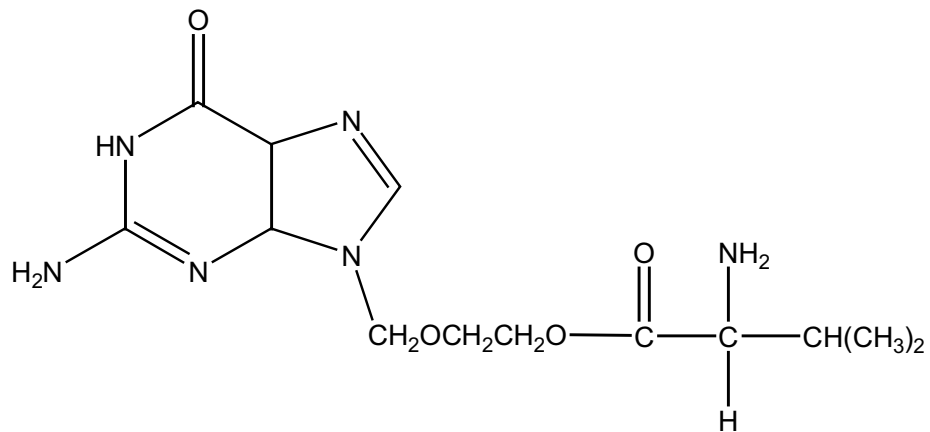
ปฏิกิริยา chain elongation ไม่สามารถดำเนินต่อไปได้เพราะขาดปลาย 3'-hydroxyl ดังนั้นบทบาทของ ACV-TP คือยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase [53, 54]



รูปที่ 2.6 แสดง DNA chain termination เมื่อสาร acyclovir ถูกเปลี่ยนเป็น acyclovir triphosphate [55]

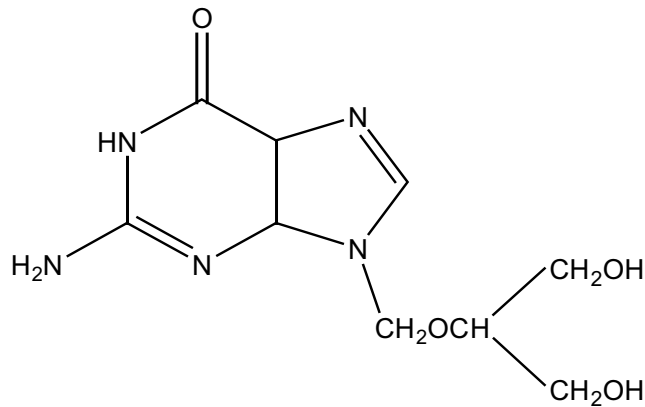
นอกจากนี้ในปัจจุบันได้มีการพัฒนายาตัวนี้ขึ้นมาเป็นตัวยาใหม่ ๆ เช่น Valacyclovir, Ganciclovir, Penciclovir, Famciclovir และ Foscarnet เป็นต้น

Valacyclovir เป็นอนุพันธ์ของ acyclovir ซึ่งได้จากปฏิกิริยา esterification ของ L-valine เข้าที่หมู่ hydroxyl ของ acyclovir [56] ดังรูปที่ 2.7 ภายหลังจากเข้าสู่ร่างกายแล้วยาชนิดนี้จะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของ acyclovir อย่างรวดเร็วโดยการทำงานของเอนไซม์ valacyclovir hydrolase ที่อยู่ในกระเพาะอาหารและตับ valacyclovir ได้รับการพิสูจน์แล้วว่ามีประสิทธิภาพในการรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อโดยเชื้อ herpes simplex virus และ varicella-zostervirus ชื่อทางการค้า คือ Valtrex [57]



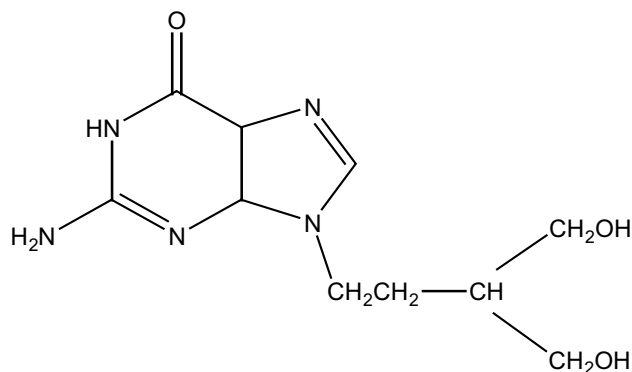
รูปที่ 2.7 โครงสร้าง Valacyclovir [50]

Ganciclovir มีโครงสร้างแตกต่างจาก acyclovir ตรงที่มีการเติมหมู่ hydroxymethyl ที่ตำแหน่งที่ 3 ของ acyclic side chain [58] เมตาบอลิซึมและกลไกการทำงานจะเหมือนกับ acyclovir แต่จะเป็นสารตั้งต้น (substrate) ที่ดีสำหรับเอนไซม์ phosphotransferase และมีครึ่งชีวิต (half life) ที่ยาวนานคือ เมื่อเทียบกับ acyclovir แล้วสำหรับครึ่งชีวิตของ ganciclovir triphosphate อย่างน้อยที่สุดประมาณ 12 ชั่วโมง ขณะที่ acyclovir triphosphate แค่ประมาณ 1-2 ชั่วโมงเท่านั้น [59]



รูปที่ 2.8 โครงสร้างของ Ganciclovir [50]

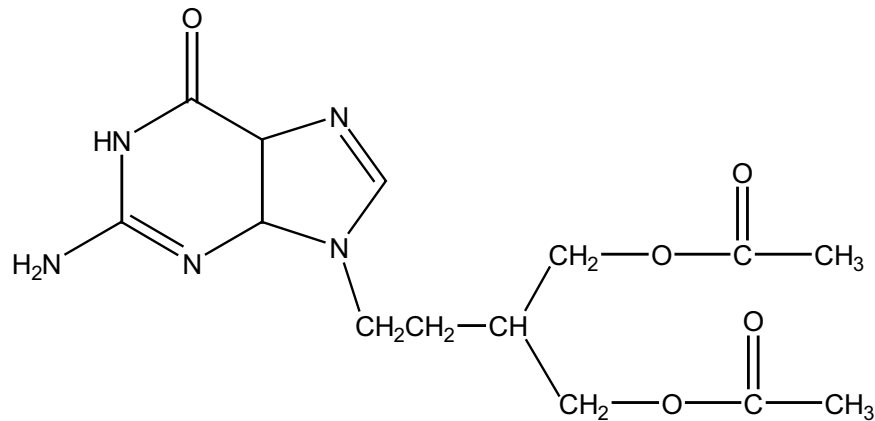
Penciclovir มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับ ganciclovir แตกต่างกันคือ มีการแทนที่ด้วย methylene bridge ether oxygen ในส่วนของ acyclic ribose ของโมเลกุล ดังรูปที่ 2.9 มีเมตาบอลิซึมและกลไกการทำงานเหมือนกับ acyclovir [60] ซึ่งจากการศึกษาในหลอดทดลองพบว่า ยาชนิดนี้สามารถยับยั้งการทำงานของ herpes simplex virus ชนิดที่ 1 และชนิดที่ 2 รวมทั้ง varicella zoster virus ด้วยเช่นเดียวกับ acyclovir [61]



รูปที่ 2.9 โครงสร้างของ Penciclovir [50]

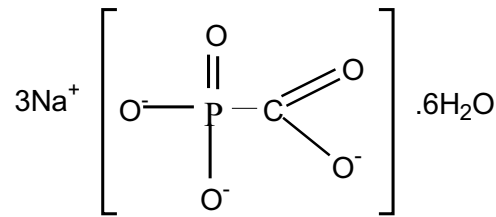
Famciclovir คือ diacetyl-6-deoxy analog ของ penciclovir มีโครงสร้างดังรูปที่ 2.10 ภายหลังจากเข้าสู่ร่างกายแล้วจะถูกเปลี่ยนไปอยู่ในรูป penciclovir โดยปฏิกิริยา deacetylation ในกระเพาะอาหาร เลือดและตับ ข้อดีของยาชนิดนี้คือ ดูดซึมดีกว่าและเมื่ออยู่ในรูปที่พร้อมจะทำปฏิกิริยาคือ penciclovir triphosphate มีครึ่งชีวิต (half-life) ที่ค่อนข้างนาน เมื่อเทียบเปรียบกับยาชนิดอื่น จัดเป็นยาที่มีประสิทธิภาพสูงในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสโดย

รับประทานแค่ 1 ครั้งต่อวันก็เพียงพอ [62] famciclovir มีประสิทธิภาพในยับยั้งทั้ง genital herpes [63] และ herpes zoster infection [64]



รูปที่ 2.10 โครงสร้าง Famciclovir [50]

Foscarnet หรือ trisodium phosphonoformate เป็น organic analog ของ inorganic pyrophosphate มีโครงสร้างดังรูปที่ 2.11 เกาะติดกับ viral DNA polymerase ที่ pyrophosphate-binding site โดยช่วยป้องกันการแตกตัวของ pyrophosphate จาก nucleoside triphosphates และช่วยยับยั้งปฏิกิริยา primer-template extension [65] จากการศึกษาดลองทางคลินิกได้พิสูจน์แล้วว่า foscarnet มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับ ganciclovir ในการใช้รักษาโรคที่เกิดจากเชื้อ cytomegalovirus และมีประสิทธิภาพสูงสำหรับใช้รักษาโรคที่มีสาเหตุจาก herpes simplex viruses ที่ดื้อยา acyclovir [66]



รูปที่ 2.11 โครงสร้างของ Foscarnet [50]

นอกจาก nucleoside analog ดังรายละเอียดที่กล่าวไว้ข้างต้นแล้ว ยังมีสารสังเคราะห์ประเภทอื่น เช่น docosanol มีโครงสร้างเป็น straight chain alcohol ประกอบด้วยคาร์บอน 22 อะตอม สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ herpes viruses ได้ทั้งในหลอดทดลอง (vitro) และในเซลล์ (vivo) [67, 68]

อย่างไรก็ตามเมื่อผู้ป่วยใช้ยาที่สังเคราะห์ขึ้นดังกล่าวข้างต้นเป็นเวลานานติดต่อกัน จะมีผลทำให้เชื้อ Herpes simplex virus หลายๆ สายพันธุ์ดื้อต่อยาขึ้น ๆ [66, 69, 70] จึงทำให้เป็นข้อจำกัดในการใช้ยาดังกล่าวเพื่อรักษาผู้ป่วย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการพัฒนายาตัวใหม่ ๆ รวมทั้งค้นคว้าหาสารประกอบใหม่ ๆ ที่มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อไวรัส [71] สารสกัดที่สกัดได้จากธรรมชาติจัดเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีศักยภาพ

2.5 สารที่มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อไวรัสที่ได้จากไซยาโนแบคทีเรีย

2.5.1 Polysaccharide

ในปี 1993 Hayashi และคณะ [17] เป็นนักวิจัยคณะแรกที่ศึกษาถึงคุณสมบัติในการต้านเชื้อไวรัสของสารสกัดด้วยน้ำร้อนที่ได้จากสาหร่ายสไปรูลินา โดยพบว่า สารสกัดดังกล่าวมีคุณสมบัติออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HSV-1 ได้ในช่วงความเข้มข้น 0.08-50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดนี้จะมีฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 ใน HeLa cells คือ สามารถยับยั้งกระบวนการ viral penetration ที่จะเข้าสู่ HeLa cells รวมทั้งยับยั้งการสังเคราะห์ specific protein ของไวรัสโดยไม่มีผลกระทบต่อการทำงานของโปรตีนใน host cell และไม่มีผลยับยั้งกระบวนการเกาะติดกับเซลล์ของไวรัส (virus attachment to cell) ด้วยในกรณีที่เติมสารสกัดให้กับเซลล์ภายในเวลา 3 ชั่วโมง ก่อนเกิดการ infection นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษายาในเซลล์โดยทดลองกับหนู hamsters ที่ถูก infect ด้วย virus ดังกล่าว พบว่า หนูที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของสารสกัดนี้ในปริมาณ 100 มิลลิกรัม และ 500 มิลลิกรัม ต่อ กิโลกรัมต่อวัน จะมีอัตราการรอดชีวิตสูงขึ้นด้วย

ต่อมาในปี 1996 นักวิจัยกลุ่มนี้ได้นำสารสกัด polysaccharide ดังกล่าวมาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธี gel filtration ด้วยการนำ polysaccharide มาแยกผ่านคอลัมน์ sepharose

6B พบว่า แยกสารได้ 3 fractions คือ SP-H-1, SP-H-2 และ SP-H-3 แต่มีเฉพาะ fraction SP-H-2 เท่านั้นที่มีคุณสมบัติต้านเชื้อไวรัส HSV-1 นำ SP-H-2 มาทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นโดยผ่านคอลัมน์ของ DEAE cellulose ion-exchange และคอลัมน์ sepharose 6B อีกครั้งหนึ่ง ขณะเดียวกันได้ศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของ SP-H-2 พบว่า มีน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) ประมาณ 2.6×10^5 โดยประกอบด้วยน้ำตาล rhamnose, ribose, mannose, fructose, galactose, xylose, glucose, glucuronic acid และ galacturonic acid นอกจากนี้ยังพบซัลเฟตร้อยละ 3.24 แก้วร้อยละ 12.17 และพบแคลเซียมในปริมาณที่ใกล้เคียงกับซัลเฟต แต่ตรวจไม่พบไนโตรเจนแสดงว่าไม่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ ซึ่งจากการศึกษาทำให้ทราบว่า โครงสร้างของโมเลกุลที่มี chelation ของแคลเซียมมีอันประกอบกับหมู่ซัลเฟตมีความจำเป็น ต่อผลในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อนำ polysaccharide ที่ไม่มีแคลเซียม และซัลเฟตมาตรวจสอบคุณสมบัติ cytotoxicity และการต้านเชื้อไวรัส พบว่า สารประกอบทั้งสองเป็นพิษต่อการเจริญของ HeLa cells และคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อไวรัสลดลง จึงเรียก sulfated polysaccharide นี้ว่า calcium spirulan (Ca-SP) โดยสารสกัดดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ virus หลายชนิด เช่น HSV-1, HIV-1, human cytomegalovirus, measles virus, mumps virus และ influenza A virus [72] ต่อมาในปี 1998 Lee และคณะ ได้นำ sulfated polysaccharide มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคทางคอลัมน์โครมาโตกราฟี คือ นำสารมาแยกผ่าน sepharose 6B, DEAE-Toyopearl 650M และ Toyopearl HW-65 ตามลำดับ โดยเมื่อผ่าน sepharose 6B พบว่า สารใน fraction ที่ 2 (SP-TSH-2) มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อ HSV-1 สูงที่สุด (มีค่า IC_{50} 0.78 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม) จากนั้นนำ SP-TSH-2 มาผ่านคอลัมน์ DEAE-Toyopearl 650M ได้สาร 2 ส่วน คือ SP-TSH-2-1 และ SP-TSH-2-2 โดย SP-TSH-2-2 มีค่า IC_{50} 0.68 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม เมื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ Toyopearl HW-65 ได้สาร Ca-SP และวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างพบว่า เป็นสาย polymer ที่ประกอบด้วย rhamnose, 3-O-methylrhamnose (acofriose), 2,3-di-O-methylrhamnose, 3-O-methylxylose, uronic acids และ sulfate โดย backbone ของ Ca-SP เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ glycosidic แบบ 1,3-linked rhamnose และ 1,2-linked 3-O-methylrhamnose units โดยมีหมู่ sulfate แทนที่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ของน้ำตาลและมีหน่วยย่อยของปลายสาย polymer เป็น 2,3-di-O-methylrhamnose และ 3-O-methylxylose ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น nonreducing [73] และเมื่อนำมาวิเคราะห์โครงสร้างโดยใช้เทคนิค Electrospray Ionization Mass Spectrometry พบว่า โพลีแซคคาไรด์ดังกล่าวประกอบด้วย disaccharide 2 ชนิด ซ้ำ ๆ กัน คือ O-rhamnosyl-acofriose และ O-hexuronosyl-rhamnose (aldobiuronic acid) [74]

นอกจากนี้มีการศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ Ca-SP ต่อกิจกรรมการต้านเชื้อไวรัส HSV-1 โดยการแทนที่แคลเซียมด้วยไอออนของโลหะชนิดต่าง ๆ เช่น โซเดียม (Na), โพแทสเซียม (K), แมกนีเซียม (Mg), แมงกานีส (Mn), เหล็ก (Fe), แคดเมียม

(Cd) และ อะลูมิเนียม (Al) เป็นต้น และเปรียบเทียบผลของการเป็นสารยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ HSV-1 พบว่า การแทนที่แคลเซียมไอออนของ Ca-SP ด้วยโซเดียมและโพแทสเซียมไอออนไม่มีผลต่อคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อ HSV-1 นั่นคือ สารมีฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 ใกล้เคียงกับแคลเซียมไอออน ขณะที่การแทนที่ด้วยไอออนของโลหะชนิดอื่น ๆ มีผลให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ HSV-1 ลดลง นอกจากนี้ไอออนของโลหะบางชนิดโดยเฉพาะแคดเมียมและเงินที่เป็น divalent และ trivalent จะทำให้คุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อ HSV-1 ลดลงอย่างจำเพาะเจาะจง [75] ในปี 2002 Corona-Hernandez และคณะ พบว่า hot water extract (HWE) จาก *Spirulina maxima* (*S. maxima*) มีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งการติดเชื้อจากไวรัสหลายชนิด เช่น HSV-2, pseudorabies virus (PRV), humancytomegalovirus (HCMV) และ HSV-1 โดยมีค่า ED₅₀ (50% effective inhibition doses) เท่ากับ 0.069, 0.103, 0.142 และ 0.333 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยสารสกัดดังกล่าวมีคุณสมบัติเด่นชัดในการต้านเชื้อ HSV-2 นอกจากนี้ยังทราบว่าสาร HWE จาก *S. maxima* ยับยั้งขั้นตอนเริ่มต้นของการ infection ของ Herpesvirus โดยมีผลยับยั้งทั้งกระบวนการเกาะติด (absorption) และการเข้าสู่เซลล์ของไวรัส (penetration) [76] ซึ่งผลการทดลองที่ได้คล้ายคลึงกับผลงานวิจัยของ Hayashi และคณะ (ในปี 1993) ที่พบใน *S. platensis* อย่างไรก็ตาม คุณสมบัติในการต้านเชื้อไวรัสของสารสกัดจาก *S. maxima* แตกต่างจากสารสกัดของ *S. platensis* ตรงที่สารสกัดที่แยกได้จาก *S. platensis* จะยับยั้งการ penetration ของ HSV-1 โดยไม่มีผลต่อกระบวนการ virus adsorption ที่จะเข้าสู่ Hela cells แต่สารสกัดที่ได้จาก *S. maxima* จะยับยั้งทั้ง 2 กระบวนการตามที่ได้กล่าวมา นอกจากนี้ได้ทำการแยกเพื่อหาคุณลักษณะของสารสำคัญใน HWE ที่มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อไวรัส HSV-2 ที่สกัดได้จาก *S. maxima* โดยใช้ตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ในการสกัด และนำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์หาคุณสมบัติในการต้านเชื้อไวรัส HSV-2 ดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 คุณสมบัติการต้านเชื้อไวรัส HSV-2 ของสารสกัดหลายชนิดที่ได้จาก *S. maxima* เมื่อใช้ตัวทำละลายต่างชนิดกัน [76]

Solvent	Cytotoxicity ^a ID ₅₀ (mg/ml)	Antiviral activity ^b ED ₅₀ (mg/ml)	Selectivity index (ID ₅₀ /ED ₅₀)
Hexane	2.7	No activity	-
Chloroform	1.95	0.14	13.9
Methanol	6.9	0.13	53
Methanol:water (3:1)	37	0.1	370
Hot water	37	0.3	123

^a Cytotoxicity แสดงในรูปของ ID₅₀ (ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ควมคุมลง 50%)

^b Antiviral activity แสดงในรูปของ ED₅₀ (ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ลด virus infection ของเซลล์ควมคุมลง 50 %)

จากตารางที่ 2.3 พบว่า สารสกัดด้วย hexane ไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-2 ขณะที่สารสกัดของ chloroform, methanol, methanol-water (3:1) และ hot water มีคุณสมบัติออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-2 ได้ใกล้เคียงกัน โดยสารที่ได้จากการใช้ methanol-water (3:1) และ hot water เป็นตัวสกัดนั้นมีข้อดีคือ มีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ นั่นคือ สามารถใช้สารสกัดทั้งสองชนิดได้ในปริมาณที่มีความเข้มข้นสูงถึง 37 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรจึงจะเป็นพิษต่อเซลล์ ท้ายที่สุดสรุปได้ว่า สารสำคัญที่สกัดได้จากสาหร่าย *S. maxima* และมีคุณสมบัติที่ดีในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-2 มีลักษณะเป็นสารที่มีขั้วสูง

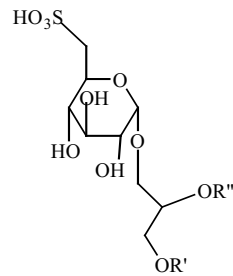
นอกจาก polysaccharide ที่ได้จากสาหร่ายสไปรูลินาจะมีศักยภาพในการเป็นสารต้าน herpes simplex virus แล้ว ยังมีงานวิจัยอื่น ที่แสดงให้เห็นว่า polysaccharide มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อไวรัสชนิดอื่น ๆ ด้วย เช่น Ayehunie และคณะ พบว่า สารสกัดด้วยน้ำร้อนที่ได้จากสาหร่ายสไปรูลินายับยั้งการเพิ่มจำนวน (replication) ของ HIV-1 ใน human T-cell lines, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) และ Langerhans cells (LC) โดยสารสกัดที่มีความเข้มข้นระหว่าง 0.3 และ 1.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลด viral production ใน PBMCs ได้ประมาณร้อยละ 50 ขณะที่ค่า IC_{50} ของสารสกัดนี้ต่อการเจริญเติบโตของ PBMCs อยู่ระหว่าง 0.8-3.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดจะยับยั้งการติดเชื้อ HIV-1 ได้โดยตรงเมื่อป้อนสารสกัดกับ virus ก่อนการเติม human T-cell lines [77] เนื่องจากมีรายงานว่า tannins และอนุพันธ์จำพวก polyphenols ใน polysaccharide ที่พบมากในพืชชั้นสูงมีคุณสมบัติเป็น nonspecific inhibitors สามารถยับยั้ง HIV-1 replication หรือ HIV-1 reverse transcription ได้ [78, 79] คณะผู้วิจัยกลุ่มนี้จึงได้นำเอาสารที่สกัดด้วยน้ำร้อนมาแยก fraction โดยขั้นแรกได้ตกตะกอนแยกเอาส่วนของ polysaccharide ด้วย $H_2O:EtOH$ (1:1) ขณะที่ส่วนของ supernatant นำไปแยก tannins และ polyphenols ออกโดยผ่าน polyamide column ได้สารทั้งหมด 4 fractions และนำสารแต่ละส่วนไปตรวจสอบคุณสมบัติการออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HIV-1 พบว่า ส่วนตะกอนที่มี polysaccharide เป็นองค์ประกอบหลักนั้นยังมีศักยภาพในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HIV-1 ขณะที่ส่วนของ supernatant ซึ่งไม่มี tannins และ polyphenols นั้นมีเฉพาะ fraction ที่ใช้ H_2O และ $H_2O:methanol$ (1:1) เป็นตัวชะเท่านั้นที่มีคุณสมบัติออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HIV-1 โดยอีก 2 ส่วนที่ใช้ methanol เป็นตัวชะนั้นไม่มีฤทธิ์ จึงสรุปว่า สารสกัดด้วยน้ำจากสาหร่ายสไปรูลินามีคุณสมบัติเป็น antiretroviral ที่มีศักยภาพและน่าสนใจในการนำไปทดลองใช้ในทางคลินิก [77]

ขณะที่ Mixhima และคณะ พบว่า Ca-SP ที่สกัดได้จากสาหร่ายสไปรูลินาสามารถยับยั้งการเกิด tumor invasion ของ B16-BL6 melanoma, Colon 26 M3.1 carcinoma และ HT-1080 fibrosarcoma cells รวมทั้ง metastasis ด้วย โดยช่วยป้องกันการ adhesion และ migration ของ tumor cell ต่อ laminin substrate และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ heparanase ในการย่อย heparan sulfate โดยคาดว่า Ca-SP จะยึดอยู่กับ laminin receptors

เช่น integrins และ 67-kDa protein ที่บริเวณผิวของ tumor cell และชักนำให้เกิดการยับยั้งกระบวนการ adhesion และ invasion ของ tumor cell [19] นอกจากนี้ Ca-SP และ Sodium spirulan (Na-SP) ของสาหร่ายสไปรูลินายังมีคุณสมบัติเป็น antithrombin โดยช่วยเร่งการทำงานของ heparin cofactor II (HC II) ซึ่งเป็น plasma protein ที่มีหน้าที่ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ thrombin ใน coagulation pathway [80, 81]

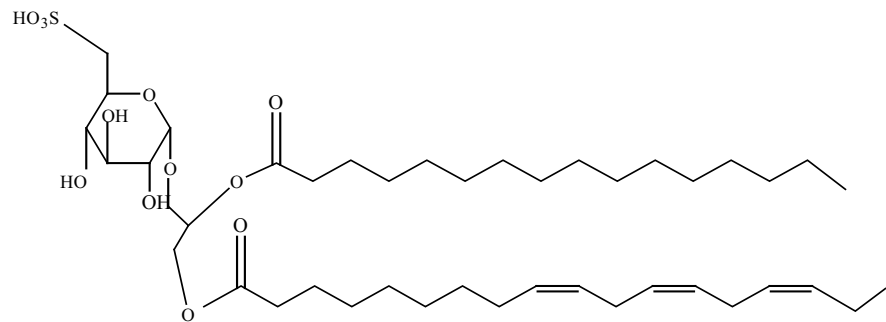
2.5.2 Lipid

ในปีค.ศ. 1989 Gustafson และคณะ [20] ได้พัฒนาเทคนิค tetrazolium-based microculture assay เพื่อใช้คัดเลือกสารสกัดจาก marine cyanobacteria 2 ชนิด คือ *Lyngbya lagerheimii* และ *Phormidium tenue* (สายพันธุ์ CN-2-1) ที่มีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งเชื้อ HIV-1 ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเอดส์ จากการศึกษาครั้งนี้ได้ค้นพบสารประกอบ glycolipid 4 ชนิด ที่มีหมู่ sulfonic acid เป็นองค์ประกอบโดยแทนที่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 6 ของน้ำตาล และมีโครงสร้างเป็น α -linked hexapyranose backbone ดังรูปที่ 2.12 โดยสารออกฤทธิ์ 2 ชนิดที่แยกได้จาก *L. lagerheimii* มีโครงสร้างดังสารประกอบรูปที่ 1 และ 2 ขณะที่สารสกัดของสาหร่าย *P. tenue* มีโครงสร้างดังสารประกอบรูปที่ 3 และ 4 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังรายงานอ้างถึง sulfolipid ที่ได้จากไซยาโนแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ด้วย เช่น *Phormidium cebennse*, *Oscillatoria raciborskii*, *Scytonema burmanicum*, *Calothrix elenkinii* และ *Anabaena variabilis* ซึ่งพบว่ามีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งเชื้อ HIV-1 เช่นกัน



FATTY ACID ESTERS

	R'	R''
1	18:3	16:0
2	18:2	16:0
3	18:1	16:0
4	16:1	16:0

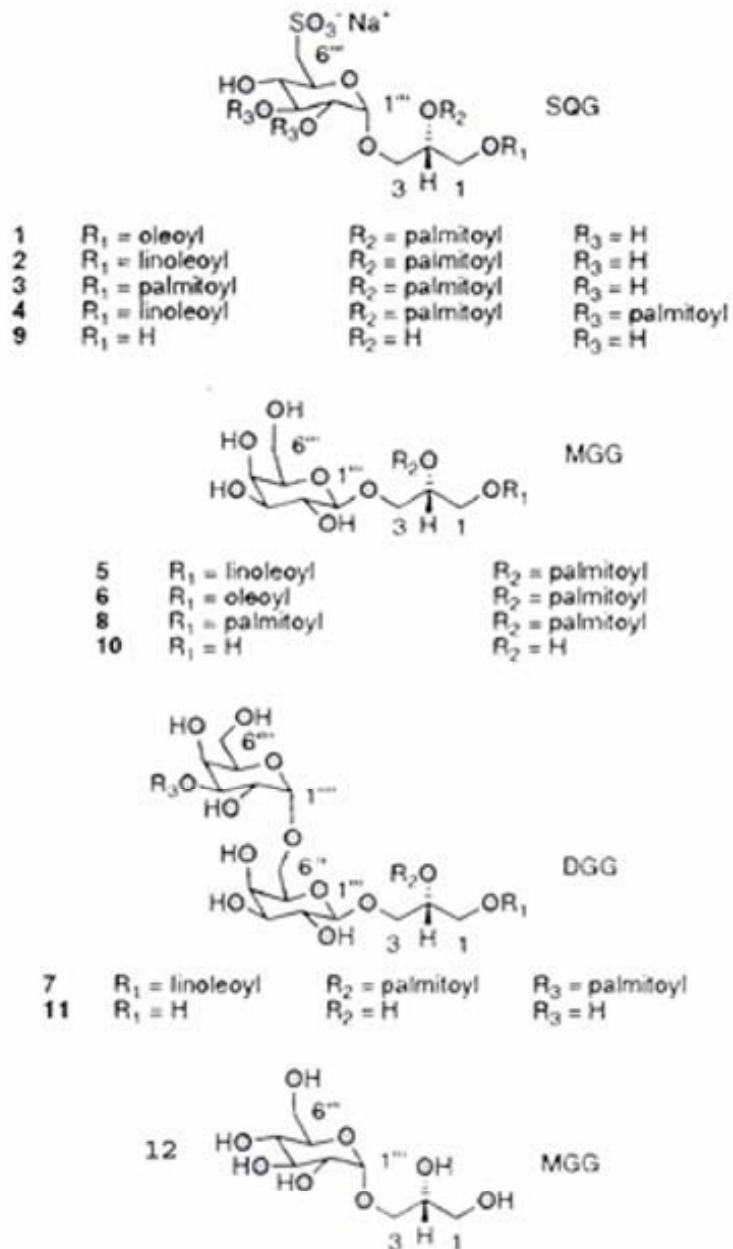


1

รูปที่ 2.12 โครงสร้างของสาร sulfolipids ที่แยกได้จากสาหร่าย *L. lagerheimii* และ *P. tenue* รูปด้านบนแสดงโครงสร้างของสาร sulfolipids โดย R' และ R'' แทน fatty acid esters ขณะที่รูปด้านล่างแสดงโครงสร้างสาร sulfolipid ชนิดที่ 1 ซึ่ง R' ถูกแทนที่ด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่ประกอบด้วยพันธะคู่ในตำแหน่งจำเพาะ 3 ตำแหน่ง [20]

ต่อมาในปี 1997 Reshef และคณะ ได้แยกสาร diacylated sulfoglycolipids 5 ชนิด จากไซยาโนแบคทีเรีย *Scytonema* spp. (TAU strain SL-30-1-4) และ acylated diglycolipids 4 ชนิด จาก *Oscillatoria raai* (TAU strain IL-76-1-2) พบว่า สารประกอบเหล่านี้มีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HIV-1 RT polymerase โดย sulfoglycolipid 4 ชนิด มีศักยภาพสูงในการเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าวคือ ที่ความเข้มข้นสูงสุด 10 ไมโครโมล (μ M) จะสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HIV-1 RT polymerase ได้เกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ glycolipid อีก 4 ชนิด มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ RT DNA polymerase ร้อยละ 65 42 33 และ 8 ตามลำดับ [82] โดยพบว่า สารที่สกัดได้มีปฏิกิริยายับยั้งคล้ายคลึงกับผลของสาร sulfoglycolipids ที่แยกได้จากสาหร่าย *L. lagerheimii* และ *P. tenue* [20] ขณะเดียวกัน Loya และคณะ [83] ได้สกัดสารประเภท lipophilic จากไซยาโนแบคทีเรีย 5 ชนิด คือ *Oscillatoria raai* (TAU strain IL-76-1-2), *Scytonema* sp. (TAU strain SL-30-1-4), *Oscillatoria trichoides* (TAU IL-104-3-2), *Oscillatoria limnetica* และ *Phormidium tenue* (TAU IL-144-1) โดยสารที่สกัดได้ประกอบด้วย sulfoglycolipids (สารประกอบที่ 1-4) glycolipids (สารประกอบที่ 5-8) และสารประกอบที่ 9-11 ซึ่งได้มาจากการนำสารประกอบที่

4 5 และ 7 มาทำปฏิกิริยา hydrolysis รวมทั้งสารประกอบที่ 12 ซึ่งสังเคราะห์ขึ้น ดังรูปที่ 2.13 และพบว่า สารประกอบแต่ละชนิดมีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase และ RNase H ดังตารางที่ 2.4



รูปที่ 2.13 โครงสร้างของ sulfoglycolipids (สารประกอบที่ 1-4) glycolipids (สารประกอบที่ 5-8) สารที่ได้จากปฏิกิริยา hydrolysis (สารประกอบที่ 10-11) และสารสังเคราะห์ (สารประกอบที่ 12) ที่สกัดได้จากไซยาโนแบคทีเรีย 5 ชนิด [83]

ตารางที่ 2.4 ผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase และ RNase ของ HIV-1 โดยสาร sulfoglycolipids glycolipids และอนุพันธ์ต่าง ๆ [83]

Compound	DNA polymerase ^a		RNase H ^b
	IC ₅₀	IC ₉₀	% of initial enzymatic activity
1	0.024 ± 0.003	0.076 ± 0.002	66 ± 7
2	0.077 ± 0.003	0.280 ± 0.80	100
3	0.112 ± 0.023	0.465 ± 0.025	45 ± 4
4	2.95 ± 0.15	14 ± 1.0	100
5	38 ± 4	> 100	100
6	65 ± 5.2	>> 100	100
7	99.4 ± 16.9	>> 100	100
8	> 100	>> 100	100
9	75 ± 3	>> 100	NT ^c
10	>> 100	NA ^c	NT
11	>> 100	NA	NT
12	>> 100	NA	NT

^a ค่า IC₅₀ และ IC₉₀ ความเข้มข้นที่ยับยั้งร้อยละ 50 และ 90 ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์ตอนเริ่มต้น และทุกข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ครั้ง มีหน่วยเป็นไมโครโมล (μM)

^b RNase H activity วิเคราะห์เมื่อมีการเติม inhibitor ที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครโมล โดยค่า enzymatic activity คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ของตัวควบคุมที่ไม่ได้เติม inhibitor

^c NA = not applicable; NT = not tested

โดยมีสมมุติฐานว่า การที่สารประกอบดังกล่าวสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HIV-1 RT ได้นั้นมีอยู่ด้วยกัน 3 สมมุติฐาน คือ 1. สารประกอบยับยั้งทั้งกิจกรรมของเอนไซม์ DNA polymerase และ RNase H 2. สารเลือกยับยั้งเฉพาะการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase โดยไม่มีผลต่อ RNase H หรือมีผลกระทบเพียงเล็กน้อยเท่านั้น 3. สารประกอบนั้นยับยั้งเฉพาะเอนไซม์ RNase H โดยไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ DNA polymerase ของ HIV-1 แต่อย่างใด จากการศึกษพบว่า sulfoglycolipids (สารประกอบที่ 1-4) จัดอยู่ใน

สมมุติฐานที่ 2 คือ ยับยั้งเฉพาะการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ขณะที่สารจำพวก glycolipids (สารประกอบที่ 5-8) ไม่มีคุณสมบัติในการยับยั้งทั้ง DNA polymerase และ RNase H แสดงให้เห็นว่าหมู่ sulfonic acid ที่เป็นองค์ประกอบของ sulfoglycolipid นั้นเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้สารประกอบนี้มีศักยภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase นอกจากนี้ยังได้วิเคราะห์หาพารามิเตอร์ที่สำคัญในโครงสร้างของ sulfoglycolipid (สารประกอบที่ 1-3) ที่จำเป็นต่อคุณสมบัติการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase โดยนำสารประกอบทั้งสามมาทำปฏิกิริยา hydrolyzed fatty acid ได้เป็นสารประกอบที่ 9 พบว่า สารนี้จะคุณสมบัติในการยับยั้ง DNA polymerase ลดลง คือ มีค่า IC_{50} เป็น 75 ไมโครโมล นั่นคือ มีค่าเพิ่มขึ้น 3000 ถึง 700 เท่าของสารประกอบเดิม อย่างไรก็ตามพบว่า การเปลี่ยนแปลงของ acyl chain group เช่น ความยาว และ degree ของการ saturation ไม่มีผลต่อคุณสมบัติในการยับยั้งแต่อย่างใด ขณะเดียวกันเพื่อพิสูจน์ถึงความสำคัญของหมู่ sulfonic acid ต่อคุณสมบัติการเป็นออกฤทธิ์เป็นสาร anti HIV RT จึงได้สังเคราะห์สารประกอบ 1-O-(α -D-glucopyranosyl)glycerol (สารประกอบที่ 12) ซึ่งไม่มีอนุพันธ์ของ sulfonate เป็นองค์ประกอบ พบว่าสารประกอบนี้ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ของ HIV-1 RT ได้ ในทำนองเดียวกันกับสารประกอบที่ 10 และ 11 คือ monogalactopyranosyl glycerol และ digalactopyranosyl glycerol ซึ่งไม่มีหมู่ sulfonic acid เป็นองค์ประกอบก็ไม่มีคุณสมบัติดังกล่าวด้วยเช่นกัน นอกจากนี้ยังพบว่า การแทนที่หมู่ hydroxyl 2 หมู่ บนโมเลกุลของน้ำตาลด้วยหมู่ palmitoyl มีผลทำให้ความสามารถในการยับยั้งเชื้อไวรัสดังกล่าวลดลงอย่างจำเพาะเจาะจง จากตารางที่ 2.4 เห็นได้ว่า สารประกอบโครงสร้างที่ 1 มีศักยภาพในการยับยั้ง HIV-1 RT สูงสุด นอกจากนี้ยังมีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์เป็นสารยับยั้งเชื้อ HIV-2 RT ด้วย โดยมีค่า IC_{50} ที่ค่อนข้างต่ำคือ 34 นาโนโมล สรุปได้ว่า ทั้ง sulfonic acid และ fatty acid ester side chain มีผลต่อการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ นั่นคือ ถ้าโมเลกุลของสารไม่มี sulfonic acid เป็นองค์ประกอบ สารดังกล่าวจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ HIV-1 ลดลง และในทำนองเดียวกันถ้า fatty acid side chain เกิดปฏิกิริยา hydrolysis ก็จะทำให้การยับยั้งเอนไซม์ HIV RT ลดลงด้วยเช่นเดียวกัน สมมุติฐานของกลไกในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HIV RT คือ หมู่ lipophilic จะทำปฏิกิริยากับ hydrophobic core ของเอนไซม์ ขณะที่ประจุลบของ sulfonic acid จะทำปฏิกิริยากับประจุบวกของ side chains บนเอนไซม์ โดยคาดว่า sulfoglycolipids อาจมีลักษณะเหมือนกับ nonnucleoside RT inhibitors (NNRTIs) ที่มีคุณสมบัติเป็น RT inhibitors โดยจะทำปฏิกิริยากับ hydrophobic amino acid pocket ของ HIV-1 RT ที่อยู่ใกล้กับ active site ของ DNA polymerase domain [84, 85]

2.5.3 สารประกอบอื่น ๆ

นอกจากนี้ยังมีสารอื่น ๆ อีกที่สกัดได้จากไซยาโนแบคทีเรียและมีคุณสมบัติเป็นสารต้านเชื้อไวรัส เช่น cyanovirin-N (CV-N) [86] เป็นสารสกัดด้วยน้ำซึ่งแยกได้ครั้งแรกจาก *Nostoc ellipsosporum* โดยใช้เทคนิค bioassay-guided fractionation [87] cyanovirin-N มีขนาด 11 –kDa เป็นเปปไทด์ที่มีคุณสมบัติต้านเชื้อไวรัส ประกอบไปด้วย 101 amino acid และมีสูตรโมเลกุล คือ $C_{467}H_{737}N_{133}O_{164}S_4$ [88, 89] โดยที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ สารนี้สามารถป้องกันการเพิ่มจำนวน (replication) ของ retroviruses รวมทั้ง HIV-1 และ HIV-2 ด้วย ซึ่งมีนักวิจัยหลายกลุ่มได้ทำการศึกษาถึงโครงสร้างและกลไกในการทำงาน (mechanism of action) ของสารชนิดนี้ ในปี 1996 McMahon และคณะ เป็นกลุ่มแรกที่ตั้งสมมุติฐานถึงกลไกการทำงานของ cyanovirin-N ในการยับยั้งการทำงานของเชื้อ HIV ว่า cyanovirin-N จะทำปฏิกิริยากับ virus's surface envelope glycoprotein gp120 ต่อมาในปี 1998 Mariner และคณะ [90] พบว่า cyanovirin-N ไม่ได้ยับยั้งการยึดจับของ sCD4-receptor กับ HIV-1 lysates แต่จะยับยั้งการยึดเกาะของ HIV-1 virions กับ target T-cell lines ท้ายที่สุดจึงสรุปว่า cyanovirin-N จะทำลายขั้นตอนการ fusion และการยึดเกาะของ virus กับ target cells ขณะเดียวกันมีรายงานว่าพบสารดังกล่าวนี้ในสาหร่ายสีโปรคลีนาเช่นกัน โดยพบว่ามีผลยับยั้งเชื้อ HIV หลายสายพันธุ์แบบผันกลับไม่ได้ โดยไปยับยั้งกระบวนการ cell-to-cell และ virus-to-cell fusion [91]

ขณะที่ Lau และคณะ [92] ได้ทำการศึกษาในหลอดทดลอง (in vitro) โดยนำสารสกัด lipophilic และ hydrophilic ที่ได้จากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมากกว่า 900 สายพันธุ์ มาศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ reverse transcriptases ของเชื้อ avian myeloblastosis virus (AMV) และ HIV-1 พบว่า สารที่สกัดด้วยน้ำของสาหร่าย 18 สายพันธุ์ หรือคิดเป็นร้อยละ 2 ของสาหร่ายกลุ่มนี้มีคุณสมบัติยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าว และสรุปว่า สารสกัดที่ได้จากสาหร่าย 18 สายพันธุ์นี้ ประกอบด้วยสารสำคัญมีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ reverse transcriptase ของ AMV และ HIV-1

2.6 สารที่มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อไวรัสที่ได้จากสาหร่ายและสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ

นอกจากไซยาโนแบคทีเรียแล้ว สารสกัดที่ได้จากสาหร่ายชนิดอื่น ๆ ก็มีรายงานถึงคุณสมบัติในการต้านเชื้อไวรัสเช่นเดียวกัน เช่น สารสกัดด้วยน้ำร้อนจากสาหร่ายสีน้ำตาล *Sagassum horneri* (Turner) C. Agardh. พบว่า sulfated polysaccharide ที่มีน้ำตาล fucose เป็นองค์ประกอบหลัก มีศักยภาพในการยับยั้งกิจกรรมของเชื้อ HSV-1, human cytomegalovirus และ HIV-1 (Molt-4/HTLV-IIIB cells) [93] ขณะที่สารสกัดด้วยน้ำจากสาหร่ายทะเลสีแดง *Nothogenia fastigiata* พบว่า สารใน fraction ที่ 6 ซึ่งประกอบด้วย sulfated xylomann มีคุณสมบัติในการยับยั้งการ replication ของ HSV-1 โดยมีค่า IC_{50} 13.5

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร [94] carrageenans และอนุพันธ์ที่สกัดแยกได้จากสาหร่ายสีแดง *Gigartina skottsbergii* มีศักยภาพเป็นสารยับยั้งเชื้อ herpes viruses ขณะที่ sulfated galactan ที่มี molecular weight ต่ำ (2800 Da) ที่แยกได้จากสาหร่ายสีแดง *Cryptopleura ramosa* มีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้ง HSV-1 และ HSV-2 replication ใน vero cells โดยมีค่า IC_{50} อยู่ระหว่าง 1.6 – 4.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร [95] รวมทั้ง sulfated galactans ที่ได้จากสาหร่ายทะเล *Bostrychia montagnei* ก็มีคุณสมบัติในการยับยั้ง HSV replication ด้วยเช่นเดียวกัน [96]

ในปี ค.ศ. 1998 Ohta และคณะ พบว่า สารสกัด 6-Sulfo- α -D-quinovopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3')-1',2'-diacylglycerol ที่ได้จากสาหร่ายทะเลสีแดง *Gigartina tenella* มีศักยภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ในสิ่งมีชีวิตจำพวก eukaryote และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HIV-RT-1 โดยประสิทธิภาพในการยับยั้งขึ้นอยู่กับ dose [97] นอกจากนี้สารประกอบ sesquiterpene hydroquinones 2 ชนิด คือ peyssonol A และ peyssonol B ที่แยกได้จากสาหร่ายทะเลสีแดง *Peyssonelia* species พบว่า สารประกอบทั้งสองชนิดมีศักยภาพเป็นสารยับยั้ง RNA-directed DNA synthesis ของเอนไซม์ RTs ของเชื้อ HIV-1 และ HIV-2 โดยกลไกในการทำงานคาดว่าสาร peyssonol A และ peyssonol B จะขัดขวางการทำงานของเอนไซม์โดยยึดเกาะกับเอนไซม์ reverse transcriptase โดยตรงทำให้เกิดเป็น template primer [98]

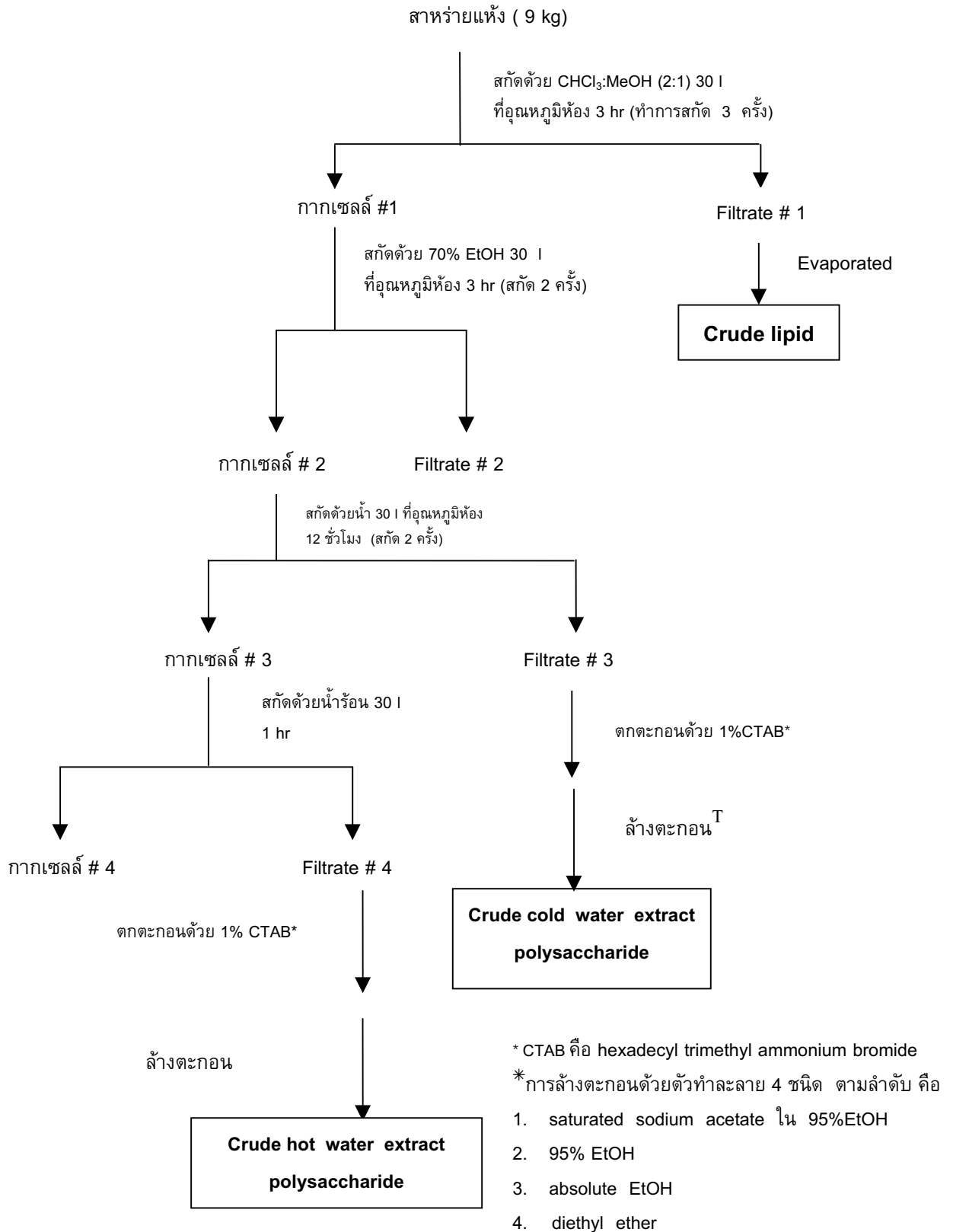
นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงสารสกัดอีกหลายชนิดที่ยังไม่ทราบโครงสร้างของสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส เช่น ในปี 1996 Hayashi และคณะได้แยกสารสกัดจากสาหร่าย 49 ชนิด และนำมาตรวจหาคุณสมบัติในการต้านเชื้อ HSV และ HIV พบว่า สารสกัดด้วยน้ำจำนวน 25 ชนิด มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อ HSV ซึ่งในจำนวนนี้มีสารสกัด 4 ชนิด ที่มีศักยภาพสูง โดยมีค่า selective index > 1000 ขณะที่สารสกัดอีก 8 ชนิด มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อ HIV [99] Cardellina และคณะ พบว่า ประมาณร้อยละ 15 ของสารสกัดด้วยน้ำที่ได้จากพืช ไชยาโนแบคทีเรีย สาหร่าย และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่อาศัยอยู่ในทะเล แสดงคุณสมบัติในการเป็นสารยับยั้งเชื้อ HIV [100]

มีรายงานว่าสาร anionic polysaccharide ที่แยกได้จากสมุนไพรรจีน *Prunella vulgaris* มีคุณสมบัติออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 และ HSV-2 [101] ขณะเดียวกันเมื่อนำสารสกัดด้วยน้ำที่ได้จากสมุนไพรรจีนอีกชนิดหนึ่งคือ *Plantago major* มาทำให้บริสุทธิ์พบว่าสารดังกล่าวคือ caffeic acid มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อ HSV-1 (มีค่า EC_{50} เท่ากับ 15.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ HSV-2 (มีค่า EC_{50} เท่ากับ 87.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จากการทดลองนี้สรุปได้ว่า สารบริสุทธิ์ของ *P. major* ที่มีคุณสมบัติต้านเชื้อไวรัสส่วนใหญ่แล้วเป็นสารประกอบจำพวก phenolic [102]

สารสกัดด้วยน้ำที่ได้จากสมุนไพรไทยหลายชนิดมีคุณสมบัติในการยับยั้งทั้งเชื้อไวรัส HSV-1 และ HSV-2 เช่น Yoosook และคณะ [103, 104] ได้แยกสารสกัดด้วยน้ำจากต้น บัวบก *Centella asiatica* L. และสมุนไพรอีก 2 ชนิด คือ *Maclura cochinchinensis* Cornor, และ *Mangifera indica* L. โดยใช้เทคนิคทาง plaque inhibition assay ในการตรวจวัดคุณสมบัติในการต้านเชื้อไวรัสของสารสกัด จากนั้นยืนยันผลการทดลองด้วยเทคนิค yield reduction assay พบว่า สารสกัดที่ได้ทั้ง 3 ชนิด ออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 โดยมีค่า ED₅₀ เป็น 362.40 20.19 และ 23.94 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีคุณสมบัติต้านเชื้อ HSV-2 ที่ค่า ED₅₀ เท่ากับ 298.84 68.32 และ 31.83 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ [103] นอกจากนี้ยังได้ศึกษาถึงคุณสมบัติของสารสกัดจากใบของต้นเสลดพังพอนตัวผู้ (*Barleria lupulina* Lindl) และต้นพญาายอ (*Clinacanthus nutans* (Burm. F.)) ในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-2 โดยใช้เทคนิค plaque inhibition assay และทำการทดสอบกับเชื้อ HSV-2 จำนวน 6 สายพันธุ์ คือ HSV-2 (G) ได้มาจาก Culture Collection (MD, USA) ขณะที่อีก 5 สายพันธุ์ คือ HSV-2 (#203), HSV-2 (#333), HSV-2 (#388), HSV-2 (#408) และ HSV-2 (#477) แยกได้จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อ genital herpes พบว่า สารสกัดของ *B. lupulina* สามารถยับยั้งการทำงานของเชื้อ HSV-2 ทั้ง 5 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่ติดเชืวดังกล่าวได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเชื้อ HSV-2 (G) ได้ ขณะที่สารสกัดของ *C. nutans* ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ HSV-2 ทั้ง 6 สายพันธุ์ได้ ซึ่งจากข้อมูลที่ได้อาจนำไปใช้พัฒนายาที่มีคุณสมบัติเป็น anti-herpes จากสมุนไพร *B. lupulina* ต่อไป อย่างไรก็ตามมีนักวิจัยของประเทศไทยอีกกลุ่มหนึ่งที่ได้ทำการศึกษาทางด้านเภสัชวิทยาของสมุนไพรพญาายออย่างต่อเนื่อง และพบว่า สารสกัดจากใบพญาายอนอกจากจะมีฤทธิ์ต้านการอักเสบแล้ว [105] ยังมีฤทธิ์ทำลายเชื้อไวรัส Herpes simplex ชนิดที่ 2 ในหลอดทดลองด้วย [106] ซึ่งจากการศึกษาในคนก็พบว่า มีประสิทธิภาพในการรักษาโรคเริมที่อวัยวะเพศ [107] และโรคงูสวัด [108] โดยทำให้โรคงดลงหายเร็วขึ้นและลดความเจ็บปวดได้ รวมทั้งไม่ทำให้เกิดอาการแสบระคายเคืองเหมือนยาครีมที่สังเคราะห์ขึ้น (acyclovir) ขณะที่จากการศึกษาทางพิษวิทยาก็พบว่า เป็นยาที่ค่อนข้างปลอดภัย [105] ดังนั้นสารสกัดจากใบพญาายอจึงน่าจะมีประสิทธิภาพในการรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสในตระกูล Herpes

บทที่ 3 วิธีการทดลอง

3.1 การสกัด crude lipid และ crude polysaccharide



แผนภาพที่ 3.1 วิธีการสกัด crude lipid, crude cold และ hot water extract polysaccharide จากสาหร่ายสไปรูลินา

นำสาหร่ายสไปรูลินาแห้งมา 9 กิโลกรัม เติมตัวทำละลายผสมของ chloroform และ methanol (อัตราส่วน 2:1 โดยปริมาตร) 30 ลิตร ใส่ลงในภาชนะที่มีการกวนอย่างต่อเนื่องตลอดเวลาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง แยกส่วนที่สกัดได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ขณะที่ส่วนกากเซลล์สาหร่ายนำมาสกัดด้วยวิธีการเดิมซ้ำอีก 2 ครั้ง นำส่วนที่สกัดได้ไปทำให้แห้งโดยระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator (รุ่น R-200, BUCHI) ได้ crude lipid ส่วนกากเซลล์ของสาหร่ายที่เหลืออยู่นำมาสกัดต่อด้วย 70% EtOH ปริมาตร 30 ลิตร โดยทำการสกัดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง (ทำการสกัด 2 ครั้ง) แยกส่วนที่เป็นสารละลายและกากเซลล์ออกจากกัน ส่วนที่เป็นสารละลายนำไปทำให้แห้ง ส่วนของกากเซลล์นำมาสกัดเพื่อแยกเอา polysaccharide ด้วยน้ำกลั่น 30 ลิตร คนอย่างต่อเนื่องตลอดเวลาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง (ทำการสกัด 2 ครั้ง) แยกส่วนสารละลายออกจากกากเซลล์สาหร่าย นำส่วนสารละลายมาตกตะกอนโดยค่อยๆ หยด 1% CTAB ลงในสารละลายที่มีการคนอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งสารละลายมีสีขาวขุ่น จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง refrigerate centrifuge (SORVALL RC 5C *Plus*) ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนสารละลายเก็บไว้เพื่อตรวจสอบว่ามี polysaccharide เหลืออยู่หรือไม่ โดยนำไปตกตะกอนด้วย 1% CTAB อีกครั้งหนึ่ง ขณะที่ตะกอนของ polysaccharide ที่ได้นำมาล้างด้วย saturated sodium acetate ใน 95% EtOH, 95% EtOH, absolute EtOH และ diethyl ether ตามลำดับ นำตะกอนที่ได้เก็บไว้ใน desiccator ตะกอนที่ได้คือ crude cold water extract polysaccharide นำกากเซลล์ที่เหลือมาสกัดด้วยน้ำร้อน 30 ลิตร คนอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แยกส่วนสารละลายออกจากกากเซลล์สาหร่าย นำส่วนของสารละลายมาตกตะกอนและล้างตะกอนด้วยวิธีเดียวกันกับ crude cold water extract polysaccharide ตะกอนที่ได้คือ crude hot water extract polysaccharide

3.2 การแยก lipid class ของ crude lipid

การแยก lipid class โดยวิธีของ Sato และ Murata [109]

ชั่ง crude lipid 0.5 กรัม ใส่ใน vial ฝาเกลียว ละลายด้วยตัวทำละลายผสมของ chloroform และ methanol (อัตราส่วน 2:1) 2 มิลลิลิตร ใช้ดินสอลากเส้นเบาๆ บน silica gel plate (Merck No. 105553.0001 TLC aluminium sheets silica gel 60 without fluorescent, ขนาด 20x20 เซนติเมตร) ให้สูงจากขอบ plate 2 เซนติเมตร หยดสารละลายลิปิดประมาณ 100 ไมโครลิตร ด้วย microsyringe ลงบนรอยดินสอที่ลากไว้ เป่าให้แห้ง แล้วนำแผ่น TLC ใส่ใน chamber ซึ่งมีระบบตัวทำละลายของ chloroform/methanol/28% NH_4OH (อัตราส่วน 13:17:1 โดยปริมาตร) 200 มิลลิลิตร ทิ้งไว้จนกระทั่งเฟสเคลื่อนที่ไปได้ระยะทาง 18 เซนติเมตร จากนั้นนำออกมาวางไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที แล้วสเปรย์ด้วย 0.01% primuline ที่ละลายด้วย acetone และน้ำในอัตราส่วน 4:1 โดยปริมาตร

ทิ้งให้แห้งเป็นเวลา 10 นาที นำไปตรวจจุดของลิปิดภายใต้แสง UV (312 nm ultraviolet; T350 spectroline Model TVC 312A) และเทียบกับสารมาตรฐานชั้นลิปิด แล้วใช้ดินสอทำตำแหน่งของลิปิดแต่ละชนิด

ทำการสกัดลิปิดแต่ละชั้นด้วยการขูด silica gel ที่ตำแหน่งชั้นลิปิดใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติม chloroform/methanol (อัตราส่วน 2:1 โดยปริมาตร) 8 มิลลิลิตร นำไปบดที่อุณหภูมิห้องพร้อมกับมีการกวนบน magnetic stirrer เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปกรองผ่านกระดาษกรอง (Whatman No. 1541 110) เติมน้ำ 1 ใน 4 ของปริมาตรเดิมเพื่อให้ลิปิดแยกชั้น นำเฉพาะส่วนของชั้นลิปิดไประเหยเอาตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่อง rotary evaporator แล้วเป่าให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน

3.3 การแยก crude lipid ให้บริสุทธิ์เพื่อหาโครงสร้างของสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1

3.3.1 การทำ partition ของ crude lipid

นำ crude lipid มาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยวิธี partition โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ตามลำดับความมีขั้วจากต่ำไปสูง คือ hexane, ethyl acetate และ methanol ตามลำดับ โดยนำ crude lipid ประมาณ 2 กรัม ละลายใน methanol/H₂O (อัตราส่วน 30:70 โดยปริมาตร) 150 มิลลิลิตร ใส่ลงในกรวยแยกขนาด 500 มิลลิลิตร เติมหexane ลงไป 150 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้สารตัวอย่างแยกชั้นเป็นเวลา 20 นาที จะได้สารสกัดของ hexane แยกอยู่ชั้นบน ขณะที่กากอยู่ด้านล่างของกรวยแยก นำเอากากมาสกัดซ้ำด้วย hexane อีกสองครั้ง รวมสารสกัดของ hexane ที่ได้ทั้งหมดและนำมาระเหยให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator จากนั้นนำกากมาสกัดต่อด้วย ethyl acetate ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ทำการสกัด 3 ครั้ง รวมสารสกัดของ ethyl acetate ที่ได้ทั้งหมดและนำไประเหยให้แห้ง และนำกากที่เหลือมาสกัดต่อด้วย methanol 3 ครั้ง รวมสารสกัดของ methanol ที่ได้ทั้งหมดและนำไประเหยให้แห้งเช่นเดียวกัน จากนั้นนำสารสกัดทั้ง 3 ชนิด คือ สารสกัดในชั้น hexane, ethyl acetate และ methanol ไปทดสอบคุณสมบัติของการเป็นสารยับยั้งเชื้อ HSV-1 ต่อไป

3.3.2 การแยกสารสกัด ethyl acetate ด้วยวิธี Gel-Filtration Chromatography

ซึ่งสารสกัดในชั้น ethyl acetate ประมาณ 2 กรัม ละลายด้วย methanol 20 มิลลิลิตร ค่อย ๆ เทสารลงใน column (ขนาด 3x100 เซนติเมตร) ที่บรรจุด้วย SephadexTM LH-20 (Pharmacia product, Sweden) และใช้ methanol เป็นตัวชะสารตัวอย่าง ทำการเก็บ fraction โดยกำหนดให้แต่ละ fraction มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลาย lipid แต่ละ fraction ไประเหยให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator และนำไปทดสอบคุณสมบัติของการเป็นสารยับยั้งเชื้อ HSV-1

3.4 การวิเคราะห์

3.4.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมัน

3.4.1.1 การเตรียม methyl ester ของกรดไขมันโดยดัดแปลงวิธีของ Lapage และ Roy [110]

นำ lipid ที่ต้องการวิเคราะห์ 3 มิลลิกรัม ใส่ใน vial ขนาด 5 มิลลิลิตร เติม Heptadecanoic acid ($C_{17}H_{33}COOH$; Sigma Chemical Co.) 5 ไมโครลิตร เพื่อใช้เป็น internal standard และเติม 5% HCl ใน methanol 2 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที ในที่มืด พร้อมกับกวนบน magnetic stirrer ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมน้ำกลั่นและ hexane (ที่มี 0.1%BHT, Butylated hydroxytoluene) อย่างละ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำชั้น hexane ซึ่งอยู่ชั้นบน กรองผ่าน sodium sulfate (Na_2SO_4) เพื่อกำจัดน้ำที่เหลืออยู่ ออก เก็บส่วนที่ผ่านการกรองมาใส่ในขวด vial ที่สะอาดและเป่าให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน นำไปวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันโดยวิธี Gas Chromatography

3.4.1.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของ methyl ester ของกรดไขมันโดยใช้ Gas Chromatography

วิเคราะห์โดยใช้เครื่อง GC 17A, Shimadzu, ซึ่งประกอบด้วย detector แบบ FID (Flame Ionization Detector) คอลัมน์ที่ใช้คือ sp-2330 OMEGAWAXTH fused silica capillary (Supelco) ขนาดความยาว 30 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.25 มิลลิเมตร ความหนาของผิวเคลือบ 0.2 ไมโครเมตร column flow 1 มิลลิลิตรต่อนาที linear velocity 48 เซนติเมตรต่อวินาที split ratio 1:100 อุณหภูมิคอลัมน์ 205 องศาเซลเซียส อุณหภูมิ injector 250 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ detector 260 องศาเซลเซียส

3.4.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำตาลของ crude hot water extract polysaccharide ดัดแปลงมาจากวิธีของ Blakeney และคณะ [111]

3.4.2.1 การเตรียมอนุพันธ์ของน้ำตาลสำหรับวิเคราะห์ด้วย Gas Chromatography

ชั่งน้ำตาลแต่ละชนิด 1 มิลลิกรัม ใส่ลงใน vial ขนาด 5 มิลลิลิตร เติม สารละลาย sodium tetraborohydride เข้มข้น 20 กรัมต่อลิตรลงไป 1 มิลลิลิตร นำไป บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ค่อย ๆ เติม amberlite IR-120 (H^+) จนกระทั่งไม่มีฟองก๊าซเกิดขึ้น กรองผ่านกระดาษกรองเพื่อแยกเอา amberlite IR-120 (H^+) ออก และนำสารละลายที่ได้ไประเหยภายใต้ความดันต่ำให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator เติม methanol (เพื่อกำจัด boric acid ที่เหลืออยู่ออกไปในรูปของ methyl borate) ประมาณ

1 มิลลิลิตรและนำไปประเหยให้แห้ง (ทำขั้นตอนนี้ซ้ำ 3 ครั้ง) เติม acetic anhydride และ pyridine อย่างละ 0.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิประมาณ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำ vial ไปจุ่มในภาชนะที่มีน้ำแข็งและเติม methanol ลงไป 1 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปประเหยจนแห้งเพื่อกำจัด methyl acetate จากนั้นกำจัด pyridine โดยเติม heptane 1 มิลลิลิตร และนำไปประเหยให้แห้งทำซ้ำจนกระทั่งไม่มี pyridine เหลืออยู่ ละลายสารตัวอย่างน้ำตาลด้วย dichloromethane 200 ไมโครลิตร และนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC

3.4.2.2 วิธีการ hydrolyzed polysaccharide

ซึ่งสารตัวอย่างของ crude hot water extract polysaccharide (SHP-F1 และ SHP-F2) อย่างละ 5 มิลลิกรัม และเติม myo-inositol 1 มิลลิกรัม (Sigma chemical Co.) เพื่อใช้เป็น internal standard เติม 2N sulfuric acid 2 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง นำสารละลายมา neutralized ด้วย barium carbonate จนกระทั่งมีค่า pH เท่ากับ 5 กรองสารละลายที่ได้ผ่านกระดาษกรอง และนำไปผ่านคอลัมน์ Dowex 1-x8 anion-exchange resin โดยใช้ น้ำที่ปราศจากไอออนประมาณ 10-15 มิลลิลิตร ชะล้างตัวอย่างออกจากคอลัมน์และนำไปประเหยให้แห้ง และนำไปเตรียมอนุพันธ์ของน้ำตาลดังวิธีการข้อที่ 3.4.2.1 และนำอนุพันธ์ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC

3.4.2.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำตาลโดยใช้ Gas Chromatography

วิเคราะห์โดยใช้เครื่อง GC 17A, Shimadzu ซึ่งประกอบด้วย detector แบบ FID (Flame Ionization Detector) คอลัมน์ที่ใช้คือ Rtx-2330 capillary column (RESTEK CORPORATION) ขนาดความยาว 30 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.25 มิลลิเมตร ความหนาของผิวเคลือบ 0.2 ไมโครเมตร column flow rate 1 มิลลิลิตรต่อนาที linear velocity 33 เซนติเมตรต่อวินาที split ratio 1:25 อุณหภูมิคอลัมน์ 220 องศาเซลเซียส อุณหภูมิ injector 230 องศาเซลเซียส อุณหภูมิ detector 230 องศาเซลเซียส

3.4.3 การวิเคราะห์สารตัวอย่างด้วย NMR

^1H , ^{13}C , ^1H - ^1H COSY และ HMQC spectrum วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Bruker DRX 400 NMR spectrometer โปรตอนทำการวิเคราะห์ที่ 400 MHz ขณะที่คาร์บอนวิเคราะห์ที่ 100 MHz

3.5 การตรวจสอบหมู่ไฮดรอกซิลของน้ำตาลใน glycolipid โดยการทำปฏิกิริยา Acetylation

นำสารตัวอย่าง lipid ประมาณ 100 มิลลิกรัม ใส่ในขวดก้นกลมขนาด 50 มิลลิลิตร เติม pyridine 1 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ จนสารตัวอย่าง lipid ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นหยด acetic anhydride 0.5 มิลลิลิตร คนอย่างต่อเนื่องที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

และนำไปประเหยให้แห้งเพื่อกำจัด pyridine ที่เหลืออยู่โดยใช้เครื่อง vacuum pump จากนั้นนำสารตัวอย่างมาสกัดด้วยตัวทำละลายผสมของ ethyl acetate และน้ำ (อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร) 30 มิลลิลิตร โดยใช้ separation funnel เขย่าให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้จนสารละลายแยกชั้น (ประมาณ 20 นาที) แยกเอาชั้นน้ำมันสกัดด้วย ethyl acetate 3 ครั้ง รวมชั้น ethyl acetate ที่สกัดได้ทั้งหมด และนำไปประเหยให้แห้งด้วยเครื่อง Rotary evaporator

3.6 การตรวจสอบพันธะคู่ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวโดยการทำปฏิกิริยา Bromination

ชั่งสารตัวอย่าง lipid 30 มิลลิกรัม ใส่ในขวดก้นกลมขนาด 10 มิลลิลิตร ละลายสารตัวอย่างด้วย methylene chloride 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย bromine 1-2 หยด กวนอย่างเนื่องเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง

3.7 การแยก fraction ของ crude hot water extract polysaccharide โดยวิธี Gel-filtration Chromatography [72]

ชั่ง crude hot water extract polysaccharide ประมาณ 35-40 มิลลิกรัม และละลายด้วย citrate buffer 0.01 M (pH 7) ที่ประกอบด้วย NaCl เข้มข้น 0.1 M 5 มิลลิลิตร ค่อย ๆ ใช้ปั๊มดูดสารตัวอย่างผ่านเข้าไปใน Sepharose 6B column ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร ยาว 30 เซนติเมตร (Pharmacia) และใช้ citrate buffer 0.01 M (pH 7) ที่ประกอบด้วย NaCl เข้มข้น 0.1 M เป็นตัวชะสารตัวอย่าง ทำการเก็บ fraction ด้วยเครื่อง fraction collector (รุ่น DC-1200, EYELA) โดยกำหนดให้แต่ละ fraction มีปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากนั้นแบ่งสารตัวอย่างที่ได้ของแต่ละ fraction นำไปวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตโดยวิธี phenol-sulfuric และวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectronic 21 ที่ความยาวคลื่น 485 นาโนเมตร รวม fraction ของสารกลุ่มเดียวกัน นำไปทำ methanol bath และนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze dryer (รุ่น FD-1, EYELA) นำสารตัวอย่างไปละลายด้วยน้ำ deionization และทำ dialysis โดยใช้ dialysis tubing (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 34 มิลลิเมตร ความจุ 3.7 มิลลิลิตรต่อเซนติเมตร molecular weight cut off เท่ากับ 7,000) ทำการเปลี่ยนน้ำทุก ๆ 4 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze dryer

3.8 การศึกษาความคงตัวของสารสกัด EtOAc และตำรับยา

การศึกษาความคงตัวของสารสกัด EtOAc และตำรับยาทำการศึกษา 2 สภาวะ คือ สภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และสภาวะปกติที่อุณหภูมิห้อง โดยเก็บสารตัวอย่างที่สภาวะเร่งทุก ๆ 1, 2, 3 และ 6 เดือน ตามลำดับ ขณะที่อุณหภูมิปกติจะเก็บตัวอย่างทุก 3 เดือน เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณของสารสำคัญที่สลายตัวไป รวมทั้งนำไปตรวจสอบคุณสมบัติการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HSV-1 ด้วย โดยเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้กับค่าของตัวควบคุม คือ สารสกัด EtOAc และตำรับยาที่ชั่วโมงที่ 0

การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญที่สลายตัวไปใช้หลักการของการเติม internal standard โดยคำนวณหาอัตราส่วนของพื้นที่ของสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ต้าน HSV-1 ต่อพื้นที่ของ internal standard ที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อสารตัวอย่างอยู่ในสภาวะเร่ง และอุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลาต่าง ๆ กัน วิธีการทำโดยชั่งสารตัวอย่าง คือ สารสกัด EtOAc และตำรับยามา ประมาณ 4 และ 10 มิลลิกรัม ตามลำดับ ละลายสารตัวอย่างด้วย $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (70:30) 1 มิลลิลิตร นำไป vortex จนสารตัวอย่างละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นปิเปตสารตัวอย่างใส่ลงใน vial ๆ ละ 300 ไมโครลิตร และเติม internal standard, IS (เตรียมจาก L-A-phosphatidyl-DL-glycerol sodium, Sigma Co. ประมาณ 1 มิลลิกรัม ละลายด้วย $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (70:30) 1 มิลลิลิตร) ลงในแต่ละ vial ปริมาณ 30, 60 และ 100 ไมโครลิตร ตามลำดับ ปรับปริมาตรของสารละลายตัวอย่างในแต่ละ vial ให้เป็น 400 ไมโครลิตรด้วย $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (70:30) จากนั้นนำสารตัวอย่างที่เตรียมได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณโดยใช้เทคนิค HPLC-MS (คอลัมน์ HPLC คือ C18 reverse phase, LICHROART 250x4 มิลลิเมตร RP 18 E), Mass Spectrometer รุ่น LCT, UV detector (รุ่น 2487, Dual λ Absorbance Detector, Waters Co.) สภาวะที่ใช้คือ desolvation gas flow rate 420-430 ลิตรต่อชั่วโมง nebuliser gas flow rate 150-155 ลิตรต่อชั่วโมง desolvation temperature 300 องศาเซลเซียส Source temperature 150 องศาเซลเซียส Capillary 2700 โวลต์ Sample Cone 27 โวลต์ Extraction Cone 15 โวลต์ RF Lens 178 และใช้ negative mode ขณะที่ระบบของ mobile phase คือ $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (70:30) อัตราการไหลของ mobile phase 1 มิลลิลิตร ต่อนาที โดยฉีดสารตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร จากนั้นคำนวณหาอัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีคของกลุ่มสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง HSV-1 ต่อพื้นที่ของ internal standard ของสารตัวอย่างเมื่อมีความเข้มข้นของ internal standard เป็น 30, 60 และ 100 ไมโครลิตรตามลำดับ และเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ที่ได้กับค่าของตัวควบคุมคือ สารสกัด EtOAc และตำรับยาที่ชั่วโม่งที่ 0 โดยในการวิเคราะห์แต่ละครั้งต้องควบคุมให้ความเข้มข้นของสารตัวอย่างมีค่าเท่ากัน ขณะที่ความเข้มข้นของ internal standard กำหนดให้มีค่าที่แตกต่างกัน 3 ความเข้มข้น ทั้งนี้เพื่อเพิ่มความถูกต้องและแน่นอนของค่าที่วิเคราะห์ได้

3.9 การกำจัดสีออกจาก crude lipid

เนื่องจาก crude lipid ที่สกัดได้จากสาหร่ายสไปรูลินามีสีน้ำตาลเข้ม ซึ่งอาจทำให้สีของตำรับยาที่ได้ไม่สวยงาม ดังนั้นเบื้องต้นได้ทำการทดลองเพื่อลดความเข้มของสี

3.9.1 การกำจัดสีโดยใช้ activated charcoal

นำ crude lipid 15 กรัม มาละลายโดยใช้ตัวทำละลาย $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (2:1) 500 มิลลิลิตร นำสารละลาย crude lipid ไปกรองผ่านคอลัมน์ที่บรรจุด้วย silica gel 60 (0.063-0.200 mm, Merck Co.) ปรับปริมาตรของสารละลาย crude lipid เป็น 750 มิลลิลิตร ด้วย $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (2:1) จากนั้นแบ่งสารละลาย crude lipid ใส่ใน flask ขนาด 500 มิลลิลิตร

flask ละ 250 มิลลิลิตร และเติม activated charcoal (Fluka Co.) ลงไปในแต่ละ flask 5, 10, 20 และ 30 กรัม ตามลำดับ นำไปกวนอย่างต่อเนื่องด้วยเครื่อง magnetic stirrer ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง กรองสารละลาย crude lipid ผ่านกระดาษกรอง เพื่อแยก activated charcoal ออก และนำสารละลาย crude lipid ที่ได้ไปทำให้แห้งโดยใช้เครื่องระเหยภายใต้ความดันต่ำ จากนั้นแบ่งสารตัวอย่างที่ได้ประมาณ 0.5 มิลลิกรัม มาละลายด้วย MeOH 5 มิลลิลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectronic 21 (MILTON ROY COMPANY)

3.9.2 การกำจัดสีโดยการปรับเปลี่ยนอัตราส่วนของตัวทำละลาย MeOH:H₂O

ชั่ง crude lipid 2 กรัม นำมาละลายด้วยตัวทำละลาย MeOH:H₂O 100 มิลลิลิตร โดยปรับเปลี่ยนอัตราส่วนของ MeOH:H₂O ด้วยการลดสัดส่วนของ MeOH และเพิ่มสัดส่วนของ H₂O ให้มากขึ้นเป็น 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80 และ 10:90 ตามลำดับ แยกส่วนที่ละลายได้และกากออกจากกันโดยการกรองผ่านกระดาษกรอง จากนั้นนำส่วนที่เป็นสารละลายไประเหยเอาตัวทำละลายออกจนแห้ง และแบ่งสารตัวอย่างที่ได้ประมาณ 0.5 มิลลิกรัม มาละลายด้วย MeOH 5 มิลลิลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectronic 21 ขณะเดียวกันนำทั้งส่วนที่ละลายได้และกากไปวิเคราะห์ด้วย NMR เพื่อดู spectrum ของคลอโรฟิลล์

3.10 การหาปริมาณคลอโรฟิลล์ของ crude lipid [112]

ละลาย crude lipid 0.5 มิลลิกรัม ด้วย MeOH 1 มิลลิลิตร และปิเปตสารละลาย crude lipid มา 0.5 มิลลิลิตร เจือจางด้วย MeOH และปรับปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตร นำสารละลายดังกล่าวไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665 นาโนเมตร

3.11 การหาปริมาณโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต

3.11.1 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry [113]

เตรียม standard curve จาก stock solution ของ bovine serum albumin (BSA) ที่มีความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นเป็น 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200 และ 300 ไมโครกรัมต่อ 2 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลาย BSA แต่ละความเข้มข้นมา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองและเติม NaOH ความเข้มข้น 0.5 มิลลิลิตร นำหลอดทดลองทั้งหมดไปแช่ในน้ำเดือดเป็นเวลา 20 นาที รอจนกระทั่งเย็น จากนั้นจึงเติมสารละลายผสมของ 5% Na₂CO₃, 1% CuSO₄·5H₂O และ 2% NaKC₄H₆O₆·4H₂O (อัตราส่วน 50:1:1) 2.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดของสารตัวอย่างและสารละลาย BSA เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที และเติมสาร Folin-Ciocalteu ลงไป 0.5 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที สารละลายจะมีสีน้ำเงินเข้ม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectronic 21

3.11.2 การหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตโดยวิธี Phenol-sulfuric [114]

เตรียม standard curve จาก stock solution ของ glucose ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นเป็น 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อ 2 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปิเปตสารละลาย glucose แต่ละความเข้มข้นมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองและเติมสารละลาย 5% phenol ลงไป 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติม H_2SO_4 เข้มข้น 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดของสารละลายตัวอย่าง และสารละลาย glucose อย่างรวดเร็ว เขย่าให้เข้ากันอีกครั้งหนึ่ง ตั้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 30 นาที สังเกตว่าสารตัวอย่างมีสีเหลืองเข้มจึงนำสารตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 485 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectronic 21

3.12 การหาปริมาณน้ำตาลของสาหร่ายสไปรูลินาและ crude hot water extract polysaccharide [115]

ชั่งตัวอย่างสาหร่ายสไปรูลินาและ crude hot water extract polysaccharide มา 500 มิลลิกรัม ใส่ถ้วยกระเบื้อง (crucible) ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน นำไปเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ตั้งไว้ให้เย็นใน desiccator และนำไปชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณหาปริมาณน้ำตาล

3.13 การหาปริมาณแคลเซียมและซัลเฟตใน crude hot water polysaccharide

3.13.1 การหาปริมาณแคลเซียมด้วยเครื่อง ICP (Inductive Couple Plasma Spectroscopy)

เตรียมสารละลายแคลเซียมมาตรฐาน จาก stock solution ของแคลเซียมที่มีความเข้มข้น 100 ppm โดยนำไปเจือจางให้มีความเข้มข้นเป็น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 ppm ตามลำดับ จากนั้นนำไปวัดค่าความเข้มข้นที่แท้จริงด้วยเครื่อง ICP (รุ่น JY 124, JOBIN YVON EMISSION, FRANCE) ที่ความยาวคลื่น 396.847 นาโนเมตร การเตรียม crude hot water polysaccharide เพื่อหาปริมาณแคลเซียม ทำโดยชั่ง crude hot water polysaccharide มา 100 มิลลิกรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้อง (crucible) ที่ผ่านการเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส ประมาณ 2 ชั่วโมง นำไปเผาด้วยเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จนกระทั่งสารตัวอย่างเป็นสีขาวทั้งหมด จากนั้นนำตัวอย่างใส่ไว้ใน desiccator จนกระทั่งหายร้อน หยด deionized water ประมาณ 20-30 หยด นำเข้าของ polysaccharide ไปย่อยโดยเติมกรดไนตริกเข้มข้น 2 มิลลิลิตร ต้มบน hot plate ที่มีความร้อนประมาณ 100 องศาเซลเซียส จนกระทั่งถ้าถูกย่อยจนหมด แต่ถ้าสารละลายตัวอย่างมีตะกอนสีดำต้องนำไปกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 และนำมาเจือจางด้วย deionized water ให้ได้ปริมาตร 25 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณแคลเซียมด้วยเครื่อง ICP ที่ความยาวคลื่น 396.847 นาโนเมตร

3.13.2 การหาปริมาณซัลเฟตใน crude hot water extract polysaccharide [116]

ชั่ง crude hot water extract polysaccharide 5 กรัม ใส่ใน flask ขนาด 500 มิลลิลิตร เติม deionized water 200 มิลลิลิตร และกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 15 มิลลิลิตร นำไปต้มบน hot plate จนสารตัวอย่างเดือดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที นำมาเจือจางด้วย deionized water จนมีปริมาตร 500 มิลลิลิตร จากนั้นแบ่งสารละลายตัวอย่างมา 100 มิลลิลิตร เจือจางด้วย deionized water 200 มิลลิลิตร และเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นอีก 0.5 มิลลิลิตร นำไปต้มจนเดือดพร้อมกับคอนอย่างต่อเนื่อง ค่อย ๆ หยดสารละลายของ 10% BaCl 10 มิลลิลิตร และตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16 ชั่วโมง กรองตะกอนของ BaSO₄ ที่ได้ผ่านกระดาษกรอง ล้างตะกอนด้วยด้วย deionized water ที่ร้อน นำไปเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ตั้งให้เย็นใน desiccator นำมาชั่งและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของซัลเฟต

3.14 การกำจัดแคลเซียมและซัลเฟตออกจาก crude hot water extract polysaccharide

3.14.1 การกำจัดแคลเซียมออกจาก crude hot water extract polysaccharide [72]

ละลาย crude hot water extract polysaccharide 30 มิลลิกรัม ด้วย deionized water นำไปผ่าน cation exchange column (Dowex 50W, X-8, H⁺ form) ใช้ deionized water เป็นตัวชะสารตัวอย่างให้ออกจากคอลัมน์จนหมด นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปทำให้แห้งและวิเคราะห์คุณสมบัติการออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 ต่อไป

3.14.2 การกำจัดซัลเฟตออกจาก crude hot water extract polysaccharide [117]

ชั่ง crude hot water extract polysaccharide ที่ไม่มีแคลเซียมมา 20 มิลลิกรัม ละลายสารตัวอย่างด้วย deionized water 5 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายตัวอย่างจนมีค่าเป็น 7.6 ด้วย pyridine นำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator สารตัวอย่างที่ได้จะอยู่ในรูปของ pyridinium salt เติม 10% MeOH ใน DMSO 15 มิลลิลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง (คอนอย่างต่อเนื่องตลอดเวลา) นำไปทำ dialysis ด้วย deionized water เป็นเวลา 3 วัน โดยเปลี่ยนน้ำทุก ๆ 6 ชั่วโมง จากนั้นทำ dialysis ต่อด้วย 0.5 M EDTA เป็นเวลา 2 วัน นำส่วนของ nondialyzing fraction ไปทำให้แห้งและนำสารที่ได้ไปวิเคราะห์การออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1

3.15 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านไวรัสก่อโรค Herpes simplex virus type 1 (Anti-HSV-1 assay) โดย colorimetric method [118]

เป็นการศึกษาผลของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิด viral infection โดยใช้วิธีการบ่มสารทดสอบกับเซลล์เจ้าบ้านที่ติดเชื้อไวรัสในระยะเวลาที่เหมาะสม หลังจากนั้นทำการตรวจวัดหาปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตโดยการย้อมสีเยื่อหุ้มเซลล์และวัดค่าการดูดกลืนแสงเทียบกับชุดควบคุมผลลบซึ่งไม่มีสารทดสอบแต่มีไวรัสอยู่ และชุดควบคุมผลบวกที่มีการเติม anti-HSV agent ได้แก่ Acyclovir โดยมีวิธีและหลักการทั่วไปดังนี้

ไวรัสที่ใช้ในการทดสอบคือ HSV-1 (HF strain) เซลล์เจ้าบ้านที่ใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อไวรัสเพื่อเพิ่มจำนวนไวรัสคือ Vero cell (African green monkey kidney fibroblast) เลี้ยงใน Eagle's minimum essential medium (MEM) ที่เติม 10% fetal bovine serum, FBS (heat-inactivated) ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านไวรัสเริ่มใน 96-well microplate โดยผสม Vero (1×10^5 cell/ml), HSV-1 30 PFU ต่อหลุม (ใช้ไวรัสที่เก็บเป็น stock และวัดปริมาณไวรัสดังกล่าวโดยการไตเตรดหาค่า titer ด้วยวิธีมาตรฐาน คือ Plaque reduction assay) และสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบที่มีความเข้มข้นของสารต่างกัน (two-fold dilution) โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย นำไปบ่มในตู้ incubator 37 องศาเซลเซียส และ 5% CO₂ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ตรึงสภาพเซลล์ด้วย 50% trichloroacetic acid (TCA) ที่เย็น ไปแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำสะอาด 4 ครั้ง ทิ้งไว้ให้แห้ง ย้อมสีเซลล์ด้วย 0.05% sulforhodamine B ใน 1% acetic acid นาน 30 นาที แล้วจึงล้างด้วย 1% acetic acid ตั้งทิ้งไว้จนแห้ง ละลายสีโดยเติม 10 mM Tris-base pH 10 และนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA Microplate Reader นอกจากนี้ยังตรวจสอบความเป็นพิษเบื้องต้นของสารทดสอบต่อเซลล์เจ้าบ้าน โดยทำการทดลองดังวิธีที่กล่าวไว้ข้างต้นแต่ใช้เซลล์เจ้าบ้านที่ไม่มีการติดเชื้อไวรัส จากนั้นทำการคำนวณและแปลผลฤทธิ์ยับยั้งไวรัส (% inhibition) ของสารตัวอย่างที่นำมาทดสอบที่ระดับความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เจ้าบ้านโดยเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสง (OD_{510nm}) ที่วัดได้จากหลุมที่มีสารตัวอย่างกับชุดควบคุมลบที่ไม่มีสารตัวอย่าง โดยการทดลองทุกครั้งค่าที่ได้จะเป็นค่าเฉลี่ยจากการทำหลาย ๆ ตัวอย่างที่มีความเข้มข้นเท่ากัน สำหรับชุดควบคุมผลบวกจะใช้ acyclovir ในการทดสอบฤทธิ์ต้านไวรัสเริ่ม และใช้ clefticin ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยมีหลักเกณฑ์ในการรายงานผลดังนี้

1. การแปลผลความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity to vero cell)

ระดับความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบคือ 50 $\mu\text{g/ml}$

- ถ้าสารไม่เป็นพิษต่อเซลล์จะรายงานผลเป็นค่า $\text{IC}_{50} > 50 \mu\text{g/ml}$
- ถ้าสารมีความเป็นพิษต่อเซลล์ จะทำ serial dilution เพื่อหาค่า IC_{50}

2. การแปลผลฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสเริม (Anti HSV-1)

ทำการแปลผลที่ระดับความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ vero ตามหลักเกณฑ์ดังนี้

% Inhibition	Activity
<25%	Inactive
25-35%	Weakly active
>35-50%	Moderately active
>50%	Active (ทำ serial dilution เพื่อหาค่า IC_{50})

บทที่ 4 ผลการดำเนินงานวิจัยและวิจารณ์ผล

ผลการดำเนินงานวิจัยในรายงานนี้ประกอบไปด้วย 4 ส่วนหลัก คือ

1. การเตรียม crude lipid และ crude polysaccharide จากสาหร่ายสไปรูลีนา
2. การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HSV-1 ใน crude lipid
3. การตั้งตำรับยาทาภายนอกจากสารสกัด EtOAc ที่ได้จาก lipid ของสาหร่ายสไปรูลีนา
4. การศึกษาองค์ประกอบและคุณสมบัติของ crude hot water extract polysaccharide

4.1 การเตรียม crude lipid และ crude polysaccharide จากสาหร่ายสไปรูลีนา

จากข้อมูลเบื้องต้นดังตารางที่ 1.1 ทำให้ทราบว่าทั้ง crude lipid และ crude polysaccharide ที่สกัดแยกได้จากสาหร่ายสไปรูลีนามีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 ที่ก่อให้เกิดโรคเริม ดังนั้นในขั้นตอนแรกจึงทำการสกัดแยกสารทั้ง 2 ชนิด โดยนำเซลล์แห้งของสาหร่ายสไปรูลีนามาสกัดด้วยแผนภาพที่ 3.1 ซึ่งข้อดีของการสกัดด้วยวิธีดังกล่าว คือ เพื่อเป็นการนำเซลล์ของสาหร่ายสไปรูลีนามาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด ภายหลังจากการสกัด พบว่า สารสกัดหยาบ (crude extract) แบ่งออกได้เป็น 2 ส่วน คือ ส่วนแรกที่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์สกัด (คลอโรฟอร์ม:เมทานอลในอัตราส่วน 2:1 [119]) ได้สารที่มีลักษณะเหนียวหนืดเป็นสีน้ำตาลเข้มเรียกว่า crude lipid ดังรูปที่ 4.1 และส่วนที่สองซึ่งได้จากการใช้น้ำเป็นตัวสกัดเรียกว่า crude polysaccharide แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ polysaccharide ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ (low molecular weight) ที่ได้มาจากการใช้น้ำกลั่นที่อุณหภูมิปกติเป็นตัวสกัด เรียกว่า crude cold water extract polysaccharide และ polysaccharide ที่สกัดด้วยน้ำร้อน ซึ่งมีมวลโมเลกุลสูง (high molecular weight) เรียกว่า crude hot water extract polysaccharide โดย crude polysaccharide ที่สกัดได้มีลักษณะเป็นผงสีขาวนวล โดย crude hot water extract polysaccharide มีสีเข้มกว่าเล็กน้อย ดังรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.1 Crude lipid ที่สกัดได้จากสาหร่ายสไปรูลินา



รูปที่ 4.2 Crude cold water extract polysaccharide (สีอ่อน) และ hot water extract polysaccharide (สีเข้ม) ที่แยกได้จากสาหร่ายสไปรูลินา

อย่างไรก็ตามหลังจากแยกได้สารสกัดทั้ง 3 ชนิดแล้ว จะพิจารณาเลือกใช้สารสกัดเพียงชนิดเดียวเท่านั้น เพื่อนำมาใช้ในงานวิจัยต่อไป คือ นำมาวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 รวมทั้งใช้เป็นองค์ประกอบในการตั้งตำรับยา ซึ่งการพิจารณาว่าจะเลือกใช้ crude lipid, crude cold water polysaccharide หรือ crude hot water polysaccharide นั้นจะใช้หลักการของ Bioassay guided fractionation เป็นความสำคัญลำดับแรก คือ พิจารณาจากคุณสมบัติของออกฤทธิ์การเป็นสารยับยั้งเชื้อ HSV-1 (ค่า IC_{50}) ของสารสกัดที่แยกได้จากสาหร่ายสไปรูลินา ถ้าสารสกัดกลุ่มใดมีคุณสมบัติที่ดีในการเป็นสารยับยั้งเชื้อ HSV-1 (ค่า IC_{50} ต่ำ) จะนำสารดังกล่าวมาแยกให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารสำคัญที่มีคุณสมบัติออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HSV-1 ต่อไป

ภายหลังจากการนำสารสกัดหยาบทั้ง 3 ชนิด ไปตรวจสอบคุณสมบัติของการเป็นสารยับยั้งเชื้อ HSV-1 โดยวิธี **colorimetric method** พบว่า **crude lipid** และ **crude hot water extract polysaccharide** มีคุณสมบัติของการออกฤทธิ์เป็นสารยับยั้งเชื้อ HSV-1 ใกล้เคียงกัน ดังผลที่แสดงไว้ในตารางที่ 4.1 ขณะที่ crude cold water extract polysaccharide ไม่มีคุณสมบัติของการออกฤทธิ์เป็นสารยับยั้งเชื้อ HSV-1 ซึ่งผลการทดลองครั้งนี้ไม่สอดคล้องกับผลการทดลองก่อนหน้านี้ (ตารางที่ 1.1) ที่พบว่า มีสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 ทั้งในส่วน of crude hot water และ cold water extract polysaccharide ทั้งนี้เนื่องมาจากการทดลองครั้งนี้ใช้สาหร่ายสไปรูลินาในปริมาณมาก โดยสกัดสาหร่ายครั้งละ 9 กิโลกรัม อาจทำให้มีปัญหาในเรื่อง homogeneous คือ ยากที่จะกวนสาหร่ายให้ถูกกับตัวทำละลายอย่างทั่วถึง ซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้ประสิทธิภาพของการสกัดลดลงและเป็นผลให้คุณสมบัติของการออกฤทธิ์เป็นสารยับยั้งเชื้อ HSV-1 ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับตารางที่ 1.1 ซึ่งเป็นการสกัดโดยใช้สาหร่าย สไปรูลินา จำนวนน้อยคือ ประมาณ 250 กรัม อย่างไรก็ตามสำหรับ polysaccharide นั้นจากการค้นคว้างานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า สารออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 ที่อยู่ใน polysaccharide จากสาหร่ายสไปรูลินาได้จากการสกัดด้วยน้ำร้อนเป็นส่วนมาก [17, 72, 73]

ตารางที่ 4.1 ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติการออกฤทธิ์เป็นสารยับยั้งเชื้อ HSV-1 ของ crude lipid, crude hot water extract polysaccharide และ cold water extract polysaccharide

Sample	Cytotoxicity (IC_{50} : μ g/ml)	Anti HSV-1 activity	Anti HSV-1 (IC_{50} : μ g/ml)
crude lipid	> 50	Active	17.28
crude hot water polysaccharide	> 50	Active	21.32
crude cold water polysaccharide	> 50	Inactive	-

ดังนั้นในการดำเนินงานวิจัยซึ่งจะทำการศึกษาเพื่อหาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HSV-1 จะมุ่งเน้นที่ **crude lipid** เป็นสำคัญ ทั้งนี้เนื่องจากมีคุณสมบัติของการออกฤทธิ์เป็นสารยับยั้งเชื้อ HSV-1 ใกล้เคียงกับ crude hot water extract polysaccharide (ผลจากตารางที่ 4.1) แต่ข้อดีของ crude lipid เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับ crude hot water extract polysaccharide คือ มีขั้นตอนในการสกัดที่ไม่ซับซ้อน โดยพบว่าการแยกและสกัดสารทั้ง 2 ชนิดจากสาหร่ายสไปรูลินาด้วยวิธีการนี้ สามารถสกัด **crude lipid** ได้มากกว่า crude hot water extract polysaccharide ถึง 23 เท่า คือ สกัด crude lipid ได้ประมาณร้อยละ 7 ของน้ำหนักสาหร่ายแห้ง ขณะที่ crude hot water extract polysaccharide สกัดได้เพียงร้อยละ 0.3 ของน้ำหนักสาหร่ายแห้งเท่านั้น

4.2 การตรวจสอบสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HSV-1 ใน crude lipid

เนื่องจาก lipid ที่พบในสาหร่ายสไปรูลินานั้นส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของ glycerolipid เบื้องต้นได้ทำการแยก crude lipid ที่สกัดได้จากสาหร่ายสไปรูลินาให้บริสุทธิ์ขึ้น โดยนำ crude lipid มาแยกออกเป็นชั้นของลิพิด (lipid class) ต่าง ๆ ด้วยเทคนิคทาง Thin layer chromatography (TLC) [109] พบว่า แยก lipid ได้ทั้งหมด 4 classes คือ MGDG DGDG SQDG และ PG ตามลำดับ และ lipid ทั้ง 4 classes มีสัดส่วนดังตารางที่ 4.2 โดยชั้น MGDG มีสัดส่วนมากที่สุดคือ ประมาณร้อยละ 50 ขณะที่ lipid อีก 3 ชั้น คือ DGDG SQDG และ PG มีสัดส่วนใกล้เคียงกันประมาณร้อยละ 15-20 ของ lipid ทั้งหมด ซึ่งจากการแบ่งตัวอย่างของ lipid แต่ละชั้นมาทำการตรวจวิเคราะห์หาคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 พบว่า lipid ทุกชั้นมีฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 โดย lipid แต่ละชั้นมีฤทธิ์มากน้อยแตกต่างกันไป โดยชั้น PG มีฤทธิ์ดีที่สุดคือ มีค่า IC_{50} 5.83 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ขณะที่ชั้น DGDG และ SQDG มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อไวรัสดังกล่าวใกล้เคียงกัน ส่วนชั้น MGDG มีฤทธิ์น้อยที่สุด ดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.2 องค์ประกอบของ lipid class ที่แยกได้จากสาหร่ายสไปรูลินา

lipid class	% of total lipid
MGDG	49
DGDG	14
SQDG	19
PG	18

ตารางที่ 4.3 ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติของการเป็นสารยับยั้งเชื้อ HSV-1 ของ lipid class ที่แยกได้จาก crude lipid ของสาหร่ายสไปรูลินา

Sample	Cytotoxicity (IC ₅₀ : µg/ml)	Anti HSV-1 activity	Anti HSV-1* (IC ₅₀ : µg/ml)
MGDG	> 50	Active	13.68 ± 5.80
DGDG	> 50	Active	29.10 ± 6.71
SQDG	> 50	Active	12.23 ± 7.64
PG	> 50	Active	5.83 ± 4.52

* ค่าเฉลี่ยของการวิเคราะห์คุณสมบัติของการเป็นสารยับยั้งเชื้อ HSV-1 2 ครั้ง

อย่างไรก็ตามการแยก crude lipid ให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยเทคนิคทาง TLC นั้น มีข้อจำกัดคือ ในการนำ crude lipid มาแยกแต่ละครั้งนั้นสารที่แยกได้มีปริมาณน้อยมาก ดังนั้นวิธีการนี้จึงไม่เหมาะสมนักเมื่อต้องการแยกสารในปริมาณมากๆ เพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์หาโครงสร้างของสารสำคัญที่ทำให้ crude lipid มีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 ต่อไป

ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยพยายามหาวิธีการที่สกัดเหมาะสม นั่นคือ นำ crude lipid ที่สกัดได้จากสาหร่ายสไปรูลินามาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นบางส่วน (partial purification) ด้วยการนำมาสกัดด้วยวิธี partition โดยเลือกใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) 3 ชนิด ตามลำดับความมีขั้ว (polarity) ของตัวทำละลายจากสารที่มีขั้วต่ำไปสูง คือ hexane, ethyl acetate และ methanol ตามลำดับ ซึ่งทำให้ได้สารที่ไม่มีขั้วและมีขั้วต่ำในการสกัดด้วยตัวทำละลาย hexane และ ethyl acetate และได้สารที่มีขั้วสูงในการสกัดด้วย methanol พบว่า ได้สารสกัดทั้งสามชนิดมีสัดส่วนดังตารางที่ 4.4 และนำสารสกัดทั้งสามชนิดไปตรวจสอบคุณสมบัติของการออกฤทธิ์เป็นสารยับยั้งเชื้อ HSV-1 (ตารางที่ 4.5)

ตารางที่ 4.4 สัดส่วนของสารสกัด hexane, ethyl acetate และ methanol ที่ได้จากการนำ crude lipid ของสาหร่ายสไปรูลินามาทำ partition

สารสกัด	% of crude lipid
hexane	10.5 ± 1.1
ethyl acetate	88.5 ± 3.5
methanol	1.0 ± 0.08

ตารางที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติของการเป็นสารยับยั้งเชื้อ HSV-1 ของสารสกัดทั้งสามชนิดที่ได้จากการนำ crude lipid ของสาหร่ายสไปรูลินามาทำ partition

สารสกัด	Cytotoxicity (IC ₅₀ : µg/ml)	Anti HSV-1 activity	Anti HSV-1 (IC ₅₀ : µg/ml)
hexane	> 50	Inactive	-
ethyl acetate	> 50	Active	29
methanol	> 50	Weakly active	42.3

จากผลการทดลองดังตารางที่ 4.5 พบว่า สารสกัดที่ได้จากการใช้ ethyl acetate และ methanol เป็นตัวสกัดมีฤทธิ์เป็นสารยับยั้งเชื้อ HSV-1 โดยสารสกัด ethyl acetate มีคุณสมบัติออกฤทธิ์เป็นสารยับยั้งเชื้อ HSV-1 ดีกว่าสารสกัด methanol ประมาณ 2 เท่า และมีสัดส่วนมากถึงร้อยละ 88.5 ของสารสกัดทั้งหมด (ตารางที่ 4.4) ขณะที่สารสกัดของ hexane ไม่มีคุณสมบัติดังกล่าวซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Corona-Hernandez และคณะ ที่พบว่า สารสกัดของ hexane ที่ได้จากสาหร่าย *Spirulina maxima* ก็ไม่มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อ HSV-2 เช่นกัน [76] เบื้องต้นอาจสรุปได้ว่า สารสำคัญใน crude lipid ที่มีคุณสมบัติออกฤทธิ์เป็นสารยับยั้งเชื้อ HSV-1 เป็นสารที่มีขั้ว ดังนั้นจึงนำสารสกัด ethyl acetate และ methanol มาแยกต่อเพื่อให้สารที่ได้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นด้วยวิธี Gel Filtration Chromatography โดยใช้ sephadex LH-20 column และใช้ methanol เป็นตัวชะสารตัวอย่าง โดยวิธีการนี้จะแยกสารสกัดทั้งสองชนิดตามขนาดของโมเลกุล โดยสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่จะถูกชะออกมาจากคอลัมน์ก่อน ขณะที่สารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าจะถูกชะออกมาจากคอลัมน์ภายหลัง ซึ่งจากการทดลองสามารถแยก fraction ของสารสกัดทั้งสองชนิดได้อย่างละ 10 fractions ภายหลังจากที่นำสารแต่ละ fraction ไประเหยให้แห้งและนำไปตรวจสอบคุณสมบัติของการออกฤทธิ์เป็นสารยับยั้งเชื้อ HSV-1 พบว่า สารทั้ง 10 fractions ที่แยกได้จากสารสกัด methanol ไม่มีฤทธิ์เป็นสารยับยั้งเชื้อ HSV-1 แต่อย่างใด ขณะที่สารใน fraction ที่ 3-10 ของสารสกัด ethyl acetate ออกฤทธิ์เป็นสารยับยั้งเชื้อ HSV-1 ส่วนสาร fraction ที่ 1 และ 2 ไม่มีคุณสมบัติในการเป็นสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HSV-1 โดยในสาร fraction ที่ 3-5 มีคุณสมบัติในการเป็นสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HSV-1 ค่อนข้างต่ำ ขณะที่ fraction ที่ 6-10 มีคุณสมบัติที่ดีในการเป็นสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HSV-1 ดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติของการเป็นสารยับยั้งเชื้อ HSV-1 ของสารทั้ง 10 fractions ที่แยกได้จากสารสกัด ethyl acetate ของสาหร่ายสไปรูลินา

EtoAc Fraction	Yield (% of total fraction)	Cytotoxicity (IC ₅₀ : µg/ml)	Anti HSV-1 activity	Anti HSV-1 (IC ₅₀ : µg/ml)
F1	0.05	> 50	Inactive	Inactive
F2	2.4	> 50	Inactive	Inactive
F3	12.5	> 50	Active	36.80
F4	64.8	> 50	Active	30.83
F5	15.1	> 50	Active	39.35
F6	3.8	> 50	Active	7.59
F7	0.87	> 50	Active	3.01
F8	0.26	> 50	Active	0.84
F9	0.08	> 50	Active	1.55
F10	0.05	> 50	Active	18.31

F = fraction

ดังนั้นจากผลการทดลองในตารางที่ 4.6 แสดงให้เห็นว่า สารสำคัญใน crude lipid ที่มีคุณสมบัติออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HSV-1 เป็นสารที่มีชื่อและมีขนาดของโมเลกุลไม่ใหญ่มากนัก เพราะถูกแยกออกมาจากคอลัมน์ในช่วง fraction ท้ายๆ (F6-F10) ซึ่งเมื่อพิจารณาจากค่า IC₅₀ ของ fraction ที่ 5 เปรียบเทียบกับ fraction ที่ 6 พบว่า fraction ที่ 6 มีคุณสมบัติออกฤทธิ์เป็นสารยับยั้งเชื้อ HSV-1 ได้ดีกว่า fraction ที่ 5 ถึงประมาณ 6 เท่า โดยมีฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 ใกล้เคียงกับ fraction ที่ 7 อย่างไรก็ตามเพื่อให้ได้สารที่มีประสิทธิภาพและคุณสมบัติที่ดีในการเป็นสารยับยั้งเชื้อ HSV-1 ในการดำเนินงานวิจัยต่อไปจึงเลือกใช้เฉพาะ fraction ที่ 7-10 เท่านั้น ทั้งนี้เพื่อป้องกันปัญหาความคลาดเคลื่อนในการแยก fraction ในแต่ละครั้ง คือ สารใน fraction ที่ 5 บางส่วนอาจปะปนอยู่ใน fraction ที่ 6 ซึ่งจะทำให้ fraction ที่ 6 มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อ HSV-1 ลดลง แต่เมื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารของ fraction ที่ 7 ถึง fraction ที่ 10 พบว่า มีสัดส่วนที่ค่อนข้างน้อยมากเมื่อเทียบกับสัดส่วนทั้งหมดคือ คิดเป็นร้อยละ 1.26 ของ fraction ทั้งหมด ดังนั้นในการทดลองจึงต้องนำสารสกัด ethyl acetate มาแยกผ่าน sephadex LH-20 column ซ้ำหลาย ๆ ครั้ง เพื่อให้ได้ส่วนของ fraction ที่มีคุณสมบัติออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HSV-1 ค่อนข้างดี (F7-F10) ในปริมาณที่มากพอสำหรับนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป ซึ่งภายหลังจากได้สารใน fraction ดังกล่าวในปริมาณที่ต้องการแล้ว จึงรวมสารใน fraction ที่ 7-10 เข้าด้วยกันและนำไปตรวจสอบคุณสมบัติออกฤทธิ์ยับยั้ง HSV-1 พบว่า มีค่า

IC₅₀ 7.62 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสารค่อนข้างบริสุทธิ์นี้มีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อ HSV-1 ดีขึ้นกว่าเดิมที่อยู่ในรูปของสารสกัด ethyl acetate ถึงประมาณ 4 เท่า

กรดแกมมาลิโนลิค (GLA, γ -linolenic acid (C18:3)) เป็นสารออกฤทธิ์ตัวหนึ่งที่มีการกล่าวถึงกันมากในการใช้เป็น antiinflammatory [28, 29] โดยใน crude lipid ของสาหร่ายสไปรูลินามี GLA เป็นองค์ประกอบมากถึงร้อยละ 30 ของกรดไขมันทั้งหมด ทางคณะผู้วิจัยจึงมีสมมุติฐานเบื้องต้นว่า GLA ใน crude lipid อาจมีบทบาทสำคัญที่ทำให้ crude lipid มีฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 ด้วยเช่นเดียวกัน ขณะเดียวกันนี้ทางห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีสาหร่ายมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ได้ทำการกลายพันธุ์สาหร่ายสไปรูลินาสายพันธุ์ดั้งเดิม (สายพันธุ์ C1) ได้เป็นสาหร่ายสายพันธุ์ที่ไม่สร้าง GLA (สายพันธุ์ I30/1) โดยทั้งสองสายพันธุ์มีคุณลักษณะในการเจริญเติบโตและคุณสมบัติการสังเคราะห์แสงคล้ายคลึงกัน (ไม่ได้แสดงผล) แต่มีองค์ประกอบของกรดไขมันแตกต่างกันดังตารางที่ 4.7 ดังนั้นในงานวิจัยนี้ได้ทำการสกัด crude lipid จากสาหร่ายทั้งสองสายพันธุ์และนำไปตรวจสอบคุณสมบัติการเป็นสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 (ตารางที่ 4.8)

ตารางที่ 4.7 องค์ประกอบกรดไขมันของสาหร่ายสไปรูลินาสายพันธุ์ปกติ (C1) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์กลาย (I 30/1)

สายพันธุ์	องค์ประกอบของกรดไขมัน (ร้อยละของกรดไขมันทั้งหมด)						TFA ^a (% DW) ^b	GLA (% DW)
	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3		
C 1	44.8	5.0	1.2	8.1	21.5	19.3	4.8	0.93
I 30/1	46.1	3.4	0.7	5.9	42.6	0	5.8	0

a : กรดไขมันทั้งหมด

b : ร้อยละของน้ำหนักแห้ง

ตารางที่ 4.8 ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติของการเป็นสารยับยั้งเชื้อ HSV-1 ของสาหร่ายสไปรูลินาสายพันธุ์ดั้งเดิม (C1) และสายพันธุ์กลาย (I 30/1)

สายพันธุ์	Cytotoxicity (IC ₅₀ : μ g/ml)	Anti HSV-1 activity	Anti HSV-1 (IC ₅₀ : μ g/ml)
C1	> 50	Active	7.3
I 30/1	> 50	Active	4.1

จากผลคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อ HSV-1 ของ crude lipid ทั้ง 2 สายพันธุ์ ดังตารางที่ 4.8 ข้างต้น พบว่า สายพันธุ์ I30/1 ที่ไม่มี GLA เป็นองค์ประกอบนั้นสามารถออกฤทธิ์เป็นสารยับยั้งเชื้อ HSV-1 ได้ใกล้เคียงกันกับสายพันธุ์ปกติ แสดงให้เห็นว่า GLA ใน crude lipid ของสาหร่ายสไปรูลีนาไม่ได้มีบทบาทต่อการทำให้ crude lipid เป็นสารยับยั้งเชื้อ HSV-1 แต่อย่างใด

ขณะเดียวกันได้นำชั้นของ lipid ทั้งสี่ชั้น คือ MGDG DGDG PG และ SQDG ที่แยกได้จากวิธี TLC และสารใน fraction ที่ 7-10 แยกได้จาก Gel Filtration Chromatography มาวิเคราะห์หาองค์ประกอบของกรดไขมันเพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นว่า สารสำคัญที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 มีองค์ประกอบของกรดไขมันเป็นอย่างไร ซึ่งผลที่วิเคราะห์ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.9 และ 4.10 ตามลำดับ เห็นได้ว่าชั้น PG ซึ่งจัดเป็นสารพวก phospholipid และมีคุณสมบัติออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HSV-1 ได้ดีที่สุดที่ชั้นนั้น มีสัดส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัว γ -linolenic acid (C18:3, GLA) เพียงร้อยละ 1.1 ของไขมันทั้งหมดเท่านั้น ขณะที่ชั้น MGDG และ DGDG ซึ่งมี GLA เป็นองค์ประกอบถึง 42.4 และ 46.5 ตามลำดับ มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ HSV-1 ได้ต่ำกว่า และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับข้อมูลของกรดไขมันจากตารางที่ 4.10 พบว่า fraction ที่ 7-10 มีปริมาณของ GLA ต่ำเช่นเดียวกันคือ มีเพียงร้อยละ 1.1 ของไขมันทั้งหมด แต่ยังสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HSV-1 ได้เป็นอย่างดี

ตารางที่ 4.9 องค์ประกอบของกรดไขมันใน Lipid Class ของสาหร่ายสไปรูลีนา

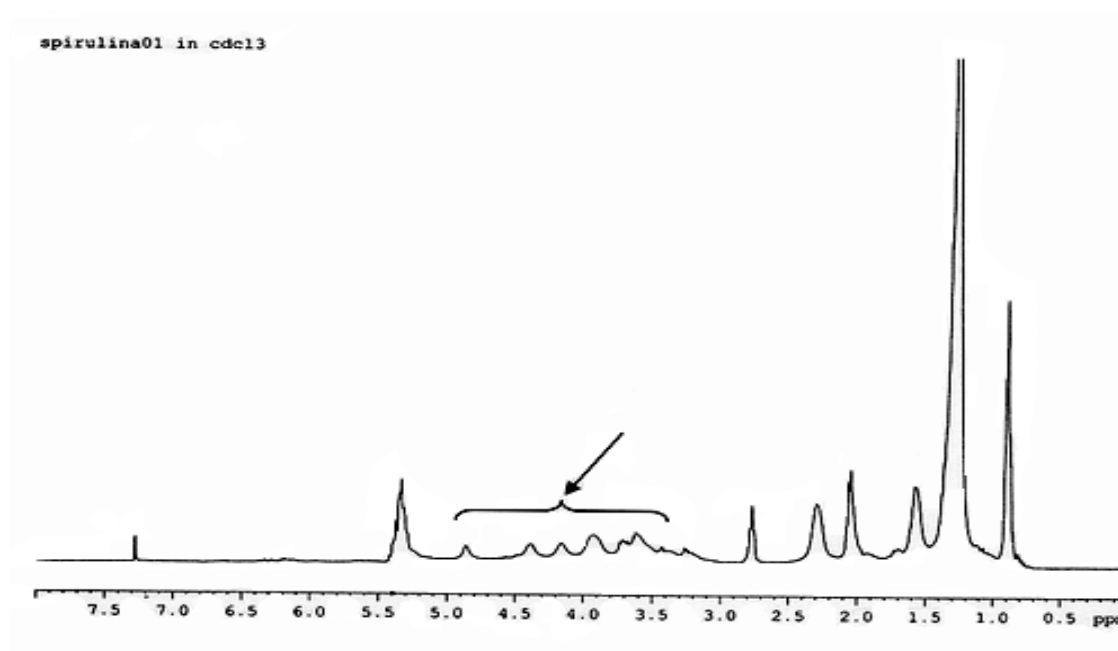
Lipid Class	Fatty acid composition (% of TFA)					
	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
MGDG	44.2	6.4	0.3	1.5	4.3	42.4
DGDG	41.1	6.3	0.3	1.3	4.3	46.5
PG	50.6	0.8	1.3	6.5	39.3	1.1
SQDG	60.8	1.9	2.8	5.5	26.8	2.0

ตารางที่ 4.10 องค์ประกอบของกรดไขมันของสาร fraction ที่ 7 – 10 (F7-F10) ที่แยกได้จาก สารสกัด ethyl acetate ของสาหร่ายสไปรูลีนา

Sample	Fatty acid composition (% of TFA)					
	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
F7-F10	57.6	1.0	0.9	3.5	35.8	1.2

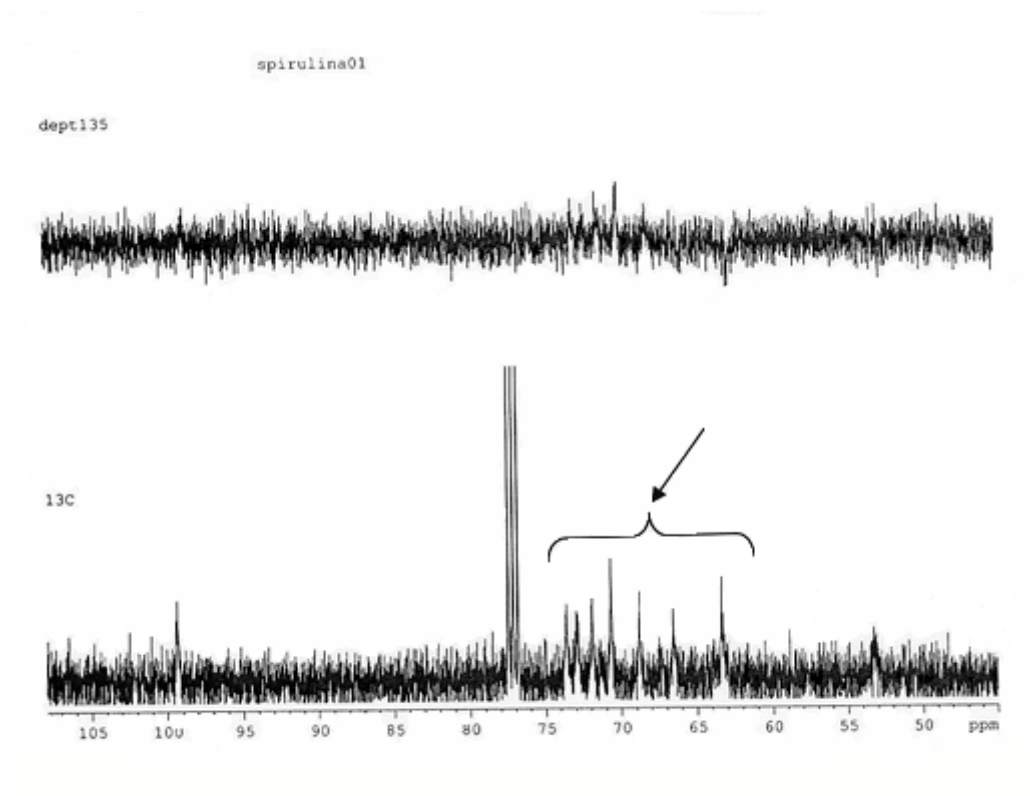
เมื่อพิจารณาองค์ประกอบของกรดไขมันของสาร F7-F10 (ตารางที่ 4.10) เปรียบเทียบกับองค์ประกอบของกรดไขมันที่วิเคราะห์ได้จาก Lipid Class (ตารางที่ 4.9) เห็นได้ว่า F7-F10 มีองค์ประกอบของกรดไขมันสอดคล้องกับองค์ประกอบของกรดไขมันของ Lipid Class 2 ชนิด คือ PG และ SQDG มากที่สุด โดยมีกรดไขมันอิ่มตัว palmitic acid (C16:0) และกรดไขมันไม่อิ่มตัว linoleic acid (C18:2) เป็นองค์ประกอบหลัก ดังนั้นสมมุติฐานเบื้องต้นจึงคาดว่า สารสำคัญที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส HSV-1 ใน fraction F7-F10 อาจเป็น PG และ/หรือ SQDG

ดังนั้นเพื่อทำการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HSV-1 ใน fraction ที่ 7-10 จึงได้นำสาร F7-F10 ไปตรวจสอบสูตรโครงสร้างทางเคมีโดยอาศัยเทคนิคทาง Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR) ทั้ง One Dimension (1D NMR) (ดังรูปที่ 4.3 และ 4.4) และ Two Dimension (2D NMR) (รูปที่ 4.5) พบว่า สารใน fraction เหล่านี้เป็นพวก glycerolipid ที่มีกรดไขมันและน้ำตาลเกาะอยู่โดยจะพบสัญญาณของน้ำตาลและกลีเซอรอลที่ประมาณ 3.5-4.8 ppm และพบสัญญาณที่เป็นของกรดไขมันด้วย (รูปที่ 4.3)

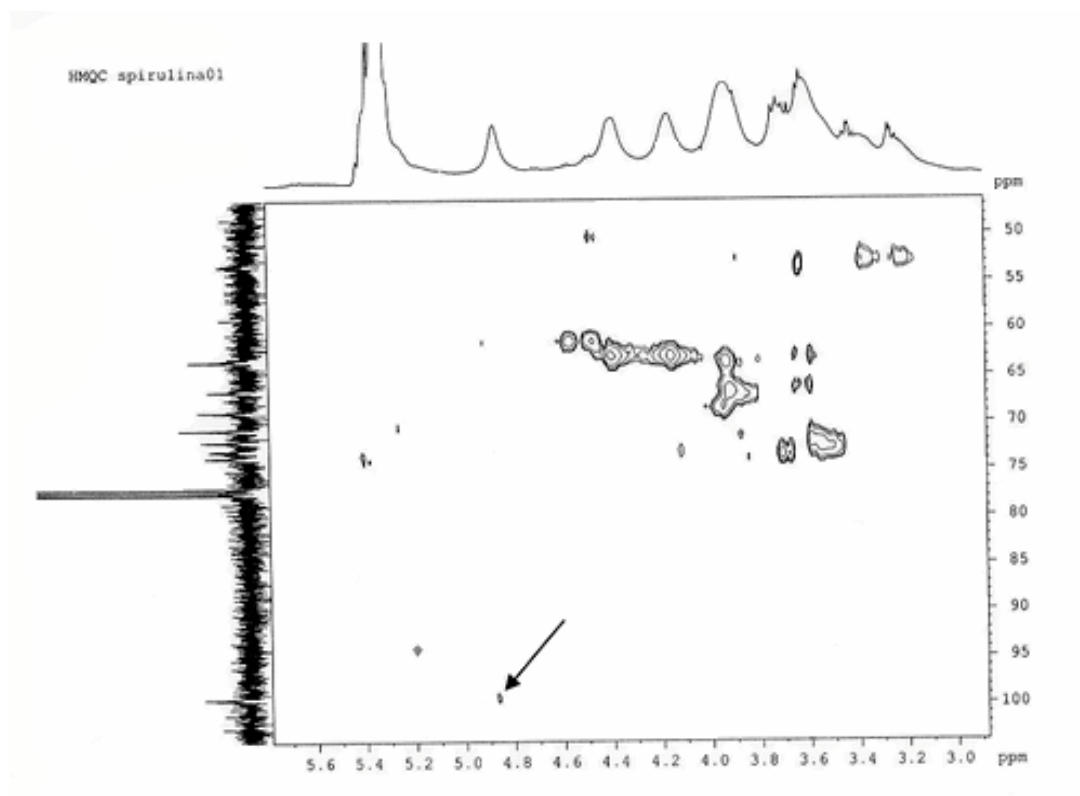


รูปที่ 4.3 ^1H NMR (400 MHz) spectrum (CDCl_3) ของสาร fraction ที่ 7-10

ขณะที่จาก ^{13}C NMR spectrum (รูปที่ 4.4) พบ anomeric carbon ของน้ำตาลที่ตำแหน่งประมาณ 60-75 ppm และจาก HMQC spectrum (รูปที่ 4.5) พบว่า ที่ตำแหน่งประมาณ 100 ppm นั้นคาร์บอนจะ correlate กับโปรตอนตำแหน่งประมาณ 4.85 ppm ซึ่งเป็นตำแหน่งของ anomeric proton

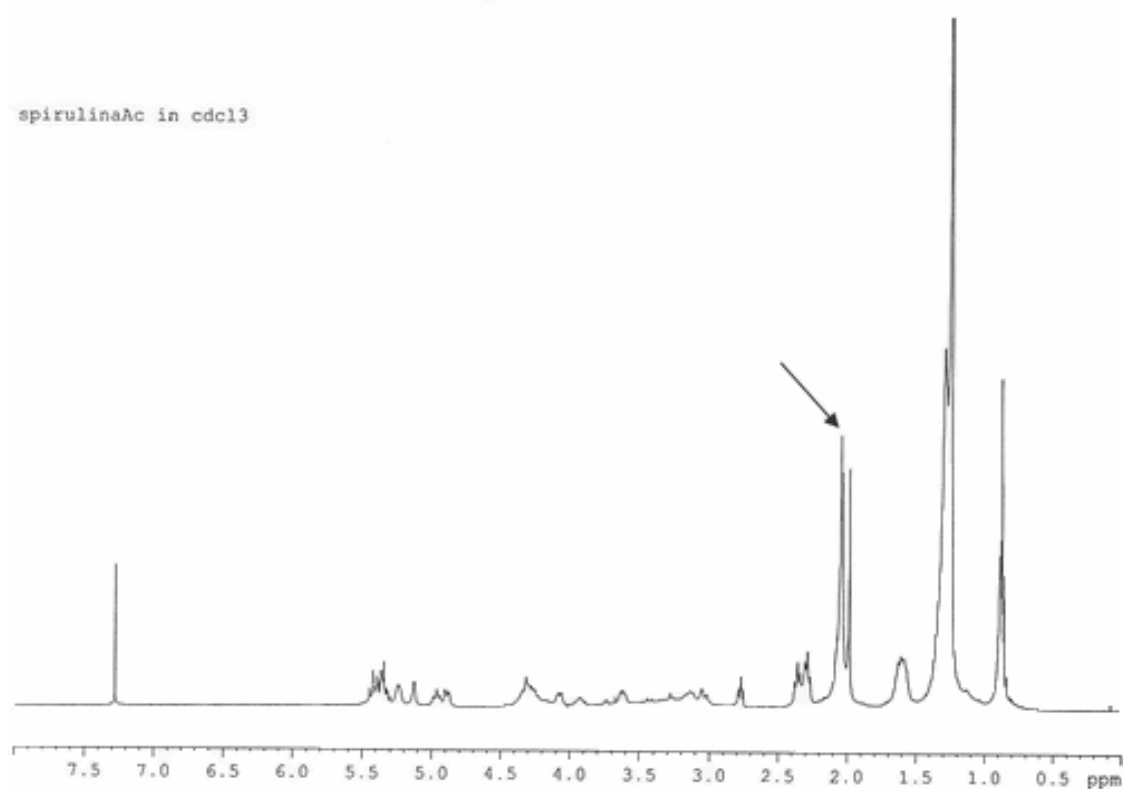


รูปที่ 4.4 ^{13}C NMR (100 MHz) spectrum (CDCl_3) ของสาร fraction ที่ 7-10

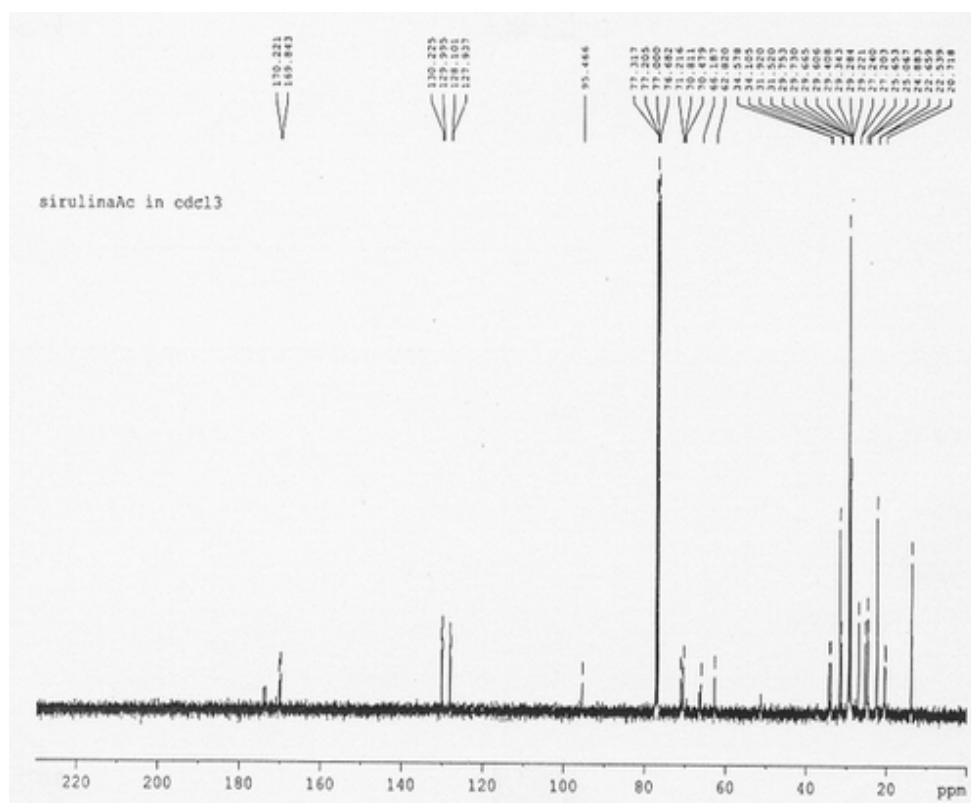


รูปที่ 4.5 HMOC spectrum (CDCl_3) ของสาร fraction ที่ 7-10

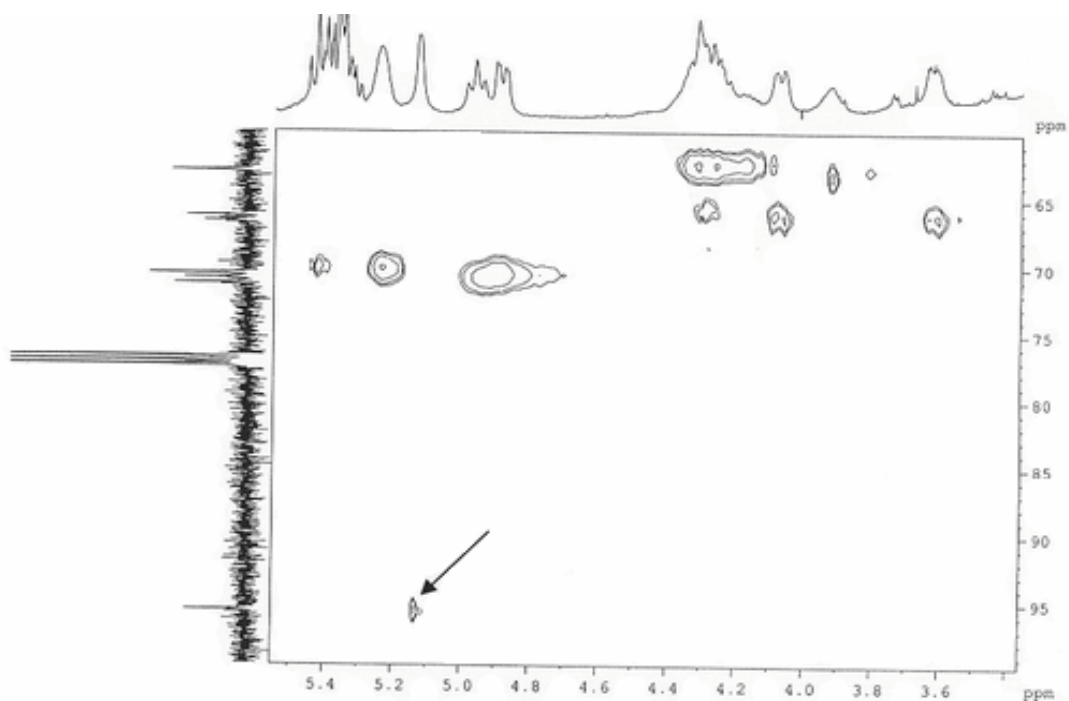
จากการวิเคราะห์ข้อมูลของ NMR spectrum ทำให้ทราบว่าสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส HSV-1 มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบอยู่ในโครงสร้างด้วย ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันว่าสารสำคัญดังกล่าว มีโมเลกุลของน้ำตาลเป็นองค์ประกอบอยู่ในสูตรโครงสร้างจริง จึงได้นำสาร fraction ที่ 7-10 ไปทำปฏิกิริยา Acetylation เพื่อแทนที่หมู่ hydroxyl (-OH) ของโมเลกุลน้ำตาลด้วยหมู่ acetate (-COCH₃) โดยมีสมมุติฐานว่า เมื่อนำผลผลิตที่ได้จากการทำปฏิกิริยา Acetylation มาวิเคราะห์ด้วย NMR จะแสดงสเปกตรัมที่มีความเข้มของสัญญาณเพิ่มมากขึ้น ซึ่งเมื่อนำสารดังกล่าวไปวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างด้วยเทคนิคทาง NMR ทั้ง 1D (รูปที่ 4.6 และ 4.7) และ 2D NMR (รูปที่ 4.8 และ 4.9) พบว่า จากรูปที่ 4.6 ¹H NMR spectrum แสดงสัญญาณไฮโดรเจนอะตอมของ acetate groups ที่ประมาณ 2 ppm นั้นมีความเข้มของสัญญาณมากกว่าเมื่อพิจารณาเทียบกับสเปกตรัมของสาร fraction ที่ 7-10 ก่อนนำมาทำปฏิกิริยา Acetylation (รูปที่ 4.3)



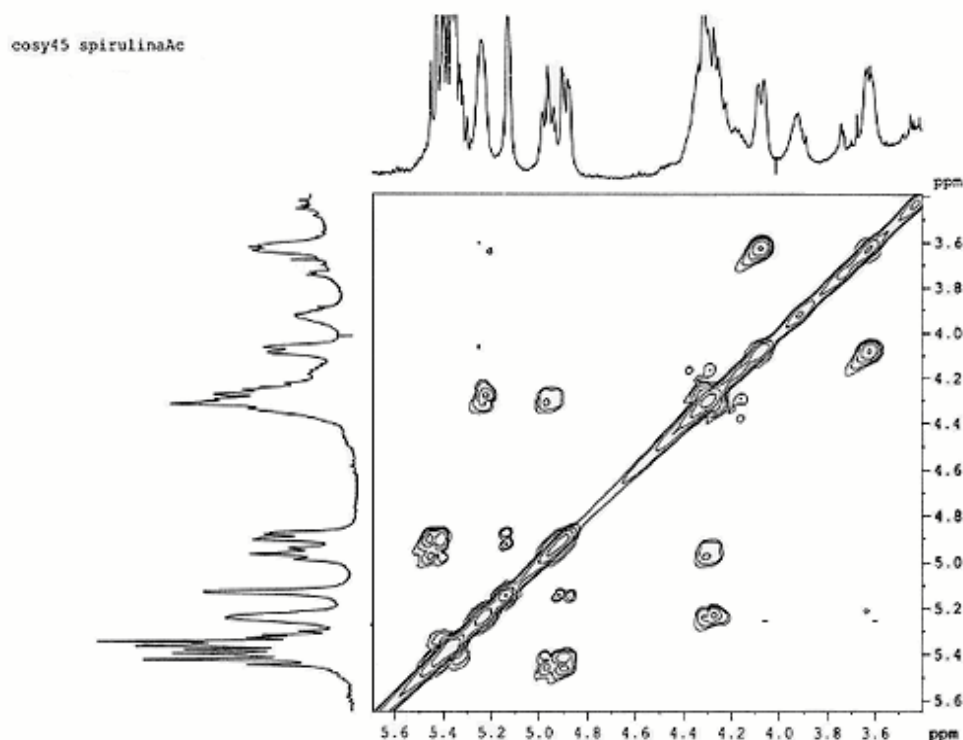
รูปที่ 4.6 ¹H NMR (400 MHz) spectrum (CDCl₃) ของสาร fraction ที่ 7-10 เมื่อนำมาทำปฏิกิริยา Acetylation



รูปที่ 4.7 ^{13}C NMR (100 MHz) spectrum (CDCl_3) ของสาร fraction ที่ 7-10 ภายหลังจากนำมาทำปฏิกิริยา Acetylation



รูปที่ 4.8 HMQC spectrum (CDCl_3) ของสาร fraction ที่ 7-10 ภายหลังจากนำมาทำปฏิกิริยา Acetylation



รูปที่ 4.9 COSY spectrum (CDCl_3) ของสาร fraction ที่ 7-10 ภายหลังจากนำมามีปฏิกิริยา Acetylation

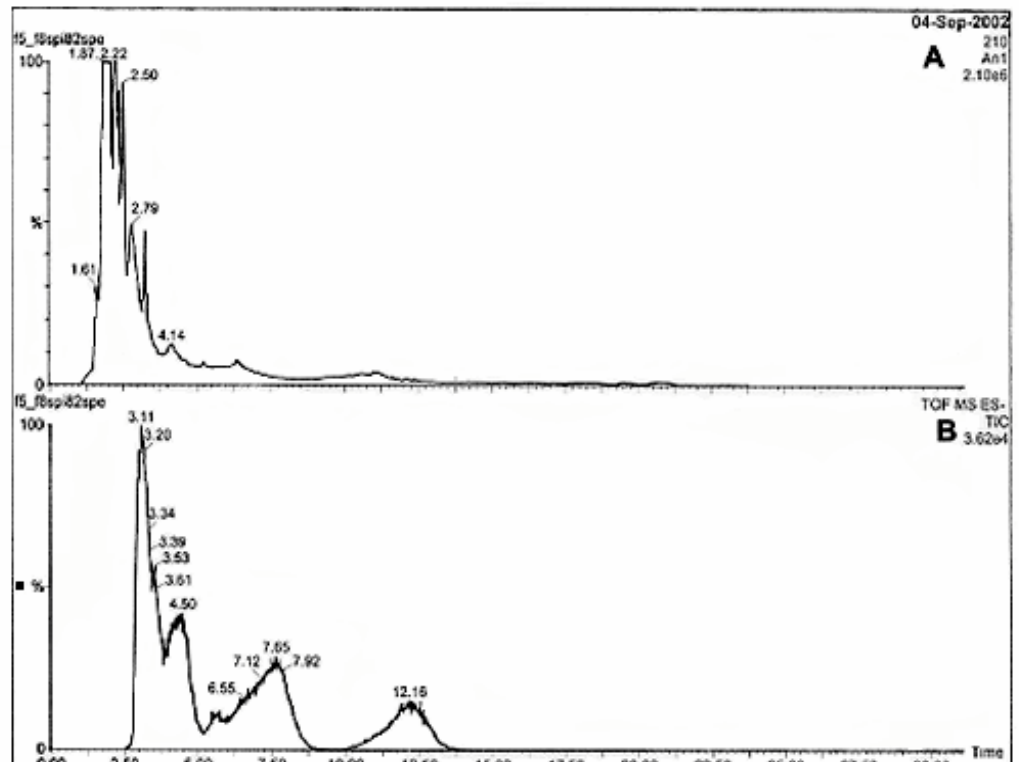
จาก HMQC spectrum (รูปที่ 4.8) พบว่า anomeric proton จะ correlate กับ anomeric carbon ที่ตำแหน่งประมาณ 97 ppm ดังนั้นจึงพบว่า anomeric proton มี pattern ของการ coupling เป็น broad singlet จึงทำให้ทราบว่าน้ำตาลชนิดนี้เป็น α -sugar และจาก COSY spectrum (รูปที่ 4.9) พบว่า โปรตอนในตำแหน่งที่ 2, 3 และ 4 ของน้ำตาลชนิดนี้เป็น axial orientation ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า โครงสร้างของน้ำตาลชนิดนี้มีความคล้ายคลึงกับน้ำตาลกลูโคสมาก ซึ่งจากการค้นคว้างานวิจัยพบว่า น้ำตาลที่คล้ายกลูโคสนี้ชื่อว่า quinovose จากผลการวิจัยที่กล่าวมาในข้างต้นทำให้ทราบว่า สารสำคัญที่ทำให้ crude lipid ของสาหร่ายสไปรูลินาออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 นั้น มีลักษณะของโครงสร้างทางเคมีเป็น glycerolipid ที่มีกรดไขมัน C16:0, C18:2 และน้ำตาล α -quinovose เป็นองค์ประกอบหลัก

จากนั้นเพื่อให้สาร fraction ที่ 7-10 บริสุทธิ์มากขึ้น จึงได้นำสาร fraction ที่ 7-10 มาแยกผ่าน sephadex LH-20 column อีกครั้งหนึ่งและใช้ methanol เป็นตัวชะสารตัวอย่าง ออกจากคอลัมน์เช่นเดิม แต่ในการทดลองครั้งนี้ได้ทำการเก็บ fraction ให้ละเอียดมากกว่า ครั้งแรกคือ ทำการเก็บสารแต่ละ fraction ในปริมาตร 30 มิลลิลิตร ซึ่งจากเดิมที่กำหนดให้แต่ละ fraction มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร พบว่า แยกสารได้ทั้งหมด 18 fractions (F1'-F18') ซึ่งเมื่อนำสารแต่ละ fraction ไปทำให้แห้งและนำไปวิเคราะห์ ^1H NMR spectrum พบว่า spectrum ของสารใน fraction ที่ 5' ถึง fraction ที่ 8' มีลักษณะคล้ายคลึงกับ spectrum ของสาร fraction ที่ 7-10 (รูปที่ 4.3) มาก ดังนั้นจึงทำการรวมสารใน fraction ที่ 5'-8' (F5'-F8') เข้าด้วยกันและนำไประเหยเอาตัวทำละลายออกจนแห้ง จากนั้นแบ่งสาร F5'-F8' มาตรวจสอบคุณสมบัติของการออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 พบว่า สารดังกล่าวมีฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 ใกล้เคียงกับสาร fraction ที่ 7-10 ในขณะเดียวกันได้นำสาร fraction ที่ 5'-8' มาวิเคราะห์หาองค์ประกอบของกรดไขมันด้วยเช่นกัน พบว่า องค์ประกอบของกรดไขมันใน fraction ที่ 5'-8' มีความคล้ายคลึงกับ fraction ที่ 7-10 อย่างมาก คือ มีกรดไขมันอิ่มตัว C16:0 และกรดไขมันไม่อิ่มตัว C18:2 เป็นองค์ประกอบหลัก คือ ประมาณร้อยละ 57 และ 37 ของกรดไขมันทั้งหมดตามลำดับ (ตารางที่ 4.11)

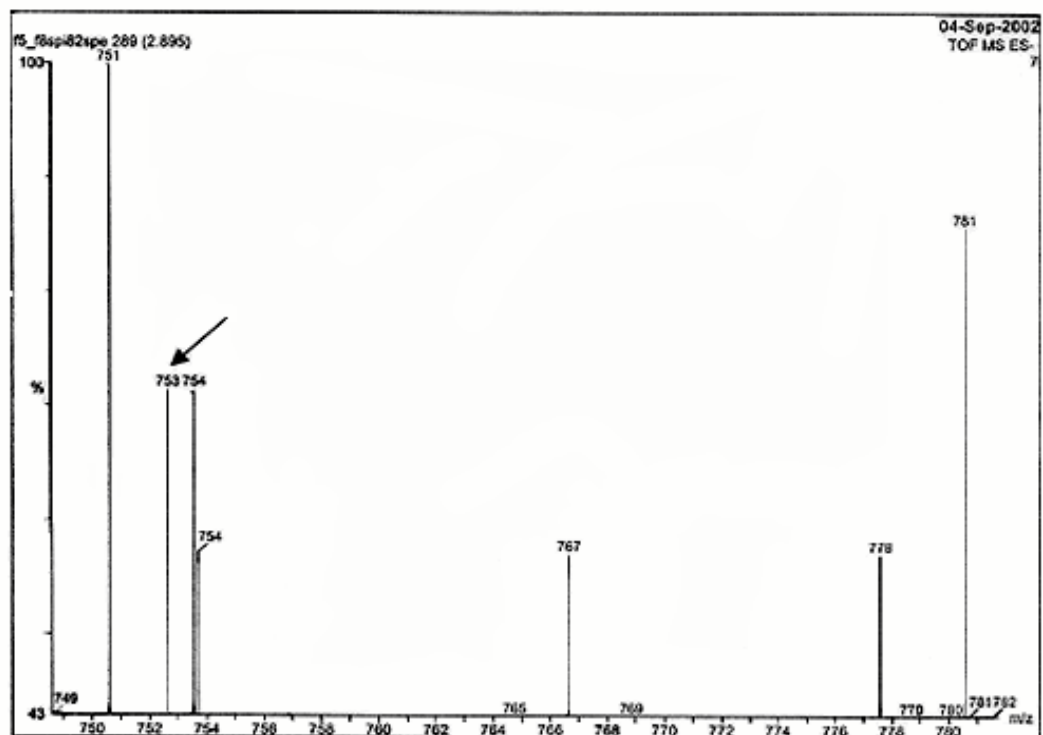
ตารางที่ 4.11 เปรียบเทียบองค์ประกอบของกรดไขมันของสาร fraction ที่ 7-10 (F7-F10) และสาร fraction ที่ 5'-8' (F5'-F8') ที่สกัดได้จากสาหร่ายสไปรูลีนา โดยใช้เทคนิค gas chromatography

Sample	Fatty acid composition (% of TFA)					
	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
F7-F10	57.6	1.0	0.9	3.5	35.8	1.2
F5'-F8'	57.0	1.5	0.4	2.6	37.4	1.1

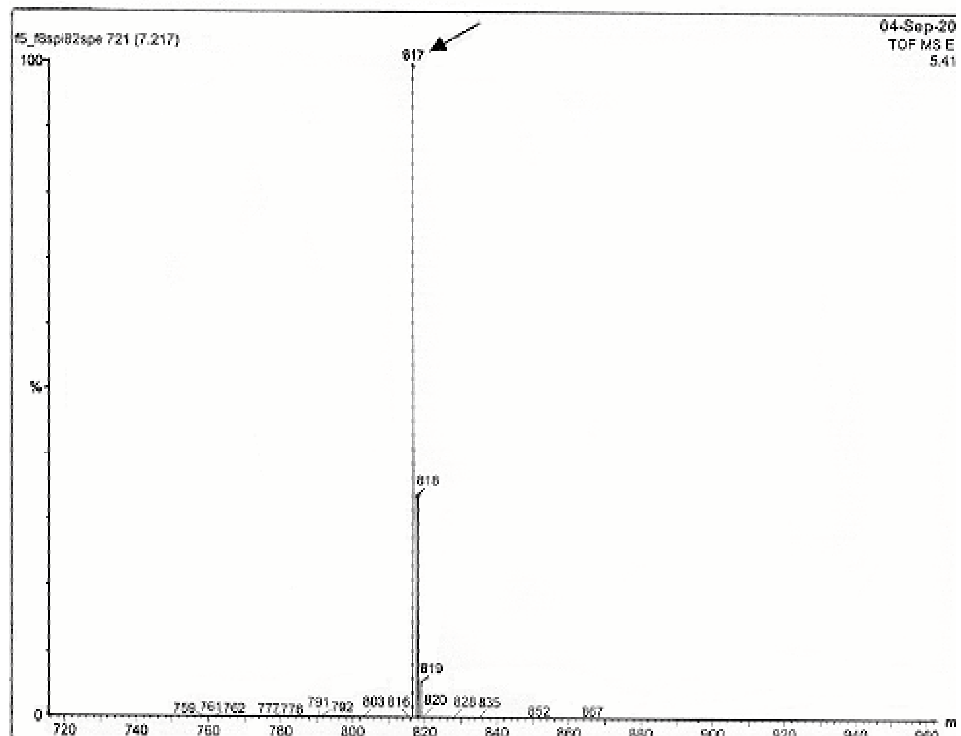
เมื่อนำสาร fraction ที่ 5'-8' มาวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างโดยใช้เครื่อง HPLC-MS ผ่าน C18 reverse phase column และใช้ระบบของตัวพา (mobile phase) คือ acetonitrile : H_2O (80:20) และ UV-detector ที่ความยาวคลื่น 210 nm พบ สารที่เป็นองค์ประกอบหลัก 2 กลุ่ม ซึ่งแสดง peak ที่เวลา 2.9 และ 7.2 นาที โดย fraction ที่ 5'-8' ถูก ionize และให้ chromatogram ดังรูปที่ 4.10 และมีค่า molecular formula จาก ESI-TOF mass spectrum m/z (M-H) เท่ากับ 753 และ 817 (ดังรูปที่ 4.10 และ 4.11 ตามลำดับ) โดยจะพบสารกลุ่มที่สองในสัดส่วนที่มากกว่าสารกลุ่มที่หนึ่ง



รูปที่ 4.10 Chromatogram ของ UV-detector 210 nm (A) และ MS-detector (B) ของสาร fraction 5'-8' เมื่อระบบของตัวทำละลายคือ acetonitrile : H₂O (80:20)



รูปที่ 4.11 ค่า m/z (M-H) = 753 ของสารกลุ่มที่หนึ่ง ออกที่เวลาประมาณ 2.9 นาที

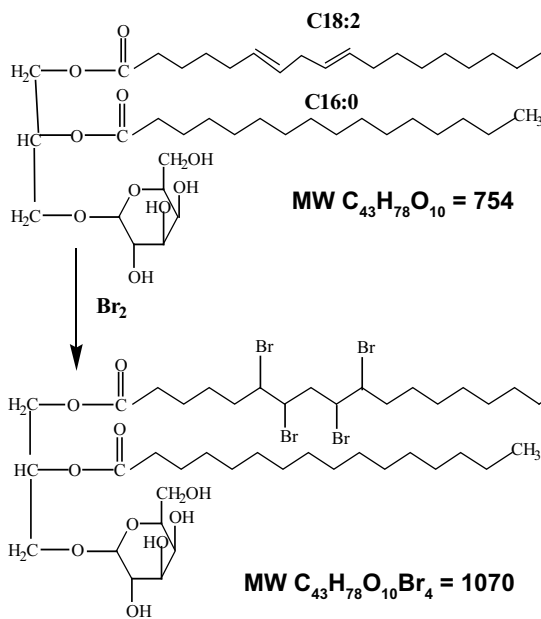


รูปที่ 4.12 ค่า m/z ($M-H$) = 817 ของสารกลุ่มที่สอง ออกที่เวลา 7.2 นาที

เนื่องจาก lipid ในสาหร่ายสไปรูลินาอยู่ในรูปของ triglyceride ที่มีกรดไขมัน esterify อยู่ที่ตำแหน่งที่ 1 (*sn-1*) และ 2 (*sn-2*) ขณะที่ตำแหน่งที่ 3 เป็นตำแหน่งที่ถูกเกาะด้วยโมเลกุลของน้ำตาลหรือหมู่ฟอสเฟต [33] ซึ่งเมื่อพิจารณาจากข้อมูลที่ได้จาก NMR spectrum องค์ประกอบของกรดไขมัน และ HPLC-MS ประกอบกัน พร้อมกับความรู้พื้นฐานทางด้านโครงสร้างของ lipid ในสาหร่ายสไปรูลินาที่ว่า กรดไขมันในกลุ่ม C18 จับอยู่กับกลีเซอรอลด้วยพันธะเอสเทอร์ที่ตำแหน่ง *sn-1* ในขณะที่กรดไขมันกลุ่ม C16 อยู่กับกลีเซอรอลด้วยพันธะเอสเทอร์ที่ตำแหน่ง *sn-2* ดังนั้น เมื่อคำนวณมวลโมเลกุล (molecular weight, MW) ของสารทั้งสองกลุ่มที่พบ โดยการแทนที่กรดไขมันไม่อิ่มตัว C18:2 ที่ตำแหน่ง *sn-1* และกรดไขมันอิ่มตัว C16:0 ที่ตำแหน่ง *sn-2* ส่วนตำแหน่งที่ 3 กำหนดให้เป็นน้ำตาล β -D-galactose และ α -D-quinovose ตามลำดับ จะได้สารที่มีสูตรโครงสร้าง (1) และ (2) ตามลำดับ ดังรูปที่ 4.13 โดยมีมวลโมเลกุล เท่ากับ 754 และ 818 ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการวิเคราะห์โดย MS (mass spectroscopy) คือ พบค่า $M-H$ เท่ากับ 753 และ 817 ตามลำดับ

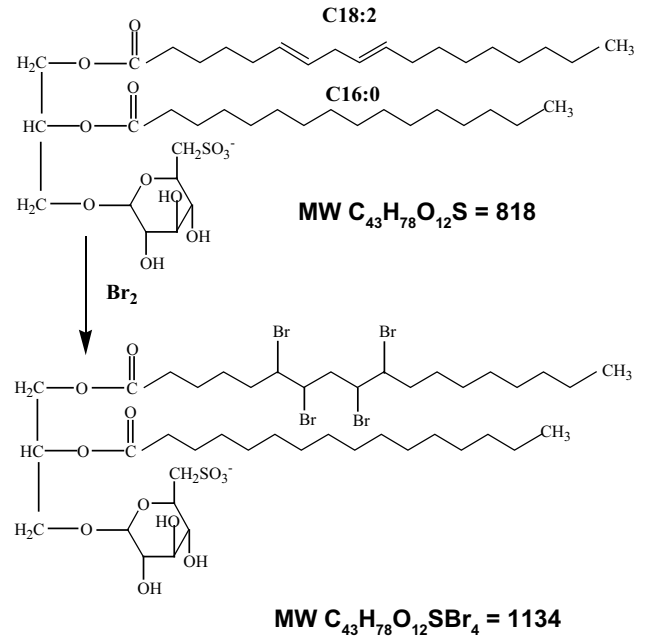
ปฏิกิริยาที่ 1

สารสูตรโครงสร้าง (1) Monogalactosyl diacylglycerol



ปฏิกิริยาที่ 2

สารสูตรโครงสร้าง (2) Sulfoquinovosyl diacylglycerol



สารสูตรโครงสร้าง (3)

สารสูตรโครงสร้าง (4)

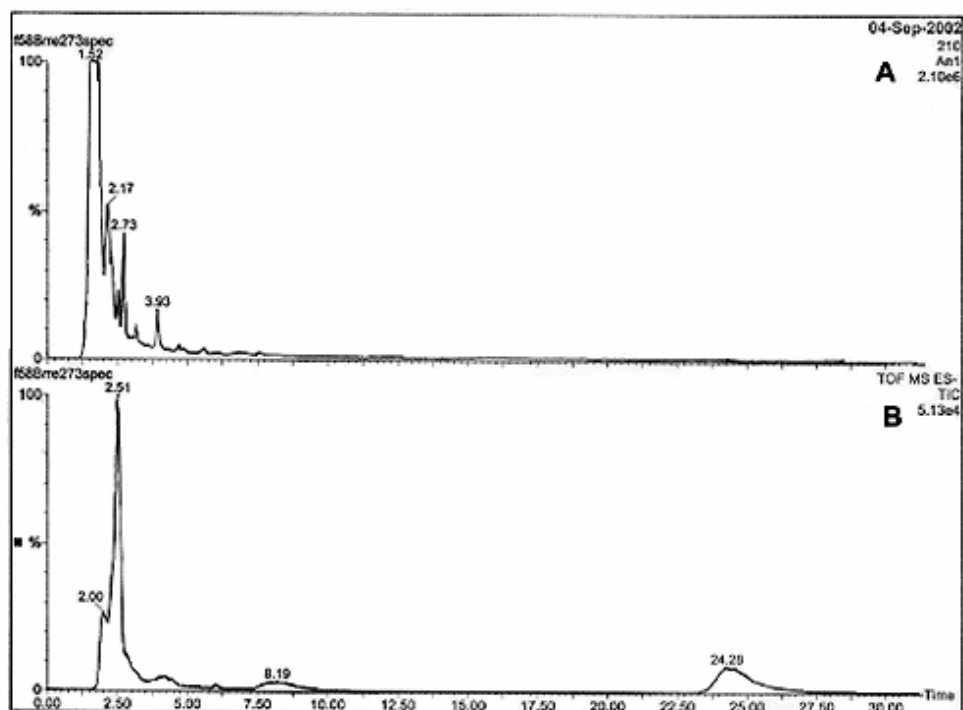
รูปที่ 4.13 ปฏิกิริยา Bromination ของสารสูตรโครงสร้าง (1) และ (2)

เพื่อพิสูจน์ให้แน่ชัดว่า สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 นั้นประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัว C18:2 จริง และจากหลักการแทนที่ของหมู่ฮาโลเจนที่ตำแหน่งพันธะคู่ของกรดไขมันจึงนำ fraction ที่ 5'-8' มาทำปฏิกิริยา Bromination เพื่อให้โบรมีน (Br) เข้าแทนที่ไฮโดรเจนอะตอมที่ตำแหน่งพันธะคู่ของกรดไขมันไม่อิ่มตัว C18:2 ทั้ง 2 ตำแหน่ง คือ ที่ตำแหน่ง $\Delta 9$ และ $\Delta 12$ ดังปฏิกิริยาที่ 1 และ 2 (รูปที่ 4.13) ได้เป็นสารที่มีสูตรโครงสร้าง (3) และ (4) มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 1070 และ 1134 ตามลำดับ

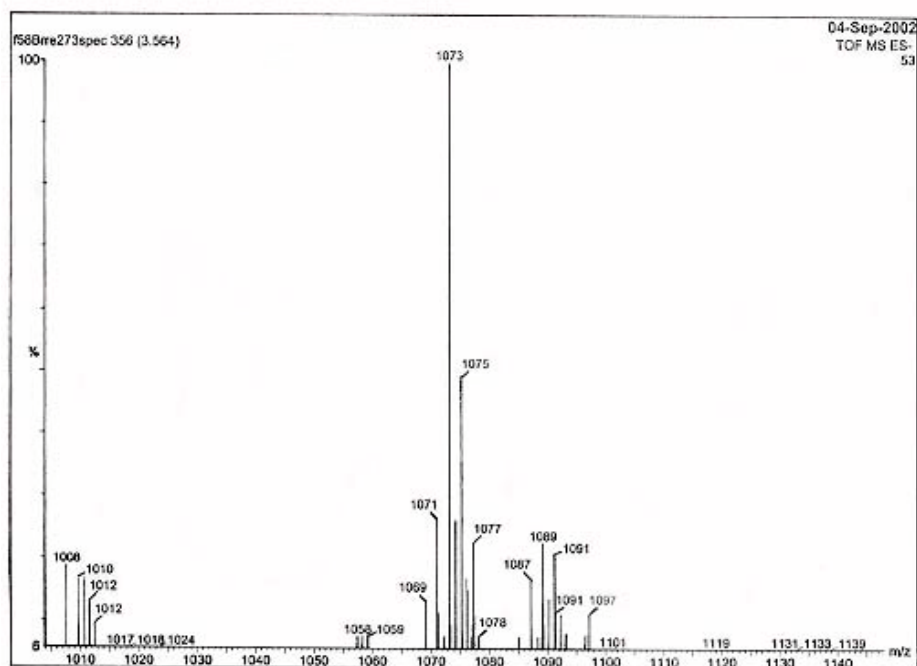
เมื่อนำสารที่ผ่านการทำปฏิกิริยา Bromination มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง mass spectroscopy จะแสดง isotope ratios ที่มีลักษณะเฉพาะคือ พบ isotope peaks ทั้งหมดเท่ากับ $n+1$ peaks และมี isotope ratios เท่ากับ $(a+b)^n$ [120]

- เมื่อ
- a คือ relative abundance of light isotope
 - b คือ relative abundance of heavy isotope
 - n คือ the number of halogen atoms

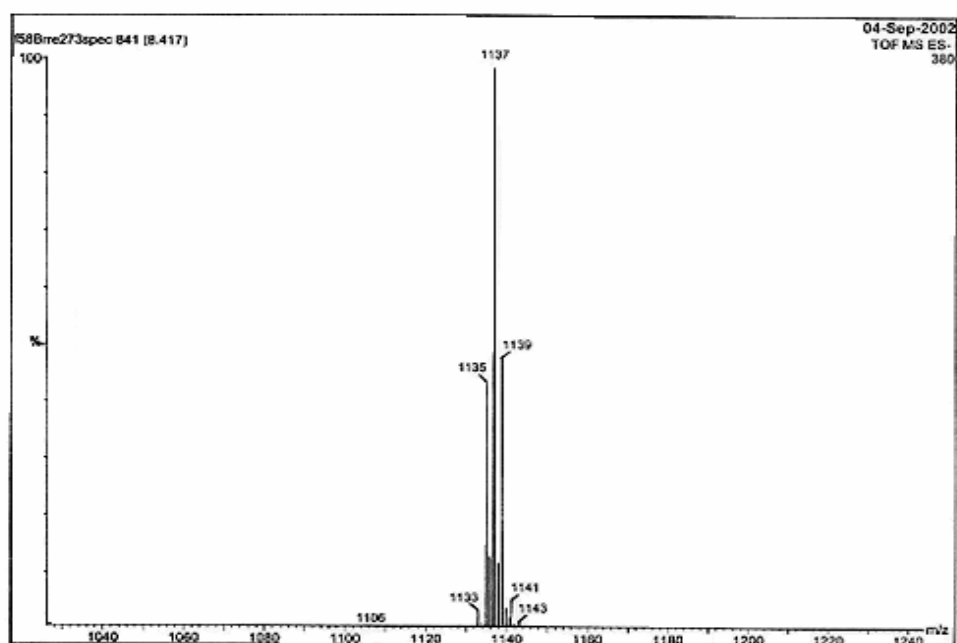
ในกรณีนี้ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นการแทนที่ไฮโดรเจนอะตอมทั้ง 4 อะตอม ด้วยโบรมีน 4 อะตอม (นั่นคือ $a=1$, $b=1$ และ $n=4$) ซึ่งเมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย MS จะได้ isotope peaks $= 4+1 = 5$ peaks และมี isotope ratios $= (1+1)^4 = 1:4:6:4:1$ เมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC-MS โดยใช้ระบบตัวพา (mobile phase) คือ acetonitrile:H₂O (70:30) ดังรูปที่ 4.14 4.15 และ 4.16 ตามลำดับ พบว่า สารทั้งสองถูก ionize และแสดง chromatogram ดังรูปที่ 4.14B โดยมี isotope peaks เท่ากับ 5 peaks คือ สูตรโครงสร้างที่ (3) มีค่า m/z (M-H) ที่เวลา 3.6 นาที เท่ากับ 1069, 1071, 1073, 1075 และ 1077 ขณะที่สูตรโครงสร้างที่ (4) มีค่า m/z (M-H) ที่เวลา 8.4 นาที เท่ากับ 1133, 1135, 1137, 1139 และ 1141 (รูปที่ 4.15 และ 4.16 ตามลำดับ)



รูปที่ 4.14 Chromatogram ของ UV-detector 210 nm (A) และ MS-detector (B) ของสาร fraction 5'-8' ที่ได้จากปฏิกิริยา Bromination เมื่อระบบตัวทำละลาย คือ acetonitrile : H₂O (70:30)

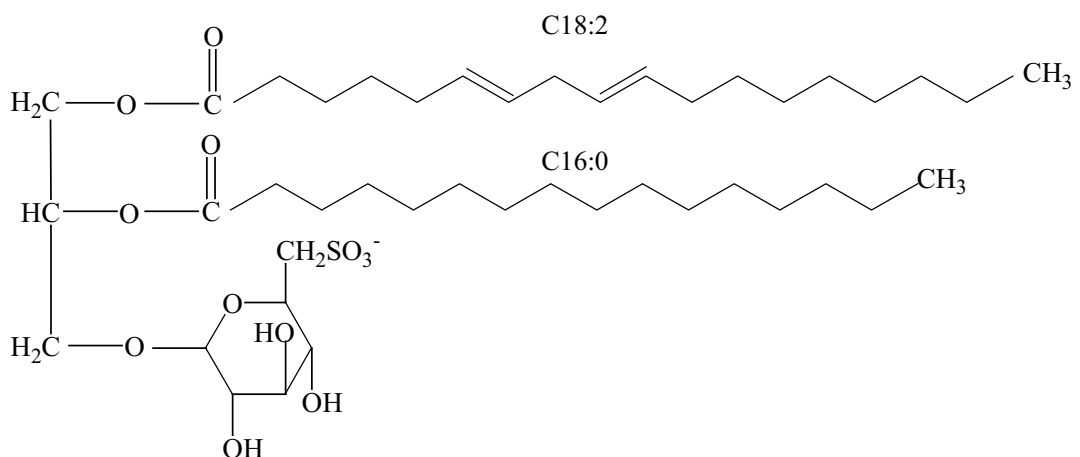


รูปที่ 4.15 ค่า m/z (M-H) = 1069, 1071, 1073, 1075 และ 1077 ของสารสูตร
โครงสร้าง (3) ซึ่งออกที่เวลาประมาณ 3.6 นาที



รูปที่ 4.16 ค่า m/z (M-H) = 1133, 1135, 1137, 1139 และ 1141 ของสารสูตร
โครงสร้าง (4) ซึ่งออกที่เวลาประมาณ 8.4 นาที

จากข้อมูลการดำเนินงานวิจัยซึ่งมุ่งเน้นเพื่อโครงสร้างทางเคมีของสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HSV-1 ใน crude lipid จากสาหร่ายสไปรูลีนาแสดงให้เห็นว่า **สารที่ออกฤทธิ์นั้นจัดเป็นสารกลุ่ม Sulfoquinovosyl diacylglycerol** โดยโครงสร้างของสารแสดงดังรูปที่ 4.17 คือ มีกรดไขมันไม่อิ่มตัว C18:2 และกรดไขมันอิ่มตัว 16:0 esterify อยู่ที่ตำแหน่ง *sn*-1 และ *sn*-2 ตามลำดับ ขณะที่ตำแหน่งที่ 3 ของ glycerol backbone เป็นน้ำตาล α -D-quinovose ที่มี sulfonic acid เป็นองค์ประกอบ ซึ่ง lipids ที่มี sulfonic acid เป็นองค์ประกอบนี้ได้ถูกค้นพบและอธิบายถึงคุณสมบัติทางเคมีเป็นครั้งแรกโดย Benson และคณะ [121] ขณะที่บทบาทของสารกลุ่มนี้ต่อการต้านเชื้อไวรัสได้ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1989 โดย Gustafson และคณะ โดยพบว่า sulfolipid สามารถออกฤทธิ์เป็นสารต้านเชื้อ HIV-1 ที่เป็นสาเหตุของโรคเอดส์ได้ [20] อย่างไรก็ตามในสาหร่ายสไปรูลีนาฯยังไม่มีรายงานถึงคุณสมบัติของสารกลุ่มนี้ในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 ที่ก่อให้เกิดโรคเริ่มแต่อย่างใด ดังนั้นผลการทดลองที่ได้จากงานวิจัยนี้จึงถือเป็นการพบบทบาทที่สำคัญของสาร sulfolipid ที่สกัดแยกได้จากสาหร่ายสไปรูลีนา



รูปที่ 4.17 สูตรโครงสร้างของสาร Sulfoquinovosyl diacylglycerol ที่แยกได้จากสาหร่ายสไปรูลีนา

4.3 การตั้งตำรับยาทาภายนอกจากสารสกัด lipid จากสาหร่ายสไปรูลินา และการศึกษาความคงตัวของสารสกัด EtOAc และตำรับยา

4.3.1 การตั้งตำรับยาทาภายนอกจากสารสกัด lipid จากสาหร่ายสไปรูลินา

จากผลการทดลองในหัวข้อที่ 4.1 เห็นได้ว่าทั้ง crude lipid และ crude hot water polysaccharide มีฤทธิ์เป็นสารต้านเชื้อ HSV-1 แต่ในการตั้งตำรับยาทางผู้วิจัยได้พิจารณาเลือกนำเฉพาะส่วนของสารสกัด EtOAc ที่แยกได้จาก crude lipid ของสาหร่ายสไปรูลินามาใช้เป็น **active ingredient** เท่านั้น ทั้งนี้เนื่องจากสารสกัด EtOAc ดังกล่าวมีขั้นตอนในการสกัดที่ไม่ซับซ้อนและสัดส่วนของ lipid ที่สกัดได้นั้นมีปริมาณมากเมื่อเทียบกับ crude hot water polysaccharide ในการตั้งตำรับยาได้ทดลองทำทั้งหมด 6 ตำรับด้วยกัน โดยตำรับยาที่ตั้งขึ้นนั้นแบ่งเป็น 3 แบบ คือ **แบบที่ 1 Emulgel (hot process)** วิธีการนี้ทำโดยเตรียม emulsion ขึ้นที่อุณหภูมิประมาณ 55-60 องศาเซลเซียสก่อน จากนั้นนำมาผสมกับ gel จะได้ยาพื้นที่เป็น Emulgel แล้วจึงเติมสารสกัด EtOAc ลงไป ได้แก่ ตำรับ SE 001 และ SE 002 **แบบที่ 2 เป็นสูตรตำรับ Emulgel เช่นเดียวกัน แต่จะเตรียมด้วยวิธี Cold process** วิธีการนี้ใช้สารช่วยที่เรียกว่า Emulbase ซึ่งมีข้อดีคือ สามารถเตรียม Emulgel โดยไม่ต้องใช้ความร้อนได้ การเตรียมทำได้โดยการผสมสารสกัด EtOAc กับ Emulbase และเติมน้ำลงไปผสมจนเข้ากัน ได้แก่ ตำรับ SE 003 และ SE 004 **แบบที่ 3 ใช้ยาพื้นที่เรียกว่า Vanishing cream** ซึ่งเป็นสูตรที่นิยมใช้ในครีมทาผิวทั่วไป โดยมี cetyl alcohol, stearyl alcohol และ sodium lauryl sulfate เป็นองค์ประกอบในตำรับ สารสกัด EtOAc จะถูกผสมในส่วนที่เป็น oil phase ของตำรับและผสมกับ water phase ในตำรับเตรียมให้เกิด emulsion ที่อุณหภูมิประมาณ 55-60 องศาเซลเซียส ได้แก่ ตำรับ SE 005 และ SE 006 ซึ่งในทุกตำรับที่กล่าวมาจะมีสารสกัด EtOAc เท่ากันอยู่ร้อยละ 10 เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบและเป็นปริมาณที่ประมาณว่ามีสารออกฤทธิ์ในปริมาณที่มากพอ สำหรับสารช่วยอื่นจะมีปริมาณแตกต่างกันไป ดังตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.12 องค์ประกอบของสารในตำรับยา SE 001, SE 002, SE 003, SE 004, SE 005 และ SE 006

Ingredients (%)	Formulation					
	SE 001	SE 002	SE 003	SE 004	SE 005	SE 006
EtOAc extract	10	10	10	10	10	10
BHT	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
IPM	0.8	0.8	10	5	30	20
Water	66.45	67.05	61.95	66.95	35.19	47.19
PG	10	10	10	10	5	5
Ethanol	5	5	-	-	5	5
Carbopol 940	0.9	0.3	-	-	-	-
Triethanolamine	1	1	-	-	-	-
Polysorbate 60	3.627	3.627	-	-	-	-
Myritol 318	0.8	0.8	-	-	-	-
Sorbitan monostearate	0.373	0.373	-	-	-	-
Paraben concentrate (10% w/w) (MP:PP, 10:2)	1	1	-	-	-	-
Paraben concentrate	-	-	1	1	1	1
Emulbase	-	-	5	5	-	-
Tween 60	-	-	2	2	-	-
Cetyl alcohol	-	-	-	-	5	3
Stearyl alcohol	-	-	-	-	8	8
Sodium lauryl sulfate	-	-	-	-	0.76	0.76

BHT; butylated hydroxy toluene, IPM; isopropyl myristate, PG; propylene glycol, MP; methyl paraben
PP; propyl paraben

จากตารางที่ 4.12 ตำรับ SE 001 มีองค์ประกอบคล้ายกับตำรับ SE 002 ขณะที่ตำรับ SE 003 มีองค์ประกอบคล้ายกับตำรับ SE 004 และตำรับ SE 005 มีองค์ประกอบคล้ายกับตำรับ SE 006 โดยตำรับ SE 002, SE 003 และ SE 006 มีลักษณะทางกายภาพที่ดีกว่า SE 001, SE 004 และ SE 005 ตามลำดับ จึงทำการเลือกมาเพื่อศึกษาความคงตัวทางเคมีของสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 และการตรวจสอบคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสต่อไป

4.3.2 การศึกษาความคงตัวของสารสกัด EtOAc และตำรับยา

การศึกษาความคงตัวของสารสกัด EtOAc และตำรับยา นั้นมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความคงตัวของสารสำคัญที่มีคุณสมบัติออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 ซึ่งอยู่ในสารสกัด EtOAc และตำรับยา ซึ่งข้อมูลที่ได้อาจเป็นประโยชน์เพื่อนำไปใช้ในการคำนวณหาอายุของยาได้เบื้องต้น โดยในงานวิจัยนี้จะทำการทดลอง 2 สภาวะ ด้วยกัน คือ **1. การศึกษาความคง**

ตัวแบบเร่ง เป็นการศึกษาเพื่อที่จะเร่งปฏิกิริยาการสลายตัวหรือการเปลี่ยนแปลงทางเคมีหรือทางฟิสิกส์ของยา โดยการเก็บสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบไว้ในสภาวะที่รุนแรงมากกว่าความเป็นจริง ในทางปฏิบัติจริงได้ทำการทดสอบแบบจุดเดียว (one temperature) คือ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ 75 เปอร์เซ็นต์ **2. การศึกษาความคงตัวที่สภาวะอุณหภูมิห้อง** ซึ่งอุณหภูมิห้องของประเทศไทยมีค่าเฉลี่ยประมาณ 30 องศาเซลเซียส และมีความชื้นสัมพัทธ์ 75-80 เปอร์เซ็นต์

การศึกษาความคงตัวของสารสกัด EtOAc และตำรับยา ทำการศึกษาทั้งความคงตัวทางเคมีของสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HSV-1 ควบคู่กับการนำสารตัวอย่างไปตรวจสอบคุณสมบัติการออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 ด้วย

4.3.2.1 การศึกษาความคงตัวทางเคมีของสารสำคัญ ทำโดยใช้เทคนิคทาง HPLC-MS เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ (SQDG) ที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 ในสารสกัด EtOAc และตำรับยาว่า เมื่อสารตัวอย่างอยู่ในทั้งสองสภาวะข้างต้นเป็นเวลานานขึ้น มีผลให้สารสำคัญที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 มีปริมาณเปลี่ยนแปลงไปหรือไม่อย่างไร เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับปริมาณของสารสำคัญ (SQDG) ที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 ในชั่วโมงที่ 0 โดยกำหนดให้ชั่วโมงที่ 0 สารสกัด EtOAc และตำรับยาทั้ง 3 ตำรับ มีสัดส่วนของสารออกฤทธิ์ SQDG อยู่ 100 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นคำนวณผลเพื่อหาปริมาณสัดส่วนสารออกฤทธิ์ SQDG ที่ลดลง โดยผลการทดลองได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.13

ตารางที่ 4.13 สัดส่วนของสารออกฤทธิ์ SQDG ที่ลดลง (ร้อยละ) ของสารสกัด EtOAc และตำรับยา SE 002, SE 003 และ SE 006 เมื่ออยู่ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลาต่าง ๆ

สภาวะที่ทำการทดลอง		สัดส่วนสารออกฤทธิ์ SQDG ที่ลดลง (ร้อยละ)			
		EtOAc	SE 002	SE 003	SE 006
อุณหภูมิห้อง	- 3 เดือน	3.7±1.0	3.1±1.0	4.3±1.2	4.7±1.4
	- 6 เดือน	5.3±1.2	5.5±1.4	7.1±1.2	16.5±1.5
อุณหภูมิ 45°C	- 1 เดือน	18.9±1.5	20.7±1.7	23.1±1.4	27.7±2.1
	- 2 เดือน	24.2±2.7	28.0±2.1	26.7±1.8	39.4±1.7
	- 3 เดือน	31.2±2.6	35.0±2.2	38.3±2.0	45.6±1.1
	- 6 เดือน	44.5±1.7	42.4±3.5	52.3±5.3	57.8±4.0

จากตารางที่ 4.13 เห็นได้ว่า ที่สภาวะปกติคือ ที่อุณหภูมิห้องเมื่อพิจารณาปริมาณของสารสำคัญ (SQDG) ที่อยู่ในสารสกัด EtOAc พบว่า เมื่อระยะเวลาผ่านไป 3 เดือน และ 6 เดือน สารออกฤทธิ์ SQDG มีสัดส่วนลดลงร้อยละ 3.7 และ 5.3 ตามลำดับเมื่อเทียบกับสารตัวอย่างที่ชั่วโมงที่ 0 ขณะที่ตำรับยา SE 002 สารออกฤทธิ์ SQDG มีสัดส่วนลดลงในปริมาณที่ใกล้เคียงกับสารสกัด EtOAc ส่วนตำรับยา SE 003 สารออกฤทธิ์ SQDG มีสัดส่วนลดลงร้อยละ 4.3 และ 7.1 ตามลำดับ แต่สำหรับตำรับยา SE 006 มีการสลายตัวของสารออกฤทธิ์มากกว่าสารสกัด EtOAc และตำรับยาอีกสองตำรับอย่างเด่นชัด คือ เมื่ออยู่ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 เดือน สารสำคัญลดลงมากถึงร้อยละ 16.5 ทั้งนี้อาจเกิดจากสาเหตุหลายประการด้วยกัน เช่น การเกิดความไม่เข้ากัน (incompatibility) ระหว่างสารออกฤทธิ์ SQDG กับสารช่วยในตำรับส่งผลให้โครงสร้างทางเคมีของสารสำคัญเปลี่ยนแปลงไปและเป็นผลให้ปริมาณของสารสำคัญลดลงอย่างเห็นได้ชัด นอกจากนี้แล้วขบวนการเตรียมอาจมีผลเร่งการสลายตัวของสารสำคัญได้ เนื่องจากสูตรตำรับนี้เป็นเพียงสูตรเดียวที่ทำโดยการนำสารสกัด EtOAc ใส่ลงไป ใน oil phase ขณะที่ร้อนซึ่งอาจมีผลทำให้เร่งการสลายตัวในช่วงแรกของการเตรียมและทำให้สารสลายตัวได้มากกว่าหลังจากเก็บไว้ ขณะที่ในสภาวะเร่งการสลายตัวคือ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เห็นได้อย่างชัดเจนว่า สารสำคัญที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 เกิดการสลายตัวค่อนข้างเร็วกว่าในสภาวะปกติ โดยจะมีการสลายตัวอย่างรวดเร็วมากกว่าร้อยละ 18 ภายในเดือนแรกในทุกสูตรตำรับและสลายตัวช้าลงหลังจากนั้น นอกจากนี้ยังพบว่า ตำรับยา SE 002 ยังคงมีอัตราการสลายตัวของสารออกฤทธิ์ใกล้เคียงกับสารสกัด EtOAc โดยเมื่ออยู่ในสภาวะดังกล่าวเป็นเวลา 6 เดือน สารสำคัญมีปริมาณลดลงร้อยละ 44.5 ขณะที่ตำรับยา

SE 003 มีการสลายตัวของสารออกฤทธิ์มากกว่าสารสกัด EtOAc และตำรับยา SE 002 เพียงเล็กน้อย ส่วนตำรับยา SE 006 มีการสลายตัวของสารสำคัญมากที่สุด โดยเมื่ออยู่ที่สภาวะเร่งเป็นเวลา 6 เดือน สารสำคัญมีปริมาณลดลงถึงร้อยละ 57.8 ซึ่งมากกว่าในสารสกัด EtOAc ถึง 13 เปอร์เซ็นต์ โดยคาดว่า ที่อุณหภูมิสูงอาจเร่งให้สารสำคัญเกิดปฏิกิริยา hydrolysis หรือปฏิกิริยา oxidation ได้ โดยสังเกตจากโครงสร้างทางเคมีของสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 ประกอบด้วย ester bonds และกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่ 2 ตำแหน่ง คือ C18:2 (ดังรูปที่ 4.17) ซึ่งมีแนวโน้มง่ายต่อการเกิดปฏิกิริยา hydrolysis และ/หรือปฏิกิริยา oxidation ดังนั้นปริมาณของสารสำคัญที่วิเคราะห์ที่ลดลงอย่างเด่นชัดอาจเกิดจากการสลายตัวดังที่กล่าวมา นอกจากนี้แล้วยังมีข้อสังเกตว่า ตำรับยา SE 002 ควรเป็นตำรับที่มีความเหมาะสมต่อการนำไปพัฒนาในลำดับต่อไป ทั้งนี้เนื่องจากมีความคงตัวใกล้เคียงกับสารสกัด EtOAc โดยมีอัตราการสลายตัวของสารสำคัญในระดับเดียวกับสารสกัด EtOAc

เนื่องจากโครงสร้างทางเคมีของสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่ 2 ตำแหน่ง คือ C18:2 ซึ่งมีแนวโน้มง่ายต่อการเกิดปฏิกิริยาตามที่กล่าวมา ดังนั้นจึงมีสมมุติฐานว่า การที่ปริมาณของสารสำคัญลดลงนั้นสาเหตุหนึ่งอาจเนื่องมาจากการที่กรดไขมันไม่อิ่มตัว C18:2 เกิดการสลายตัว จึงนำสารสกัด EtOAc ซึ่งอยู่ในสภาวะทั้งสองมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบของกรดไขมัน ดังผลที่แสดงไว้ในตารางที่ 4.14

ตารางที่ 4.14 องค์ประกอบของกรดไขมันของสารสกัด EtOAc เมื่ออยู่ในสภาวะ อุณหภูมิห้องและที่สภาวะเร่งการสลายตัวอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ 75 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลาต่าง ๆ

สารสกัด EtOAc		Fatty acid composition (% of TFA)						% of DW	
		16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	TFA	GLA
อุณหภูมิห้อง	- ชั่วโมงที่ 0	46.4	5.1	1.4	2.2	20.4	24.5	39.2	9.6
		±0.2	±0.5	±0	±0	±0.3	±0.5	±0.7	±0.4
	- เวลา 3 เดือน	46.0	5.0	1.5	2.0	20.8	24.7	39.0	9.6
		±0.4	±0.3	±0.4	±0.3	±0.6	±0.7	±0.6	±0.4
	- เวลา 6 เดือน	46.3	5.5	1.7	2.4	19.9	24.2	38.7	9.4
		±0.3	±0.4	±0.2	±0.1	±0.1	±0.2	±0.4	±0.2
อุณหภูมิ 45°C	- เวลา 1 เดือน	47.6	4.8	1.4	2.3	19.9	24.0	38.3	9.2
		±0.8	±0.1	±0.1	±0.1	±0.2	±0.4	±0.6	±0.3
	- เวลา 2 เดือน	50.3	4.9	1.4	2.1	19.4	21.9	38.0	8.4
		±0.3	±0	±0.1	±0.1	±0.2	±0.2	±0.3	±0.1
	- เวลา 3 เดือน	50.8	5.8	1.7	2.1	18.7	20.9	38.2	7.9
		±0.6	±0.1	±0.3	±0.3	±0.1	±0.1	±0.9	±0.1
	- เวลา 6 เดือน	52.5	5.9	2.8	2.4	17.8	18.7	38.4	6.8
		±0.8	±0.3	±0.1	±0	±0.4	±0.4	±0.4	±0.3

จากตารางแสดงองค์ประกอบของกรดไขมัน (ตารางที่ 4.14) ทำให้ทราบว่า เมื่ออยู่ในสภาวะปกติ (อุณหภูมิห้อง) เป็นระยะเวลานาน 3 และ 6 เดือน สารตัวอย่างคือ สารสกัด EtOAc มีองค์ประกอบของกรดไขมันแต่ละชนิดไม่แตกต่างจากชั่วโมงที่ 0 ของอุณหภูมิห้อง ขณะที่สภาวะเร่งคือ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เมื่อระยะเวลาผ่านไป 1 เดือน องค์ประกอบของกรดไขมันในสารสกัด EtOAc ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเช่นกัน แต่เมื่อสารตัวอย่างอยู่ในสภาวะดังกล่าวนานขึ้นเป็นเวลา 2, 3 และ 6 เดือน ตามลำดับ จะเห็นการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบของกรดไขมันคือ สารสกัด EtOAc จะมีปริมาณของกรดไขมันไม่อิ่มตัว C18:3 และ C18:2 ลดลง และมีการเพิ่มขึ้นของกรดไขมันอิ่มตัว C16:0 และ C18:0 เช่น เมื่อเวลานาน 6

เดือน สารสกัด EtOAc มีกรดไขมัน C18:3 และ C18:2 ลดลงร้อยละ 23.7 และ 12.7 ตามลำดับ และมีสัดส่วนของกรดไขมัน C16:0 และ C18:0 เพิ่มขึ้นร้อยละ 13 และ 100 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับสารสกัด EtOAc ในช่วงเวลาที่ 0 อย่างไรก็ตามการทดลองนี้เป็นการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันทั้งหมดที่อยู่ในสารสกัด EtOAc ไม่ใช้การวิเคราะห์เฉพาะองค์ประกอบของกรดไขมันในสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 เท่านั้น จากข้อมูลที่ได้แสดงให้เห็นว่าเมื่ออยู่ที่สภาวะเร่งเป็นระยะเวลานานขึ้น กรดไขมันไม่อิ่มตัว C18:2 ของสารสกัด EtOAc มีการสลายตัวไปจริง โดยคาดว่าปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัว C18:2 ของสารสกัดที่ลดลงนั้นส่วนหนึ่งอาจเป็นผลมาจากการลดลงของกรดไขมันไม่อิ่มตัว C18:2 ในสารสำคัญด้วย ซึ่งเมื่อกรดไขมันไม่อิ่มตัวดังกล่าวลดลงทำให้โครงสร้างของสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 เปลี่ยนแปลงไปจากโครงสร้างเดิมและเป็นผลให้วิเคราะห์ปริมาณของสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ได้ลดลง

4.3.2.2 การศึกษาคุณสมบัติการออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 ของสารสกัด EtOAc และตำรับยา

จากการวิเคราะห์ความคงตัวทางเคมีของสารสำคัญในสารสกัด EtOAc และตำรับยา ทำให้ทราบว่า สารสำคัญที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส HSV-1 ที่แยกได้จากสาหร่ายสไปรูลินามีความคงตัวต่ำ ดังนั้นเพื่อตรวจสอบว่าปริมาณของสารสำคัญที่สลายตัวไปนั้นสอดคล้องหรือไม่อย่างไรกับคุณสมบัติในการออกฤทธิ์เป็นสารต้านเชื้อ HSV-1 จึงนำสารตัวอย่างซึ่งเก็บไว้ที่สภาวะปกติและสภาวะเร่งมาตรวจสอบคุณสมบัติการออกฤทธิ์เป็นสารต้านเชื้อ HSV-1 ด้วย ดังตารางที่ 4.15 และ 4.16 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.15 การวิเคราะห์คุณสมบัติการออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 ของสารสกัด EtOAc และตำรับยา SE 002, SE 003 และ SE 006 ที่อุณหภูมิห้อง

Sample	Cytotoxicity (IC ₅₀ :µg/ml)	Anti HSV-1 activity	Anti HSV-1 (IC ₅₀ :µg/ml)
สารสกัด EtOAc - ชั่วโมงที่ 0	> 50	Active	6.6
- เวลา 3 เดือน	> 50	Active	11.8
- เวลา 6 เดือน	> 50	Inactive	-
ตำรับยา SE 002 - ชั่วโมงที่ 0	> 500	Active	87.9
- เวลา 3 เดือน	> 500	Active	109.1
- เวลา 6 เดือน	> 500	Active	400.9
ตำรับยา SE 003 - ชั่วโมงที่ 0	> 500	Active	80.4
- เวลา 3 เดือน	> 500	Active	93.8
- เวลา 6 เดือน	> 500	Active	456.4
ตำรับยา SE 006 - ชั่วโมงที่ 0	144.2	Inactive	-
- เวลา 3 เดือน	78.9	Inactive	-

หมายเหตุ ในการวิเคราะห์คุณสมบัติการออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 ของตำรับยา จากวิธีการทดลองที่ 3.15 ซึ่งตามปกติระดับความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบคือ 50 µg/ml แต่ทั้งนี้เนื่องจากตำรับยาแต่ละตำรับมีสารสกัด EtOAc เป็นองค์ประกอบอยู่เพียงร้อยละ 10 ดังนั้นระดับความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบตำรับยา คือ 500 µg/ml

จากตารางที่ 4.15 เมื่อพิจารณาคุณสมบัติการออกฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสของสารสกัด EtOAc พบว่า เมื่ออยู่ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 เดือน สารสกัด EtOAc ออกฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสได้ใกล้เคียงกับที่ชั่วโมงที่ 0 แต่เมื่ออยู่ที่สภาวะดังกล่าวเป็นเวลา 6 เดือน สารสกัด EtOAc ไม่มีฤทธิ์ในการต้านไวรัสเริ่มซึ่งผลที่ได้ไม่สอดคล้องกับการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในตารางที่ 4.13 ที่พบว่า ที่สภาวะอุณหภูมิห้องและระยะเวลา 6 เดือน สารสำคัญมีการสลายตัวไปเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ทั้งนี้สาเหตุอาจเนื่องมาจากการที่สารสกัด EtOAc มีคุณสมบัติออกฤทธิ์ต้านไวรัสเริ่มนั้นอาจประกอบด้วยสารสำคัญที่ออกฤทธิ์มากกว่า 1 ชนิดด้วยกัน ดังนั้นเป็นไปได้ว่าที่สภาวะดังกล่าวสารสำคัญชนิดใดชนิดหนึ่งที่เสริมฤทธิ์ต้านไวรัสอาจสลายตัวไป เป็นผลให้สารสกัด EtOAc ไม่มีฤทธิ์ สำหรับตำรับยา SE 002 พบว่า ที่ระยะเวลา 3 เดือน ยามีคุณสมบัติออกฤทธิ์ต้านไวรัสได้ดีใกล้เคียงกับชุดควบคุมในชั่วโมงที่ 0 แต่ที่เวลา 6 เดือน ตำรับยา SE 002 มีฤทธิ์ลดลงประมาณ 4.5 เท่า เมื่อพิจารณาเทียบกับชั่วโมงที่ 0 ส่วนตำรับยา SE 003 แสดงคุณสมบัติการออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 ทำนองเดียวตำรับยา SE 002 ขณะที่ตำรับยา

SE 006 พบว่า สารมีความเป็นพิษต่อเซลล์และไม่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ HSV-1 ทั้งที่ชั่วโมงที่ 0 และเมื่อระยะเวลาผ่านไป 3 เดือน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากตำรับยา SE006 มีสาร sodium lauryl sulfate ซึ่งเป็น anionic surfactants เป็นองค์ประกอบ โดยสารดังกล่าวเป็น severe irritant ซึ่งอาจมีผลกระทบต่อเยื่อบุเซลล์และทำให้เป็นพิษต่อเซลล์ได้ อย่างไรก็ตามจากการนำยาสังเคราะห์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อเริ่ม ZEVIN CREAM lot number R9A251 (ที่มี Acyclovir เป็นองค์ประกอบอยู่ร้อยละ 5 ของน้ำหนักแห้ง) ซึ่งมีจำหน่ายตามร้านขายยาทั่วไปและผลิตโดยบริษัท BIOLAB ไปวิเคราะห์คุณสมบัติออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 พบว่ามีค่า IC_{50} 246.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นเมื่อพิจารณาจากคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 พบว่า ตำรับยา SE 002 เมื่อเริ่มทำการศึกษามีสารสกัด EtOAc เป็นองค์ประกอบอยู่ร้อยละ 10 ของน้ำหนักแห้งมีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 ดีกว่ายาสังเคราะห์ ZEVIN CREAM (ผลการศึกษานี้เป็นผลที่ได้จาก lot ที่ทำการศึกษาและใช้เพื่อการเปรียบเทียบเชิงวิจัยเท่านั้นไม่สามารถนำไปอ้างอิงสำหรับ lot อื่นหรือเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า)

ตารางที่ 4.16 การวิเคราะห์คุณสมบัติการออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 ของสารสกัด EtOAc และตำรับยา SE 002, SE 003 และ SE 006 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ 75 เปอร์เซ็นต์

Sample	Cytotoxicity (IC ₅₀ : µg/ml)	Anti HSV-1 activity	Anti HSV-1 (IC ₅₀ : µg/ml)
สารสกัด EtOAc - ชั่วโมงที่ 0	> 50	Active	6.6
- 1 เดือน	> 50	Active	39.2
- 2 เดือน	> 50	Active	19.5
- 3 เดือน	> 50	Active	33.7
- 6 เดือน	> 50	Active	20.0
ตำรับยา SE 002 - ชั่วโมงที่ 0	> 500	Active	87.9
- 1 เดือน	> 500	Active	215.1
- 2 เดือน	> 500	Active	139.1
- 3 เดือน	> 500	Active	44.4
- 6 เดือน	> 500	Active	131.0
ตำรับยา SE 003 - ชั่วโมงที่ 0	> 500	Active	80.4
- 1 เดือน	> 500	Inactive	-*
- 2 เดือน	> 500	Active	68.0
- 3 เดือน	> 500	Active	117.8
- 6 เดือน	> 500	Active	224.1
ตำรับยา SE 006 - ชั่วโมงที่ 0	144.2	Inactive	-
- 1 เดือน	78.9	Inactive	-
- 2 เดือน	153.8	Inactive	-
- 3 เดือน	132.7	Inactive	-

* คาดว่าอาจมีความผิดพลาดในส่วนของการวิเคราะห์คุณสมบัติในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1

จากตารางที่ 4.16 แสดงผลการวิเคราะห์คุณสมบัติในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 ของสารตัวอย่างเมื่ออยู่ในสภาวะเร่ง (อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส) พบว่า เมื่ออยู่ที่อุณหภูมิสูงเป็นระยะเวลานานขึ้น สารสกัด EtOAc มีแนวโน้มออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 ได้ลดลง ขณะที่ตำรับยา SE 002 และ SE 003 แสดงผลในการทำงานเหมือนกัน ส่วนตำรับยา SE 006 ให้ผลเช่นเดียวกับที่สภาวะปกติคือ มีความเป็นพิษต่อเซลล์และไม่มีคุณสมบัติออกฤทธิ์เป็นสารต้าน

เชื้อ HSV-1 ดังนั้นอาจสรุปได้ว่าตำรับยา SE 006 มีองค์ประกอบที่ไม่เหมาะสมกับสารสกัด EtOAc ของสาหร่ายสไปรูลีนา สำหรับผลคุณสมบัติการออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 ที่แสดงด้วยค่า IC_{50} ดังตารางที่ 4.16 นั้น ในทางปฏิบัติจริงการวิเคราะห์สารตัวอย่างนั้นมี variation ค่อนข้างสูง อย่างไรก็ตามโดยหลักการของทางเภสัชกรรม การพิจารณาความคงตัวของตำรับยาจะพิจารณาจากความคงตัวของสารสำคัญเป็นลำดับแรก นอกจากนี้การศึกษาความคงตัวของสารสกัดและตำรับยาในงานวิจัยนี้เป็นเพียงการทดลองขั้นต้น (preliminary) เท่านั้น โดยการทดลองได้เลือกใช้อุณหภูมิเพียงจุดเดียวคือ 45 องศาเซลเซียส และเป็นการทดลองในช่วงระยะเวลาเพียง 6 เดือน ซึ่งผลการทดลองที่ได้สามารถอธิบายคุณสมบัติของตำรับยาจากสารสกัด EtOAc จากสาหร่ายสไปรูลีนาได้ไม่มากนัก ดังนั้นถ้าต้องการทราบรายละเอียดเพื่อนำไปใช้คำนวณอายุของยาอาจต้องใช้ระยะเวลาในการศึกษาที่มากกว่านี้รวมทั้งมีความหลากหลายของสภาวะที่ศึกษา เช่น ทำการศึกษาที่อุณหภูมิอย่างน้อย 3 อุณหภูมิขึ้นไป ซึ่งจากข้อมูลที่ได้เมื่อนำมาประมวลกับผลการทดลองของงานวิจัยนี้อาจอธิบายคุณสมบัติของตำรับยาจากสารสกัดของสาหร่ายสไปรูลีนาได้สมบูรณ์ขึ้น

นอกจากการวิเคราะห์ความคงตัวของสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 และการตรวจสอบคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ของสารสำคัญแล้ว เนื่องจากสารสกัด EtOAc ของสาหร่ายสไปรูลีนามีสีน้ำตาลเข้ม ซึ่งสีจัดเป็นคุณสมบัติทางกายภาพของสารอย่างหนึ่งที่ต้องคำนึงถึง ดังนั้นเพื่อให้ทราบว่าสีของสารสกัดมีการเปลี่ยนแปลงไปอย่างไรเมื่ออยู่ในสภาวะดังกล่าว จึงนำสารสกัดมาวิเคราะห์หาปริมาณความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ดังผลตารางที่ 4.17

ตารางที่ 4.17 ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ของสารสกัด EtOAc ที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75 เปอร์เซ็นต์

สารตัวอย่าง	ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ (mg/l)
สารสกัด EtOAc อุณหภูมิห้อง	
- ชั่วโมงที่ 0	34.5 ± 1.2
- 3 เดือน	35.1 ± 2.3
- 6 เดือน	34.0 ± 1.8
สารสกัด EtOAc ที่อุณหภูมิ 45°C	
- 1 เดือน	34.8 ± 2.0
- 2 เดือน	32.1 ± 0.9
- 3 เดือน	30.5 ± 1.4
- 6 เดือน	28.5 ± 0.5

ตารางที่ 4.17 พบว่า สีของสารสกัด EtOAc (วิเคราะห์จากความเข้มข้นของ คลอโรฟิลล์) มีเปลี่ยนแปลงเฉพาะที่สภาวะเร่งเท่านั้น คือ เมื่ออยู่ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2, 3 และ 6 เดือน ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์จะลดลงร้อยละ 7, 12 และ 17 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับสารสกัด EtOAc ชั่วโมงที่ 0

อย่างไรก็ตามจากข้อมูลเบื้องต้นด้านความคงตัวของสารสกัด EtOAc และตำรับยา ที่ได้จากงานวิจัยนี้ทำให้ทราบว่า สารสำคัญที่ออกฤทธิ์ด้านเชื้อ HSV-1 ที่แยกได้จากสาหร่าย สไปรูลินามีความคงตัวต่ำ ดังนั้นตำรับยาที่มีสารสกัด EtOAc จากสาหร่ายสไปรูลินาเป็นองค์ ประกอบอยู่นั้นควรเก็บไว้ในสภาวะที่มีอุณหภูมิต่ำและหลีกเลี่ยงจากแสงด้วยเพื่อป้องกันการ สลายตัวของสารสำคัญรวมทั้งการเปลี่ยนแปลงสีของตำรับยา

4.4 การกำจัดสีของ crude lipid

เนื่องจาก crude lipid ที่สกัดได้จากสาหร่ายสไปรูลินานั้นมีสีน้ำตาลเข้ม ทั้งนี้เพราะตัว ทำละลายอินทรีย์ที่ใช้สกัดนั้นสามารถทำให้รงควัตถุต่าง ๆ ที่อยู่ภายในเซลล์ของสาหร่าย สไปรูลินาถูกสกัดออกมาด้วยเช่นกัน โดยเฉพาะคลอโรฟิลล์ซึ่งเป็นรงควัตถุหลักของสาหร่าย สไปรูลินา การที่ crude lipid มีสีดังกล่าวข้างต้นนั้น ส่งผลทำให้ผลิตภัณฑ์ไม่เหมาะสมต่อการ นำไปใช้งานในบางรูปแบบที่ต้องการความสวยงาม จึงได้ทำการทดลองเพื่อลดความเข้มของสี ดังกล่าว แต่ขณะเดียวกันต้องพยายามรักษาปริมาณของ crude lipid ไว้ด้วยเช่นกัน

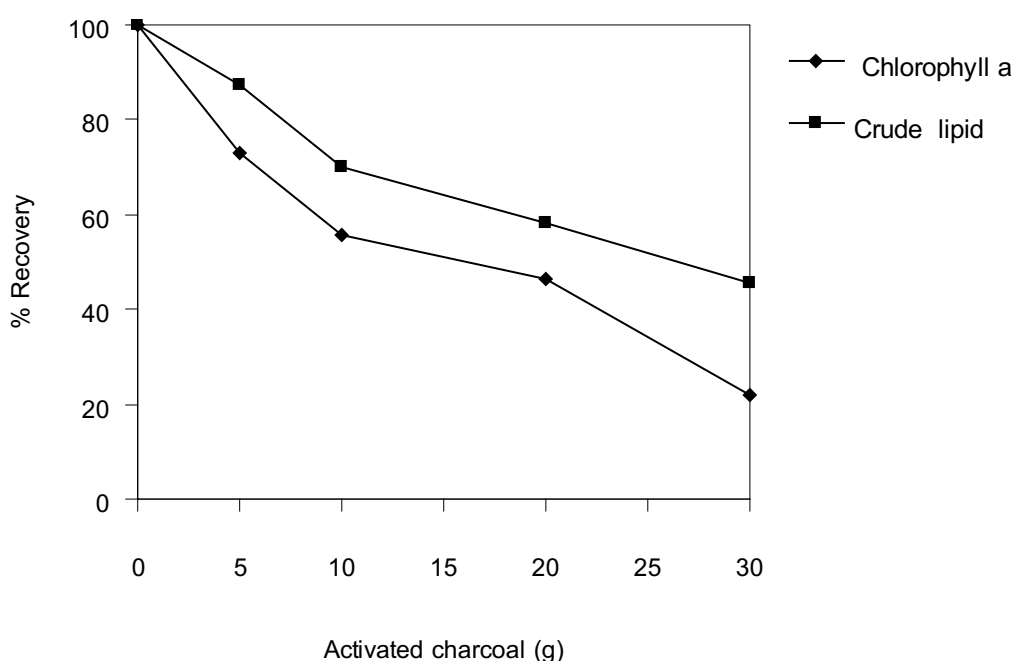
4.4.1 การกำจัดสีโดยใช้ activated charcoal

Activated charcoal เป็นสารที่ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายทั้งทางด้านอุตสาหกรรม และด้านการแพทย์ ในกำจัดกลิ่นและสีที่ไม่ต้องการออกจากผลิตภัณฑ์ ซึ่งงานวิจัยนี้ก็เช่นเดียวกัน ได้ทดลองเติม activated charcoal 5, 10, 20 และ 30 กรัม ลงในสารละลาย crude lipid พบว่า เมื่อใช้ปริมาณของ activated charcoal เพิ่มขึ้น crude lipid ที่ได้มีความเข้มของสี ลดลง แต่อย่างไรก็ตามพบว่า มีการสูญเสียปริมาณของ crude lipid เพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน เพราะสารละลายของ crude lipid บางส่วนจะถูกดูดซับอยู่กับ activated charcoal ด้วย โดย เมื่อเพิ่มปริมาณของ activated charcoal พื้นที่ผิวของการดูดซับจะเพิ่มขึ้นตามไปด้วย เช่น เมื่อเติม activated charcoal เพียง 5 กรัม จะได้ crude lipid คิดเป็นร้อยละ 85 ขณะที่เมื่อ ใช้ activated charcoal เพิ่มขึ้นเป็น 30 กรัม เหลือ crude lipid คิดเป็นร้อยละ 45 นั่นคือมีค่า ลดลงร้อยละ 55 ของ crude lipid ที่ใช้ตอนเริ่มต้น ดังตารางที่ 4.18

ตารางที่ 4.18 ปริมาณของคลอโรฟิลล์และ crude lipid ที่คงเหลือเมื่อใช้ activated charcoal เป็นตัวกำจัดสี

Activated charcoal (g)	Chlorophyll a (mg/l)	% Recovery of crude lipid
5	36.7±1.8	85±5
10	28.1±1.5	70±3
20	23.3±1.2	58±4
30	11.0±0.9	45±3

เมื่อนำข้อมูลจากตารางที่ 4.18 มาพล็อตกราฟระหว่างปริมาณ activated charcoal และ % recovery ของ chlorophyll a และ crude lipid ดังรูปที่ 4.18 พบว่า เมื่อใช้ปริมาณ activated charcoal เพิ่มขึ้น ข้อดีคือ ปริมาณของ chlorophyll a ลดลงซึ่งทำให้ความเข้มข้นของ lipid ลดลงด้วย แต่ข้อจำกัดคือ crude lipid ที่ได้มีปริมาณลดลงค่อนข้างมาก

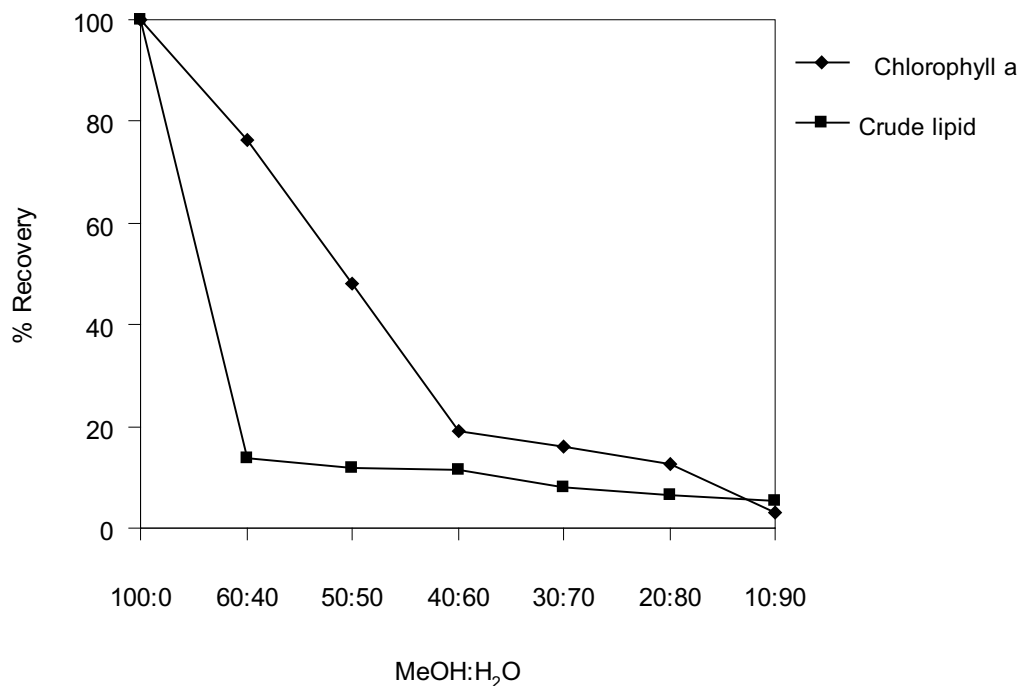


รูปที่ 4.18 ผลของปริมาณ activated charcoal ที่ใช้ในการกำจัดสีต่อ chlorophyll a และ crude lipid

4.4.2 การกำจัดสีของ crude lipid โดยการปรับเปลี่ยนอัตราส่วนของ

ตัวทำละลาย MeOH:H₂O

วิธีการนี้ทำโดยลดสัดส่วนของ MeOH และเพิ่มสัดส่วนของ H₂O ให้มากขึ้น เพื่อให้ glycolipid ที่สกัดได้มีปริมาณของ chlorophyll ออกมาน้อยที่สุด โดยในการทดลองใช้อัตราส่วนของ MeOH:H₂O เป็น 60:40 50:50 40:60 30:70 20:80 และ 10:90 ตามลำดับ พบว่าเมื่อปริมาณของ MeOH ลดลง ปริมาณน้ำเพิ่มขึ้น สีของ lipid ที่สกัดได้มีความเข้มน้อยลงดังรูปที่ 4.19 และ ตารางที่ 4.19 ตามลำดับ



รูปที่ 4.19 ผลของอัตราส่วน MeOH:H₂O ต่อปริมาณ chlorophyll a และ crude lipid

จากรูปที่ 4.19 เห็นได้อย่างชัดเจนว่า การสกัด crude lipid โดยการลดอัตราส่วนของ MeOH และเพิ่มอัตราส่วนของน้ำให้มากขึ้นนั้นให้ผลในการทำงานเดียวกับการใช้ activated charcoal แม้ว่าจะทำให้สีของสารสกัดดีขึ้นแต่ในทางตรงกันข้ามพบว่า มีผลทำให้ปริมาณของ crude lipid ที่ได้ลดลงด้วยเช่นกัน โดยพบว่า เมื่อใช้ MeOH:H₂O ในอัตราส่วน 60:40 ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์มีค่าใกล้เคียงกับการใช้ activated charcoal ปริมาณ 5 กรัม แต่ได้ crude lipid ร้อยละ 13.9 เท่านั้น ขณะที่การใช้ activated charcoal 5 กรัม ได้ crude lipid มากถึงร้อยละ 85 เมื่ออัตราส่วนของ MeOH:H₂O มีสัดส่วนของน้ำอยู่มากที่สุดคือ 10:90 พบว่า

จะกำจัดสีของคลอโรฟิลล์ใน crude lipid ได้เกือบสมบูรณ์ แต่ขณะเดียวกัน crude lipid ที่สกัดได้จะมีเพียงร้อยละ 5 เท่านั้น (ตารางที่ 4.19) ขณะที่รูปที่ 4.20 แสดงให้เห็นสีของสารละลาย crude lipid ที่สกัดด้วย MeOH:H₂O ในอัตราส่วนต่าง ๆ เห็นได้ว่า เมื่อใช้ MeOH:H₂O ที่อัตราส่วน 80:20 และ 90:10 สารละลายของ crude lipid มีสีใสกว่าเมื่อเทียบกับการใช้ MeOH:H₂O ที่อัตราส่วน 40:60

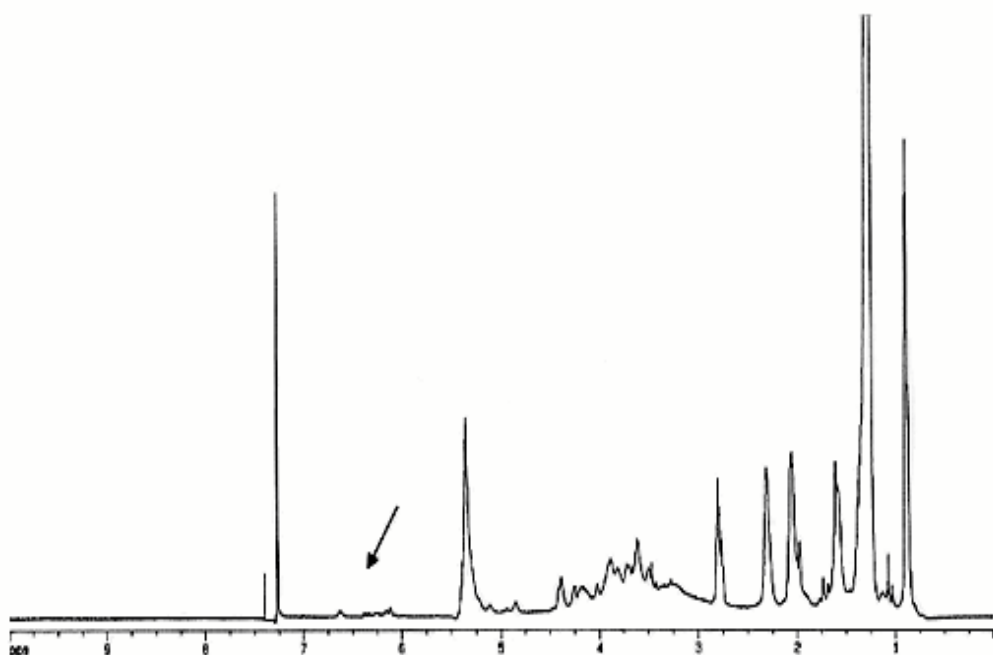
ตารางที่ 4.19 ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์และปริมาณ crude lipid ที่สกัดได้ เมื่อใช้ตัวทำละลาย MeOH:H₂O ในอัตราส่วนต่าง ๆ เป็นตัวสกัด

อัตราส่วนของ MeOH:H ₂ O	คลอโรฟิลล์ (mg/l)	crude lipid (ร้อยละ)
60:40	38.4±0.9	13.9±1.5
50:50	24.2±1.3	12.0±1.2
40:60	9.6±0.5	11.5±0.8
30:70	8.1±0.4	8.0±1.0
20:80	6.3±0.4	6.5±0.7
10:90	1.6±0.2	5.2±0.8

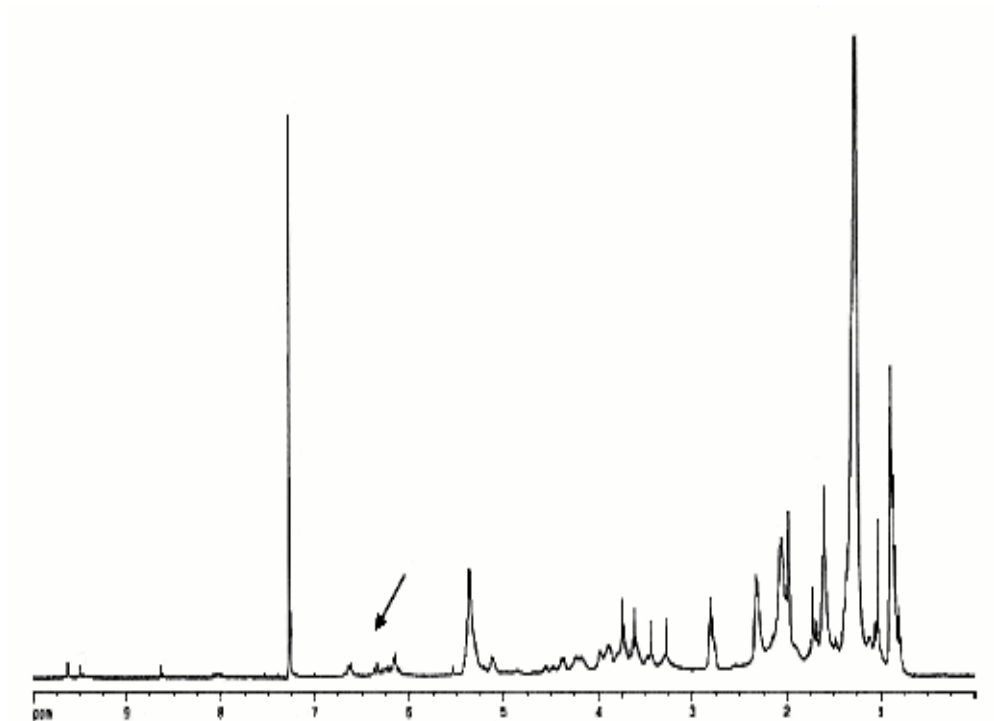


รูปที่ 4.20 เปรียบเทียบสีของสารละลาย crude lipid ที่ได้จากการใช้ MeOH:H₂O ในอัตราส่วน 40:60 50:50 60:40 70:30 80:20 และ 90:10 เป็นตัวสกัดตามลำดับ

ขณะเดียวกันได้นำสารละลายของ crude lipid สองส่วน คือ ส่วนที่ละลายได้และส่วนกากที่ไม่ละลายที่สกัดด้วย MeOH:H₂O (อัตราส่วน 50:50) ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทาง NMR เพื่อเปรียบเทียบความเข้มของสเปกตรัมของคลอโรฟิลล์ พบว่า ส่วนที่ละลายได้ให้สัญญาณของคลอโรฟิลล์ที่ประมาณ 6-6.75 ppm (ดังรูปที่ 4.21) นั้นมีความเข้มของสัญญาณน้อยกว่า ส่วนของกากที่ไม่ละลายในตัวทำละลายระบบดังกล่าว (ดังรูปที่ 4.22) แสดงให้เห็นว่า ส่วนของกากมีปริมาณของคลอโรฟิลล์มากกว่าส่วนที่ละลายได้



รูปที่ 4.21 ¹H NMR (400 MHz) spectrum (CDCl₃) ของสารละลาย lipid ที่ได้จากการนำ crude lipid มาสกัดด้วย MeOH:H₂O ในอัตราส่วน 50:50 โดยปริมาตร

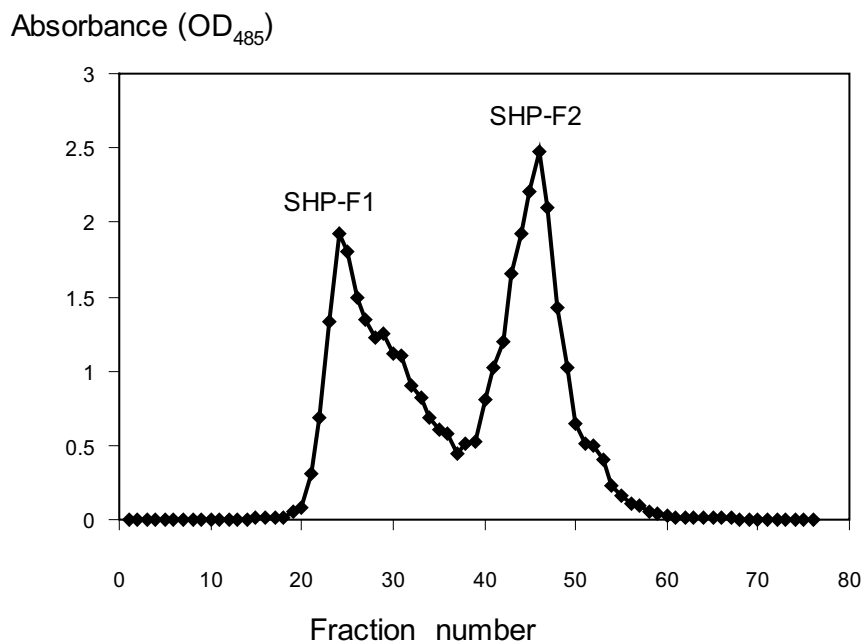


รูปที่ 4.22 ^1H NMR (400 MHz) spectrum (CDCl_3) ของส่วนที่ไม่ละลายที่ได้จากการนำ crude lipid มาสกัดด้วย $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ ในอัตราส่วน 50:50 โดยปริมาตร

การแยกสีกออกจาก crude lipid ของสาหร่ายสไปรูลินาด้วยเทคนิคทั้ง 2 วิธีในงานวิจัยนี้ แม้ว่าขั้นตอนไม่ซับซ้อนและทำให้ความเข้มข้นของ crude lipid ลดลงอย่างชัดเจน ก็ตาม แต่มีผลเสียคือ ทำให้ปริมาณของ crude lipid สูญเสียไปค่อนข้างมาก ซึ่งอาจไม่เหมาะสมในกรณีที่ต้องการผลิตให้ได้สารปริมาณมากๆ อย่างไรก็ตามการแยกสีของคลอโรฟิลล์สามารถทำได้โดยใช้เทคนิคอื่น ๆ เช่น ใช้เครื่อง HPLC ซึ่งสารที่ได้มีความบริสุทธิ์สูงแต่สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายและเวลาดค่อนข้างมาก รวมทั้งผลิตได้ในปริมาณที่น้อยเช่นกัน ดังนั้นการกำจัดสีออกจาก crude lipid มีข้อจำกัดมากมายที่ต้องนำมาพิจารณาประกอบกันเพื่อให้ได้สารที่มีสีสวยงามและได้ปริมาณตามต้องการ

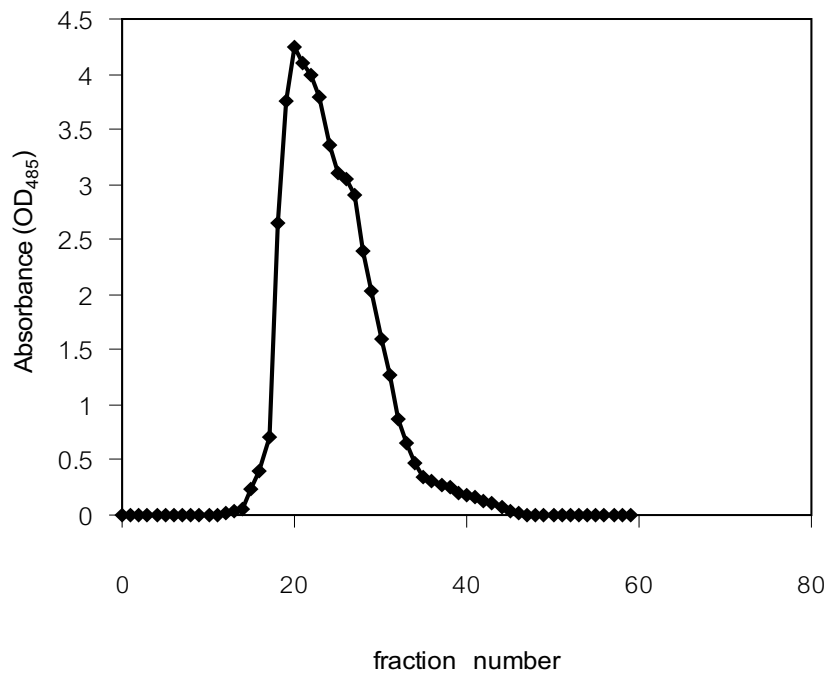
4.4 การศึกษาองค์ประกอบและคุณสมบัติของ crude hot water extract polysaccharide

crude hot water extract polysaccharide ที่สกัดได้จากสาหร่ายสไปรูลินามีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส HSV-1 ใกล้เคียงกับ crude lipid แต่มีขั้นตอนการสกัดที่ซับซ้อนและมีปริมาณเพียงร้อยละ 0.3 ของน้ำหนักสาหร่ายแห้งเท่านั้น ขณะที่ crude lipid สกัดได้ถึงร้อยละ 7 ของน้ำหนักแห้ง ทำให้ crude hot water polysaccharide ไม่เหมาะสมที่จะนำมาเป็นส่วนผสมของตำรับยา อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสนใจที่จะได้ข้อมูลเบื้องต้นของสารสกัดในส่วนนี้ เนื่องจากสารสกัดที่ได้มีลักษณะขาวนวลและมีผลในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HSV-1 ที่ดี ดังนั้นการศึกษาในส่วนของ hot water polysaccharide เบื้องต้นได้นำ crude hot water extract polysaccharide มาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยนำมาแยก fraction ด้วยวิธี Gel filtration chromatography ผ่าน sepharose 6B column หลังจากนั้นนำสารตัวอย่างของแต่ละ fraction ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี phenol-H₂SO₄ และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 485 นาโนเมตร พบว่า ระบบดังกล่าวไม่สามารถแยกสารทั้งสอง fraction ออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ (ไม่ได้แสดงผล) ดังนั้นได้ปรับระบบของตัวชะสารตัวอย่างให้มีความเข้มข้นของ NaCl ลดลง คือ จาก 0.1 โมลาร์ เป็น 0.08 โมลาร์ และลด flow rate จาก 1 มิลลิลิตรต่อนาที เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งพบว่าระบบและสภาวะดังกล่าวยังไม่สามารถแยกสารออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์เช่นกัน โดยพบว่า ได้สาร 2 fractions คือ SHP-F1 และ SHP-F2 (กราฟรูปที่ 4.23) โดย SHP-F2 มีปริมาณร้อยละ 60 ขณะที่ SHP-F1 มีปริมาณร้อยละ 40 ของ crude hot water extract polysaccharide

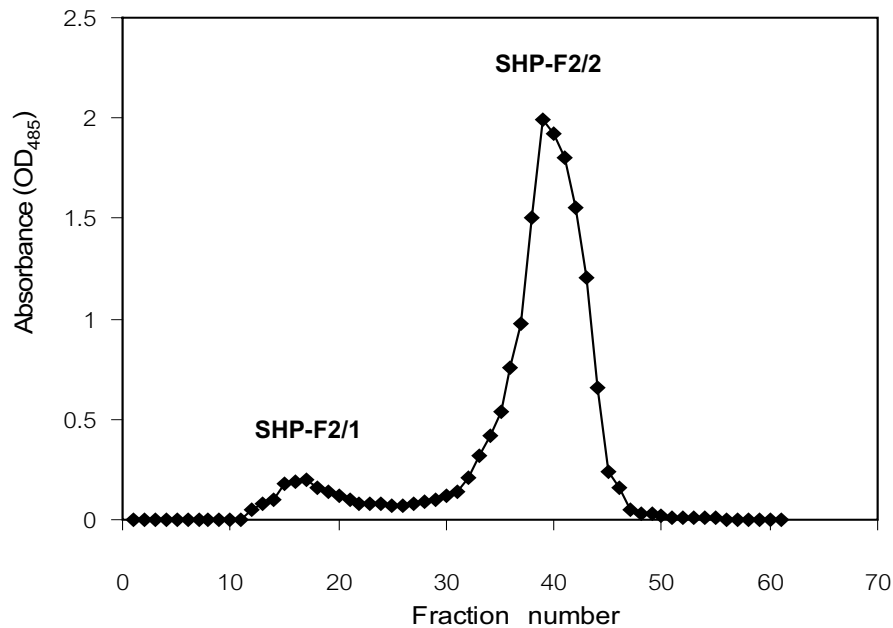


รูปที่ 4.23 Elution profile ของ hot water extract polysaccharide ที่ผ่าน sepharose 6B column และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 485 นาโนเมตร

จากรูปที่ 4.23 เพื่อให้สารทั้งสอง fraction บริสุทธิ์มากขึ้น ได้นำสารแต่ละ fraction (SHP-F1 และ SHP-F2) มาแยกผ่าน sepharose 6B column อีกครั้งหนึ่งโดยใช้สภาวะเดิมในการแยก พบว่า SHP-F1 เป็นสารบริสุทธิ์เพราะแยกได้สารเพียง 1 ส่วน (รูปที่ 4.24) ขณะที่ SHP-F2 ยังไม่บริสุทธิ์เพราะ สามารถแยกได้ 2 ส่วนคือ SHP-F2/1 และ SHP-F2/2 (รูปที่ 4.25)



รูปที่ 4.24 Elution profile ของ SHP-F1 ที่ผ่าน sepharose 6B column และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 485 นาโนเมตร



รูปที่ 4.25 Elution profile ของ SHP-F2 ที่ผ่าน sepharose 6B column และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 485 นาโนเมตร

อย่างไรก็ตามเพื่อให้ทราบว่า การทำให้ crude hot water extract polysaccharide บริสุทธิ์ขึ้นบางส่วนนั้น สารมีคุณสมบัติออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 ดีขึ้นอย่างไร ซึ่งผลการวิเคราะห์ในตารางที่ 4. 20 พบว่า SHP-F1 และ SHP-F2 ออกฤทธิ์เป็นสารต้านเชื้อ HSV-1 ดีกว่า crude hot water extract polysaccharide ประมาณ 4 เท่า และ 2 เท่า ตามลำดับ

ตารางที่ 4.20 ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติในการต้านเชื้อ HSV-1 ของ fraction ที่แยกได้จาก hot water extract polysaccharide ของสาหร่ายสไปรูลินา

Fraction	Cytotoxicity (IC ₅₀ : µg/ml)	Anti HSV-1 activity	Anti HSV-1 (IC ₅₀ : µg/ml)
SHP-F1	> 50	Active	5.25
SHP-F2	> 50	Active	9.61

ขณะเดียวกันได้นำสารทั้งสอง fraction มาวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำตาล ดังตารางที่ 4.21 เห็นได้ว่า แต่ละ fraction มีน้ำตาล rhamnose เป็นองค์ประกอบหลักเช่นเดียวกับงานวิจัยของ Hayashi และคณะ [72] โดย SHP-F2 มีความหลากหลายของชนิดน้ำตาลมากกว่า SHP-F1 นอกจากนี้ได้นำ hot water extract polysaccharide ที่สกัดได้จากสาหร่าย สไปรูลีนา มาวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางชีวเคมีที่สำคัญ เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรตและไขมัน พบว่า hot water extract polysaccharide ที่สกัดได้มีโปรตีนลดลงครึ่งหนึ่ง ขณะที่ปริมาณของ คาร์โบไฮเดรตเพิ่มขึ้น 2 เท่า และไม่พบไขมันเป็นองค์ประกอบเมื่อเปรียบเทียบกับองค์ประกอบที่วิเคราะห์ได้จากสาหร่ายแห้ง (ตารางที่ 4.22)

ตารางที่ 4.21 องค์ประกอบน้ำตาลของ fraction SHP-F1 และ SHP-F2 ที่แยกได้จาก hot water extract polysaccharide และนำไปวิเคราะห์โดยเทคนิค Gas Chromatography

Fraction	% Sugar Composition						
	rhamnose	ribose	arabinose	glucose	mannose	galactose	xylose
SHP-F1	75.6	13.4	11.0	-	-	-	-
SHP-F2	30.4	27.1	10.0	18.2	7.5	4.5	2.3

ตารางที่ 4.22 องค์ประกอบสำคัญของสาหร่ายแห้งและ crude hot water polysaccharide ที่สกัดได้จากสาหร่ายสไปรูลีนา

องค์ประกอบ	ร้อยละของน้ำหนักแห้ง	
	สาหร่ายแห้ง	Crude hot water polysaccharide
คาร์โบไฮเดรต	21.9±0.8	42.5±0.3
โปรตีน	61.4±1.1	31.0±0.8
ไขมัน	7.2±1.3	-
แคลเซียม	ND*	0.123±0.006
ซัลเฟต	ND*	1.44 ±0.03
เถ้า	7.2±0.1	12.9±0.4

*ND ไม่ได้ทำการวิเคราะห์

crude hot water polysaccharide ที่สกัดได้จากสาหร่ายสไปรูลินาด้วยการใช้ CTAB เป็นตัวตกตะกอนนั้น คาดว่ามาจากการทำปฏิกิริยาของซัลเฟตไอออน (SO_4^{2-}) ที่อยู่ใน polysaccharide กับ แอมโมเนียมไอออน (NH_4^+) ของสาร CTAB อย่างไรก็ตามจากตารางที่ 4.22 เห็นได้ว่า polysaccharide ที่ได้นั้นไม่บริสุทธิ์เพราะ มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 30 ซึ่งลดลงไปครึ่งหนึ่งจากเดิมที่มีประมาณร้อยละ 60 ของสาหร่ายแห้ง การที่มีโปรตีนปนอยู่ใน polysaccharide นั้นอาจเนื่องมาจากสารที่ใช้ในการตกตะกอนคือ CTAB มีคุณสมบัติที่สามารถตกตะกอน DNA ได้เช่นเดียวกัน ดังนั้นถ้าสามารถแยกเอาโปรตีนที่ปนอยู่ใน crude hot water polysaccharide ออกได้ อาจทำให้ polysaccharide ดังกล่าวมีความบริสุทธิ์มากขึ้น ทางผู้วิจัยได้ทดลองนำสารละลายของ crude hot water extract polysaccharide มาตกตะกอนด้วย trichloroacetic acid (TCA) โดยใช้ TCA ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10, 20, 30 และ 50 ตามลำดับ จากนั้นนำส่วนที่ไม่ตกตะกอนไปทำให้แห้ง แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตอีกครั้งหนึ่ง ดังตารางที่ 4.23

ตารางที่ 4.23 ปริมาณคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนที่วิเคราะห์ได้ หลังจากการนำ crude hot water polysaccharide มาตกตะกอนด้วย TCA

ความเข้มข้นของ TCA (เปอร์เซ็นต์)	ร้อยละของ crude hot water polysaccharide	
	คาร์โบไฮเดรต	โปรตีน
10	41.8±1.5	28.1±2.1
20	45.3±1.8	25.4±1.3
30	49.2±2.3	22.3±1.5
50	53.1±2.0	18.0±0.8

จากการทดลองพบว่า วิธีดังกล่าวทำให้ crude hot water polysaccharide บริสุทธิ์ขึ้น คือ ที่ความเข้มข้นสูงสุดของ TCA ที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีน คือ 50% TCA พบว่า มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตเพิ่มขึ้นประมาณร้อยละ 25 ขณะที่โปรตีนลดลงร้อยละ 42.0 เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับ crude hot water polysaccharide ก่อนนำมาตกตะกอน นอกจากนี้ถ้าต้องการให้ crude polysaccharide มีความบริสุทธิ์ขึ้นมากกว่านี้ อาจปรับปรุงวิธีการสกัดโดยนำสารละลายของสาหร่ายมาตกตะกอนด้วย TCA เพื่อแยกเอาโปรตีนออกก่อน จากนั้นจึงนำไปตกตะกอน polysaccharide ด้วย CTAB

เนื่องจากมีรายงานว่าแคลเซียมและซัลเฟตใน crude hot water polysaccharide ที่สกัดได้จากสาหร่ายสไปรูลินาเป็นองค์ประกอบที่มีบทบาทสำคัญต่อการทำให้ crude hot water polysaccharide มีสมบัติออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HSV-1 [72] ดังนั้นการทดลองต่อไปนี้ได้กำจัดแคลเซียมและซัลเฟตใน crude hot water polysaccharide ออกและนำสารตัวอย่างที่ได้ไปตรวจสอบคุณสมบัติของการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HSV-1 ดังตารางที่ 4.24

ตารางที่ 4.24 ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติของการเป็นสารยับยั้งเชื้อ HSV-1 ของ crude hot water polysaccharide ปกติ และ hot water polysaccharide ที่ไม่มี Ca และ SO_4^{2-} เป็นองค์ประกอบ

Sample	Cytotoxicity (IC_{50} : $\mu\text{g/ml}$)	Anti HSV-1 activity	Anti HSV-1 (IC_{50} $\mu\text{g/ml}$)
Crude hot water polysaccharide	> 50	Active	21.3
Crude hot water polysaccharide (-Ca)	> 50	Active	38.4
Crude hot water polysaccharide ($-\text{SO}_4^{2-}$)	> 50	Inactive	-

จากตารางที่ 4.24 พบว่า crude hot water polysaccharide ที่ไม่มีแคลเซียมเป็นองค์ประกอบยังแสดงคุณสมบัติของการออกฤทธิ์เป็นสารยับยั้งเชื้อ HSV-1 แต่ออกฤทธิ์ได้ต่ำกว่า crude hot water polysaccharide ปกติ คือ มีค่า IC_{50} เพิ่มขึ้นเป็น 38.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่ crude hot water polysaccharide ที่ถูกกำจัดเอาซัลเฟตออกนั้น ไม่มีคุณสมบัติของการเป็นสารยับยั้งเชื้อ HSV-1 แสดงให้เห็นว่า ทั้งแคลเซียมและซัลเฟตเป็นองค์ประกอบสำคัญที่ทำให้ crude hot water polysaccharide มีสมบัติของการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HSV-1 โดยซัลเฟตมีบทบาทต่อการออกฤทธิ์มากกว่าแคลเซียม เพราะถ้าไม่มีซัลเฟตเป็นองค์ประกอบจะส่งผลให้ polysaccharide ไม่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ HSV-1 ขณะที่การขาดแคลเซียมจะทำให้มีฤทธิ์น้อยลงเท่านั้น

บทที่ 5 สรุปผลการดำเนินงานวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยนี้ศึกษาหาสารจากสาหร่ายสไปรูลินาที่มีคุณสมบัติออกฤทธิ์เป็นสารต้านเชื้อ HSV-1 ที่ก่อให้เกิดโรคเริม พบว่า มีสารสกัด 2 ส่วนที่มีคุณสมบัติดังกล่าวคือ crude lipid และ crude hot water extract polysaccharide โดยสารทั้ง 2 ชนิด มีฤทธิ์ใกล้เคียงกัน คือ มีค่า IC_{50} 17.28 และ 21.32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ การแยกและสกัดสารทั้ง 2 ชนิดจากสาหร่ายสไปรูลินาตามวิธีการดังรูปที่ 3.1 นั้นสามารถสกัด crude lipid ได้มากกว่า crude hot water extract polysaccharide ถึง 23 เท่า

อย่างไรก็ตามการศึกษาเพื่อหาโครงสร้างทางเคมีของสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 นั้นทำเฉพาะ crude lipid เท่านั้น เนื่องจากสารดังกล่าวมีปริมาณสูงและมีขั้นตอนการสกัดที่ไม่ซับซ้อน ไม่สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายเมื่อพิจารณาเทียบกับ crude hot water extract polysaccharide การแยก crude lipid และทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Gel filtration chromatography และพิสูจน์หาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารสำคัญโดยอาศัยเทคนิค NMR, HPLC-MS และ GC พบว่า สารสำคัญที่ทำให้ crude lipid มีฤทธิ์เป็นสารต้านเชื้อ HSV-1 คือ สารกลุ่ม sulfoquinovosyl diacylglycerol ที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัว C18:2 และกรดไขมันอิ่มตัว 16:0 esterify อยู่ที่ตำแหน่ง sn-1 และ sn-2 ตามลำดับ ขณะที่ตำแหน่งที่ 3 ของ glycerol backbone เป็นน้ำตาล α -D-quinovose ที่มี sulfonic acid เป็นองค์ประกอบ เมื่อทดสอบผลของสารบริสุทธิ์ที่ได้ต่อการออกฤทธิ์เป็นสารต้านเชื้อ HSV-1 พบว่า มีค่า IC_{50} เป็น 7.62 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อ HSV-1 ดีกว่า crude lipid ประมาณ 2.3 เท่า และจากการพัฒนาตำรับยาโดยใช้ crude lipid เป็น active ingredient ในปริมาณร้อยละ 10 พบว่า เมื่อเริ่มทำการศึกษา ตำรับยา SE 002 แสดงคุณสมบัติออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 ดีกว่า ยาครีม ZEVIN ที่มี acyclovir เป็นองค์ประกอบอยู่ร้อยละ 5 จึงคาดว่าตำรับยาดังกล่าวเหมาะสมและประสิทธิภาพเพียงพอที่จะพัฒนาเป็นตำรับเพื่อการใช้งานจริงต่อไป สำหรับการศึกษาความคงตัวทางเคมีของสารออกฤทธิ์ในสารสกัด EtOAc และตำรับยา 3 ตำรับ (SE 002, SE 003 และ SE 006) พบว่า สารสำคัญมีความคงตัวต่ำ โดยเฉพาะที่สภาวะเร่งคือ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ 75 เปอร์เซ็นต์ สารสำคัญที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 มีการสลายตัวอย่างต่อเนื่องเมื่อระยะเวลาผ่านไป

การศึกษาองค์ประกอบน้ำตาลของ crude hot water extract polysaccharide พบว่า polysaccharide ดังกล่าว มีน้ำตาล rhamnose เป็นองค์ประกอบหลัก นอกจากนี้พบว่า แคลเซียมและซัลเฟตมีบทบาทสำคัญต่อคุณสมบัติการออกฤทธิ์เป็นสารยับยั้งเชื้อ HSV-1 ของ crude hot water polysaccharide

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. งานวิจัยนี้ทราบว่าสาร sulfoquinovosyl diacylglycerol เป็นสารสำคัญที่ทำให้ crude lipid ที่สกัดได้จากสาหร่ายสไปรูลินาออกฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส HSV-1 เพื่อหาข้อสรุปว่า ส่วนใดของสารสำคัญที่มีบทบาทในการออกฤทธิ์มากที่สุด การใช้เอนไซม์ไลเปสตัดแยกส่วนของกรดไขมันออกจาก glycerol backbone ที่มีน้ำตาลเกาะอยู่ และนำสารทั้งสองส่วนมาวิเคราะห์คุณสมบัติของการออกฤทธิ์เป็นสารต้านเชื้อ HSV-1 อาจทำให้ทราบว่า กรดไขมันหรือน้ำตาล quinovose หรือต้องเป็นสารที่มีส่วนประกอบของทั้งสองส่วนอยู่ในโครงสร้างเดียวกันจึงจะทำให้สารดังกล่าวมีคุณสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 ถ้าทราบส่วนประกอบที่มีบทบาทสำคัญในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 อาจนำไปพัฒนาหรือสังเคราะห์สารที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับสารสกัดที่ออกฤทธิ์ได้
2. การศึกษา mode of action ของสารออกฤทธิ์จาก crude lipid ดังกล่าวอาจทำให้ทราบอย่างละเอียดถึงกลไกการทำงานของสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อไวรัสเริม
3. ทดลองนำตำรับยาที่มีฤทธิ์ดีในการต้านเชื้อ HSV-1 เช่น SE 002 มาใช้กับอาสาสมัครที่ป่วยเป็นโรคเริม เพื่อทดสอบว่ายาดังกล่าวก่อให้เกิดอาการแพ้หรือผลข้างเคียงหรือไม่อย่างไร เพื่อนำข้อมูลมาปรับปรุงและพัฒนาตำรับยาที่เหมาะสมต่อการใช้งานจริงต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Nahmias, A. J. and Roizman, B., 1973, "Infection with herpes-simplex viruses 1 and 2," **New England Journal of Medicine**, Vol. 289, No. 13-15, pp. 667-674, 719-725, 781-789.
2. Kalinyak, J. E., Fleagle, G. and Docherty, J. J., 1977, "Incidence and distribution of herpes simplex virus types 1 and 2 from genital lesions in college women," **Journal of Medical Virology**, Vol. 1, No. 3, pp. 175-181.
3. Barrett, J. T., 1927, "Herpesviridae," In **Microbiology and Immunology concepts**, Section III General virology, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, New York., pp. 118-122.
4. Jayavasu, C., Thavatsupa, P. and Thitivongwarasakul, P., 1981, "Prevalence of HSV-2 antibodies in Thai population in Bangkok," **Bulletin of Infection Disease Thailand**, Vol. 1, No. 4, pp. 1-9.
5. ธรรมลิขิตกุล, วิษณุ, 2538, องค์ความรู้ของสมุนไพรพญายอ เสนอต่อสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย, หน้า 7-8.
6. Whitley, R. J., 1994, "HSV infections of women and their offspring: implications for a developed society," **Proceeding of the National Academy of science**, Vol. 91, pp. 2441-2447.
7. Corey, L. and Spear, P. G., 1986, "Infection with herpes simplex virus (1)," **New England Journal of Medicine**, Vol. 314, No. 11, pp. 868-891.
8. Lafferty, W. E., Coombs, R. W., Benedetti, J., Critehlow, C. and Corey, L., 1987, "Recurrence after oral and genital herpes simplex virus infection. Influence of site of infection and viral type," **New England Journal of Medicine**, Vol. 316, No. 23, pp. 1444-1449.
9. วงศ์ไวยวรรณ, หาญ และ กุลละวณิชย์, ปรียา, 2533, สถิติโรคผิวหนังที่พบบ่อยของสถาบันโรคผิวหนัง, วารสารกรมการแพทย์ 2533, เล่มที่ 15, หน้า 354-359
10. Jourdan, J. P., Ancel, P. and Boileau, E., 1999, "Small-scale production of *Spirulina*" **Food Chain**, Vol. 24, pp. 3-7.
11. Cyanotech Corporation, 1988, Phycobiliprotein Applications Customer information Data Sheet.
12. Hudson, B. J. F., 1984, "Evening primrose (*Oenothera spp.*) oil and seed," **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Vol. 6, pp. 540-543.

13. Nagahara, T., Yokochi, T., Kamisaka, Y. and Suzuki, O., 1992, "Gamma linolenic from genus *Mortierella*," **In Industrial application of single cell oil**, Edited by Kyle, D. J. and Ratleedge, C., American Oil Chemists' Society press, Champaign, Illinois, pp. 61-97.
14. Baird, J. K., Sandford, P. A. and Cottrel, I. W., 1983, "Industrial application of some new microbial polysaccharide," **Biotechnology**, Vol. 1, pp. 779-783.
15. Paul, F., Morin, A. and Morsan, P., 1986, "Microbial polysaccharide with actual potential industrial applications," **Biotechnological Advances**, Vol. 4, pp. 245-259.
16. Hayashi, K., Hayashi, T. and Kojima, T., 1996, "A natural sulfated polysaccharide, calcium spirulan, isolated from *Spirulina platensis*: in vitro and ex vivo evaluation of anti-herpes simplex virus and anti-human immunodeficiency virus activities," **AIDS Research and Human Retroviruses**, Vol. 12, No. 15, pp. 1463-1467.
17. Hayashi, K., Hayashi, T. and Moria, N., 1993, "An extraction from *Spirulina platensis* is a selective inhibitor of Herpes simplex virus type 1 penetration into HeLa cell," **Phytotherapy Research**, Vol. 7, pp. 76-80.
18. Baojiang, G. et al., April 1994, "Study on effect and mechanism of polysaccharides of spirulina on body immune function improvement," South China Normal University, Publication in **Proc. of Second Asia Pacific Conf. on Algal Biotech. University of Malaysia**, pp 33-38, China.
19. Mishima, T., Murata, J., Toyoshima, M., Fujii, H., Nakajima, M., Hayashi, T., Kato, T. and Saiki, I., 1998, "Inhibition of tumor invasion and metastasis by calcium spirulan (Ca-SP), a novel sulfated polysaccharide derived from a blue-green alga, *Spirulina platensis*," **Clinical and Experimental Metastasis**, Vol. 16, No. 6, pp. 541-550.
20. Gustafson, K. R., Cardellina, J. H., Fuller, R. W., Weislow, O. S., Kiser, R. F., Snader, K. M., Patterson, G. M., and Boyd, M. R., 1989, "AIDS-Antiviral sulfolipids from cyanobacteria (blue-green algae)," **Journal of the National Cancer Institute**, Vol. 81, No. 16, pp. 1254-1258.

21. Tomaselli, L., 1997, "Morphology, ultrastructure and taxonomy of *Arthrospira* (*Spirulina*) *maxima* and *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*," In ***Spirulina platensis* (*Arthrospira*): Physiology, Cell-biology and Biotechnology**, Edited by Vonshak, A., Great Britain, Taylor & Francis Ltd, pp. 1-15.
22. Richmond, A., 1986, "Microalgae of economic potential," In **Handbook of Microalgal Mass Culture**, Edited by Richmond, A., Florida, CRC Press Inc., pp. 199-243.
23. Lewin, R.A., 1980, "Uncoiled variants of *Spirulina platensis* (*Cyanophyceae*: *Oscillatoriaceae*)," **Archives Hydrobiology Supplement, Algological Studies**, Vol. 26, pp. 48-52.
24. Becker, E. W., 1986, "Nutritional properties of microalgae: potentials and constraints," In **Handbook of Microalgal Mass Culture**, Edited by Richmond, A., Florida, CRC Press Inc., pp. 339-419.
25. Tantichroen, M., Reungjitchatchawali, M., Boonag, B., Vonktaveesuk, P., Vonshak, A. and Cohen, Z., 1994, "Optimization of γ -linolenic acid (GLA) production in *Spirulina platensis*," **Journal of Applied Phycology**, Vol. 6, pp. 295-300.
26. Ciferri, O., 1983, "*Spirulina*, the edible microorganism," **Microbiological Review**, Vol. 47, No. 4, pp. 551-578.
27. Cyanotech Corporation, 1988, Phycobilliprotein Application Customer information Data Sheet.
28. Romay, C., Ledon, N. and Gonzalez, R., 1998, "Further studies on anti-inflammatory activity of phycocyanin in some animal models of inflammation," **Inflammation Research**, Vol. 47, pp. 334-338.
29. Romay, C., Ledon, N. and Gonzalez, R., 1999, "Phycocyanin extract reduces leukotriene B4 levels in arachidonic acid-induced mouse-ear inflammation test," **Journal of Pharmacy and Pharmacol**, Vol. 51, No. 5, pp. 641-642.
30. Bhat, V. B. and Madyastha, K. M., 2000, "C-phycocyanin: a potent peroxy radical scavenger in vivo and in vitro," **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Vol. 275, No. 1, pp. 20-25.
31. Glazer, A. N., 1994, "Phycobiliproteins - a family of valuable, widely used fluorophores," **Journal of Applied Phycology**, Vol. 6, pp. 105-112.

32. Kronick, M. N., 1986, "The use of phycobiliproteins as fluorescent labels in immunoassay," **Journal of Immunological Methods**, Vol. 92, pp. 1-13.
33. Murata, N. and Nishida, I., 1987, "Lipid of blue-green algae (cyanobacteria)," In **Lipid: Structure and Function, the Biochemistry of Plants**, Edited by Stumpf, P. K., Florida, Academic Press, pp. 315-347.
34. Murata, N., Wada, H. and Gombos, Z., 1992, "Modes of fatty acid desaturation in cyanobacteria," **Plant Cell Physiology**, Vol. 33, No. 7, pp. 933-941
35. Murata, N., Higashi, S. I. and Fujimara, Y., 1990, "Glycerolipid in various preparation of photosystem II from spinach chloroplast," **Biochemica et Biophysica Acta**, Vol. 1019, pp. 261-268.
36. Wada, H., Gombos, Z. and Murata, N., 1994, "Contribution of membrane lipids to the ability of the photosynthetic machinery to tolerate temperature stress," **Proceeding of the National Academy of Science**, Vol. 91, pp. 4273-4277.
37. Chan, J. A., Nagasawa, M., Takegushi, C. and Sih, L., 1975, "On agents favoring prostaglandin F formation during biosynthesis," **Biochemistry**, Vol. 14, pp. 2987.
38. Flack, J. D., 1973, In **The Prostaglandins**, Edited by Ramwell, P. W., Plenum: New York, p. 327.
39. Cohen, Z., 1986, "Products from Microalgae," In **CRC Handbook of Microalgal Mass Culture**, Edited by Richmond, A., Boca Raton, CRC Press, pp. 421-454.
40. Yokochi, T., Usita, M., Kamisaka, Y., Nakahara, T., and Suzuki, O., 1990, "Increase in the gamma-linolenic acid content by solvent winterization of fungal oil extracted from *Mortierella* genus," **Journal of the American Oil Chemists' Society**. Vol. 67, pp. 846-851.
41. Pederson, M. and Dasilva, E. J., 1973, "Simple brominated phenols in the bluegreen alga *Calothrix brevissima*," **West. Planta**, Vol. 115, pp. 83-86.
42. Botes, D. P., Tuinman, A. A., Wessels P. L., Viljoen C. C., Kruger, H. D., Williams, H., Santikarn S., Smith R. J., and Hamond S. J., 1984, "The structure of cyanoginosin-LA, a cyclic heptapeptide toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*," **Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions**, Vol. 1, pp. 2311-2318.

43. Vonshak, A., Boussiba, S. Abeliovich, A. and Richmond A., 1983, "On the production of *Spirulina* biomass: The maintenance of pure culture under outdoor conditions" **Biotechnology and Bioengineering**, Vol. 25, No. 2, pp. 341-351.
44. Saiki, I., Maeda, H., Sakurai, T., Murata, J., Iida, J., Kiso, M., Hasegawa, A. and Azuma, I., 1989, "Induction of an endogenous tumor necrosis factor in mice by murine recombinant interferon-gamma combined with a lipid A subunit analog (GLA-60) of low toxicity," **Cancer Immunology Immunotherapy**, Vol. 29, No. 2, pp.101-108.
45. Wildy, P., Russell, W. C., and Horne, R. W., 1960, "The morphology of herpes virus," **Virology**, Vol. 12, pp. 204-222
46. Kieff, E. D., Bachenheimer, S. L. and Roizman, B., 1971, "Size, composition, and structure of the deoxyribonucleic acid of herpes simplex virus subtype 1 and 2," **Journal of Virology**, Vol. 8, pp. 125-132.
47. Wadsworth, S., Jacob, R. J. and Roizman, B., 1975, "Anatomy of herpes simplex virus DNA II. Size, composition, and arrangement of inverted terminal repetitions," **Journal of Virology**, Vol. 15, pp. 1487-1497.
48. Schaeffer, H. J., Beauchamp, L., De Miranda, P., Elion, G. B., Bauer, D. J. and Collins, P., 1978, "9-(2-Hydroxyethoxymethyl)guanine activity against viruses of the herpes group," **Nature**, Vol. 272, pp. 583-585.
49. Elion, G. B., Furman, P. A., Fyfe, J. A., de Miranda, P., Beauchamp, L. and Schaeffer, H. J., 1977, "Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine," **Proceeding of the National Academy of Science USA**, Vol. 74, pp. 5716-5720.
50. Alastair, J. J. and Wood, M. D., 1999, "Drug Therapy," **The New England Journal of Medicine**, Vol. 340, No. 16, pp. 1255-1268.
51. Fyfe, J. A., Keller, P. M., Furman, P. A., Miller, R. L., and Elion, G. B., 1978, "Thymidine kinase from herpes simplex virus phosphorylates the new antiviral compound , 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine," **The Journal of Biological Chemistry**, Vol. 253, pp. 8721-8727.
52. Miller, W. H. and Miller, R. L., 1980, "Phosphorylation of acyclovir (acycloguanosine) monophosphate by GMP kinase," **The Journal of Biological Chemistry**, Vol. 255, pp. 7204-7207.

53. Derse, D., Cheng, Y-C., Furman, P. A., St. Clair, M. H. and Elion, G. B., 1981, "Inhibition of purified human and herpes simplex virus-induced DNA polymerases by 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine triphosphate," **The Journal of Biological Chemistry**, Vol. 256, pp. 11447-11451.
54. Furman, P. A., St. Clair, M. H. and Spector, T., 1984, "Acyclovir triphosphate is a suicide inactivator of the herpes simplex virus DNA polymerase," **The Journal of Biological Chemistry**, Vol. 259, pp. 9575-9579.
55. http://biology.kenyon.edu/slone/bio38/stancikl_02/What_Antiviral_therapies_are_Used.html.
56. Beauchamp, L. M., Orr, G. F., De Miranda, P., Doucette, M., Burnette, T. and Krenitsky, T. A., 1992, "Amino acid ester prodrugs of acyclovir," **Antiviral Chemical Chemotherapy**, Vol. 3, pp. 157-164.
57. Beutner, K. R., Friedman, D. J., Forszpaniak, C., Andersen, P. L. and Wood, M. J., 1995, "Valaciclovir compared with acyclovir for improved therapy for herpes zoster in immunocompetent adults," **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Vol. 39, pp.1546-1553.
58. Crumpacker, C. S., 1996, "Ganciclovir," **New England Journal of Medicine**, Vol. 335, pp. 721-729.
59. Biron, K. K., Stanat, S. C., Sorrell, J. B., Fyfe, J. A., Keller, P. M., Lambe, C. U. and Nelson, D. J., 1985, "Metabolic activation of the nucleoside analog 9-[(2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy)methyl]guanine in human diploid fibroblasts infected with human cytomegalovirus," **Proceeding of the National Academy of Science USA**, Vol. 82, pp. 2473-2477.
60. Earnshaw, D. L., Bacon, T. H., Darlison, S. J., Edmonds, K., Perkins, R. M. and Vere Hodge, R. A., 1992, "Mode of antiviral action of penciclovir in MRC-5 cells infected with herpes simplex virus type 1 (HSV-1), HSV-2, and varicella-zoster virus," **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Vol. 36, pp. 2747-2457.
61. Boyd, M. R., Bacon, T. H., Sutton, D. and Cole, M., 1987, "Antiherpesvirus activity of 9-(4-hydroxy-3-hydroxy-methylbut-1-yl)guanine (BRL 39123) in cell culture," **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Vol. 31., pp. 1238-1242.

62. Vere Hodge, R. A., Sutton, D., Boy, M. R., Harnden, M. R. and Jarvest, R. L., 1989, "Selection of an oral prodrug (BRL 42810; famciclovir) for the antiherpes-virusagent BRL39123 [9-(4-hydroxy-3-hydroxymethylbut-1-yl)guanine; penciclovir]," **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Vol. 33., pp. 1765-1773.
63. Sacks, S. L., Aoki, F. Y., Diaz-Mitoma, F., Sellors, J. and Shafran, S. D., 1996, "Patient-initiated, twice-daily oral famciclovir for early recurrent genital herpes: a randomized, Double-blind multicenter trial," **Journal of the American Medical Association**, Vol. 276, pp. 44-49.
64. Tying, S., Barbarash R. A., Nahlik, J. E., Cunningham, A., Marley, J., Heng, M., Jones, T., Rea, T., Boon, R. and Saltzman, R., 1995, "Famciclovir for the treatment of acute herpes zoster: effects on acute disease and postherpetic neuralgia: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial," **Annals of Internal Medicine**, Vol. 123, No. 2, pp. 89-96.
65. Oberg, B., 1989, "Antiviral effects of phosphonoformate (PEA, foscarnet sodium)," **Pharmacology Therapy**, Vol. 40, pp. 213-285.
66. Safrin, S., Crumpacker, C., Chatis, P., Davis, R., Hafner, R., Rush, J., Kersler, H. A., Landry, B. and Mills, J., 1991, "A controlled trial comparing foscarnet with vidarabine for acyclovir-resistant mucocutaneous herpes simplex in the acquired immunodeficiency syndrome," **New England Journal of Medicine**, Vol. 325, No. 8, pp. 551-555.
67. Katz, D. H., Marcelleti, J. F., Khalil, M. H., Pope, L. E. and Katz, L. R., 1991, "Antiviral activity of 1-docosonal, an inhibitor of lipid-enveloped viruses including herpes simplex," **Proceeding of the National Academy of Science USA**, Vol. 88, pp. 10825-10829.
68. Pope, L. E., Marcelleti, J. F., Katz, L. R., Lin, J. Y., and Katz, D. H., 1996, "Anti-herpes simplex activity of *n*-docosonal correlates with intracellular metabolic conversion of the drug," **Journal Lipid Research**, Vol. 37, pp. 2167-2178.
69. Crumpacker, C. S., Schnipper, L. E., Marlowe, S. I., Kowalsky, P. N., Hershey, B. J. and Levin, M. J., 1982, "Resistance to antiviral drugs of herpes simplex virus isolated from a patient treated with acyclovir," **New England Journal of Medicine**, Vol. 306, No. 6, pp. 343-346.

70. Erlich, K. S., Mills, J., Chatis, P., Mertz, G. J., Busch, D. F., Follansbee, S. E., Grant, R. M. and Crumpacker, C. S, 1989, "Acyclovir-resistance herpes simplex virus infection in patients with the acquired immunodeficiency syndrome," **New England Journal of Medicine**, Vol. 320, No. 5, pp. 293-296.
71. Hammer, S. M. and Inouye. R. T., 1997, "Antiviral agents" **In Clinical Virology**, Edited by Richman, D. D., Whitley, R. J. and Hayden, F. G., Churchill Livingstone Inc., New York, pp. 186-201.
72. Hayashi, T. and Hayashi, K., 1996, "Calcium Spirulan, an inhibitor of enveloped virus replication, from a blue-green alga *Spirulina platensis*", **Journal of Natural Products**, Vol. 59, No. 1, pp. 83-87.
73. Lee, J. B., Hayashi, T., Hayahi, K., Sankawa, U., Maeda, M., Nemoto, T., and Nakanishi, H., 1998, "Further purification and structural analysis of calcium spirulan from *Spirulina platensis*," **Journal of Natural product**, Vol. 61, pp. 1101-1104.
74. Lee, J. B., Hayashi, T., Hayahi, K. and Sankawa, U., 2000 "Structural analysis of calcium spirulan (Ca-SP)-Derived oligosaccharides using electrospray ionization mass spectrometry," **Journal of Natural product**, Vol. 63, pp. 136-138.
75. Lee, J. B., Srisomporn, P., Hayahi, K., Tanaka, T., Sankawa, U. and Hayashi, T., 2001, "Effects of structural modification of calcium spirulan, a sulfated polysaccharide from *Spirulina platensis*, on antiviral activity," **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Vol. 49, pp. 108-110.
76. Corona-Hernandez, A., Nieves, I., Meckes, M., Chamorro, G. and Barron, B. L., 2002, "Antiviral activity of *Spirulina maxima* against herpes simplex virus type 2," **Antiviral Research**, Vol. 56, pp. 279-285.
77. Ayehunie, S., Belay, A., Baba, T. W. and Ruprecht, R. M., 1998, "Inhibition of HIV-1 replication by an aqueous extract of *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*)," **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology**, Vol 18, pp. 7-12.
78. Nakashima, H., Murakami, T., Yamamoto, N., Sakagami, H., Tannuma, S. and Hatano, T., 1992, "Inhibition of human immunodeficiency viral replication by tannins and related compounds," **Antiviral Research**, Vol. 18, pp. 91-103.

79. Nonaka, G. I., Nishioka, I., Nishizawa, M., Yamagishi, T., Kashiwada, Y., Dutschman, G. E., Bonder, A., Kilkuskie, R. E., Cheng, Y.-C. and Lee, K.-H., 1990, "Anti-AIDS agents, 2: inhibitory effects of tannins on HIV reverse transcriptase and HIV replication in H9 lymphocyte cells," **Journal of Natural Products**, Vol. 53, pp. 587-593.
80. Hayakawa, Y., Hayashi, T., Hayashi, K., Ozawa, T., Niiya, K. and Sakuragawa, N., 1996, "Heparin cofactor II-dependent antithrombin activity of calcium spirulan," **Blood Coagulation and Fibrinolysis**, Vol. 7, pp. 554-560.
81. Hayakawa, Y., Hayashi, T., Lee, J. B., Ozawa, T. and Sakuragawa, N., 2000, "Activation of heparin cofactor II by calcium spirulan" **The Journal of Biological Chemistry**, Vol. 275, pp. 11379-11382.
82. Reshef, V., Mizrahi, E., Maretzki, T., Silberstein, C., Loya, S., Hizi, A., and Carmeli, S., 1997, "New acyclated sulfoglycolipids and digalactolipids related known glycolipids from cyanobacteria with a potential to inhibit the reverse transcriptase of HIV-1," **Journal of Natural product**, Vol. 60, pp. 1251-1260.
83. Loya, S., Reshef, V., Mizrahi, E., Silberstein, C., Rachamim, Y., Carmeli, S., and Hizi, A., 1998, "The inhibition of the reverse transcriptase of HIV-1 by the natural sulfoglycolipids from cyanobacteria: Contribution of different moieties to their high potency," **Journal of Natural product**, Vol. 61, pp. 891-895.
84. Kohlstaedt, L. A., Wang, J., Friedman, J. M., Rice, P. A. and Steitz, T. A., 1992, "Crystal structure at 3.5 Å^o resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor," **Science**, Vol. 256, pp. 1783-1790.
85. Jacobo-Molina, A., Ding, J., Nanni, R. G., Clark, A. D., Lu, X., Tantillo, C., Williams, R. L., Kamer, G., Ferris, A. L., Clark, P., Hizi, A., Hughes, S. H. and Arnold, E., 1993, "Crystal structure of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase complexed with double-stranded DNA at 3.0 Å resolution shows bent DNA," **Proceeding of the National Academy of Science USA**, Vol. 90, pp. 6320-6324.
86. Boyd, M. R., Gustafson, K., McMahon, J. and Shoemaker, R., 1996, "Discovery of cyanovirin-N, a novel HIV-inactivating protein from *Nostoc ellipsosporum* that targets viral gp120," **International Conference on AIDS**, Vol 11, pp. 71-71.

87. Parish, C. R., Low, L., Warren, H. S., and Cunningham, A. L., 1990, "A polyanion binding site on the CD₄ molecule, Proximity to the HIV- gp 120 binding region," **Journal of Immunology**, Vol. 145, pp. 1188-1195.
88. Gustafson, K. R., Sowder, R. C., Henderson, L. E., Cardellina, J. H., McMahon, J. B., Rajamani, U., Pannell, L. K. and Boyd, M. R., 1997, "Isolation, primary sequence determination, and disulfide bond structure of cyanovirin-N, an anti-HIV (human immunodeficiency virus) protein from the cyanobacterium *Nostoc ellipsosporum*," **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Vol. 238, pp. 223-228
89. Bewley, C. A., Gustafson, K. R., Boyd, M. R., Covell, D. G., Bax, A., Clore, G. M. and Gronenborn, A. M., 1998, "Solution structure of cyanovirin-N, a potent HIV-inactivating protein," **Nature Structural Biology**, Vol. 5, pp. 571-578.
90. Mariner, J. M., McMahon, J. B., O'Keefe, B. R., Nagashima, K., and Boyd, M. R., 1998, "The HIV- inactivation protein, cyanovirin-N, does not block gp 120-mediated virus-to-cell binding," **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Vol. 248, pp. 841-845.
91. Boyd, M. R., 1997, "Protein isolated from blue-green algae inactivates HIV," **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Vol. 41, pp. 1521-1530.
92. Lau, A. F., Siedlecki, J., Anleitner, J., Patterson, G. M., Caplan, F. R., and Moore, R. E., 1993, "Inhibition of reverse transcriptase activity by extracts of cultured blue-green algae (cyanophyta)," **Planta Medicine**, Vol. 59, pp. 148-151.
93. Hoshino, T., Hayashi, T., Hayashi, K., Hamada, J., Lee, J. B. and Sankawa, U., 1998, "An antivirally active sulfated polysaccharide from *Sargassum horneri* (TURNER) C. AGARDH," **Biology Pharmaceutical Bulletin**, Vol. 21, pp. 730-734.
94. Damonte, E. B., Neyts, J., Pujol, C.A., Snoeck, R., Andrei, G., Ikeda, S., Witvrouw, M., Reymen, D., Haines, H., and Matulewicz, M. C., 1994, "Antiviral activity of a sulfated polysaccharide from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*," **Biochemical Pharmacology**, Vol. 47, pp. 2187-2192.
95. Carlucci, M. J., Scolaro, L. A., Errea, M. I., Matulewicz, M. C. and Damonte, E. B., 1997b, "Antiviral activity of natural sulfated galactans on herpes virus multiplication in cell culture," **Planta Medicine**, Vol. 63, pp. 429-432.

96. Duarte, M. E., Nosedá, D. G., Nosedá, M. D., Tulio, S., Pujol, C. A. and Damonte, E. B., 2001, "Inhibition effect of sulfate galactans from the marine alga *Bostrychia montagnei* on herpes simplex virus replication in vitro," **Phytomedicine**, Vol. 8, 53-58.
97. Ohta, K., Mizushima, Y., Hirata, N., Takemura, M., Sugawara, F., Matsukage, A., Yoshida, S. and Sakaguchi, K., 1998, "Sulfoquinovosyldiacylglycerol, KM043, a new potent inhibitor of eukaryotic DNA polymerases and HIV-reverse transcriptase type 1 from a marine red alga, *Gigartina tenella*," **Chemical & Pharmaceutical Bulletin** (Tokyo), Vol. 46, pp. 684-686.
98. Loya, S., Bakhanashvili, M., Kashman, Y. and Hizi, A., 1995, "Peyssonols A and B, two novel inhibitors of the reverse transcriptases of human immunodeficiency virus types 1 and 2," **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Vol. 316, pp. 789-796.
99. Hayashi, K., Hamada, J. and Hayashi, T., 1996c, "A screening strategy for selection of anti-HSV-1 and anti-HIV extracts from algae," **Phytotherapy Research**, Vol. 10, pp. 233-237.
100. Cardellina, J. H., Munro, M. H., Fuller, R. W., Manfredi, K. P., McKee, T. C., Tischler, M., Bokesch, H. R., Gustafson, K. R., Beutler, J. A. and Boyd, M. R., 1993, "A chemical screening strategy for the dereplication and prioritization of HIV-inhibitory aqueous natural products extracts," **Journal of Natural product**, Vol. 56, pp. 1123-1129.
101. Xu, H. X., Lee, S.H., Lee S. F., White, R. L. and Blay, J., 1999, "Isolation and characterization of an anti-HSV polysaccharide from *Prunella vulgaris*," **Antiviral Research**, Vol. 44, No. 1, pp. 43-54.
102. Chiang, L. C., Chiang, W., Chang, M. Y., Ng, L. T. and Lin, C. C., 2002, "Antiviral activity of *Plantago major* extracts and related compounds in vitro," **Antiviral Research**, Vol. 55, No. 1, pp. 53-66.
103. Yoosook, C., Bunyapraphatsara, N., Boonyakiat, Y. and Kantasuk, C., 2000, "Anti-herpes simplex virus activities of crude water extracts of Thai Medicinal Plants," **Phytomedicine**, Vol. 6, No. 6, pp. 411-419.

104. Yoosook, C., Panpisutchai, Y., Chaichana, S., Santisuk, T. and Reutrakul, V., 1999, "Evaluation of anti-HSV-2 activities of *Barleria lupulina* and *Clinacanthus nutans*," **Journal of Ethnopharmacology**, Vol. 67, pp. 179-187.
105. Kittisiripornkul, S., Bunyaphrathatsara, N., Tanasomwang, W. and Salayavivad, J., 1987, "The anti-inflammatory action and toxicology studies of *Clinacanthus nutans*," **Princess Congress**, Vol. 1, pp. 10-13.
106. Jayavasut, C., Chavalittumrong, P., Polachandrra, K., Dechatiwonges Na Ayudhaya, T. and Jongtrakulsiri, S., 1992, "The virucidal activity of *Clinacanthus nutans* Lindau extracts against herpes simplex virus type 2 : An *in vitro* study," **Bulletin Med Dept Science**, Vol. 34, No. 4, pp. 153-158
107. Jayavasut, C., Dechatiwonges Na Ayudhaya, T. and Balachandra, K., 1991, "The virucidal activity of herb extracts to herpes simplex virus 2 : An *in vitro* study," **Virus Information Exchange Newsletter**, Vol. 8, No. 11, p. 26
108. Thawaranantha, D., Balachandra, K., Jongtrakulsiri, S., Chavalittumrong, P., Bhumiswasdi, J. and Jayavasut, C., 1992, "In *vitro* antiviral activity of *Clinacanthus nutans* on varicella-Zoster virus," **Siriraj Hospital. Gaz.**, Vol. 44, No. 4, pp. 285-291.
109. Sato, N. and Murata, N., 1988, "Membrane lipid," **Methods Enzymology**, Vol. 167, pp. 251-259.
110. Lapage, G. and Roy, C. C., 1984, "Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction of purification," **Journal of Lipid Research**, Vol. 25, pp. 1391-1396.
111. Blakeney, A. B., Harris, P. J., Henry, R. J. and Stone, B. A., 1983, "A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis," **Carbohydrate Research**, Vol. 113, pp. 291-299.
112. Bennet, J. and Bogorad, L., 1973, "Complementary chromatic adaptation in filamentous blue-green alga," **Journal of cell Biology**, Vol. 58, pp. 419-438.
113. Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A .L. and Kandall, K. J., 1951, "Protein measurement with the Folin phenol reagent," **The Journal of Biological Chemistry**, Vol. 193, pp. 265-275.

114. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F., 1956, "Colorimetric method for determination of sugar and related substances," **Analytical Chemistry**, Vol. 28, pp. 350-356.
115. Isaac, R. A., 1995, "AOAC Official Method 930.05 Ash of Plants," In **Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists International**, Chapter 3, 16th Ed Volume I, Edited by Cunniff, P., AOAC international, Virginia, p. 1
116. Burns, B. A., 1995, "AOAC Official Method 920.46 Metals and Other Constituents in Baking Powders," In **Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists International**, Chapter 5, 16th Ed Volume II, Edited by Cunniff, P., AOAC international, Virginia, p. 5
117. Nagasawa, K., Inoue, Y., and Kamata, T., 1977, "Solvolytic desulfation of glycosaminoglycuronan sulfates with dimethyl sulfoxide containing water or methanol," **Carbohydrate Research**, Vol. 58, pp. 47-55.
118. Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S. and Boyd, M. R., 1990, "New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening," **Journal of the National Cancer Institute**, Vol. 82, No. 13, pp. 1107-1112.
119. Folch, J., Lees, M. and Stanley, G. H. S., 1957, "A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues," **The Journal of Biological Chemistry**, Vol. 226, pp. 497-509.
120. Davis, R. and Frearson, M., 1998, "Halogen Isotopes" In **Mass Spectrometry Analytical Chemistry by Open Learning**, Edited by Prichard, F.E., Thames Polytechnic, London, pp. 146-172.
121. Benson, A. A., Daniel, H. and Wiser, R., 1959, "A sulfolipid in plants," **Proceeding of the National Academy of Science USA**, Vol. 45, pp. 1582-1587.

ภาคผนวก

รายละเอียดผลการดำเนินงานของโครงการโดยสรุป

กิจกรรม (ตามแผน)	ผลที่คาดว่าจะได้รับ (ตามแผน)	ผลการดำเนินงาน	หมายเหตุ
1. เตรียมสารสกัดจากสาหร่ายสไปรูลินาสำหรับนำไปใช้ในการเตรียมตำรับยา	ได้สารสกัดที่มีคุณสมบัติออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 ในปริมาณเพียงพอสำหรับนำไปใช้ในการเตรียมตำรับยาและวิเคราะห์หองค์ประกอบทางเคมี	ได้สารสกัด 2 ชนิด คือ crude lipid และ crude hot water extract polysaccharide ที่มีคุณสมบัติออกฤทธิ์ต้านเชื้อดังกล่าว	การตั้งตำรับยาและการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสำคัญ ทำเฉพาะ crude lipid
2. วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากสาหร่ายสไปรูลินาที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1	ทราบโครงสร้างทางเคมีของสารสำคัญจากสาหร่ายสไปรูลินาที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1	Sulfoquinovosyl diacylglycerol คือสารสำคัญที่ทำให้ crude lipid ของสาหร่าย สไปรูลินาออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1	
3. การทดสอบความคงตัวของสารสกัดจากสาหร่ายสไปรูลินาที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1	ทราบว่า สารสกัดจากสาหร่ายสไปรูลินาที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 มีความคงตัวมากน้อยอย่างไร	สารสกัดจากสาหร่ายสไปรูลินาที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 มีความคงตัวทางเคมีต่ำ	
4. การตั้งตำรับยาทาภายนอกของสารสกัดจากสาหร่ายสไปรูลินา	ได้ตำรับยาที่มีสารสกัดจากสาหร่ายสไปรูลินาเป็นองค์ประกอบ รวมทั้งมีคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพเหมาะสมต่อการนำไปใช้งานต่อไป	ตั้งตำรับยาได้ทั้งหมด 6 ตำรับ คือ ตำรับยา SE 001-SE 006 โดยแต่ละตำรับมีสารสกัดจากสาหร่ายเป็นองค์ประกอบอยู่ร้อยละ 10	
5. การทดสอบความคงตัวของตำรับยาที่ใส่สารสกัด lipid จากสาหร่ายสไปรูลินา	ทราบว่า ตำรับยาที่ใส่สารสกัด lipid จากสาหร่ายสไปรูลินามีความคงตัวมากน้อยอย่างไร	ตำรับยาที่ใส่สารสกัด lipid จากสาหร่ายสไปรูลินามีความคงตัวต่ำ	ตำรับ SE 002 เป็นตำรับที่เหมาะสมต่อการนำไปพัฒนาในลำดับต่อไป เพราะมีฤทธิ์ที่ดีในการต้านเชื้อ HSV-1 และมีความคงตัวใกล้เคียงกับสารสกัด lipid จากสาหร่าย