



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการสารออกฤทธิ์ต้านไวรัสจากสาหร่าย

โดย นางบุษยา บุนนาคและคณะ

ธันวาคม 2546

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการสารออกฤทธิ์ต้านไวรัสจากสาหร่าย

คณะผู้วิจัย

สังกัด

- | | |
|-----------------------------------|---|
| 1. รศ. บุษยา บุนนาค | 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 บุนนาค¹, 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

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาค่าประเภททางเคมีของสารสกัดจากสาหร่ายสไปรูลีนา 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 ลิปิดและกรดไขมันในไซยาโนแบคทีเรีย	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 เมื่ออยู่ในสภาวะ อุณหภูมิห้องและที่สภาวะเร่งการสลายตัวอุณหภูมิ 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

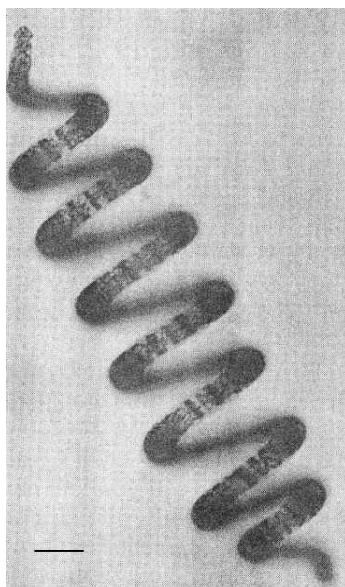
1. ทราบกลุ่มของสารเคมีที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HSV-1 ที่พบในสาหร่ายสไปรูลินา
2. ทราบว่า กรดแกมมาลิโนลินิก (γ -linolenic acid, GLA) ที่พบในสาหร่ายสไปรูลินามีส่วนช่วยให้สารสกัด crude lipid ออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 หรือไม่
3. ทราบสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HSV-1 ที่พบในสาหร่ายสไปรูลินา
4. สามารถเตรียมสารสกัดที่มีความคงตัวสำหรับใช้ในการตั้งตำรับยา
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 (phycobillisome) 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]

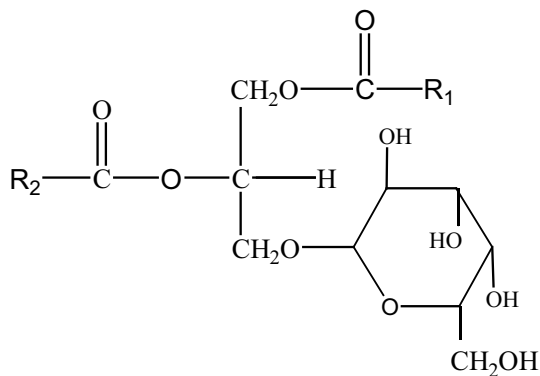
ชนิดสาหร่าย	โปรตีน	ไขมัน	คาร์โบไฮเดรต	กรดนิวคลีอิก
<i>Spirulina platensis</i>	46-50	4-9	8-14	2-5
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	6-7	13-16	2.9-4.5
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	14-22	12-17	4-5
<i>Scedesmus obliquus</i>	50-56	12-14	10-17	3-6
<i>Synechococcus</i> sp.	63.0	11.0	15.0	5.0
<i>Prymnesium parvum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

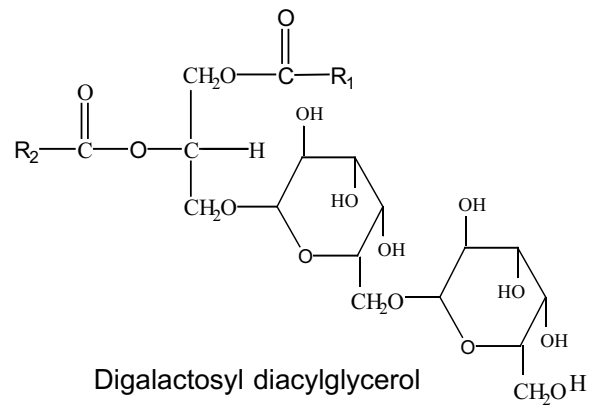
2.2 ลิพิดและกรดไขมันในไซยาโนแบคทีเรีย

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

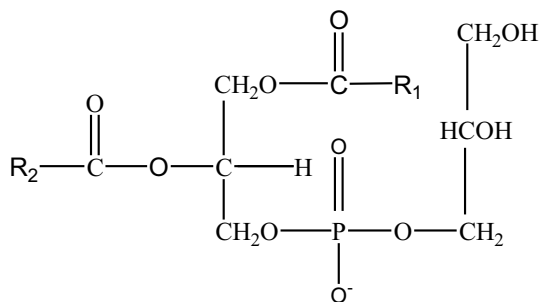
1. Monogalactosyl diacylglycerol (MGDG)
2. Digalactosyl diacylglycerol (DGDG)
3. Phosphatidyl diacylglycerol (PG)
4. Sulfoquinovosyl diacylglycerol (SQDG)



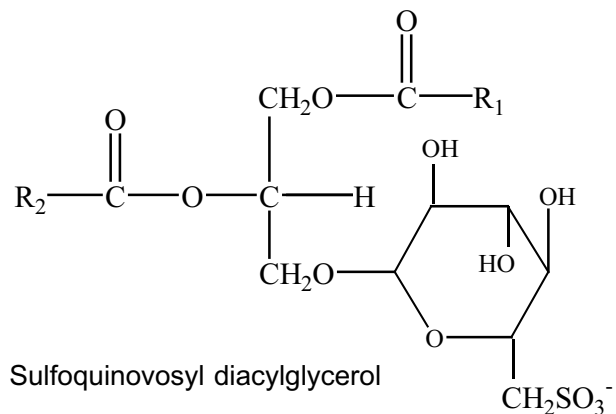
Monogalactosyl diacylglycerol
(MGDG)



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]

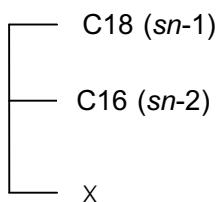
ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบของ glycerolipid ชนิดต่าง ๆ ในสาหร่ายสไปรูลินา [34]

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 ตำแหน่งของกรดไขมันในไซยาโนแบคทีเรีย

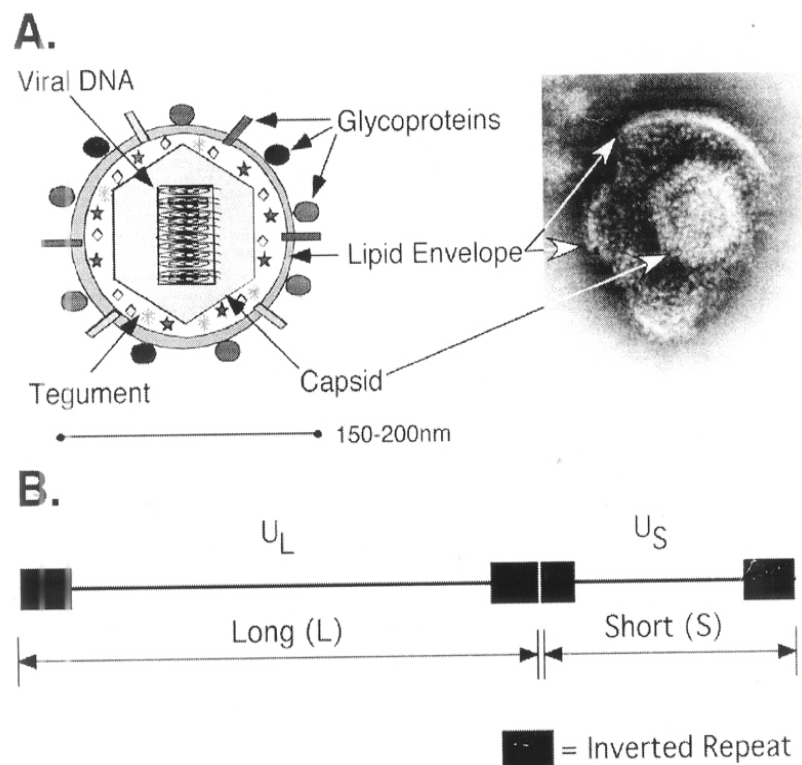
X ส่วนที่เป็น polar head ของลิพิด [33]

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) แต่มีกลุ่มวิจัยได้พัฒนาวิธีการสกัดเพื่อเพิ่มปริมาณ 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 ช่วยในการลดระดับคอเลสเตอรอลได้ดีกว่ากรดลิโนลินิก 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

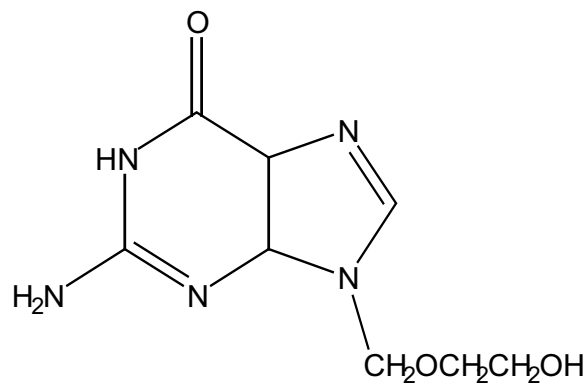


รูปที่ 2.4 โครงสร้างของ HSV virion (A) และ genome organization (B) [45]

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

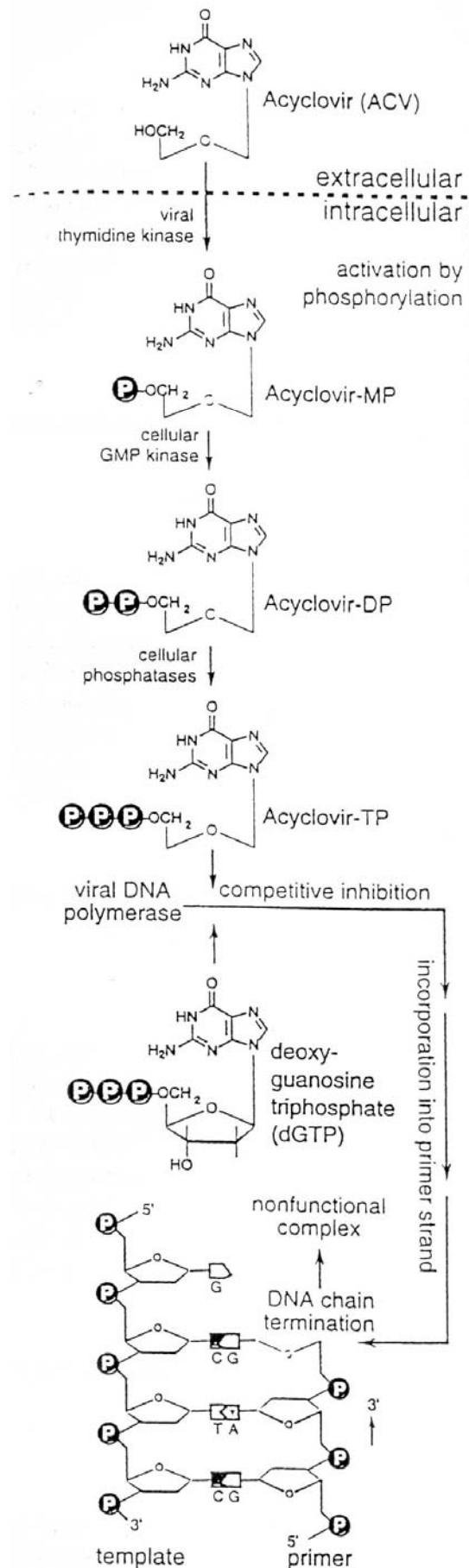
Acyclovir (ACV) เป็นสารสังเคราะห์ประเภท nucleoside analog ชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพและมีความจำเพาะเจาะจงสูงในการยับยั้งการ replication ของ herpes simplex virus ทั้งในเซลล์และในหลอดทดลอง โดยจะยับยั้งเฉพาะการทำงานของ herpes simplex virus ในเซลล์ที่ถูก infect ด้วย HSV เท่านั้น (ไม่มีผลข้างเคียงต่อเซลล์ที่ไม่ถูก 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

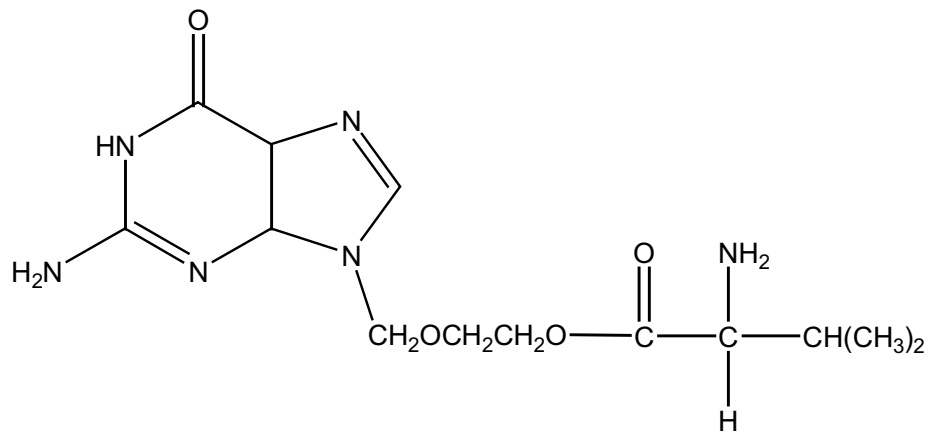
ปฏิกิริยา chain elongation ไม่สามารถดำเนินต่อไปได้เพราะขาดปลาย 3'-hydroxyl ดังนั้นบทบาทของ ACV-TP คือยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase [53, 54]



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

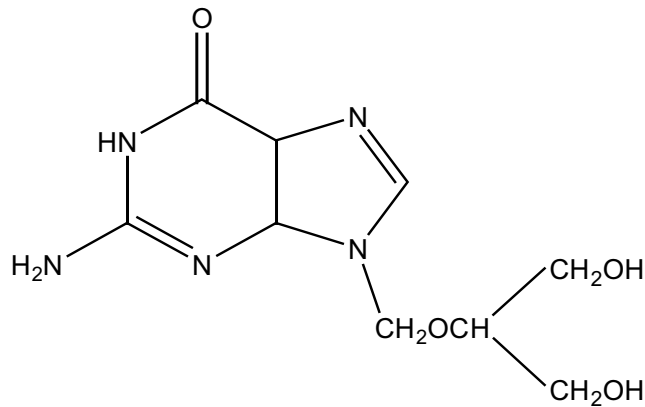
นอกจากนี้ในปัจจุบันได้มีการพัฒนายาตัวนี้ขึ้นมาเป็นตัวยาใหม่ ๆ เช่น Valacyclovir, Ganciclovir, Penciclovir, Famciclovir และ Foscarnet เป็นต้น

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]



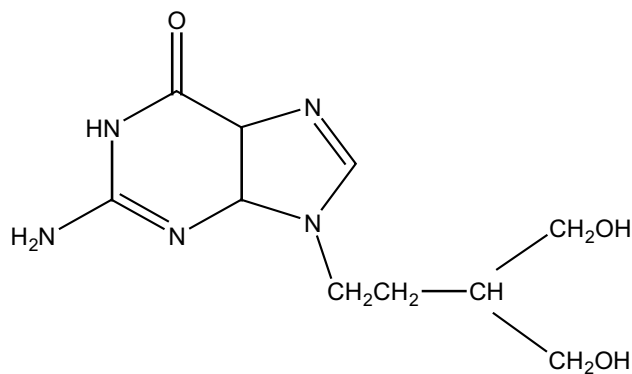
รูปที่ 2.7 โครงสร้าง Valacyclovir [50]

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]

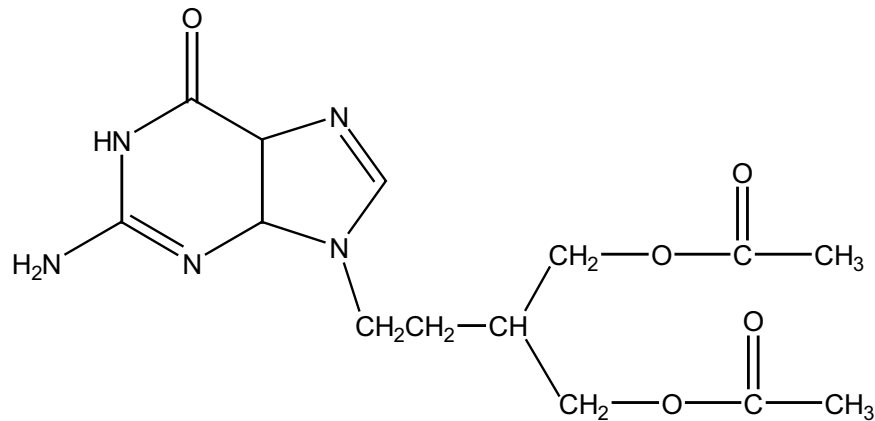
Penciclovir มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับ ganciclovir แตกต่างกันคือ มีการแทนที่ด้วย methylene bridge ether oxygen ในส่วนของ acyclic ribose ของโมเลกุล ดังรูปที่ 2.9 มีเมตาบอลิซึมและกลไกการทำงานเหมือนกับ acyclovir [60] ซึ่งจากการศึกษาในหลอดทดลองพบว่า ยาชนิดนี้สามารถยับยั้งการทำงานของ herpes simplex virus ชนิดที่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



รูปที่ 2.9 โครงสร้างของ Penciclovir [50]

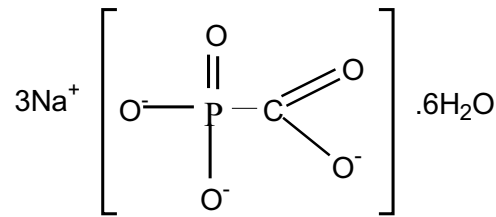
Famciclovir คือ diacetyl-6-deoxy analog ของ penciclovir มีโครงสร้างดังรูปที่ 2.10 ภายหลังจากเข้าสู่ร่างกายแล้วจะถูกเปลี่ยนไปอยู่ในรูป penciclovir โดยปฏิกิริยา deacetylation ในกระเพาะอาหาร เลือดและตับ ข้อดีของยาชนิดนี้คือ ดูดซึมดีกว่าและเมื่ออยู่ในรูปที่พร้อมจะทำปฏิกิริยาคือ penciclovir triphosphate มีครึ่งชีวิต (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 (ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ความคุมลง 50%)

^b Antiviral activity แสดงในรูปของ ED₅₀ (ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ลด virus infection ของเซลล์ควบคุมลง 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

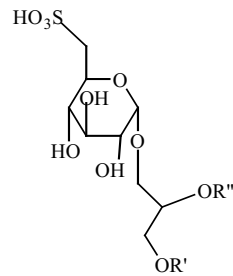
นอกจาก polysaccharide ที่ได้จากสาหร่ายสไปรูลินาจะมีศักยภาพในการเป็นสารต้าน herpes simplex virus แล้ว ยังมีงานวิจัยอื่น ที่แสดงให้เห็นว่า polysaccharide มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อไวรัสชนิดอื่น ๆ ด้วย เช่น Ayehunie และคณะ พบว่า สารสกัดด้วยน้ำร้อนที่ได้จากสาหร่ายสไปรูลินายับยั้งการเพิ่มจำนวน (replication) 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]

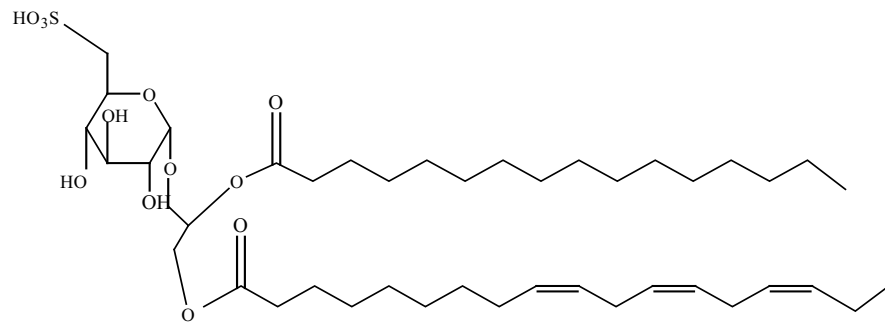
2.5.2 Lipid

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

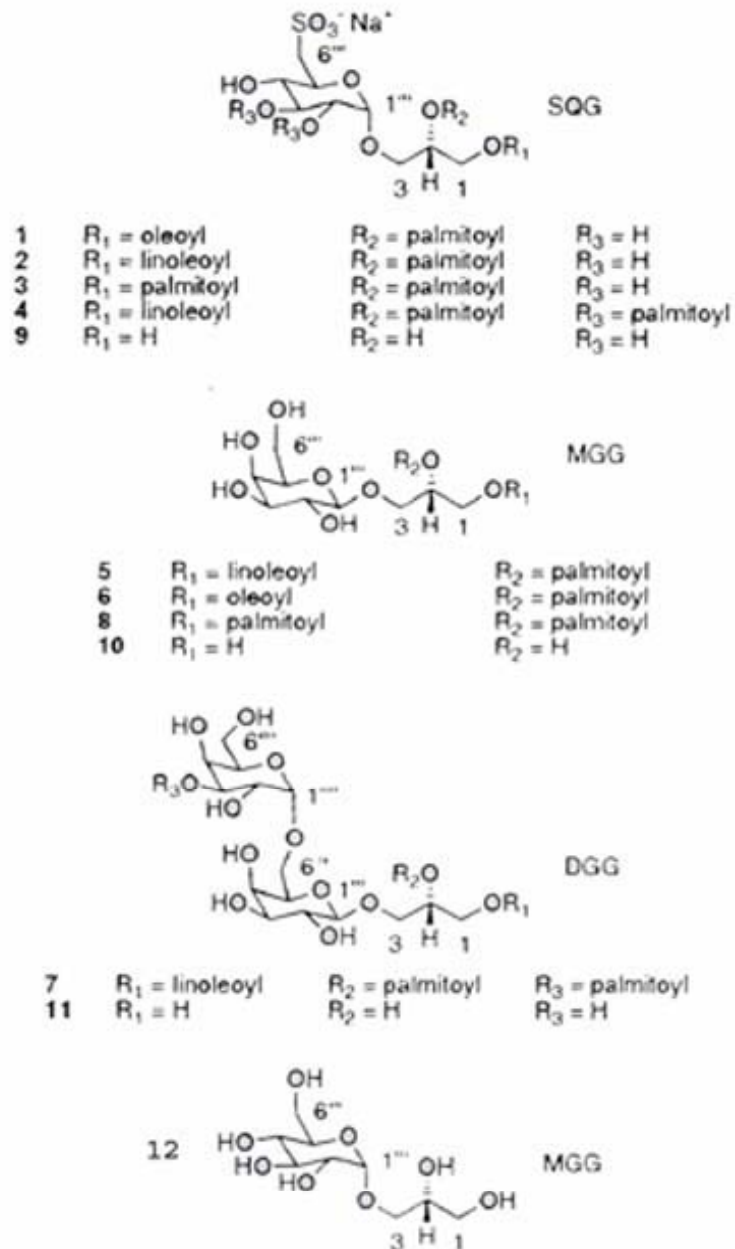


1

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]

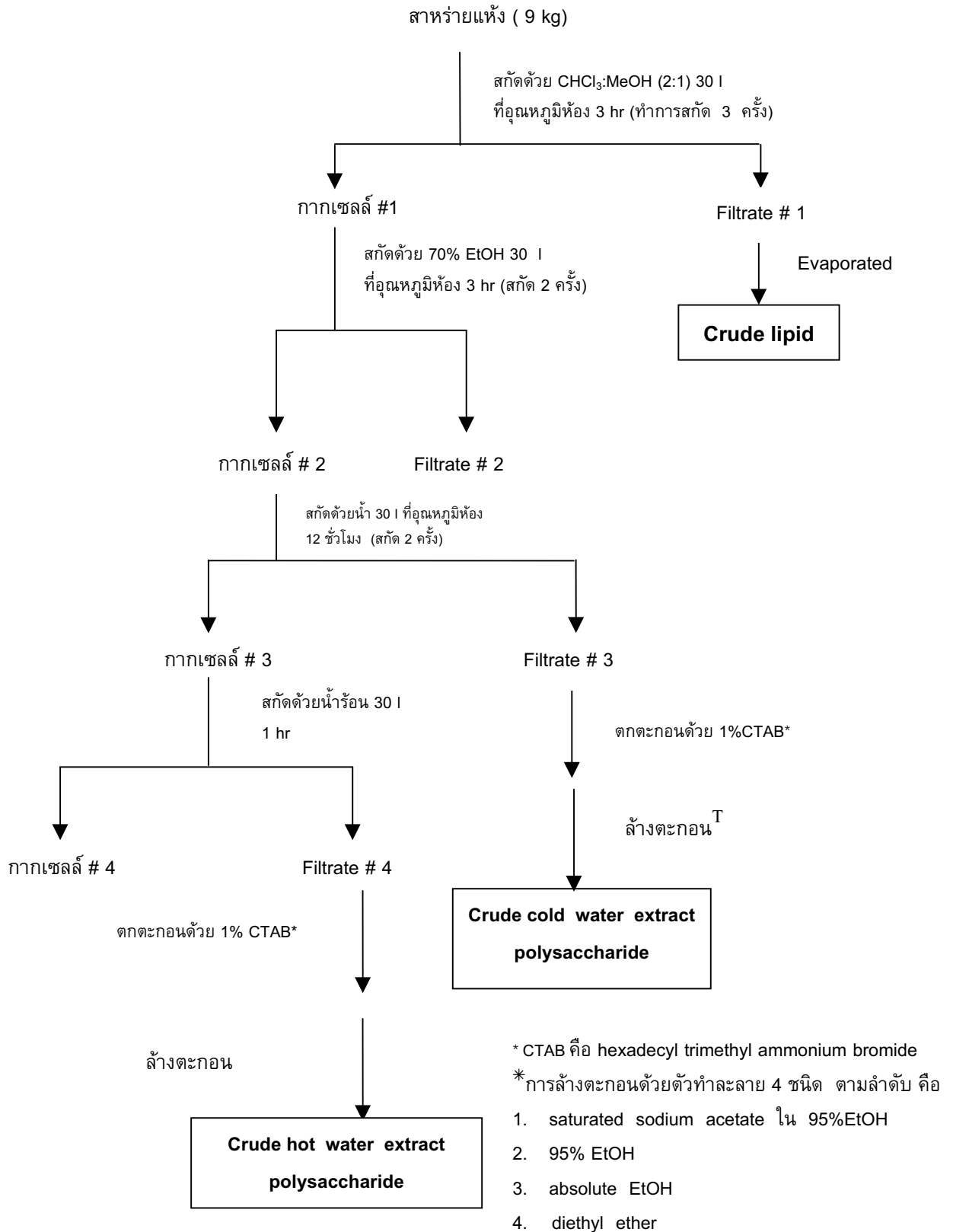
นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงสารสกัดอีกหลายชนิดที่ยังไม่ทราบโครงสร้างของสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส เช่น ในปี 1996 Hayashi และคณะได้แยกสารสกัดจากสาหร่าย 49 ชนิด และนำมาตรวจหาคุณสมบัติในการต้านเชื้อ HSV และ HIV พบว่า สารสกัดด้วยน้ำจำนวน 25 ชนิด มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อ HSV ซึ่งในจำนวนนี้มีสารสกัด 4 ชนิด 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 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม และมีคุณสมบัติต้านเชื้อ HSV-2 ที่ค่า ED₅₀ เท่ากับ 298.84 68.32 และ 31.83 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ [103] นอกจากนี้ยังได้ศึกษาถึงคุณสมบัติของสารสกัดจากใบของต้นเสลดพังพอนตัวผู้ (*Barleria lupulina* Lindl) และต้นพญาเสือ (*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 ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อมานานแล้วได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเชื้อ HSV-2 (G) ได้ ขณะที่สารสกัดของ *C. nutans* ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ HSV-2 ทั้ง 6 สายพันธุ์ได้ ซึ่งจากข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้พัฒนายาที่มีคุณสมบัติเป็น anti-herpes จากสมุนไพร *B. lupulina* ต่อไป อย่างไรก็ตามมีนักวิจัยของประเทศไทยอีกกลุ่มหนึ่งที่ได้ทำการศึกษาทางด้านเภสัชวิทยาของสมุนไพรพญาเสืออย่างต่อเนื่อง และพบว่า สารสกัดจากใบพญาเสือนอกจากจะมีฤทธิ์ต้านการอักเสบแล้ว [105] ยังมีฤทธิ์ทำลายเชื้อไวรัส Herpes simplex ชนิดที่ 2 ในหลอดทดลองด้วย [106] ซึ่งจากการศึกษาในคนก็พบว่า มีประสิทธิภาพในการรักษาโรคเริมที่อวัยวะเพศ [107] และโรคงูสวัด [108] โดยทำให้โรคดังกล่าวหายเร็วขึ้นและลดความเจ็บปวดได้ รวมทั้งไม่ทำให้เกิดอาการแสบระคายเคืองเหมือนยาครีมที่สังเคราะห์ขึ้น (acyclovir) ขณะที่จากการศึกษาทางพิษวิทยาก็พบว่า เป็นยาที่ค่อนข้างปลอดภัย [105] ดังนั้นสารสกัดจากใบพญาเสือจึงน่าจะมีประสิทธิภาพในการรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสในตระกูล 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 และนำไปในอัตราส่วน 4:1 โดยปริมาตร

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

ทำการสกัดลิปิดแต่ละชั้นด้วยการดูด silica gel ที่ตำแหน่งชั้นลิปิดใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติม chloroform/methanol (อัตราส่วน 2:1 โดยปริมาตร) 8 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องพร้อมกับมีการกวนบน 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 ใช้ปิเปตดูดสารตัวอย่างผ่านเข้าไปใน 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 ต่อ นาที 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 และวัดปริมาณไวรัสตั้งกล่าวโดยการไตเตรดหาค่า 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 จากสาหร่ายสไปรูลินา
2. การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HSV-1 ใน crude lipid
3. การตั้งตำรับยาทาภายนอกจากสารสกัด EtOAc ที่ได้จาก lipid ของสาหร่ายสไปรูลินา
4. การศึกษาองค์ประกอบและคุณสมบัติของ crude hot water extract polysaccharide

4.1 การเตรียม crude lipid และ crude polysaccharide จากสาหร่ายสไปรูลินา

จากข้อมูลเบื้องต้นดังตารางที่ 1.1 ทำให้ทราบว่าทั้ง crude lipid และ crude polysaccharide ที่สกัดแยกได้จากสาหร่ายสไปรูลินามีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-1 ที่ก่อให้เกิดโรคเริม ดังนั้นในขั้นตอนแรกจึงทำการสกัดแยกสารทั้ง 2 ชนิด โดยนำเซลล์แห้งของสาหร่ายสไปรูลินามาสกัดด้วยวิธีดังภาพที่ 3.1 ซึ่งข้อดีของการสกัดด้วยวิธีดังกล่าว คือ เพื่อเป็นการนำเซลล์ของสาหร่ายสไปรูลินามาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด 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 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 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