



## รายงานการวิจัย

ออกซิเรสเวราทรอล : การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณในผลิตภัณฑ์สมุนไพร  
และการศึกษาฤทธิ์ต้านการเสื่อมของระบบประสาท  
Oxyresveratrol: Quantitative Determination in Herbal Products and  
Study for Anti-neurodegenerative Activity

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดย

ศาสตราจารย์ ดร. กิตติศักดิ์ ลิขิตวิทย์  
รองศาสตราจารย์ ดร. บุญชู ศรีตุลารักษ์  
รองศาสตราจารย์ ดร. วราภรณ์ ภูตะสุน  
รองศาสตราจารย์ ดร. ฤทธิกร วิวัฒน์ปฐพี  
รองศาสตราจารย์ ดร. ธงชัย สุขแสวง  
ดร. พูนศักดิ์ พลอยประดิษฐ์

## กิตติกรรมประกาศ

แผนงานวิจัยเรื่อง “ออกซิเรสเวอราทรอล : การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณในผลิตภัณฑ์สมุนไพรและการศึกษาฤทธิ์ด้านการเชื่อมของระบบประสาท” นี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปี พ.ศ. 2558

ผลงานวิจัยทั้งหมดนี้เป็นความสำเร็จที่เกิดจากความร่วมมือทางวิชาการของอาจารย์ นักวิจัย และนิสิตบัณฑิตศึกษา จากมหาวิทยาลัยและสถาบันวิจัย 4 สถาบัน ได้แก่คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณคณะ มหาวิทยาลัย และสถาบันดังกล่าว ที่ได้ให้การสนับสนุนสถานที่เครื่องมือ และอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ ตลอดจนอำนวยความสะดวกในการทำวิจัย ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้เป็นอย่างดี

**แผนงานวิจัย** ออกซิเรสเวอราทรอล : การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณในผลิตภัณฑ์สมุนไพร และการศึกษาฤทธิ์ด้านการเชื่อมของระบบประสาท

**Research program** Oxyresveratrol: its quantitative determination in herbal products and study for anti-neurodegenerative activity

**ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย** ศาสตราจารย์ ดร. กิตติศักดิ์ ลิขิตวิทย์วุฒิ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**โครงการวิจัย** การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่ใช้เทคนิคอิมมูโนแอสซายในการตรวจวัดปริมาณสารออกซิเรสเวอราทรอล

**Research project** Development of enzyme-linked immunosorbent assay for quantitative determination of oxyresveratrol

รองศาสตราจารย์ ดร. วราภรณ์ ภูตะลุน	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	หัวหน้าโครงการ
ศาสตราจารย์ ดร. กิตติศักดิ์ ลิขิตวิทย์วุฒิ	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ผู้ร่วมวิจัย
รองศาสตราจารย์ ดร. บุญชู ศรีตุลารักษ์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ผู้ร่วมวิจัย
ดร. พูนศักดิ์ พลอยประดิษฐ์	สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์	ผู้ร่วมวิจัย

**โครงการวิจัย** การศึกษาออกซิเรสเวอราทรอลในการลดอาการเสื่อมของระบบประสาทในโรคอัลไซเมอร์

**Research project** Study of oxyresveratrol for the ability to ameliorate neurodegenerative processes in Alzheimer's disease

รองศาสตราจารย์ ดร. ฤดีกร วิวัฒน์ปฐพี	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	หัวหน้าโครงการ
ศาสตราจารย์ ดร. กิตติศักดิ์ ลิขิตวิทย์วุฒิ	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ผู้ร่วมวิจัย
รองศาสตราจารย์ ดร. ธงชัย สุขเสวต	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ผู้ร่วมวิจัย
รองศาสตราจารย์ ดร. บุญชู ศรีตุลารักษ์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ผู้ร่วมวิจัย

## บทคัดย่อ

ออกซิเรสเวอราทรอล (2,4,3',5'-เตตราไฮดรอกซิสติลปิน) เป็นสารไฟโตอะเล็กซินที่พบในแก่นของต้นมะหาดในปริมาณสูง มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายอย่าง และเป็นสารหลักในยาถ่ายพยาธิ “ปวกหาด” ของไทยซึ่งเป็นผงแห้งที่เตรียมจากการสกัดแก่นมะหาดด้วยน้ำเดือด ปัจจุบันสารนี้ใช้เป็นสารช่วยให้ผิวขาวในผลิตภัณฑ์บำรุงผิวหลายชนิด นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยในหลอดทดลองว่าสารนี้อาจป้องกันโรคอัลไซเมอร์ได้ แผนงานวิจัยนี้ประกอบด้วยโครงการวิจัย 2 โครงการ ซึ่งมีวัตถุประสงค์ตามลำดับดังนี้ (1) พัฒนาวิธีวิเคราะห์สำหรับใช้ตรวจวัดปริมาณสารออกซิเรสเวอราทรอลในตัวอย่างพืชและผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้อง และ (2) ศึกษาออกซิเรสเวอราทรอลในการป้องกันโรคอัลไซเมอร์หรือสมองเสื่อมในสัตว์ทดลอง

โครงการแรก เป็นการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารออกซิเรสเวอราทรอลในตัวอย่างพืชและผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องโดยอาศัยหลักการของไอโซลา เริ่มจากการนำสารออกซิเรสเวอราทรอล มาเชื่อมต่อกับโปรตีนแอลบูมินจากซีรัมของวัวด้วยวิธีที่แตกต่างกัน 3 วิธี คือใช้ปฏิกิริยาเคมีที่แตกต่างกัน 3 ปฏิกิริยา ได้แก่ คาร์โบดิอิมิเดชัน เพอร์ออกซิเดตออกซิเดชัน และปฏิกิริยาแมนนิค ได้เป็นสารคอนจูเกตจำนวน 3 ชนิดที่เหมาะสมที่จะนำไปใช้เป็นอิมมูโนเจนสำหรับกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในสัตว์ทดลอง เมื่อนำสารคอนจูเกตชนิดแรกซึ่งได้จากปฏิกิริยาคาร์โบดิอิมิเดชันไปฉีดให้สัตว์ทดลอง พบว่ามีการสร้างพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อออกซิเรสเวอราทรอล เมื่อนำแอนติบอดีนี้ไปทดลองใช้วิเคราะห์ปริมาณสารออกซิเรสเวอราทรอลในแก่นต้นมะหาดและปวกหาด โดยวิธีไอโซลาแบบแข่งขันทางอ้อม พบว่ามีความแม่นยำและความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ซึ่งเป็นที่ยอมรับ แต่มีความไวต่ำกว่าวิธีวิเคราะห์แบบโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (เอชพีแอลซี) 1,000 เท่า ต่อมาได้นำสารคอนจูเกตทั้ง 3 ชนิดข้างต้นมาศึกษา นำสารแต่ละชนิดฉีดเข้าหนูทดลองเพื่อผลิตแอนติบอดีโดยวิธีไฮบริโดมา ได้มอโนโคลนอลแอนติบอดีหลายโคลนตามสารคอนจูเกตที่ใช้ จากการตรวจคัดคุณสมบัติต่างๆ พบว่าเฉพาะมอโนโคลนอลแอนติบอดีอันหนึ่งที่ได้จากสารคอนจูเกตจากปฏิกิริยาแมนนิคเท่านั้นที่มีความเหมาะสมที่จะนำมาศึกษาต่อ เมื่อนำแอนติบอดีนี้มาใช้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ไอโซลาแบบแข่งขันทางอ้อมสำหรับตรวจวัดปริมาณออกซิเรสเวอราทรอลในแก่นต้นมะหาดและปวกหาด พบว่าวิธีนี้มีความแม่นยำและความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ซึ่งเป็นที่ยอมรับ มีความไวในการตรวจวัดสูงกว่าวิธีเอชพีแอลซีถึง 16 เท่า มีความจำเพาะต่อออกซิเรสเวอราทรอลค่อนข้างสูง เมื่อนำไปทดสอบ ไม่พบว่ามีปฏิกิริยาจับกับสารอื่นที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับออกซิเรสเวอราทรอลทั้งสารในกลุ่มเฟลโวนอยด์และกลุ่มสติลปิน แต่พบว่ามีปฏิกิริยาจับกับเรสเวอราทรอลในสัดส่วนร้อยละ 89.92 วิถีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้จึงมีข้อจำกัด คือใช้ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณออกซิเรสเวอราทรอลเฉพาะในตัวอย่างที่ไม่มีเรสเวอราทรอลปนอยู่ หรือมีเรสเวอราทรอลปนอยู่ในปริมาณที่น้อยมาก อย่างไรก็ตามวิธีวิเคราะห์นี้อาจนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจติดตามการกระจายตัวของออกซิเรสเวอราทรอลในอวัยวะภายในของสัตว์ทดลอง

โครงการที่สองเป็นการศึกษาฤทธิ์ของออกซิเรสเวอราทรอลในสัตว์ทดลองในการป้องกันพิษของเบตาอะมิลลอยด์ซึ่งเป็นสารเพปไทด์ที่ก่อให้เกิดพยาธิสรีรวิทยาของโรคอัลไซเมอร์ โดยใช้แบบจำลองสมองกตมอร์ริส ใช้หนูไอซอร์เป็นสัตว์ทดลอง แบ่งออกเป็น 8 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว ประกอบด้วย กลุ่มปกติ กลุ่มควบคุมอีก 3 กลุ่มถัดไปได้รับสารออกซิเรสเวอราทรอลทางปากในรูปยาแขวนตะกอนในน้ำ ขนาด 90, 180 และ 360

มก/กก ต่อวัน และอีก 3 กลุ่มสุดท้ายได้รับสารออกซิเรสเวอราทอรอลทางปากในรูปของระบบนำส่งยาที่เกิดไมโครอิมัลชันเอง (เอสเอ็มอีดีเอส) ขนาด 90, 180 และ 360 มก/กก ต่อวัน โดยให้ยา (ออกซิเรสเวอราทอรอล) เป็นเวลา 7 วัน จึงฉีดสารละลายอะมิลอยด์เบตา 25-35 เข้าทางโพรงสมองหนู แล้วให้ยาต่ออีก 7 วัน หลังจากนั้นฝึกหนูให้หาแท่นวัตถุที่ซ่อนอยู่ในน้ำเป็นเวลา 5 วัน แล้วทำการทดสอบ โดยบันทึกพฤติกรรมของหนูและเวลาในการค้นหาแท่นวัตถุ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง เก็บเนื้อเยื่อส่วนฮิปโปแคมปัสมาศึกษาปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน และตรวจดูการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ ผลการทดลองชี้ว่าหนูกลุ่มที่ได้รับออกซิเรสเวอราทอรอลที่อยู่ในรูปยาแขวนตะกอนในขนาด 360 มก/กก และหนูกลุ่มที่ได้รับออกซิเรสเวอราทอรอลที่อยู่ในสูตรตำรับเอสเอ็มอีดีเอสทุกขนาดใช้เวลาในการหาแท่นวัตถุน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$  –  $P < 0.0001$ ) การตรวจเนื้อเยื่อฮิปโปแคมปัสของสัตว์ทดลองพบว่า กลุ่มที่ได้รับออกซิเรสเวอราทอรอลในสูตรตำรับทุกขนาด มีปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันลดลง (เหลือเป็นร้อยละ 64 – 74) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.01$  –  $P < 0.05$ ) แต่กลุ่มที่ได้รับออกซิเรสเวอราทอรอลในรูปยาแขวนตะกอนทุกขนาด ปฏิกิริยานี้ไม่ลดลง เมื่อตรวจดูลักษณะเนื้อเยื่อในฮิปโปแคมปัสด้วยการย้อมสีส่องตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าออกซิเรสเวอราทอรอลในรูปยาแขวนตะกอนขนาด 90 และ 180 มก/กก ไม่สามารถปกป้องเซลล์ประสาทจากพิษของเบตาอะมิลอยด์ได้ ส่วนในกลุ่มที่ได้รับออกซิเรสเวอราทอรอลในรูปยาแขวนตะกอนขนาด 360 มก/กก และในสูตรตำรับทุกขนาด สามารถลดการตายของเซลล์ลงได้อย่างได้อย่างมีนัยสำคัญเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $P < 0.0001$ ) ผลการทดลองทั้งหมดชี้ให้เห็นว่าออกซิเรสเวอราทอรอลสามารถป้องกันพิษของเบตาอะมิลอยด์ได้ จึงมีศักยภาพที่จะนำมาพัฒนาเพื่อใช้ป้องกันโรคอัลไซเมอร์ และนอกจากนี้ยังแสดงว่าสูตรตำรับแบบเอสเอ็มอีดีเอสช่วยให้ออกซิเรสเวอราทอรอลออกฤทธิ์ได้สูงขึ้น ทั้งนี้คาดว่าเป็นผลจากการที่สูตรตำรับช่วยให้ออกซิเรสเวอราทอรอลมีชีวปริมาณมากขึ้นและสามารถซึมผ่านจากเลือดเข้าสู่สมองในปริมาณที่สูงขึ้น

## Abstract

Oxyresveratrol (2,4,3',5'-tetrahydroxystilbene), a phytoalexin found in large amounts in the heartwood of "Ma-haad" *Artocarpus lakoocha* Roxb. (Moraceae), is known to possess a wide range of biological activities. It is also the major component in the traditional Thai anthelmintic drug "Puag-haad", a dried aqueous extract prepared from the heartwood of this plant. Currently oxyresveratrol has been widely used as an active ingredient in several skin whitening products, due to its potent tyrosinase inhibitory activity. In addition, the compound has been recently reported to exhibit preventive activity against Alzheimer's disease *in vitro*. This research program consists of two separate but related projects with the following respective objectives: (1) Development of method(s) for analysis of oxyresveratrol content in plant materials and products and (2) Investigation of the protective activity of oxyresveratrol against Alzheimer's disease *in vivo*.

The first project was concerned with the development of method(s) for quantitative analysis of oxyresveratrol through the use of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) technique. Three conjugation methods, including carbodiimidation, periodate oxidation and Mannich reaction were used to connect oxyresveratrol to bovine serum albumin, and thus yielded three types of conjugated products, which were employed as immunogens in subsequent studies. An attempt to prepare a polyclonal antibody from the carbodiimidation-derived immunogen was successful. The antibody was found to have high specificity to oxyresveratrol, and was used to develop an indirect competitive ELISA method for analysis of oxyresveratrol content in the heartwood of *A. lakoocha* and puag-haad. This method showed acceptable values of accuracy and precision. However, its sensitivity was about 1,000 times lower than that obtained by the high performance liquid chromatography (HPLC) method. Efforts to produce monoclonal antibodies from each of the three above-mentioned immunogens in mice were made by the hybridoma technique, and three types of monoclonal antibodies were obtained. However, only a certain antibody against the oxyresveratrol-BSA conjugate derived from the Mannich reaction had the properties suitable for further investigation. An indirect competitive ELISA method developed from this antibody was shown to have an acceptable accuracy and precision, with sensitivity 16-time higher than that of the HPLC technique. Primarily, this antibody appeared to not show cross-reactivity with any structurally similar polyphenolic compounds, including several flavonoids

and stilbenoids. However, a closer examination revealed that it possessed a 89.92% cross-reactivity with resveratrol. Thus, this newly developed analytical method, despite its several advantages, seems to have some limitation, as it can only be applied to the samples that contain no or only minute amounts of resveratrol. Nevertheless, the method could be used as a tool for monitoring the distribution of oxyresveratrol in the internal organs of experimental animals.

The second project aimed to investigate the ability of oxyresveratrol to protect experimental animals from the toxicity of  $\beta$ -amyloid, the peptide responsible for the pathophysiology of Alzheimer's disease. The Morris water maze model was used. The animals consist of 8 groups of 10 ICR male mice. The first group contained normal animals, and the second was the control. The animals in the next three groups received unformulated oxyresveratrol (in the form of suspension in water) orally once a day at the dose of 90, 180 and 360 mg/kg, respectively, for 7 days. The last three groups were given formulated oxyresveratrol (in the form of self-microemulsifying drug delivery system, SMEDDS) at the daily oral dose of 90, 180 and 360 mg/kg, respectively, in a similar manner. Then, neuronal damage was induced to the animals by intracerebroventricular injection with amyloid- $\beta_{25-35}$ , and the oxyresveratrol feeding was continued for another 7 days. After 5 days of training (to locate the hidden platform), the animals were subjected to the probe test. The animal behaviors were observed, and the latency times were recorded. After sacrifice, the hippocampus were removed and analyzed for lipid peroxidation and histological changes. The results showed that 360 mg/kg unformulated oxyresveratrol, as well as oxyresveratrol in SMEDDS at all doses, showed significant preventive activity as compared with the untreated control ( $p < 0.05$  -  $p < 0.0001$ ). Regarding the lipid peroxidation in the hippocampus, oxyresveratrol in SMEDDS at all doses caused significant reduction of the oxidative reaction (down to 64 – 74 %) when compared with the treated control ( $p < 0.01$  -  $p < 0.005$ ), whereas the unformulated oxyresveratrol (at all doses) did not show observable effects. Examination of the hippocampus tissues revealed that unformulated oxyresveratrol at the 90 and 180 mg/kg could not protect the neurons from death caused by  $\beta$ -amyloid, but at a higher dose (360 mg/kg) it demonstrated significant neuroprotective activity as compared with the untreated control ( $p < 0.0001$ ). Oxyresveratrol in SMEDDS at all doses could similarly prevent damage induced by the toxic peptide. All of these observations indicate the potential application of oxyresveratrol as a neuroprotectant against Alzheimer's disease. From the data in this study, it could be speculated that the SMEDDS formulation

could enhance the neuroprotective activity of oxyresveratrol by increasing the bioavailability and blood-brain-barrier permeability of the compound.

# สารบัญเรื่อง

หน้า

กิติกรรมประกาศ.....	i
บทคัดย่อ... ..	ii
Abstract.....	iv
สารบัญตาราง.....	viii
สารบัญรูป.....	ix

## บทที่

1. บทนำแผนงานวิจัย.....	1
2. โครงการวิจัยที่ 1	
เรื่อง “การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่ใช้เทคนิคอิลูซาในการตรวจวัดปริมาณสารออกซิเรสเวอราทอรอล”.....	6
3. โครงการวิจัยที่ 2	
เรื่อง “การศึกษาออกซิเรสเวอราทอรอลในการลดอาการเสื่อมของระบบประสาทในโรคอัลไซเมอร์”.....	41
4. บทสรุปแผนงานวิจัย.....	60
ประวัตินักวิจัย.....	63

## สารบัญตาราง

		หน้า
(1)	ตารางที่ 2.1 cross reactivity ของโพลีโคลนอลแอนติบอดีในการจับกับสารชนิดต่างๆ	19
(2)	ตารางที่ 2.2 ค่าความเที่ยงภายในเพลท (intra-plate) และระหว่างเพลท (inter-plate) ของวิธีวิเคราะห์ indirect competitive ELISA (n=5)	20
(3)	ตารางที่ 2.3 ค่า recovery ของวิธีวิเคราะห์ indirect competitive ELISA (n=3)	21
(4)	ตารางที่ 2.4 ปริมาณ oxyresveratrol ในมะหาดและปวกหาด ด้วยวิธี polyclonal antibody-based ELISA และ HPLC	22
(5)	ตารางที่ 2.5 ผลของอิมมูโนเจนชนิดต่างๆ ต่อการผลิตแอนติบอดีในซีรัมหนู	24
(6)	ตารางที่ 2.6 การผลิตและความสามารถในการจดจำสาร oxyresveratrol จากแอนติบอดีโคลน A1	25
(7)	ตารางที่ 2.7 cross reactivity ของมอโนโคลนอลแอนติบอดีในการจับกับสารชนิดต่างๆ	29
(8)	ตารางที่ 2.8 ค่าความเที่ยงภายในเพลท (intra-plate) และระหว่างเพลท (inter-plate) ของวิธีวิเคราะห์ indirect competitive ELISA โดยใช้มอโนโคลนอลแอนติบอดี	30
(9)	ตารางที่ 2.9 ค่า recovery ของวิธีวิเคราะห์ indirect competitive ELISA (n=3) โดยใช้มอโนโคลนอลแอนติบอดี	30
(10)	ตารางที่ 2.10 ปริมาณ oxyresveratrol ในมะหาดและปวกหาด ด้วยวิธี monoclonal antibody-based ELISA และ HPLC	31

## สารบัญรูป

		หน้า	
(1)	รูปที่ 1.1	โครงสร้าง oxyresveratrol	1
(2)	รูปที่ 2.1	วิธีการสังเคราะห์สารที่ใช้เป็นอิมมูโนเจนโดยวิธี carbodiimidation	7
(3)	รูปที่ 2.2	วิธีการสังเคราะห์สารที่ใช้เป็นอิมมูโนเจนโดยวิธี periodate oxidation	8
(4)	รูปที่ 2.3	วิธีการสังเคราะห์สารที่ใช้เป็นอิมมูโนเจนโดยวิธี Mannich reaction	8
(5)	รูปที่ 2.4	ขั้นตอนการกระตุ้นกระต่ายเพื่อผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี	9
(6)	รูปที่ 2.5	ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร oxyresveratrol ด้วยวิธี indirect competitive ELISA	11
(7)	รูปที่ 2.6	ขั้นตอนการกระตุ้นหนูเพื่อผลิตมอโนโคลนอลแอนติบอดี	12
(8)	รูปที่ 2.7	MALDI-TOF mass spectrum ของ cBSA (A) และ OXY-cBSA (B)	14
(9)	รูปที่ 2.8	MALDI-TOF mass spectrum ของ MuA-BSA	15
(10)	รูปที่ 2.9	MALDI-TOF mass spectrum ของ OXY-cBSA 1:2	15
(11)	รูปที่ 2.10	MALDI-TOF mass spectrum ของ OXY-cBSA 1:5	16
(12)	รูปที่ 2.11	MALDI-TOF mass spectrum ของ OXY-cBSA 1:10	16
(13)	รูปที่ 2.12	MALDI-TOF mass spectrum ของ OXY-cBSA 1:20	16
(14)	รูปที่ 2.13	MALDI-TOF mass spectrum ของ OXY-cBSA 1:50	17
(15)	รูปที่ 2.14	อัตราส่วนระหว่างแอนติเจนและโปรตีนในการสังเคราะห์สารโดยวิธี Mannich reaction	17
(16)	รูปที่ 2.15	ไทเทรต (titer) ของแอนติบอดีที่ได้จากซีรัมกระต่ายและความจำเพาะในการจับกับสาร oxyresveratrol	18
(17)	รูปที่ 2.16	การเกิดปฏิกิริยาระหว่างความเข้มข้นของโพลีโคลนอลแอนติบอดีกับ oxyresveratrol ด้วยวิธี indirect ELISA	18
(18)	รูปที่ 2.17	กราฟมาตรฐานของสาร oxyresveratrol ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะกับ oxyresveratrol	20

## สารบัญรูป (ต่อ)

		หน้า	
(19)	รูปที่ 2.18	ไทเทรตของแอนติบอดีที่ได้จากซีรัมหนู BALB/c และความจำเพาะในการจับกับ สาร oxyresveratrol จากอิมมูโนเจน OXA-cBS	22
(20)	รูปที่ 2.19	ไทเทรตของแอนติบอดีที่ได้จากซีรัมหนู BALB/c และความจำเพาะในการจับกับสาร oxyresveratrol จากอิมมูโนเจน MuA-BSA	23
(21)	รูปที่ 2.20	ไทเทรตของแอนติบอดีที่ได้จากซีรัมหนู BALB/c และความจำเพาะในการจับกับสาร oxyresveratrol จากอิมมูโนเจน OXY-cBSA ที่อัตราส่วนต่างๆ	24
(22)	รูปที่ 2.21	การเกิดปฏิกิริยาระหว่างความเข้มข้นของมอโนโคลนอลแอนติบอดีกับ oxyresveratrol ด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้แอนติบอดีโคลน B8	26
(23)	รูปที่ 2.22	กราฟมาตรฐานของสาร oxyresveratrol ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้มอโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน B8	26
(24)	รูปที่ 2.23	ผลการตรวจสอบชนิดของมอโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน E4	27
(25)	รูปที่ 2.24	ขนาดของมอโนโคลนอลแอนติบอดีจากการตรวจสอบโดยใช้ SDS page	28
(26)	รูปที่ 2.25	การเกิดปฏิกิริยาระหว่างความเข้มข้นของมอโนโคลนอลแอนติบอดีกับ oxyresveratrol ด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้แอนติบอดีโคลน E4	28
(27)	รูปที่ 2.26	กราฟมาตรฐานของสาร oxyresveratrol ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้มอโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน E4 จากการกระตุ้นด้วย OXY-cBSA (1:50)	29
(28)	รูปที่ 3.1	ขั้นตอนการศึกษาฤทธิ์ป้องกันความเสื่อมของสมองในหนูเม้าส์ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยการฉีดเปปไทด์ Amyloid- $\beta$ 25-35 เข้าไปทางโพรงสมอง ซึ่งเป็นโมเดลสัตว์ทดลองของโรคอัลไซเมอร์	45
(29)	รูปที่ 3.2	ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แสดงการเกาะกลุ่มของเปปไทด์ Amyloid- $\beta$ 25-35 หลังจากการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน	48
(30)	รูปที่ 3.3	น้ำหนักของหนูเม้าส์แต่ละกลุ่มในช่วงระหว่างการทดลอง เป็นเวลา 20 วัน	49
(31)	รูปที่ 3.4	พฤติกรรมการเรียนรู้และการจดจำเชิงตำแหน่งสถานที่และวัตถุในช่วง 5 วันของการฝึก ด้วยวิธี Morris water-maze ของหนูเม้าส์	50
(32)	รูปที่ 3.5	ผลการทดสอบพฤติกรรมการเรียนรู้และการจดจำเชิงตำแหน่งสถานที่และวัตถุ โดยปราศจากแท่นวัตถุ เมื่อเวลา 4 ชั่วโมงหลังจากการฝึกครั้งสุดท้าย (probe test)	51
(33)	รูปที่ 3.6	การติดตามพฤติกรรมเคลื่อนที่ของหนูเม้าส์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเปปไทด์ Amyloid- $\beta$ 25-35 ระหว่างการทดสอบโดยปราศจากแท่นวัตถุ (probe test)	53

## สารบัญรูป (ต่อ)

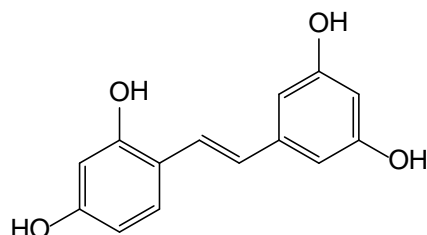
		หน้า	
(34)	รูปที่ 3.7	ระดับการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (lipid peroxidation) ในฮิปโปแคมปัสของหนูเมาส์ จากการทดสอบโดยวิธี ferrous (III)-xylene orange (FOX)	54
(35)	รูปที่ 3.8	ภาพถ่ายลักษณะเนื้อเยื่อของฮิปโปแคมปัสในแนวระนาบหน้าหลัง (coronal section) ที่ย้อมด้วย cresyl violet ในหนูเมาส์กลุ่มต่างๆที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเพปไทด์ Amyloid- $\beta$ 25-35 และบริหารออกซิเรสเวอราทรอลทางปากในรูปแบบสูตรตำรับ SMEDDS (F)	55
(36)	รูปที่ 3.9	ภาพถ่ายลักษณะทางจุลกายวิภาคเนื้อเยื่อของฮิปโปแคมปัสซีกซ้ายในส่วน CA1, CA2, CA3 และ DG ซึ่งย้อมด้วย cresyl violet ในหนูเมาส์กลุ่มต่างๆที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเพปไทด์ Amyloid- $\beta$ 25-35 และบริหารออกซิเรสเวอราทรอลทางปากในรูปแบบสูตรตำรับ SMEDDS (F)	56
(37)	รูปที่ 3.10	ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ประสาทในฮิปโปแคมปัสทั้งสองซีกต่อพื้นที่ (ตารางมิลลิเมตร) ของหนูเมาส์กลุ่มต่างๆที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเพปไทด์ Amyloid- $\beta$ 25-35 และบริหารออกซิเรสเวอราทรอลโดยการรับประทานในรูปแบบสูตรตำรับ SMEDDS และสารแขวนตะกอนที่ขนาดยาต่างๆ	58

# บทที่ 1

## บทนำแผนงานวิจัย

### ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ออกซิเรสเวราทรอล (oxyresveratrol) มีโครงสร้างเป็น 2,4,3',5'-tetrahydroxystilbene (รูปที่ 1.1) เป็นสารธรรมชาติที่พบในพืชหลายชนิดในวงศ์ Moraceae ตัวอย่างเช่น มะหาด *Artocarpus lakoocha* Roxb. (Mongolsuk, et al., 1957) แต่เดิมสาร oxyresveratrol เป็นที่ทราบแต่เพียงว่ามีฤทธิ์ถ่ายพยาธิ (anthelmintic activity) ตั้งแต่พ.ศ. 2540 เป็นต้นมาคณะผู้วิจัยได้การศึกษาฤทธิ์ชีวภาพของ oxyresveratrol อย่างต่อเนื่อง และได้พบว่าสารนี้มีฤทธิ์ชีวภาพอื่นๆ ที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายด้าน เช่นฤทธิ์ทำให้ผิวขาว (skin whitening activity) (Sritularak et al., 1998; Likhitwitayawuid, et al., 2006; Tengamnuay, et al., 2006) ฤทธิ์ยับยั้งไวรัสเริม (anti-herpes simplex virus activity) (Likhitwitayawuid et al., 2005; Lipipun et al., 2011) ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (anti-oxidative activity) (Aftab et al., 2011) และฤทธิ์ปกป้องดีเอ็นเอ (DNA protective activity) (Chatsampun et al., 2011)



รูปที่ 1.1 โครงสร้าง oxyresveratrol

คณะผู้วิจัยได้เสนอแผนงานวิจัย หรือชุดโครงการวิจัย (research program) นี้ โดยมีจุดมุ่งหมายที่จะสร้างองค์ความรู้ใหม่เพื่อให้สามารถนำสาร oxyresveratrol ใช้ประโยชน์ในทางยาหรือเครื่องสำอางได้มากขึ้น แผนงานวิจัยนี้ประกอบด้วยโครงการย่อย 2 โครงการ ได้แก่ (1) การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่ใช้เทคนิคไอโซลาในการตรวจวัดปริมาณสารออกซิเรสเวราทรอล และ (2) การศึกษาฤทธิ์ของออกซิเรสเวราทรอลในการบรรเทาอาการเสื่อมของระบบประสาท โครงการย่อยแต่ละโครงการมีที่มาของโจทย์วิจัยดังนี้

โครงการวิจัยที่ (1) จากผลงานวิจัยที่เกี่ยวกับฤทธิ์ของ oxyresveratrol ที่ทำให้ผิวขาว (skin whitening activity) ที่คณะผู้วิจัยได้เผยแพร่ผลวิจัยออกสู่สาธารณะ ในเวลาต่อมาได้มีผู้ประกอบการหลายรายนำสารสกัดจากแก่นต้นมะหาด (ซึ่งมี oxyresveratrol เป็นสารสำคัญ) ไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางจำหน่ายกันอย่างแพร่หลาย ทำให้เกิดประเด็นคำถามเกี่ยวกับวัตถุดิบ (ได้แก่ แก่นมะหาด และเปลือก) และผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางว่ามีปริมาณสาร oxyresveratrol มากน้อยเพียงใด จากการสำรวจรายงานการวิจัยในเบื้องต้น พบว่ามีรายงานวิธีทางเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ oxyresveratrol ในตัวอย่างพืชและสารสกัดหลายวิธี เช่นวิธี HPLC และ TLC (Shao et al., 2007; Huang 2008; Bertram et al., 2010;

Maneechai et al., 2009) แต่ยังไม่มียางานการศึกษาการใช้ชีวโมเลกุลเพื่อวิเคราะห์ปริมาณสาร oxyresveratrol คณะผู้วิจัยจึงได้เห็นว่าควรศึกษาวิธีทางอิมมูโนโลยี (immunology) เพื่อใช้หาปริมาณ oxyresveratrol ในวัตถุดิบหรือผลิตภัณฑ์สมุนไพร โดยคาดหวังว่าวิธีนี้จะมีความจำเพาะและแม่นยำสูง และอาจนำไปตัดแปลงประยุกต์ใช้ในงานวิจัยด้านอื่นๆ เช่น ใช้วิเคราะห์ปริมาณ oxyresveratrol ในเนื้อเยื่ออวัยวะของสัตว์ทดลอง แนวคิดนี้จึงได้เป็นโจทย์วิจัยในโครงการเรื่อง “การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่ใช้เทคนิคอิมมูโนโลยีในการตรวจวัดปริมาณสารออกซิเรสเวอราทรอล (Development of enzyme-linked immunosorbent assay for quantitative determination of oxyresveratrol)”

โครงการวิจัยที่ (2) เป็นการขยายผลการวิจัยในส่วนฤทธิ์ยับยั้งไวรัสเริม (herpes simplex virus, HSV) ของ oxyresveratrol คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษากฤทธิ์ยับยั้งไวรัสเริมทั้งแบบที่ 1 และแบบที่ 2 (HSV-1 และ HSV-2) ทั้งในหลอดทดลอง (*in vitro*) (Likhitwitayawuid et al., 2005) ไปจนถึงในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) จนได้สูตรผลิตภัณฑ์สำหรับทาผิวหนังซึ่งติดเชื้อไวรัส HSV-1 ซึ่งมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับยา acyclovir (Lipipun et al., 2011; Sasivimolphan, et al., 2013.) ในปัจจุบันได้มีข้อมูลการวิจัยทางการแพทย์เพิ่มเติมว่าในผู้ป่วยโรคมะเร็งหลังจากที่แผลที่ผิวหนังของหายแล้ว จะมีการฝังตัวของเชื้อ HSV-1 ที่สมอง ซึ่งหลักฐานหลายอย่างบ่งชี้ว่าการฝังตัวของเชื้อ HSV-1 นี้มีความเกี่ยวข้องกับการก่อโรคความจำเสื่อมหรืออัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) (Špeljko et al., 2011) คณะผู้วิจัยจึงได้ศึกษาเพิ่มเติมพบว่า oxyresveratrol มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (antioxidative activity) และสามารถปกป้องดีเอ็นเอ (DNA protective activity) จากพิษของอนุมูลอิสระบางอย่างได้ดีกว่า trolox และ ascorbic acid (Aftab et al., 2011; Chatsampun et al., 2011) ข้อมูลดังกล่าวนี้สอดคล้องกับรายงานการศึกษาจากนักวิจัยกลุ่มอื่นๆ ว่า oxyresveratrol มีฤทธิ์ปกป้องระบบประสาท (neuroprotective activity) โดยผ่านกลไกการต้านออกซิเดชันในหลายรูปแบบ (Lorenz et al., 2003; Andrabi et al., 2004) นอกจากนี้การศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง rat cortical neurons พบว่า oxyresveratrol ช่วยปกป้องเซลล์ประสาทจากพิษของ  $\beta$ -amyloid peptide ซึ่งเป็นสารที่เป็นสาเหตุของอาการของโรคความจำเสื่อมหรืออัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) ได้ (Ban et al., 2006; Jeon et al., 2007) จากข้อมูลข้างต้นคณะผู้วิจัยจึงตั้งสมมติฐานว่าสาร oxyresveratrol อาจมีศักยภาพที่จะนำมาใช้ป้องกันหรือบรรเทาอาการของโรคอัลไซเมอร์ได้ ซึ่งเป็นที่มาของโครงการวิจัยเรื่อง “การศึกษาฤทธิ์ของออกซิเรสเวอราทรอลในการลดอาการเสื่อมของระบบประสาทในโรคอัลไซเมอร์ (Study of oxyresveratrol for the ability to ameliorate neurodegenerative processes in Alzheimer's disease)”

### วัตถุประสงค์และขอบเขตการทำวิจัย

1. พัฒนารูปแบบวิเคราะห์ oxyresveratrol แบบ ELISA เพื่อนำไปใช้วิเคราะห์ปริมาณ oxyresveratrol ในตัวอย่างวัตถุดิบสมุนไพร ผลิตภัณฑ์สมุนไพร
2. ศึกษาฤทธิ์ของ oxyresveratrol ในการลดหรือป้องกันอาการเสื่อมของระบบประสาทในสัตว์ทดลอง

## ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ด้านวิชาการ: สร้างองค์ความรู้ใหม่ 2 เรื่อง เรื่องแรกเป็นวิธีวิเคราะห์สาร oxyresveratrol ในวัตถุดิบและ/หรือผลิตภัณฑ์สมุนไพร ซึ่งอาจนำไปประยุกต์ใช้ต่อในงานวิจัยด้านอื่นๆ ได้ด้วย เรื่องที่สองเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่จะชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้/ไม่ได้ ที่จะนำสาร oxyresveratrol มาใช้ป้องกันหรือบรรเทาอาการโรคอัลไซเมอร์

2. ด้านนโยบาย: สนองนโยบายของรัฐบาลที่จะเร่งพัฒนาให้ประเทศไทยเป็นสังคมที่อยู่บนพื้นฐานขององค์ความรู้ และเร่งสร้างนักวิทยาศาสตร์ และนักวิจัย ให้เพียงพอต่อความต้องการของประเทศ

3. ด้านเศรษฐกิจ/พาณิชย์: องค์ความรู้ใหม่ที่สร้างขึ้นอาจช่วยเพิ่มคุณค่าให้แก่มะหาดและพืชอื่นๆ ที่เป็นแหล่งธรรมชาติของ oxyresveratrol ซึ่งอาจนำไปสู่การสร้างมูลค่าในเชิงพาณิชย์ต่อไป

4. ด้านสังคมและชุมชน: องค์ความรู้ใหม่ที่เกิดขึ้น จะช่วยส่งเสริมให้ประชาชนทั่วไปและสังคมได้เข้าใจและมองเห็น ประโยชน์ ความจำเป็นและคุณค่าในการศึกษาและอนุรักษ์พืชสมุนไพรไทย

## หมายเหตุ

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์นี้ ได้แบ่งการนำเสนอเนื้อหาออกเป็น 4 บท ดังนี้

**บทที่ 1** เป็นบทนำ ซึ่งกล่าวถึงความจำเป็นมา วัตถุประสงค์ ขอบเขต และประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากแผนงานวิจัย

**บทที่ 2** เป็นเนื้อหาของโครงการวิจัยเรื่อง “การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่ใช้เทคนิคอิมมูโนซอร์เบนต์ในการตรวจวัดปริมาณสารออกซิเรสเวราทรอล (Development of enzyme-linked immunosorbent assay for quantitative determination of oxyresveratrol)” ซึ่งกล่าวถึงรายละเอียดการดำเนินงาน การอภิปรายผล และสรุปผลวิจัย

**บทที่ 3** เป็นเนื้อหาของโครงการวิจัยเรื่อง “การศึกษาฤทธิ์ของออกซิเรสเวราทรอลในการลดอาการเสื่อมของระบบประสาทในโรคอัลไซเมอร์ (Study of oxyresveratrol for the ability to ameliorate neurodegenerative processes in Alzheimer’s disease)” ซึ่งกล่าวถึงรายละเอียดการดำเนินงาน การอภิปรายผล และสรุปผลวิจัย

**บทที่ 4** เป็นบทสรุปของแผนการวิจัย ซึ่งกล่าวถึงผลวิจัยทั้งหมด และประโยชน์ที่ได้รับ

## เอกสารอ้างอิง

- Aftab N, Likhitwitayawuid K, Vieira A. Comparative antioxidant activities and synergism of resveratrol and oxyresveratrol. *Nat. Prod. Res.* 2010; 24: 1726-1733.
- Andrabi SA, Spina MG, Lorenz P, Ebmeyer U, Wolf G, Horn TFW. Oxyresveratrol (*trans*-2,3',4,5'-tetrahydroxystilbene) is neuroprotective and inhibits the apoptotic cell death in transient cerebral ischemia. *Brain Res.* 2004; 1017: 98-107.
- Ban J, Jeon S, Nguyen T, Bae K, Song K, Seong Y. Neuroprotective effect of oxyresveratrol from *Smilacis Chinae* rhizome on amyloid  $\beta$  protein (25—35)-induced neurotoxicity in cultured rat cortical neurons *Biol. Pharm. Bull.* 2006; 29: 2419-2424.
- Bertram RM, Takemoto JK, Remsberg CM, Vega-Villa KR, Sablani S, Davies NM. High-performance liquid chromatographic analysis: applications to nutraceutical content and urinary disposition of oxyresveratrol in rats. *Biomed. Chromatogr.* 2010; 24: 516-521.
- Chatsumpun M, Chuanasa T, Sritularak B, Likhitwitayawuid K. Oxyresveratrol protects against DNA damage induced by photosensitized riboflavin. *Nat. Prod. Comm.* 2011; 6: 41-44.
- Huang H, Zhang J, Chen G, Lu Z, Wang X, Sha N, Shao B, Li P, Guo DA. High performance liquid chromatographic method for the determination and pharmacokinetic studies of oxyresveratrol and resveratrol in rat plasma after oral administration of Smilax china extract. *Biomed. chromatogr.* 2008; 22: 421-427
- Jeon S, Kwon S, Seong Y, Bae K, Hur J, Lee Y, Suh D, Song K.  $\beta$ -secretase (BACE1)-inhibiting stilbenoids from Smilax Rhizoma. *Phytomedicine* 2007; 14: 403-408.
- Likhitwitayawuid K, Sritularak B, Benchanak K, Lipipun V, Mathew J, Schinazi RF. Phenolics with antiviral activity from *Millettia erythrocalyx* and *Artocarpus lakoocha*. *Nat. Prod. Res.* 2005; 19: 177-182.
- Likhitwitayawuid K, Sornsute A, Sritularak B, Ploypradith P. Chemical transformations of oxyresveratrol (*trans*-2,4,3',5'-tetrahydroxystilbene) into a potent tyrosinase inhibitor and a strong cytotoxic agent *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006; 16: 5650-5653.
- Lipipun V, Sasivimolphan P, Yoshida Y, Daikoku T, Sritularak B, Ritthidej G, Likhitwitayawuid K, Pramyothin P, Hattori M, Shiraki K. Topical cream-based oxyresveratrol in the treatment of cutaneous HSV-1 infection in mice. *Antiviral Res.* 2011; 91: 154-160.
- Lorenz P, Roychowdhury S, Engelmann M, Wolf G, Horn TFW. Oxyresveratrol and resveratrol are potent antioxidants and free radical scavengers: effect on

- nitrosative and oxidative stress derived from microglial cells. *Nitric Oxide* 2003; 9: 64–76.
- Maneechai S, Likhitwitayawuid K, Sritularak B, Palanuvej C, Ruangrunsi N, Sirisa-Ard P. Quantitative analysis of oxyresveratrol content in *Artocarpus lakoocha* and 'Puag-Haad'. *Med Princ Pract*. 2009; 3, 18: 223-227.
- Mongolsuk S, Robertson A, Towers R. 2,4,3',5'-Tetrahydroxystilbene from *Artocarpus lakoocha*. *J. Chem. Soc.* 1957; 2231-2233.
- Sasivimolphan P, Lipipun V, Ritthidej G, Chitphet K, Yoshida Y, Daikoku T, Sritularak B, Likhitwitayawuid K, Pramyothin P, Hattori M, Shiraki K. Microemulsion-based oxyresveratrol for topical treatment of herpes simplex virus (HSV) infection: Physicochemical properties and efficacy in cutaneous HSV-1 infection in mice. *AAPS PharmSciTech*. 2013; 13: 1266-1275.
- Shao B, Guo HZ, Cui YJ, Liu AH, Yu HL, Guo H, Xu M, Guo DA. Simultaneous determination of six major stilbenes and flavonoids in *Smilax china* by high performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007; 44:737-742.
- Špeljko T, Jutric D, Šimić G. HSV1 in Alzheimer's disease: myth or reality? *Trans. Neuro.* 2011; 2: 61-68.
- Sritulaluk B, De-Eknamkul W, Likhitwitayawuid K. Tyrosinase inhibitors from *Artocarpus lakoocha*. *Thai J. Pharm. Sci.* 1998; 22: 149-155.
- Tengamnuay P, Pengrungruangwong K, Pheansri I, Likhitwitayawuid K. *Artocarpus lakoocha* heartwood extract as a novel cosmetic ingredient: evaluation of the *in vitro* anti-tyrosinase and *in vivo* skin whitening activities *Int J. Cosm Sci.* 2006; 28: 269-276.

## บทที่ 2

### โครงการวิจัยที่ 1

#### การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่ใช้เทคนิคอีไลซา ในการตรวจวัดปริมาณสารออกซิเรสเวอราทรอล

#### 1. ความสำคัญและที่มาของการวิจัย

ออกซิเรสเวอราทรอล (oxyresveratrol) จัดเป็นสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ในกลุ่ม stilbenoids ที่พืชสร้างขึ้นเพื่อป้องกันอันตรายจากสิ่งต่างๆ ที่รบกวนการดำรงชีวิตของพืช ได้แก่ แมลงศัตรูพืช แบคทีเรีย รา และแสง UV เป็นต้น สาร oxyresveratrol พบในพืชวงศ์ Moraceae หลายชนิด โดยที่พบ oxyresveratrol ในปริมาณสูงได้แก่แก่นมะหาด (*Artocarpus lakoocha* Roxb.) และรากหม่อน (*Morus alba* L.) จากข้อมูลการศึกษาวิจัยพบว่า oxyresveratrol มีฤทธิ์ทางหลายอย่างเช่น ฤทธิ์ยับยั้ง เอนไซม์ tyrosinase และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Kim et al., 2002; 2010) ฤทธิ์ปกป้องตับจากพิษของ ethanol (Zhang et al., 2008) ฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท (Horn et al., 2004) ฤทธิ์ชะลอการเกิดสีน้ำตาล ค้ำในแอปเปิ้ล (Li et al., 2007) ฤทธิ์ต้านไวรัส herpes simplex virus (Lipipun et al., 2011) และ African swine fever virus (Alonso et al., 2011) จากข้อมูลฤทธิ์ทางชีวภาพของ oxyresveratrol ดังกล่าว ทำให้ oxyresveratrol ได้รับความสนใจจากนักวิจัยอย่างมาก ในการที่จะพยายามพัฒนานำไปใช้ประโยชน์ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์สมุนไพรเพื่อสุขภาพและเครื่องสำอาง ปัจจุบันแก่นของต้นมะหาดซึ่งเป็นพืชที่มีการสะสม oxyresveratrol ในปริมาณสูงเป็นที่ต้องการของตลาดเป็นจำนวนมาก เพื่อนำไปใช้เป็นองค์ประกอบในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เนื่องจากคุณสมบัติของ oxyresveratrol ในการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ tyrosinase ดังนั้นการวิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ oxyresveratrol ในวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้อง จึงเป็นสิ่งสำคัญในการควบคุมคุณภาพของสมุนไพรให้ได้มาตรฐาน วิธีการวิเคราะห์ดังกล่าวควรมีความถูกต้องรวดเร็ว มีความไว และความแม่นยำสูง เหมาะสำหรับการนำไปตรวจวัดปริมาณ oxyresveratrol ในแก่นมะหาดและผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้อง จากการสำรวจรายงานการวิจัยพบว่า ได้มีรายงานวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณสาร oxyresveratrol โดยใช้วิธี high-performance liquid chromatography (Shao et al., 2007; Huang 2008; Bertram et al., 2010) และ thin-layer chromatography (TLC) densitometric method (Maneechai et al., 2009)

ปัจจุบันได้มีการศึกษาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาจากพืชสมุนไพร โดยอาศัยเทคนิคด้านอิมมูโนโลยีสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสารนั้น เนื่องจากมีความแม่นยำและจำเพาะเจาะจงสูง วิธีเตรียมสารตัวอย่างไม่ยุ่งยาก สามารถนำสารสกัดหยาบมาทำการวิเคราะห์ได้ อีกทั้งยังเป็นวิธีที่มีความสะดวกและรวดเร็ว จึงเหมาะกับการวิเคราะห์สารในปริมาณต่ำ และมีจำนวนตัวอย่างมาก ได้ คณะผู้วิจัยได้มีประสบการณ์ในการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสาร mangiferin ซึ่งเป็นสารหลักที่ออกฤทธิ์ในใบมะม่วง ด้วยวิธี enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) (Yusakul et al., 2012) ซึ่งมีความไวและความแม่นยำในการตรวจสอบ นอกจากนี้ ยังได้ทำการศึกษาวิจัยอย่างต่อเนื่องเกี่ยวกับผลิตแอนติบอดีต่อสารที่ออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในพืชสมุนไพรโดยได้ทำการผลิตแอนติบอดีเพื่อนำมาใช้ตรวจสอบสารในต้นบัวบกและกวาวเครือขาว (Tassanawat et al., 2012; 2013; Pongkitwitoon et al., 2010; 2011) จากเหตุผลที่กล่าว

มาข้างต้นแล้วว่าในขณะนี้ยังไม่มีการศึกษาวิจัยการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสาร oxyresveratrol ซึ่งเป็นสารหลักและสารออกฤทธิ์ที่พบในมะหาด คณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะพัฒนาวิธีวิเคราะห์สำหรับตรวจวัดปริมาณสาร oxyresveratrol ด้วยเทคนิคทางอิมมูโนโลยี โดยมุ่งเน้นการผลิตแอนติบอดีแบบโพลีโคลนอลและโมโนโคลนอลที่จำเพาะต่อ oxyresveratrol เพื่อนำมาพัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่ใช้เทคนิค ELISA สำหรับตรวจสาร oxyresveratrol ในพืชสมุนไพรและผลิตภัณฑ์ ทั้งทางเชิงปริมาณและคุณภาพ ในการ วิเคราะห์ดังกล่าวคาดว่าจะจะเป็นประโยชน์ต่อผู้ผลิตวัตถุดิบ และผู้ประกอบการอุตสาหกรรมสมุนไพร นอกจากนี้แอนติบอดีที่ผลิตได้ยังอาจนำไปประยุกต์ใช้ในการวิจัยเกี่ยวกับ oxyresveratrol ในด้านอื่นๆ ได้ด้วย เช่นตรวจสอบการสะสมสารในพืช การกระจายตัวของสารในอวัยวะของสัตว์ทดลอง และการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของสาร

## 2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

2.1 ผลิตโมโนโคลนอลและโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสาร oxyresveratrol

2.2 พัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสาร oxyresveratrol ในพืชสมุนไพรและผลิตภัณฑ์ด้วยวิธี ELISA โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีและโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้

## 3. ขอบเขตของโครงการวิจัย

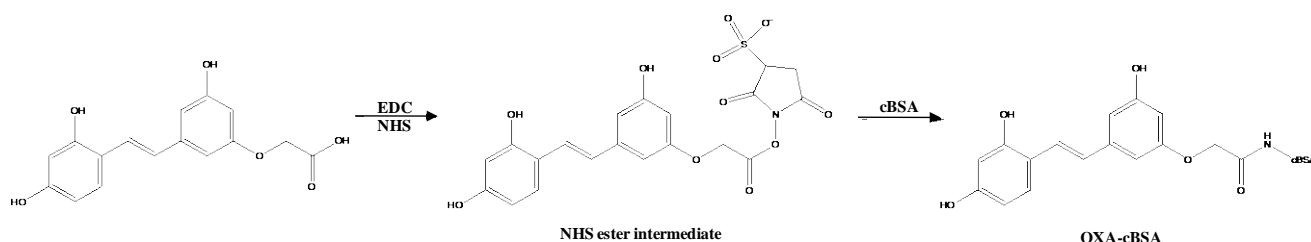
ผลิตโพลีโคลนอลและโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับสาร oxyresveratrol และนำแอนติบอดีดังกล่าวมาประยุกต์ใช้พัฒนาวิธีวิเคราะห์สาร oxyresveratrol ในพืชสมุนไพรและผลิตภัณฑ์ด้วยวิธี ELISA

## 4. วิธีดำเนินการวิจัย

### 4.1 การสังเคราะห์สารที่ใช้เป็นอิมมูโนเจน

#### 4.1.1 การสังเคราะห์สารที่ใช้เป็นอิมมูโนเจนโดยวิธี carbodiimidation

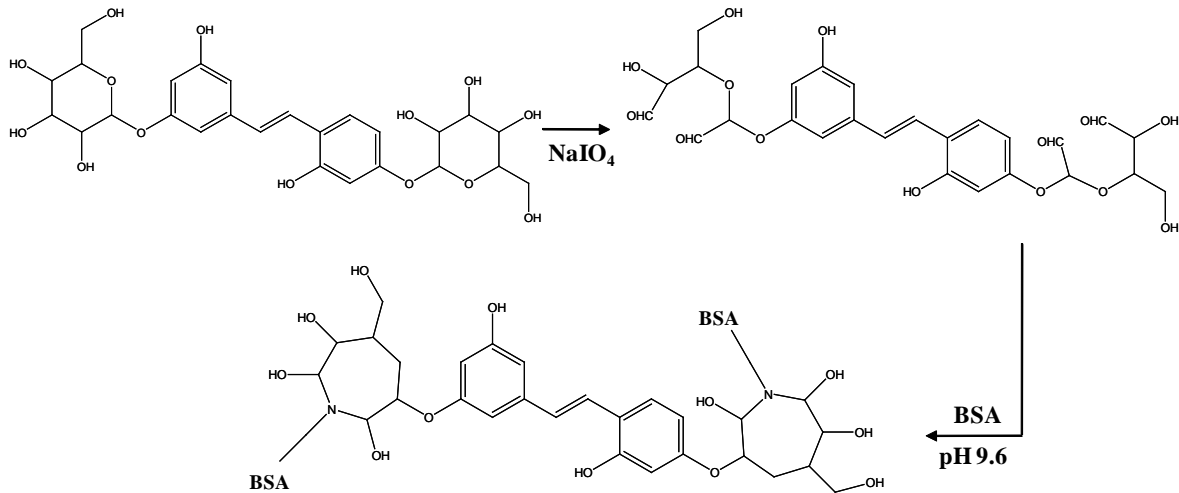
นำสาร oxyresveratrol ที่ได้ทำการสังเคราะห์ให้มีหมู่ฟังก์ชันที่เหมาะสมในการเชื่อมต่อกับโปรตีนที่มีโมเลกุลใหญ่เพื่อสร้างแฮปเทน (hapten) โดยนำสาร oxyresveratrol acid ที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงหมู่ฟังก์ชันให้เกิด methyl-carboxylic acid บริเวณ phenol ring มาทำการเชื่อมต่อกับโปรตีน cationized bovine serum albumin (cBSA) และ cationized ovalbumin (cOVA) โดยทำปฏิกิริยา carbodiimidation กับ EDC/NHS ได้เป็น OXA-cBSA จากนั้นทำการตรวจสอบการเชื่อมต่อกับโปรตีนโดยใช้วิธี MALDI mass spectrometry ขั้นตอนในการทำปฏิกิริยาเตรียมสารที่ใช้เป็นอิมมูโนเจนแสดงดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 วิธีการสังเคราะห์สารที่ใช้เป็นอิมมูโนเจนโดยวิธี carbodiimidation

#### 4.1.2 การสังเคราะห์สารที่ใช้เป็นอิมมูโนเจนโดยวิธี periodate oxidation

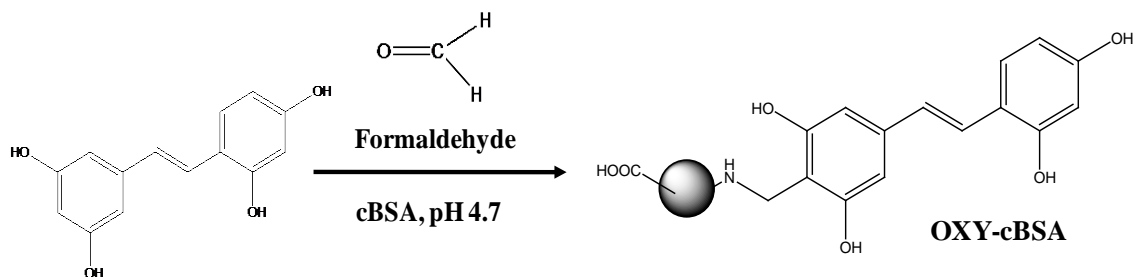
นำสาร mulberroside A ซึ่งเป็นสารที่เป็น glycoside ของ oxyresveratrol มาทำปฏิกิริยาด้วยวิธี periodate oxidation จากนั้น ทำการตรวจสอบการเชื่อมต่อกับโปรตีนโดยใช้วิธี MALDI mass spectrometry ขั้นตอนในการทำปฏิกิริยาเพื่อเตรียมสารที่ใช้เป็นอิมมูโนเจนแสดงดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 วิธีการสังเคราะห์สารที่ใช้เป็นอิมมูโนเจนโดยวิธี periodate oxidation

#### 4.1.3 การสังเคราะห์สารที่ใช้เป็นอิมมูโนเจนโดยวิธี Mannich reaction

นำสาร oxyresveratrol มาทำการเชื่อมต่อกับโปรตีน cationized bovine serum albumin (cBSA) และ cationized ovalbumin (cOVA) โดยทำปฏิกิริยาด้วยวิธี Mannich reaction ได้เป็น OXY-cBSA จากนั้นทำการตรวจสอบการเชื่อมต่อกับโปรตีนโดยใช้วิธี MALDI mass spectrometry ขั้นตอนในการทำปฏิกิริยาเพื่อเตรียมสารที่ใช้เป็น อิมมูโนเจนแสดงดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 วิธีการสังเคราะห์สารที่ใช้เป็นอิมมูโนเจนโดยวิธี Mannich reaction

## 4.2 การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี

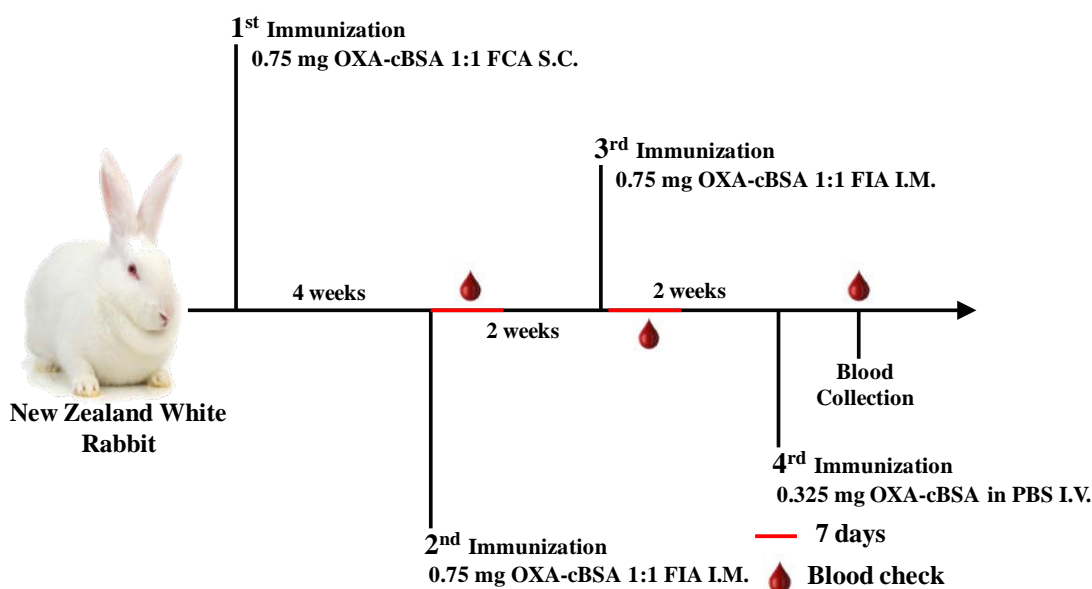
### 4.2.1 สัตว์ทดลอง

กระต่ายเพศผู้สายพันธุ์ New Zealand White อายุ 3 เดือน ได้จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล จังหวัดนครปฐม การดูแลสัตว์ทดลองได้ผ่านการพิจารณาของคณะกรรมการจรรยาบรรณ

และมาตรฐานการเลี้ยงและการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ตามเอกสารเลขที่ จส. มข. 31/2557

#### 4.2.2 การกระตุ้นกระต่ายให้สร้างแอนติบอดี (immunization)

นำอิมมูโนเจน OXA-cBSA ที่ได้จากวิธีการสังเคราะห์ด้วยวิธี carbodiimides (วิธีที่ 4.1.1) มาทำการฉีดเข้าที่บริเวณใต้ผิวหนัง (s.c.) กระต่าย (New Zealand White) โดยทำการฉีดร่วมกับ Freund's complete adjuvant หลังจากการกระตุ้นครั้งแรก 4 สัปดาห์ ทำการฉีดสารกระตุ้นครั้งที่ 2 เข้าที่บริเวณกล้ามเนื้อส่วนขาของกระต่าย (i.m.) โดยทำการฉีดร่วมกับ Freund's incomplete adjuvant หลังจากนั้น 1 สัปดาห์ นำซีรัมกระต่ายที่ได้รับการฉีดอิมมูโนเจนมาทำการตรวจสอบการเกิดแอนติบอดีโดยวิธี indirect ELISA และ indirect competitive ELISA หลังจากทำการกระตุ้นครั้งที่ 2 เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ทำการฉีดอิมมูโนเจนครั้งที่ 3 เข้าที่บริเวณกล้ามเนื้อส่วนขาของกระต่าย (i.m.) โดยทำการฉีดร่วมกับ Freund's incomplete adjuvant จากนั้น 1 สัปดาห์ นำซีรัมกระต่ายมาทำการตรวจสอบการเกิดแอนติบอดีโดยวิธี ELISA จากนั้นทำการฉีดครั้งที่ 4 โดยใช้อิมมูโนเจนที่ละลายใน PBS และทำการฉีดเข้าเส้นเลือดดำ (i.v.) ขั้นตอนการกระตุ้นกระต่ายให้สร้างแอนติบอดีแสดงดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 ขั้นตอนการกระตุ้นกระต่ายเพื่อผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี

#### 4.2.3 การทำให้แอนติบอดีบริสุทธิ์

นำซีรัมจากเลือดกระต่ายที่สามารถสร้างแอนติบอดีมาทำให้บริสุทธิ์โดยการแยก IgG โดยใช้คอลัมน์ชนิด Protein G FF (0.46 x 11 cm, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) โดยมีขั้นตอนการแยก IgG จากซีรัมกระต่ายดังนี้

นำซีรัมปริมาตร 1-2 ml ผ่านคอลัมน์ชนิด Protein G FF ทำการล้างคอลัมน์ด้วย 20 mM phosphate buffer (pH 7) เพื่อล้างสารอื่นๆ ออกจากคอลัมน์ จากนั้น ทำการชะด้วยสารละลาย 100 mM citrate buffer (pH 2.7) เพื่อใช้ในการแยกแอนติบอดีออกจากคอลัมน์ แอนติบอดีที่ได้จากคอลัมน์นำไปทำปฏิกิริยาการสะเทินด้วย 1 M Tris-HCl buffer pH 9.0 จากนั้น นำไปทำการ dialysis ด้วยน้ำที่

อุณหภูมิ 4°C โปรตีนของแอนติบอดีที่ได้นำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze drying)

#### 4.2.4 ตรวจสอบคุณสมบัติของแอนติบอดี

ทำการตรวจสอบคุณสมบัติของแอนติบอดีที่ได้ โดยการนำไปตรวจสอบคุณสมบัติในการจับกับสาร oxyresveratrol และสารอื่นที่มีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงกันโดยวิธี indirect competitive ELISA จากนั้น ทำการคำนวณหา % cross reactivity ของแอนติบอดีที่ผลิตได้กับสารชนิดต่างๆ ด้วยวิธีของ Weiler and Zenk (1976)

#### 4.2.5 พัฒนารีวิววิเคราะห์สาร oxyresveratrol โดยวิธี ELISA

พัฒนารีวิวการวิเคราะห์หาปริมาณสาร oxyresveratrol ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้แอนติบอดีที่ผลิตได้ จากนั้นทำการหาความเที่ยง ความไว และความแม่นยำในการวิเคราะห์ และตรวจสอบหาปริมาณสาร oxyresveratrol ที่พบในมะหาดเปรียบเทียบกับวิธี HPLC วิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร oxyresveratrol โดยวิธี ELISA มีขั้นตอนแสดงดังรูปที่ 2.5

อนึ่งการวิเคราะห์ปริมาณสาร oxyresveratrol ในตัวอย่างพืชด้วยวิธี HPLC ที่ใช้เปรียบเทียบ มีสถานะในการวิเคราะห์ดังนี้

High performance liquid chromatography PerkinElmer Series 200 LC pump และ PerkinElmer 785A UV/VIS detector, PE Nelson computer

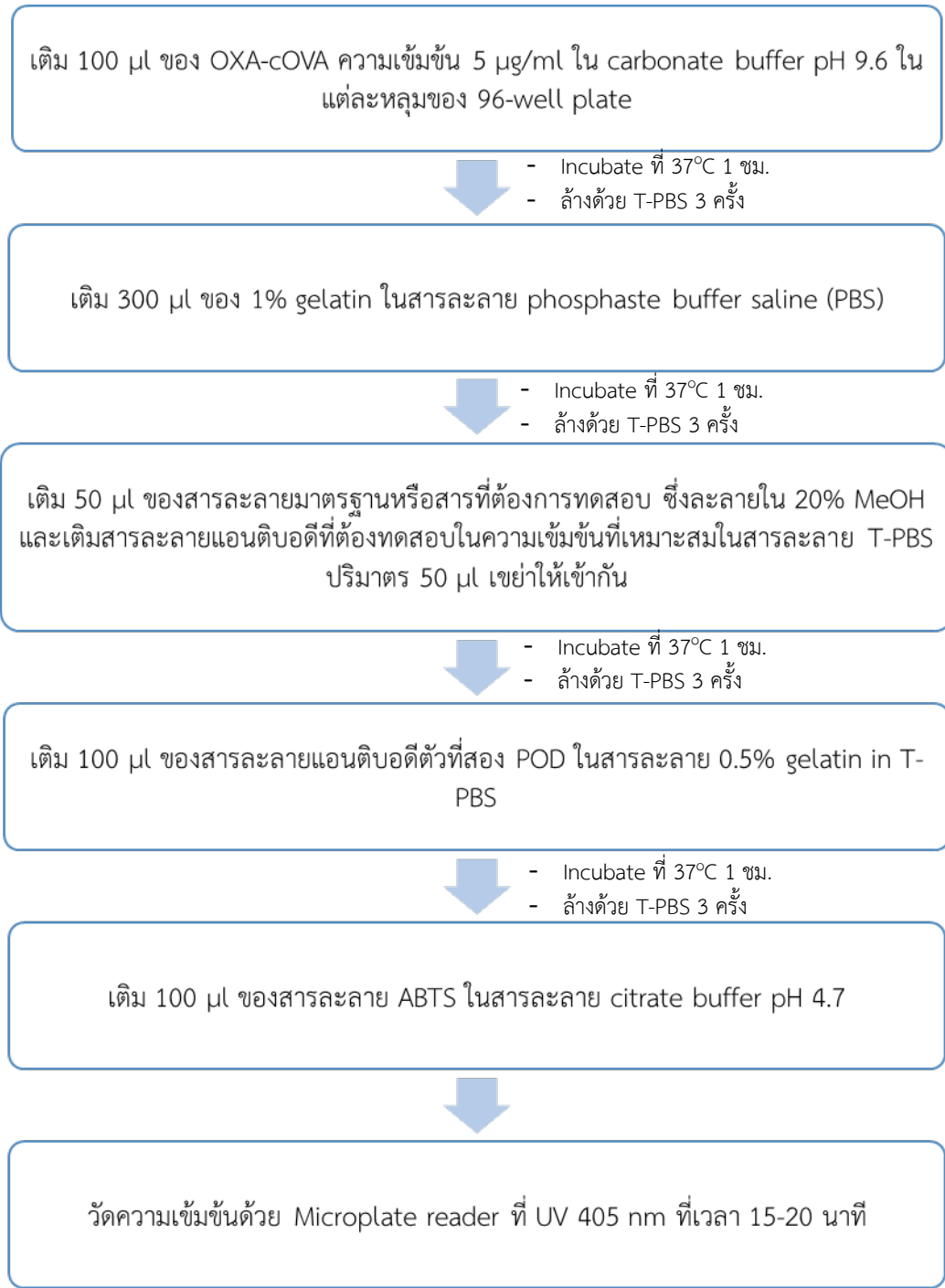
Column : LiChroCART®, 125 x 4 mm, 5 µm particle size; Merck, Germany

Mobile phase : 20% acetonitrile ที่มี 0.5% acetic acid

Flow rate : 1.0 ml/min

Detector wavelength : 320 nm

Injection volume : 20 µl



รูปที่ 2.5 ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร oxyresveratrol ด้วยวิธี indirect competitive ELISA

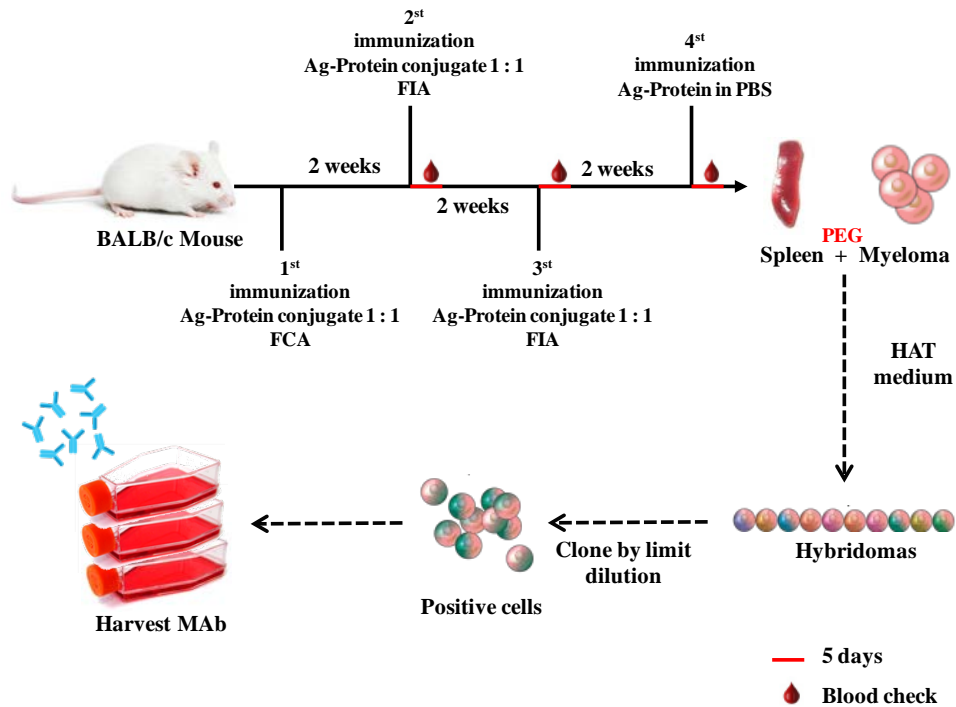
### 4.3 การผลิตมโนโคลนอลแอนติบอดี

#### 4.3.1 สัตว์ทดลอง

หนูเม้าส์เพศผู้สายพันธุ์ Balb/c อายุ 6 สัปดาห์ ได้จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล จังหวัดนครปฐม การดูแลสัตว์ทดลองได้ผ่านการพิจารณาของคณะกรรมการจริยธรรมและมาตรฐานการเลี้ยงและการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ตามเอกสารเลขที่ จส.มข. 31/2557 (ภาคผนวก)

#### 4.3.2 การกระตุ้นหนูให้สร้างสารแอนติบอดี

ทำการฉีดสารอิมมูโนเจน OXA-cBSA เข้าที่บริเวณหน้าท้องหนู (mouse, Balb/c strain) ทุกๆ 2 สัปดาห์ โดยทำการฉีดร่วมกับ Freund's complete adjuvant จากนั้น ทำการฉีดอิมมูโนเจนครั้งที่ 2 และ 3 โดยทำการฉีดร่วมกับ Freund's incomplete adjuvant ส่วนครั้งที่ 4 จะทำการฉีดกระตุ้นโดยไม่ได้ฉีดร่วมกับ adjuvant จากนั้น นำซีรัมหนูที่ได้รับการฉีดอิมมูโนเจนมาทำการตรวจสอบการผลิตแอนติบอดีที่ได้โดยวิธี ELISA ขั้นตอนการกระตุ้นหนูให้สร้างแอนติบอดีแสดงดังรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 ขั้นตอนการกระตุ้นหนูเพื่อผลิตมโนโคลนอลแอนติบอดี

#### 4.3.3 การหลอมรวมเซลล์และคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา (hybridoma)

นำเซลล์ม้ามจากหนูมาหลอมรวมกับเซลล์ไมอีโลมา (myeloma, sp2/0) (RIKEN BioResource center, Iwabaki, Japan) ด้วยวิธี polyethylene glycol (PEG) ทำการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา (hybridoma) และทำการเลี้ยงเซลล์ที่ 37°C/5% CO<sub>2</sub> incubator โดยใช้ HAT medium จากนั้น ทำการเลี้ยง

ไปเป็นระยะเวลา 10 วัน แล้วนำส่วน supernatant ของอาหารที่ทำการเพาะเลี้ยงมาตรวจสอบการผลิตแอนติบอดีโดยวิธี indirect ELISA เมื่อได้เซลล์ที่ผลิตแอนติบอดีแล้วทำการแยกเซลล์ที่ได้ให้เป็นเซลล์เดี่ยวๆ โดยใช้วิธี clone by limiting dilution ภายใน 2-3 อาทิตย์ จะได้โคลนีเดี่ยวๆ ที่สามารถผลิตแอนติบอดีมากพอที่จะทำการตรวจสอบได้โดยวิธี ELISA อีกครั้ง โคลนที่ให้ผลบวกต่อการตรวจสอบ จะถูกนำมาเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณ

#### 4.3.4 การทำให้แอนติบอดีบริสุทธิ์

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไฮบริโดมาในอาหารเพาะเลี้ยงจนได้ปริมาณแอนติบอดีปริมาณมาก จากนั้น นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ protein G FF เพื่อแยกแอนติบอดีออกมาโดยอาศัยหลักการในการจับกับ Fc ของแอนติบอดีและแยกสารออกมาโดยใช้สารบัฟเฟอร์ (buffer) ที่มี pH ต่ำ ตามวิธีการและขั้นตอนในข้อ 3.2.3

#### 4.3.5 ตรวจสอบคุณสมบัติของแอนติบอดี

ทำการตรวจสอบคุณสมบัติของมอโนโคลนอลแอนติบอดี โดยการนำไปตรวจสอบคุณสมบัติในการจับกับสาร oxyresveratrol และสารอื่นที่มีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงกันโดยวิธี indirect competitive ELISA จากนั้นทำการคำนวณหา % cross reactivity ของแอนติบอดีที่ผลิตได้กับสารชนิดต่างๆ ด้วยวิธีของ Weiler and Zenk (1976)

#### 4.3.6 พัฒนาวิธีวิเคราะห์สาร oxyresveratrol โดยวิธี ELISA

พัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณสาร oxyresveratrol ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้แอนติบอดีที่ผลิตได้ ตามขั้นตอนและวิธีการในข้อที่ 4.2.5 ทำการหาความเที่ยง และความไวในการวิเคราะห์ และตรวจสอบหาปริมาณสาร oxyresveratrol ที่พบในมะหาดเปรียบเทียบกับวิธี HPLC

### 4.4 การเตรียมตัวอย่างพืชเพื่อตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสาร oxyresveratrol

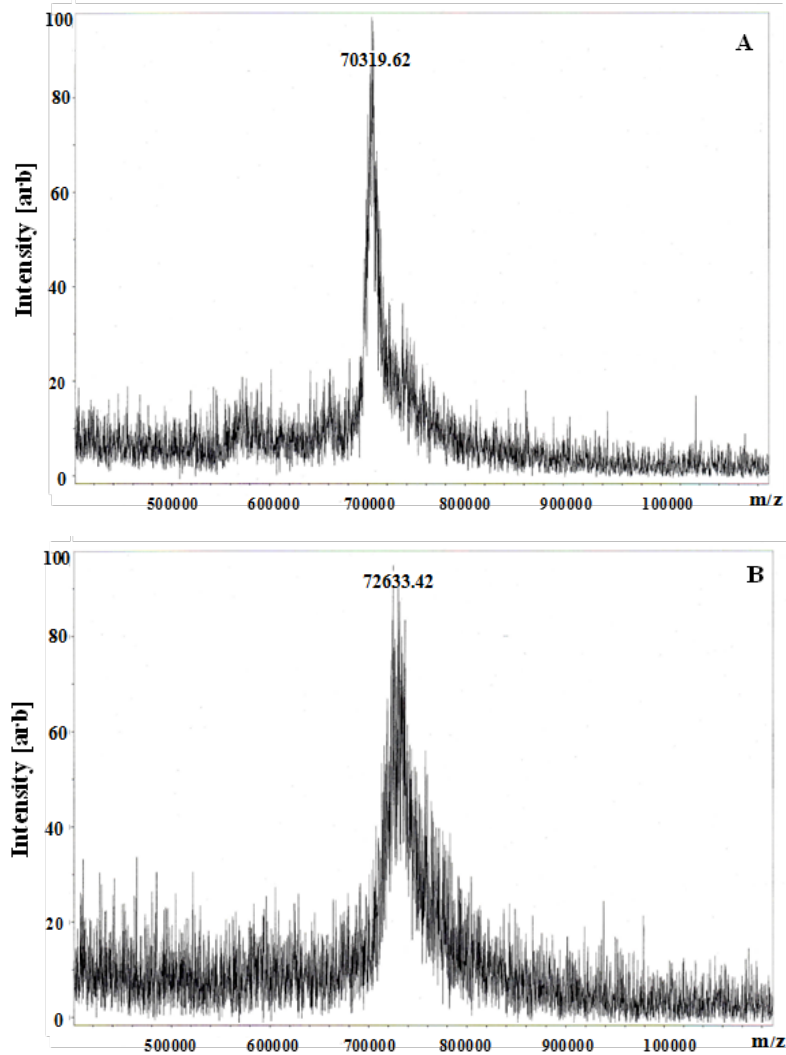
ตัวอย่างพืชนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 2 วัน ทำการบดให้เป็นผงละเอียด จากนั้น ทำการชั่งตัวอย่าง 50 mg แล้วนำไปสกัดด้วย methanol 500 µl และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใส จากนั้น ทำการสกัดซ้ำ 4 ครั้ง เก็บส่วนใสทั้งหมดรวมกันแล้วนำไประเหยจนแห้ง แล้วปรับปริมาตรด้วย methanol 1 ml จากนั้นทำการนำไปตรวจวิเคราะห์ปริมาณ oxyresveratrol ด้วยวิธี ELISA ที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับวิธี HPLC

## 5. ผลการวิจัย

### 5.1 การสังเคราะห์สารที่ใช้เป็นอิมมูโนเจน

#### 5.1.1 การสังเคราะห์สารที่ใช้เป็นอิมมูโนเจนโดยวิธี carbodiimidation

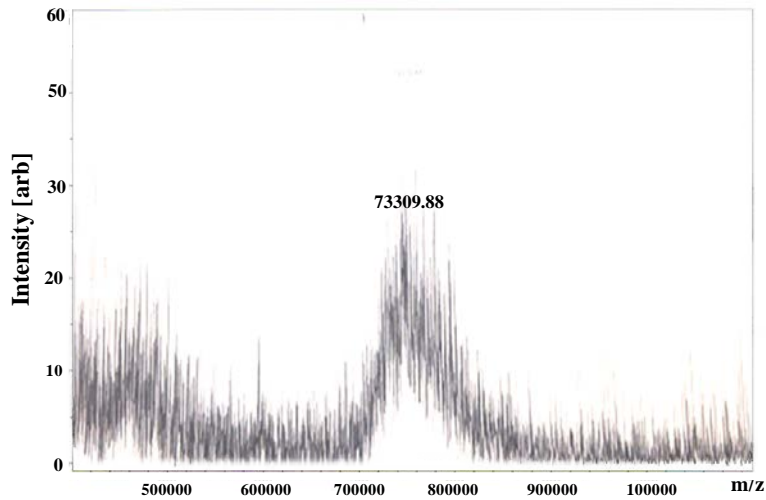
oxyresveratrol acid ที่เชื่อมต่อกับโปรตีน cBSA (OXA-cBSA) จากการเตรียมโดยวิธี carbodiimidation โดยใช้ EDC/NSH ได้นำมาทำการตรวจสอบ hapten number โดย MALDI-TOF-MS (BrukerDaltonics, Bremen, Germany) รูปที่ 2.7 แสดงน้ำหนักโมเลกุลของอิมมูโนเจนที่สังเคราะห์ได้ พบว่า OXA-cBSA มีน้ำหนักโมเลกุล 72633.42 ในขณะที่โปรตีน cBSA มีน้ำหนักโมเลกุล 70319.62 เมื่อทำการคำนวณหาจำนวน hapten number โดยน้ำหนักโมเลกุลของ oxyresveratrol acid มีค่า 287 พบว่า อิมมูโนเจนที่สังเคราะห์ได้มีจำนวน hapten number เป็น 8 จะเห็นได้ว่า ค่าที่ได้อยู่ในช่วงที่เหมาะสม (hapten number 5-25) ดังนั้น อิมมูโนเจนที่สังเคราะห์ได้จึงสามารถนำมาใช้ในการกระตุ้นสัตว์ทดลองให้สร้างแอนติบอดี



รูปที่ 2.7 MALDI-TOF mass spectrum ของ cBSA (A) และ OXY-cBSA (B)

### 5.1.2 การสังเคราะห์สารที่ใช้เป็นอิมมูโนเจนโดยวิธี *periodate oxidation*

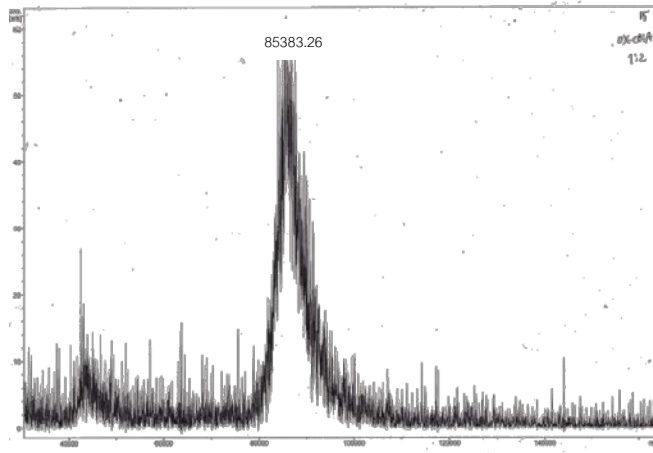
mulberroside A ที่เชื่อมต่อกับโปรตีน BSA (MuA-BSA) ด้วยวิธี *periodate oxidation* ได้นำมาทำการตรวจสอบ hapten number โดย MALDI-TOF-MS รูปที่ 2.8 แสดงน้ำหนักโมเลกุลของอิมมูโนเจนที่สังเคราะห์ได้พบว่า MuA-BSA มีน้ำหนักโมเลกุล 73309.88 ในขณะที่โปรตีน BSA มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 66382 เมื่อทำการคำนวณหาจำนวน hapten number โดยน้ำหนักโมเลกุลของ mulberroside A มีค่า 508 พบว่า อิมมูโนเจนที่สังเคราะห์ได้มีจำนวน hapten number เป็น 13 ดังนั้น แอนติเจนที่สังเคราะห์ได้จึงสามารถนำมาใช้ในการกระตุ้นสัตว์ทดลองให้สร้างแอนติบอดี



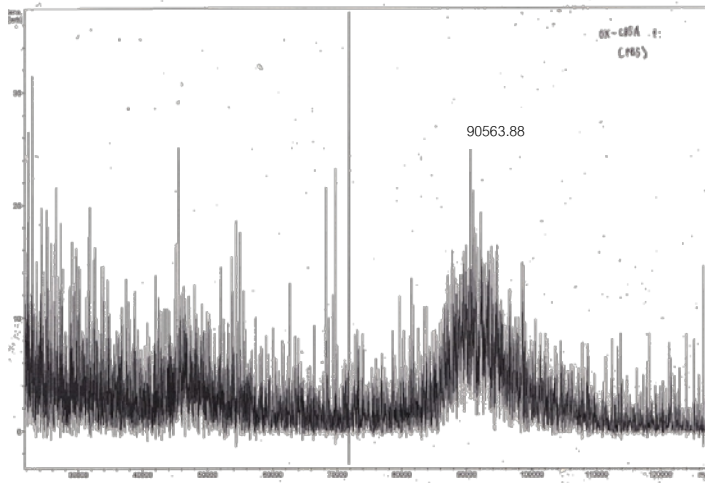
รูปที่ 2.8 MALDI-TOF mass spectrum ของ MuA-BSA

### 5.1.3 การสังเคราะห์สารที่ใช้เป็นอิมมูโนเจนโดยวิธี Mannich reaction

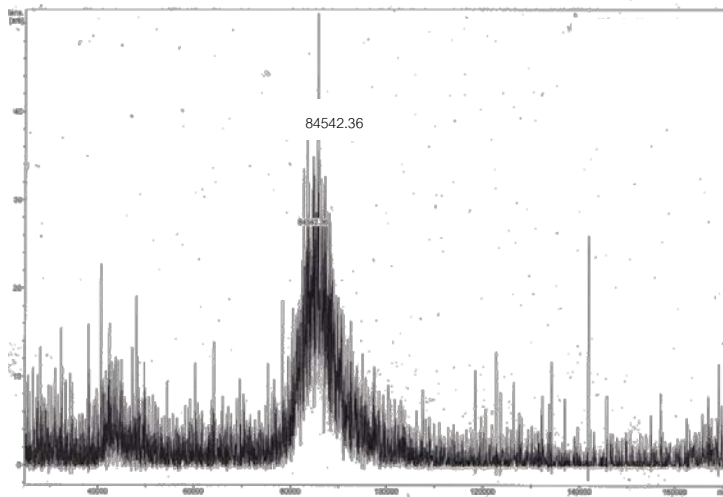
oxyresveratrol ที่เชื่อมต่อกับโปรตีน cBSA (OXY-cBSA) จากการเตรียมโดยวิธี Mannich reaction ได้นำมาทำการตรวจสอบ hapten number โดย MALDI-TOF-MS จากการศึกษาโดยใช้อัตราส่วนระหว่างสาร oxyresveratrol และโปรตีน cBSA ที่แตกต่างกัน ได้แก่ 1:2, 1:5, 1:10, 1:20 และ 1:50 พบว่า จำนวน hapten number ที่ได้มีความแตกต่างกัน คิดเป็น 63, 65, 62, 36 และ 20 ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 2.9 – 2.13



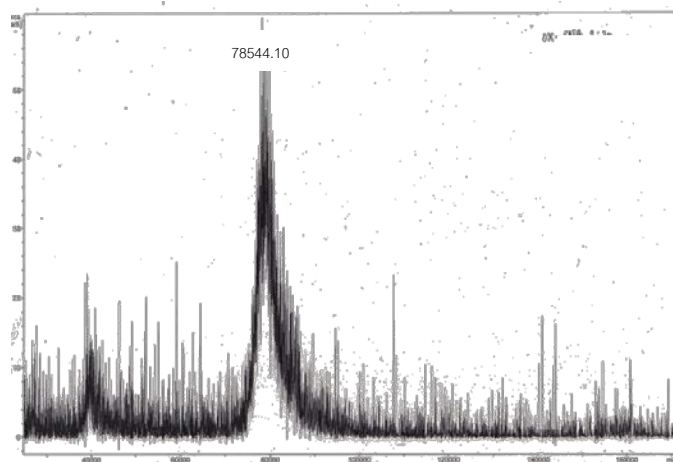
รูปที่ 2.9 MALDI-TOF mass spectrum ของ OXY-cBSA 1:2



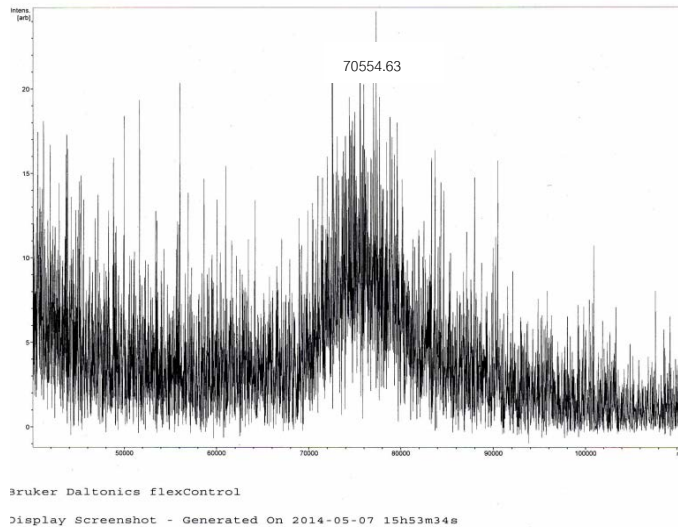
รูปที่ 2.10 MALDI-TOF mass spectrum ของ OXY-cBSA 1:5



รูปที่ 2.11 MALDI-TOF mass spectrum ของ OXY-cBSA 1:10

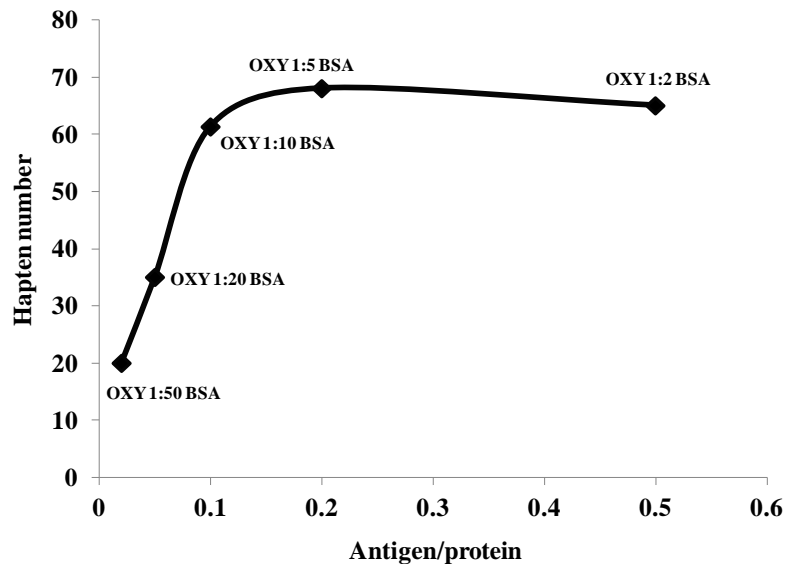


รูปที่ 2.12 MALDI-TOF mass spectrum ของ OXY-cBSA 1:20



รูปที่ 2.13 MALDI-TOF mass spectrum ของ OXY-cBSA 1:50

อัตราส่วนระหว่างแอนติเจนและโปรตีนในการเชื่อมต่อโดยวิธี Mannich reaction จากรูปที่ 2.14 แสดงให้เห็นว่า อัตราส่วน 1:2 ถึง 1:10 ให้จำนวน hapten number อยู่ในช่วงที่ใกล้เคียงกันคือ 62-65 ในขณะที่อัตราส่วนของโปรตีนที่เพิ่มขึ้นเป็น 1:20 และ 1:50 จะมีผลให้จำนวน hapten number ลดลงเป็น 36 และ 20 ตามลำดับ

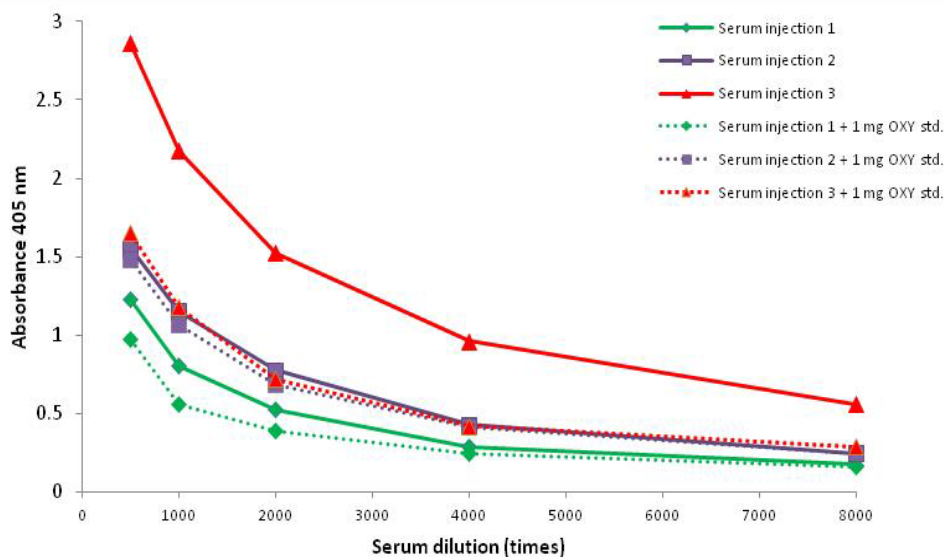


รูปที่ 2.14 อัตราส่วนระหว่างแอนติเจนและโปรตีนในการสังเคราะห์สารโดยวิธี Mannich reaction

## 5.2 การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี

จากการกระตุ้นกระต่าย (New Zealand White) ด้วยอิมมูโนเจนจากวิธี carbodiimides (OXA-cBSA) จำนวน 4 ครั้ง และนำซีรัมที่ได้จากเลือดกระต่ายมาทำการตรวจสอบคุณสมบัติของแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA และตรวจสอบคุณสมบัติในการจับกับ oxyresveratrol ด้วยวิธี indirect competitive ELISA ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 2.15 จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า กระต่ายสามารถสร้างแอนติบอดีและมีการจดจำสาร

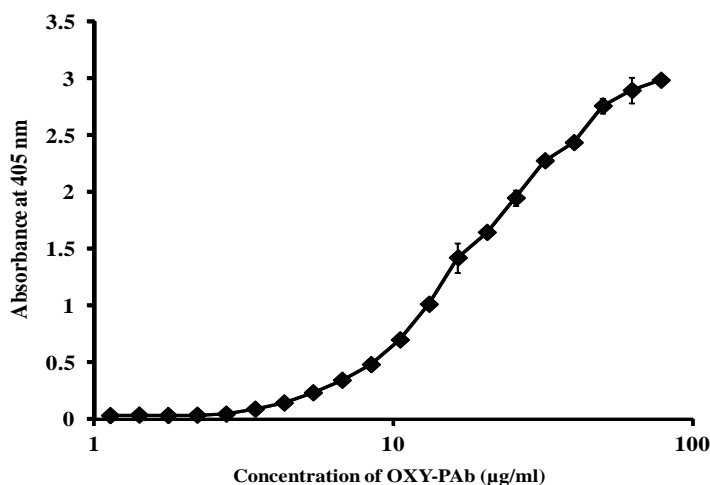
oxyresveratrol ได้ ดังนั้น จึงทำการกระตุ้นกระต่ายในครั้งที่ 4 และทำการเก็บเลือดกระต่ายในปริมาณที่มากขึ้น ทำการแยกซีรัมและนำซีรัมที่ได้ไปทำการแยกแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ Protein G FF



รูปที่ 2.15 ไทเทอร์ (titer) ของแอนติบอดีที่ได้จากซีรัมกระต่ายและความจำเพาะในการจับกับสาร oxyresveratrol

### 5.2.1 คุณสมบัติของโพลีโคลนอลแอนติบอดี

เมื่อนำแอนติบอดีที่ผลิตได้มาทำการตรวจสอบคุณสมบัติในการจับกับแอนติเจนโดยวิธี indirect ELISA พบว่า แอนติบอดีที่มีความเข้มข้น 13.10  $\mu\text{g/ml}$  เหมาะสมในการจับกับแอนติเจนโดยให้ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ประมาณ 1.0 แสดงดังรูปที่ 2.16 ดังนั้น ความเข้มข้นของแอนติบอดีดังกล่าวจึงนำมาใช้ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์โดย indirect competitive ELISA



รูปที่ 2.16 การเกิดปฏิกิริยาระหว่างความเข้มข้นของโพลีโคลนอลแอนติบอดีกับ oxyresveratrol ด้วยวิธี indirect ELISA

เมื่อทำการตรวจสอบคุณสมบัติของแอนติบอดีในการจับกับสาร oxyresveratrol และสารอื่นที่มีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงเพื่อหาปฏิกิริยาข้าม (cross reactivity) ค่าที่ได้แสดงดังตารางที่ 2.1 ผลการศึกษาพบว่า แอนติบอดีที่ผลิตได้มีความจำเพาะกับสาร oxyresveratrol สูง โดยแอนติบอดีไม่สามารถจับกับสารอื่นที่มีสูตร

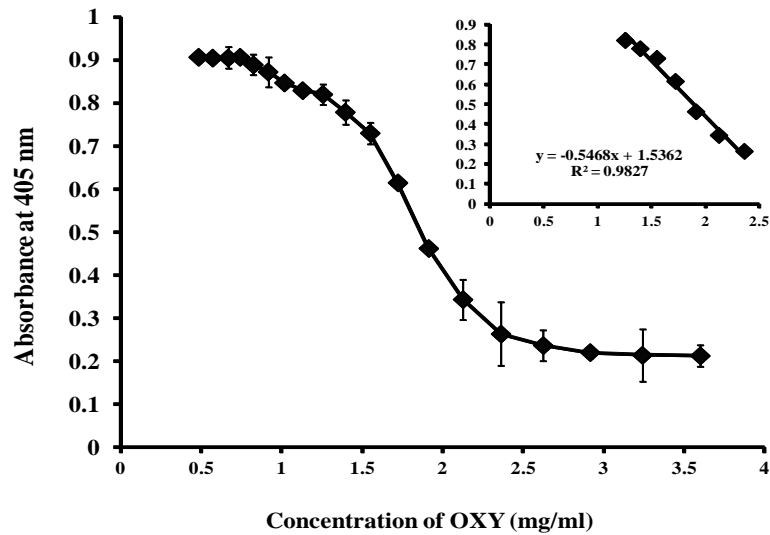
โครงสร้างใกล้เคียงกันได้ รวมทั้ง resveratrol และ mulberroside A ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม stilbenoids และสารอื่นๆ หลายชนิดในกลุ่ม flavonoids

**ตารางที่ 2.1** cross reactivity ของโพลีโคลนอลแอนติบอดีในการจับกับสารชนิดต่างๆ

สาร	กลุ่มสาร	Cross-reactivity (%)
Oxyresveratrol		100%
Resveratrol	Stilbenoids	< 0.01
Mulberroside A		< 0.01
Rutin		< 0.01
Artocarpin		< 0.01
Cycloartobiloxanthone		< 0.01
Norcycloartocarpin	Flavonoids	< 0.01
Chalcomoracin		< 0.01
Quercetin		< 0.01
Kaemferol		< 0.01

### 5.2.2 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สาร oxyresveratrol โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดี

จากการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สาร oxyresveratrol ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีพบว่า ช่วงของการตรวจวิเคราะห์สาร oxyresveratrol อยู่ระหว่าง 1.12-2.12 mg/ml โดยกราฟมาตรฐานของ oxyresveratrol แสดงดังรูปที่ 2.17



รูปที่ 2.17 กราฟมาตรฐานของสาร oxyresveratrol ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้โพลีโคลอนอลแอนติบอดีที่จำเพาะกับ oxyresveratrol

จากการตรวจสอบความเที่ยง (precision) ของวิธีวิเคราะห์โดยการหาค่าความเที่ยงภายในเพลท (intra-plate) และระหว่างเพลท (inter-plate) พบว่า ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) มีค่าไม่เกิน 10% ในทุกความเข้มข้นของสารมาตรฐาน แสดงดังตารางที่ 2.2 แสดงให้เห็นว่า วิธีการที่พัฒนาขึ้นมีความเที่ยงในการวิเคราะห์

ตารางที่ 2.2 ค่าความเที่ยงภายในเพลท (intra-plate) และระหว่างเพลท (inter-plate) ของวิธีวิเคราะห์ indirect competitive ELISA (n=5)

Oxyresveratrol concentration (mg/ml)	Intra-assay RSD (%)	Inter-assay RSD (%)
2.12	2.69	3.47
1.91	6.41	6.11
1.72	4.14	4.14
1.55	0.58	3.15
1.39	3.13	5.09
1.26	3.99	1.12
1.13	2.90	2.66

จากการตรวจสอบความแม่นยำ (accuracy) ของวิธีวิเคราะห์โดยการเติมสารมาตรฐานลงในตัวอย่าง (spike sample) ที่ 3 ระดับ และหา % recovery พบว่า % recovery ของ oxyresveratrol อยู่ในช่วง 98-102.10% (ตารางที่ 2.3) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ แสดงให้เห็นว่า วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีความแม่นยำ สามารถนำมาใช้เพื่อหาปริมาณสาร oxyresveratrol ในตัวอย่างได้

ตารางที่ 2.3 ค่า recovery ของวิธีวิเคราะห์ indirect competitive ELISA (n=3)

Spike of oxyresveratrol concentration (mg/ml)	Oxyresveratrol content (mg/ml)	Recovery (%)	RSD (%)
0	1.21±0.08	-	6.24
0.2	1.41±0.05	99.54	3.32
0.8	2.02±0.19	102.10	9.39
1	2.20±0.06	98.90	2.47

### 5.2.3 การหาปริมาณสาร oxyresveratrol ในพืชสมุนไพรด้วยวิธี indirect competitive ELISA และ HPLC

การวิเคราะห์ปริมาณสาร oxyresveratrol โดยวิธี indirect competitive ELISA ที่พัฒนาขึ้นได้นำมาประยุกต์ใช้เพื่อหาปริมาณสารดังกล่าวในมะหาดและปวกหาด เปรียบเทียบกับวิธี HPLC แสดงดังตารางที่ 2.4 เมื่อพิจารณาช่วงการวิเคราะห์สารด้วยวิธี ELISA พบว่า มีช่วงการวิเคราะห์เป็น 1.12-2.21 mg/ml ซึ่งมีค่าที่สูงกว่าวิธี HPLC ถึง 1,000 เท่า แสดงให้เห็นว่า ค่าความไว (sensitivity) ในการวิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA ต่ำกว่าวิธีมาตรฐาน HPLC ดังนั้น กรณีที่ตัวอย่างพืชที่ทำการตรวจวิเคราะห์มีปริมาณสารต่ำ วิธี ELISA จะไม่สามารถตรวจสอบได้ จากตารางที่ 2.4 จะเห็นได้ว่า สามารถตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารได้จากตัวอย่างของปวกหาดหรือแก่นมะหาดเท่านั้น ปริมาณสารจากส่วนใบ เปลือก และกิ่ง ไม่สามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธี ELISA ปริมาณสาร oxyresveratrol ที่พบในปวกหาดและแก่นมะหาดด้วยวิธี ELISA คิดเป็น 683.52 และ 212.14 mg/g น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ เมื่อนำค่าที่ตรวจสอบได้จากทั้งสองวิธีมาหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (%correlation coefficient) พบว่า วิธีการทั้งสองมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ 0.9878

ตารางที่ 2.4 ปริมาณ oxyresveratrol ในมะหาดและปวกหาด ด้วยวิธี polyclonal antibody-based ELISA และ HPLC

ตัวอย่าง	Oxyresveratrol content (mg/g dry wt.)	
	HPLC	ELISA
มะหาด		
ใบหมายเลข 1	0.07±0.00	ND
ใบหมายเลข 2	0.02±0.00	ND
กิ่ง	0.06±0.00	ND
เปลือก	0.08±0.00	ND
แก่น	237.71±8.64	212.14±18.92
ปวกหาด		
ปวกหาดหมายเลข 1	664.08±3.23	683.52±11.18
ปวกหาดหมายเลข 2	676.43±1.76	618.32±3.44

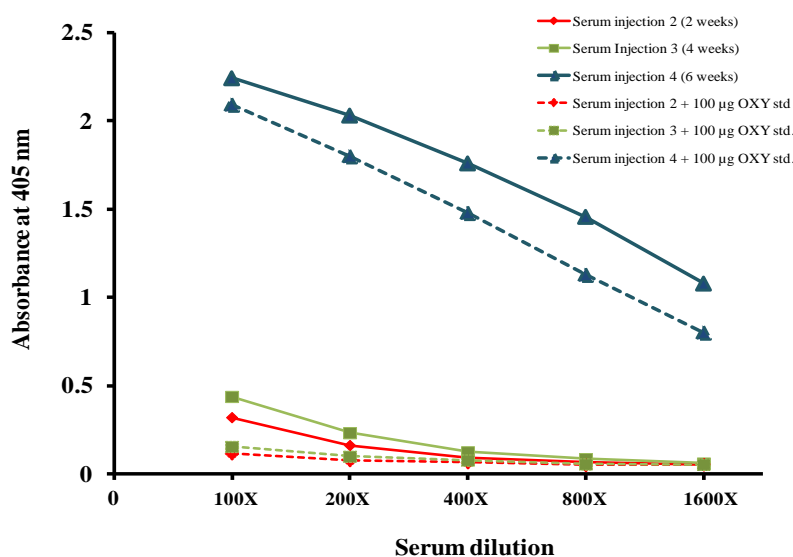
ND = not detected

### 5.3 การผลิตมอโนโคลนอลแอนติบอดี

#### 5.3.1 ผลของอิมมูโนเจนจากการสังเคราะห์ด้วยวิธีต่างๆ ต่อการผลิตแอนติบอดี

##### 5.3.1.1 อิมมูโนเจนจากวิธี carbodiimidation

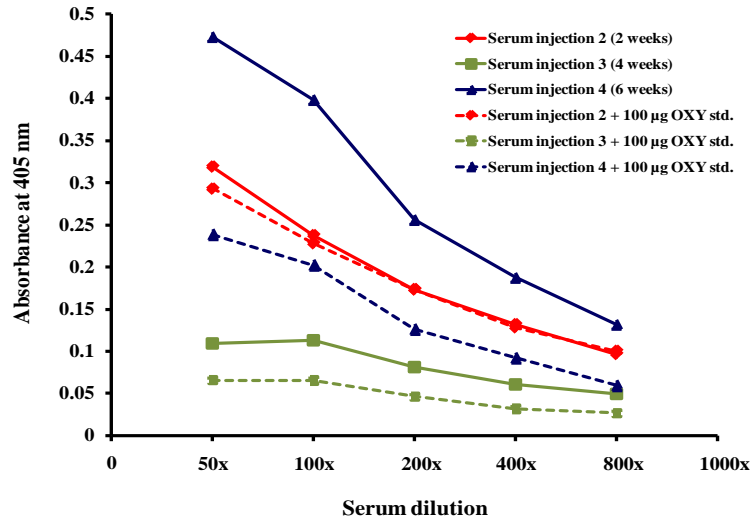
จากการฉีดอิมมูโนเจนชนิด OXA-cBSA ที่ได้จากปฏิกิริยา carbodiimidation เพื่อกระตุ้นหนูสายพันธุ์ BALB/c ให้ผลิตแอนติบอดีจำนวน 4 ครั้ง นำซีรัม (serum) ที่ได้จากเลือดหนูมาทำการตรวจสอบแอนติบอดีที่ผลิตได้ด้วยวิธี indirect ELISA และตรวจสอบคุณสมบัติในการจับกับ oxyresveratrol ด้วยวิธี indirect competitive ELISA ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 2.18



รูปที่ 2.18 ไทเทอร์ของแอนติบอดีที่ได้จากซีรัมหนู BALB/c และความจำเพาะในการจับกับสาร oxyresveratrol จากอิมมูโนเจน OXA-cBSA

### 5.3.1.2 อิมมูโนเจนจากวิธี periodate oxidation

จากการฉีดอิมมูโนเจนชนิด MuA-BSA ที่ได้จากปฏิกิริยา periodate oxidation เพื่อกระตุ้นหนูสายพันธุ์ BALB/c ให้ผลิตแอนติบอดีจำนวน 4 ครั้ง นำซีรัมที่ได้จากเลือดหนูมาทำการตรวจสอบแอนติบอดีที่ผลิตได้ด้วยวิธี indirect ELISA และตรวจสอบคุณสมบัติในการจับกับ oxyresveratrol ด้วยวิธี indirect competitive ELISA ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 2.19

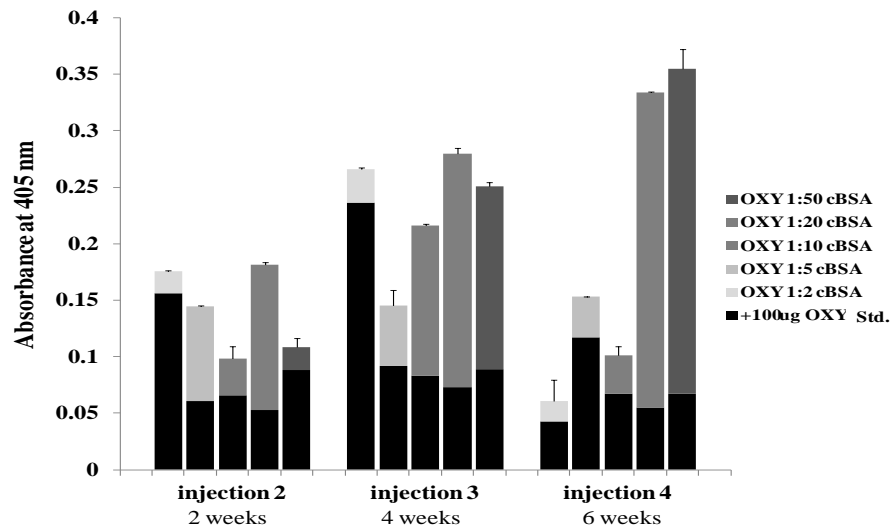


รูปที่ 2.19 ไทเทอร์ของแอนติบอดีที่ได้จากซีรัมหนู BALB/c และความจำเพาะในการจับกับสาร oxyresveratrol จากอิมมูโนเจน MuA-BSA

### 5.3.1.3 อิมมูโนเจนจากวิธี Mannich reaction

จากการฉีดอิมมูโนเจนชนิด OXY-cBSA ที่ได้จากปฏิกิริยา Mannich reaction เพื่อกระตุ้นหนูสายพันธุ์ BALB/c ให้ผลิตแอนติบอดีจำนวน 4 ครั้ง นำซีรัมที่ได้จากเลือดหนูมาทำการตรวจสอบแอนติบอดีที่ผลิตได้ด้วยวิธี indirect ELISA และตรวจสอบคุณสมบัติในการจับกับ oxyresveratrol ด้วยวิธี indirect competitive ELISA ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 2.20

ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า แอนติบอดีจากหนูที่ได้รับสาร OXY-cBSA ในอัตราส่วน 1:50 ซึ่งมีจำนวน hapten number ต่ำสุดคือ 20 มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดีที่มีความไวสูงสุดเทียบกับอิมมูโนเจนในอัตราส่วนอื่นๆ แสดงให้เห็นว่า OXY-cBSA ในอัตราส่วน 1:50 มีความเหมาะสมในการนำไปผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี



รูปที่ 2.20 ไทเทอร์ของแอนติบอดีที่ได้จากซีรัมหนู BALB/c และความจำเพาะในการจับกับสาร oxyresveratrol จากอิมมูโนเจน OXY-cBSA ที่อัตราส่วนต่างๆ

ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า อิมมูโนเจนที่ได้จากปฏิกิริยา Mannich reaction สามารถทำให้เกิดการจับกับ epitope เพื่อให้ได้ antibody ที่มีการจดจำตำแหน่งที่จำเพาะกับโครงสร้างของ oxyresveratrol ได้ดี (high binding affinity) อย่างไรก็ตาม การที่จำนวน hapten number สูงเกินไปจะส่งผลให้การละลายของอิมมูโนเจนต่ำและทำให้ผลิตแอนติบอดีได้ในปริมาณต่ำ แสดงดังในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 ผลของอิมมูโนเจนชนิดต่างๆ ต่อการผลิตแอนติบอดีในซีรัมหนู

Conjugate	Antigen/Carrier protein ratio	Hapten number	Antibody production <sup>a</sup> (Abs 405 nm) <sup>b</sup>	Oxyresveratrol recognition ability (% inhibition) <sup>c</sup>
OXA-cBSA	1:1	8	2.30±0.12	10.71
MuA-BSA	1:1	13	0.39±0.05	48.71
OXY-cBSA	1:2	63	0.06±0.00	28.93
	1:5	65	0.15±0.00	25.52
	1:10	62	0.10±0.01	34.00
	1:20	36	0.33±0.00	83.51
	1:50	20	0.35±0.06	81.10

<sup>a</sup>Mean±SD

<sup>b</sup>Titer of anti-OXY antibody in the 4<sup>th</sup> immunized mouse sera determined by indirect competitive ELISA, Serum dilution 1:100

<sup>c</sup>% Inhibition = [1-(Absorbance of 4<sup>th</sup> immunized mouse sera + 100 µg standard OXY/ Absorbance of 4<sup>th</sup> immunized mouse sera)] x 100

### 5.3.2 มอนโคลนอลแอนติบอดีจากอิมมูโนเจนชนิดต่างๆ

จากผลการศึกษาจะเห็นได้ว่า หนูที่ได้รับอิมมูโนเจนชนิดต่างๆ สามารถสร้างแอนติบอดีและมีการจดจำสาร oxyresveratrol ได้ (ตารางที่ 2.5) ดังนั้นจึงได้นำเซลล์จากม้ามของหนูที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสาร oxyresveratrol ที่เกิดจากแอนติเจนทั้งสามวิธีมาทำการหลอมรวมกับเซลล์ไมอีโบลมาด้วยวิธี PEG และทำการเลี้ยงเซลล์ที่ 37°C/5% CO<sub>2</sub> incubator โดยใช้ HAT medium เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ จากนั้นทำการแยกให้ได้โคลนเดี่ยวด้วยวิธี clone by limit dilution

#### 5.3.2.1 อิมมูโนเจนจากวิธี carbodiimidation

ภายหลังจากการตรวจสอบคุณสมบัติของแอนติบอดีด้วยวิธี indirect competitive ELISA และทำการคัดเลือกโคลนเดี่ยวด้วยวิธี clone by limit dilution จำนวน 2 ครั้ง พบว่า ไฮบริโดมาจำนวน 3 โคลนสามารถผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะกับ oxyresveratrol ได้ โคลน A1 มีความสามารถในการจับกับแอนติเจนได้ดีที่สุด ดังนั้น จึงนำโคลนดังกล่าวมาทำการเพิ่มปริมาณในอาหารเพาะเลี้ยง อย่างไรก็ตาม ระหว่างที่ทำการผลิตเพื่อเพิ่มปริมาณแอนติบอดีพบว่า ความสามารถในการผลิตมอนโคลนอลแอนติบอดีลดลงต่อเนื่องและเมื่อทำการผลิตที่ระดับการเพาะเลี้ยง 500 ml (1 เดือน ภายหลังเพาะเลี้ยง) เซลล์ดังกล่าวไม่สามารถผลิตแอนติบอดีได้ ดังแสดงในตารางที่ 2.6 ดังนั้น มอนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากวิธีการนี้จึงไม่สามารถดำเนินการต่อเพื่อตรวจสอบคุณสมบัติได้

**ตารางที่ 2.6** การผลิตและความสามารถในการจดจำสาร oxyresveratrol จากแอนติบอดีโคลน A1

Culture Volume	Antibody production <sup>a</sup> (Abs 405 nm) <sup>b</sup>	Oxyresveratrol recognition ability (% inhibition) <sup>c</sup>
5 ml	2.514	43.12%
10 ml	2.149	45.14%
160 ml	1.263	42.60%
250 ml	0.424	53.87%
500 ml	0.039	0%

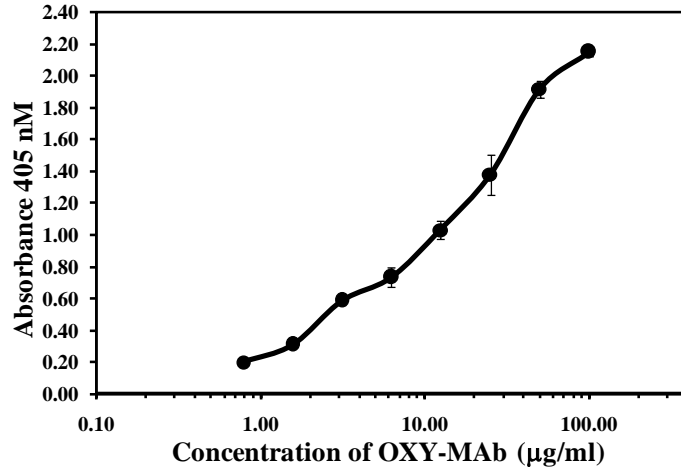
<sup>a</sup>Mean±SD

<sup>b</sup>Titer of anti-OXY antibody in the 4<sup>th</sup> immunized mouse sera determined by indirect competitive ELISA, Serum dilution 1:100

#### 5.3.2.2 อิมมูโนเจนจากวิธี periodate oxidation

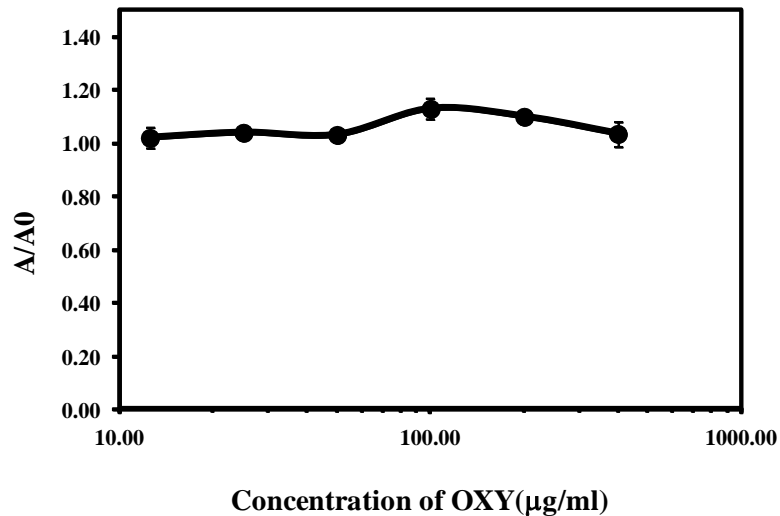
ภายหลังจากการตรวจสอบคุณสมบัติของแอนติบอดีด้วยวิธี indirect competitive ELISA และทำการคัดเลือกโคลนเดี่ยวด้วยวิธี clone by limit dilution พบว่า ไฮบริโดมาจำนวน 1 โคลน สามารถผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะกับ oxyresveratrol ได้ คือ โคลน B8 ดังนั้น โคลนดังกล่าวจึงถูกเลือกเพื่อนำมาทำการเพิ่มปริมาณและทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ คอลัมน์โปรตีน G FF

จากการตรวจสอบคุณสมบัติของแอนติบอดีโดยวิธี indirect ELISA พบว่า แอนติบอดีที่ความเข้มข้น 12.50 µg/ml เหมาะสมในการจับกับแอนติเจนโดยให้ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 1.0 แสดงดังรูปที่ 2.21 ดังนั้น ความเข้มข้นของแอนติบอดีดังกล่าวจึงนำมาใช้ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์โดย indirect competitive ELISA



รูปที่ 2.21 การเกิดปฏิกิริยาระหว่างความเข้มข้นของมอโนโคลนอลแอนติบอดีกับ oxyresveratrol ด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้แอนติบอดีโคลน B8

เมื่อทำการพัฒนาวิธีการตรวจสอบหาปริมาณสาร oxyresveratrol ด้วยวิธี indirect competitive (รูปที่ 23) พบว่า มอโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ไม่มีคุณสมบัติในการจดจำสาร oxyresveratrol ที่เติมลงไปเพื่อให้เกิดการแย่งจับ มีการจดจำเฉพาะสารที่อยู่ในรูปแบบของการเชื่อมต่อกับโปรตีนเท่านั้น ทำให้ไม่สามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อหาปริมาณสารได้



รูปที่ 2.22 กราฟมาตรฐานของสาร oxyresveratrol ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้มอโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน B8

### 5.3.2.3 อิมมูโนเจนจากวิธี Mannich reaction

ภายหลังจากการตรวจสอบคุณสมบัติของแอนติบอดีด้วยวิธี indirect competitive ELISA และทำการคัดเลือกโคลนเดี่ยวด้วยวิธี clone by limit dilution พบว่า ไฮบริโดมาจำนวน 1 โคลน สามารถผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะกับ oxyresveratrol ได้ คือ โคลน E4 ดังนั้น โคลนดังกล่าวจึงถูกเลือกเพื่อนำมาทำการเพิ่มปริมาณและทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ คอลัมน์โปรตีน G FF

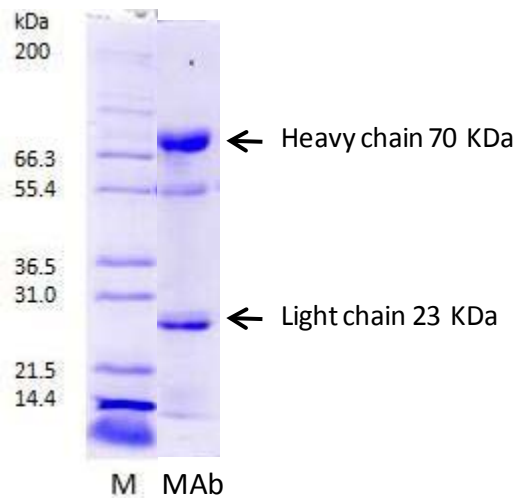
#### คุณสมบัติของมอโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน E4

จากการตรวจสอบคุณสมบัติของมอโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน E4 โดยใช้ชุดตรวจสอบชนิดของแอนติบอดี (IsoStrip mouse monoclonal antibody isotyping kit, Roche Applied Science, IN, USA) พบว่า มอโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จัดเป็นกลุ่มย่อย IgM และมี light chain เป็น kappa ( $\kappa$ ) แสดงดังรูปที่ 2.23



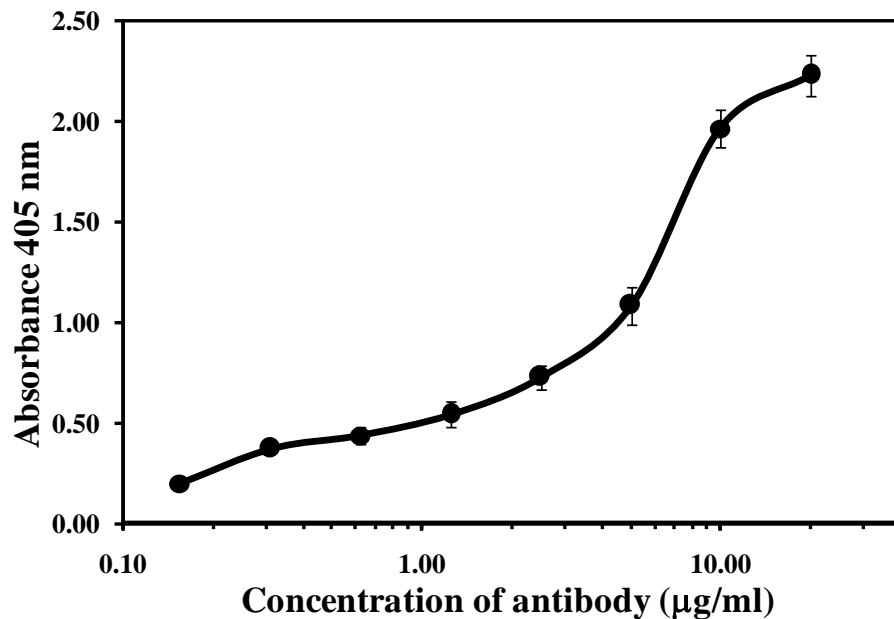
รูปที่ 2.23 ผลการตรวจสอบชนิดของมอโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน E4

เมื่อทำการยืนยันผลการทดสอบคุณสมบัติของมอโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS page) พบว่า แอนติบอดีที่ได้มี heavy chain ขนาดประมาณ 70 KDa และ light chain ขนาดประมาณ 23 KDa แสดงให้เห็นว่า แอนติบอดีมีขนาดเท่ากับ heavy chain และ light chain ของ IgM รูปที่ 2.24 แสดงขนาดของมอโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน E4



รูปที่ 2.24 ขนาดของมอโนโคลนอลแอนติบอดีจากการตรวจสอบโดยใช้ SDS page

จากการตรวจสอบคุณสมบัติของแอนติบอดีโดยวิธี indirect ELISA พบว่า แอนติบอดีที่ความเข้มข้น 5  $\mu\text{g/ml}$  เหมาะสมในการจับกับแอนติเจนโดยให้ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 1.0 แสดงดังรูปที่ 2.25 ดังนั้นความเข้มข้นของแอนติบอดีดังกล่าวจึงนำมาใช้ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์โดย indirect competitive ELISA



รูปที่ 2.25 การเกิดปฏิกิริยาระหว่างความเข้มข้นของมอโนโคลนอลแอนติบอดีกับ oxyresveratrol ด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้แอนติบอดีโคลน E4

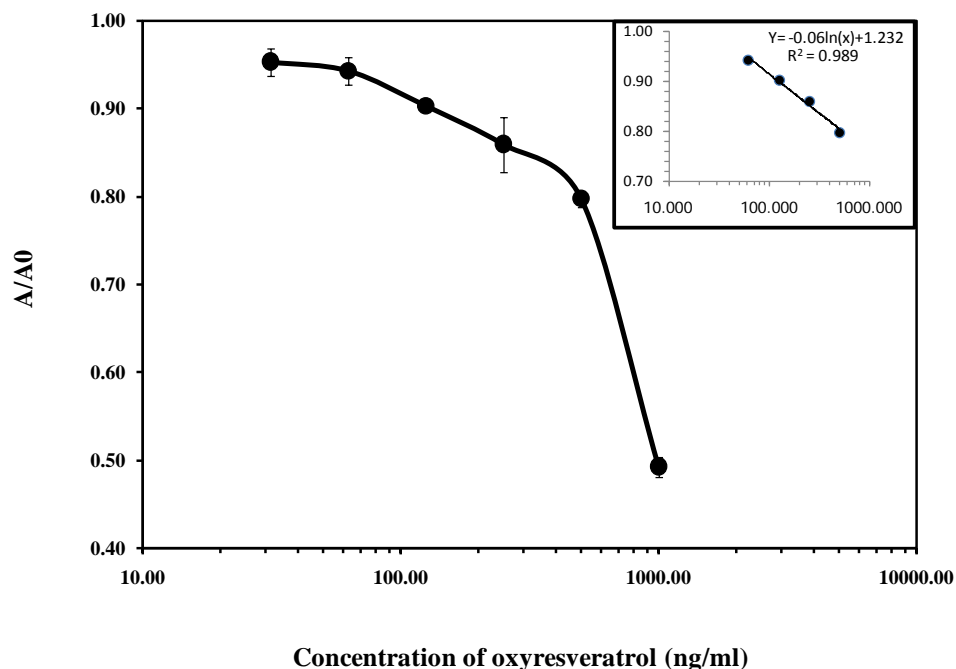
เมื่อทำการตรวจสอบคุณสมบัติของแอนติบอดีในการจับกับสาร oxyresveratrol และสารอื่นที่มีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงเพื่อหาปฏิกิริยาข้าม ค่าที่ได้แสดงดังตารางที่ 2.7 ผลการศึกษาพบว่า แอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถจับกับสาร resveratrol ซึ่งมีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงกันได้ โดยมีปฏิกิริยาข้าม 89.92% แต่ไม่

เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารอื่นในกลุ่ม stilbenes ได้แก่ mulberroside A, moscatilin, gigantol และสารอื่นในกลุ่ม flavonoids

ตารางที่ 2.7 cross reactivity ของมอโนโคลนอลแอนติบอดีในการจับกับสารชนิดต่างๆ

สาร	กลุ่มสาร	Cross-reactivity (%)
Oxyresveratrol		100
Resveratrol	Stilbenoids	89.92
Mulberroside A		< 0.01
Moscatilin		< 0.01
Gigantol		< 0.01
Artocarpin		< 0.01
Cycloartobiloxanthone	Flavonoids	< 0.01
Norcycloartocarpin		< 0.01
Chalcomoracin		< 0.01

จากการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สาร oxyresveratrol ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้มอโนโคลนอลแอนติบอดีพบว่า ช่วงของการตรวจวิเคราะห์สาร oxyresveratrol อยู่ระหว่าง 63-500 ng/ml โดยกราฟมาตรฐานของ oxyresveratrol แสดงดังรูปที่ 2.26



รูปที่ 2.26 กราฟมาตรฐานของสาร oxyresveratrol ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้มอโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน E4 จากการกระตุ้นด้วย OXY-cBSA (1:50)

การตรวจสอบความเที่ยง (precision) ของวิธีวิเคราะห์ทำโดยการหาค่าความเที่ยงภายในเพลท (intra-plate) และระหว่างเพลท (inter-plate) พบว่า ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) มีค่าไม่เกิน 10% ในทุกความเข้มข้นของสารมาตรฐาน แสดงดังตารางที่ 2.8 แสดงให้เห็นว่า วิธีที่พัฒนาขึ้นมีความเที่ยงในการวิเคราะห์

**ตารางที่ 2.8** ค่าความเที่ยงภายในเพลท (intra-plate) และระหว่างเพลท (inter-plate) ของวิธีวิเคราะห์ indirect competitive ELISA โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี

Oxyresveratrol concentration (ng/ml)	Intra-assay RSD (%) (n=6)	Inter-assay RSD (%) (n=3)
500	1.15	4.05
250	3.56	7.24
125	1.51	6.81
62.5	3.03	4.17
31.25	1.59	8.77

การตรวจสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ทำโดยการเติมสารมาตรฐานลงในตัวอย่างที่ 3 ระดับ และหา % recovery พบว่า % recovery ของ oxyresveratrol อยู่ในช่วง 95.93-103.55% (ตารางที่ 2.9) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ แสดงให้เห็นว่า วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีความแม่นยำ สามารถนำมาใช้เพื่อหาปริมาณสาร oxyresveratrol ในตัวอย่างพืชได้

**ตารางที่ 2.9** ค่า recovery ของวิธีวิเคราะห์ indirect competitive ELISA (n=3) โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี

Spike of oxyresveratrol concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Oxyresveratrol content ( $\mu\text{g/ml}$ )	Recovery (%)	RSD (%)
0	661.14 $\pm$ 35.04	-	5.30
125	781.05 $\pm$ 65.21	95.93	8.35
250	920.02 $\pm$ 57.59	103.55	6.26
500	1146.65 $\pm$ 50.22	96.97	4.38

การวิเคราะห์ปริมาณสาร oxyresveratrol โดยวิธี indirect ELISA ที่พัฒนาขึ้นได้นำมาประยุกต์ใช้เพื่อหาปริมาณสารดังกล่าวในแก่นมะหาดและปวกหาด เปรียบเทียบกับวิธี HPLC แสดงในตารางที่ 2.10 เมื่อพิจารณาช่วงการวิเคราะห์สารด้วยวิธี ELISA พบว่า มีช่วงการวิเคราะห์เป็น 63-500 ng/ml จากตารางที่ 2.10 จะเห็นได้ว่า สามารถตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารได้จากตัวอย่างของปวกหาดหรือแก่นมะหาด เมื่อนำค่าที่

ตรวจสอบได้จากทั้งสองวิธีมาหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (% correlation coefficient) พบว่า วิธีทั้งสองมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ 0.975

**ตารางที่ 2.10** ปริมาณ oxyresveratrol ในมะหาดและปวกหาด ด้วยวิธี monoclonal antibody-based ELISA และ HPLC

ตัวอย่าง	Oxyresveratrol content (mg/g dry wt.)	
	HPLC	ELISA
มะหาด		
แก่น 1	23.01±1.26	22.74±3.78
ปวกหาด		
ปวกหาดหมายเลข 1	348.02±27.78	373.55±15.52
ปวกหาดหมายเลข 2	498.34±2.56	444.65±34.28

## 6. อภิปรายผลการวิจัย

### 6.1 การสังเคราะห์สารที่ใช้เป็นอิมมูโนเจน

เนื่องจากสาร oxyresveratrol มีคุณสมบัติเป็น hapten และเมื่อทำการเชื่อมต่อกับโปรตีนเพื่อให้ได้อิมมูโนเจนที่มีโมเลกุลใหญ่จะสามารถกระตุ้นให้สัตว์ทดลองเกิดการตอบสนองโดยการผลิตแอนติบอดีได้ การเตรียมอิมมูโนเจนเพื่อใช้ฉีดในสัตว์ทดลองเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อคุณสมบัติของแอนติบอดี เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างของสาร oxyresveratrol สามารถทำการสังเคราะห์อิมมูโนเจนได้หลายวิธี จากการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเตรียมอิมมูโนเจนทั้งหมด 3 วิธี คือ (1) carbodiimides (2) periodate oxidation และ (3) Mannich reaction

อิมมูโนเจนที่ได้จากการเตรียมโดยวิธี carbodiimides โดยใช้ EDC/NSH มีจำนวน hapten number เป็น 8 ในขณะที่อิมมูโนเจนจากการเตรียมด้วยวิธี periodate oxidation มีจำนวน hapten number เป็น 13 จะเห็นได้ว่า ค่าที่ได้อยู่ในช่วงที่เหมาะสม (hapten number 5-25) ดังนั้น จึงสามารถนำมาใช้กระตุ้นสัตว์ทดลองให้สร้างแอนติบอดีได้

อิมมูโนเจนที่ได้จากการเตรียมด้วยวิธี Mannich reaction จะใช้อัตราส่วนระหว่างสาร oxyresveratrol กับ cBSA ที่แตกต่างกัน ได้แก่ 1:2, 1:5, 1:10, 1:20 และ 1:50 พบว่า จำนวน hapten number ที่ได้มีความแตกต่างกัน คิดเป็น 63, 65, 62, 36 และ 20 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า อัตราส่วนระหว่างสาร oxyresveratrol กับ cBSA 1:50 ซึ่งได้ค่า hapten number เป็น 20 น่าจะมีความเหมาะสมในการนำมาใช้กระตุ้นสัตว์ทดลองมากกว่าอัตราส่วนอื่นๆ ซึ่งมีจำนวนสูงเกินไปอาจส่งผลต่อการละลายของอิมมูโนเจน นอกจากนี้ จำนวน hapten number อาจส่งผลต่อคุณสมบัติของแอนติบอดี ตลอดจนความสามารถในการกระตุ้นสัตว์ทดลองให้เกิดการสร้างแอนติบอดี

## 6.2 โพลีโคลนอนแอนติบอดี

จากการศึกษาโดยการผลิตโพลีโคลนอนแอนติบอดีด้วยการกระตุ้นกระต่ายด้วยอิมมูโนเจนจากวิธี carbodiimidation พบว่า กระต่ายสามารถสร้างแอนติบอดีและมีการจดจำสาร oxyresveratrol ได้ เมื่อทำการตรวจสอบคุณสมบัติของแอนติบอดีโดยการหาปฏิกิริยาข้ามพบว่า แอนติบอดีมีความจำเพาะกับ oxyresveratrol สูง โดยแอนติบอดีไม่สามารถจับกับสารอื่นที่มีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงกันได้ รวมทั้ง resveratrol และ mulberroside A ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม stilbenoids และสารอื่นในกลุ่ม flavonoids เมื่อนำแอนติบอดีที่ผลิตได้ได้มาทำการตรวจสอบคุณสมบัติในการจับกับแอนติเจนโดยวิธี indirect ELISA พบว่าแอนติบอดีที่ความเข้มข้น 13.10  $\mu\text{g/ml}$  เหมาะสมในการจับกับแอนติเจนโดยให้ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 1.0 ดังนั้น ความเข้มข้นของแอนติบอดีดังกล่าวจึงนำมาใช้ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์โดย indirect competitive ELISA

จากการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สาร oxyresveratrol ด้วยวิธี indirect competitive ELISA พบว่า ช่วงของการตรวจวิเคราะห์สาร oxyresveratrol อยู่ระหว่าง 1.12-2.12 mg/ml และเมื่อทำการตรวจสอบความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ พบว่า ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์มีค่าไม่เกิน 10% ในทุกความเข้มข้นของสารมาตรฐาน และมีความแม่นยำในการวิเคราะห์ อยู่ในช่วง 98-102.10% ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ แสดงให้เห็นว่า วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีความเที่ยงและความแม่นยำในการวิเคราะห์ สามารถนำมาใช้เพื่อหาปริมาณสาร oxyresveratrol ในตัวอย่างได้

อย่างไรก็ตาม การวิเคราะห์ปริมาณสาร oxyresveratrol โดยวิธี indirect competitive ELISA ที่พัฒนาขึ้นได้นำมาประยุกต์ใช้เพื่อหาปริมาณสารดังกล่าวในมะหาดและปวกหาด เปรียบเทียบกับวิธี HPLC เมื่อพิจารณาช่วงการวิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA พบว่า มีค่าที่สูงกว่าวิธี HPLC ถึง 1,000 เท่า แสดงให้เห็นว่า ค่าความไว (sensitivity) ในการวิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA ต่ำกว่าวิธีมาตรฐาน HPLC ดังนั้น กรณีที่ตัวอย่างพืชที่ทำการตรวจวิเคราะห์มีปริมาณสารต่ำ วิธี ELISA จะไม่สามารถตรวจสอบได้ จะเห็นได้ว่า สามารถตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารได้จากตัวอย่างของปวกหาดหรือแก่นมะหาดเท่านั้น ปริมาณสารจากส่วนใบ เปลือก และกิ่ง ไม่สามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธี ELISA ปริมาณสาร oxyresveratrol ที่พบในปวกหาดและแก่นมะหาดด้วยวิธี ELISA คิดเป็น 683.52 และ 212.14 mg/g น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

แม้ว่าวิธีการวิเคราะห์โดย ELISA โดยใช้โพลีโคลนอนแอนติบอดีจะสามารถตรวจสอบหาปริมาณ oxyresveratrol ในปวกหาดและแก่นมะหาดได้ แต่ยังมีค่าความไวต่ำในการตรวจวิเคราะห์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากลักษณะของแอนติบอดีที่เป็นโพลีโคลนอนแอนติบอดีหรือลักษณะของอิมมูโนเจนที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยา carbodiimidation เพื่อให้ได้ OXA-cBSA มีตำแหน่งของโครงสร้างที่เชื่อมต่อกับโปรตีนที่ไม่เหมาะสมในการกระตุ้นสัตว์ทดลองให้ผลิตแอนติบอดีที่สามารถจับเกิดการจับกันระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีได้ดี (low binding affinity) อย่างไรก็ตาม อิมมูโนเจนที่ได้จากปฏิกิริยานี้มีความจำเพาะเจาะจงสูงในการผลิตแอนติบอดี ดังนั้น การเปลี่ยนรูปแบบการผลิตแอนติบอดีเป็นมอโนโคลนอลหรือการเปลี่ยนรูปแบบการทำปฏิกิริยาเพื่อสังเคราะห์อิมมูโนเจนจึงถูกนำมาใช้เพื่อพัฒนาคุณสมบัติของแอนติบอดีที่ได้ให้มีความไวเพิ่มขึ้น และมีความจำเพาะเจาะจงในการจับกับแอนติเจน

### 6.3 มอโนโคลนอลแอนติบอดี

#### 6.3.1 ผลของอิมมูโนเจนจากการสังเคราะห์ด้วยวิธีต่างๆ ต่อการผลิตแอนติบอดี

การฉีดอิมมูโนเจนที่ได้จากปฏิกิริยา carbodiimidation, periodate oxidation และ Mannich reaction สามารถกระตุ้นหนูให้ผลิตแอนติบอดี จากนั้นทำการตรวจสอบแอนติบอดีในซีรัมหนูด้วยวิธี indirect ELISA และตรวจสอบคุณสมบัติในการจับกับ oxyresveratrol ด้วยวิธี indirect competitive ELISA ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า แอนติบอดีจากหนูที่ได้รับอิมมูโนเจนจากปฏิกิริยา carbodiimides จะมีความสามารถในการผลิตแอนติบอดีได้สูงแต่มีความไวต่ำ ในขณะที่แอนติบอดีจากปฏิกิริยา periodate oxidation มีความสามารถในการผลิตแอนติบอดีและความไวปานกลาง ส่วนแอนติบอดีจากปฏิกิริยา Mannich reaction ในอัตราส่วน 1:50 ซึ่งมีจำนวน hapten number ต่ำสุดคือ 20 มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดีที่มีความไวสูงสุดเทียบกับอิมมูโนเจนในอัตราส่วนอื่นๆ แสดงให้เห็นว่า อัตราส่วน 1:50 มีความเหมาะสมในการนำไปผลิตมอโนโคลนอลแอนติบอดี

โดยทั่วไปความสามารถในการกระตุ้นสัตว์ทดลองให้ผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะกับแอนติเจนเกิดได้จากหลายปัจจัยรวมถึงตำแหน่งของโครงสร้างสารที่จับกับโปรตีนที่มาเชื่อมต่อ ความยาวของหมู่ฟังก์ชันที่มาเชื่อมต่อกับโครงสร้างสารภายหลังจากการสังเคราะห์ จำนวน hapten number ที่เกิดขึ้นภายหลังจากการเชื่อมต่อกับโปรตีน และปฏิกิริยาที่ใช้ในการเชื่อมต่อระหว่างสารและโปรตีน (Gosling, 2000) จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า อิมมูโนเจนที่ได้จากปฏิกิริยา Mannich reaction ซึ่งหมู่ amine ของโปรตีน cBSA สามารถทำให้เกิดการเชื่อมต่อที่เสถียรกับไฮโดรเจนอะตอม (hydrogen atom) ส่วน phenol ring ของโครงสร้าง oxyresveratrol สามารถทำให้เกิดการจับกับ epitope เพื่อให้ได้ antibody ที่มีการจดจำตำแหน่งที่จำเพาะกับโครงสร้างของ oxyresveratrol ได้ดี (high binding affinity) อย่างไรก็ตาม การที่จำนวน hapten number สูงเกินไปจะส่งผลให้การละลายของอิมมูโนเจนต่ำและทำให้ผลิตแอนติบอดีได้ในปริมาณต่ำ (ตารางที่ 2.5)

สูตรโครงสร้างของสารที่ใช้ในการสังเคราะห์อิมมูโนเจนนับเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะและความไวสูง จากการศึกษาจะเห็นได้ว่า OXY-cBSA จากปฏิกิริยา Mannich reaction ซึ่งไม่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเดิมของสาร oxyresveratol สามารถผลิตแอนติบอดีที่มีความไวในการจับกับแอนติเจนได้เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับปฏิกิริยา carbodiimidation ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงหมู่ฟังก์ชันของโครงสร้าง oxyresveratrol ให้อยู่ในรูปของ methyl-carboxylic acid ก่อนทำการเชื่อมต่อกับโปรตีน หรือปฏิกิริยา periodate oxidation ซึ่งใช้ mulberroside A ที่มีหมู่น้ำตาล 2 โมเลกุล เป็นโครงสร้างที่ใช้เชื่อมต่อกับโปรตีน

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ใช้สารซึ่งมีหมู่ carboxylic acid ในโมเลกุลในการเชื่อมต่อกับโปรตีนด้วยวิธี carbodiimidation สามารถผลิตแอนติบอดีที่มีจำเพาะสูงกับสารเป้าหมาย (Limsuwanchote et al., 2014; Kohno et al., 2014) ดังนั้น OXA-cBSA จากการเชื่อมต่อดัวยวิธี carbodiimidation จึงถูกนำมาใช้ในการสังเคราะห์อิมมูโนเจนในโครงการนี้ ซึ่งจะเห็นได้ว่า สัตว์ทดลองสามารถผลิตแอนติบอดีได้สูงแต่แอนติบอดีที่ผลิตได้มีความสามารถในการจับกับแอนติเจนต่ำ ทำให้วิธีวิเคราะห์ด้วย ELISA ที่พัฒนาขึ้นมีความไวต่ำ ดังแสดงในผลการศึกษาของการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีและผลจากการกระตุ้นหนูในรูปที่ 2.18 อย่างไรก็ตาม ด้วยคุณสมบัติของอิมมูโนเจนที่สังเคราะห์ได้จากวิธีนี้สามารถละลายน้ำได้ดี จึงส่งผลให้สามารถกระตุ้นให้สัตว์ทดลองเกิดการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันและผลิตแอนติบอดีได้สูง (high titer)

### 6.3.2 มอโนโคลนอลแอนติบอดีจากอิมมูโนเจนชนิดต่างๆ

#### 6.3.2.1 อิมมูโนเจนจากวิธี carbodiimidation

ภายหลังจากการตรวจสอบคุณสมบัติของแอนติบอดีด้วยวิธี indirect competitive ELISA และทำการคัดเลือกโคลนเดี่ยวด้วยวิธี clone by limit dilution จำนวน 2 ครั้ง พบว่า ไฮบริโดมาโคลน A1 มีความสามารถในการจับกับแอนติเจนได้ดีที่สุด อย่างไรก็ตามระหว่างที่ทำการผลิตเพื่อเพิ่มปริมาณแอนติบอดีพบว่า ความสามารถในการผลิตมอโนโคลนอลแอนติบอดีลดลงต่อเนื่อง ดังนั้น มอโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากวิธีการนี้จึงไม่สามารถดำเนินการต่อเพื่อตรวจสอบคุณสมบัติได้

สาเหตุที่ความสามารถในการผลิตแอนติบอดีที่ลดลงของโคลน A1 ยังไม่ทราบแน่ชัด ในเบื้องต้นสันนิษฐานว่าในเวลาที่ยูเซลล์ของไฮบริโดมาที่ไดยังไม่ได้เกิดเป็นโคลนเดี่ยว อาจมีเซลล์ไฮบริโดมาอื่นที่ไม่สามารถผลิตแอนติบอดีได้แต่สามารถเติบโตอย่างรวดเร็วปะปนมา ส่งผลให้ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ไฮบริโดมาที่ต้องการและความสามารถในการผลิตแอนติบอดีลดลงในที่สุด

#### 6.3.2.2 อิมมูโนเจนจากวิธี periodate oxidation

ภายหลังจากการตรวจสอบคุณสมบัติของแอนติบอดีพบว่า ไฮบริโดมาโคลน B8 สามารถผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะกับ oxyresveratrol ได้ โดยพบว่า แอนติบอดีที่ความเข้มข้น 12.50 µg/ml เหมาะสมในการจับกับแอนติเจนโดยให้ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 1.0 ดังนั้น ความเข้มข้นของแอนติบอดีดังกล่าวจึงนำมาใช้ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์โดย indirect competitive ELISA อย่างไรก็ตาม เมื่อทำการพัฒนาวิธีการตรวจสอบหาปริมาณสาร oxyresveratrol ด้วยวิธี indirect competitive พบว่า มอโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ไม่มีคุณสมบัติในการจดจำสาร oxyresveratrol ที่เติมลงไปเพื่อให้เกิดการแย่งจับ มีการจดจำเฉพาะสารที่อยู่ในรูปแบบของการเชื่อมต่อกับโปรตีนเท่านั้น ทำให้ไม่สามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อหาปริมาณสารได้

#### 6.3.2.3 อิมมูโนเจนจากวิธี Mannich reaction

ภายหลังจากการตรวจสอบคุณสมบัติของแอนติบอดีพบว่า ไฮบริโดมาโคลน E4 สามารถผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะกับ oxyresveratrol ได้ เมื่อทำการตรวจสอบคุณสมบัติของมอโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน E4 พบว่า มอโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จัดเป็นกลุ่มย่อย IgM และมี light chain เป็น kappa (κ)

เมื่อทำการตรวจสอบคุณสมบัติของแอนติบอดีโดยการหาปฏิกิริยาข้ามพบว่า แอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถจับกับสาร resveratrol ซึ่งมีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงกันได้ โดยมีปฏิกิริยาข้าม 89.92% แต่ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารอื่นในกลุ่ม stilbenes ได้แก่ mulberroside A, moscatilin, gigantol และสารอื่นในกลุ่ม flavonoids เมื่อนำแอนติบอดีที่ผลิตได้ไปทำการตรวจสอบคุณสมบัติในการจับกับแอนติเจนโดยวิธี indirect ELISA พบว่า แอนติบอดีที่ความเข้มข้น 5 µg/ml เหมาะสมในการจับกับแอนติเจนโดยให้ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 1.0 ดังนั้น ความเข้มข้นของแอนติบอดีดังกล่าวจึงนำมาใช้ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์โดย indirect competitive ELISA อย่างไรก็ตาม พิษมหาดโดยเฉพาะอย่างยิ่งปวกหาดและแก่นมะหาด มีองค์ประกอบหลักเป็นสาร oxyresveratrol ดังนั้น แอนติบอดีดังกล่าวสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบในมะหาดได้ จากการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สาร oxyresveratrol ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้มอโนโคลนอลแอนติบอดีพบว่า ช่วงของการตรวจวิเคราะห์สาร oxyresveratrol อยู่ระหว่าง 63-500 ng/ml

วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีค่าความเที่ยงภายในเพลท (intra-plate) และระหว่างเพลท (inter-plate) โดยมีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ไม่เกิน 10% ในทุกความเข้มข้นของสารมาตรฐาน และมีความแม่นยำในการวิเคราะห์ อยู่ในช่วง 95.93-103.55% ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ แสดงให้เห็นว่า วิธีวิเคราะห์ที่

พัฒนาขึ้นโดยใช้มอโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความเที่ยงและความแม่นยำในการวิเคราะห์ สามารถนำมาใช้เพื่อหาปริมาณสาร oxyresveratrol ในตัวอย่างได้ เมื่อนำวิธีวิเคราะห์ด้วย indirect ELISA มาประยุกต์ใช้หาปริมาณสารในแก่นมะหาดและปวกหาด เปรียบเทียบกับวิธี HPLC พบว่า วิธีดังกล่าวสามารถตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารจากตัวอย่างของปวกหาดหรือแก่นมะหาดได้

จากผลการศึกษาจะเห็นได้ว่า การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร oxyresveratrol ด้วยวิธี ELISA โดยใช้มอโนโคลนอลแอนติบอดีมีช่วงการวิเคราะห์เป็น 63-500 ng/ml ซึ่งมีความไวในการตรวจวิเคราะห์สูงกว่าวิธี ELISA ที่ใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดี (ช่วงการตรวจวิเคราะห์อยู่ระหว่าง 1.12-2.12 mg/ml) ประมาณ 16,000 เท่า และมีความไวสูงกว่าวิธี HPLC ประมาณ 16 เท่า แสดงให้เห็นว่า มอโนโคลนอลแอนติบอดีมีความสามารถในการจดจำโครงสร้างของ oxyresveratrol ได้ดี (high affinity) อย่างไรก็ตาม เนื่องจากคุณสมบัติของมอโนโคลนอลที่ได้เป็นชนิด IgM ซึ่งมีโมเลกุลขนาดใหญ่และสามารถจับกับแอนติเจนได้หลายบริเวณ (multiple binding sites) เมื่อเทียบกับ IgG การนำไปใช้เพื่อตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี competitive ELISA แม้ว่าจะมีความไวในการตรวจวิเคราะห์สูงแต่การที่แอนติบอดีมีลักษณะดังกล่าวอาจเกิดการตกตะกอนภายหลังจากการจับกันของแอนติบอดีและแอนติเจนได้ ซึ่งเป็นข้อจำกัดที่ทำให้การนำไปใช้ของแอนติบอดีที่เป็น IgM มีน้อยกว่าการใช้แอนติบอดีที่เป็น IgG (Dooper et al., 2007) การใช้ปริมาณแอนติบอดีและแอนติเจนที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเป็นสิ่งจำเป็นต้องคำนึงถึง กรณีที่สารตัวอย่างมีคุณสมบัติเป็น matrix อาจเกิดการตกตะกอนในระหว่างการตรวจวิเคราะห์ได้ ดังนั้นสารละลายของสารตัวอย่างที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ ต้องทำให้อยู่ในช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA จึงจะสามารถลดการเกิดปัญหาดังกล่าวได้

นอกจากนี้ มอโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ยังมีความจำเพาะไม่สูงนัก สามารถจับกับสาร resveratrol ซึ่งมีโครงสร้างใกล้เคียงกับ oxyresveratrol ได้ ทำให้มีข้อจำกัดในการตรวจวิเคราะห์ สามารถนำมาใช้หาปริมาณสาร oxyresveratrol จากแก่นมะหาดและปวกหาดได้ดี เนื่องจากพืชและผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมี resveratrol ในปริมาณน้อยมาก ในกรณีที่พืชบางชนิดที่มีสาร resveratrol เป็นองค์ประกอบรวมในปริมาณมาก อาจใช้มอโนโคลนอลแอนติบอดีนี้ในการตรวจวิเคราะห์ได้ปริมาณ oxyresveratrol และ resveratrol รวมกันในรูปของปริมาณของผสมที่มีค่าเทียบเท่ากับปริมาณสารเดี่ยว oxyresveratrol

## 7. สรุปผลการวิจัย

oxyresveratrol จัดเป็นสารประกอบหลักในแก่นมะหาดและปวกหาด มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ tyrosinase ด้านอนุมูลอิสระ ปกป้องเซลล์ประสาท และฤทธิ์ต้าน herpes simplex virus ทำให้มีศักยภาพในการนำไปใช้เป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพจากธรรมชาติรวมทั้งการนำไปพัฒนาเพื่อประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ดังนั้น วิธีการวิเคราะห์ปริมาณสาร oxyresveratrol ที่รวดเร็ว มีความไวสูงและแม่นยำ จึงมีความจำเป็นในการใช้ตรวจสอบสารออกฤทธิ์ในแก่นมะหาดและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากพืชชนิดนี้เพื่อใช้เป็นมาตรฐานและตรวจสอบคุณภาพของพืชสมุนไพร คณะผู้วิจัยจึงได้มีแนวคิดที่จะพัฒนาวิธีการทางอิมมูโนโลยีโดยใช้แอนติบอดีทั้งรูปแบบโพลีโคลนอลและมอโนโคลนอลมาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ oxyresveratrol

การเตรียมอิมมูโนเจนเพื่อใช้ฉีดในสัตว์ทดลองเป็นปัจจัยหนึ่งส่งผลต่อคุณสมบัติของแอนติบอดี ผลการศึกษาพบว่า อิมมูโนเจนจากการเตรียมโดยวิธี carbodiimidation และวิธี periodate oxidation มีจำนวน hapten number เป็น 8 และ 13 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในช่วงที่เหมาะสมในการนำไปกระตุ้นสัตว์ทดลองสำหรับอิมมูโนเจนที่ได้จากการเตรียมด้วยวิธี Mannich reaction ด้วยอัตราส่วนระหว่างสาร oxyresveratrol

และโปรตีน cBSA ที่แตกต่างกัน พบว่า อัตราส่วนระหว่างสาร oxyresveratrol กับ cBSA 1:50 ได้ค่า hapten number เป็น 20 ซึ่งมีความเหมาะสมในการนำมาใช้กระตุ้นสัตว์ทดลองมากกว่าอัตราส่วนอื่น

ในการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีโดยใช้อิมมูโนเจนจากวิธี carbodiimidation พบว่า แอนติบอดีที่ได้มีความจำเพาะกับสาร oxyresveratrol สูง โดยแอนติบอดีนี้ไม่สามารถจับกับสารอื่นที่มีสูตรโครงสร้างใกล้เคียง เช่น resveratrol และ mulberroside A ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม stilbenoids และสารอื่นในกลุ่ม flavonoids เมื่อนำแอนติบอดีที่ได้มาทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สาร oxyresveratrol ด้วยวิธี indirect competitive ELISA พบว่า ช่วงของการตรวจวิเคราะห์สาร oxyresveratrol อยู่ระหว่าง 1.12-2.12 mg/ml และเมื่อทำการตรวจสอบความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ พบว่า ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์มีค่าไม่เกิน 10% ในทุกความเข้มข้นของสารมาตรฐาน และมีความแม่นยำในการวิเคราะห์ อยู่ในช่วง 98-102.10% การวิเคราะห์ปริมาณสาร oxyresveratrol โดยวิธี indirect competitive ELISA ได้นำมาประยุกต์ใช้เพื่อหาปริมาณสารดังกล่าวในมะหาดและปวกหาด พบว่า วิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA มีค่าความไวในการวิเคราะห์ต่ำกว่าวิธี HPLC ปริมาณสาร oxyresveratrol ที่พบในปวกหาดและแก่นมะหาดด้วยวิธี ELISA คิดเป็น 683.52 และ 212.14 mg/g น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ การวิเคราะห์โดยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีจะมีข้อจำกัด คือ มีความไวในการตรวจวิเคราะห์ต่ำ แต่มีความจำเพาะเจาะจงสูงกับสาร oxyresveratrol

การผลิตมอโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยการฉีดอิมมูโนเจนที่ได้จากปฏิกิริยา carbodiimidation, periodate oxidation และ Mannich reaction พบว่า แอนติบอดีจากซีรัมหนูที่ได้รับอิมมูโนเจนจากปฏิกิริยา carbodiimidation มีความสามารถในการผลิตแอนติบอดีสูงแต่แอนติบอดีที่ได้มีความไวต่ำในการจดจำสาร oxyresveratrol ในขณะที่แอนติบอดีจากปฏิกิริยา periodate oxidation มีความสามารถในการผลิตแอนติบอดีและความไวปานกลาง ส่วนแอนติบอดีจากปฏิกิริยา Mannich reaction ในอัตราส่วน 1:50 มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดีที่มีความไวสูงสุดเทียบกับอิมมูโนเจนชนิดอื่น แสดงให้เห็นว่า อัตราส่วน 1:50 มีความเหมาะสมในการนำไปผลิตมอโนโคลนอลแอนติบอดี

ในการผลิตมอโนโคลนอลแอนติบอดีโดยใช้อิมมูโนเจนจากปฏิกิริยา Mannich reaction ในอัตราส่วน 1:50 พบว่า ไฮบริโดมาโคลน E4 สามารถผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะกับ oxyresveratrol ได้ เมื่อทำการตรวจสอบคุณสมบัติของมอโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน E4 พบว่า มอโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จัดเป็นกลุ่มย่อย IgM และมี light chain เป็น kappa ( $\kappa$ ) เมื่อทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้หลักการ antigen-antibody binding precipitation assay พบว่า มอโนโคลนอลแอนติบอดีมีคุณสมบัติในการจับกับสาร resveratrol ซึ่งมีโครงสร้างใกล้เคียงกับ oxyresveratrol คิดเป็น 89.92% แอนติบอดีดังกล่าวสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบในมะหาดได้ จากการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สาร oxyresveratrol ด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้มอโนโคลนอลแอนติบอดีพบว่า ช่วงของการตรวจวิเคราะห์สาร oxyresveratrol อยู่ระหว่าง 63-500 ng/ml วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีความเที่ยงภายในเพลท (intra-plate) และระหว่างเพลท (inter-plate) โดยมีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ไม่เกิน 10% ในทุกความเข้มข้นของสารมาตรฐานและมีความแม่นยำในการวิเคราะห์ อยู่ในช่วง 95.93-103.55%

ผลการศึกษาพบว่า การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร oxyresveratrol ด้วยวิธี ELISA โดยใช้มอโนโคลนอลแอนติบอดีมีช่วงการวิเคราะห์ซึ่งมีความไวในการตรวจวิเคราะห์สูงกว่าวิธี ELISA โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดี และสูงกว่าวิธี HPLC แสดงให้เห็นว่า มอโนโคลนอลแอนติบอดี มีความสามารถจดจำตำแหน่งที่จำเพาะกับโครงสร้างของ oxyresveratrol ได้ดี อย่างไรก็ตาม มอโนโคลนอลแอนติบอดีดังกล่าวสามารถจดจำ

สาร resveratrol ซึ่งมีโครงสร้างใกล้เคียงกับ oxyresveratrol ด้วย ทำให้มีข้อจำกัดในการตรวจวิเคราะห์ได้เฉพาะตัวอย่างที่มีสาร oxyresveratrol เป็นสารหลัก และมีสาร resveratrol ในปริมาณที่น้อยมาก เช่น แก่นมะหาดและปวกหาด นอกจากนี้ยังอาจนำไปประยุกต์ใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจวัดสาร oxyresveratrol ในอวัยวะภายในของสัตว์ทดลองได้อีกด้วย

## เอกสารอ้างอิง

- Alonso C, Hernáez B, Berná J, Fenoll J, Cenis JL, Escribano JM, Galindo I. Comparative inhibitory activity of the stilbenes resveratrol and oxyresveratrol on African swine fever virus replication. *Antiviral Res.* 2011; 91: 57–63.
- Bertram RM, Takemoto JK, Remsberg CM, Vega-Villa KR, Sablani S, Davies NM. High-performance liquid chromatographic analysis: applications to nutraceutical content and urinary disposition of oxyresveratrol in rats. *Biomed. Chromatog.* 2010; 24: 516-521.
- Canadian Council on Animal Care. 2002. CCAC Guidelines on: antibody production. Retrieved November 20, 2014, from [http://www.ccac.ca/en/CCAC\\_Programs/Guidelines\\_Policies/GDLINES/Antibody/antibody.pdf](http://www.ccac.ca/en/CCAC_Programs/Guidelines_Policies/GDLINES/Antibody/antibody.pdf)
- Chao J, Yu MS, Ho YS, Wang M, Chang RC. Dietary oxyresveratrol prevents parkinsonian mimetic 6-hydroxydopamine neurotoxicity. *Free Radic. Biol. Med.* 2008; 45:1019-1026.
- Chuanasa T, Phromjai J, Lipipun V, Likhitwitayawuid K, Suzuki M, Pramyothin P. Anti-herpes simplex virus (HSV-1) activity of oxyresveratrol derived from Thai medicinal plant: Mechanism of action and therapeutic efficacy on cutaneous HSV-1 infection in mice. *Antiviral Res.* 2008; 80: 62–70.
- Dooper M, Holden L, Feaste CK, Thompson KM, Egaas E. Monoclonal antibodies against the candidate lupin allergens  $\alpha$ -conglutin and  $\beta$ -conglutin. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2007; 143: 49–58.
- Gosling JP, Editor. *Immunoassay: a practical approach.* New York: Oxford University Press; 2000.
- Horn TF, Andrabi SA, Spina MG, Lorenz P, Ebmeyer U, Wolf G. Oxyresveratrol (trans-2,3',4,5'-tetrahydroxystilbene) is neuroprotective and inhibits the apoptotic cell death in transient cerebral ischemia. *Brain Res.* 2004; 1017: 98–107.
- Huang H, Zhang J, Chen G, Lu Z, Wang X, Sha N, Shao B, Li P, Guo DA. High performance liquid chromatographic method for the determination and pharmacokinetic studies of oxyresveratrol and resveratrol in rat plasma after oral administration of Smilax china extract. *Biomed. Chromatogr.* 2008; 22: 421–427.
- Kim JK, Kim M, Cho SG, Kim MK, Kim SW, Lim YH. Biotransformation of mulberroside A from *Morus alba* results in enhancement of tyrosinase inhibition. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2010; 37:631–637.
- Kim YM, Yun J, Lee CK, Lee H, Min KR, Kim Y. Oxyresveratrol and hydroxystilbene compounds inhibitory effect on tyrosinase and mechanism of action. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 16340-16344.

- Kohno T, Sakamoto S, Tanaka H, Morimoto S. Development of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (icELISA) using highly specific monoclonal antibody against ganoderic acid A. *Isan J. Pharm. Sci.* 2015; 10: 297.
- Li H, Cheng KW, Cho CH, He Z, Wang M. Oxyresveratrol as an antibrowning agent for cloudy apple juices and fresh-cut apples. *J. Agric. Food Chem.* 2007; 55: 2604-2610.
- Likhitwitayawuid K, Sornsute A, Sritularaka B, Ploypradith P. Chemical transformations of oxyresveratrol (trans-2,4,3',5'-tetrahydroxystilbene) into a potent tyrosinase inhibitor and a strong cytotoxic agent. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006; 16: 5650-5653.
- Lim YH, Park KT, Kim JK, Hwang D, Yoo Y. Inhibitory effect of mulberroside A and its derivatives on melanogenesis induced by ultraviolet B irradiation. *Food Chem. Toxic.* 2011; 49: 3038-3045.
- Limsuwanchote S, Wungsintaweekul J, Keawpradub N, Putalun W, Morimoto S, Tanaka H. Development of indirect competitive ELISA for quantification of mitragynine in Kratom (*Mitragyna speciosa* (Roxb.) Korth.). *Forensic Sci. Inter.* 2014; 244: 70-77.
- Lipipun V, Sasivimolphan P, Yoshida Y, Daikoku T, Sritularak B, Ritthidej G, Likhitwitayawuid K, Pramyothin P, Hattori M and Shiraki K. Topical cream-based oxyresveratrol in the treatment of cutaneous HSV-1 infection in mice. *Antiviral Res.* 2011; 91: 154-160.
- Maneechai S, Likhitwitayawuid K, Sritularak B, Palanuvej C, Ruangrunsi N, Sirisa-Ard P. Quantitative analysis of oxyresveratrol content in *Artocarpus lakoocha* and 'Puag-Haad'. *Med. Princ Pract.* 2009; 3, 18: 223-227.
- Mouihate A, Horn TF, Pittman QJ. Oxyresveratrol dampens neuroimmune responses in vivo: a selective effect on TNF- $\alpha$ . *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2006; 291: 1215-1221.
- Ohguchi K, Tanaka T, Kido T, Baba K, Inuma M, Matsumoto K, et al. Effects of hydroxystilbene derivatives on tyrosinase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; 307:861-863.
- Phrompittayarat W, Putalun W, Tanaka H, Wittaya-Areekul S, Jetiyanon K, Ingkaninan K. An enzyme-linked immunosorbent assay using polyclonal antibodies against bacopaside I. *Anal. Chim. Acta.* 2007; 584(1): 1-6.
- Pongkitwitoon B, Sakamoto S, Tanaka H, Tsuchihashi R, Kinjo J, Morimoto S, Putalun W. Enzyme-linked immunosorbent assay for total isoflavonoids in *Pueraria candollei* using anti-puerarin and anti-daidzin polyclonal antibodies. *Planta Med.* 2010; 76: 831-836.
- Pongkitwitoon B, Sakamoto S, Tanaka H, Tsuchihashi R, Kinjo J, Morimoto S, Putalun W. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay to determine puerarin and its aglycone daidzein. *J. Nat. Med.* 2011; 65: 31-36.
- Ray E. Immunoassay : an introduction. London : Heinemann Medical Books; 1985. 74-100.

- Shan S, Tanaka H, Shoyama Y. Enzyme-linked immunosorbent assay for glycyrrhizin using anti-glycyrrhizin monoclonal antibody and an eastern blotting technique for glucuronides of glycyrrhetic acid. *Anal. Chem.* 2001; 73: 5784-5790.
- Shao B, Guo HZ, Cui YJ, Liu AH, Yu HL, Guo H, Xu M, Guo DA. Simultaneous determination of six major stilbenes and flavonoids in *Smilax china* by high performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007; 44: 737-742.
- Singh A, Chaudhary S, Agarwal A, Verma S. Antibodies: Monoclonal and polyclonal. In: *Animal Biotechnology*. Noida; 2014. 265-87.
- Tassanawat P, Putalun W, Yusakul G, Sritularak B, Juengwatanatrakul T, Tanaka H. Production of polyclonal antibody against madecassoside and development of immunoassay methods for analysis of triterpene glycosides in *Centella asiatica* *Phytochem. Anal.* 2013; 24: 256-262.
- Tassanawat P, Putalun W, Komaikul J, Sritularak B, Juengwatanatrakul T, Tanaka H. Development of anti-asiaticoside polyclonal antibody-based immunoassay and applications for *Centella asiatica* products and human serum. *Food Anal. Methods.* 2010; 5: 1320-1327.
- Tothiam C, Phrompittayarat W, Putalun W, Tanaka H, Sakamoto S, Khan IA, Ingkaninan K. An enzyme linked immunosorbent assay using monoclonal antibody against bacoside A3 for determination of jujubogenin glycosides in *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. *Phytochem. Anal.* 2011; 22: 385-391.
- Li H, Cheng KW, Cho CH, He Z, Wang M. Oxyresveratrol as an antibrowning agent for cloudy apple juices and fresh-cut apples. *J. Agric. Food Chem.* 2007; 55: 2604-2610.
- Weiler EW, Zenk MH. Radioimmunoassay for the determination of digoxin and related compounds in *Digitalis lanata*. *Phytochemistry.* 1976; 15: 1537-45.
- Wen KC, Lin JW, Chaing HM, Lin YC. Natural products with skin –whitening Effects. *J. Food Drug Anal.* 2008; 16: 1-10.
- Xiao K, Zhang HJ, Xuan LJ, Zhang J, Xu YM, Bai DL. Stilbenoids: chemistry and bioactivities. *Stud Nat Prod Chem.* 2008; 34: 453-646.
- Yen GC, Fang SC, Hsu. Anti-inflammatory effects of phenolic compounds isolated from the fruits of *Artocarpus heterophyllus*. *J. Agric. Food Chem.* 2008; 56: 4463-4468.
- Yusakul G, Kitirattrakarn W, Tanwanichkul N, Tanaka H, Putalun W. Development and application of an enzyme-linked immunosorbent assay for specific detection of mangiferin content in various cultivars of *Mangifera indica* leaves using anti-mangiferin polyclonal antibody. *J. Food Sci.* 2012; 77: C414-419.
- Zhang Z, Jin J, Shi L. Protective function of cis-mulberroside A and oxyresveratrol from *Ramulus mori* against ethanol-induced hepatic damage. *Environ. Toxicol. Phar.* 2008; 26: 325-330.

### บทที่ 3

## โครงการวิจัยที่ 2

# การศึกษาออกซิเรสเวราทรอลในการลดอาการเสื่อมของระบบประสาทในโรคอัลไซเมอร์

### 1. ความสำคัญและที่มาของการวิจัย

ปัจจุบันสังคมไทยได้ก้าวเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุได้มีการคาดการณ์ว่าในอีกประมาณ 15 ปี จำนวนผู้สูงอายุจะเพิ่มขึ้นเป็น 23 % ของจำนวนประชากรวัยทำงาน ซึ่งจะเป็นสัดส่วนที่สูงกว่าค่าเฉลี่ยของประเทศอื่นๆ ในทวีปเอเชียยกเว้นจีนและญี่ปุ่น ในอนาคตอันใกล้ การจัดบริการด้านสาธารณสุขให้แก่ผู้สูงอายุซึ่งได้แก่การดูแลสุขภาพ การป้องกันและรักษาโรคของคนชราจะเป็นโจทย์ที่ท้าทายสำหรับประเทศไทย รัฐจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องเข้ามากำกับดูแลและพัฒนาการสาธารณสุขสำหรับผู้สูงอายุให้มีประสิทธิภาพและครอบคลุมคนชราทุกกลุ่ม เพื่อตอบสนองความต้องการของสังคมที่เปลี่ยนไป ภายใต้กรอบงบประมาณและทรัพยากรของประเทศที่มีอย่างจำกัด

ในผู้สูงอายุ หรือผู้ที่มีอายุตั้งแต่อายุ 65 ปีขึ้นไปนั้น ปัญหาสุขภาพหรืออาการป่วยที่พบบ่อยได้แก่ ความผิดปกติของระบบโลหิต และความเสื่อมของระบบประสาท ในกรณีความผิดปกติของระบบประสาทนั้น มักเกิดจากการที่สมองสูญเสียความสามารถในการควบคุมสั่งการอวัยวะอื่นๆ โดยมีสาเหตุมาจากการที่เซลล์สมองถูกทำลาย หรือถูกขัดขวางการทำงาน หรือขาดสารสื่อประสาทในเนื้อเยื่อสมอง ตัวอย่างของโรคผู้สูงอายุที่เกิดจากความผิดปกติของระบบประสาทในสมอง เช่น โรคความจำเสื่อมหรืออัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) และโรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) สาเหตุที่ทำให้ผู้สูงอายุป่วยเป็นโรคเหล่านี้ยังไม่ทราบแน่ชัด อย่างไรก็ตามหากเราสามารถป้องกันไม่ให้ผู้สูงอายุมีอาการผิดปกติเหล่านี้ได้ ก็จะทำให้ผู้สูงอายุมีสุขภาพแข็งแรง มีคุณภาพชีวิตที่ดี ไม่เป็นภาระแก่ครอบครัวและคนใกล้ชิด ซึ่งจะส่งผลดีต่อสังคมโดยรวม นอกจากนี้เมื่อพิจารณาในแง่เศรษฐศาสตร์ การป้องกันโรคมักมีค่าใช้จ่ายน้อยกว่าการรักษาโรค ทำให้รัฐสามารถประหยัดงบประมาณรายจ่ายในปัญหาสาธารณสุขส่วนนี้ได้ ประเทศไทยอุดมไปด้วยทรัพยากรธรรมชาติ มีพืชสมุนไพรมากมาย หากเราสามารถนำพืชสมุนไพรมาพัฒนาใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารหรือยาช่วยป้องกันการเสื่อมของสมอง ก็จะเป็นการพัฒนาคุณค่าความหลากหลายทางชีวภาพ เพิ่มมูลค่าของพืชสมุนไพร

ออกซิเรสเวราทรอล (oxyresveratrol หรือ 2,4,3',5'-tetrahydroxystilbene) เป็นสารธรรมชาติที่พบในพืชหลายชนิดในวงศ์ Moraceae เช่น มะหาด *Artocarpus lakoocha* Roxb ในระยะเวลาประมาณ 10 ปีที่ผ่านมาได้มีรายงานวิจัยเบื้องต้นหลายเรื่องเกี่ยวกับฤทธิ์ของ oxyresveratrol ในการปกป้องเซลล์ประสาท (neuroprotective activity) (Lorenz et al., 2003; Andrabi et al., 2004) ได้มีรายงานการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง rat cortical neurons พบว่า oxyresveratrol ช่วยปกป้องเซลล์ประสาทจากพิษของ  $\beta$ -amyloid peptide ซึ่งเป็นสารที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคความจำเสื่อมหรืออัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) (Ban et al., 2006; Jeon et al., 2007) คณะผู้เสนอโครงการวิจัยได้ศึกษาศักยภาพของ oxyresveratrol ในการเป็นสารต้านชรา (anti-aging agent) และพบว่า oxyresveratrol มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน สามารถปกป้องดีเอ็นเอจากอันตรายของอนุมูลอิสระได้ดีกว่า trolox และ ascorbic acid (Aftab et al., 2011; Chatsampun et al., 2011) จากข้อมูลข้างต้นคณะผู้วิจัยจึงตั้งสมมติฐานว่าสาร oxyresveratrol น่าจะมีศักยภาพที่จะนำมา

พัฒนาเพื่อใช้ป้องกันหรือบรรเทาอาการเสื่อมของระบบประสาทเช่นที่พบในโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) ได้ อย่างไรก็ตามการนำ oxyresveratrol โดยลำพังมาใช้ป้องกันหรือบรรเทาอาการเสื่อมของระบบประสาทมีอุปสรรคหลายประการ ที่สำคัญได้แก่ การที่ oxyresveratrol ถูกทำลายหรือกำจัดอย่างรวดเร็วโดยกระบวนการเมตาบอลิซึมในร่างกาย (Mei et al., 2012) และการที่ oxyresveratrol เป็นสารซึ่งมีความสามารถซึมผ่าน blood-brain-barrier ในสมองปกติได้ในปริมาณที่น้อย (Breuer et al., 2005) ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีความประสงค์ที่จะศึกษาการพัฒนาสูตรตำรับที่ช่วยให้ oxyresveratrol มีความทนต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมในร่างกายได้มากขึ้น และช่วยให้ oxyresveratrol ซึมผ่านผนังหลอดเลือดเข้าสู่เนื้อเยื่อสมองในสภาวะปกติในปริมาณที่มากพอที่จะออกฤทธิ์ชีวภาพต่อเซลล์ในสมองได้

ในปัจจุบันการพัฒนาสูตรตำรับสำหรับนำส่ง oxyresveratrol ยังมีการศึกษาน้อยมาก และส่วนใหญ่เป็นการพัฒนาเพื่อนำส่งทางผิวหนังเช่น สูตรตำรับ ointment, cream และ microemulsion เพื่อรักษาการติดเชื้อไวรัสในสัตว์ทดลอง และไม่พบข้อมูลการพัฒนาหรือศึกษาสูตรตำรับเพื่อเป็นระบบนำส่งสำหรับการให้ oxyresveratrol ทางปาก (oral delivery) หรือการนำส่งไปยังสมอง (brain delivery) ระบบนำส่งยาแบบอนุภาคนาโนโดยใช้ไขมันแข็ง (lipid nanoparticles) ซึ่งได้แก่ solid lipid nanoparticles (SLN) และ nanostructured lipid carriers (NLC) มีขนาด 50 - 1000 นาโนเมตรผลิตจากไขมันที่เป็นของแข็งในกรณีของ SLN และส่วนผสมของไขมันแข็งกับน้ำมันในกรณีของ NLC ระบบ lipid nanoparticles มีข้อดีหลายประการ เช่น ระบบมีการใช้ส่วนประกอบที่เป็นไขมันและน้ำมันที่สามารถเข้ากันได้กับร่างกายและย่อยสลายได้ในร่างกาย สามารถป้องกันยาจากการทำลายด้วยเอนไซม์และสารเคมี และสามารถควบคุมการปลดปล่อยยานอกจากนี้การที่มีอนุภาคขนาดเล็กและส่วนประกอบของตำรับบางชนิด เช่น ไขมันและสารลดแรงตึงผิวสามารถช่วยเพิ่มการดูดซึมยาในทางเดินอาหาร และลดการถูกทำลายหรือกำจัดอย่างรวดเร็วโดยกระบวนการเมตาบอลิซึมในร่างกาย นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าระบบนำส่งยาแบบ lipid nanoparticles มีศักยภาพในการเพิ่มการนำยาหลายชนิดเข้าสู่ human brain endothelial cells ได้ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีความประสงค์ที่จะพัฒนาสูตรตำรับในการนำส่ง oxyresveratrol เพื่อหวังผลในการนำส่งยาสำหรับออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อระบบประสาทและสมองต่อไป

## 2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

2.1 พัฒนาสูตรตำรับของ oxyresveratrol ที่เหมาะสมสำหรับการให้ทางปาก

2.2 ศึกษาผลของ oxyresveratrol ในสูตรตำรับต่อการปกป้องระบบประสาทของสมอง จากพิษของ  $\beta$ -amyloid peptide เมื่อให้สารทดลองทางปาก

## 3. ขอบเขตของโครงการวิจัย

โครงการมุ่งพัฒนาสูตรตำรับของ oxyresveratrol ในรูปแบบ lipid nanoparticles ศึกษาคุณสมบัติทางฟิสิกส์เคมี (physicochemical properties) เลือกสูตรตำรับที่เหมาะสม นำไปทดลองในหนูที่ได้รับการฉีด  $\beta$ -amyloid peptide โดยให้สารทดลองทางปาก จากนั้นจึงทำการศึกษาผลต่อพฤติกรรมต่างๆที่เกี่ยวข้องกับโรคความจำเสื่อมหรืออัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) ของสัตว์ทดลอง เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบ

## 4. วิธีดำเนินการวิจัย

#### 4.1 การเตรียมและศึกษาคุณสมบัติของระบบนำส่งยาแบบเซลล์ไมโครอิมัลชันของออกซิเรสเวอราทอรอล (OXY-SMEDDS)

สูตรตำรับ SMEDDS ของออกซิเรสเวอราทอรอล สามารถเตรียมได้ด้วยวิธีการผสมแบบง่าย ซึ่งทำโดยการผสมน้ำมันคือ น้ำมัน Capryol 90 สัดส่วนร้อยละ 45 เข้ากับวัฏภาคสารลดแรงตึงผิวคือ Cremophor RH40 และ Tween 80 ในสัดส่วนร้อยละ 40 และ 15 ตามลำดับ จนได้สารละลายใส แล้วจึงเติมออกซิเรสเวอราทอรอลจำนวน 40 มิลลิกรัมต่อ 1 กรัมของสารผสมดังกล่าวลงไป ปั่นจนได้สารผสมใส หลังจากนั้นทำการประเมินการตกตะกอนของยา โดยการวางสูตรตำรับที่เตรียมได้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วจึงบรรจุลงในแคปซูลขนาด 00 และเก็บไว้ในภาชนะป้องกันแสงจนกระทั่งใช้งาน

การศึกษาคุณสมบัติของสูตรตำรับ SMEDDS ของออกซิเรสเวอราทอรอล ทำโดยการเจือจางสูตรตำรับดังกล่าวในน้ำ 20 เท่า แล้วประเมินในหัวข้อต่างๆ ที่อุณหภูมิห้องดังนี้คือ 1) ความสามารถในการเกิดไมโครอิมัลชัน ซึ่งประเมินด้วยการมองเห็น (visual grading system) (Singh et al., 2009) 2) ขนาดอนุภาคและการกระจายขนาดอนุภาค ซึ่งวัดโดยเทคนิคการกระเจิงแสง (dynamic light scattering) ที่มุม 173 องศา โดยใช้เครื่องวัดขนาดอนุภาค Zetasizer Nano ZS® (Malvern Instruments, UK) 3) ปริมาณยาในสูตรตำรับ ซึ่งหาโดยการนำไมโครอิมัลชันที่มียา 1 มิลลิลิตร มาละลายในเมทานอล (methanol) แล้ววิเคราะห์หาปริมาณออกซิเรสเวอราทอรอล ด้วยวิธี High pressure chromatography (HPLC) แบบย้อนกลับที่ได้รับการตรวจสอบแล้ว และคำนวณเทียบกับปริมาณยาเริ่มต้น ผลการตรวจสอบวิธี HPLC พบว่าเป็นวิธีที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณยาในตำรับได้อย่างถูกต้อง ( $95.50 \pm 4.40\%$  -  $101.87 \pm 1.61\%$ ) และแม่นยำ (RSD < 2.0 %) ในช่วงความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่ 0.2 - 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ( $r^2 = 0.9994$ ) หลังจากทดลองซ้ำ 3 ครั้งสำหรับแต่ละการทดลอง

#### 4.2 การศึกษาฤทธิ์ป้องกันอาการเสื่อมของระบบประสาทในหนูเมาส์ที่เหนี่ยวนำด้วยการฉีดเพปไทด์ Amyloid- $\beta_{25-35}$ เข้าโพรงสมอง ซึ่งเป็นโมเดลสัตว์ทดลองสำหรับโรคอัลไซเมอร์

##### 4.2.1 สัตว์ทดลอง

การศึกษานี้ใช้หนูเมาส์สายพันธุ์ ICR เพศผู้ น้ำหนัก  $30 \pm 2$  กรัม จำนวน 80 ตัว ซึ่งได้รับมาจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล หนูเมาส์ถูกเลี้ยงกรงละ 5 ตัว ณ คณะเกษตรศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พร้อมทั้งให้อาหารและน้ำในปริมาณที่พอเหมาะ รวมทั้งควบคุมอุณหภูมิ ความชื้น และแสงสว่าง จนได้น้ำหนักที่ต้องการ ในขั้นตอนการศึกษาพฤติกรรม สัตว์ทดลองจะถูกทำให้คุ้นเคยกับสถานที่ทดลองอย่างน้อย 30 นาที ก่อนการทดลองทุกครั้ง ห้องทดลองจะเป็นห้องที่มีการไหลเวียนของอากาศที่ดี และปราศจากเสียงรบกวน และทำการทดลองระหว่างเวลา 9.00-16.00 น. ภายใต้ข้อกำหนดของคณะกรรมการจริยธรรมการใช้สัตว์ทดลองของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลขที่ 1533003

##### 4.2.2 การเตรียมเพปไทด์ Amyloid- $\beta$

เตรียมสารละลายเพปไทด์ Amyloid- $\beta_{25-35}$  โดยละลายผงเพปไทด์ในน้ำเกลือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS) พีเอช 7.4 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของสารละลายเพปไทด์ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส ก่อนการใช้เพปไทด์ Amyloid- $\beta_{25-35}$  ถูกบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน หลังจากนั้นหยดสารละลายดังกล่าวลงบนสไลด์แก้ว แล้วตรวจสอบความสามารถในการเกาะกลุ่มของเพปไทด์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

##### 4.2.3 ขั้นตอนการทดลอง

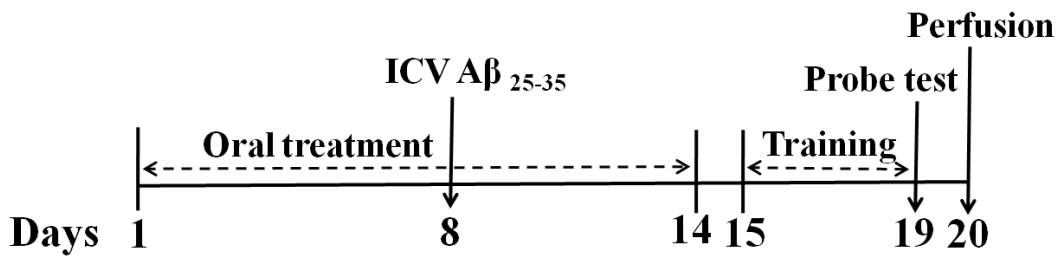
หลังจากการพักรีสต์ทดลองประมาณ 1 สัปดาห์ หนูเมาส์ถูกแบ่งเป็น 8 กลุ่ม อย่างสุ่ม (10 ตัวต่อกลุ่ม) โดยหนูเมาส์ 7 กลุ่ม จะถูกเหนี่ยวนำให้เกิดอาการเสื่อมของระบบประสาทด้วยการฉีดสารละลายเพปไทด์ Amyloid- $\beta_{25-35}$  ปริมาณ 9 ไมโครกรัมต่อตัว เข้าทางโพรงสมอง (intracerebroventricular หรือ i.c.v. injection) ในขณะที่กลุ่มที่เหลือเป็นหนูปกติ ซึ่งจะได้รับการฉีดน้ำเกลือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และหนูเมาส์ แต่ละกลุ่มจะได้รับการป้อนสารตัวอย่างต่างๆทางปาก วันละครั้ง เป็นเวลา 14 วัน ดังแสดงด้านล่าง โดยที่หนูเมาส์ทุกตัว ยังคงได้รับอาหารและน้ำตามปกติ

- 1) กลุ่มปกติ (Normal group): น้ำเกลือ 0.9% (Normal saline 0.9%)
- 2) กลุ่มควบคุม (Control group): น้ำเกลือ 0.9%
- 3) กลุ่มออกซิเรสเวอราทอรอลขนาดยาระดับต่ำ (OXY90): สารแขวนตะกอนของออกซิเรสเวอราทอรอลในน้ำ ขนาดยา 90 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
- 4) กลุ่มออกซิเรสเวอราทอรอลขนาดยาระดับกลาง (OXY180): สารแขวนตะกอนของออกซิเรสเวอราทอรอลในน้ำ ขนาดยา 180 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
- 5) กลุ่มออกซิเรสเวอราทอรอลขนาดยาระดับสูง (OXY360): สารแขวนตะกอนของออกซิเรสเวอราทอรอลในน้ำ ขนาดยา 360 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
- 6) กลุ่มสูตรตำรับออกซิเรสเวอราทอรอลขนาดยาระดับต่ำ (F90): สูตรตำรับ SMEDDS ของออกซิเรสเวอราทอรอลในน้ำ ขนาดยา 90 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
- 7) กลุ่มสูตรตำรับออกซิเรสเวอราทอรอลขนาดยาระดับกลาง (F180): สูตรตำรับ SMEDDS ของออกซิเรสเวอราทอรอลในน้ำ ขนาดยา 180 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของหนูเมาส์
- 8) กลุ่มสูตรตำรับออกซิเรสเวอราทอรอลขนาดยาระดับสูง (F360): สูตรตำรับ SMEDDS ของออกซิเรสเวอราทอรอลในน้ำ ขนาดยา 360 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

**หมายเหตุ:** การฉีดสารเข้าทางโพรงสมอง ทำโดยการใช้กระบอกฉีดยา Hamilton (model 80301, Hamilton, USA) ซึ่งมีเข็มเบอร์ 26 ขนาด 1/2 นิ้ว ที่ถูกสวมด้วยท่อพลาสติกยาว 9 มิลลิเมตร เพื่อควบคุมความลึกของเข็มที่แทงเข้าโพรงสมองเป็น 4 มิลลิเมตร ในขั้นตอนการฉีด สัตว์ทดลองจะถูกทำให้สลบอย่างอ่อนด้วย 2.8% isoflurane โดยมีก๊าซออกซิเจน ( $O_2$ ) เป็นตัวพา โดยฉีดโดยตรงเข้ายังโพรงสมองด้านข้าง (lateral ventricle) ซึ่งมีตำแหน่งห่างจาก bregma ไปทางด้านหลัง 3 มิลลิเมตร และห่างจากเส้นกลางกะโหลก (midline) 1 มิลลิเมตร (Laursen and Belknap, 1986; Maurice et al., 1996)

แผนผังขั้นตอนการทดลองแสดงในรูปที่ 3.1 หลังจากหนูเมาส์แต่ละกลุ่มได้รับสารตัวอย่างต่างๆเป็นเวลา 7 วัน ในวันที่ 8 หนูเมาส์จะถูกเหนี่ยวนำให้เกิดอาการเสื่อมของระบบประสาทด้วยการฉีดสารละลายเพปไทด์ amyloid- $\beta_{25-35}$  เข้าไปทางโพรงสมอง หลังจากนั้นหนูเมาส์ยังคงได้รับสารตัวอย่างต่างๆ ต่อจนครบ 14 วัน เมื่อหยุดการบริหารยา สัตว์ทดลองจะถูกฝึกเป็นเวลา 5 วัน แล้วทำการศึกษาพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำด้วยโมเดล Morris water maze หลังจาก 4 ชั่วโมงของการฝึกสัตว์ทดลองครั้งสุดท้าย (Delobette et al., 1997; Zussy et al., 2011) หลังจากทดสอบหนูเมาส์กลุ่มละ 5 ตัว ถูกฆ่าโดยการดิงคอค แล้วแยกสมองส่วนฮิปโปแคมปัสออกอย่างรวดเร็ว เพื่อใช้ในการทดสอบการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (lipid peroxidation) ต่อไป (Hermes-Lima et al., 1995; Meunier et al., 2006) ส่วนหนูเมาส์ที่เหลืออีกกลุ่มละ 5 ตัว ถูกทำให้สลบโดยการฉีดยาสลบ Pentobarbital sodium (Nembutol<sup>®</sup>) เข้าทางช่องท้อง (intraperitoneal หรือ i.p. injection) แล้วทำ perfusion ผ่านหัวใจด้วยน้ำเกลือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ตามด้วย 4% paraformaldehyde ในน้ำเกลือฟอสเฟตบัฟเฟอร์

ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ก่อนที่จะแยกเอาสมองออกมา แล้วแช่ไว้ในสารละลายดังกล่าว ก่อนการวิเคราะห์เนื้อเยื่อต่อไป (Wanakhachornkrai, 2006; Zussy et al., 2011)



รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการศึกษาฤทธิ์ป้องกันความเสื่อมของสมองในหนูเมาส์ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยการฉีดเปปไทด์ Amyloid-β<sub>25-35</sub> เข้าไปทางโพรงสมอง ซึ่งเป็นโมเดลสัตว์ทดลองของโรคอัลไซเมอร์

#### 4.2.3.1 การศึกษาพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำด้วยโมเดล Morris water maze

การศึกษาพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำในหนูเมาส์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความเสื่อมของระบบประสาทสมองด้วยการฉีดเปปไทด์ Amyloid-β<sub>25-35</sub> เข้าไปทางโพรงสมอง ทำโดยใช้โมเดล Morris water maze (Delobette et al., 1997) ซึ่งใช้อ่างน้ำขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 150 เซนติเมตร สูง 40 เซนติเมตร ที่มีการแบ่งเป็น 4 ส่วน (quadrant) ซึ่งมีการควบคุมอุณหภูมิ (25 ± 2 องศาเซลเซียส) ความขุ่นของน้ำ เสียงรบกวนภายนอก และความเข้มแสงอย่างรัดกุม แขนงวัตถุ (platform) ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 8 เซนติเมตร ซึ่งเป็นจุดพักสำหรับสัตว์ทดลอง ถูกวางไว้ใต้ระดับผิวน้ำ 1 เซนติเมตร ที่ตำแหน่งตรงกลางของส่วนใดส่วนหนึ่งของอ่างน้ำ (Training quadrant) และติดตามเส้นทางการว่ายน้ำของสัตว์ทดลองด้วยกล้อง CCD ซึ่งต่ออยู่กับคอมพิวเตอร์ แล้วคำนวณออกมาเป็นค่าระยะเวลาและระยะทางที่ใช้ในการหาตำแหน่งวัตถุ ด้วยโปรแกรม VideoMot 2 (TSE systems GmbH, Bad Homburg, Germany)

ในส่วนของการฝึกสัตว์ทดลองเป็นเวลา 5 วัน จะให้หนูเมาส์ว่ายน้ำ 3 ครั้งต่อวัน โดยปล่อยตัวหนูเมาส์ที่จุดเดียวซึ่งก็คือตำแหน่งกึ่งกลางของแต่ละ quadrant แล้วอนุญาตให้หนูเมาส์ว่ายน้ำหาตำแหน่งวัตถุเป็นเวลา 90 วินาที และอยู่บนแท่นวัตถุจนครบเวลา 30 วินาที สำหรับหนูเมาส์ที่ไม่สามารถทำได้ภายในเวลาที่กำหนด จะถูกฝึกโดยผู้ศึกษา และหลังจาก 4 ชั่วโมงของการฝึกครั้งสุดท้าย หนูเมาส์จะถูกทดสอบพฤติกรรม โดยการนำแท่นวัตถุออกแล้วให้หนูเมาส์ว่ายน้ำอย่างอิสระเป็นเวลา 60 วินาที พร้อมทั้งบันทึกและคำนวณระยะเวลาและระยะทางที่หนูเมาส์ใช้ในการหาตำแหน่งวัตถุในส่วนของการ Training quadrant เพื่อใช้เปรียบเทียบผลของสูตรตำรับ SMEDDS และออกซิเรสเวอราทอรอลเดี่ยว

#### 4.2.3.2 การทดสอบการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (lipid peroxidation)

การหาระดับการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในเนื้อเยื่อ สามารถทำได้โดยวิธี ferrous (III)-xynolol orange (FOX) (Hermes-Lima et al., 1995; Meunier et al., 2006) ดังนี้คือ หนูเมาส์ถูกทำให้ตายด้วยการตีคอ แล้วผ่าเอาสมองและแยกส่วนของฮิปโปแคมปัสออกมาอย่างรวดเร็ว หลังจากชั่งน้ำหนักเนื้อเยื่อที่แยกได้ดังกล่าวถูกเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวจนกระทั่งใช้ ก่อนการทดสอบ เนื้อเยื่อที่แห้งถูกละลายแล้วปั่นในเมธานอล (เกรด HPLC) ที่เย็น ในอัตราส่วน 10/1 น้ำหนักต่อปริมาตร ที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วหมุนเหวี่ยงสารผสมดังกล่าวที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำ

สารละลายใส (supernatant) ที่ได้จากหนูเมาส์กลุ่มควบคุม (control group) ไปทำการทดลองเบื้องต้นเพื่อหาปริมาณในการเกิดปฏิกิริยาที่เหมาะสม โดยใช้ปริมาณของสารละลายใสที่แตกต่างกันคือ 2-100 ไมโครลิตร สารละลายใสปริมาณต่างๆดังกล่าวถูกเติมลงไปในการก่อปฏิกิริยา ซึ่งประกอบด้วย  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ความเข้มข้น 0.25 มิลลิโมลาร์  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ และ xylenol orange ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ แล้วเติมน้ำบริสุทธิ์เพื่อให้ได้ปริมาตรสุทธิ 1 มิลลิลิตร สารผสมดังกล่าวถูกบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน แล้วจึงวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 580 นาโนเมตร ในการทดลองแต่ละครั้งทำการวัดซ้ำ 3 ครั้ง แล้วเลือกปริมาณของสารละลายเนื้อเยื่อที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงเป็น 0.7 เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

สำหรับเนื้อเยื่อฮิปโปแคมปัสของหนูเมาส์กลุ่มอื่นๆ ก็ทำการศึกษาดังกล่าวด้วยวิธีการเดียวกันกับข้างต้น โดยเติมปริมาณที่เหมาะสม (50 ไมโครลิตร) ของสารละลายใสที่ได้จากหนูเมาส์แต่ละกลุ่ม ลงไปในการก่อปฏิกิริยา แล้วปรับปริมาตรจนครบ 1 มิลลิลิตร ด้วยน้ำบริสุทธิ์ แล้วบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน แล้วจึงวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 580 นาโนเมตร ( $A_{5801}$ ) หลังจากนั้นเติมปริมาตร 5 ไมโครลิตร ของ cumene hydroperoxide (CHP) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ลงไปในตัวอย่างดังกล่าว แล้วบ่มต่อในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 580 นาโนเมตร ( $A_{5802}$ ) อีกครั้ง เพื่อหาระดับการเกิดออกซิเดชันสูงสุด ดังนั้น ปริมาณการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในเนื้อเยื่อ สามารถแสดงเป็นค่าเทียบเท่ากับจำนวนโมลของ CHP ต่อน้ำหนักเปียกของเนื้อเยื่อ ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{CHPE} = (A_{5801}/A_{5802}) \times \text{CHP (nmol)}$$

#### 4.2.3.3 การวิเคราะห์ทางจุลกายวิภาคเนื้อเยื่อของสมอง (histological analysis)

หลังจากทำการสลบสัตว์ทดลองโดยการฉีด Pentobarbital sodium (Nembutal<sup>®</sup>) เข้าช่องท้อง แล้วจึงทำ perfusion ผ่านหัวใจ ด้วยน้ำเกลือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ตามด้วยสารละลาย PFA (4%) ในน้ำเกลือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ก่อนที่จะแยกเอาสมองออกมา แล้วแช่ไว้ใน 4% PFA ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ต่ออีกเป็นเวลาอย่างน้อย 48 ชั่วโมง ก่อนการศึกษา สมองจะถูกแช่ข้ามคืนในสารละลายซูโครสความเข้มข้น 10%, 20% และ 30% ตามลำดับ หลังจากนั้นทำการติดสมองบนแท่นด้วยสาร optimal cutting temperature (O.C.T) (Tissue-Tek<sup>®</sup>; Sakura Finetek, Torrance, CA, USA) แล้วทำให้แข็งภายใต้อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ในเครื่องตัดตัวอย่างที่จุดเยือกแข็ง (cryostat; CM1800, Leica, Germany) แล้วทำการตัดเนื้อเยื่อด้วยความหนา 10 ไมโครเมตร ในแนวระนาบหน้าหลัง (coronal section) จากด้านหน้าของสมองส่วนฮิปโปแคมปัส แล้วทำการเลือกติดชิ้นเนื้อเยื่อแบบสุ่มลงบนสไลด์แก้วที่เคลือบด้วยเจลาติน หลังจากนั้นทำการเอา PFA ออก และย้อมเนื้อเยื่อสมองดังกล่าวด้วยสีย้อม 0.2% cresyl violet แล้วจึงเอาน้ำออกจากเนื้อเยื่อ พร้อมด้วยปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ ก่อนนำไปวิเคราะห์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Nikon eclipse E600, Nikon Instrument Inc., USA) แล้วบันทึกรูปภาพโดยใช้โปรแกรม Nikon ACT-1 (New York, USA) พร้อมกับนับจำนวนเซลล์ประสาทที่ไม่ถูกทำลายในแต่ละส่วนของฮิปโปแคมปัสทั้งสองซีก (hemispheres) ซึ่งประกอบด้วย CA1, CA2, CA3 และ dentate gyrus (DG) ที่กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งทำการนับโดยผู้ทดลองเพียงคนเดียวเพื่อลดอคติ แล้วคำนวณหาความหนาแน่นของเซลล์ประสาทต่อพื้นที่บนสไลด์ (ตารางมิลลิเมตร) (Wanakhachornkrai, 2006; Zussy et al., 2011)

#### 4.2.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลจากการทดลองต่างๆ ในหนูเมาส์แต่ละกลุ่ม ถูกแสดงเป็นค่าเฉลี่ย (Means)  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (SEM) และใช้เทคนิคการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียว (one-way ANOVA) และเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลอง โดยการใช้การเปรียบเทียบพหุคูณแบบ Tukey (Tukey's multiple comparison)

### 5. ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

#### 5.1 การเตรียมและศึกษาคุณสมบัติของสูตรตำรับ SMEDDS ของออกซิเรสเวอราทอรอล

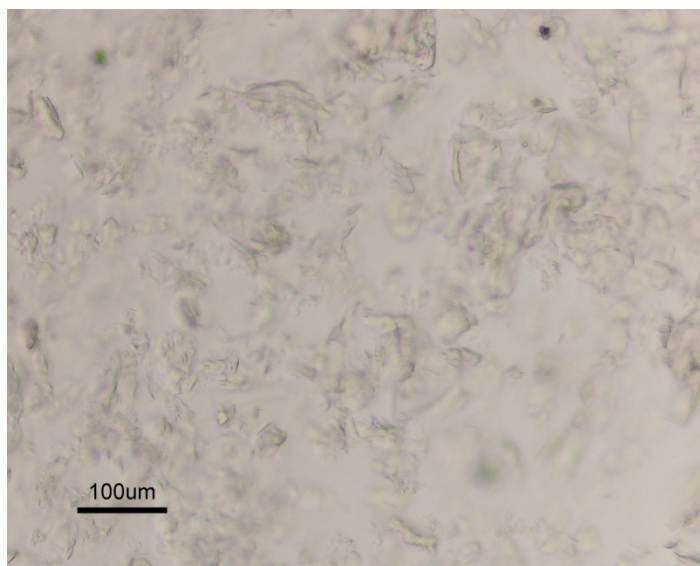
สูตรตำรับ SMEDDS ของออกซิเรสเวอราทอรอลที่เตรียมได้มีลักษณะเป็นน้ำมันใส สีน้ำตาลอมเหลือง และปราศจากน้ำ หลังจากถูกเจือจางด้วยน้ำ จะเกิดเป็นไมโครอิมัลชัน (microemulsion) ที่มียาละลายอยู่ในหยดน้ำมัน หรือบนผิวหน้าระหว่างน้ำมันและสารลดแรงตึงผิวได้เอง การละลายของยาในระบบนี้ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติความชอบน้ำมันของยา รวมทั้งสารลดแรงตึงผิว และสารลดแรงตึงผิวร่วมที่ใช้ (Gursoy and Benita, 2004) ดังนั้น ในการศึกษานี้ใช้สารลดแรงตึงผิวชนิด Cremophor RH40<sup>®</sup> และ Tween80<sup>®</sup> สามารถอิมัลซิไฟล์น้ำมันชนิด Capryol 90<sup>®</sup> ได้ดี จนเกิดเป็นไมโครอิมัลชันโปร่งใส (visual grade I) หลังจากการเจือจางด้วยน้ำด้วยอัตราส่วนต่างๆ คือ 1:10, 1:20, 1:100, 1:500 และ 1:1000 จากการประเมินความสามารถในการเกิดไมโครอิมัลชัน โดยที่ออกซิเรสเวอราทอรอลไม่ตกตะกอนหลังจากเจือจาง 24 ชั่วโมง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าระบบนี้สามารถรักษาออกซิเรสเวอราทอรอลในรูปละลายได้ เมื่อเจือจางระบบด้วยน้ำ 20 เท่า พบว่าขนาดหยดของไมโครอิมัลชันที่มีออกซิเรสเวอราทอรอล เป็น  $26.6 \pm 0.1$  นาโนเมตร และมีการกระจายขนาดอนุภาคที่สม่ำเสมอ โดยมี PDI เป็น  $0.073 \pm 0.010$  ในขณะที่ปริมาณออกซิเรสเวอราทอรอลในสูตรตำรับที่เตรียมได้เป็น  $101.4 \pm 1.2$  % แสดงว่าไม่มีการสูญเสียยาไปในช่วงการเตรียม

#### 5.2 การศึกษาฤทธิ์ป้องกันอาการเสื่อมของระบบประสาทในหนูเมาส์ที่เหนี่ยวนำด้วยการฉีดเพปไทด์

##### Amyloid- $\beta_{25-35}$ เข้าโพรงสมอง

##### 5.2.1 การเกาะกลุ่มของเพปไทด์ Amyloid- $\beta_{25-35}$

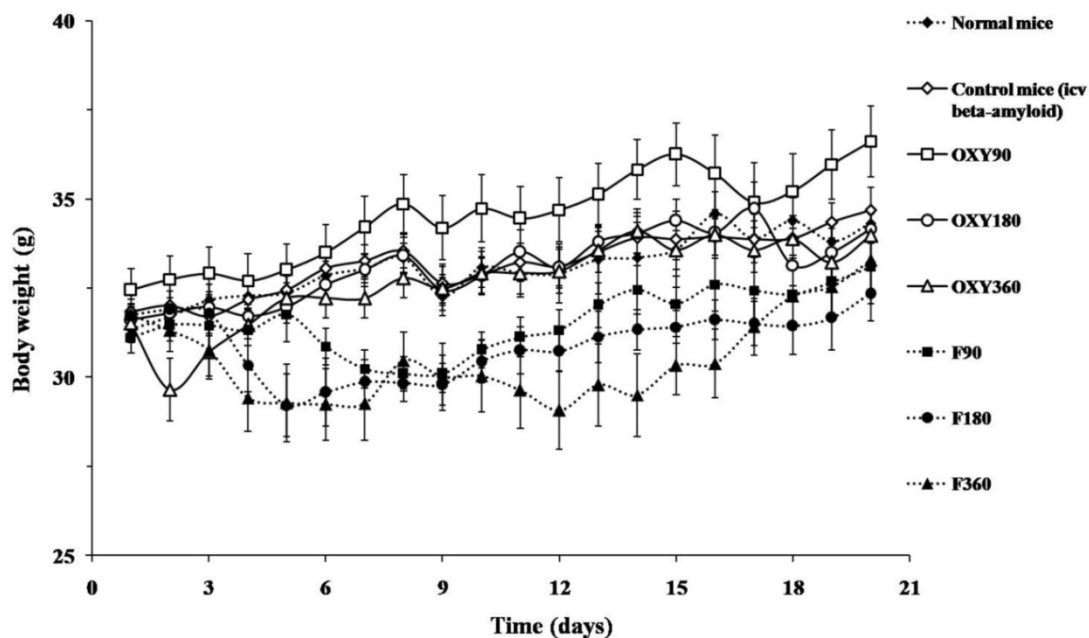
การเกาะกลุ่มของเพปไทด์ Amyloid- $\beta_{25-35}$  ในสารละลาย ถูกพบหลังจากการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน (รูปที่ 3.2) โครงสร้างที่เป็นระเบียบสูงซึ่งมีทั้งลักษณะของก้อนขนาดใหญ่และเส้นใยยาวแหลมนี้เป็นลักษณะที่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อสมองของเพปไทด์ Amyloid- $\beta_{25-35}$  หลังจากการฉีดเข้าสู่สัตว์ทดลอง



รูปที่ 3.2 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แสดงการเกาะกลุ่มของเปปไทด์ Amyloid- $\beta_{25-35}$  หลังจากการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

### 5.2.2 การติดตามน้ำหนักของสัตว์ทดลอง

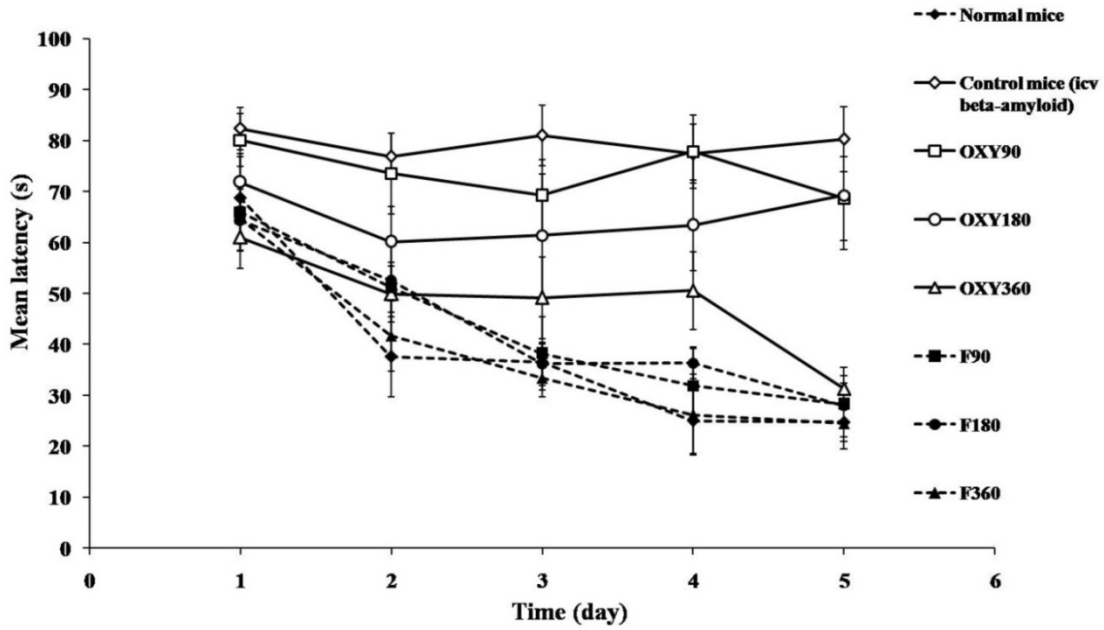
จากการติดตามน้ำหนักของหนูเมาส์ในแต่ละกลุ่มระหว่างการทดลอง เป็นเวลา 20 วัน (รูปที่ 3.3) พบว่า น้ำหนักของหนูกลุ่มควบคุมเหมือนกันกับหนูกลุ่มปกติ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเปปไทด์ Amyloid- $\beta_{25-35}$  ไม่มีผลต่อน้ำหนักตัวของหนูเมาส์ สำหรับในช่วงการให้ยาในวันที่ 1-14 น้ำหนักของหนูในกลุ่มที่ได้รับสูตรตำรับ SMEDDS ของออกซิเรสเวราทรอล ทั้งสามกลุ่ม (F90, F180, F360) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มปกติ ( $p < 0.05$ ) แต่อย่างไรก็ตามน้ำหนักของหนูในกลุ่มเหล่านั้นก็เพิ่มขึ้นสู่ระดับเดิมหลังจากช่วงการให้ยา (วันที่ 15-20) สำหรับน้ำหนักของหนูในกลุ่มที่ได้รับสารแขวนตะกอนของออกซิเรสเวราทรอลในระดับกลาง (OXY180) และสูง (OXY360) ไม่แตกต่างจากน้ำหนักของหนูกลุ่มปกติ ในทางตรงข้ามหนูในกลุ่มที่ได้รับสารแขวนตะกอนของออกซิเรสเวราทรอลในระดับต่ำ (OXY90) พบว่ามีน้ำหนักเพิ่มขึ้นในระหว่างการทดลอง ผลการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักของหนูเมาส์ อาจมาจากสารออกซิเรสเวราทรอลเอง หรือส่วนประกอบต่างๆในสูตรตำรับ SMEDDS ที่มีผลต่อศูนย์ควบคุมความหิวหรือความอยากอาหารของสัตว์ทดลอง



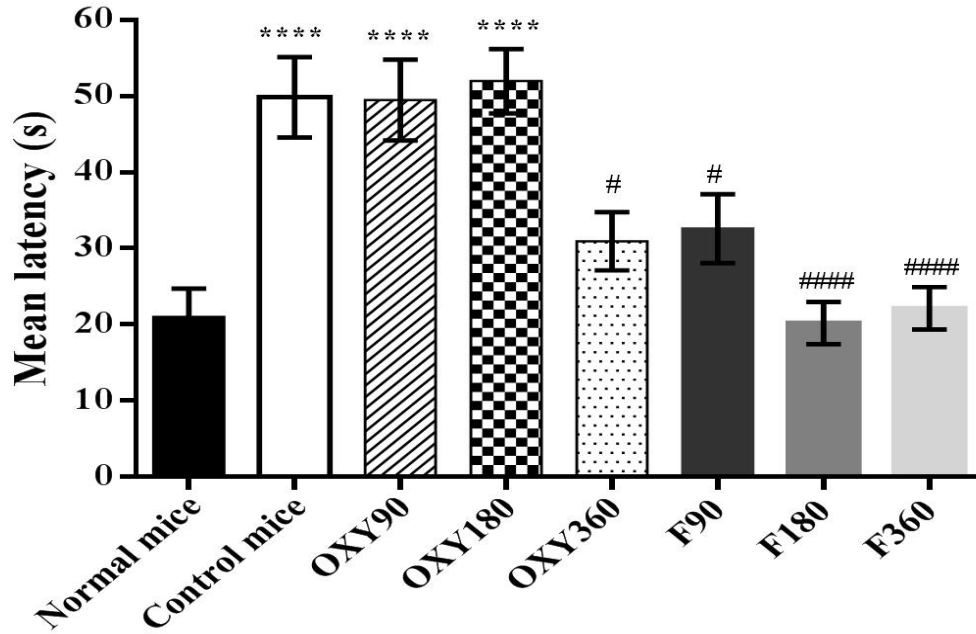
รูปที่ 3.3 น้ำหนักของหนูเมาส์แต่ละกลุ่มในช่วงระหว่างการทดลอง เป็นเวลา 20 วัน

### 5.2.3 การศึกษาพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำด้วยโมเดล Morris water maze

เนื่องจากโรคอัลไซเมอร์แสดงลักษณะอาการทางคลินิกของโรคคือ การลดลงอย่างมากในกระบวนการเรียนรู้และการจดจำเชิงตำแหน่งสถานที่และวัตถุ ดังนั้นวิธี Morris water-maze จึงนำมาใช้ในการทดสอบการเรียนรู้และการจดจำในหนูเมาส์ที่ได้รับการเหนี่ยวนำด้วยเพปไทด์ Amyloid- $\beta_{25-35}$  ให้เกิดความผิดปกติต่อสมอง รวมทั้งผลของสูตรตำรับ SMEDDS ที่มีออกซิเรสเวอราทอรอลในการป้องกันความผิดปกติในพฤติกรรมดังกล่าว เปรียบเทียบกับออกซิเรสเวอราทอรอลเดี่ยว ผลการทดลองพบว่าหลังจากการฉีดเพปไทด์ Amyloid- $\beta_{25-35}$  9 นาโนกรัม เข้าสู่โพรงสมอง เป็นเวลา 1 สัปดาห์ หนูกลุ่มควบคุมมีการเรียนรู้และการจดจำในการหาตำแหน่งของวัตถุทดลอง ในช่วงระหว่างการฝึกเป็นเวลา 5 วัน (รูปที่ 3.4) และช่วงการทดสอบ (probe test) (รูปที่ 3.5) แสดงให้เห็นว่าการฉีดเพปไทด์ Amyloid- $\beta_{25-35}$  ชัดขวางการเรียนรู้ในการหาตำแหน่งสถานที่และวัตถุของหนูเมาส์



รูปที่ 3.4 พฤติกรรมการเรียนรู้และการจดจำเชิงตำแหน่งสถานที่และวัตถุในช่วง 5 วันของการฝึก ด้วยวิธี Morris water-maze ของหนูเมาส์ หลังจากการบริหารออกซิเรสเวอราทรอลทางปากในรูปแบบสูตรตำรับ SMEDDS (F) ที่ขนาดยาต่างๆ สามระดับ คือ 90, 180, 360 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับออกซิเรสเวอราทรอลเดี่ยว (OXY) ที่ขนาดยาเท่ากัน โดยหนูกลุ่มควบคุมคือหนูที่ได้รับการฉีดเพปไทด์ Amyloid- $\beta_{25-35}$  แต่ไม่ได้รับสารตัวอย่าง ส่วนหนูกลุ่มปกติคือหนูที่ได้รับการฉีดน้ำเกลือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 แต่ไม่ได้รับสารตัวอย่าง ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ยของเวลาที่ใช้ในการหาแท่นวัตถุ (Mean latency)  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (SEM) กลุ่มละ 10 ตัว



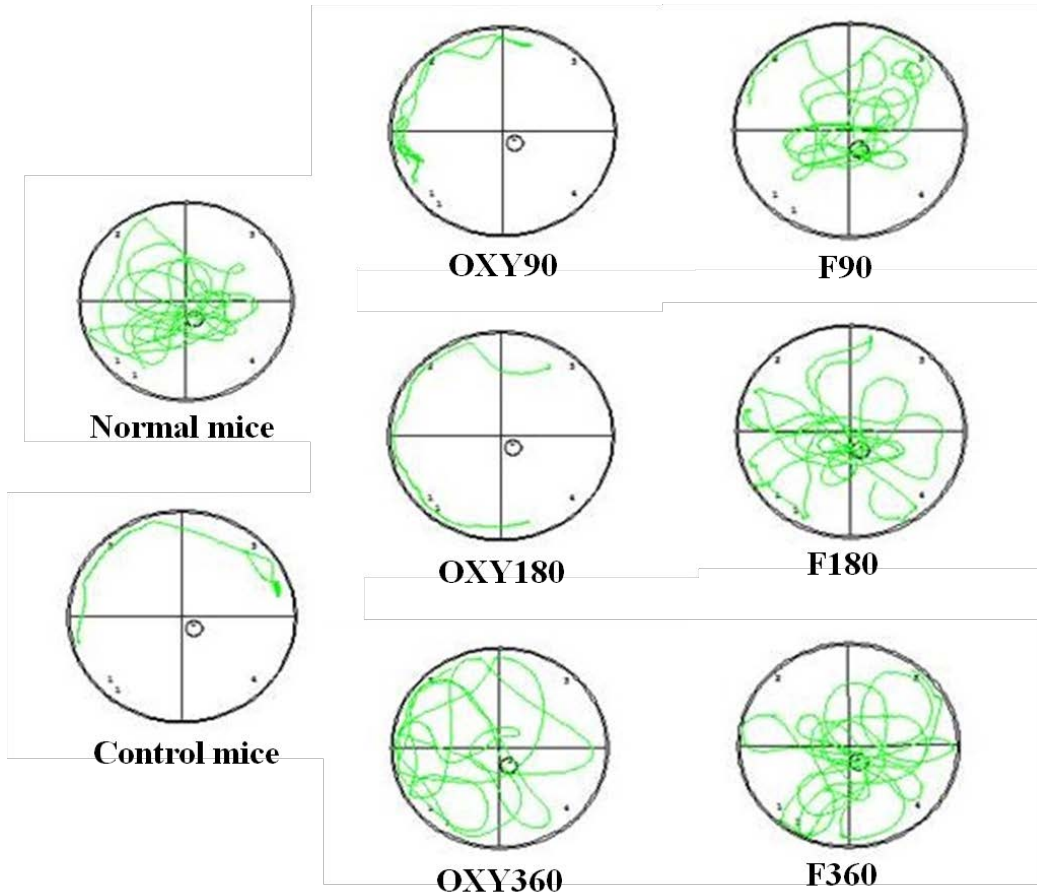
**รูปที่ 3.5** ผลการทดสอบพฤติกรรมการเรียนรู้และการจดจำเชิงตำแหน่งสถานที่และวัตถุ โดยปราศจากแท่นวัตถุ เมื่อเวลา 4 ชั่วโมงหลังจากการฝึกครั้งสุดท้าย (probe test) ด้วยการว่ายน้ำอย่างอิสระเป็นเวลา 60 วินาที (วิธี Morris water-maze) ของหนูเมาส์ หลังจากการบริหารออกซิเรสเวอราทรอลทางปากในรูปแบบสูตรตำรับ SMEDDS (F) ที่ขนาดยาต่างๆ สามระดับ คือ 90, 180, 360 มิลลิกรัม ต่อ กิโลกรัม เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับออกซิเรสเวอราทรอลเดี่ยว ที่ขนาดยาเท่ากัน โดยหนูกลุ่มควบคุมคือหนูที่ได้รับการฉีดเพปไทด์ Amyloid- $\beta_{25-35}$  แต่ไม่ได้รับสารตัวอย่าง ส่วนหนูกลุ่มปกติคือหนูที่ได้รับการฉีดน้ำเกลือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 แต่ไม่ได้รับสารตัวอย่าง ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ยของเวลาที่ใช้ในการหาแท่นวัตถุ (Mean latency)  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (SEM) กลุ่มละ 10 ตัว

\*\*\*\* $p < 0.0001$  เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มปกติ

# $p < 0.05$ , #### $p < 0.0001$  เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม

สำหรับหนูเมาส์กลุ่มที่ได้รับสารตัวอย่าง สามระดับคือ ต่ำ กลาง หรือสูง โดยการให้ทางปากทุกวัน วันละครั้ง เป็นเวลา 14 วัน พบว่าค่าเฉลี่ยของเวลาที่ใช้ในการหาแท่นวัตถุในช่วงการฝึกของกลุ่มที่ได้รับออกซิเรสเวอราทรอลเดี่ยวขนาดต่ำ (OXY90) และกลาง (OXY180) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มควบคุม ( $p > 0.05$ ) นอกจากนี้ผลของค่าเฉลี่ยของเวลาดังกล่าวในช่วงทดสอบโดยไม่มีแท่นวัตถุ (probe test) ก็เป็นเช่นเดียวกัน ยกเว้นกลุ่มที่ได้รับออกซิเรสเวอราทรอลเดี่ยวขนาดสูง (OXY360) ที่แสดงการเข้าสู่ตำแหน่งของแท่นวัตถุใน Training quadrant มากกว่าทั้งสองกลุ่มข้างต้น (OXY90 และ OXY180) (รูปที่ 3.6) จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการให้ออกซิเรสเวอราทรอลเดี่ยวที่ขนาดน้อยกว่าหรือเท่ากับ 180 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่สามารถป้องกันความเป็นพิษต่อสมองที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยเพปไทด์ Amyloid- $\beta_{25-35}$  ได้ แต่ในกลุ่มที่ได้รับสูตรตำรับ SMEDDS ของออกซิเรสเวอราทรอลที่ขนาดยาเท่ากันกับออกซิเรสเวอราทรอลเดี่ยวสามารถบรรเทาความผิดปกติที่เกิดขึ้นจากการเหนี่ยวนำของเพปไทด์ Amyloid- $\beta_{25-35}$  ได้ โดยที่ทุกกลุ่มมี

ค่าเฉลี่ยของเวลาที่ใช้ในการหาตำแหน่งวัตถุในช่วงการฝึกทดลองและเทียบเท่ากับหนูกลุ่มปกติ (รูปที่ 3.4) และทั้งนี้ หนูกลุ่มที่ได้รับสูตรตำรับ SMEDDS ที่ขนาดยาต่ำ (F90) ให้ค่าเฉลี่ยของเวลาดังกล่าวเท่ากับหนูกลุ่มที่ได้รับ ออกซิเรสเวราทรอลเดี่ยวขนาดสูง (OXY360) ในขณะที่ค่าเฉลี่ยของเวลาที่ใช้ในการหาตำแหน่งวัตถุของหนูกลุ่มที่ได้รับสูตรตำรับ SMEDDS ขนาดยา 180-360 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (F180 และ F360) ลดลงอย่างมากเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม ( $p < 0.0001$ ) (รูปที่ 3.5) ซึ่งสอดคล้องกับการติดตามพฤติกรรมเคลื่อนที่ของหนู เมาส์ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความถี่ในการปรากฏตัวของหนูเมาส์ที่ได้รับสูตรตำรับ SMEDDS ที่ตำแหน่งของแท่น วัตถุใน training quadrant อย่างมาก (รูปที่ 3.6) ดังนั้นเมื่อให้ออกซิเรสเวราทรอลโดยการรับประทานในรูปแบบ SMEDDS (F90) สามารถลดขนาดยาที่ใช้ในการป้องกันความผิดปกติของการเรียนรู้และการจดจำของ หนูเมาส์ลงได้ถึง 4 เท่า เมื่อเทียบกับการให้ออกซิเรสเวราทรอลเดี่ยว ผลการทดลองบ่งบอกได้ว่าสูตรตำรับ SMEDDS เพิ่มประสิทธิภาพของออกซิเรสเวราทรอล ในการป้องกันความเป็นพิษต่อสมองที่เหนี่ยวนำด้วยเพปไทด์ Amyloid- $\beta_{25-35}$  ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการเพิ่มการซึมผ่านของยาในลำไส้ ส่งผลให้เพิ่มค่าชีวปริมาณของ ออกซิเรสเวราทรอลโดยระบบ SMEDDS เมื่อบริหารยาโดยการรับประทาน

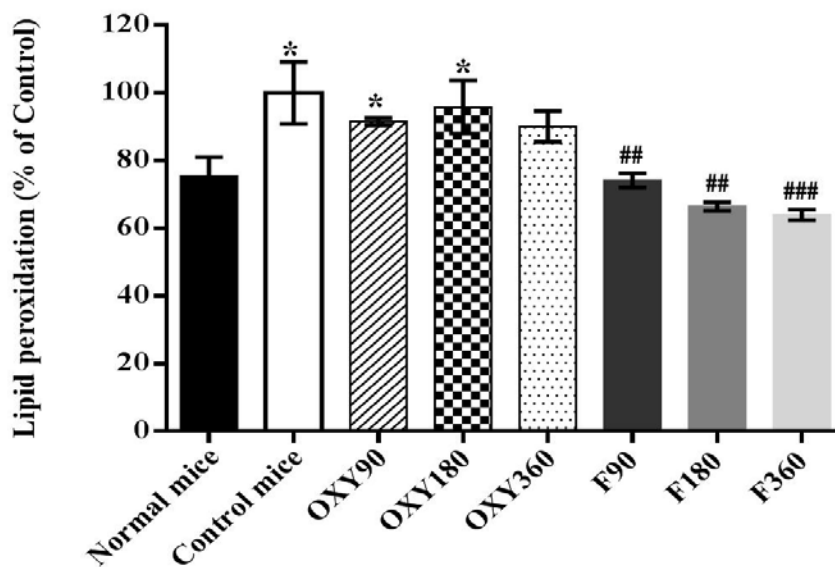


**รูปที่ 3.6** การติดตามพฤติกรรมเคลื่อนที่ของหนูเมาส์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเพปไทด์ Amyloid- $\beta_{25-35}$  ระหว่างการทดสอบโดยปราศจากแท่นวัตถุ (probe test) โดยการว่ายน้ำอย่างอิสระเป็นเวลา 60 วินาทีด้วยวิธี Morris water-maze หลังจากการบริหารออกซิเรสเวอราทรอลทางปาก ในรูปแบบสูตรตำรับ SMEDDS (F) ที่ขนาดยาต่างๆ สามระดับ คือ 90, 180, 360 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับออกซิเรสเวอราทรอลเดี่ยว (OXY) ที่ขนาดยาเท่ากัน หนูกลุ่มควบคุมและหนูกลุ่มปกติ

#### 5.2.4 การทดสอบการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (lipid peroxidation)

การป้องกันความเสื่อมของระบบประสาทของออกซิเรสเวอราทรอลถูกทดสอบในเชิงการตอบสนองต่อความเครียดในการเกิดออกซิเดชัน ซึ่งเหนี่ยวนำโดยเพปไทด์ Amyloid- $\beta_{25-35}$  (รูปที่ 3.7) การศึกษาพบว่าหลังจาก 7 วันของการฉีดเพปไทด์ Amyloid- $\beta_{25-35}$  เข้าสู่โพรงสมอง มีการเพิ่มระดับของการเกิดออกซิเดชันของไขมันในฮิปโปแคมปัสของหนูเมาส์อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับฮิปโปแคมปัสของหนูเมาส์ปกติ ( $\sim 25\%$ ;  $p < 0.05$ ) และการให้สารแขวนตะกอนของออกซิเรสเวอราทรอล ในขนาดยาทั้งสามระดับ (OXY90, OXY180, OXY360) โดยการรับประทาน ไม่สามารถลดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในฮิปโปแคมปัสในหนูเมาส์ซึ่งถูกเหนี่ยวนำโดยเพปไทด์ Amyloid- $\beta_{25-35}$  ได้ แต่ในขณะที่การให้ออกซิเรสเวอราทรอลในรูปแบบ SMEDDS ช่วยลดการเกิดออกซิเดชันของไขมันในฮิปโปแคมปัสของหนูเมาส์ลงเป็น 74% ( $p < 0.01$ ),

66% ( $p < 0.01$ ) และ 64% ( $p < 0.005$ ) สำหรับขนาดยาต่ำ (F90), กลาง (F180) และ สูง (F360) ตามลำดับ เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม จากผลการลดระดับการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในฮิปโปแคมปัสของหนูเมาส์ แสดงถึงประสิทธิภาพของออกซิเรสเวอราทรอลในรูปแบบ SMEDDS ในการป้องกันความเครียดในการเกิดออกซิเดชันซึ่งเหนี่ยวนำโดยเพปไทด์ Amyloid- $\beta_{25-35}$  ซึ่งผลนี้สอดคล้องกับศักยภาพในการป้องกันความผิดปกติในพฤติกรรมการเรียนรู้และจดจำในสัตว์ทดลองของ SMEDDS ที่มีออกซิเรสเวอราทรอล ดังนั้นการเพิ่มประสิทธิภาพของออกซิเรสเวอราทรอลโดยระบบ SMEDDS อาจจะมาจากการเพิ่มระดับออกซิเรสเวอราทรอลในพลาสมา ส่งผลให้มีระดับยามากขึ้นในยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน ซึ่งทำให้สามารถป้องกันการทำลายเนื้อเยื่อสมองในโรคอัลไซเมอร์ได้



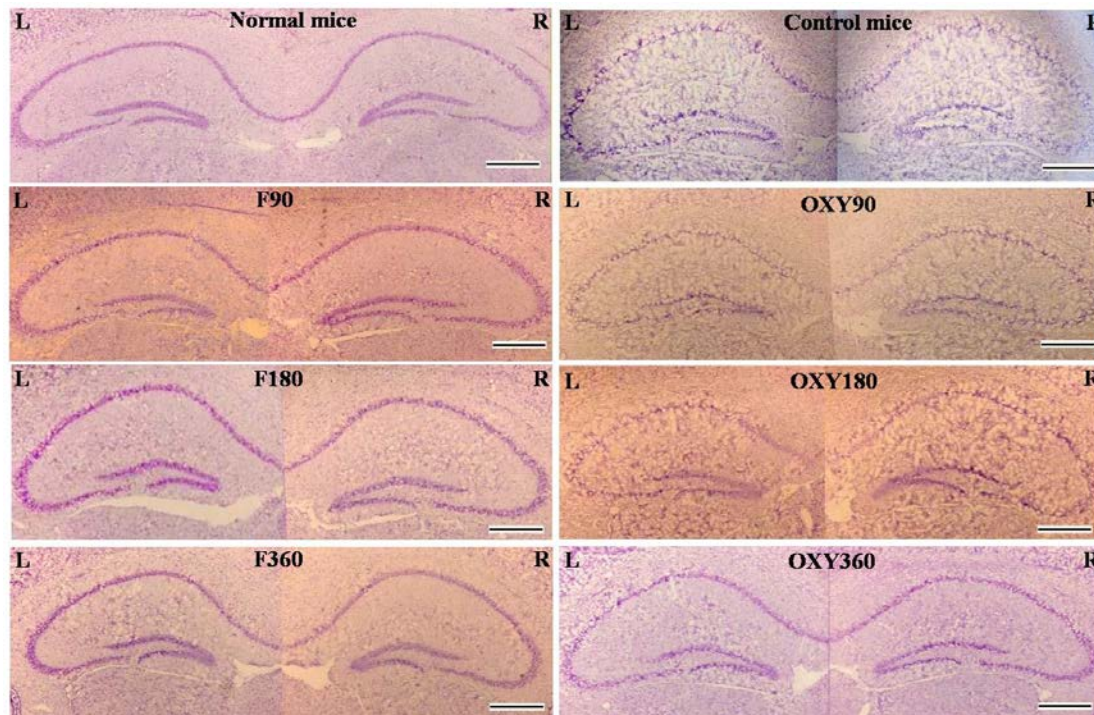
**รูปที่ 3.7** ระดับการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (lipid peroxidation) ในฮิปโปแคมปัสของหนูเมาส์ จากการทดสอบโดยวิธี ferrous (III)-xylene orange (FOX) ซึ่ง % การเกิดออกซิเดชันของไขมันของหนูเมาส์แต่ละกลุ่มถูกแสดงเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม (% of Control) หลังจากการบริหารออกซิเรสเวอราทรอลทางปาก ในรูปแบบสูตรตำรับ SMEDDS (F) ที่ขนาดยาต่างๆ สามระดับ คือ 90, 180, 360 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับออกซิเรสเวอราทรอลเดี่ยว ที่ขนาดยาเท่ากัน และหนูกลุ่มปกติ ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ยของ % of Control  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (SEM) กลุ่มละ 5 ตัว

\* $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มปกติ

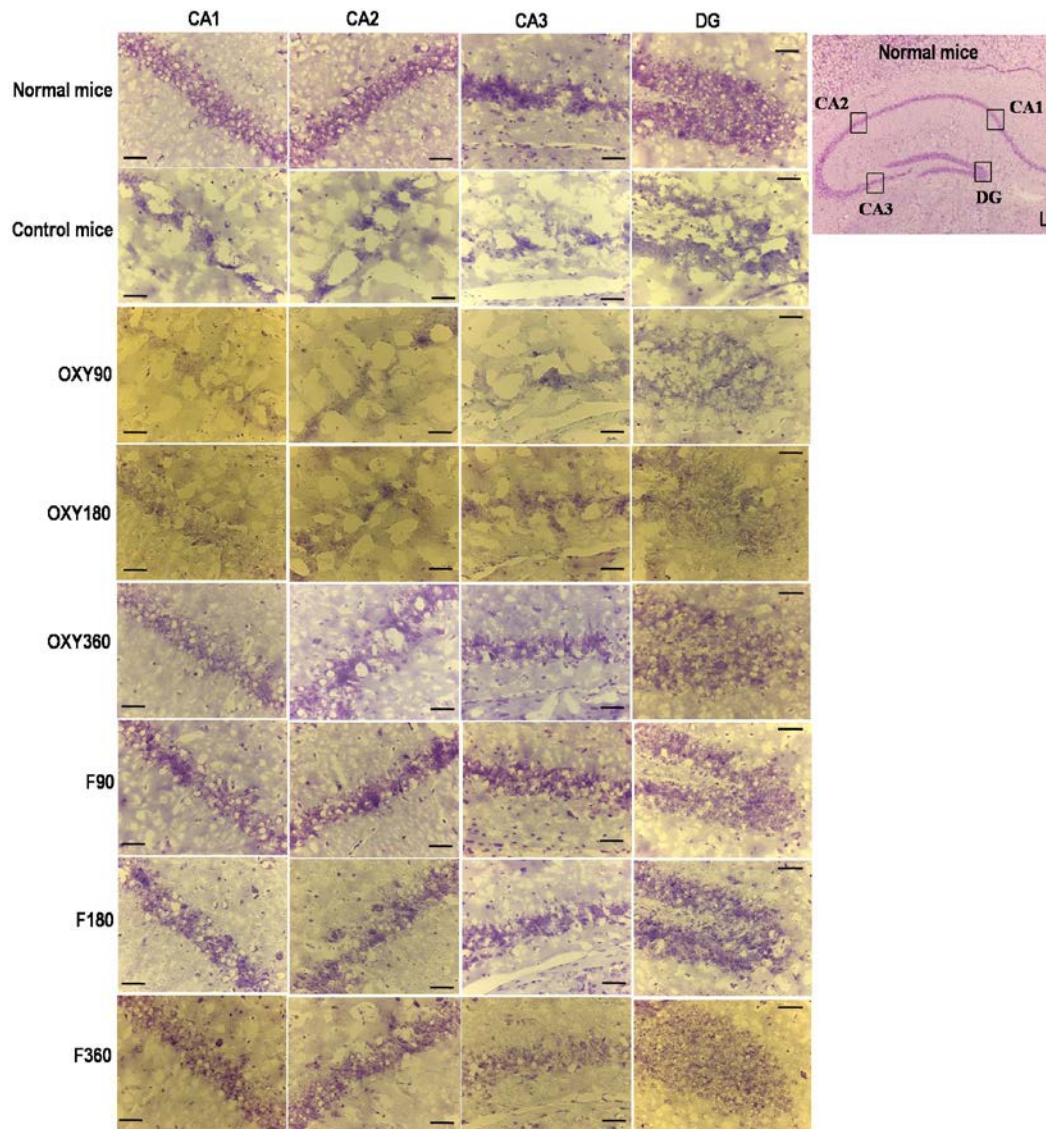
### $p < 0.01$ , #### $p < 0.005$  เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม

### 5.2.5 การวิเคราะห์ทางจุลกายวิภาคเนื้อเยื่อของสมอง (histological analysis)

การเปลี่ยนแปลงในลักษณะจุลกายวิภาคเนื้อเยื่อของสมอง (รูปที่ 3.8) และการสูญหายของเซลล์ประสาทในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส (รูปที่ 3.9) ในหนูเมาส์แต่ละกลุ่ม ถูกวิเคราะห์ด้วยการย้อมด้วย cresyl violet



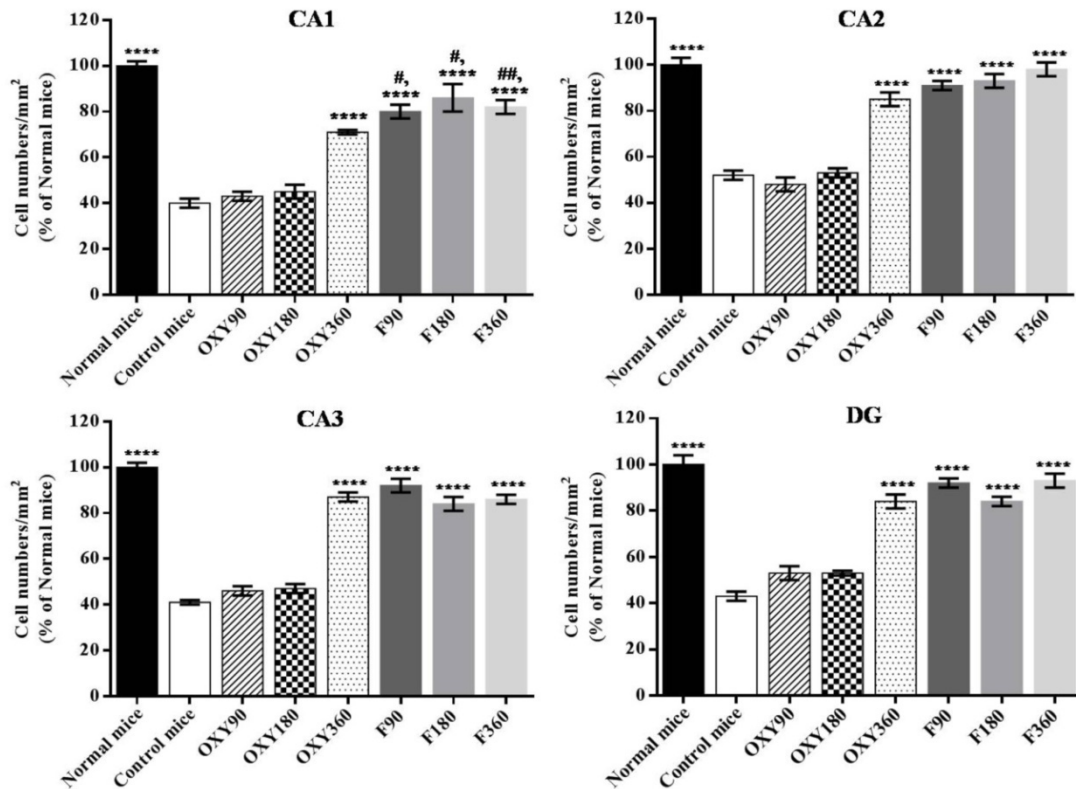
รูปที่ 3.8 ภาพถ่ายลักษณะเนื้อเยื่อของฮิปโปแคมปัสในแนวระนาบหน้าหลัง (coronal section) ที่ย้อมด้วย cresyl violet ในหนูเมาส์กลุ่มต่างๆที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเพปไทด์ Amyloid- $\beta_{25-35}$  และบริหารออกซิเรสเวอราทอรอลทางปากในรูปแบบสูตรตำรับ SMEDDS (F) ที่ขนาดยาต่างๆ สามระดับ คือ 90, 180, 360 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับออกซิเรสเวอราทอรอลเดี่ยว ที่ขนาดยาเท่ากัน และหนูเมาส์ที่ไม่ได้รับสารตัวอย่าง คือ กลุ่มควบคุม และกลุ่มปกติ โดยที่สเกลบาร์ในภาพเป็น 500 ไมโครเมตรที่กำลังขยาย 4 เท่า



รูปที่ 3.9 ภาพถ่ายลักษณะทางจุลกายวิภาคเนื้อเยื่อของฮิปโปแคมปัสซีกซ้ายในส่วน CA1, CA2, CA3 และ DG ซึ่งย้อมด้วย cresyl violet ในหนูเมาส์กลุ่มต่างๆที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเพปไทด์ Amyloid- $\beta_{25-35}$  และบริหารออกซิเรสเวราทรอลทางปากในรูปแบบสูตรตำรับ SMEDDS (F) ที่ขนาดยาต่างๆ สามระดับ คือ 90, 180, 360 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับออกซิเรสเวราทรอลเดี่ยว ที่ขนาดยาเท่ากัน และหนูเมาส์ที่ไม่ได้รับสารตัวอย่าง คือ กลุ่มควบคุม และกลุ่มปกติ โดยที่สเกลบาร์ ในภาพเป็น 50 ไมโครเมตรที่กำลังขยาย 40 เท่า

ในรูปที่ 3.10 แสดงให้เห็นเซลล์ที่ย้อมติดสี cresyl violet ในฮิปโปแคมปัสส่วนต่างๆ ของหนูกลุ่มควบคุม คิดเป็น  $40 \pm 2\%$ ,  $52 \pm 2\%$ ,  $41 \pm 1\%$  และ  $43 \pm 2\%$  สำหรับ CA1, CA2, CA3 และ DG ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มปกติ ซึ่งบ่งบอกถึงการลดลงของเซลล์ประสาทอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.0001$ ) ในฮิปโปแคมปัสทุกส่วน ของหนูเมาส์ที่ถูกเหนี่ยวนำโดยเพปไทด์ Amyloid- $\beta_{25-35}$  โดยที่ไม่ได้รับสารตัวอย่าง และเช่นเดียวกันกับหนูเมาส์ที่ได้รับสารแวนตะกอนของออกซิเรสเวราทรอลขนาด 90-180 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (OXY90 และ OXY180) มีการลดลงของเซลล์ประสาทสมองอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.0001$ ) ในทุกส่วนของ

ฮิปโปแคมปัสเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มปกติ แต่อย่างไรก็ตามหนูเมาส์ที่ได้รับสารแวนตะกอนของออกซิเรสเวอราทอรอลขนาดสูง (OXY360) ยังมีลักษณะเนื้อเยื่อของสมองส่วนฮิปโปแคมปัสที่สมบูรณ์ (รูปที่ 3.8) ถึงแม้จะมีการสูญหายของเซลล์ติดสีในฮิปโปแคมปัสบ้างเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มปกติ ซึ่งคิดเป็น 71%, 85%, 87% และ 84% ในฮิปโปแคมปัสส่วน CA1, CA2, CA3 และ DG ตามลำดับ (รูปที่ 3.10) แต่อย่างไร % เซลล์ประสาทเหล่านี้สูงกว่าที่พบในหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.0001$ ) ดังนั้นการให้ออกซิเรสเวอราทอรอลขนาดน้อยกว่า 360 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมโดยการรับประทาน ไม่มีประสิทธิภาพในการป้องกันอาการเสื่อมของประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำโดยเพปไทด์ Amyloid- $\beta_{25-35}$  ในหนูเมาส์ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการที่ออกซิเรสเวอราทอรอลมีค่าชีวปริมาณที่ต่ำและมีขั้วสูง จึงทำให้ไม่สามารถซึมผ่านตัวกรองกั้นระหว่างเลือดและสมอง (blood brain barrier) ซึ่งมีไขมันเป็นส่วนประกอบได้ ทำให้จำกัดการออกฤทธิ์ในการปกป้องระบบประสาทของสมอง (Breuer et al., 2006; Sangsen et al., 2016) ในทางตรงกันข้าม หนูเมาส์ที่ได้รับสูตรตำรับ SMEDDS ของออกซิเรสเวอราทอรอลที่ขนาดยา 90-360 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (F90, F180 และ F360) แสดงลักษณะของเนื้อเยื่อของฮิปโปแคมปัสที่ดีกว่ากลุ่มที่ได้รับออกซิเรสเวอราทอรอลเดี่ยว (OXY90 และ OXY180) และหนูกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ปริมาณเซลล์ติดสีในทุกส่วนของฮิปโปแคมปัสของหนูทั้งสามกลุ่มดังกล่าว (F90, F180 และ F360) สูงกว่า 80% เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มปกติ ดังนั้นการใช้สูตรตำรับไขมันระดับนาโนนี้ (SMEDDS) สามารถช่วยลดขนาดยาของออกซิเรสเวอราทอรอลในการป้องกันการสูญหายของเซลล์ประสาทในฮิปโปแคมปัสได้ถึง 4 เท่า การค้นพบนี้ยืนยันการเพิ่มความสามารถในการป้องกันระบบประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดพิษด้วยเพปไทด์ Amyloid- $\beta_{25-35}$  ของออกซิเรสเวอราทอรอลโดยระบบ SMEDDS ซึ่งอาศัยผลในการเพิ่มระดับยาในเลือด โดยการห่อหุ้มยาในหยดไขมัน ทำให้เพิ่มการดูดซึมและยับยั้งกลไกการปั๊มยากลับในลำไส้ และเพิ่มการผ่านเข้าสู่สมองได้ด้วยคุณสมบัติที่เป็นระบบไขมัน ส่งผลให้นำส่งยาไปยังตำแหน่งออกฤทธิ์ที่สมองได้ (Masserini, 2013; Sangsen et al., 2016)



รูปที่ 3.10 ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ประสาทในฮิปโปแคมปัสทั้งสองซีกต่อพื้นที่ (ตารางมิลลิเมตร) ของหนูเมาส์กลุ่มต่างๆที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเพปไทด์ Amyloid- $\beta_{25-35}$  และบริหารออกซิเรสเวราทรอลโดยการรับประทานในรูปแบบสูตรตำรับ SMEDDS และสารแขวนตะกอนที่ขนาดยาต่างๆ สามระดับคือ 90, 180, 360 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เปรียบเทียบกับหนูเมาส์ที่ไม่ได้รับสารตัวอย่างคือ กลุ่มควบคุม และกลุ่มปกติ ผลการทดลองแสดงเป็น % เปรียบเทียบกับหนูกลุ่มปกติ (% of Normal mice)  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (SEM) ( $n \geq 5$  ต่อกลุ่ม)

# $p < 0.05$  และ ## $p < 0.01$  เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับสารแขวนตะกอนของออกซิเรสเวราทรอลขนาดสูง (OXY360)

\*\*\* $p < 0.0001$  เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม

## 6. สรุปผลการทดลอง

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าในการทดลองในหนูเมาส์ ออกซิเรสเวราทรอลขนาด 360 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถบรรเทาความผิดปกติของการเรียนรู้และการจดจำ รวมถึงการสูญเสียของเซลล์ประสาทในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส ซึ่งเป็นสถานะที่เหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นโดยการฉีดเพปไทด์ Amyloid- $\beta_{25-35}$  เข้าทางโพรงสมอง นอกจากนี้ยังพบว่าออกซิเรสเวราทรอลช่วยลดความผิดปกติของลักษณะทางจุลกายวิภาคเนื้อเยื่อของฮิปโปแคมปัส โดยมีกลไกที่เกี่ยวข้องกับการลดหรือป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน ผลการทดลองชี้ว่าเราสามารถลดขนาดของออกซิเรสเวราทรอลลง 4 เท่า เป็น 90 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยใช้ระบบนำส่งในรูปแบบ SMEDDS การศึกษานี้จึงแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของระบบ SMEDDS ในการนำมาใช้เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพในการป้องกันโรคอัลไซเมอร์ของออกซิเรสเวราทรอลเมื่อให้โดยการรับประทาน

## เอกสารอ้างอิง

- Breuer C, Wolf G, Andrabi SA, Lorenz P, Horn, TFW. Blood-brain barrier permeability to the neuroprotectant oxyresveratrol. *Neurosci. Lett.* 2006; 393: 113–118.
- Delobette S, Privat A, Maurice T. *In vitro* aggregation facilitates  $\beta$ -amyloid peptide-(25–35)-induced amnesia in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 1997; 319: 1-4.
- Gursoy RN, Benita S. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral bioavailability of lipophilic drugs. *Biomed. Pharmacother.* 2004; 58: 173–182.
- Laursen SE, Belknap J. Intracerebroventricular injections in mice: some methodological refinements. *J. Pharmacol. Methods.* 1986;16: 355-357.
- Masserini M. Nanoparticles for brain drug delivery, *ISRN biochemistry.* 2013; Article ID 238428, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/238428> 1-18.
- Maurice T, Lockhart B, Privat A, Amnesia induced in mice by centrally administered  $\beta$ -amyloid peptides involves cholinergic dysfunction. *Brain Res.* 1996; 706: 181-193.
- Sangsen Y, Wiwattanawongsa K, Likhitwitayawuid K, Sritularak B, Graidist P, Wiwattanapatapee R. Influence of surfactants in self-microemulsifying formulations on enhancing oral bioavailability of oxyresveratrol: Studies in Caco-2 cells and *in vivo*. *Int. J. Pharm.* 2016; 498: 294-303.
- Singh AK, Chaurasiya A, Awasthi A, Mishra G, Asati D, Khar RK, Mukherjee R. Oral bioavailability enhancement of exemestane from self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS). *AAPS PharmSciTech.* 2009; 10: 906–916.
- Wanakhachornkrai O. Effects of *N*-(2-propylpentanoyl) urea on impairment of learning memory and neuronal cell death after bilateral common carotid arteries occlusion in mice. Master's Degree Thesis. Bangkok: Chulalongkorn University; 2006.
- Zussy C, Bureau A, Delair B, Marchal S, Keller E, Ixart G, Naert G, Meunier J, Chevallier N, Maurice T, Givalois L. Time-course and regional analyses of the physiopathological changes induced after cerebral injection of an amyloid  $\beta$  fragment in rats, *Am. J. Pathol.* 2011; 179: 315-334.

## บทที่ 4

### บทสรุปแผนงานวิจัย

แผนงานวิจัย (research program) เรื่อง “ออกซิเรสเวราทรอล : การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณในผลิตภัณฑ์สมุนไพรและการศึกษาฤทธิ์ต้านการเสื่อมของระบบประสาท (Oxyresveratrol: its quantitative determination in herbal products and study for anti-neurodegenerative activity)” มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาโดยทำการทดลอง เพื่อให้ได้ข้อมูลและวิธีการทางวิทยาศาสตร์ที่เหมาะสมที่จะนำไปสนับสนุนการพัฒนาสารออกซิเรสเวราทรอลหรือพืชสมุนไพรที่เกี่ยวข้อง เพื่อนำไปใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพ แผนงานวิจัยนี้มีลักษณะเป็นชุดโครงการ ประกอบด้วยโครงการวิจัยย่อย 2 โครงการได้แก่ (1) โครงการเรื่อง “การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่ใช้เทคนิคอีไลซาในการตรวจวัดปริมาณสารออกซิเรสเวราทรอล (Development of enzyme-linked immunosorbent assay for quantitative determination of oxyresveratrol)” และ (2) โครงการเรื่อง “การศึกษาออกซิเรสเวราทรอลในการลดอาการเสื่อมของระบบประสาทในโรคอัลไซเมอร์ (Study of oxyresveratrol for the ability to ameliorate neuro-degenerative processes in Alzheimer’s disease)”

โครงการแรก มีจุดมุ่งหมายที่จะพัฒนาวิธีวิเคราะห์ออกซิเรสเวราทรอลโดยใช้เทคนิคอีไลซา (ELISA) เริ่มจากการเตรียมสารคอนจูเกตโดยการนำโมเลกุลของออกซิเรสเวราทรอลมาเชื่อมต่อกับโปรตีนด้วยปฏิกิริยา 3 ปฏิกิริยา คือ carbodiimidation periodate oxidation และ Maanich reaction ได้เป็นสาร อิมมูโนเจน (immunogen) จำนวน 3 ชนิดได้แก่ OXA-cBSA, MuA-BSA และ OXY-cBSA ตามลำดับ เมื่อนำ OXA-cBSA มาฉีดเข้ากระต่ายขาวนิวซีแลนด์เพื่อกระตุ้นให้สร้างพอลิโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody) พบว่าแอนติบอดีที่ได้มีความจำเพาะต่อออกซิเรสเวราทรอล เมื่อนำมาทดสอบวิเคราะห์ปริมาณออกซิเรสเวราทรอลในแก่นต้นมะหาดและปวกหาด ด้วยวิธี indirect competitive ELISA พบว่ามีค่าการวัดเป็นเส้นตรง (linear measurement) ในช่วง 1.12-2.12 mg/ml มีความ (accuracy) แม่นยำและความเที่ยงตรง (precision) ในเกณฑ์ที่ยอมรับ คือมีค่าpercentage of recovery ในช่วง 98 – 102 และ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ต่ำกว่าร้อยละ 10 แต่มีความไว (sensitivity) ในการตรวจวัดสารออกซิเรสเวราทรอลเพียงต่ำกว่าวิธี high performance liquid chromatography (HPLC) มากถึง 1,000 เท่า ต่อมาจึงนำสารอิมมูโนเจน 3 ชนิดข้างต้นมา แต่ละชนิดมาฉีดเข้าหนูเพื่อสร้างมอนอโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) โดยเทคนิคไฮบริโดมา พบว่ามอนอแอนติบอดีที่ได้จาก OXA-cBSA มีความจำเพาะต่อออกซิเรสเวราทรอลสูง แต่เซลล์ไฮบริโดมาไม่สามารถผลิตแอนติบอดีในปริมาณสูง วิธีนี้จึงไม่อาจนำไปใช้ผลิตแอนติบอดีเพื่อศึกษาต่อได้ โมโนแอนติบอดีที่ได้จาก MuA-BSA พบว่าไม่มีความสามารถรับรู้ออกซิเรสเวราทรอล ส่วนมอนอแอนติบอดีจาก OXY-cBSA นั้นตรวจพบว่าอยู่ในกลุ่ม IgM มี light chain แบบ Kappa เมื่อนำมาใช้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารออกซิเรสเวราทรอลในตัวอย่าง พบว่าวิธีนี้มีค่าการวัดเป็นเส้นตรงในช่วง 63 - 500 ng/ml วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีค่าความเที่ยงภายในเพลท (intra-plate) และระหว่างเพลท (inter-plate) โดยมีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ไม่เกิน 10% ในทุกความเข้มข้นของสารมาตรฐาน และมีความแม่นยำในการวิเคราะห์ อยู่ในช่วง 95.93-103.55% มีความไวในการตรวจวัดออกซิเรสเวราทรอลคิดเป็น 16 เท่าของวิธี HPLC จากการทดสอบความจำเพาะ พบว่าแอนติบอดีที่ได้มีความจำเพาะค่อนข้างสูง ไม่แสดงปฏิกิริยาจับกับ

สารโพลีฟีนอลอื่นๆ ที่มีโครงสร้างใกล้เคียงเช่นสารกลุ่มฟลาวานอยด์ และสารกลุ่มสติลบิน ยกเว้นเรสเวอร่าทรอลซึ่งมีค่าการจับคิดเป็นร้อยละ 89.92 ทั้งนี้คาดว่าป็นผลจากโครงสร้างของออกซิเรสเวอร่าทรอลและเรสเวอร่าทรอลที่มีความใกล้เคียงกันมาก ดังนั้นแอนติบอดีที่เตรียมได้จาก OXY-cBSA จึงเหมาะสมที่จะนำไปใช้ตรวจวัดปริมาณออกซิเรสเวอร่าทรอลในตัวอย่างที่ไม่มี หรือมีสารเรสเวอร่าทรอลในปริมาณที่น้อยมากเช่นแก่นต้นมะหาด ปวกหาด หรือผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่ไม่มีเรสเวอร่าทรอลเป็นส่วนประกอบ นอกจากนี้ยังอาจนำแอนติบอดีนี้ไปใช้เป็นเครื่องมือสำหรับศึกษาการกระจายตัวของสารออกซิเรสเวอร่าทรอลในสัตว์ทดลอง ในกรณีที่ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์หาปริมาณออกซิเรสเวอร่าทรอล มีเรสเวอร่าทรอลปนอยู่ในปริมาณสูง ค่าที่วัดได้จะเป็นผลรวมของสารทั้งสอง

โครงการที่สองเป็นการศึกษาในสัตว์ทดลองถึงฤทธิ์ของออกซิเรสเวอร่าทรอลในการป้องกันพิษของเบตาอะมิลลอยด์ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพของโรคอัลไซเมอร์ การทดลองใช้แบบจำลองสรวงกตมอร์ริส โดยใช้หนูไอซัวร์ ซึ่งแบ่งออกเป็น 8 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว กลุ่มแรกเป็นกลุ่มปกติ สัตว์ทดลองไม่ได้รับทั้งสารเบตาอะมิลลอยด์และยา (ออกซิเรสเวอร่าทรอล) กลุ่มที่สองเป็นกลุ่มควบคุม คือหนูได้รับสารเบตาอะมิลลอยด์แต่ไม่ได้รับยา กลุ่มที่ 3 – 5 เป็นกลุ่มที่ได้รับสารออกซิเรสเวอร่าทรอลทางปากในรูปของยาแขวนตะกอนในน้ำวันละครั้งในขนาด 90, 180 และ 360 มก/กก ตามลำดับ เป็นเวลา 7 วัน ส่วนกลุ่มที่ 6 – 8 เป็นกลุ่มที่ได้รับสารออกซิเรสเวอร่าทรอลทางปากในรูปสูตรตำรับเฮ้สเอ็มอีดีดีเอ้ส วันละครั้งในขนาด 90, 180 และ 360 มก/กก ตามลำดับ เป็นเวลา 7 วัน ทำการฉีดเบตาอะมิลลอยด์ซึ่งเป็นสารพิษเข้าที่โพรงสมองของหนูในกลุ่มที่ 2 – 8 แล้วให้/ไม่ให้ยาในรูปแบบเดิมต่อไปอีกเป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นนำสัตว์ทดลองมาฝึกค้นหาแท่นพักที่ซ่อนไว้เป็นเวลา 5 วัน ทำการทดสอบความจำและการเรียนรู้ของสัตว์ โดยสังเกตพฤติกรรมและบันทึกเวลาที่หนูใช้ในการหาแท่นพัก เมื่อสิ้นสุดการทดลอง นำสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของสัตว์ทดลองไปวิเคราะห์ปริมาณปฏิกิริยาไลปิดเพอร์ออกซิเดชันที่เกิดขึ้น และตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ ผลการทดลองแสดงว่าออกซิเรสเวอร่าทรอลที่อยู่ในรูปยาแขวนตะกอน ในขนาด 90 และ 180 มก/กก ไม่สามารถปกป้องกันเซลล์สมองจากสารพิษได้ แต่เมื่อเพิ่มขนาดเป็น 360 มก/กก สามารถแสดงฤทธิ์ปกป้องระบบประสาทของสัตว์ทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับยา ( $p < 0.5$ ) โดยมีฤทธิ์ใกล้เคียงกับออกซิเรสเวอร่าทรอลในสูตรตำรับเฮ้สเอ็มอีดีดีเอ้สในขนาด 90 มก/กก นอกจากนี้พบฤทธิ์ปกป้องที่สูงขึ้น ( $p < 0.0001$ ) ในออกซิเรสเวอร่าทรอลในสูตรตำรับขนาด 180 และ 360 มก/กก ผลการตรวจวัดปฏิกิริยาไลปิดเพอร์ออกซิเดชันในเนื้อเยื่อฮิปโปแคมปัสซึ่งพบว่าออกซิเรสเวอร่าทรอลในรูปแบบยาแขวนตะกอนทั้ง 3 ขนาด ไม่สามารถแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ในทางกลับกันออกซิเรสเวอร่าทรอลที่อยู่ในสูตรตำรับในทุกขนาดสามารถลดปฏิกิริยาเพอร์ออกซิเดชันของไขมันได้จนเหลือเป็นร้อยละ 64 – 74 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $p < 0.01 - p < 0.005$ ) เมื่อตรวจเนื้อเยื่อฮิปโปแคมปัสพบว่าออกซิเรสเวอร่าทรอลที่อยู่ในรูปยาแขวนตะกอนในขนาด 90 และ 180 มก/กก ไม่สามารถลดการตายของเซลล์ประสาท แต่ในขนาด 360 มก/กก สามารถลดการตายของเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $p < 0.0001$ ) ส่วนออกซิเรสเวอร่าทรอลในสูตรตำรับทุกขนาดสามารถปกป้องกันเซลล์จากสารพิษได้อย่างมีนัยสำคัญเช่นเดียวกัน ( $p < 0.0001$ ) ผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าออกซิเรสเวอร่าทรอลมีฤทธิ์ป้องกันเซลล์ประสาทเสื่อมจากโรคอัลไซเมอร์ได้ และเราสามารถทำให้ฤทธิ์นี้สูงขึ้นได้ โดยการเตรียมสารให้อยู่ในสูตรตำรับเฮ้สเอ็มอีดีดีเอ้ส ฤทธิ์ที่สูงขึ้นนี้คาดว่าป็นผลที่เกิดจากการเพิ่มชีวปริมาณหรือความสามารถในการซึมผ่านจากเลือดเข้าสู่สมองของออกซิเรสเวอร่าทรอล

สรุปผลการวิจัยจากแผนงานวิจัยนี้ได้ว่า (1) ได้วิธีวิเคราะห์ปริมาณสารออกซิเรสเวราทรอลด้วยเทคนิคอิลูซาโดยใช้มอโนโคลนอลแอนติบอดี วิธีนี้มีข้อจำกัดเนื่องจากนำไปประยุกต์ใช้ได้กับตัวอย่างที่ไม่มีเรสเวราทรอลหรือมีเรสเวราทรอลในปริมาณที่น้อยมาก อย่างไรก็ตามสามารถนำไปประยุกต์ใช้ตรวจวัดปริมาณoxyresveratrol ในอวัยวะภายในของสัตว์ทดลอง (2) ได้ข้อมูลที่แสดงให้เห็นว่าออกซิเรสเวราทรอลสามารถป้องกันพิษ  $\beta$ -amyloid ในหนูทดลองได้ ซึ่งบ่งชี้ศักยภาพของสารออกซิเรสเวราทรอลในการป้องกันโรคอัลไซเมอร์

## ประวัตินักวิจัย

### ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย

- ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นายกิตติศักดิ์ ลิขิตวิทายาวุฒิ  
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Kittisak Likhitwitayawuid
- เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3101500418432
- ตำแหน่งปัจจุบัน ศาสตราจารย์
- หน่วยงาน ภาควิชาเภสัชเวชและเภสัชพฤกษศาสตร์  
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
โทรศัพท์: 02-21888360  
E-mail: Kittisak.L@chula.ac.th
- ประวัติการศึกษา  
ปริญญาตรี เภสัชศาสตร์ (เกียรตินิยมอันดับ 1) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ. 2524  
ปริญญาโท Natural Products Chemistry Chiba University พ.ศ. 2529  
ปริญญาเอก Pharmacognosy University of Illinois at Chicago พ.ศ. 2535

### หัวหน้าโครงการวิจัยที่ 1

- ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาววราภรณ์ ภูตะลุน  
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Waraporn Putalun
- เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3409901146853
- ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์
- หน่วยงาน คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น  
โทรศัพท์ 043-202378. 043-362093 โทรสาร 043-202379  
E-mail: waraporn@kku.ac.th, waraporn6@yahoo.com
- ประวัติการศึกษา  
ปริญญาตรี เภสัชศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับ 2) มหาวิทยาลัยขอนแก่น พ.ศ. 2534  
ปริญญาโท เภสัชศาสตรมหาบัณฑิต (เภสัชเวช) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ. 2536  
ปริญญาเอก Pharmaceutical Sciences Kyushu University พ.ศ. 2544

### หัวหน้าโครงการวิจัยที่ 2

- ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางฤดีกร วิวัฒน์ปฐพี  
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mrs. Ruedeekorn Wiwattanapatapee
- เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3909800027269
- ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์
- หน่วยงาน ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม  
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

โทรศัพท์ 074-288915 โทรสาร 074-428148

E-mail: ruedeekorn.w@psu.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

ปริญญาตรี	เภสัชศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับ 1)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	พ.ศ. 2530
ปริญญาโท	เภสัชศาสตรมหาบัณฑิต (เภสัชอุตสาหกรรม)	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	พ.ศ. 2532
ปริญญาเอก	Pharmaceutics	University of London	พ.ศ. 2542

**ผู้ร่วมวิจัย (1)**

- ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นายบุญชู ศรีตุลารักษ์  
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Boonchoo Sritularak
- เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3839900268081
- ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์
- หน่วยงาน ภาควิชาเภสัชเวชและเภสัชพฤกษศาสตร์  
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
โทรศัพท์: 02-21888356, 081-8547016  
E-mail: Boonchoo.Sr@chula.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

ปริญญาตรี	เภสัชศาสตร์	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	พ.ศ. 2539
ปริญญาโท	เภสัชเวช	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	พ.ศ. 2542
ปริญญาเอก	เภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	พ.ศ. 2546

**ผู้ร่วมวิจัย (2)**

- ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นายธงชัย สุขเสวต  
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Thongchai Sooksawate
- เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3100902691566
- ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์
- หน่วยงาน ภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยา  
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
โทรศัพท์: 02-2188342  
E-mail: sthongch@chula.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

ปริญญาตรี	เภสัชศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับ 2)	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	พ.ศ. 2531
ปริญญาโท	เภสัชศาสตรมหาบัณฑิต (เภสัชเวช)	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	พ.ศ. 2538
ปริญญาเอก	Pharmacology	University of London	พ.ศ. 2542

### ผู้ร่วมวิจัย (3)

- ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นายพูนศักดิ์ พลอยประดิษฐ์  
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Poonsakdi Ploypradith
- เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3100502817350
- ตำแหน่งปัจจุบัน
- หน่วยงาน ห้องปฏิบัติการเภสัชเคมี  
สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์  
โทรศัพท์: 02-553-8555 ต่อ 8964  
E-mail: poonsakdi@cri.or.th
- ประวัติการศึกษา

ปริญญาตรี	Chemistry	The Johns Hopkins University	พ.ศ. 2537
ปริญญาโท	Organic Chemistry	The Johns Hopkins University	พ.ศ. 2539
ปริญญาเอก	Organic Chemistry	The Johns Hopkins University	พ.ศ. 2542