



รายงานผลการวิจัย

เรื่อง การพัฒนาผลิตภัณฑ์ผงของสารสกัดสมุนไพรที่ห่อหุ้มด้วยอนุภาคนาโนไคโตซานเพื่อต้าน

ไวรัสก่อโรคในสัตว์เศรษฐกิจ : กรณีศึกษาไวรัสพีอาร์อาร์เอสในสุกร

Development of Powder Product of Herb Extract Cross-linked with Nanochitosan

Particles for Antiviral Purpose in Livestock Animal : a Case Study of Porcine

Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Swine

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย

ประจำปี 2561

จำนวน 230,100 บาท

หัวหน้าโครงการ

วติน เจริญตันชนกุล

ผู้ร่วมโครงการ

มธุรส ชัยหาญ และวิลาวรรณ เรือนสิทธิ์

รหัสโครงการ.....

คำนิยม

โครงการวิจัยเรื่อง การพัฒนาผลิตภัณฑ์ผงของสารสกัดสมุนไพรที่ห่อหุ้มด้วยอนุภาคนาโนไคโตซานเพื่อต้านไวรัสก่อโรคในสัตว์เศรษฐกิจ : กรณีศึกษาไวรัสพาร์อาร์เอสในสุกร (Development of Powder Product of Herb Extract Cross-linked with Nanochitosan Particles for Antiviral Purpose in Livestock Animal : a Case Study of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Swine) ได้ดำเนินการวิจัย โดยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปีงบประมาณ 2561 ผู้วิจัยขอขอบคุณ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัย

ผู้วิจัย

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยแม่โจ้	
B :	เลขเรียกหนังสือ
I :	
- 9 พ.ย. 2563	
วันที่	

สารบัญ

	หน้า
สารบัญภาพ	ข
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
คำนำ	3
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย	10
ผลการศึกษาวิจัย	13
วิจารณ์ผลการวิจัย	15
สรุปผลการวิจัย	18
เอกสารอ้างอิง	19
ภาคผนวก ก	27

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 อนุภาคของไคโตซานและอนุภาคสารสกัดพญายอที่ห่อหุ้มด้วยอนุภาคนาโนไคโตซาน	13
ภาพที่ 2 ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดพญายอที่ห่อหุ้มด้วยอนุภาคนาโนไคโตซานและไคโตซาน	14



การพัฒนาผลิตภัณฑ์ผงของสารสกัดสมุนไพรที่ห่อหุ้มด้วยอนุภาคนาโนไคโตซานเพื่อ
ต้านไวรัสก่อโรคในสัตว์เศรษฐกิจ : กรณีศึกษาไวรัสพอร์อาร์เอสในสุกร

Development of Powder Product of Herb Extract Cross-linked with Nanochitosan
Particles for Antiviral Purpose in Livestock Animal : a Case Study of Porcine
Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Swine

วสิน เจริญตันชนกุล มธุรส ชัยหาญ วิลาวรรณ เรือนสิทธิ์

Wasin Charerntantanakul, Mathurot Chaiharn and Wilawun Ruansit

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่ 50290

บทคัดย่อ

ไวรัสพอร์อาร์เอส (PRRSV) เป็นไวรัสที่สร้างความสูญเสียทางมูลค่าด้านการผลิตสุกร ซึ่งไวรัสมีการพัฒนาเปลี่ยนแปลงสารทางพันธุกรรม จึงทำให้มีความหลากหลายของสายพันธุ์ย่อย HP-PRRSV เป็นไวรัสพอร์อาร์เอสสายพันธุ์ก่อโรครุนแรง ซึ่งได้มีการศึกษาการยับยั้งไวรัสพอร์อาร์โดยใช้สารสกัดสมุนไพรพญาขอ พบว่าสามารถยับยั้งไวรัส HP-PRRSV ได้ ไคโตซานเป็นสารในกลุ่มโพลีแซคคาไรด์ที่เตรียมได้จากไคตินซึ่งมีคุณสมบัตินำส่งสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ดีขึ้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดพญาขอห่อหุ้มด้วยอนุภาคนาโนไคโตซานต่อการยับยั้งการเข้าสู่เซลล์และการแบ่งตัวของไวรัส HP-PRRSV ในเซลล์ MARC-145 โดยการเตรียมอนุภาคจากสารสกัดพญาขอที่สกัดด้วยเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ มาห่อหุ้มด้วยไคโตซานแล้วตรวจหาขนาดของอนุภาคด้วย SEM พบว่า ขนาดของสารสกัดพญาขอห่อหุ้มด้วยอนุภาคนาโนไคโตซานมีขนาดประมาณ 943 นาโนเมตร มีฤทธิ์ในการยับยั้งไวรัสพอร์อาร์เอสระยะหลังการติดเข้าสู่เซลล์ ลดปริมาณไวรัสที่ $4 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ หลังทำการเก็บรักษาอนุภาคสารสกัดพญาขอที่ห่อหุ้มด้วยไคโตซานยับยั้งไวรัสได้ที่ $3.25 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ สารสกัดพญาขอที่สกัดด้วยเอทานอล 50% มีสารประกอบที่มีลักษณะเป็นไขมัน การห่อหุ้มอนุภาคด้วยไคโตซานเพิ่มประสิทธิภาพในการละลายน้ำและการดูดซึม จึงมีความเป็นไปได้ในการใช้อนุภาคสารสกัดพญาขอที่ห่อหุ้มด้วยไคโตซานมาประยุกต์ใช้ในการยับยั้งไวรัสพอร์อาร์เอสในสุกร

คำสำคัญ : ไวรัสพอร์อาร์เอส อนุภาคนาโนไคโตซาน พญาขอ

Abstract

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) causes a worldwide loss in swine industry. PRRSV's distinct genetic characteristic is its rapid evolution resulting in the development of a new strain. Thus, the newly emerged highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus (HP-PRRSV) causes more severe infections and clinical symptoms. *Clinacanthus nutans* extract was reported to inhibit HP-PRRSV. On the other hand, chitosan is a natural occurring polysaccharide from chitin that helps transmembrane transportation. The objective of this research was to evaluate the efficacy of *C. nutans* extract encapsulated with chitosan in the inhibition of HP-PRRSV replication prior to and after HP-PRRSV infection in MARC-145 cells. Fifty percent ethanol extract of *C. nutans* was encapsulated with chitosan and particle size was measured by scanning electron microscope (SEM). The particle size of *C. nutans* encapsulated extract was about 943 nm. The effect of anti HP-PRRSV revealed that encapsulated *C. nutans* extract inhibited HP-PRRSV on post infection by decreased the viruses at 4 log₁₀ TCID₅₀/ml. Chitosan-encapsulated *C. nutans* extract was checked for its anti HP-PRRSV effect after 12 months and it showed that the virus was decreased to 3.25 log₁₀ TCID₅₀/ml. Fifty percent ethanol extract with lipid compound after encapsulated with chitosan may contribute to the increase of absorption. Therefore, *C. nutans* extract encapsulated with chitosan can be applied to inhibit the HP-PRRSV infected pigs.

Key words: PRRSV, nanochitosan, *C. nutans*

คำนำ

ไวรัสพอร์อาร์เอสสายพันธุ์รุนแรง (highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus; HP-PRRSV) ก่อปัญหาในสุกรโดยทำให้สุกรแม่พันธุ์ผสมติดยาก แท้ง มีลูกตาย แรกคลอดและกลับสัดซ้ำ และทำให้สุกรขุนโตช้า แคระแกร็น ติดเชื้อแทรกซ้อนอื่นๆสูง มีปัญหาทางระบบหายใจและตาย ปัจจุบันยังไม่มีวิธีการจัดการใดที่สามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัส HP-PRRSV ในสุกรได้อย่างมีประสิทธิภาพ และประเทศไทยยังไม่มี การขึ้นทะเบียนเวชภัณฑ์ของวัคซีน HP-PRRSV เพื่อใช้ในราชอาณาจักร แต่เกษตรกรมีการลักลอบใช้วัคซีนที่ผลิตจากประเทศจีนซึ่งให้ประสิทธิภาพในการคุ้มโรคไม่แน่นอน

การใช้ประโยชน์จากพืชสมุนไพรเพื่อยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสเป็นแนวทางการจัดการที่อาจช่วยลดความสูญเสียจากไวรัส HP-PRRSV ได้ ซึ่งคณะผู้วิจัยมีประสบการณ์และมีผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเรื่องนี้อยู่พอสมควร ในงานวิจัยนี้คณะผู้วิจัยจะผลิตผลิตภัณฑ์ผงแห้งที่ทำจากสารสกัดพญาขอ (*Clinacanthus nutans* (Burm.f.) Lindau) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านไวรัส HP-PRRSV ได้ดีที่สุดโดยสารสกัดพญาขอจะถูกห่อหุ้มอยู่ด้วยอนุภาคนาโนโคโคซานที่ผลิตขึ้นเองเพื่อนำส่งสารสำคัญของสารสกัดพญาขอเข้าสู่เซลล์ได้ดียิ่งขึ้น

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการควบคุมโรคพอร์อาร์เอสทั้งโดยตัวผลิตภัณฑ์เองหรือร่วมกับการจัดการโรคด้วยวิธีการอื่น และเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มของพืชสมุนไพรไทยด้วยต้นทุนการผลิตที่ไม่สูง รวมถึงมีโอกาสนำมาจำหน่ายในเชิงพาณิชย์

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมผงแห้งของสารสกัดพญาขอที่ห่อหุ้มด้วยอนุภาคนาโนไคโตซานที่ผลิตขึ้นเอง
2. เพื่อศึกษาคุณภาพทางชีวภาพของผงแห้งสารสกัดพญาขอที่ห่อหุ้มด้วยอนุภาคนาโนไคโตซานในห้องทดลอง (in vitro test)
3. เพื่อศึกษาลักษณะทางกายภาพของผงแห้งสารสกัดพญาขอที่ห่อหุ้มด้วยอนุภาคนาโนไคโตซาน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ผลิตภัณฑ์สารสกัดแห้งพญาขอที่ห่อหุ้มด้วยอนุภาคนาโนไคโตซานที่มีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัส HP-PRRSV
2. ขยายผลในการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์เพื่อการยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัส HP-PRRSV ในสุกร (in vivo test) ในการศึกษาขั้นต่อไป
3. มีโอกาสที่จะผลิตในเชิงพาณิชย์ และมีโอกาสทางการตลาดเพราะไม่มีผลิตภัณฑ์อื่นที่สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัส HP-PRRSV ได้ในปัจจุบัน
4. มีโอกาสที่จะใช้ยับยั้งไวรัสก่อโรคนิดอื่นของสุกร เช่น อหิวาต์สุกร และไวรัสก่อโรคของสัตว์เศรษฐกิจอื่นๆ
5. สร้างมูลค่าเพิ่มของพืชสมุนไพรไทย
6. นำองค์ความรู้จัดทำเอกสารเผยแพร่ จัดอบรมถ่ายทอดความรู้ให้แก่นักวิจัยทั้งภาครัฐและเอกชน เกษตรกรผู้เลี้ยงสุกรและผู้สนใจได้ทราบขั้นตอนและเทคโนโลยีการผลิตและการนำไปประยุกต์ใช้

การตรวจเอกสาร

ไวรัสพ็อร์อาร์เอสเป็นไวรัสในจีนัส (genus) Arterivirus แฟมิลี (family) Arteriviridae มีจีโนม (genome) เป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวแบบบวก (positive-sense single-stranded RNA) อนุภาคไวรัสมีเอนวิโลป (envelope) ล้อมรอบ (Amonsin et al., 2009) เชื้อไวรัสแบ่งตัวในเม็ดเลือดขาวประเภทมัยอีโตโมโนซัยติกเซลล์ (myelomonocytic cell) ได้แก่ โมโนซัยต์ (monocyte) แมคโครฟาจ (macrophage) และเดนดริติกเซลล์ (dendritic cell) ของสุกร (Charemtantanakul et al., 2006)

เชื้อไวรัสพ็อร์อาร์เอสแบ่งออกเป็น 2 สายพันธุ์หรือจีโนไทป์ (genotype) ตามลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ได้แก่ สายพันธุ์อเมริกาเหนือ (north America) และสายพันธุ์ยุโรป (Europe) ทั้งสองสายพันธุ์ก่อปัญหาในสุกรแม่พันธุ์โดยทำให้ผสมติดยาก แท้ง ลูกตายแรกคลอด และกลับสัดซ้ำ และในสุกรขุนโดยทำให้โตช้า แคระแกร็น มีอัตราการติดเชื้อแทรกซ้อนจากไวรัสและแบคทีเรียก่อโรคอื่นๆสูง มีปัญหาทางระบบหายใจและตาย (Halbur et al., 1995; Halbur et al., 1996; Lunney et al., 2010; Mengeling et al., 1998; Rossow et al., 1994; Thacker et al., 1998; van der Linden et al., 2003)

ในปี พ.ศ. 2553 ไวรัสพ็อร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือที่พบในประเทศจีนได้เกิดการกลายพันธุ์ทำให้เชื้อไวรัสมีความรุนแรงในการก่อโรคมากขึ้น ไวรัสสายพันธุ์ใหม่นี้เรียกว่า highly pathogenic PRRSV (HP-PRRSV) ซึ่งต่อมาพบระบาดในประเทศจีน เวียดนาม ลาวและทุกภาคของประเทศไทย ไวรัส HP-PRRSV นี้ทำให้สุกรตายเฉียบพลันทุกช่วงอายุและสุกรที่รอดชีวิตจะให้ผลผลิตลดลงอย่างมาก (Shi et al., 2010; Zhou and Yang., 2010; An et al., 2011)

เชื้อไวรัส HP-PRRSV กระตุ้นให้เกิดการอักเสบอย่างรุนแรง และทำให้สุกรมีความไวต่อการติดเชื้อแทรกซ้อนอื่นๆ เช่น ไวรัสหวัดสุกร ไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียม และกลุ่มแบคทีเรียที่ก่อโรคทางระบบทางเดินหายใจในสุกร ส่งผลให้สุกรป่วยด้วยโรคติดเชื้อต่างๆง่ายขึ้นและรุนแรงขึ้น (Thacker, 2001) สุกรมีอัตราการเจริญเติบโตที่ช้าลงอย่างมีนัยสำคัญ ส่งผลให้เกษตรกรมีต้นทุนการผลิตสุกรสูงขึ้น รวมถึงมีค่าใช้จ่ายด้านเวชภัณฑ์เพื่อการรักษาโรคติดเชื้อแทรกซ้อนมากขึ้น ในประเทศสหรัฐอเมริกา มีรายงานการประเมินมูลค่าความเสียหายทางเศรษฐกิจที่เกิดจากเชื้อไวรัสพ็อร์อาร์เอสต่ออุตสาหกรรมการผลิตสุกรคิดเป็นมูลค่าประมาณปีละ 500 ล้านดอลลาร์สหรัฐ (Neumann et al., 2005) ในประเทศไทย มูลค่าความสูญเสียทางเศรษฐกิจที่เกิดจากไวรัส HP-PRRSV คาดว่าทำให้สุกรตายและหายไปจากระบบการผลิตประมาณร้อยละ 20 ในช่วงปี พ.ศ. 2554-2555 ซึ่งส่งผลให้ราคาเนื้อสุกรชำแหละในขณะนั้นพุ่งสูงขึ้นเป็นกิโลกรัมละประมาณ 150 บาท (จากราคาปกติอยู่ที่กิโลกรัมละ 110-120 บาท)

ในปัจจุบัน ยังไม่มีวิธีการจัดการใดที่สามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัส HP-PRRSV ในสุกรได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Corzo et al., 2010; Thanawongnuwech and Suradhat, 2010) ในต่างประเทศมีการใช้วัคซีนที่ผลิตจาก HP-PRRSV แต่ประสิทธิภาพในการป้องกันโรคยังไม่แน่นอน ส่วนในประเทศไทยก็ยังไม่มีการขึ้นทะเบียนเวชภัณฑ์ของวัคซีนดังกล่าวเพื่อใช้ในราชอาณาจักร แต่เกษตรกรมีการลักลอบใช้วัคซีนที่ผลิตจากประเทศจีนซึ่งให้ประสิทธิภาพในการคุมโรคไม่แน่นอน นอกจากนี้ยังมีการลองใช้วัคซีนป้องกันโรคพอร์อาร์เอสที่ผลิตจากเชื้อไวรัสพอร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือ ซึ่งเป็นวัคซีนที่กระตุ้นภูมิคุ้มโรคได้ค่อนข้างสูง (Zuckermann et al., 2007) แต่ภูมิคุ้มกันที่วัคซีนสร้างขึ้นค่อนข้างจำเพาะกับสายพันธุ์ของไวรัส ซึ่งถ้าไวรัส HP-PRRSV มีลำดับ นิวคลีโอไทด์คล้ายกับลำดับของไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีน การฉีดวัคซีนก็อาจช่วยลดความรุนแรงของโรคได้ แต่ถ้าเชื้อไวรัส HP-PRRSV มีลำดับ นิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างจากลำดับของไวรัสในวัคซีนมาก วัคซีนนั้นก็มีแนวโน้มไม่ช่วยคุ้มโรค (Kimman et al., 2009; Huang and Meng, 2010; Charerntantanakul, 2011)

การใช้ประโยชน์จากพืชสมุนไพรเพื่อยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสเป็นแนวทางการจัดการแนวทางหนึ่งที่จะช่วยลดความสูญเสียจากไวรัส HP-PRRSV ได้ ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ผู้วิจัยได้รายงานว่าสารสกัดของพืชสมุนไพรหลายชนิด เช่น ทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz) (โสภิตาและคณะ 2556) พลูควา (*Houttuynia cordata* Thunb.) (โสภิตาและคณะ 2554a) และพญาขอ (*Clinacanthus nutans* (Burm.f.) Lindau) (โสภิตาและคณะ 2554b) สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสพอร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือได้ และในการศึกษาเบื้องต้นในไวรัส HP-PRRSV โดยคณะผู้วิจัยพบว่าสารสกัดของพลูควา พญาขอ มะรุม (*Moringa oleifera* Lam.) และผักข่า (*Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng.) สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของ HP-PRRSV ได้ โดยสามารถยับยั้งได้ทั้งก่อนที่ไวรัสจะติดเข้าสู่เซลล์และ/หรือหลังไวรัสติดเข้าสู่เซลล์แล้ว โดยในสารสกัดทั้งหมด สารสกัดของพญาขอที่สกัดด้วยเอทานอล 50% มีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสพอร์อาร์เอสสายพันธุ์อเมริกาเหนือและ HP-PRRSV ได้ดีที่สุดโดยสามารถยับยั้งได้ทั้งก่อนที่ไวรัสจะติดเข้าสู่เซลล์และหลังไวรัสติดเข้าสู่เซลล์แล้ว นอกเหนือจากไวรัสพอร์อาร์เอสแล้วสารสกัดของพญาขอยังมีฤทธิ์ยับยั้งไวรัสก่อโรคอื่นๆ ในสัตว์เศรษฐกิจและในมนุษย์ เช่น ไวรัสหวัดสุกร (Classical swine fever virus) (ซิลเวอร์และคณะ 2558) ไวรัสโรคหัวเหลืองในกึ่ง (Yellow head virus) (Direkbusarakom et al., 1998) และไวรัสเริม (Herpes simplex virus) ในมนุษย์ (Sakdarat et al., 2009) เป็นต้น และเมื่อคณะผู้วิจัยนำสารสกัดพญาขอมาศึกษาด้วยวิธี HPLC-ELSD พบว่าสารสกัดพญาขอที่สกัดด้วยเอทานอล 50% มีสารเคอควิติน (quercetin) อยู่ในปริมาณสูงที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดของสมุนไพรอื่น ๆ ที่ศึกษา (วิลาวรรณและคณะ 2558) ซึ่งสารเคอควิตินบริสุทธิ์มีฤทธิ์ยับยั้งไวรัส

อาร์อาร์เอสได้ (วิลารรณและวณิน งานวิจัยการเผยแพร่) และยังมีฤทธิ์ยับยั้งไวรัสก่อโรคอื่น ๆ ในสัตว์เศรษฐกิจและมนุษย์ เช่น Porcine epidemic diarrhea virus (Choi et al., 2009a), Equine herpesvirus-1 (Gravina et al., 2011) และ Influenza virus (Choi et al., 2009b) เป็นต้น

ไคโตซาน (chitosan) เป็นอนุพันธ์ของไคติน (chitin) ที่ได้จากการดึงเอาหมู่อะซิทิล (Acetyl Group) ของไคตินออกไปโดยปฏิกิริยา Deacetylation ทำให้โครงสร้างของไคตินที่เป็น N-Acetyl Glucosamine กลายเป็น D-Glucosamine ซึ่งเป็นโครงสร้างที่พร้อมจะทำปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว

ในอุตสาหกรรมจะสกัดไคตินจากเปลือกกุ้ง ปู ปลาหมึกเพื่อนำมาผลิตเป็นผงไคโตซาน ไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะมีสายยาว แต่สามารถทำให้เป็นสายสั้นลงได้โดยการใช้สารละลาย Tripolyphosphate ซึ่งสามารถทำให้ขนาดของไคโตซานเล็กลงได้ถึง 100-150 nm และมีรูพรุนมากขึ้น ทำให้ทำปฏิกิริยากับสารต่างๆ ได้ดียิ่งขึ้น (Perez and Francois, 2016; Sacco et al., in press)

ไคโตซานเป็นสารธรรมชาติที่มีลักษณะโดดเด่นเฉพาะตัว คือ เป็นวัสดุชีวภาพ สามารถย่อยสลายตามธรรมชาติ มีความปลอดภัยในการนำมาใช้กับมนุษย์และสัตว์ ปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม ไม่ไวไฟและไม่เป็นพิษต่อพืช ไคโตซานถูกนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ทางการแพทย์ การเกษตร อุตสาหกรรม ดังนี้ (สุริดา 2552; สมพร 2555)

1. ด้านการแพทย์และเภสัชกรรม

ไคโตซานเป็นสารธรรมชาติที่มีความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อและเซลล์ของร่างกาย สามารถรับประทานได้ และย่อยสลายได้ตามธรรมชาติโดยไม่เป็นพิษต่อร่างกาย ส่วนมากนิยมนำมาเป็นสารที่ใช้ในการตรึงหรือห่อหุ้มอนุภาคของยาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการปลดปล่อยยาให้เหมาะสม

ด้วยคุณสมบัติที่เป็นประจวบของไคโตซานจึงสามารถประกอบร่วมกับตัวยาที่เป็นประจวบได้ดี อนุภาคนาโนไคโตซานจึงมีคุณสมบัติในการเป็นตัวนำส่งยาโดยช่วยในการควบคุมการปลดปล่อยยาและลดความเป็นพิษของยา โดยสามารถนำส่งยาไปออกฤทธิ์ในบริเวณเป้าหมายได้ และสามารถปกป้องยาจากเอนไซม์ภายในร่างกายเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการนำส่งยาได้ดีขึ้นโดยไม่เป็นอันตรายต่อร่างกาย (Wang et al., 2011)

ไคโตซานจะถูกสลายได้ดีในสภาวะที่เป็นกรดเนื่องจากพันธะไฮโดรเจนถูกทำลาย ซึ่ง ไคโตซานที่ถูกดูดซึมเข้าไปในกระเพาะอาหารจะถูกทำลายได้ในบริเวณไตและส่วนที่อยู่ในทางเดินอาหารจะถูกขับออกมาพร้อมกับอุจจาระ

นอกจากนี้ได้มีการนำไคโตซานมาใช้ในวัสดุทดแทนกระดูก ใช้เป็น Filling ในกระดูกและฟัน ใช้เป็นวัสดุปิดบาดแผล กระตุ้นการสร้างเซลล์ใหม่ และป้องกันการติดเชื้อ ช่วยทำให้บาดแผลหายเร็วขึ้น เป็นสารป้องกันการจับตัวเป็นก้อนของเลือด (Blood Anticoagulant) และสารห้ามเลือด (Hemostatic) (Hwang et al., 2008; Anisha et al., 2013; Yang et al., 2009; Zhang et al., 2014)

2. ด้านการเกษตร

ไคโตซานสามารถนำไปใช้ได้เกือบทุกขั้นตอนของการผลิตพืช เช่น ใช้เป็นสารปรับสภาพดินสำหรับเพาะปลูก การใช้ไคโตซานผสมในปุ๋ยน้ำสำหรับพืชมีข้อดี คือ สามารถยึดเกาะกับพื้นผิวดินได้ดี ทนต่อการถูกชะล้าง ลดการระเหยของน้ำ ช่วยควบคุมการปลดปล่อยแร่ธาตุและสารอาหารให้แก่พืช ช่วยเร่งอัตราการเจริญเติบโต ทำให้ผลไม้สดสามารถเก็บรักษาไว้ได้นานขึ้น เป็นส่วนประกอบในการผลิตแผ่นคลุมดินเพื่อเร่งการเจริญเติบโตของพืช เพิ่มอุณหภูมิของดิน และช่วยเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ในดิน และยังส่งเสริมให้พืชกำจัดเชื้อก่อโรคของพืช (Cota-Arriola et al., 2013, Xing et al., 2015) นอกจากนี้ยังสามารถนำมาใช้ในการผลิตกระถางหรือถุงเพาะต้นกล้าได้ซึ่งผลิตภัณฑ์เหล่านี้สามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ (Chiellini et al., 2002)

3. ด้านอุตสาหกรรมอาหาร

ปัจจุบันไคโตซานมีการผลิตออกจำหน่ายอย่างแพร่หลายในรูปของอาหารเสริมเพื่อลดคอเลสเตอรอลและควบคุมน้ำหนัก จากสมบัติของไคโตซานในด้านการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา ทำให้เป็นจุดเด่นที่สำคัญต่อการนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการถนอมอาหาร เช่น ในการเก็บรักษาเนื้อปลา การนำไปใช้ในเครื่องปรุงรสอาหาร ในกระบวนการผลิตอาหารและเครื่องดื่มหลายชนิด ใช้เป็นฟิล์มห่อหุ้มเพื่อถนอมอาหาร (Tharanathan, 2003)

4. การใช้เป็นสารตกตะกอน

มีการนำไคโตซานมาใช้ด้านการบำบัดน้ำเนื่องจากพบว่าไคโตซานมีประสิทธิภาพในการใช้เป็นสารตกตะกอนชีวภาพ (Bioflocculant) ในการบำบัดน้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหาร สามารถลดความขุ่นปริมาณตะกอนแขวนลอย ตลอดจนค่า BOD และ COD ลงได้ ทำให้น้ำมีคุณภาพดีขึ้น การใช้ไคโตซานเป็นตัวจับไอออนโลหะในน้ำทิ้ง เช่น ไอออนของปรอท ทองแดง ตะกั่วและแคดเมียม เป็นต้น (Yang et al., 2016)

5. ด้านเครื่องสำอาง

ประจุบวกของหมู่แอมโมเนียม (NH_3^+) ที่เรียงรายอยู่บนโครงสร้างของไคโตซานจะมีความว่องไวต่อการจับกับผิวหนังและเส้นผมที่ประกอบด้วยสาร Mucopolysaccharides โปรตีน และไขมัน ที่มีประจุลบได้เป็นอย่างดี ไคโตซานที่เคลือบอยู่จะก่อตัวเป็นฟิล์มบางๆ พร้อมกับดูดซับความชื้นและไขมันเอาไว้จึงช่วยรักษาความชุ่มชื้นและความยืดหยุ่นให้แก่ผิวหนังและเส้นผม (Nakajima and Shinoda, 1977) และนอกเหนือจากสมบัติในการช่วยยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและลดอาการระคายเคืองหรือคันศีรษะแล้ว ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นกับ Polysaccharides และ โปรตีนของเส้นผมยังมีส่วนในการเพิ่มความเงางามให้แก่เส้นผม (Sionkowska et al., 2017) ปัจจุบันผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่มีส่วนผสมของ

โคโตซาน ได้แก่ ครีมและโลชั่นบำรุงผิว แชมพู โลชั่นบำรุงผม แป้งแต่งหน้า ยาทาเล็บ ยาสีฟัน และ มอยส์เจอไรเซอร์ เป็นต้น

6. ด้านเส้นใยและสิ่งทอ

การประยุกต์ใช้โคโตซานทางด้านเส้นใยและสิ่งทอพบว่าสามารถแบ่งตามลักษณะการใช้งานได้ดังนี้ ใช้ผลิตเป็นเส้นใยและเส้นด้าย เส้นใยโคตินและโคโตซานสามารถนำไปใช้ผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น ผ้านอนวูฟเวน (Nonwoven) ผ้าปิดแผลไหมละลาย เป็นต้น (Kumar, 1999, Kong et al., 2010)

7. ด้านการดูดซับน้ำมันของโคโตซาน

มีรายงานการนำโคโตซานมาใช้ประโยชน์ในการดูดซับน้ำมันตกค้าง (Residue Oil) ที่มีอยู่ในน้ำเสียซึ่งเป็นปัญหาสำคัญโดยเฉพาะในอุตสาหกรรมการสกัดน้ำมันปาล์ม เนื่องจากโมเลกุลของโคโตซานมีประจุบวกจึงสามารถจับกับสารที่มีประจุลบใน Residue Oil ได้ และทำให้ประจุลบของ Residue Oil สูญเสียเสถียรภาพโดยอาศัยกลไกการสะเทิน (Neutralize) ประจุ (Ahmad et al., 2005)

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

อุปกรณ์

วัสดุอุปกรณ์

1. กระดาษกรอง
2. กระบอกลีดข่า
3. กระบอกลีดข่า
4. ขวดดูแรน
5. ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์
6. ซ้อนดักสาร
7. ตัวกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร
8. ถาด
9. ถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ (96 well plate)
10. ถุงมือ
11. ปิเปตทิป
12. พาราฟิล์ม
13. ไมโครปิเปต
14. เครื่องเขย่า
15. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง
16. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
17. เครื่องปั่นเหวี่ยง
18. เครื่องระเหยความดันต่ำ
19. เครื่องระเหยสุญญากาศ
20. ตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์
21. ตู้ปลอดเชื้อ
22. ตู้อบลมร้อน
23. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ

สารเคมี

1. 3,3'-Diaminobenzidine (DAB)

2. albumin
3. anti-PRRSV antibodies
4. chitosan
5. dimethyl sulfoxide (DMSO)
6. di-sodium hydrogen phosphate anhydrous
7. ethanol
8. fetal bovine serum (FBS)
9. formaldehyde
10. horseradish peroxidase (HRP)
11. minimum essential medium (MEM)
12. penta sodium triphosphate (TPP)
13. potassium chloride
14. potassium dihydrogen phosphate
15. sodium chloride
16. sodium hydrogen carbonate
17. น้ำกลั่น

สมุนไพรที่ใช้ในการศึกษา

1. พญาขอ (*Clinacanthus nutans* (Burm.f) Lindau.)

วิธีการวิจัย

1. เตรียมสารสกัดพญาขอ

นำผงสมุนไพรพญาขอ มาสกัดด้วยตัวทำละลาย เอทานอล 50% เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วทำการแยกกากออก หลังจากนั้นทำให้สารละลายเข้มข้นขึ้นด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ และทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง ทำการเก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียส

2. การเตรียมสารสกัดพญาขอที่ห่อหุ้มด้วยอนุภาคนาโนไคโตซาน

นำสารสกัดพญาขอที่ได้มาละลายกลับด้วยเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาผสมกับไคโตซานความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ ก่อนนำมาผสมกับ

ไทร โพลีฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงตกตะกอนอนุภาคและทำการอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นำอนุภาคที่ได้ไปทำการศึกษาขนาดด้วยกล้อง SEM

3. การทดสอบความเป็นพิษสารสกัดพลาสมาที่ห่อหุ้มด้วยอนุภาคนาโนไคโตซานต่อเซลล์เพาะเลี้ยง MARC-145

เพาะเลี้ยงและปรับความเข้มข้นของเซลล์ MARC-145 ด้วยอาหาร MEM⁺⁺ แล้วบ่มร่วมกับสารละลายสารสกัดพลาสมาที่ห่อหุ้มด้วยอนุภาคนาโนไคโตซานที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยทำการเจือจางความเข้มข้นทีละ 2 เท่า ลงในถาดเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง วิเคราะห์การตายของเซลล์ด้วยวิธี crystal violet (Kanamaru and Yoshida, 1989) โดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 590 นาโนเมตร เลือกความเข้มข้นของสารที่มากที่สุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ไว้ศึกษาต่อไป

4. การทดสอบฤทธิ์สารสกัดพลาสมาที่ห่อหุ้มด้วยอนุภาคนาโนไคโตซานต่อการยับยั้งการติดเชื้อเซลล์ของไวรัสพาร์อาร์เอส

เป็นการทดสอบในระยะก่อนการติดเชื้อเซลล์ โดยบ่มเซลล์ MARC-145 กับสารละลายที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วบ่มตามด้วยไวรัสพาร์อาร์เอส ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยง MEM⁺⁺ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณโคเดอรัของไวรัสหลังบ่มด้วยวิธี immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) (Yoon et al., 1995) ระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบและกลุ่มที่ไม่ได้รับสารทดสอบ

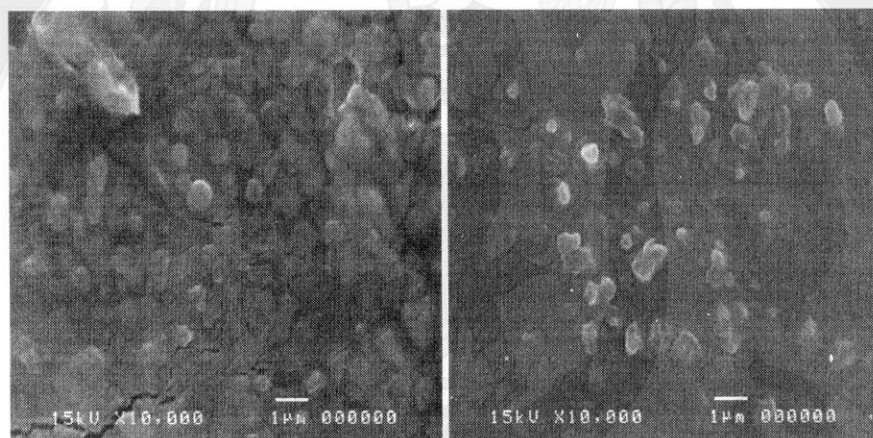
5. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดพลาสมาที่ห่อหุ้มด้วยอนุภาคนาโนไคโตซานต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสพาร์อาร์เอส

เป็นการทดสอบระยะหลังการติดเชื้อเซลล์ โดยบ่มเซลล์ MARC-145 ร่วมกับไวรัสพาร์อาร์เอส เพื่อให้ไวรัสติดเชื้อเซลล์ จากนั้นเติมสารละลายที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม ทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร MEM⁺⁺ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 4 วัน เปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณไวรัสหลังการบ่มด้วยวิธี IPMA ระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบและกลุ่มที่ไม่ได้สารทดสอบ

ผลการศึกษาวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดพลาสมาที่ห่อหุ้มด้วยอนุภาคนาโนไคโตซาน

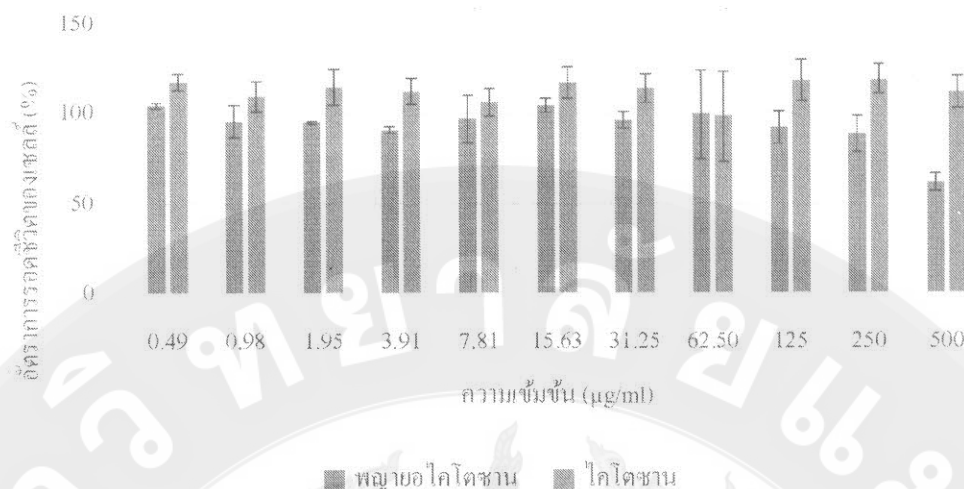
จากการเตรียมสารสกัดพลาสมาที่ห่อหุ้มด้วยอนุภาคนาโนไคโตซาน โดยใช้สารสกัดสมุนไพรพลาสมาที่มีความเข้มข้นที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัม ผสมกับไคโตซานความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.5 และผสมกับไตรโพลิฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อตรวจผลภายใต้กล้อง SEM พบว่า มีขนาดของอนุภาคอยู่ที่ 943 ± 184 นาโนเมตร เมื่อเทียบกับ ไคโตซานที่ไม่มีสารสกัดพลาสมา มีขนาดของอนุภาคอยู่ที่ประมาณ 876 ± 167 นาโนเมตร แต่อนุภาคของสารสกัดพลาสมาไม่สามารถตรวจสอบขนาดอนุภาคได้เนื่องจากสารสกัดมีความเป็นน้ำมันอยู่จึงไม่สามารถตรวจสอบภายใต้กล้อง SEM ได้



ภาพที่ 1 อนุภาคของนาโนไคโตซาน (ซ้าย) และ อนุภาคสารสกัดพลาสมาที่ห่อหุ้มด้วยอนุภาคนาโนไคโตซาน (ขวา) และ

2. ความเป็นพิษต่อเซลล์ MARC-145 ของสารสกัดพลาสมาที่ห่อหุ้มด้วยอนุภาคนาโนไคโตซาน

จากการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ MARC-145 ของสารสกัดพลาสมาที่ห่อหุ้มด้วยอนุภาคนาโนไคโตซาน พบว่าที่ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม เป็นความเข้มข้นที่สูงที่สุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์โดยให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์มากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนของไคโตซานไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ทดสอบ



ภาพที่ 2 ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดพญาขอที่ห่อหุ้มด้วยอนุภาคนาโนโคโตซานและโคโตซาน

3. การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไวรัส HP-PRRSV ของสารสกัดพญาขอที่ห่อหุ้มด้วยอนุภาคนาโนโคโตซาน

จากการศึกษาการศึกษาสาร สกัดพญาขอที่ห่อหุ้มด้วยอนุภาคนาโนโคโตซานที่ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร สามารถยับยั้งไวรัส HP-PRRSV ได้ในระยะก่อนการติดเข้าสู่เซลล์อยู่ที่ $0.25 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ ในระยะหลังการติดเข้าสู่เซลล์ยับยั้งไวรัสได้ $4 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ ในขณะที่สารสกัดพญาขอที่ไม่ห่อหุ้มด้วยอนุภาคนาโนโคโตซาน ยับยั้งไวรัส HP-PRRSV ได้ที่ 3.75 และ $4 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ ในระยะก่อนการติดเข้าสู่เซลล์และระยะหลังการติดเข้าสู่เซลล์ตามลำดับ ส่วนโคโตซานไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งไวรัส HP-PRRSV จากการศึกษาการเก็บรักษาอนุภาคพญาขอโคโตซานที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 เดือน แล้วนำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไวรัสพอร์อาร์เอสในระยะหลังการติดเข้าสู่เซลล์และตรวจสอบด้วยวิธี IPMA พบว่า สามารถยับยั้งไวรัสได้ $3.25 \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ ซึ่งความสามารถในการยับยั้งไวรัสลดลง $0.75 \text{TCID}_{50}/\text{ml}$

วิจารณ์ผลการวิจัย

พลาสมาที่สกัดด้วยเอทานอล พบสารสำคัญต่าง ๆ ได้แก่ Alpha tocopherol, Sinapic acid, Vanillin, Rutin trihydrate, Syringic acid, Protocatechuic acid, 4-Hydrophenylacetic acid, Gentisic acid, Cinnamic acid, 4-Hydroxybenzoic acid, Coumalic acid, p-Coumaric acid, 3,4-Dimethoxybenzoic acid, Quercetin hydrate, trans-Ferulic acid, Vanilic acid, Chlorogenic acid, Linoleic acid, Stearic acid, Oleic acid, Palmitic acid และ Myristic acid (Sulaiman et al., 2015) การศึกษาเกี่ยวกับการห่อหุ้มอนุภาคด้วยไคโตซานมีการศึกษาอย่างกว้างขวาง สารที่พบในพลาสมาที่มีการศึกษาด้วยเช่นกัน ได้แก่ Alpha tocopherol เป็นสารในกลุ่มวิตามินอี มีความเมื่อนำไคโตซานมาห่อหุ้มแล้วตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบอนุภาคมีขนาดอยู่ระหว่าง 200-800 นาโนเมตร (Luo et al., 2011) ในขณะที่การเตรียมอนุภาคที่ห่อหุ้มด้วยไคโตซานของ Alpha tocopherol ด้วยวิธีอัลตราโซนิกมีอนุภาคประมาณ 350 nm (Naghizadeh et al., 2010) Sinapic acid หลังทำการห่อหุ้มอนุภาคด้วยไคโตซานมีขนาดประมาณ 115 ± 12 nm (Balaganadharan et al., 2019) ในส่วนของ Vanillin การเตรียมอนุภาคด้วยไคโตซานมีขนาดของอนุภาคอยู่ที่ 100-150 nm (Wang et al., 2011) และมีขนาด 200-250 nm (Kamaraj et al., 2018) Rutin มีขนาดอนุภาคที่ห่อหุ้มด้วยไคโตซานอยู่ระหว่าง 85-100 nm (Ahmad et al., 2016) โดยขนาดของอนุภาคขึ้นอยู่กับอัตราส่วนระหว่างไคโตซานและไตรโพลีฟอสเฟต การเพิ่มสัดส่วนของไคโตซานทำให้ขนาดอนุภาคของไคโตซานลดลงดังงานวิจัยที่ห่อหุ้ม Rutin ด้วยอนุภาคไคโตซานที่มีสัดส่วนกับฟอสเฟต 2:1 มีขนาดอนุภาคอยู่ที่ 814 nm ในขณะที่สัดส่วนที่ 5:1 มีขนาดอนุภาคอยู่ที่ 322 nm (Konecsni et al., 2012) Chlorogenic acid เมื่อถูกห่อหุ้มด้วยไคโตซานแล้วพบว่ามีขนาดอนุภาคอยู่ที่ประมาณ 210 nm (Nallamuthu et al., 2015) Linoleic acid มีขนาดอนุภาคขนาด 200-600 nm (Chen et al., 2003) Stearic acid ที่เชื่อมอยู่กับไคโตซานมีขนาดตั้งแต่ 33.4-130.9 nm (Yuan et al., 2010) ส่วน Quercetin ที่ถูกห่อหุ้มด้วยไคโตซานมีขนาดอยู่ที่ประมาณ 168.58 nm (Souza et al., 2014) เป็นต้น จะเห็นได้ว่าขนาดของสารที่พบในพลาสมาที่ห่อหุ้มด้วยไคโตซานมีขนาดที่ต่างกัน ตั้งแต่ 33.4-800 nm จากการศึกษาวิจัยการเตรียมสารสกัดพลาสมาที่ห่อหุ้มด้วยอนุภาคนาโนไคโตซานมีขนาดอนุภาคที่ 943 นาโนเมตร จัดอยู่ในกลุ่มอนุภาคนาโนขนาดใหญ่ โดยมีปัจจัยในการเตรียมอนุภาคที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ความเข้มข้นของไคโตซาน สัดส่วนของไคโตซานและไตรโพลีฟอสเฟต ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม (Gan et al., 2005)

จากการวิจัยสารสกัดพลาสมาที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งไวรัสฟิอาร์อาร์เอส เป็นผลเนื่องมาจากสารพฤษเคมีที่มีในสมุนไพรพลาสมา มีรายงานสารสำคัญที่พบในสารสกัดพลาสมาที่มีฤทธิ์ในการต้าน

ไวรัส ได้แก่ Rutin มีฤทธิ์ด้านการเพิ่มจำนวนของไวรัส Enterovirus A71 (EV-A71) ใน RD cells (Lin et al., 2012) Chlorogenic acid มีฤทธิ์ในการต้านต่อ hepatitis B virus (HBV) โดยยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส (Wang et al., 2009) นอกจากนี้ยังพบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ neuraminidase ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ (H1N1/H3N2) ที่ทำหน้าที่ในการย่อย glycoprotein ที่เป็น receptor site บนผิวเซลล์ เป็นผลให้เกิดการยับยั้งการปลดปล่อยไวรัสจากเซลล์ที่ติดเชื้อภายนอกเซลล์ได้ (Ding et al., 2017) Protocatechuic acid ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส HBV โดยลดการปลดปล่อย DNA ของไวรัสจากเซลล์ HepG2 2.2.15 และยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส duck hepatitis B virus (DHBV) ซึ่งพบว่าช่วยลดปริมาณของไวรัสในกระแสเลือดของลูกเป็ดที่ติดเชื้อได้ (Kakkar and Bais, 2014) Myristic acid ต้านไวรัส human immunodeficiency virus (HIV) และ HBV (Parang et al., 1997) และยับยั้งไวรัส Junin virus (JV) โดยลดการเพิ่มจำนวนของไวรัส (Cordo et al., 1999) Quercetin ต้านไวรัสด้วยการยับยั้งเอนไซม์ reverse transcriptase ของ RNA ไวรัส โดยพบว่าพลาโวนอยด์ส่งเสริมการสร้างไซโตไคน์ Interferon (Ahmad et al., 2015) และมีรายงานการพบสารสำคัญในพลาโวนอยด์อื่นๆ ได้แก่ Shafloside, Orientin, Isoorientin, Vitexin, Isovitexin และ Apigenin 6,8-C- α -L-pyranarabinoside สารสกัดพลาโวนอยด์นี้มีฤทธิ์ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยการกระตุ้นการสร้างไซโตไคน์ Interferon- γ และ Interleukin-2 (Huang et al., 2015) ไซโตไคน์ interferon- γ มีความสำคัญอย่างมากในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้เกิดกระบวนการกำจัดไวรัส โดยการส่งเสริมการทำงานของเม็ดเลือดขาวให้ทำงานและส่งเสริมให้ยับยั้งกระบวนการจำลองตัวของไวรัส มีรายงานสารสำคัญที่ตรวจพบในพลาโวนอยด์มีฤทธิ์ในการต้านไวรัส ดังเช่น จากรายงานสาร Isoorientin มีฤทธิ์ในการต้านไวรัส Respiratory Syncytial Virus (RSV) โดยการยับยั้งการบุกรุกเข้าสู่เซลล์และการแบ่งตัวของไวรัส (Zhu et al., 2015) Isovitexin ยับยั้งการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ของไวรัส RSV ด้วยเช่นกัน (Ye et al., 2011) ซึ่งฤทธิ์ในการต้านไวรัสพือาร์เอสในงานวิจัยนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากสารพฤษเคมีที่มีอยู่ในพลาโวนอยด์ทำงานร่วมกัน ดังรายงานฤทธิ์การยับยั้งไวรัส Herpes Simplex Virus Type 2 (HSV-2) ของสารผสมระหว่าง orientin, rutin, quercetin และ kaempferol (Lam et al., 2016) ฤทธิ์ในการยับยั้งไวรัสของสารสกัดพลาโวนอยด์ทั้งพบทั้งในระยะก่อนและหลังการติดเชื้อเข้าสู่เซลล์ เมื่อห่อหุ้มอนุภาคด้วยโคโคซานประสิทธิภาพในการยับยั้งไวรัสในระยะก่อนการติดเชื้อเข้าสู่เซลล์ลดลง ในขณะที่ฤทธิ์ในการยับยั้งไวรัสในระยะหลังการติดเชื้อเข้าสู่เซลล์ยังคงประสิทธิภาพอยู่ แต่เมื่อทำการเก็บรักษาอนุภาคพลาโวนอยด์ที่ห่อหุ้มด้วยโคโคซานเป็นเวลา 12 เดือน ฤทธิ์ในการยับยั้งไวรัสพือาร์เอสลดลง

เนื่องจากสารสกัดพลาโวนอยด์มีส่วนที่เป็นไขมันมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ การห่อหุ้มอนุภาคด้วยโคโคซานช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการละลายน้ำของสารพฤษเคมีที่อยู่ในสารสกัด และช่วยในกระบวนการดูดซึมสารของร่างกาย ทำให้สามารถไปยังอวัยวะเป้าหมายได้ (Li et al., 2015) จากการ

วิจัยซึ่งชี้ให้เห็นว่าพลาสมาที่ถูกห่อหุ้มด้วยโคโคซานมีความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับห้องปฏิบัติการ การประยุกต์ใช้สารสกัดพลาสมาที่ห่อหุ้มด้วยอนุภาคโคโคซานให้สุกที่ติดไวรัสฟิอาร์อาร์เอส จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาสุกจากไวรัสฟิอาร์อาร์เอส



สรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้เตรียมสารประกอบพลาสมาที่ห่อหุ้มด้วยอนุภาคไคโตซานได้ จากการตรวจสอบลักษณะทางกายภาพภายใต้กล้อง SEM มีขนาดของอนุภาคของสารประกอบที่ห่อหุ้มด้วยไคโตซานอยู่ที่ 943 ± 184 นาโนเมตร สารประกอบที่มีในสารประกอบหลายชนิดที่มีในสัปดาห์พลาสมา มีฤทธิ์ในการยับยั้งไวรัส จากการศึกษานี้สารสัปดาห์พลาสมาที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งไวรัส HP-PRRSV ในส่วนของอนุภาคสารสัปดาห์พลาสมาที่ห่อหุ้มด้วยอนุภาคไคโตซานยับยั้งไวรัสได้ดีในส่วนของระยะหลังการติดเชื้อเซลล์ แต่ประสิทธิภาพหลังทำการเก็บรักษาลดลง สารสัปดาห์พลาสมาที่สัปดาห์พลาสมาที่สัปดาห์พลาสมา 50 เปอร์เซ็นต์ มีลักษณะของสารประกอบที่เป็นส่วนของไขมัน ขาดต่อการละลายน้ำ การห่อหุ้มสารสัปดาห์พลาสมาที่ห่อหุ้มด้วยอนุภาคไคโตซานช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการละลายน้ำและการดูดซึม จึงมีความเป็นไปได้ว่าจะสามารถนำอนุภาคสารสัปดาห์พลาสมาที่ห่อหุ้มด้วยไคโตซานมาประยุกต์ใช้กับสูตรที่คิดเชื้อไวรัสพอร์อาร์เอส

เอกสารอ้างอิง

- ชลเวอร์ วรรณมุข รุ่งทิพย์ กาวารี ชุติรัตน์ บรรจงลิขิตกุล ธัญวรัตน์ กางสงคราม สุจิรา ปาจริยานนท์ ละมุล โมลี และ วศิน เจริญต้นชนกุล. 2558. การตรวจหาฤทธิ์ต้านไวรัสของพืชสมุนไพรไทยต่อการยับยั้งการติดเข้าสู่เซลล์และการแบ่งตัวของไวรัสฮิวมาโนสในเซลล์เพาะเลี้ยงจากไตสุกร (SK-6). วารสารวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร 32(2), 23-35.
- วิลาวรรณ เรือนสิทธิ์ รุ่งทิพย์ กาวารี เรือนแก้ว ประพฤติ และวศิน เจริญต้นชนกุล. 2558. การตรวจหาสารเคอควินิดินในสารสกัดสมุนไพรไทยด้วยเทคนิค HPLC-ELSD. รายงานการประชุมวิชาการประจำปี 2558 วันที่ 8-9 ธันวาคม 2558 ณ ศูนย์การศึกษาและฝึกอบรมนานาชาติ มหาวิทยาลัยแม่โจ้. หน้า 146-152.
- สุธิดา คงทอง. 2552. โคติน-โคโตซาน. วารสารวิชาการอุตสาหกรรมศึกษา 3(1), 1-7.
- โสภิตา ช่วยชู ชุติรัตน์ บรรจงลิขิตกุล ธัญวรัตน์ กางสงคราม และวศิน เจริญต้นชนกุล. 2554a. ผลยับยั้งของสารสกัดพลาควาต่อการแบ่งตัวของไวรัสพาร์อาร์เอสในเซลล์เพาะเลี้ยง MARC-145. รายงานการประชุมทางวิชาการ ประจำปี 2554 วันที่ 1-2 ธันวาคม 2554 ณ ศูนย์การศึกษาและฝึกอบรมนานาชาติ มหาวิทยาลัยแม่โจ้. หน้า 146-152.
- โสภิตา ช่วยชู ชุติรัตน์ บรรจงลิขิตกุล ธัญวรัตน์ กางสงคราม รุ่งทิพย์ กาวารี และวศิน เจริญต้นชนกุล. 2554b. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดพลาควาต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสพาร์อาร์เอสในเซลล์เพาะเลี้ยง MARC-145. รายงานการประชุมทางวิชาการและนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ “แม่โจ้-แพร์ วิจัย ครั้งที่ 2” วันที่ 1-2 กันยายน 2554 ณ มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร์เฉลิมพระเกียรติ. หน้า 271-275.
- โสภิตา ช่วยชู ชุติรัตน์ บรรจงลิขิตกุล ธัญวรัตน์ กางสงคราม รุ่งทิพย์ กาวารี และวศิน เจริญต้นชนกุล. 2556. ฤทธิ์ต้านไวรัสของสารสกัดหยาบของพืชมังคุดต่อการติดเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสในเซลล์เพาะเลี้ยง MARC-145. วารสารวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร 30(1), 33-43.
- สมพร ประเสริฐส่งสกุล. 2555. การใช้โคโตซานในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช วารสารมหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา 7(2), 125-134.
- Ahmad, A., Kaleem, M., Ahmed, Z. & Shafiq, H. 2015. Therapeutic potential of flavonoids and their mechanism of action against microbial and viral infections—A review. Food Research International, 77, 221-235.

- Ahmad, A., Sumathi, S. & Hameed, B. 2005. Adsorption of residue oil from palm oil mill effluent using powder and flake chitosan: equilibrium and kinetic studies. *Water research*, 39(12), 2483-2494.
- Ahmad, N., Ahmad, R., Naqvi, A. A., Alam, M. A., Ashafaq, M., Samim, M., Iqbal, Z. & Ahmad, F. J. 2016. Rutin-encapsulated chitosan nanoparticles targeted to the brain in the treatment of cerebral ischemia. *International Journal of Biological macromolecules*, 91, 640-655.
- Amonsin, A., Kedkovid, R., Puranaveja, S., Wongyanin, P., Suradhat, S., Thanawongnuwech, R. 2009. Comparative analysis of complete nucleotide sequence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates in Thailand (US and EU genotypes). *Virology Journal*, 6, 143.
- An, T.Q., Tian, Z.J., Leng, C.L., Peng, J.M. & Tong, G.Z., 2011. Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus, Asia. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 17, 1782-1784.
- Anisha, B.S., Sankar, D., Mohandas, A., Chennazhi, K.P., Nair, S.V. & Jayakumar, R. 2013. Chitosan-hyaluronan/nano chondroitin sulfate ternary composite sponges for medical use. *Carbohydrate Polymers* 92(2), 1470-1476.
- Balagangadharan, K., Trivedi, R., Vairamani, M. & Selvamurugan, N. 2019. Sinapic acid-loaded chitosan nanoparticles in polycaprolactone electrospun fibers for bone regeneration in vitro and in vivo. *Carbohydrate Polymers*, 216, 1-16.
- Charentantanakul, W., 2011, Porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines. *World Journal of Virology* , 1, 23-30.
- Charentantanakul, W., Platt, R. & Roth, J.A. 2006. Effects of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected antigen-presenting cells on T cell activation and antiviral cytokine production. *Viral Immunology*, 19, 646-661.
- Chen, X.-G., Lee, C. M. & Park, H.-J. 2003. O/W emulsification for the self-aggregation and nanoparticle formation of linoleic acid modified chitosan in the aqueous system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10), 3135-3139.
- Chiellini, E., Cinelli, P., Antone, S. & Ilieva, V. I. 2002. Environmentally degradable polymeric materials (EDPM) in agricultural applications—an overview. *Polimery*, 47(7-8), 538-544.

- Choi, H.J., Kim, J.H., Lee, C.H., Ahn, Y.J., Song, J.H., Baek, S.H. & Kwon, D.H. 2009a. Antiviral activity of quercetin 7-rhamnoside against porcine epidemic diarrhea virus. *Antiviral Research*, 81(1), 77–81.
- Choi, H.J., Song, J.H., Park, K.S. & Kwona, D.H. 2009b. Inhibitory effects of quercetin 3-rhamnoside on influenza A virus replication. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 37, 329–333.
- Cordo, S. M., Candurra, N. A. & Damonte, E. B. 1999. Myristic acid analogs are inhibitors of Junin virus replication. *Microbes and Infection*, 1(8), 609-614.
- Corzo, C.A., Mondaca, E., Wayne, S., Torremorell, M., Dee, S., Davies, P. & Morrison, R.B. 2010. Control and elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Research*, 154, 185-192.
- Cota-Arriola, O., Onofre Cortez-Rocha, M., Burgos-Hernández, A., Marina Ezquerro-Brauer, J. & Plascencia-Jatomea, M. 2013. Controlled release matrices and micro/nanoparticles of chitosan with antimicrobial potential: development of new strategies for microbial control in agriculture. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(7), 1525-1536.
- Ding, Y., Cao, Z., Cao, L., Ding, G., Wang, Z. & Xiao, W. 2017. Antiviral activity of chlorogenic acid against influenza A (H1N1/H3N2) virus and its inhibition of neuraminidase. *Scientific Reports*, 7, 45723.
- Direkbusarakom, S., Ruangpan, L., Ezura, Y. and Yoshimizu, M. 1998. Protective efficacy of *Clinacanthus nutans* on yellow-head disease in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Pathology*, 33(4): 401-404.
- Gan, Q., Wang, T., Cochrane, C. & McCarron, P. 2005. Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 44(2-3), 65-73.
- Gravina H.D., Tafuria N.F., A. Júniora S., Fiettoa J.L.R., Oliveirac T.T., Diazd M.A.N. & Almeida M.R., 2011. In vitro assessment of the antiviral potential of trans-cinnamic acid, quercetin and morin against equid herpesvirus 1. *Research in Veterinary Science*, 91(3), 158–162.
- Halbur, P.G., Paul PS, Frey ML, Landgraf J, Eernisse K, Meng XJ. 1996. Comparison of the antigen distribution of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. *Veterinary Pathology*, 33, 159-170.

- Halbur, P.G., Paul, P.S., Frey, M.L., Landgraf, J., Eernisse, K., Meng, X.J. 1995. Comparison of the pathogenicity of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. *Veterinary Pathology*, 32, 648-660.
- Huang, D., Guo, W., Gao, J., Chen, J. & Olatunji, J. 2015. Clinacanthus nutans (Burm. f.) Lindau ethanol extract inhibits hepatoma in mice through upregulation of the immune response. *Molecules*, 20(9), 17405-17428.
- Huang, Y.W. & Meng, X.J. 2010. Novel strategies and approaches to develop the next generation of vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Virus Research*, 154, 141-149.
- Hwang, H.Y., Kim, I.S., Kwon, I.C. & Kim, Y.H. 2008. Tumor targetability and antitumor effect of docetaxel-loaded hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 128(1), 23-31.
- Kakkar, S. & Bais, S. 2014. A review on protocatechuic acid and its pharmacological potential. *ISRN Pharmacology*, 2014.
- Kamaraj, S., Palanisamy, U. M., Mohamed, M. S. B. K., Gangasalam, A., Maria, G. A. & Kandasamy, R. 2018. Curcumin drug delivery by vanillin-chitosan coated with calcium ferrite hybrid nanoparticles as carrier. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 116(48-60).
- Kanamaru, H. & Yoshida, O. 1989. Assessment of in vitro lymphokine activated killer (LAK) cell activity against renal cancer cell lines and its suppression by serum factor using crystal violet assay. *Urological research*, 17(4), 259-264.
- Kimman, T.G., Cornelissen, L.A., Moormann, R.J., Rebel, J.M. & Stockhofe-Zurwieden, N. 2009. Challenges for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccinology. *Vaccine* 27, 3704-3718.
- Konecsni, K., Low, N. & Nickerson, M. 2012. Chitosan-tripolyphosphate submicron particles as the carrier of entrapped rutin. *Food Chemistry*, 134(4), 1775-1779.
- Kumar, M. R. 1999. Chitin and chitosan fibres: a review. *Bulletin of Materials Science*, 22(5), 905.
- Lam, K. Y., Ling, A. P. K., Koh, R. Y., Wong, Y. P. & Say, Y. H. 2016. A review on medicinal properties of orientin. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2016(

- Li, Z., Jiang, H., Xu, C. & Gu, L. 2015. A review: Using nanoparticles to enhance absorption and bioavailability of phenolic phytochemicals. *Food Hydrocolloids*, 43, 153-164.
- Lin, Y.-J., Chang, Y.-C., Hsiao, N.-W., Hsieh, J.-L., Wang, C.-Y., Kung, S.-H., Tsai, F.-J., Lan, Y.-C. & Lin, C.-W. 2012. Fisetin and rutin as 3C protease inhibitors of enterovirus A71. *Journal of Virological Methods*, 182(1-2), 93-98.
- Lunney, J.K., Benfield, D.A. & Rowland, R.R., 2010. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: an update on an emerging and re-emerging viral disease of swine. *Virus Research*, 154, 1-6.
- Luo, Y., Zhang, B., Whent, M., Yu, L. L. & Wang, Q. 2011. Preparation and characterization of zein/chitosan complex for encapsulation of α -tocopherol, and its in vitro controlled release study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 85(2), 145-152.
- Mengeling, W.L., Lager, K.M. & Vorwald, A.C. 1998. Clinical consequences of exposing pregnant gilts to strains of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus isolated from field cases of "atypical" PRRS. *American Journal of Veterinary Research*, 59, 1540-1544.
- Naghibzadeh, M., Amani, A., Amini, M., Esmailzadeh, E., Mottaghi-Dastjerdi, N. & Faramarzi, M. A. 2010. An insight into the interactions between α -tocopherol and chitosan in ultrasound-prepared nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*, 2010, 44.
- Nakajima, A. & Shinoda, K. 1977. Permeation properties of glycol chitosan-mucopolysaccharide complex membranes. *Journal of Applied Polymer Science*, 21(5), 1249-1255.
- Nallamuthu, I., Devi, A. & Khanum, F. 2015. Chlorogenic acid loaded chitosan nanoparticles with sustained release property, retained antioxidant activity and enhanced bioavailability. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10(3), 203-211.
- Neumann, E.J., Kliebenstein, J.B., Johnson, C.D., Mabry, J.W., Bush, E.J., Seitzinger, A.H., Green, A.L. & Zimmerman, J.J. 2005. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 227, 385-392.

- Parang, K., Wiebe, L. I., Knaus, E. E., Huang, J.-S., Tyrrell, D. L. & Csizmadia, F. 1997. In vitro antiviral activities of myristic acid analogs against human immunodeficiency and hepatitis B viruses. *Antiviral Research*, 34(3), 75-90.
- Perez, J.J., Francois, N.J. 2016. Chitosan-starch beads prepared by ionotropic gelation as potential matrices for controlled release of fertilizers. *Carbohydrate Polymers* 148, 134–142
- Rossow, K.D., Bautista, E.M., Goyal, S.M., Molitor, T.W., Murtaugh, M.P., Morrison, R.B., Benfield, D.A. & Collins, J.E. 1994. Experimental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in one-, four-, and 10-week-old pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 6, 3-12.
- Sacco, P., Sergio, Paoletti., Cok, M., Asaro, F., Abrami, M., Grassi M. & Donati, I. In press. Insight into the ionotropic gelation of chitosan using tripolyphosphate and pyrophosphate as cross-linkers. *International Journal of Biological Macromolecules*, 92, 476-483.
- Sakdarat, S., Shuyprom, A., Pientong, C., Ekalaksananan, T. and Thongchai, S. 2009. Bioactive constituents from the leaves of *Clinacanthus nutans* Lindau. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(5), 1857-1860.
- Shi, M., Lam, T.T., Hon, C.C., Hui, R.K., Faaberg, K.S., Wennblom, T., Murtaugh, M.P., Stadejek, T. & Leung, F.C., 2010. Molecular epidemiology of PRRSV: a phylogenetic perspective. *Virus Research*, 154, 7-17.
- Sionkowska, A., Kaczmarek, B., Michalska, M., Lewandowska, K. & Grabska, S. 2017. Preparation and characterization of collagen/chitosan/hyaluronic acid thin films for application in hair care cosmetics. *Pure and Applied Chemistry*, 89(12), 1829-1839.
- Souza, M. P., Vaz, A. F., Correia, M. T., Cerqueira, M. A., Vicente, A. A. & Carneiro-da-Cunha, M. G. 2014. Quercetin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles for functional food applications. *Food and Bioprocess Technology*, 7(4), 1149-1159.
- Sulaiman, I. S. C., Basri, M., Chan, K. W., Ashari, S. E., Masoumi, H. R. F. & Ismail, M. 2015. In vitro antioxidant, cytotoxic and phytochemical studies of *Clinacanthus nutans* Lindau leaf extracts. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 9(34), 861-874.

- Thacker, E.L., Halbur, P.G., Paul, P.S. & Thacker, B.J. 1998. Detection of intracellular porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein in porcine macrophages by flow cytometry *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 10, 308-311.
- Thacker, E.L. 2001. Immunology of the porcine respiratory disease complex. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 17, 551-65.
- Thanawongnuwech, R., Suradhat, S., 2010. Taming PRRSV: revisiting the control strategies and vaccine design. *Virus Research*, 154, 133-140.
- Tharanathan, R. 2003. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in food science & technology*, 14(3), 71-78.
- van der Linden, I.F., Voermans, J.J., van der Linde-Bril, E.M., Bianchi, A.T. & Steverink, P.J. 2003. Virological kinetics and immunological responses to a porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection of pigs at different ages. *Vaccine* 21, 1952-1957.
- Wang, G., Li, P. W., Peng, Z., Huang, M. F. & Kong, L. X. 2011. Formulation of vanillin cross-linked chitosan nanoparticles and its characterization. In *Advanced Materials Research*, 335, 474-477.
- Wang, G.-F., Shi, L.-P., Ren, Y.-D., Liu, Q.-F., Liu, H.-F., Zhang, R.-J., Li, Z., Zhu, F.-H., He, P.-L. & Tang, W. 2009. Anti-hepatitis B virus activity of chlorogenic acid, quinic acid and caffeic acid in vivo and in vitro. *Antiviral research*, 83(2), 186-190.
- Wang, J.J., Zeng, Z.W., Xiao, R.Z., Xie, T., Zhou, G.L., Zhan, X.R. & Wang, S.L. 2011. Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 765-744.
- Xing, K., Zhu, X., Peng, X. & Qin, S. 2015. Chitosan antimicrobial and eliciting properties for pest control in agriculture: a review. *Agronomy for Sustainable Development*, 35(2), 569-588.
- Yang, R., Li, H., Huang, M., Yang, H. & Li, A. 2016. A review on chitosan-based flocculants and their applications in water treatment. *Water research*, 95(59-89).
- Yang, S.J., Shieh, M.J., Lin, F.H., Lou, P.J., Peng, C.L., Wei, M.F., Yao, C.J., Lai, P.S. & Young, T.H. 2009. Colorectal cancer cell detection by 5-aminolaevulinic acid-loaded chitosan nano-particles. *Cancer Letters* 273(2), 210-220.

- Ye, W.Y., Li, X. & Cheng, J. W. 2011. Screening of eleven chemical constituents from *Radix isatidis* for antiviral activity. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5(16), 1932-1936.
- Yoon, K. J., Zimmerman, J. J., Swenson, S. L., McGinley, M. J., Eernisse, K. A., Brevik, A. & Platt, K. B. 1995. Characterization of the humoral immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 7(3), 305-312.
- Yuan, H., Lu, L.-J., Du, Y.-Z. & Hu, F.-Q. 2010. Stearic acid-g-chitosan polymeric micelle for oral drug delivery: in vitro transport and in vivo absorption. *Molecular Pharmaceutics*, 8(1), 225-238.
- Zhang, H., Mi, J., Huo, Y., Huang, X., Xing, J., Yamamoto, A. & Gao, Y. 2014. Absorption enhancing effects of chitosan oligomers on the intestinal absorption of low molecular weight heparin in rats. *International Journal of Pharmaceutics*, 466(1-2), 156-162.
- Zhou, L. & Yang, H., 2010. Porcine reproductive and respiratory syndrome in China. *Virus Research*, 154, 31-37.
- Zhu, X. Z., Shen, W. W., Gong, C. Y., Wang, Y., Ye, W. E., Li, Y. L. & Li, M. M. 2015. Antiviral Activity of Isoorientin against Respiratory Syncytial Virus in Vitro and in Vivo. *Journal of Sun Yat-sen University (Medical Sciences)*, 3, 5.
- Zuckermann, F.A., Garcia, E.A., Luque, I.D., Christopher-Hennings, J., Doster, A., Brito, M. & Osorio, F. 2007. Assessment of the efficacy of commercial porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccines based on measurement of serologic response, frequency of gamma-IFN-producing cells and virological parameters of protection upon challenge. *Veterinary Microbiology*, 123, 69-85.



1. การเพาะเลี้ยงเซลล์ MACR-145

1.1 เพาะเลี้ยงเซลล์ MARC-145 โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหาร MEM⁺⁺ ให้เจริญเต็มก้นภาชนะเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน

1.2 ทำการเพิ่มจำนวนเซลล์ โดยเทอาหารออกจากขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ แล้วล้างด้วย PBS buffer 5 มิลลิตร ย่อยเซลล์ให้หลุดจากก้นภาชนะด้วยเอนไซม์ trypsin 100 ไมโครลิตร เคาะจนกว่าเซลล์จะหลุดทั้งหมด เติมน้ำอาหาร MEM⁺⁺ 10 มิลลิตร แล้วแบ่งใส่ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ใหม่ 5 มิลลิตร เพาะเลี้ยงที่สภาวะที่มีความชื้น อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์

2. การเพาะเลี้ยงไวรัส PRRSV

2.1 เตรียมเซลล์ MARC-145 ที่มีอายุ 16-20 ชั่วโมง มาเทอาหารออกแล้วเติมไวรัส 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วเติมน้ำอาหาร MEM⁺⁺ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 วัน

2.2 นำเซลล์ที่มีไวรัสไปแช่ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน นำมาละลาย แล้วนำไปแช่ที่ -80 องศาเซลเซียสอีกครั้ง เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ไวรัสหลุดออกจากเซลล์ แล้วละลาย บั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เก็บส่วนใสที่ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

3. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ MARC-145 ของสารสกัดสมุนไพร

3.1 เตรียมเซลล์ MARC-145 โดยการเทอาหารทิ้ง แล้วล้างด้วย PBS buffer 5 มิลลิตร ย่อยเซลล์ด้วยเอนไซม์ trypsin เคาะจนกว่าเซลล์จะหลุดทั้งหมดแล้วเติมน้ำอาหาร MEM⁺⁺ ปิเปิดเซลล์ใส่ใน 96 well plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร โดยมีความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 5×10^4 เซลล์ต่อมิลลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง

3.2 นำสารทดสอบที่ละลายแล้ว มากรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.02 ไมโครเมตร แล้วเจือจางสารทดสอบด้วยอาหาร MEM⁺⁺ โดยทำการเจือจางตามลำดับส่วนที่ละ 2 เท่า แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 วัน

3.3 วิเคราะห์ด้วยวิธี Crystalviolet โดยเทอาหารออกแล้วล้างด้วย PBS หลังจากนั้นเติม 60:40 Acetone : Methanol บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมน้ำ Crystal violet ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ 20 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำเปล่า หลังจากตั้งทิ้งไว้ให้แห้งแล้วจึงเติม Sorenson's citrate buffer 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้วจึงไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

4. เทคนิค Immunoperoxidase monolayer assay (IPMA)

4.1 การเตรียมสารเคมี

- เตรียม 4 % formalin จาก stock ความเข้มข้น 40 % formalin ปริมาตร 100 ml เติมน้ำ 40 % formalin ปริมาตร 10 มิลลิตร ลงใน 0.5 % PBS-T ปริมาตร 90 มิลลิตร ผสมให้เข้ากัน
- เตรียม 0.5 % PBST ปริมาตร 1 ลิตร เติมน้ำ Tween20 ปริมาตร 5 มิลลิตร ลงใน 1X PBS ปริมาตร 995 มิลลิตร ผสมให้เข้ากัน

3. เตรียม 5% hydrogen peroxide จาก Stock ความเข้มข้น 50 % ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
เติม 50 % hydrogen peroxide ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
4. เตรียม 1 M Tris sodium citrate ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
ชั่ง Tris sodium citrate 294 กรัม ผสมกับน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้มีค่าอยู่ที่ 7.2 ด้วย 1 M HCl แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร
5. เตรียม DAB substrate ความเข้มข้น 0.006 % ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

สารเคมี	ปริมาณที่ใช้	ความเข้มข้นสุดท้าย
5% hydrogen peroxide	0.2 มิลลิลิตร	0.01%
1M Tris sodium citrate	5 มิลลิลิตร	50mM
Sodium chloride	0.58 กรัม	0.1 M
DAB	6 มิลลิกรัม	0.006%
1X PBS	94.8 มิลลิลิตร	

6. เตรียม 1% BSA ใน 0.5% PBS-T ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
ชั่ง BSA มา 1 มิลลิกรัม ละลายใน 0.5% PBS-T 100 มิลลิลิตร (เตรียมแล้วใช้ให้หมดในคราวเดียว)
7. เตรียม stock secondary antibody (Goat anti-Mouse IgG conjugate with HRP)
เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อลงในขวด secondary antibody ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้าแล้วแบ่งใส่หลอด ependrop หลอดละ 200 ไมโครลิตร ทำการเก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน
8. เตรียม Primary antibody (Mouse anti-PRRSV IgG) 1:800 ปริมาตร 30,000 ไมโครลิตร
เติม primary antibody ปริมาตร 37.5 ไมโครลิตร ลงใน 1% BSA PBS-T ปริมาตร 29,967.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน (เตรียมแล้วใช้ให้หมดในคราวเดียว)
9. เตรียม secondary antibody (Goat anti-Mouse IgG conjugate with HRP) 1:600 ปริมาตร 30,000 ไมโครลิตร
เติม secondary antibody ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงใน 1% BSA PBS-T ปริมาตร 29,950 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน (เตรียมแล้วใช้ให้หมดในคราวเดียว)

4.2 วิธีการศึกษาหาปริมาณไวรัสด้วยวิธี IPMA

1. ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ MARC-145 ที่มีความเข้มข้นของเซลล์ที่ 5×10^5 cells/ml ลงในถาดเพาะเลี้ยงชนิด 96 well plate ทำการเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร MEM⁺⁺ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 16 ชั่วโมง
2. เจือจางไวรัสที่ละ 10 เท่า ด้วยอาหาร MEM⁺⁺ แล้วเติมลงในเซลล์ที่เตรียมไว้ในข้อ 1 หลุมละ 100 ul นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 96 ชั่วโมง
3. เทอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วทำการล้างด้วย 0.5% PBS-T หลุมละ 100 ul 1 ครั้ง
4. เติม 4% formalin หลุมละ 100 ul แล้วทำการบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
5. ทำการล้างออกด้วย 0.5% PBS-T หลุมละ 100 ul จำนวน 3 ครั้ง บ่มล้างครั้งละ 3-5 นาที
6. เติม primary antibody (mouse anti-PRRSV IgG) ความเข้มข้น 1:800 หลุมละ 50 ul บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที
7. ล้างออกเช่นเดียวกับข้อ 5
8. เติม secondary antibody (Goat anti-mouse IgG conjugate with HRP) ความเข้มข้น 1:600 หลุมละ 50 ul แล้วทำการบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที
9. ล้างออกเช่นเดียวกับข้อ 5
10. เติม DAB substrate หลุมละ 100 ul แล้วทำการบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำเปล่า 100 ul 1 ครั้ง
11. ทำการตรวจผลจากสีน้ำตาลที่เกิดซึ่งทั้งด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้อง แล้วทำการคำนวณหา virus titer