



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการศึกษาฤทธิ์ต้านเริ่มและฤทธิ์ต้านมะเร็งของสมุนไพรพื้นบ้าน
จังหวัดอุบลราชธานี

โดย นางสาวพรรณรัตน์ อภินิษฐาภิชาติ และคณะ

มิถุนายน 2547

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการศึกษาฤทธิ์ต้านริ้วและฤทธิ์ต้านมะเร็งของสมุนไพรพื้นบ้าน
จังหวัดอุบลราชธานี

คณะผู้วิจัย

สังกัด

- | | |
|---------------------------------|---|
| 1. นางสาวพรรณรัตน์ อภิษฐาภิชาติ | มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี |
| 2. นายอารี วังมณีรัตน์ | มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี |
| 3. Kenneth F. Bastow | University of North Carolina at Chapel Hill |
| 4. นายประพนธ์ วิไลรัตน์ | มหาวิทยาลัยมหิดล |

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ	TRG4580068
ชื่อโครงการ	โครงการศึกษาฤทธิ์ต้านริ้วและฤทธิ์ต้านมะเร็งของสมุนไพรพื้นบ้านจังหวัดอุบลราชธานี
ชื่อนักวิจัย	นางสาวพรรณรัตน์ อภินิษฐาภิชาติ
สถาบัน	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
E-mail address :	pannarat.a@mail.ubu.ac.th
ระยะเวลาโครงการ	กรกฎาคม 2545-มิถุนายน 2547

สมุนไพรจากจังหวัดอุบลราชธานีที่ใช้โดยกลุ่มแพทย์พื้นบ้านในการรักษาโรคติดเชื้อไวรัสจำนวน 5 ต้นถูกคัดเลือกเพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านไวรัสและฤทธิ์ต้านมะเร็งในหลอดทดลอง จากการแยกส่วนสกัดเป็นส่วนๆและใช้การวิเคราะห์ทางชีวภาพเป็นตัวชี้แนะ พบว่า สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จาก *Dunbaria bella* Prain (DF372) มีฤทธิ์ดีและเฉพาะเจาะจงต่อเชื้อริ้วประเภท 1 และประเภท 2 ความเข้มข้นของ DF372 ที่สามารถยับยั้งเชื้อริ้วได้ร้อยละ 50 (ทดสอบด้วยวิธี yield assay) เท่ากับ 1.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรและมีความเฉพาะเจาะจงต่อการออกฤทธิ์ต้านริ้ว 17 เท่า การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับลักษณะการออกฤทธิ์ต้านริ้วของ DF372 พบว่า ฤทธิ์ต้านริ้วไม่ได้เกี่ยวเนื่องจากการมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อริ้ว หรือเกี่ยวกับขั้นตอนการเกาะติดเซลล์/การเข้าสู่เซลล์ และประสิทธิภาพในการต้านริ้วของ DF372 ขึ้นกับปริมาณไวรัสที่ทำให้ติดเชื้อ การศึกษานี้ยังพบว่า ส่วนสกัดจำนวน 10 ชนิดที่ได้จาก *Croton cascarilloides* Raeusch และ *Dunbaria bella* Prain มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง KB และ MCF-7 โดยความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งได้ร้อยละ 50 มีค่า 5-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร

คำหลัก ฤทธิ์ต้านไวรัส, ฤทธิ์ต้านเชื้อริ้ว, ฤทธิ์ต้านมะเร็ง, สมุนไพร

Abstract

Project Code :	TRG4580068
Project Title :	A Study on Anti-herpes and Anticancer Activities of Medicinal Plants in Ubon Ratchathani
Investigator	Ms. Pannarat Akanitapichat
Institute	Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University
E-mail address :	pannarat.a@mail.ubu.ac.th
Project Period	July 2001-June 2003

Five medicinal plants from Ubon Ratchathani, used by traditional healers to treat viral infection, were selected for evaluation of *in vitro* antiviral and anticancer activities. From a bioassay-guided fractionation procedure, the partial purified fraction from *Dunbaria bella* Prain (DF372) was potentially active and selective against herpes simplex virus (HSV) type 1 and 2. Its 50% HSV inhibitory concentration determined by a yield assay was 1.2 $\mu\text{g/ml}$ and its selectivity was about 17-fold. Preliminary characterization of its antiviral action showed that the observed HSV inhibitory activities were associated with neither virucidal effect nor attachment/penetration. Moreover, anti-HSV efficacy depended on multiplicity of infection. Despite DF372 with anti-HSV activity, ten fractions obtained from *Croton cascarilloides* Raeusch and *Dunbaria bella* Prain were also found to have antiproliferative activity against malignant cell lines (KB and MCF-7), with 50% cytotoxic concentrations ranging from 6 to 20 $\mu\text{g/ml}$.

Keywords : antiviral, anti-HSV, anticancer, medicinal plant

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยครั้งนี้บรรลุผลสำเร็จได้โดยการสนับสนุนของคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัย
อุบลราชธานีที่ให้อุปกรณ์และเครื่องมือ คณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าผลการวิจัยครั้งนี้ จักเป็น
ประโยชน์ในการศึกษาและพัฒนาอย่างต่อเนื่องต่อไป

คณะผู้วิจัย

มิถุนายน 2547

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูปภาพ.....	ช
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย.....	3
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	
2.1 เชื้อเริ่ม HSV.....	4
2.2 โรคเริ่มที่อวัยวะเพศ.....	4
2.3 ยาต้านเชื้อเริ่ม.....	6
2.4 สมุนไพรท้องถิ่นจังหวัดอุบลราชธานี.....	7
ที่กลุ่มแพทย์พื้นบ้านใช้รักษาโรคติดเชื้อไวรัส	
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	
3.1 การสกัดและแยกส่วนสกัด/สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์.....	12
จากสมุนไพร	
3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านไวรัส, ฤทธิ์ความเป็นพิษ.....	15
ต่อเซลล์ปกติและฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง	
3.3 การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับลักษณะการออกฤทธิ์.....	19
ด้านเริ่มของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์	
3.4 การศึกษากลุ่มของสารประกอบเคมีใน.....	20
สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ด้านเริ่ม	

บทที่ 4 ผลการวิจัย

4.1 ส่วนสกัดหยาบ,/ ส่วนสกัด ที่มีฤทธิ์ต้านริมน.....	21
.และ/หรือมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง	
4.2 สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ DF372 ที่มีฤทธิ์ต้านริมน.....	32
4.3 การศึกษากลุ่มของสารประกอบเคมีใน DF372.....	35
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลการวิจัย.....	37

บรรณานุกรม.....	44
-----------------	----

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.....	48
--	----

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก. การเสนอผลงานไปสเตอร์.....	49
ภาคผนวก ข. การเตรียมสารละลาย.....	51

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 4.1 น้ำหนักแห้งและฤทธิ์ต้านริ้วรอยของ.....	21
ส่วนสกัดหยาบจากสมุนไพร 5 ต้น	
ตารางที่ 4.2 จำนวนส่วนสกัดที่ได้จากการแยกส่วนสกัดหยาบ.....	22
ด้วย Column chromatography ครั้งที่ 1	
ตารางที่ 4.3 ฤทธิ์ต้านริ้วรอยและฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ.....	23
ของ CF11-CF110	
ตารางที่ 4.4 ฤทธิ์ต้านริ้วรอยและฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ.....	23
ของ DF11-DF110	
ตารางที่ 4.5 ฤทธิ์ต้านริ้วรอยและฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ.....	23
ของ HF11-HF16	
ตารางที่ 4.6 ฤทธิ์ต้านริ้วรอยและฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ.....	24
ของ XF11-XF113	
ตารางที่ 4.7 ฤทธิ์ต้านริ้วรอยและฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ.....	24
ของ ZF11-ZF110	
ตารางที่ 4.8 IC ₅₀ และ TD ₅₀ (Vero) ของ CF11-CF19.....	25
ตารางที่ 4.9 IC ₅₀ , TD ₅₀ (Vero) และ TD ₅₀ (KB) ของ DF11-DF110.....	25
ตารางที่ 4.10 IC ₅₀ และ TD ₅₀ (Vero) ของ HF11, HF13-HF15.....	26
ตารางที่ 4.11 IC ₅₀ และ TD ₅₀ (Vero) ของ ZF13-ZF17.....	26
ตารางที่ 4.12 ฤทธิ์ต้านริ้วรอย, ฤทธิ์ความเป็นพิษของเซลล์ปกติ.....	27
และฤทธิ์ความเป็นพิษของเซลล์มะเร็งของ CF221-CF227	
ตารางที่ 4.13 ฤทธิ์ต้านริ้วรอย, ฤทธิ์ความเป็นพิษของเซลล์ปกติ.....	28
และฤทธิ์ความเป็นพิษของเซลล์มะเร็งของ CF231-CF236	
ตารางที่ 4.14 ฤทธิ์ต้านริ้วรอย, ฤทธิ์ความเป็นพิษของเซลล์ปกติ.....	28
และฤทธิ์ความเป็นพิษของเซลล์มะเร็งของ CF281-CF285	

ตารางที่ 4.15	ฤทธิ์ต้านริ้ว และฤทธิ์ความเป็นพิษของเซลล์ปกติ.....	28
	ของ CF291-CF296	
ตารางที่ 4.16	ฤทธิ์ต้านริ้ว และฤทธิ์ความเป็นพิษของเซลล์ปกติ.....	29
	ของ DF271-DF2710	
ตารางที่ 4.17	ฤทธิ์ต้านริ้ว และฤทธิ์ความเป็นพิษของเซลล์มะเร็ง.....	30
	ของ DF211-DF216	
ตารางที่ 4.18	ฤทธิ์ต้านริ้ว, ฤทธิ์ความเป็นพิษของเซลล์ปกติ และ.....	30
	ฤทธิ์ความเป็นพิษของเซลล์มะเร็งของ DF221-DF226	
ตารางที่ 4.19	ฤทธิ์ต้านริ้ว, ฤทธิ์ความเป็นพิษของเซลล์ปกติ และ.....	30
	ฤทธิ์ความเป็นพิษของเซลล์มะเร็งของ DF231-DF235	
ตารางที่ 4.20	ฤทธิ์ต้านริ้ว และฤทธิ์ความเป็นพิษของเซลล์ปกติ.....	31
	ของ DF371-DF377	
ตารางที่ 4.21	ผลของ DF372 ต่อปริมาณเชื้อริ้ว ที่มีในเซลล์, นอกเซลล์.....	33
	และที่มีในเซลล์ทั้งหมด	
ตารางที่ 4.22	ฤทธิ์ฆ่าเชื้อริ้ว HSV-1 และ HSV-2 ของ DF372.....	35

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 2.1 โครงสร้างเคมีของ ACV และอนุพันธ์.....	6
รูปที่ 2.2 <i>Croton cascarilloides</i> Raeusch.....	8
รูปที่ 2.3 <i>Dunbaria bella</i> Prain.....	8
รูปที่ 2.4 <i>Hymenocardia punctata</i> Wall. ex. Lindl.	9
รูปที่ 2.5 <i>Xylopiá vielana</i> Pierre.....	9
รูปที่ 2.6 <i>Ziziphus rugosa</i> Lamk. var. <i>rugosa</i>	10
รูปที่ 3.1 แผนการวิจัย และลำดับขั้นตอนการวิจัย.....	14
รูปที่ 4.1 ฤทธิ์ต้านเริมของ DF372 ด้วยวิธี Yield assay.....	32
รูปที่ 4.2 ฤทธิ์ต้านเริม HSV-1 (ก.) และ HSV-2 (ข.) ของ DF372.....	34
เมื่อเซลล์เพาะเลี้ยงถูกทำให้ติดเชื้อ 0.01 และ 1 pfu/cell (moi = 0.01 และ 1)	
รูปที่ 4.3 ฤทธิ์ต้านเริมเมื่อใช้ A549 และ Vero เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงเริม.....	35
รูปที่ 4.4 Chromatogram ของ DF372 ที่ใช้.....	36
Hexane : Ethyl acetate (1:2) เป็นตัวพา แล้วตรวจภายใต้แสง UV	
ที่ความยาวคลื่น 254 (ก) และ 366 (ข) nm และตรวจสอบด้วย	
Saturated iodine vapor (ค)	
รูปที่ 5.1 แผนภูมิสรุปฤทธิ์ต้านเริม, Selectivity.....	40
และฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของส่วนสกัด และสารสกัดที่บริสุทธิ์ที่ได้	
จากการแยกส่วนของสารสกัดหยาบจาก <i>Croton cascarilloides</i> Raeusch (ก),	
<i>Dunbaria bella</i> Prain (ข), <i>Hymenocardia punctata</i> Wall. ex. Lindl. (ค),	
<i>Xylopiá vielana</i> Pierre (ค) และ <i>Ziziphus rugosa</i> Lamk. var. <i>rugosa</i> (ค)	
ด้วยเทคนิค Chromatography	

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรคเริมที่อวัยวะเพศ (Genital herpes) เป็นโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ พบได้ทั่วไปในทุกประเทศและมีอัตราการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วถึงร้อยละ 30 ในช่วงระยะ 10-20 ปีที่ผ่านมา (Johnson et al. 1989, Cowan et al. 1994, Forsgren et al. 1994, Garland et al. 1995, Fleming et al. 1997) โรคนี้ส่วนใหญ่มักเกิดจากเชื้อเริม Herpes simplex (HSV) ประเภท 2 (HSV-2) หรือเกิดได้จากเชื้อเริม Herpes simplex ประเภท 1 (HSV-1) เมื่อมีการติดเชื้อเริมครั้งแรก (Primary infection) อาจไม่พบอาการหรือมีอาการของโรคปรากฏ นอกจากนี้เชื้อเริมยังสามารถแอบแฝงตัว (Latency) ในปมประสาทได้ ในภาวะที่มีสิ่งเร้ามากระตุ้นที่ปมประสาทหรือผิวหนัง เชื้อเริมที่แอบแฝงสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อเริมซ้ำ (reinfection) โดยมีแผลเริมที่อวัยวะเพศ (เป็นโรคซ้ำ, recurrent infection) หรือ ไม่พบแผลเริมปรากฏแต่พบเฉพาะเชื้อเริมที่บริเวณอวัยวะเพศ และมีผลเลือดบวกต่อเชื้อเริม (Asymptomatic viral shedding) จากการศึกษาพบว่าในรายที่เคยเป็นเริมที่อวัยวะเพศมาแล้วหนึ่งครั้ง มีโอกาสจะเป็นโรคซ้ำอีก 4-5 ครั้งต่อปี และประมาณร้อยละ 20 ที่มีอัตราการเป็นซ้ำได้มากกว่า 6 ครั้งต่อปี (อาจถึง 10 ครั้งต่อปี) (Benedetti et al. 1994) การติดเชื้อเริมซ้ำจึงก่อให้เกิดความรำคาญ มีผลกระทบต่อสุขภาพร่างกายและจิตใจต่อคนไข้ และเป็นสาเหตุหลักในการติดต่อโรค ไปสู่สามี/ภรรยาของคนไข้และทารกแรกคลอด ทำให้โรคเริมที่อวัยวะเพศเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญต่อประเทศ

นอกจากนี้การศึกษาทางระบาดวิทยายังพบว่าการติดเชื้อเริมที่อวัยวะเพศ เพิ่มประสิทธิภาพและเพิ่มความเสี่ยงในการติดต่อของโรคเอดส์ (Stamm et al. 1988, Holmberg et al. 1988, Keet et al. 1990, Hook et al. 1992, Gwanzura et al. 1998) Wasserheit (Wasserheit 1992), Dickerson และ คณะ (Dickerson et al. 1996) สันนิษฐานว่าการบวมของแผลเริมเพิ่มจำนวนเซลล์ที่ง่ายต่อการติดเชื้อเอดส์ และอาจเพิ่มจำนวนเชื้อเอดส์ในสารหลั่งจากอวัยวะเพศ รายงานวิจัยพบความสัมพันธ์โดยตรงระหว่างเลือดบวกต่อเชื้อเริมและต่อเชื้อเอดส์ (Chen et al. 2000) Russell และ คณะ รายงานว่าประชากรเกย์ที่มีเลือดบวกต่อเชื้อเอดส์ พบเลือดบวกต่อเชื้อเริม HSV-2 สูงถึงร้อยละ 60 และสูงกว่าในรายที่มีเลือดลบต่อเชื้อเอดส์ถึงสามเท่า (Russell et al. 2001) เช่นเดียวกับรายงานการศึกษาในประเทศแอฟริกาพบว่า คนซึ่งติดเชื้อเอดส์มีการติดเชื้อเริม HSV-2 รวมด้วยถึงมากกว่าร้อยละ 90 (Gwanzura et

al. 1998, Obasi et al. 1999) หนึ่งในคนไข้เอดส์ที่เป็นโรคเริ่มที่อวัยวะเพศ ระยะเวลาที่แผลหายต้องใช้เวลานานกว่าโดยเฉพาะรายที่มีอาการรุนแรง และมีอัตราการเป็นโรคซ้ำบ่อยครั้งกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับในคนไข้ที่มีภูมิคุ้มกันปกติ (Ruiter and Thin 1994, Pottage and Kessler 1998)

จากการศึกษาและประมาณการโดยสำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ (เกียรติ 2540) เชื่อว่าในปี พ.ศ. 2538 ผู้ติดเชื้อเอดส์ในประเทศไทย มีประมาณ 930,000 ราย และคาดการณ์ว่า ในปี พ.ศ. 2548 จะมีผู้ติดเชื้อเอดส์ในประเทศไทย ถึงประมาณ 1,827,000 ราย โดยมีแนวโน้มในทศวรรษหน้าของประเทศไทยจะมีผู้ติดเชื้อเอดส์ คิดเป็นประมาณร้อยละ 3 ของประชากรไทย จากข้อมูลที่กำลังมาข้างหน้าทางหนึ่งซึ่งน่าจะได้ผลดีในการลดอัตราการติดเชื้อเอดส์ได้ คือการรักษาและควบคุมการแพร่กระจายโรคเริ่มที่อวัยวะเพศ

ปัจจุบันการใช้ยาต้านเอดส์ได้รับการยอมรับว่าเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพดีในการรักษาและระงับการดำเนินของโรค ยาที่ได้รับการรับรองให้ใช้คือ Aciclovir, Valaciclovir และ Famciclovir (Stanberry et al. 1999) โดยให้รับประทานเมื่อเป็นโรคครั้งแรก (First episode treatment) และเมื่อเป็นโรคซ้ำเฉพาะครั้ง (Episodic Treatment of recurrent episode) ตลอดจนรับประทานอย่างต่อเนื่อง (Continuous suppressive therapy) การใช้ยาดังกล่าวอย่างต่อเนื่องจะช่วยป้องกันการกลับเป็นโรคซ้ำ และยังมีประสิทธิภาพดีต่อการลดอัตราการเกิดและความรุนแรงของการกลับเป็นโรคซ้ำ ตลอดจนช่วยลดอัตราการพบ Asymptomatic viral shedding ซึ่งเชื่อว่าจะช่วยในการปรับเปลี่ยนการติดต่อของโรค อย่างไรก็ตามทั้งสามล้วนนำเข้าจากประเทศและมีราคาแพงมาก ทำให้การรักษาโรคต้องใช้ค่าใช้จ่ายสูงมาก ผู้ป่วยจะรักษาเฉพาะเมื่อโรคมีอาการรุนแรง และอาจไม่สามารถใช้ยาดังกล่าวได้ตามที่กำหนด ดังนั้นผู้วิจัยประสงค์จะศึกษาฤทธิ์ต้านเอดส์ของสมุนไพรพื้นบ้านจังหวัดอุบลราชธานีซึ่งเป็นภูมิปัญญาท้องถิ่น โดยคัดเลือกจากสมุนไพรท้องถิ่นที่มีใช้ในกลุ่มแพทย์พื้นบ้านจังหวัดอุบลราชธานีอย่างแพร่หลายในการรักษาโรคติดเชื้อไวรัส จำนวน 5 ต้น คือ *Croton cascarilloides* Raeusch, *Dunbaria bella* Prain, *Hymenocardia punctata* Wall. ex. Lindl., *Xylopia vielana* Pierre และ *Ziziphus rugosa* Lamk. var. *rugosa* ซึ่งเป็นพืชที่ขึ้นเองในทุ่งนาจังหวัดอุบลราชธานีและโตเร็ว และมีฤทธิ์ต้านเอดส์ในหลอดทดลองจากการศึกษาเบื้องต้นโดย พรรณรัตน์ และ คณะ (Unpublished data) เพื่อพัฒนาศักยภาพของสมุนไพรไทยพื้นบ้านเป็นยาต้านเอดส์ เพิ่มโอกาสในการรักษาของผู้ป่วย ลดการแพร่กระจายของโรคเริ่มที่อวัยวะเพศและโรคเอดส์ รวมถึงเพื่อทดแทนยาที่นำเข้าจากประเทศ ตลอดจนนำประเทศไปสู่การพึ่งพาตนเองได้มากขึ้น นอกจากนี้ยังนำไปสู่การอนุรักษ์พันธุ์ไม้ ส่งเสริมให้ปลูกมากขึ้น และ/หรือทำการศึกษาวิจัยให้มีการขยายพันธุ์ให้ได้ปริมาณมากขึ้นหากผลจากการศึกษาพบว่ามีความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาเป็นยาต้านเอดส์

1.2 วัตถุประสงค์

- 1.2.1 เพื่อแยกสารที่แสดงฤทธิ์ต้านเริ่มของสมุนไพรพื้นบ้านจังหวัดอุบลราชธานีในรูปสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์
 - 1.2.2 เพื่อศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับลักษณะการออกฤทธิ์ต้านเริ่มของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต้านเริ่ม
 - 1.2.3 เพื่อหากลุ่มของสารประกอบในสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต้านเริ่ม
 - 1.2.4 เพื่อแยกสารแสดงฤทธิ์ต้านมะเร็ง* ในรูปส่วนสกัดจากส่วนสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ต้านเริ่ม
- * เนื่องจากมีความเป็นไปได้ที่อาจได้ส่วนสกัดที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

- 1.3.1 เพื่อได้สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต้านเริ่มจากสมุนไพรพื้นบ้านจังหวัดอุบลราชธานี
- 1.3.2 เพื่อทราบการออกฤทธิ์ต้านเริ่มเบื้องต้นของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต้านเริ่ม
- 1.3.3 เพื่อหากลุ่มของสารประกอบในสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต้านเริ่ม
- 1.3.4 เพื่อได้ส่วนสกัดที่แสดงฤทธิ์ต้านมะเร็งจากส่วนสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ต้านเริ่ม

บทที่ 2

บทบทวนวรรณกรรม

2.1 เชื้อเริม HSV

เชื้อเริม HSV เป็นสมาชิกใน family Herpesviridae ซึ่งเป็น family ใหญ่ประกอบด้วยสมาชิกเกือบร้อยชนิด (Roizman 1996) มีจีโนมเป็น DNA สายคู่และเป็นเส้นตรง สามารถหลบแฝงตัว (latent) ได้ในปมประสาท อนุภาคของเชื้อเริม HSV ประกอบด้วย DNA ยีโนมขนาด 152-155 kb ที่หุ้มด้วย capsid ซึ่งจัดเรียงตัวแบบ icosahedral symmetry Nucleocapsid (capsid และ DNA) มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 125 nm และถูกล้อมรอบด้วย tegument (amorphous matrix) โดยชั้นนอกสุดคือ envelop ที่เป็นไขมัน 2 ชั้น (lipid bilayer) ประกอบด้วยไกลโคโปรตีน เมื่อรวมส่วนประกอบทั้งหมดแล้วอนุภาคเชื้อเริมมีขนาด 200-300 nm

เชื้อเริม HSV แบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ เชื้อเริม HSV ประเภทที่ 1 (HSV-1) และ ประเภทที่ 2 (HSV-2) เชื้อเริมทั้งสองประเภทเมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์มีลักษณะเหมือนกัน มีส่วนประกอบของ DNA ที่เหมือนกันถึงร้อยละ 50 โดย DNA ยีโนมของเชื้อเริม HSV-1 และ HSV-2 มีขนาด 152 และ 155 kb ตามลำดับ เชื้อเริมดังกล่าวต่างกันในด้านที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ endonuclease, ขนาดโปรตีนของไวรัส, antigenicity รวมถึงความคงตัวต่ออุณหภูมิ (thermal stability)

เชื้อเริม HSV-1 และ HSV-2 ทำให้เกิดโรคและลักษณะอาการทางคลินิกได้หลายแบบ เช่น แผลที่ปาก ตา สมอ อวัยวะสืบพันธุ์ และโรคเริมในเด็กแรกเกิด (สรวงศ์ 2540) ส่วนมากแผลที่เกิดจาก HSV-1 มักพบบริเวณเหนือเอวขึ้นมา ส่วนแผลที่ต่ำกว่าเอวมักเกิดจาก HSV-2 อย่างไรก็ตามไวรัสสามารถพบ HSV-1 บริเวณต่ำกว่าเอวและ HSV-2 บริเวณเหนือเอวได้

โรคเริมที่พบบ่อยได้แก่ โรคเริมที่ปาก และโรคเริมที่อวัยวะเพศ (Genital herpes) โดยโรคเริมที่อวัยวะเพศจัดเป็นโรคที่เป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญ

2.2 โรคเริมที่อวัยวะเพศ

เป็นโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์เป็นหลัก โรคเริมที่อวัยวะเพศโดยส่วนใหญ่ (ร้อยละ 80) มักเกิดจาก HSV-2 หรือเป็นสาเหตุจาก HSV-1 (สรวงศ์ 2540) พบได้ทั่วไปในทุกประเทศและมีอัตราการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงระยะ 10-20 ปีที่ผ่านมา ถึงร้อยละ 30 (Johnson et al. 1989; Fleming et al. 1997, Cowan et al. 1994, Forsgren et al. 1994, Garland et al.

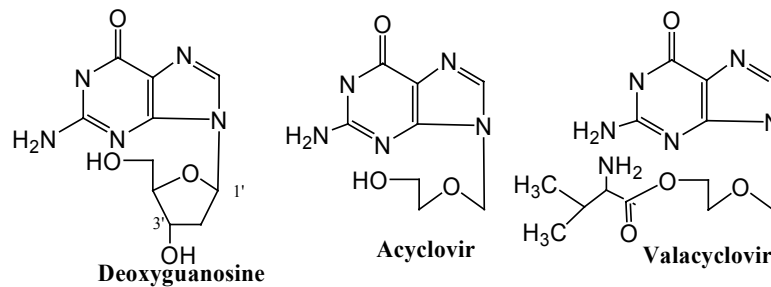
1995) หลังจากเชื้อเริ่มเข้าสู่ร่างกายทางเยื่อหรือรอยถลอกที่ผิวหนังประมาณ 3-7 วัน จะทำให้เกิดการติดเชื้อครั้งแรก (primary infection) ซึ่งอาจไม่พบอาการหรือมีอาการของโรค ปรากฏ ทั้งนี้ขึ้นกับภูมิคุ้มกันของแต่ละบุคคล (สุรางค์ 2540) ในสภาวะที่ร่างกายไม่สามารถกำจัดเชื้อเริ่มให้หมดจากร่างกายได้ เชื้อเริ่มสามารถหลบแฝงตัวในปมประสาท เมื่อภูมิคุ้มกันลดลงและ/หรือมีสิ่งเร้ามากระตุ้นที่ปมประสาทหรือผิวหนัง เชื้อเริ่มจะออกจากบริเวณที่ซ่อนตัวมาเพิ่มจำนวน โดยไม่พบแผลเริ่มปรากฏแต่พบเฉพาะเชื้อเริ่มที่บริเวณอวัยวะ เพศ (asymptomatic viral shedding) หรือเป็นโรคซ้ำ (recurrent infection)

รอยโรคเริ่มที่เกิดจาก HSV-1 และ HSV-2 มีลักษณะคล้ายคลึงกัน กล่าวคือ ภายใน 2-3 วันแรกมีกลุ่มตุ่มแดงนูน (papule) ที่บริเวณอวัยวะเพศ ท่อปัสสาวะ จากนั้นขนาดตุ่มใหญ่ขึ้น และมีน้ำใส (vesicle) แล้วตุ่มน้ำใสจะแตกและเกิดเป็นแผล โรคเริ่มที่อวัยวะเพศซึ่งเป็นครั้งแรก มักมีอาการดำเนินโรคนานประมาณ 16-21 วัน ระยะโรคในผู้ชายโดยทั่วไปจะสั้นกว่าผู้หญิง อาการของการติดเชื้อครั้งแรกจะรุนแรงกว่าอาการที่เกิดการติดเชื้อซ้ำ จากการศึกษที่ผ่านมามีพบว่าในรายที่เคยเป็นเริ่มที่อวัยวะเพศมาแล้วหนึ่งครั้ง มีโอกาสจะเป็นโรคซ้ำอีก 4-5 ครั้งต่อปี และประมาณร้อยละ 20 ที่มีอัตราการเป็นซ้ำได้มากกว่า 6 ครั้งต่อปี (อาจถึง 10 ครั้งต่อปี) (Benedetti et al. 1994) การติดเชื้อเริ่มซ้ำจึงก่อให้เกิดความรำคาญ มีผลกระทบต่อสุขภาพร่างกายและจิตใจต่อคนไข้ และเป็นสาเหตุหลักในการติดต่อโรค ไปสู่สามี/ภรรยาของคนไข้และทารกแรกคลอด

นอกจากนี้การศึกษาทางระบาดวิทยายังพบว่าการติดเชื้อเริ่มที่อวัยวะเพศ เพิ่มประสิทธิภาพและเพิ่มความเสี่ยงในการติดต่อของโรคเอดส์ (Gwanzura et al. 1998, Hook et al. 1992, Stamm et al. 1988, Holmberg et al. 1988, Keet et al. 1990) Russell และ คณะ (Russell et al. 2001) รายงานว่าประชากรเกย์ที่มีเลือดบวกต่อเชื้อเอดส์ พบเลือดบวกต่อเชื้อเริ่ม HSV-2 สูงถึงร้อยละ 60 และสูงกว่าในรายที่มีเลือดลบต่อเชื้อเอดส์ถึงสามเท่า เช่นเดียวกับรายงานการศึกษาในประเทศแอฟริกา พบว่า คนซึ่งติดเชื้อเอดส์มีการติดเชื้อเริ่ม HSV-2 ร่วมด้วยถึงมากกว่าร้อยละ 90 (Gwanzura et al. 1998, Obasi et al. 1999) อนึ่งในคนไข้เอดส์ที่เป็นโรคเริ่มที่อวัยวะเพศ ระยะเวลาที่แผลหายต้องใช้เวลานานกว่าโดยเฉพาะรายที่มีอาการรุนแรง และมีอัตราการเป็นโรคซ้ำบ่อยครั้งกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับในคนไข้ที่มีภูมิคุ้มกันปกติ (Ruiter and Thin 1994, Pottage and Kessler 1995)

2.3 ยาต้านเชื้อเริม

ยาต้านเริมที่รับรองให้ใช้ในปัจจุบัน ได้แก่ Idoxuridine, Vidarabine, Foscarnet, Interferon, Acyclovir, Valacyclovir และ Famciclovir ปัจจุบันยาที่เป็น drug of choice ในการรักษาโรคเริม คือ Acyclovir



รูปที่ 2 . 1 โครงสร้าง

Acyclovir (ACV) (รูปที่ 2.1)

เป็นอนุพันธ์ของ deoxyguanosine ซึ่งน้ำตาลถูกแทนที่ด้วยส่วนที่ไม่เป็นวงเชื่อมต่อกัน (acyclic ring) และ ไม่มีหมู่ -OH ที่ตำแหน่ง 3' (Bastow and Akanitapichat 1997) ACV ออกฤทธิ์ต้านเริมได้ต้องถูกเปลี่ยนเป็น ACV monophosphate โดยเอนไซม์ thymidine kinase ของเชื้อเริม ตามด้วย ACV di- และ triphosphate โดยเอนไซม์ cellular nucleotide kinase จากนั้น ACV triphosphate จะแข่งกับ deoxyguanosine triphosphate ในการจับกับเอนไซม์ DNA polymerase ของเชื้อเริม ทำให้การสร้าง DNA ของเชื้อเริมถูกยับยั้ง นอกจากนี้ ACV monophosphate ยังทำให้ไม่มีการสร้างพันธะ phosphodiester กับสาย DNA เนื่องจาก ACV ไม่มี 3'-OH เป็นผลให้การต่อสาย DNA ของเชื้อเริม (DNA elongation) ถูกยับยั้ง

ACV จัดเป็นยาที่ปลอดภัยในการใช้ เพราะออกฤทธิ์เฉพาะเจาะจงต่อเชื้อเริม การบริหารยาทำได้ทั้งในรูปแบบรับประทาน ฉีดเข้าหลอดเลือดดำ และใช้ทาเฉพาะที่ แต่มีข้อด้อยคือ ต้องใช้วันละ 5 ครั้ง ราคาแพง และชีวประสิทธิผล (bioavailability) ของ ACV เมื่อให้รับประทาน มีค่าต่ำ (ร้อยละ 12-20) จึงได้มีการพัฒนาเป็น Valacyclovir (รูปที่ 2.1) ซึ่งเป็น Prodrug ในรูป L-valyl ester เมื่อให้รับประทาน Valacyclovir จะมีชีวประสิทธิผลสูงถึงร้อยละ 54 และถูกดูดซึมแล้วปลดปล่อยให้ ACV ที่ลำไส้และ/หรือตับ

นอกจากนี้มียาทางการแพทย์คือยา ACV และยังพบการดื้อยาต่อยาต้านเชื้อเริม Foscarnet Famciclovir ในเชื้อเริมซึ่งไม่ตอบสนองต่อ ACV (Coen 1991, Pelosi et al. 1998)

2.4 สมุนไพรท้องถิ่นจังหวัดอุบลราชธานีที่กลุ่มแพทย์พื้นบ้านใช้รักษาโรคติดเชื้อไวรัส

Croton cascarilloides Raeusch (รูปที่ 2.2) เป็นพืชไม้ต้นขนาดเล็กหรือไม้พุ่มอยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae (นันทวัน และ อรุณ 2541) มีชื่อกลางว่า “เปล่าน้ำเงิน” หรือชื่อเรียกในจังหวัดอุบลราชธานีว่า “พระเจ้าห้าพระองค์” (วงศ์สถิตย์ และ พร้อมจิต 2541) มีสรรพคุณทางยาไทย คือ ตันและแก่นใช้บำรุงโลหิตสตรี เปลือกต้นใช้บำรุงโลหิตสตรี แก้วไขและแก้ระดูพิการ เปลือกลูกใช้แก้ไขและแก้ร้อนในกระหายน้ำ รากใช้แก้ไข (นันทวัน และ อรุณ 2541) แพทย์พื้นบ้านจังหวัดอุบลราชธานี (วงศ์สถิตย์ และ พร้อมจิต 2541) นิยมใช้ส่วนรากต้มน้ำดื่มเป็นยาแก้ไขโรคอีสุกอีใส ปัจจุบันยังไม่มีรายงานฤทธิ์ด้านเริ่มของพืชนี้ในหลอดทดลองและ/หรือในสัตว์ทดลอง จากการศึกษาเบื้องต้นโดย พรรณรัตน์ และ คณะ (Unpublished data) พบว่าส่วนสกัดหยาบจากรากของเปล่าน้ำเงิน ที่ใช้ Methanol และ Ethyl acetate สกัด ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อเริ่มได้ถึงร้อยละ 100 และไม่พบความเป็นพิษของส่วนสกัดหยาบที่ชัดเจน

Dunbaria bella Prain (รูปที่ 2.3) เป็นพืชในวงศ์ Fabaceae มีชื่อกลางว่า “ขางครั่ง” หรือชื่อเรียกในจังหวัดอุบลราชธานีว่า “เถาแดงคก, คางเลื่อย” (วงศ์สถิตย์ และ จวีวรรณ 2541) แพทย์พื้นบ้านจังหวัดอุบลราชธานีนิยมใช้ส่วนรากต้มน้ำดื่ม และฝนน้ำรับประทานแก้โรคคางทูม ปัจจุบันยังไม่มีรายงานฤทธิ์ด้านเริ่มของพืชนี้ในหลอดทดลองและ/หรือในสัตว์ทดลอง จากการศึกษาเบื้องต้น (พรรณรัตน์ และ คณะ, Unpublished data) พบว่าส่วนสกัดหยาบจากรากที่ใช้ Methanol และ Ethyl acetate สกัดที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งเชื้อเริ่มได้ถึงร้อยละ 100 นอกจากนี้ไม่พบความเป็นพิษของส่วนสกัดหยาบที่ชัดเจน เพราะไม่มีการหลุดลอกของเซลล์เพาะเลี้ยงซึ่งเป็นเซลล์ปกติ

Hymenocardia punctata Wall. ex. Lindl. (รูปที่ 2.4) เป็นพืชไม้ยืนต้นขนาดเล็กหรือไม้พุ่มอยู่ในวงศ์ Hymenocardiaceae (นันทวัน และ อรุณ 2542) มีชื่อกลางว่า “แฟบน้ำ” หรือชื่อเรียกในจังหวัดอุบลราชธานีว่า “หูลิง, หัวลิง” (วงศ์สถิตย์ และ นพมาศ 2540) มีสรรพคุณทางยาไทยคือ เนื้อไม้ใช้แก้ปวดเมื่อยตามร่างกาย ขับปัสสาวะ แก้กษัย ถ่านไม้ใช้แก้พิษทั้งปวง แก้วไขเชื่องซึม (นันทวัน และ อรุณ 2542) แพทย์พื้นบ้านจังหวัดอุบลราชธานีนิยมใช้ส่วนลำต้นต้มน้ำดื่ม แก้วโรคอีสุกอีใส (วงศ์สถิตย์ และ นพมาศ 2540) ปัจจุบันยังไม่มีรายงานฤทธิ์ด้านเริ่มของพืชนี้ในหลอดทดลองและ/หรือในสัตว์ทดลอง พรรณรัตน์ และ คณะ (Unpublished data) พบว่าส่วนสกัดหยาบจากลำต้นที่ใช้ Methanol และ Ethyl acetate สกัด สามารถยับยั้งเชื้อเริ่มได้ถึงร้อยละ 100 ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งไม่สังเกตพบความเป็นพิษของส่วนสกัดหยาบที่ชัดเจนต่อเซลล์เพาะเลี้ยงปกติ



รูปที่ 2 . 2 *Croton cascarilloides* Raeusch



รูปที่ 2 . 3 *Dunbaria bella* Prain



รูปที่ 2 . 4 *Hymenocardia punctata* Wall. ex. Lindl.



รูปที่ 2 . 5 *Xylopiavielana* Pierre



รูปที่ 2 . 6 *Ziziphus rugosa* Lamk. var. *rugosa*

Xylopi velana Pierre (รูปที่ 2.5) เป็นพืชไม้ยืนต้นอยู่ในวงศ์ Annonaceae (นพมาศ และ คณะ 2542) มีชื่อกลางว่า “กล้วยน้อย” หรือชื่อเรียกในจังหวัดอุบลราชธานีว่า “ตัดทาง” (วงศ์ สติติย และ จวีวรรณ 2541) ประเทศเวียดนามใช้ส่วนต้นของ *Xylopi velana* เป็นยาพื้นบ้าน ในการรักษาโรคมะเร็งและลดไข้ (Nieto et al. 1976) ยาพื้นบ้านอีสานใช้ ดอก เข้าเกสร ร้อย แปะ ประยาลหอม บำรุงหัวใจ (วงศ์ สติติย และ นพมาศ 2540, นพมาศ และ คณะ 2542) แพทย์พื้นบ้านจังหวัดอุบลราชธานีนิยมใช้ส่วนเปลือกต้นแช่น้ำดื่ม แช่น้ำอาบ แก้อาการไอ ขับเสมหะ ปัจจุบันยังไม่มีรายงานฤทธิ์ต้านมะเร็งของพืชนี้ในหลอดทดลองและ/หรือในสัตว์ทดลอง การศึกษาเบื้องต้นโดย พรพรรณรัตน์ และ คณะ (Unpublished data) พบว่าส่วนสกัดหยาบจากเปลือกต้นที่ สกัดด้วย Methanol และ Ethyl acetate ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถ ยับยั้งเชื้อเริ่มได้ถึงร้อยละ 100 และไม่พบความเป็นพิษของส่วนสกัดหยาบที่ชัดเจนต่อเซลล์ เพาะเลี้ยงปกติ

Ziziphus rugosa Lamk. var. *rugosa* (รูปที่ 2.6) เป็นพืชในวงศ์ Rhamnaceae (วงศ์ สติติย และ จวีวรรณ 2541) มีชื่อกลางว่า “มะควัด” หรือชื่อเรียกในจังหวัดอุบลราชธานีว่า “หมาก มาย” ในประเทศอินเดีย แพทย์พื้นบ้านใช้ *Ziziphus rugosa* ส่วนเปลือกที่แห้งรักษาอาการ ท้องร่วง และรักษาอาการปวดระดู (Tripathy et al. 1988) ใช้ส่วนต้นที่แห้งรักษาอาการปวด ระดู (Kulshreshtha and Rastogi 1972) นอกจากนี้ยังใช้ส่วนเปลือกของลำต้นเป็นยาขับ ปัสสาวะ (Bhandary et al. 1995) แพทย์พื้นบ้านจังหวัดอุบลราชธานีนิยมใช้ส่วนราก (วงศ์ สติติย และ จวีวรรณ 2541) และบางกลุ่มใช้ส่วนเปลือกต้น รักษาโรคผิวหนัง รายงานการ

ทดสอบฤทธิ์ทางชีววิทยาของ *Ziziphus rugosa* พบว่า ส่วนสกัดจากเปลือกแห้งขนาด 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมเมื่อฉีดเข้าในช่องท้อง (Intraperitoneal) ของกระต่าย มีฤทธิ์ลดความดัน (Khosa et al. 1983) ส่วนสกัดจากต้นลดอาการเกร็งของกล้ามเนื้อ (Antispasmodic activity) ในหนู Guinea pig (Bhakuni et al. 1969) แต่ไม่พบฤทธิ์ในการลดปวด ลดการอักเสบ ต้านไวรัสชนิด Vaccinia ขับปัสสาวะ หรือลดอาการเกร็งของกล้ามเนื้อในส่วนสกัดที่ได้จากใบ (Abraham et al. 1986) ปัจจุบันยังไม่มีรายงานฤทธิ์ต้านริ้วของพืชนี้ในหลอดทดลองและ/หรือ ในสัตว์ทดลอง พรรณรัตน์ และ คณะ (Unpublished data) พบว่าส่วนสกัดหยาบจากเปลือก ต้นที่สกัดด้วย Methanol และ Ethyl acetate สามารถยับยั้งเชื้อเริ่มได้ถึงร้อยละ 100 ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งไม่สังเกตพบความเป็นพิษของส่วนสกัดหยาบที่ชัดเจน ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงปกติ

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

ขั้นตอนทดลองในโครงการวิจัย (รูปที่ 3.1) มีดังนี้

1. การเตรียมส่วนสกัดหยาบจากสมุนไพรและทดสอบฤทธิ์ต้านเริ่ม
 2. การแยกสารแสดงฤทธิ์ต้านเริ่มและ/หรือฤทธิ์ต้านมะเร็ง* ในรูปส่วนสกัดจากส่วนสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ต้านเริ่ม
 3. การแยกสารแสดงฤทธิ์ต้านเริ่มในรูปสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากส่วนสกัดที่มีฤทธิ์ต้านเริ่ม
 4. การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับลักษณะการออกฤทธิ์ต้านเริ่มของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์
 5. การศึกษากลุ่มของสารประกอบเคมีในสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต้านเริ่ม
- * เนื่องจากมีความเป็นไปได้ที่อาจได้ส่วนสกัดที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง

3.1 การสกัดและแยกส่วนสกัด/สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากสมุนไพร

3.1.1 วัสดุและอุปกรณ์

- Methanol
- Dichloromethane
- Hexane
- Ethyl acetate
- Anisaldehyde 0.5%
- Dragendorff reagent
- Ferric chloride TS
- Ninhydrin 1%
- Silica gel 0.035-0.070 mm และ 0.060-0.200 mm
- Silica gel60 F254 (aluminium sheet)
- Column ขนาด 2 cm x 50 cm, 2 cm x 100 cm , 4 cm x 90 cm, และ 6 cm x 80 cm
- Sephadex LH20
- เครื่องบด
- Hot air oven (Nuaire, USA)

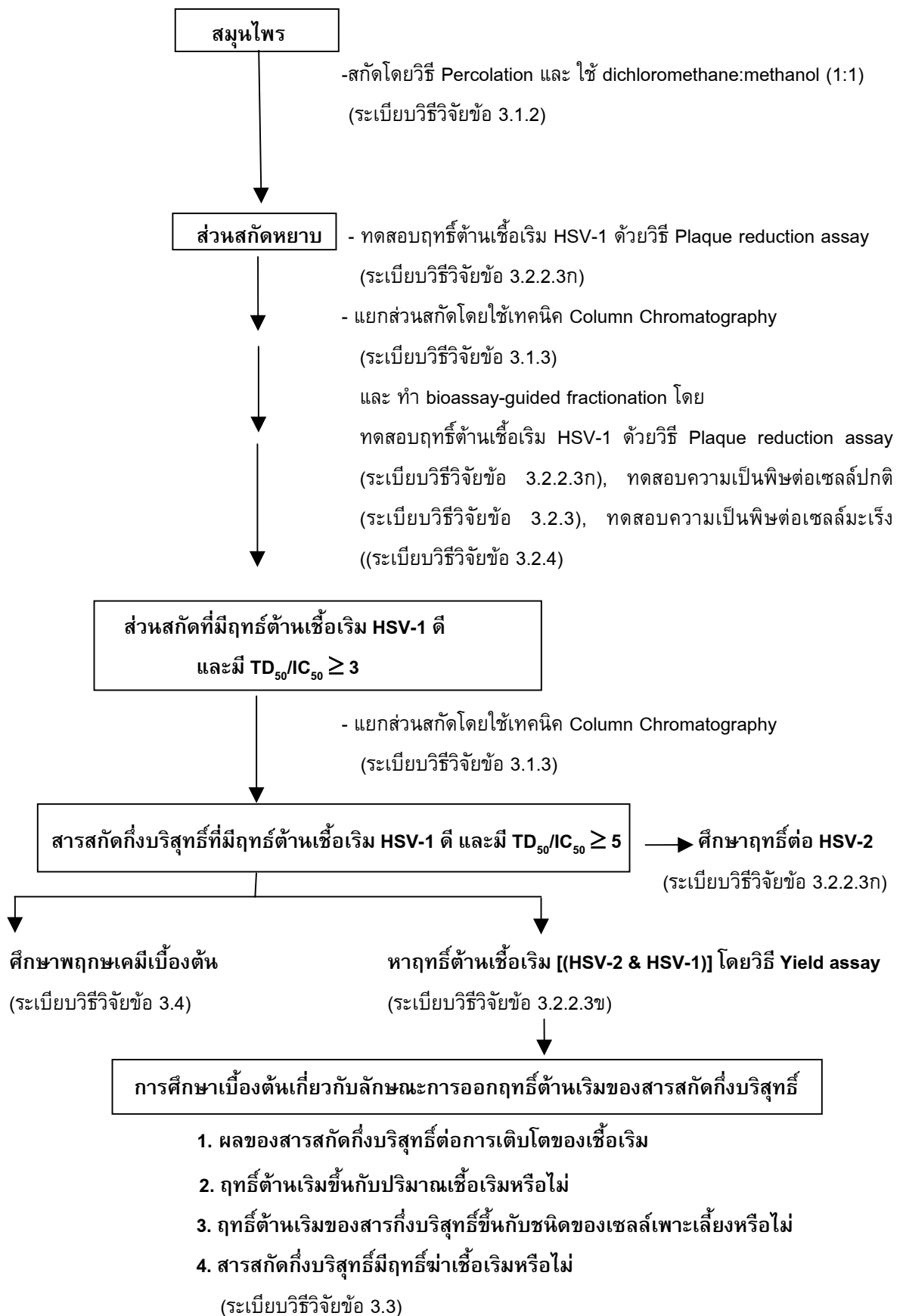
- Percolator
- Thin layer chromatography (TLC) densitometer (Switzerland)
- Rotary evaporator
- Separatory funnel

3.1.2 การเตรียมส่วนสกัดหยาบ (crude extracts) จากสมุนไพร

- ล้างสมุนไพรและผึ่งแดดให้แห้ง แล้วหั่นและบดเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 ° C
- นำสมุนไพรจำนวน 1200 กรัมต่อต้น บรรจุใน percolator เติมตัวทำละลาย dichloromethane:methanol (1:1) หมักนาน 24 ชั่วโมง ไซสารสกัดออกช้าๆ ในอัตรา 1 ml ต่อนาที เติมตัวทำละลายเหนือผงพืชอย่างปล่อยให้แห้ง และเก็บสารสกัดจนกระทั่งสารสกัดใส โดยใช้ dichloromethane:methanol (1:1) ปริมาณ 8000 ml ต่อสมุนไพรหนึ่งชนิด นำสารละลายสกัดที่ได้ไประเหยแห้งด้วย rotary evaporator เก็บส่วนสกัดหยาบที่ขังได้ในขวดสีชา

3.1.3 การแยกส่วนสกัด/สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากส่วนสกัดหยาบ/ส่วนสกัด

- ผสม Stationary phase ที่จะใช้* กับ Mobile phase ที่ใช้อันดับแรก จนได้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเทลงใน Column จน Stationary phase อัดแน่นอย่างต่อเนื่องสม่ำเสมอ
- (* ใช้ Stationary phase 30 กรัมต่อน้ำหนักหยาบ/ส่วนสกัด 1 กรัม)
- เติม methanol ลงในส่วนสกัดหยาบ/ส่วนสกัดแห้ง ในปริมาณที่เพียงพอให้ส่วนสกัดหยาบ/ส่วนสกัดแห้งกระจายตัวเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นบดส่วนผสมจนแห้ง แล้วเทลงใน Column ที่เตรียมไว้
- เติม Mobile phase แล้วไซสารสกัดออกช้าๆ ในอัตรา 1 ml ต่อนาที เก็บตัวอย่างละ 10-50 ml/beaker
- เก็บสารสกัดจนสังเกตเห็นภายใน Column ใส
- นำสารสกัดไประเหยแห้ง จากนั้นรวมสารสกัดย่อยๆ เข้าด้วยกันเป็นส่วนๆ โดยพิจารณาจาก TLC fingerprint



รูปที่ 3.1 แผนการวิจัย และลำดับขั้นตอนการวิจัย

3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อเริม, ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ และฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

3.2.1 วัสดุและอุปกรณ์

- RPMI-1640 (GibcoTM, Grand Island, NY, USA)
- Fetal bovine serum (FBS) (GibcoTM, Grand Island, NY, USA)
- Glutamine solution 200 mM (GibcoTM, Grand Island, NY, USA)
- HEPES (GibcoTM, Grand Island, NY, USA)
- Kanamycin (M & H Manufacturing Co., Thailand)
- Dulbecco's Phosphate-buffered saline (GibcoTM, Grand Island, NY, USA)
- African green monkey kidney (Vero 76, ATCC No.: CRL 1587)
- Human epidermoid nasopharyngeal carcinoma (KB, ATCC No.: CCL 17)
- Human breast carcinoma (MCF-7, ATCC No.: HTB 22)
- Human lung carcinoma (A549, ATCC No.: CCL 185)
- HSV-1 (strain KOS)
- HSV-2 (strain 186)
- Trypsin (GibcoTM, Grand Island, NY, USA)
- EDTA (GibcoTM, Grand Island, NY, USA)
- Sulforhodamine B (SRB) (Sigma Chemical, MO, USA)
- Crystal violet (E. Merk, Germany)
- Trichloroacetic acid (TCA)
- Dimethylsulfoxide (DMSO)
- Methyl cellulose (Sigma Chemical, MO, USA)
- Tris (hydroxymethyl)-aminomethane
- Acetic acid
- ACV injection (DBL, Australia)
- Tissue culture flask 25, 75 cm²
- Cryogenic tube 2 ml
- 24-well plate, 96-well plate
- Eppendorf tube 1.5 ml

- Humidified 5% (v/v) CO₂ incubator (Shellab, USA)
- Micropipet 1000 µl, 100 µl, 10 µl
- Elisa reader (Bio-tek, USA)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) (Hettich, Germany)
- กล้องจุลทรรศน์ (Inverted microscope, phase contrast) (Nikon, Japan)
- Freezer -70°C (Nuair, USA)

3.2.2 วิธีทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อเริม, ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ และฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

3.2.2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ Vero และเซลล์มะเร็ง KB และ MCF-7

- เซลล์ปกติ Vero ซึ่งใช้ในการเพาะเลี้ยงเริม และเซลล์มะเร็ง KB และ MCF-7 ถูกเพาะเลี้ยงในอาหาร RPMI-1640 ที่มี FBS 10% (v/v), L-glu-tamine 2mM และ kanamycin 100 µg/ml แล้วบ่มใน Humidified 5% (v/v) CO₂ incubator ที่ 37°C เมื่อจำนวนเซลล์มีปริมาณเต็มในภาชนะที่ใช้เลี้ยง (Confluent cell) เซลล์จำนวน 1/3-1/4 จะถูกนำไปเลี้ยงใหม่ต่อไป (subculture)

3.2.2.2 การทำสต็อกเชื้อเริม

- ก. เตรียมสต็อกของเชื้อเริม HSV-1 และ HSV-2 โดยทำให้ เซลล์ Vero ติดเชื้อที่ 0.01 plaque per forming unit (pfu) /cell และบ่มใน Humidified 5% (v/v) CO₂ incubator ที่ 37°C จน cytopathic effect สังเกตพบร้อยละ 90 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นเอาเซลล์ที่ติดเชื้อ (infected culture) แช่แข็งที่ -70°C แล้วทำให้ละลาย (freeze-thawing) 3 รอบ นำ infected culture ไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็ว 2000 rpm 10 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) ไว้ที่ -70°C

- ข. หาปริมาณไวรัสด้วยวิธี plaque assay โดย

- เจือจางสต็อกของเชื้อเริมลง 10 เท่า (Serial dilution, 1:10) แล้วทำให้ Confluent vero cell ติดเชื้อด้วย Inoculum ที่เจือจางแล้วปริมาณ 0.25 ml ในหนึ่งหลุมของ 24 well plate โดยทำ 2 ซ้ำต่อหนึ่งความเข้มข้น (duplicate sample) จากนั้นบ่มใน Humidified 5% (v/v) CO₂ incubator ที่ 37°C ประมาณ 1 ชั่วโมง
- กำจัด Inoculum ที่เกินออกและใส่ Overlay media แล้วบ่ม infected culture ใน Humidified 5% (v/v) CO₂ incubator ที่ 37°C นาน 2 วัน

- ย้อมเซลล์ด้วย Crystal violet 0.8% (w/v) อย่างน้อย 3 ชั่วโมง ล้างน้ำเพื่อกำจัดสีย้อมที่เกิน แล้วผึ่งให้แห้ง และนับจำนวน plaque โดยใช้กล้องจุลทรรศน์
- คำนวณหาปริมาณเชื้อเริ่มที่มีใน 1 มิลลิลิตร

3.2.2.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อเริ่ม

ก. โดยวิธี Plaque reduction assay

- ทำให้ Confluent Vero cell ติดเชื้อเริ่ม HSV-1 หรือ HSV-2 ในปริมาณ 50 pfu ต่อหลุม ประมาณ 1 ชั่วโมง
- กำจัด Inoculum ที่เกินออก แล้วเติม Overlay media ที่มีส่วนสกัด/สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ หรือ ACV หรือไม่มีส่วนสกัด โดยทำ 2 ซ้ำต่อหนึ่งความเข้มข้น (duplicate sample) แล้วบ่ม infected culture ใน Humidified 5% (v/v) CO₂ incubator ที่ 37°C นาน 2 วัน
- ย้อมเซลล์ด้วย Crystal violet และนับจำนวน Plaque ในแต่ละตัวอย่างโดยใช้กล้องจุลทรรศน์
- คำนวณ % antiviral activity จาก

$$\% \text{ antiviral activity} = \left[1 - \frac{\text{จำนวน Plaque เฉลี่ยที่มีในแต่ละความเข้มข้น}}{\text{จำนวน Plaque เฉลี่ยที่มีใน control}} \right] * 100$$
- หาความเข้มข้นของส่วนสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อเริ่มได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) โดยสร้างกราฟระหว่าง % antiviral activity และความเข้มข้น

ข. โดยวิธี Yield assay

- ทำให้ Confluent Vero cell ติดเชื้อเริ่ม HSV-1 หรือ HSV-2 ในปริมาณ 1 pfu/cell บ่มใน Humidified 5% (v/v) CO₂ incubator ที่ 37°C ประมาณ 1 ชั่วโมง
- กำจัด Inoculum ที่เกินออก แล้วใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งมี 0.5% FBS และมี/ไม่มีสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ บ่มใน Humidified 5% (v/v) CO₂ incubator ที่ 37°C นาน 19 ชั่วโมง
- แช่แข็ง infected culture ที่ -70°C
- ทำให้ infected culture ละลายแล้วแช่แข็ง (freeze-thawing) 3 รอบ หาปริมาณเชื้อเริ่มทั้งหมดที่มีในแต่ละกลุ่มโดยใช้ Plaque assay (ข้อ 3.2.2.2ข)

3.2.3 การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ

ก. โดยวิธี PIlaque reduction assay

ทำการทดลองดังที่อธิบายในข้อ-3.2.2.3ก สังเกตผลของส่วนสกัด/สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่มีต่อการหลุดลอกของเซลล์ Vero หลังจากย้อมเซลล์ด้วย crystal violet แล้วล้างสีย้อมที่เกินออกและผึ่ง plate ให้แห้ง โดยให้คะแนน (-), (±), (+) และ (++) เมื่อส่วนสกัด/สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ทำให้เซลล์หลุดลอกร้อยละ 0, ร้อยละน้อยกว่า 10, ร้อยละ 10-50 และ ร้อยละมากกว่า 50 ตามลำดับ

ข. โดยวิธี Colorimetric assay

- ใส่เซลล์ปกติ Vero จำนวน 5×10^4 ต่อหลุม ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีหรือไม่มีส่วนสกัด/สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ ลงใน 96-well plate โดยทำ 3 ซ้ำต่อหนึ่งความเข้มข้น (triplicate sample)
- บ่มเซลล์ใน Humidified 5% (v/v) CO₂ incubator ที่ 37°C นาน 3 วัน
- เติมน้ำ cold 50% TCA 20 μ l ต่อหลุม จากนั้นวาง plate ไว้ที่ 4°C นาน 1 ชั่วโมง
- กำจัด TCA ที่เกินและล้างด้วยน้ำ แล้วผึ่งให้แห้ง
- เติมน้ำ 0.4% SRB 50 μ l ต่อหลุม ทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที แล้วกำจัดและล้างด้วย 1% acetic acid และผึ่งให้แห้ง
- เติมน้ำ 10mM Tris 70 μ l ต่อหลุม แล้วอ่านค่า Optical density (OD) ที่ 562 nm โดยใช้ Elisa reader
- หาค่า OD เฉลี่ยของตัวอย่างที่มีส่วนสกัด/สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ และค่าเฉลี่ยในกลุ่มควบคุม แล้วคำนวณค่า % cell growth inhibition จาก

$$\% \text{ cell growth inhibition} = \left[1 - \frac{\text{OD เฉลี่ยของตัวอย่างที่มีส่วนสกัด}}{\text{OD เฉลี่ยในกลุ่มควบคุม}} \right] * 100$$

- หาค่าความเข้มข้นของส่วนสกัด/สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ ที่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติ/เซลล์มะเร็ง ที่ทำให้เซลล์มีจำนวนลดลงร้อยละ 50 (CC₅₀) โดยสร้างกราฟระหว่าง % cell growth inhibition และความเข้มข้น

3.2.4 การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ

ทดสอบโดยใช้เซลล์มะเร็ง KB, MCF และวิธี Colorimetric assay ดังที่อธิบายในข้อ

3.2.3ข

3.3 การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับลักษณะการออกฤทธิ์ต้านเริ่มของสารสกัดกึ่ง

บริสุทธิ์ (Preliminary characterization of anti-herpes action)

3.3.1 ผลของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ต่อการเติบโตของเชื้อเริ่ม

- ทดสอบด้วยวิธี Yield assay (ข้อ 3.2.2.3ข) โดยทำให้ Confluent Vero cell ติดเชื้อเริ่ม HSV-1 หรือ HSV-2 ในปริมาณ 1 pfu/cell
- หาปริมาณเชื้อเริ่มที่อยู่ใน (Intracellular virus) และนอกเซลล์ (Extracellular virus) ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่มีส่วนสกัดกึ่งบริสุทธิ์ในความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้ Plaque assay (ข้อ 3.2.2.2ข)

3.3.2 ฤทธิ์ต้านเริ่มขึ้นกับปริมาณเชื้อเริ่มหรือไม่

- ทดสอบด้วยวิธี Yield assay (ข้อ 3.2.2. 3ข) โดยทำให้ Confluent Vero cell ติดเชื้อเริ่ม HSV-1 หรือ HSV-2 ในปริมาณ 0.01 และ 1 pfu/cell
- หาปริมาณเชื้อเริ่มทั้งหมดที่มีในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่มีส่วนสกัดกึ่งบริสุทธิ์ในความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้ Plaque assay (ข้อ 3.2.2.2ข)

3.3.3 ฤทธิ์ต้านเริ่มของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ขึ้นกับชนิดของเซลล์เพาะเลี้ยงหรือไม่

- ทดสอบฤทธิ์ด้วยวิธี Plaque reduction assay (ข้อ 3.2.2.3ก) โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงสองชนิด คือ Vero และ A549
- นับจำนวน plaque ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่มีส่วนสกัดกึ่งบริสุทธิ์ในความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์
- คำนวณ % virus control จาก

$$\% \text{ virus control} = \left[\frac{\text{จำนวน Plaque เฉลี่ยที่มีในแต่ละความเข้มข้น}}{\text{จำนวน Plaque เฉลี่ยที่มีในกลุ่มควบคุม}} \right] * 100$$

3.3.4 สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อเริ่ม (Virucidal effect) หรือไม่ โดยใช้ HSV Inactivation assay (40)

- บ่ม Inoculum ซึ่งมีเชื้อเริ่ม HSV-1 หรือ HSV-2 ปริมาณ 8×10^4 ถึง 1.6×10^5 (ใน 0.5 ml) และมีสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์หรือไม่มีสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 1 ชั่วโมง
- หาปริมาณเชื้อเริ่มที่มีอยู่ในสภาวะที่เชื้อเริ่ม มี/ไม่มีสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ โดยวิธี Plaque assay (ข้อ 3.2.2..2ข)

3.4 การศึกษากลุ่มของสารประกอบเคมีในสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต้านริณ

โดยทำการศึกษาพิษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening) ดังนี้คือ ทำ TLC fingerprint แล้วพ่นด้วย Anisaldehyde 0.5%, Dragendorff reagent, Ferric chloride TS และ Ninhydrin 1%

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ส่วนสกัดหยาบ,/ ส่วนสกัด ที่มีฤทธิ์ต้านเริม และ/หรือมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง

4.1.1 ส่วนสกัดหยาบและฤทธิ์ต้านเริม

ส่วนสกัดหยาบแห้งที่ได้จากการสกัดสมุนไพร 1200 กรัมต่อดัน ด้วยวิธี Percolation โดยใช้ dichlormethane:methanol เป็นตัวทำละลาย มีน้ำหนักประมาณ 36-160 กรัม และถูกนำมาประเมินฤทธิ์ต้านเริมโดยวิธี Plaque reduction assay ค่า IC_{50} ของส่วนสกัดหยาบทั้ง 5 ชนิด มีค่าน้อยกว่า 50 ($\mu g/ml$) ดังที่แสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 น้ำหนักแห้งและฤทธิ์ต้านเริมของส่วนสกัดหยาบจากสมุนไพร 5 ต้น

พืช	ส่วนที่ใช้	น้ำหนักพืชแห้ง (กรัม)	น้ำหนักส่วนสกัดหยาบแห้ง (กรัม)	ฤทธิ์ต้านเริม HSV-1 IC_{50} ($\mu g/ml$)
<i>C.cascaillloides</i> Raeusch	ราก	1200	36.24	<10
<i>D.bella</i> Prain	ราก	1200	159.43	<10
<i>H.punctata</i> Wall. ex. Lindl	ลำต้น	1200	105.88	<10
<i>X. vielana</i> Pierre	ลำต้น	1200	50.41	<10
<i>Z. rugosa</i> Lamk. var. <i>rugosa</i>	ลำต้น	1200	103.86	30

4.1.2 ส่วนสกัด (fraction) ที่ได้จากการแยกส่วนสกัดหยาบด้วย Column chromatography ครั้งที่ 1 และฤทธิ์ต้านริเริ่ม HSV-1, ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ, ความเฉพาะเจาะจงของส่วนสกัดในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อริเริ่ม และฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

ส่วนสกัดหยาบของสมุนไพรทั้ง 5 ต้น ซึ่งมีฤทธิ์ต้านริเริ่ม (ข้อ 4.1.1) ถูกนำมาแยกส่วนด้วย Column chromatography เพื่อให้ได้สารมีฤทธิ์ที่บริสุทธิ์มากขึ้น โดยใช้

Column ขนาด : 4 cm x 90 cm หรือ 6 cm x 80 cm

Stationary phase: silica gel 0.060-0.200 mm

Mobile phase: hexane:ethyl acetate และ ethyl acetate: methanol ในอัตราส่วนที่ต่าง ๆ กัน ครั้งละ 500 ml

ชื่อพืช	น้ำหนักส่วนสกัด หยาบที่ใช้ (กรัม)	จำนวนส่วนสกัด ที่แยกได้
<i>C.cascailloides</i> Raeusch	31.24	11 (CF11-110)
<i>D.bella</i> Prain	40	10 (DF11-110)
<i>H.punctata</i> Wall. ex. Lindl	99	7 (HF11-17)
<i>X. vielana</i> Pierre	45.41	13 (XF11-113)
<i>Z. rugosa</i> Lamk. var. <i>rugosa</i>	50	10 (ZF11-110)

ตารางที่ 4.2 จำนวนส่วนสกัดที่ได้จากการแยกส่วนสกัดหยาบด้วย Column chromatography ครั้งที่ 1

จากนั้นนำส่วนสกัดที่ได้ทั้งหมด (ตารางที่ 4.2) ไปศึกษาฤทธิ์ต้านริเริ่มเบื้องต้น ที่ความเข้มข้น 20 และ 50 µg/ml โดยวิธี Plaque reduction assay ข้อมูลในตารางที่ 4.3-4.7 ซึ่งให้เห็นว่า ส่วนสกัดที่มีฤทธิ์ต้านริเริ่มดี ได้แก่ CF11-19, DF11-DF110, HF11, HF13-HF16, XF14-XF112 และ ZF13-ZF17 ซึ่งมี IC₅₀ น้อยกว่า 20 µg/m

<i>C. cascailloides</i> Fraction	Anti-HSV-1		Cytotoxicity (Vero)	
	% control		by plaque*	
	20 µg/ml	50 µg/ml	20 µg/ml	50 µg/ml
CF11	49.3	0	+	+
CF12	0	0	++	++
CF13	0	0	+	+
CF14	13.6	0	+	+
CF15	51.4	0	+	+
CF16	32	0	+	+
CF17	0	0	+	+
CF18	0	0	+	+
CF19	43.95	0	+	++
CF110	91.45	12.5	-	±

* Cytotoxicity(Vero) by plaque ทดสอบด้วยวิธี Plaque reduction assay

ตารางที่ 4.3ฤทธิ์ต้านเริ่มและฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติของ CF11-CF110

<i>D. bella</i> Fraction	Anti-HSV-1		Cytotoxicity (Vero)	
	% control		by plaque*	
	20 µg/ml	50 µg/ml	20 µg/ml	50 µg/ml
DF11	0	0	++	++
DF12	0	0	++	++
DF13	0	0	++	++
DF14	0	0	+±	++
DF15	0	0	+	+
DF16	0	0	±	++
DF17	0	0	±	++
DF18	0	0	±	++
DF19	40.4	0	-	++
DF110	35.9	0	-	++

* Cytotoxicity(Vero) by plaque ทดสอบด้วยวิธี Plaque reduction assay

ตารางที่ 4.4ฤทธิ์ต้านเริ่มและฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติของ DF11-DF110

<i>H. punctata</i> Fraction	Anti-HSV-1		Cytotoxicity (Vero)	
	% control		by plaque*	
	20 µg/ml	50 µg/ml	20 µg/ml	50 µg/ml
HF11	48.3	0	+	++
HF12	100	0	-	++
HF13	0	0	++	++
HF14	0	0	+	+
HF15	0	0	+	+
HF16	0	0	+	+
HF17	79.6	60	-	+

* Cytotoxicity(Vero) by plaque ทดสอบด้วยวิธี Plaque reduction assay

ตารางที่ 4.5ฤทธิ์ต้านเริ่มและฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติของ HF11-HF16

<i>X.vielana</i> Fraction	Anti-HSV-1		Cytotoxicity (Vero)	
	% control		by plaque*	
	20 µg/ml	50 µg/ml	20 µg/ml	50 µg/ml
XF11**				
XF12	51.1	0	+	+
XF13	84.1	77	-	±
XF14	45.5	0	+	+
XF15	0	0	+	+
XF16	0	0	++	++
XF17	0	0	++	++
XF18	0	0	++	++
XF19	0	0	++	++
XF110	0	0	++	++
XF111	0	0	++	++
XF112	0	0	++	++
XF113	58.85	0	±	±
* Cytotoxicity(Vero) by plaque ทดสอบด้วยวิธี Plaque reduction assay				
** มีปริมาณน้อยมาก จนไม่สามารถทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อเริ่ม				

ตารางที่ 4.6 ฤทธิ์ต้านเริ่มและฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติของ XF11-XF113

<i>Z.rugosa</i> Fraction	Anti-HSV-1		Cytotoxicity (Vero)	
	% control		by plaque*	
	20 µg/ml	50 µg/ml	20 µg/ml	50 µg/ml
ZF11	100	92.1	-	-
ZF12	63.5	0	-	++
ZF13	43.5	12.5	+	++
ZF14	20.7	0	+	++
ZF15	0	0	++	++
ZF16	0	0	+	++
ZF17	0	0	++	++
ZF18	84.3	68.7	-	-
ZF19	78.5	67	-	-
ZF110	77.1	53.8	-	-
*Cytotoxicity(Vero) by plaque ทดสอบด้วยวิธี Plaque reduction assay				

ตารางที่ 4.7 ฤทธิ์ต้านเริ่มและฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติของ ZF11-ZF110

การศึกษาต่อไป เพื่อประเมินความเฉพาะเจาะจงในการออกฤทธิ์ต้านเริ่ม (Selectivity) โดยพิจารณาจากค่า IC₅₀ (ฤทธิ์ต้านเริ่ม) และ TD₅₀ (Vero) (ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ) และเฉพาะส่วนสกัดที่มีฤทธิ์ต้านเริ่มดีซึ่งมี IC₅₀ น้อยกว่า 20 µg/ml เท่านั้นที่ถูกนำมาประเมิน แต่เนื่องจากส่วนสกัด XF14-XF112 มีปริมาณน้อยมากไม่เพียงพอแก่การแยกส่วนสกัดต่อไป การศึกษานี้จึงจำกัดเฉพาะ CF11-19, DF11-DF110, HF11, HF13-HF16 และ

ZF13-ZF17 จากข้อมูลในตารางที่ 4.8-4.11 จะเห็นว่า ส่วนสกัดที่มี Selectivity $\square$ 2 คือ CF12, CF13, CF18, CF 19, DF 17 และ ZF16

นอกจากนี้ยังพบว่า DF11-DF14, HF15, ZF13-ZF15, ZF17 มีค่า TD_{50} (Vero) $\square$ 10 $\mu\text{g/ml}$ และ Selectivity $\square$ 1 (ตารางที่ 4.9-4.11) ซึ่งข้อมูลนี้บอกถึงความเป็นไปได้ที่ส่วนสกัดดังกล่าวจะมีศักยภาพในการต้านมะเร็ง ดังนั้นส่วนสกัดดังกล่าวจึงถูกนำไปศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเบื้องต้น โดยใช้เซลล์มะเร็ง KB อนึ่งแม้ว่า HF15, ZF13-ZF15 และ ZF17 อาจจะมีฤทธิ์ดี แต่เนื่องจากมีปริมาณน้อยมากไม่เพียงพอแก่การนำไปแยกส่วนต่อไป ฉะนั้นเฉพาะ DF11-DF14 เท่านั้นที่ถูกประเมินฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ผลการทดลองในตารางที่ 4.9 แสดงให้เห็นว่า ส่วนสกัดทั้ง 4 มีฤทธิ์ต้านมะเร็งดี โดยมีค่า TD_{50} (KB) 8-12 $\mu\text{g/ml}$ และจะถูกนำไปแยกส่วนให้บริสุทธิ์มากขึ้นต่อไป

<i>C. cascailloides</i>	Anti-HSV-1	Cytotoxicity	Selectivity
Fraction	IC_{50}	TD_{50} (Vero)	TD_{50}/IC_{50}
	($\mu\text{g/ml}$)	($\mu\text{g/ml}$)	
CF11	14	23	1.6
CF12	5	10	2
CF13	4	24	6
CF14	7	12	1.7
CF15	13.5	21	1.6
CF16	15	12	1.3
CF17	10	14	1.4
CF18	9.3	27	2.9
CF19	18	50	2.8

ตารางที่ 4.8 IC_{50} และ TD_{50} (Vero) ของ CF11-CF19

<i>D. bella</i>	Anti-HSV-1	Cytotoxicity	Selectivity	Cytotoxicity
Fraction	IC_{50}	TD_{50} (Vero)	TD_{50}/IC_{50}	TD_{50} (KB)
	($\mu\text{g/ml}$)	($\mu\text{g/ml}$)		($\mu\text{g/ml}$)
DF11	7	6	0.9	7.5
DF12	9	10	1.1	12.5
DF13	9.5	10	1.1	8.5
DF14	11	<10	<1	8
DF15	17	13	0.8	
DF16	14	13	0.9	
DF17	2.4	8	3.3	
DF18	8.4	13	1.5	
DF19	14	14	1.0	
DF110	16	15	0.9	

ตารางที่ 4.9 IC_{50} , TD_{50} (Vero) และ TD_{50} (KB) ของ DF11-DF110

<i>H.punctata</i>	Anti-HSV-1	Cytotoxicity	Selectivity
Fraction	IC ₅₀	TD ₅₀ (Vero)	TD ₅₀ /IC ₅₀
	(µg/ml)	(µg/ml)	
HF11	19.8	14	0.7
HF13	9.8	12	1.2
HF14	12	15	1.3
HF15	7	8	1.1

ตารางที่ 4.10 IC₅₀ และ TD₅₀ (Vero) ของ HF11, HF13-HF15

<i>Z.rugosa</i>	Anti-HSV-1	Cytotoxicity	Selectivity
Fraction	IC ₅₀	TD ₅₀ (Vero)	TD ₅₀ /IC ₅₀
	(µg/ml)	(µg/ml)	
ZF13	8.6	6	0.95
ZF14	7.6	4.6	0.7
ZF15	<5	<5	<1
ZF16	6.3	21	3.3
ZF17	6	10	1.7

ตารางที่ 4.11 IC₅₀ และ TD₅₀ (Vero) ของ ZF13-ZF17

4.1.3 ส่วนสกัดที่ได้จากการแยกส่วนด้วย Column chromatography ครั้งที่ 2 และฤทธิ์ต้านเริ่ม HSV-1, ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ, ความเฉพาะเจาะจงของส่วนสกัดในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อเริ่ม และฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

การศึกษาขั้นต่อไปทำเพื่อแยกส่วนสกัดซึ่งมีฤทธิ์ต่อการต้านเริ่มหรือความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งให้บริสุทธิ์มากขึ้น

4.1.3.1 ส่วนสกัดที่แยกส่วนจาก CF12, CF13, CF18, CF 19 และ DF 17 ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเริ่มและมี Selectivity ≥ 2

ข้อมูลที่นำเสนอในข้อ 4.1.2 แสดงให้เห็นว่า CF12, CF13, CF18, CF 19, DF 17 และ ZF16 มีฤทธิ์ต้านเริ่มและมี Selectivity ≥ 2 แต่เนื่องจากปริมาณของ ZF16 มีน้อย ดังนั้นเฉพาะ CF12, CF13, CF18, CF 19 และ DF 17 ที่ถูกแยกส่วนต่อไป

4.1.3.1.1 ส่วนสกัดที่แยกจาก CF12

Column ขนาด : 4 cm x 90 cm

Stationary phase: Silica gel 0.060-0.200 mm

Mobile phase: hexane:ethyl acetate และ ethyl acetate: methanol ในอัตราส่วนที่ต่าง ๆ กัน ครั้งละ 500 ml

CF12 Fraction	น.น.ที่ได้ (กรัม)	Anti-HSV-1 IC ₅₀ (µg/ml)	Cytotoxicity by plaque* at 5 µg/ml	Cytotoxicity TD ₅₀ (KB) (µg/ml)	Cytotoxicity TD ₅₀ (MCF-7) (µg/ml)
CF12		5	-**		
CF221	0.374	3.8	++	>20	>20
CF222	2.492	2.5	++	16	>20
CF223	0.886	6	+***	>20	>20
CF224	0.539	5	+***	>20	>20
CF225	0.368	>10	-		
CF226	0.111	>10	-		
CF227	0.150	>10	-		
* Cytotoxicity(Vero) by plaque ทดสอบด้วยวิธี Plaque reduction assay					
** TD ₅₀ (Vero) = 10 µg/ml					
*** Cytotoxicity by plaque at 10 µg/ml : ++					

ตารางที่ 4.12 ฤทธิ์ต้านเริ่ม, ฤทธิ์ความเป็นพิษของเซลล์ปกติและฤทธิ์ความเป็นพิษของเซลล์มะเร็งของ CF221-CF227

ส่วนสกัดจำนวน 7 ส่วนที่แยกได้จาก CF12 (ตารางที่ 4.12) เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านเริ่มโดยวิธี Plaque reduction assay พบว่า เฉพาะ CF221-CF224 เท่านั้นที่มีฤทธิ์ต้านเริ่มดีและมี IC₅₀ ใกล้เคียงกับ CF12 เมื่อพิจารณาผลความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ ซึ่งทดสอบโดยวิธี Plaque reduction assay พบว่า CF221 และ CF222 ที่ 5 µg/ml และ CF223 และ CF224 ที่ 10 µg/ml ทำให้เซลล์ Vero หลุดลอกเกินร้อยละ 50 ข้อมูลนี้บ่งชี้ว่า Selectivity ของส่วนสกัดทั้ง 4 ส่วนดังกล่าว มีค่าน้อยกว่า 2

ข้อมูลความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติของ CF221-CF224 ยังบ่งชี้ว่าส่วนสกัดดังกล่าวน่าจะมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง ดังนั้น CF221-CF224 จึงถูกนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งสองชนิดคือ KB และ MCF ผลการทดลองพบว่า CF221, CF223 และ CF224 มีค่า TD₅₀ (KB, MCF) มากกว่า 20 µg/ml ขณะที่ CF221 ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง KB [TD₅₀ (KB) = 16 µg/ml] ได้ดีกว่า MCF [TD₅₀ (MCF) > 20 µg/ml]

4.1.3.1.2 ส่วนสกัดที่แยกจาก CF13, CF18, CF 19 และ DF 17

Column ขนาด : 2 cm x 100 cm

Stationary phase: Sephadex LH20

Mobile phase : Pure methanol

CF13	น.น.ที่ได้	Anti-HSV-1	Cytotoxicity	Cytotoxicity	Cytotoxicity
Fraction	(กรัม)	IC ₅₀	D ₅₀ (Vero)	TD ₅₀ (KB)	TD ₅₀ (MCF-7)
		(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)
CF13		4	24		
CF231	0.53	16	n.d.	>20	>20
CF232	0.24	12	10	14	16.6
CF233	0.284	4.9	5	>20	24
CF234	0.891	11.6	n.d.		
CF235	0.126	15	n.d.		
CF236	0.105	22	n.d.		
n.d. = not detected but cytotoxicity by plaque at 20 µg/ml = (-)					

ตารางที่ 4.13ฤทธิ์ต้านเริม, ฤทธิ์ความเป็นพิษของเซลล์ปกติและฤทธิ์ความเป็นพิษของเซลล์มะเร็งของ CF231-CF236

CF18	น.น.ที่ได้	Anti-HSV-1	Cytotoxicity	Cytotoxicity	Cytotoxicity
Fraction	(กรัม)	IC ₅₀	D ₅₀ (Vero)	TD ₅₀ (KB)	TD ₅₀ (MCF-7)
		(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)
CF18		9.3	27		
CF281	0.072	8	7	>20	>20
CF282	0.389	15	12	15	20
CF283	0.288	>40	n.d.		
CF284	0.087	>40	n.d.		
CF285	0.359	>40	n.d.		
n.d. = not detected					

ตารางที่ 4.14ฤทธิ์ต้านเริม, ฤทธิ์ความเป็นพิษของเซลล์ปกติและฤทธิ์ความเป็นพิษของเซลล์มะเร็งของ CF281-CF285

CF19	น.น.ที่ได้	Anti-HSV-1	Cytotoxicity
Fraction	(กรัม)	IC ₅₀	by plaque*
		(µg/ml)	at 40 µg/ml
CF19		18	50
CF291	0.404	>40	-
CF292	0.198	23	++
CF293	0.196	>40	-
CF294	0.170	>40	-
CF295	0.194	>40	-
CF296	0.520	>40	-
* Cytotoxicity(Vero) by plaque ทดสอบด้วยวิธี Plaque reduction assay			

ตารางที่ 4.15ฤทธิ์ต้านเริม และฤทธิ์ความเป็นพิษของเซลล์ปกติของ CF291-CF296

DF17 Fraction	น.น.ที่ได้ (กรัม)	Anti-HSV-1 IC ₅₀ (µg/ml)	Cytotoxicity by plaque* at 20 µg/ml	Cytotoxicity D ₅₀ (Vero) (µg/ml)
DF17		2.4	+	8
DF271	0.336	18	+	n.d.
DF272	0.198	20	+	n.d.
DF273	0.177	16	+	n.d.
DF274	0.228	16	-	n.d.
DF275	0.384	>20	-	n.d.
DF276	0.253	3	+	12
DF277	0.145	1.85	+	9
DF278	0.025	2.6	+	17
DF279	0.113	1.5	±	10
DF2710	0.238	17	-	n.d.
* Cytotoxicity(Vero) by plaque ทดสอบด้วยวิธี Plaque reduction assay				

ตารางที่ 4.16ฤทธิ์ต้านเริม และฤทธิ์ความเป็นพิษของเซลล์ปกติของ DF271-DF2710

ส่วนสกัดที่แยกได้ทั้งหมดถูกนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านเริมโดยวิธี Plaque reduction assay จากข้อมูลในตารางที่ 4.13-4.16 พบว่า ส่วนสกัดที่มีฤทธิ์ต้านเริมใกล้เคียงกับส่วนสกัดเดิมก่อนแยก ได้แก่ CF233 (ซึ่งมีค่า IC₅₀ ใกล้เคียงกับ IC₅₀ ของ CF 13), CF281 (ซึ่งมีค่า IC₅₀ ใกล้เคียงกับ IC₅₀ ของ CF 18), CF292 (ซึ่งมีค่า IC₅₀ ใกล้เคียงกับ IC₅₀ ของ CF 19) และ DF276-DF279 (ซึ่งมีค่า IC₅₀ ใกล้เคียงกับ IC₅₀ ของ DF 17) อย่างไรก็ตามค่า TD₅₀ ของ CF233 และ CF281 มีค่าใกล้เคียงกับค่า IC₅₀ (ตารางที่ 4.13-4.14) และ CF292 ที่ความเข้มข้น 40 µg/ml ทำให้เซลล์ปกติหลุดลอกมากกว่าร้อยละ 50 (ตารางที่ 4.15) ข้อมูลความเป็นพิษต่อเซลล์ปกตินี้ บอกแนวโน้มว่า Selectivity ของส่วนสกัดทั้งสามมีค่าน้อยกว่า 2 เฉพาะ DF276-DF279 เท่านั้นที่มี Selectivity มากกว่า 2 (Selectivity อยู่ในช่วง 3-7) (ตารางที่ 4.16) ดังนั้นจึงควรนำ DF276-DF279 ไปแยกส่วนต่อไป

นอกจากนี้ส่วนสกัด CF231-CF233, CF281 และ CF282 ยังถูกนำไปประเมินฤทธิ์ต้านมะเร็ง โดยทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง KB และ MCF-7 ผลการศึกษาพบว่า CF232 และ CF282 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิดได้ดีปานกลาง และใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 4.13-4.14)

4.1.3.2 ส่วนสกัดที่ได้จากการแยก DF11-DF14 ซึ่งมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งดี

เนื่องจาก DF13 และ DF14 มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งใกล้เคียงกัน กล่าวคือ TD₅₀ (KB) = 8.5 และ 8 µg/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 4.9 และ 4.19) ดังนั้นจึงผสม DF13 กับ DF14 และทำการแยกส่วนของ DF11, DF12 และ DF13+DF14 ต่อไป

Column ขนาด : 4 cm x 90 cm

Stationary phase: Silica gel 0.060-0.200 mm

Mobile phase: hexane:ethyl acetate และ ethyl acetate: methanol ในอัตราส่วนที่ต่าง ๆ กัน ครั้งละ 500 ml

DF11	น.น.ที่ได้	Anti-HSV-1	Cytotoxicity	Cytotoxicity	Cytotoxicity
Fraction	(กรัม)	IC ₅₀	TD ₅₀ (Vero)	TD ₅₀ (KB)	TD ₅₀ (MCF-7)
		(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)
DF11		7	6	7.5	
DF211	5.606	n.d.	n.d.	5.8	6
DF212	0.192	14	n.d.	>20	>20
DF213	0.124	>20	n.d.	>20	>20
DF214	0.184	>20	n.d.	>20	>20
DF215	0.107	>20	n.d.	>20	>20
DF216	0.003	>20	n.d.	>20	>20

ตารางที่ 4.17ฤทธิ์ต้านไวรัส และฤทธิ์ความเป็นพิษของเซลล์มะเร็งของ DF211-DF216

DF12	น.น.ที่ได้	Anti-HSV-1	Cytotoxicity	Cytotoxicity	Cytotoxicity
Fraction	(กรัม)	IC ₅₀	TD ₅₀ (Vero)	TD ₅₀ (KB)	TD ₅₀ (MCF-7)
		(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)
DF12		9	10	12.5	
DF221	0.062	3.2	5.6	18.5	21.8
DF222	3.795	4.4	<5	13	15.6
DF223	1.031	5.6	7.2	>20	>20
DF224	0.572	25	n.d.	>20	>20
DF225	0.201	>40	n.d.	>20	>20
DF226	1.006	11.5	6	>20	>20

ตารางที่ 4.18ฤทธิ์ต้านไวรัส, ฤทธิ์ความเป็นพิษของเซลล์ปกติ และฤทธิ์ความเป็นพิษของเซลล์มะเร็งของ DF221-DF226

DF13+DF14	น.น.ที่ได้	Anti-HSV-1	Cytotoxicity	Cytotoxicity	Cytotoxicity
Fraction	(กรัม)	IC ₅₀	TD ₅₀ (Vero)	TD ₅₀ (KB)	TD ₅₀ (MCF-7)
		(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)
DF13		9.5	10	8.5	
DF14		11	<10	8	
DF231	0.097	21	n.d.	20	14.5
DF232	0.592	11	12	14	13.7
DF233	3.008	n.d.	n.d.	6.3	6.6
DF234	0.297	22	n.d.	17	20
DF235	0.344	23	n.d.	>20	>20

ตารางที่ 4.19ฤทธิ์ต้านไวรัส, ฤทธิ์ความเป็นพิษของเซลล์ปกติ และฤทธิ์ความเป็นพิษของเซลล์มะเร็งของ DF231-DF235

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง KB และ MCF-7 พบว่า DF211, DF233 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งดีและมีฤทธิ์ใกล้เคียงกับส่วนสกัดเดิมก่อนแยก

(ตารางที่ 4.17 และ 4.19) โดยค่า TD_{50} (KB, MCF) ของ DF211 และ DF233 ใกล้เคียงกับค่า TD_{50} (KB) ของ DF11 และ DF13 (หรือ DF14) ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า DF221, DF222, DF231 และ DF232 มีฤทธิ์ดีปานกลาง (ตารางที่ 4.18 และ 4.19) โดยที่ DF221, DF222 และ DF232 ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง KB และ MCF-7 ได้ใกล้เคียงกัน ซึ่งแตกต่างจาก DF231 ที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF ได้มากกว่า KB

เนื่องจากฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของส่วนสกัด DF212-DF216, DF221-DF226, DF231, DF232, DF235 และ DF236 อยู่ในระดับดีปานกลาง มีความเป็นไปได้ที่อาจพบฤทธิ์ต้านริ้ว ดังนั้นส่วนสกัดดังกล่าวจึงถูกนำไปประเมินฤทธิ์ต้านริ้วด้วย จากข้อมูลในตารางที่ 4.17-4.19 พบว่า DF221- DF223 มีฤทธิ์ต้านริ้วดี แต่มี Selectivity ประมาณ 1 หรือมากกว่า 1 เพียงเล็กน้อยเท่านั้น

4.1.4 ส่วนสกัดที่ได้จากการแยก DF276-DF279 ด้วย Column chromatography ครั้งที่ 3

เนื่องจาก DF276-DF279 ที่แยกส่วนได้มีปริมาณน้อย (ประมาณ 0.5 กรัม) และมีฤทธิ์ต้านริ้วรวมถึง Selectivity ไม่แตกต่างกันมาก (ตารางที่ 4.16 และ 4.20) จึงผสมส่วนสกัดดังกล่าวเข้าด้วยกันและนำไปแยกส่วนต่อไป

Column ขนาด : 2 cm x 60 cm

Stationary phase: Silica gel 0.035-0.070 mm

Mobile phase: hexane:ethyl acetate และ ethyl acetate: methanol ในอัตราส่วนที่ต่าง ๆ กัน ครั้งละ 300 ml

DF276+DF277+ DF278+DF279 Fraction	น.น.ที่ได้ (กรัม)	Anti-HSV-1 IC_{50} (μ g/ml)	Anti-HSV-2 IC_{50} (μ g/ml)
DF17		2.4	
DF276		3	
DF277		1.85	
DF278		2.6	
DF279		1.5	
DF371	0.01	>10	
DF372	0.09	2.8 $\pm$ 0.21	2.7 $\pm$ 0.18
DF373	0.02	>10	
DF374	0.03	>10	
DF375	0.01	>10	
DF376	0.01	>10	
DF377	0.03	>10	

ตารางที่ 4.20 ฤทธิ์ต้านริ้ว และฤทธิ์ความเป็นพิษของเซลล์ปกติของ DF371-DF377

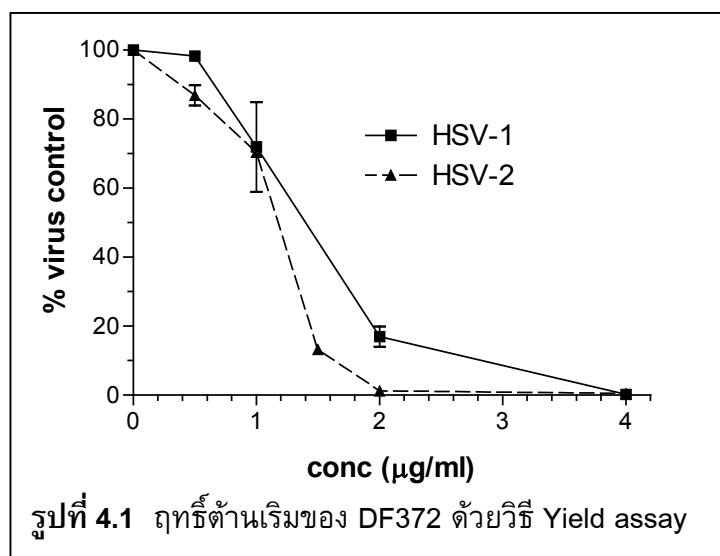
DF371-DF377 ถูกนำไปประเมินฤทธิ์ต้านริ้วเบื้องต้นโดยวิธี Plaque reduction assay ข้อมูลในตารางที่ 4.20 ชี้ให้เห็นว่าส่วนสกัด DF372 เท่านั้นซึ่งได้จากการแยกส่วน

DF276-DF279 มีฤทธิ์ต้านเริ่ม HSV-1 ใกล้เคียงกับส่วนสกัดก่อนที่จะทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น (DF17, DF276-DF279) ขณะที่ส่วนสกัดอื่นๆมีค่า IC_{50} มากกว่า 10 $\mu\text{g/ml}$ จากนั้นจึงทำการศึกษาฤทธิ์ความพิษต่อเซลล์ปกติพบว่า ค่า TD_{50} (Vero) = 20.5 $\mu\text{g/ml}$ (Selectivity ≈ 7) นอกจากนี้ยังพบว่า DF372 มีฤทธิ์ต้านเริ่ม HSV-2 ใกล้เคียงกับ HSV-1 ดังนั้น DF372 จึงเป็นสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเริ่มที่จะทำการศึกษาต่อไปในข้อ 4.2

4.2 สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ DF372 ที่มีฤทธิ์ต้านเริ่ม

4.2.1 ฤทธิ์ต้านเริ่มของ DF372 ด้วยวิธี Yield assay

DF372 ถูกนำมาประเมินฤทธิ์ต้านเริ่มต่อไปด้วยวิธี Yield assay ข้อมูลที่แสดงในกราฟที่ 4.1 ยืนยันผลการศึกษาฤทธิ์ต้านเริ่มเบื้องต้น (ตารางที่ 4.20) ว่า DF372 มีฤทธิ์ต้านเริ่ม HSV-1 ใกล้เคียงกับ HSV-2 โดยค่า IC_{50} ของ HSV-1 และ HSV-2 เท่ากับ 1.22 ± 0.04 และ 1.24 ± 0.08 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ และมี Selectivity ≈ 17



4.2.2 การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับลักษณะการออกฤทธิ์ต้านเริมของ DF372

(Preliminary characterization of anti-herpes action)

4.2.2.1 ศึกษาผลของ DF372 ต่อการเติบโตของเชื้อเริม

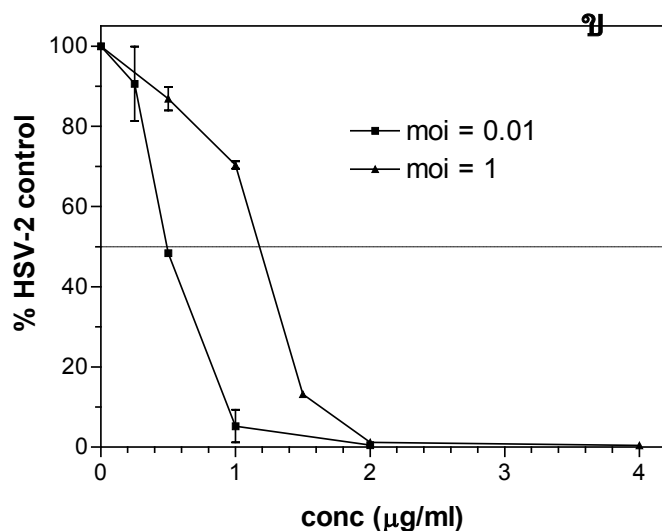
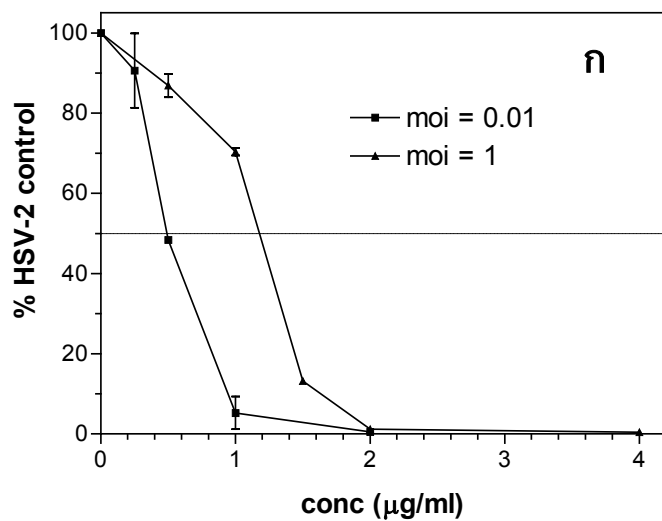
ตารางที่ 4.21 ผลของ DF372 ต่อปริมาณเชื้อเริม ที่มีในเซลล์, นอกเซลล์และที่มีในเซลล์ทั้งหมด

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	% Intracellular virus control	% Extracellular virus control	% Total virus control
0.5	98.8	94.4	97.7
1	81.1	3.56	62.77
2	19	1.5	14.9
4	0.17	0.03	0.17

การศึกษาผลของ DF372 ต่อการเติบโตของเชื้อเริม HSV-1 ที่มีในเซลล์ (Intracellular virus), นอกเซลล์ (Extracellular virus) และที่มีในเซลล์ทั้งหมด (Total virus) โดยวิธี Yield assay พบว่า DF372 ที่ความเข้มข้นต่ำ ($0.5 \mu\text{g/ml}$) และความเข้มข้นสูง ($4 \mu\text{g/ml}$) ยับยั้งการเติบโตของเชื้อเริมที่อยู่ในเซลล์, นอกเซลล์ และที่มีในเซลล์ทั้งหมดได้ใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 4.21) แต่ที่ความเข้มข้นปานกลางคือ 1 และ $2 \mu\text{g/ml}$ DF372 ยับยั้งการเติบโตของเชื้อเริมที่อยู่ในเซลล์ได้ใกล้เคียงกับที่มีในเซลล์ทั้งหมด แต่สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อเริมที่อยู่นอกเซลล์ได้มากกว่าเชื้อเริมที่อยู่ในเซลล์และที่มีเซลล์ทั้งหมดอย่างมีนัยสำคัญ โดยค่า IC_{50} (Extracellular virus, Intracellular virus, Total virus) เท่ากับ 0.75, 1.5 และ $1.2 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ

4.2.2.2 ฤทธิ์ต้านเริมของ DF372 ขึ้นกับปริมาณเชื้อเริมหรือไม่

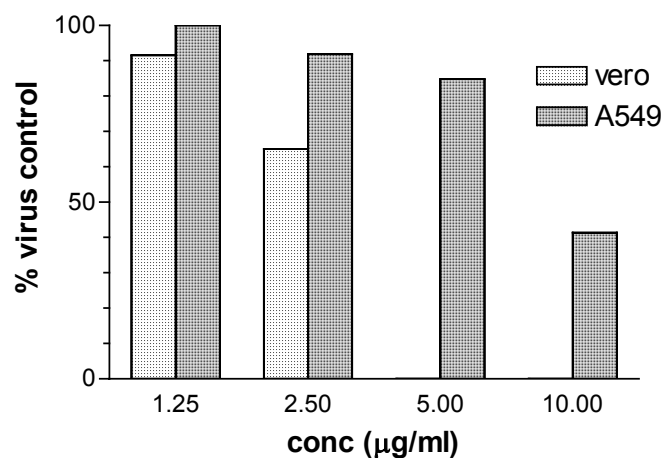
ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านเริมของ DF372 ว่าขึ้นกับปริมาณเชื้อเริมหรือไม่ โดยวิธี Yield assay ว่า ปริมาณไวรัสที่ตรวจพบในภาวะที่มี DF372 ในความเข้มข้น $1 \mu\text{g/ml}$ และเซลล์เพาะเลี้ยงถูกทำให้ติดเชื้อเริม (HSV-1) 1 และ 0.01 pfu/cell ($\text{moi} = 1$ และ 0.01) คิดเป็นร้อยละ 15 และ 60 ของกลุ่มควบคุมตามลำดับ (รูปที่ 4.2 ก.) เช่นเดียวกับในภาวะที่เซลล์เพาะเลี้ยงถูกทำให้ติดเชื้อเริม HSV-2 และมีสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ในความเข้มข้น $1 \mu\text{g/ml}$ ปริมาณไวรัสที่พบ ($\text{moi} = 1$) คิดเป็นร้อยละ 5 ของกลุ่มควบคุม ขณะที่ไวรัสมีปริมาณร้อยละ 70 ของกลุ่มควบคุมเมื่อ $\text{moi} = 0.01$ (รูปที่ 4.2 ข.) นอกจากนี้ยังพบว่า ในภาวะที่เซลล์เพาะเลี้ยงถูกทำให้ติดเชื้อเริมต่ำ DF372 มีฤทธิ์ต้านเริมแรงกว่าในภาวะที่เซลล์ถูกทำให้ติดเชื้อเริมสูง ถึง 4 เท่า [IC_{50} ($\text{moi} = 0.01$) = $0.3 \mu\text{g/ml}$ และ IC_{50} ($\text{moi} = 0.01$) = $1.2 \mu\text{g/ml}$]



รูปที่ 4.2 ฤทธิ์ต้านไวรัส HSV-1 (ก.) และ HSV-2 (ข.) ของ DF372 เมื่อเซลล์

4.2.2.3 ฤทธิ์: แพะเลี้ยงถูกทำให้ติดเชื้อ 0.01 และ 1 pfu/cell (moi = 0.01 และ 1)

จากการศึกษาโดยทดสอบฤทธิ์ต้านไวรัส HSV-1 ของ DF372 ด้วยวิธี Plaque reduction assay และใช้เซลล์แพะเลี้ยงเชื้อเริ่มสองชนิด คือ เซลล์ Vero และ A549 พบว่าในภาวะที่ใช้เซลล์แพะเลี้ยง A549 และมี DF372 ในความเข้มข้น 5 และ 10 μg/ml ตรวจพบปริมาณเชื้อเริ่มคิดเป็นร้อยละ 85 และ 40 ของกลุ่มควบคุมตามลำดับ ในขณะที่ไม่มีปริมาณเชื้อเริ่มเหลืออยู่เลยในความเข้มข้นดังกล่าวเมื่อใช้เซลล์แพะเลี้ยง Vero (รูปที่ 4.3)



รูปที่ 4.3ฤทธิ์ต้านริ้วเมื่อใช้ A549 และ Vero เป็นเซลล์

4.2.2.4 DF372 มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อริ้ว (Virucidal effect)

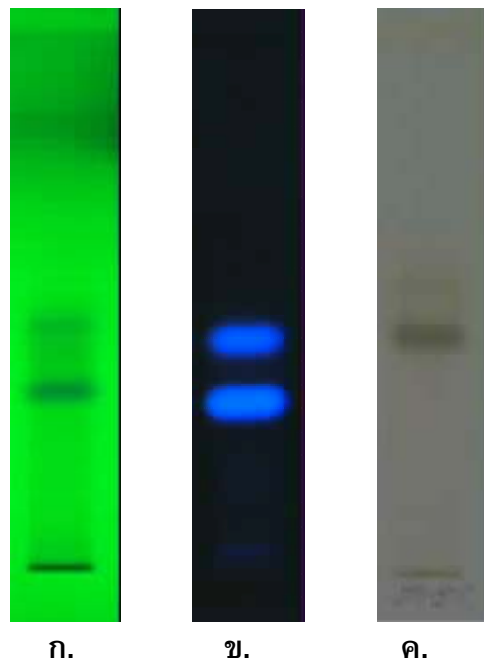
ตารางที่ 4.22 ฤทธิ์ฆ่าเชื้อริ้ว HSV-1 และ HSV-2 ของ DF372

เชื้อริ้ว	ปริมาณไวรัสที่มีใน DF372 0 µg/ml	ปริมาณไวรัสที่มีใน DF372 10 µg/ml	ปริมาณไวรัสที่มีใน DF372 20 µg/ml
HSV-1	8.8×10^4	8.8×10^4	8.0×10^4
HSV-2	1.6×10^5	1.6×10^5	1.4×10^5

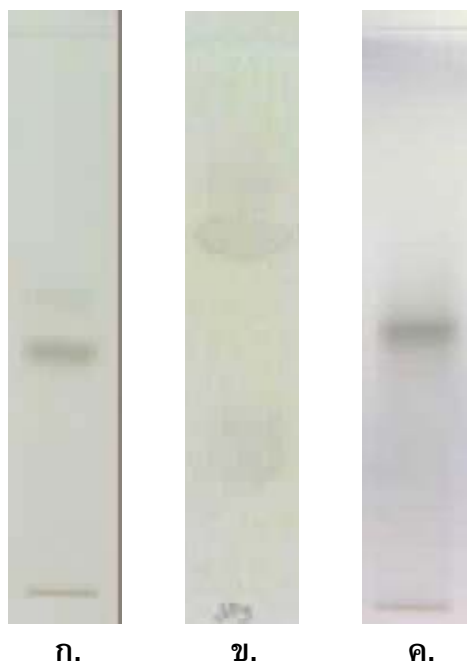
ผลการทดสอบฤทธิ์ฆ่าเชื้อริ้วของ DF372 โดยวิธี Inactivation assay พบว่า เชื้อริ้ว HSV-1 และ HSV-2 ในภาวะที่มี DF372 ในความเข้มข้น 10 และ 20 µg/ml มีปริมาณมากกว่าร้อยละ 50 ของเชื้อริ้วในกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 4.22) โดยส่วนสกัดตั้งบริสุทธิ์ 10 µg/ml ไม่มีต่อจำนวนเชื้อริ้ว แม้ในความเข้มข้นสูงขึ้นคือ 20 µg/ml ปริมาณเชื้อริ้วที่รอดชีวิตยังมีถึงร้อยละ 87-90 ของกลุ่มควบคุม แสดงว่า DF372 ไม่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อริ้วทั้ง HSV-1 และ HSV-2

4.2.3 การศึกษาคุณสมบัติของสารประกอบเคมีใน DF372

จากการทำ TLC โดยใช้ระบบตัวพาเป็น Hexane : Ethyl acetate (1:2) แฉกที่แยกได้จาก DF372 มีสองแฉกและเรืองแสง ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 nm ดัง chromatogram ที่ปรากฏใน รูปที่ 4.4 แสดงว่าสารสกัดตั้งบริสุทธิ์ DF372 น่าจะมีพันธะคู่เป็นส่วนประกอบ เมื่อนำ TLC fingerprint มาตรวจสอบด้วย Saturated iodine vapor พบว่าแฉกทั้งสองให้ผลบวก (น้ำตาลเข้ม) นอกจากนี้เมื่อพ่น TLC ด้วย Dragendorff, Ninhydrin, Ferric chloride TS และ Anisaldehyde พบว่า แฉกทั้งสองให้ผลลบกับสารทดสอบทั้งสี่ชนิด (รูปที่ 4.5)



รูปที่ 4.4 Chromatogram ของ DF372 ซึ่งใช้ Hexane : Ethyl acetate (1:2) เป็นตัวพา แล้วตรวจภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 (ก) และ 366 (ข) nm และตรวจสอบด้วย Saturated iodine vapor (ค)



รูปที่ 4.5 Chromatogram ของ DF372 ซึ่งใช้ Hexane : Ethyl acetate (1:2) เป็นตัวพา แล้วตรวจสอบด้วย Dragendorff (ก), Ferric chloride TS (ข) และ Anisaldehyde (ค)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลการวิจัย

การวิจัยนี้ทำเพื่อแยกสารที่แสดงฤทธิ์ต้านเริมจากสมุนไพรพื้นบ้านจังหวัดอุบลราชธานีที่ใช้ในกลุ่มแพทย์รักษาโรคติดเชื้อไวรัส จำนวน 5 ต้น คือ *Croton cascarilloides* Raeusch, *Dunbaria bella* Prain, *Hymenocardia punctata* Wall. ex. Lindl., *Xylopia vielana* Pierre และ *Ziziphus rugosa* Lamk. var. *rugosa* โดยสกัดขั้นแรกด้วยวิธี Percolation และใช้ dichloromethane:methanol (1:1) เป็นตัวทำละลาย จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเริม HSV-1 เบื้องต้นด้วยวิธี Plaque reduction assay พบว่าสารสกัดหยาบทั้งหมดล้วนมีฤทธิ์ต้านเริมดี กล่าวคือมีค่า IC_{50} น้อยกว่า 50 $\mu\text{g/ml}$ แต่เมื่อทำการแยกส่วนสารสกัดหยาบต่อไปด้วยเทคนิค Chromatography (รูปที่ 5.1) (และด้วยข้อจำกัดของส่วนสกัดที่มีปริมาณน้อยไม่เพียงพอต่อการแยกส่วนต่อไป) พบว่าส่วนสกัดที่ได้จากการแยกส่วนด้วย Column chromatography ครั้งที่ 2 ของสารสกัดหยาบจากพืช *Croton cascarilloides* Raeusch ในวงศ์ Euphorbiaceae (CF221-CF224, CF233, รูปที่ 5.1 ก.) และ *Dunbaria bella* Prain ในวงศ์ Fabaceae (DF276-279, รูปที่ 5.1 ข.) มีค่า IC_{50} ประมาณ 2.5-6 และ 1.5-3 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ พืชในวงศ์ Euphorbiaceae ที่เคยมีรายงานฤทธิ์ต้านเริม ได้แก่ *Euphorbia cotinifolia*, *Euphorbia tirucalli* (Betancur-Galvis et al., 2002), *Macaranga pustulata* (Taylor et al. 1996b), *Malotus philippensis* Lam., *Milettia extensa* Bentham Baker (Taylor et al. 1996a), *Euphorbia peplus* L., *Euphorbia esula* L., *Euphorbia serrulata* Thuill., *Euphorbia salicifolia* Host. (Mucsi et al., 2001) และรายงานที่ผ่านมาโดย Taylor และ คณะ (Taylor et al. 1996a) ว่า สารสกัดเมทานอล จากพืช *Bauhinia vahlii* Wight and Arnott ในวงศ์ Fabaceae มีฤทธิ์ต้านเริม ดังนั้นส่วนสกัดที่ได้จาก *Croton cascarilloides* Raeusch และ *Dunbaria bella* Prain น่าจะมีศักยภาพในการแยกส่วนเพื่อหาสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต้านเริมต่อไป

อย่างไรก็ดีผลการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติของส่วนสกัดดังกล่าว พบว่าเฉพาะ DF276-279 เท่านั้นมี Selectivity มากกว่าหรือเท่ากับ 4 เท่า (รูปที่ 5.1 ข.) ดังนั้นจึงถูกนำไปแยกส่วนให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น จากการประเมินฤทธิ์ต้านเริมเบื้องต้นของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ต่างๆ (DF371-DF377) พบว่า สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ DF372 มีฤทธิ์ต้านเริมและมี Selectivity ดี เมื่อทำการศึกษาต่อไป พบว่า DF372 มีฤทธิ์ต้านเริมดีต่อทั้ง HSV-1 และ HSV-2 โดยค่า IC_{50} เท่ากับ 1.22 ± 0.04 และ 1.24 ± 0.08 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ (โดยวิธี Yield assay) และมี Selectivity ≈ 17

การวิจัยต่อไปเพื่อศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับกลไกหลักในการออกฤทธิ์ต้านเริ่มของ DF372 หนึ่งขบวนการเพิ่มจำนวนไวรัส (Viral replication) ประกอบด้วยขบวนการเกาะติดเซลล์ (Attachment), การเข้าสู่เซลล์ (Penetration), การปล่อยยีนโอมเป็นอิสระจาก capsid (Uncoating), การสังเคราะห์องค์ประกอบของไวรัส (Synthesis of viral component), การประกอบเป็นอนุภาคไวรัสที่สมบูรณ์ (Assembly and Maturation) และ การออกจากเซลล์ (release) (พิไลพันธ์ 2540) จากการศึกษาผลของ DF372 ต่อการเติบโตของเชื้อเริ่มด้วยวิธี Yield assay พบว่า DF372 มีค่า IC_{50} (Total virus) มีค่าใกล้เคียงกับ IC_{50} (Intracellular virus) แต่แตกต่างจาก IC_{50} (Extracellular virus) อย่างมีนัยสำคัญ ข้อมูลนี้แสดงว่า DF372 น่าจะยับยั้งขั้นตอนใด ๆ ในขบวนการเพิ่มจำนวนไวรัส ยกเว้นการออกจากเซลล์ อีกทั้งฤทธิ์ต้านเริ่มของ DF372 ตรวจพบทุกครั้งเมื่อเติมหลังจากที่ทำให้เซลล์ติดเชื้อเริ่มด้วยวิธี Plaque reduction assay และ Yield assay บ่งชี้ว่ากลไกหลักในการออกฤทธิ์ต้านเริ่มของ DF372 เป็นขั้นตอน Uncoating, Synthesis of viral component หรือ assembly and maturation แต่ไม่ใช้การ Attachment หรือ Penetration

นอกจากการยับยั้งขบวนการเพิ่มจำนวนไวรัสดังที่กล่าวมาแล้ว ยังมีกลไกอื่นที่ทำให้สารมีฤทธิ์ต้านเริ่มได้คือ ฤทธิ์ฆ่าไวรัส (Virucidal effect) ดังเช่น essential oil ที่ได้จาก *Lippia juneliana*, *Lippia turbinator* (Garcia et al. 2003) และ *Mentha piperita* (peppermint oil, Schuhmacher et al. 2003), Casuarinin ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม Tannin ที่ได้จาก *Terminalia arjuna* Linn. (Cheng et al. 2000) และ สารในกลุ่ม Flavonoid ที่ได้จาก *Vitex polygama* Cham. (Goncalves et al. 2001) ซึ่งเคยมีรายงานว่า มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อเริ่ม และเป็นกลไกที่ใช้เพื่อพัฒนาเป็นยาต้านเริ่มภายนอกแบบเหน็บช่องคลอด จากการประเมินฤทธิ์ฆ่าเชื้อเริ่มของ DF372 โดยวิธี Inactivation assay พบว่า แม้ว่าในสถานะที่มีสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์สูงถึง 20 µg/ml ปริมาณเชื้อเริ่มที่รอดชีวิตยังมีถึงร้อยละ 87-90 ของกลุ่มควบคุม แสดงว่า ฤทธิ์ฆ่าเชื้อเริ่มไม่ใช่กลไกหลักในการออกฤทธิ์ต้านเริ่มของ DF372

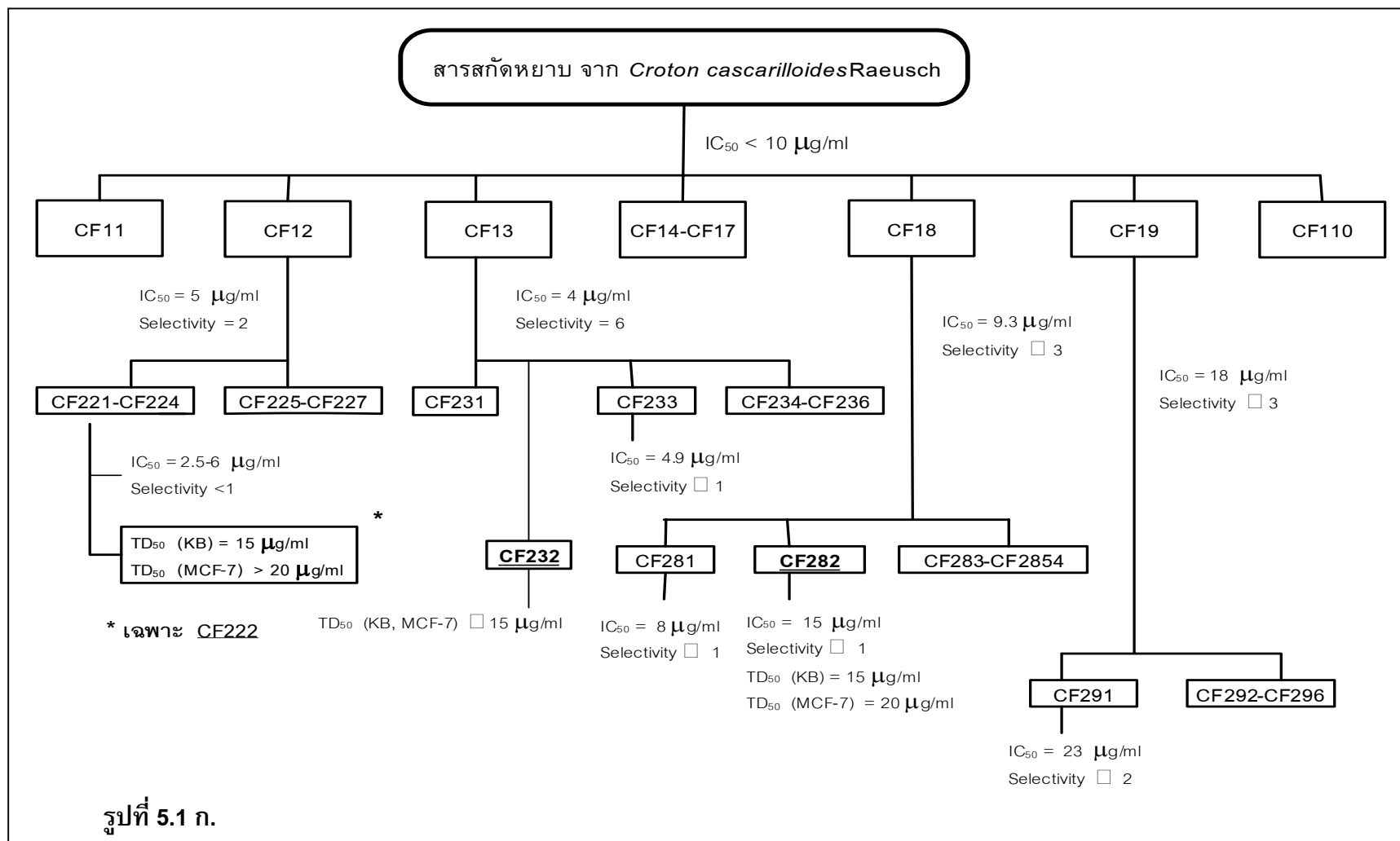
การศึกษาฤทธิ์ต้านเริ่มของ DF372 ในภาวะที่เซลล์เพาะเลี้ยงถูกทำให้ติดเชื้อเริ่มต่างกัน 10 เท่า ($moi=0.01$ และ $moi=1$) พบว่า ในภาวะที่เซลล์เพาะเลี้ยงถูกทำให้ติดเชื้อเริ่มต่ำ DF372 มีฤทธิ์แรงกว่าในภาวะที่มีเชื้อเริ่มสูงถึง 4 เท่า [IC_{50} ($moi = 0.01$) = 0.3 µg/ml และ IC_{50} ($moi = 1$) = 1.2 µg/ml] และเมื่อศึกษาในภาวะที่ใช้เซลล์เพาะเลี้ยงคือ Vero และ A549 พบว่า ค่า IC_{50} ของ DF372 = 2.7 และ >5 µg/ml ตามลำดับ ดังนั้นฤทธิ์ต้านเริ่มของ DF372 ขึ้นกับปริมาณเชื้อเริ่มที่ทำให้เซลล์ติดเชื้อ และชนิดของเซลล์ที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อเริ่ม

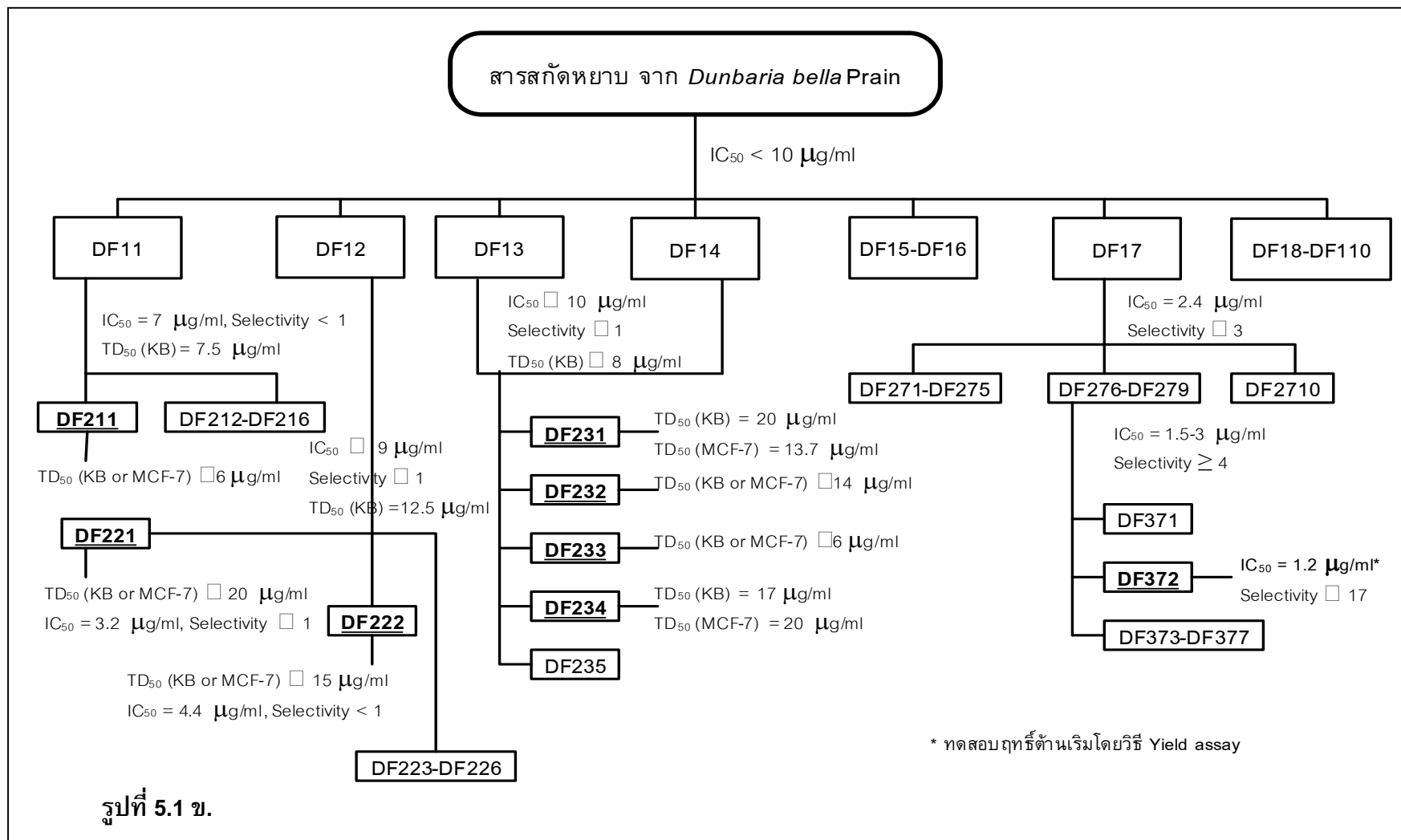
การศึกษากลุ่มของสารประกอบเคมีใน DF372 พบว่า สารที่แยกได้จาก DF372 ด้วย TLC ให้ผลลบบกับ Dragendorff, Ninhydrin, Ferric chloride TS และ Anisaldehyde แสดงว่า สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ DF372 ไม่ใช่สารในกลุ่มอัลคาลอยด์ที่มีไนโตรเจนอยู่ใน/นอก ring หรือไม่ใช่สารในกลุ่ม Tannin (หรือ polyphenol) หรือไม่ใช่สารในกลุ่ม di-/triterpene หรือไม่ใช่สารใน

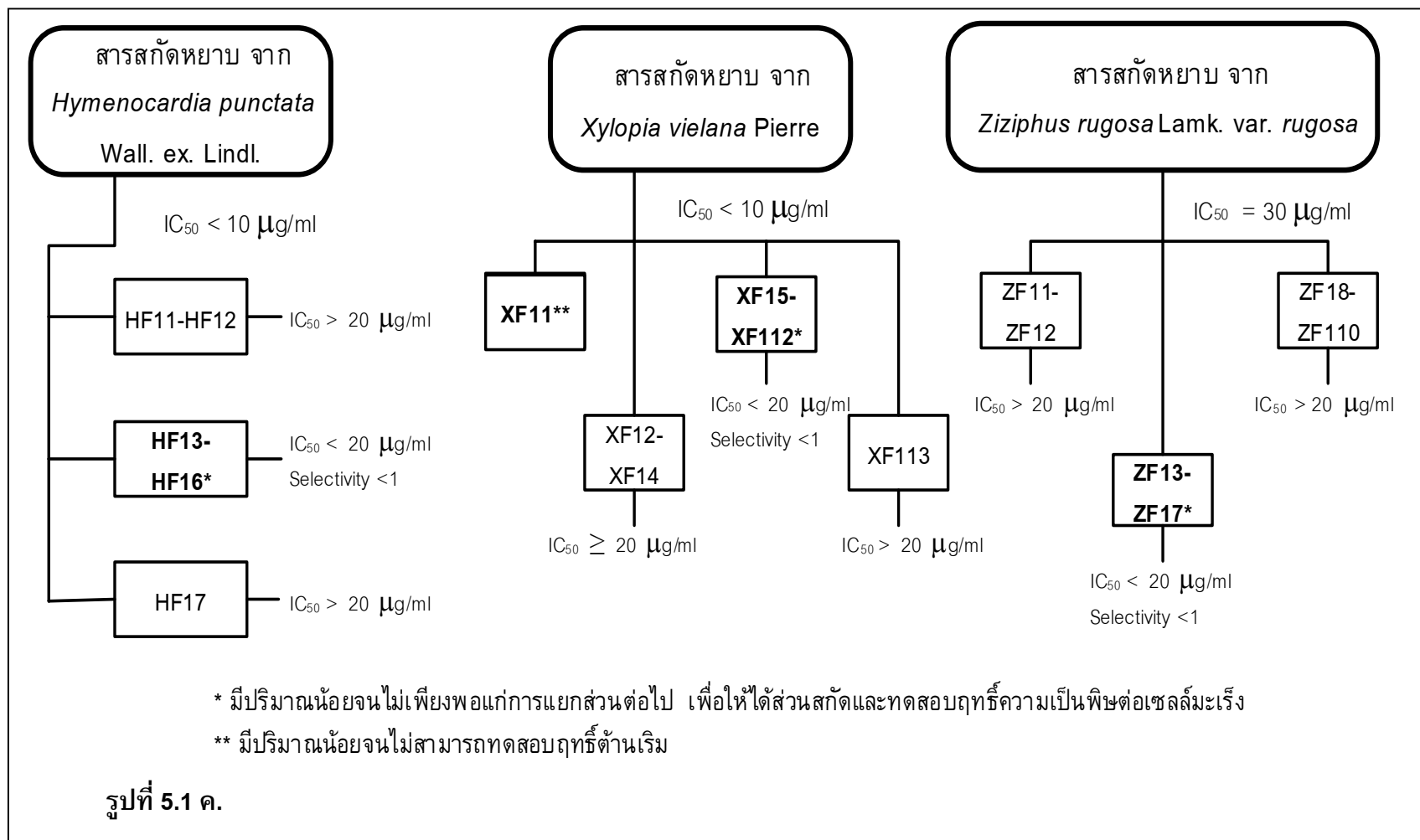
กลุ่มสเตียรอยด์ ผลจากการที่ TLC fingerprint เรืองแสงภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 และ 354 nm และให้ผลบวกกับไอโอดีน แสดงว่า สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ DF372 น่าจะมีพันธะคู่เป็นส่วนประกอบ (วันดี 2536)

ผลการศึกษาวิจัยครั้งนี้นอกจากจะได้สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ DF372 ที่มีฤทธิ์ต้านเริ่มแล้ว ยังได้ 10 สารสกัดที่มีศักยภาพในการต้านมะเร็ง (CF 222, CF232, CF282, DF211, DF221-DF222, DF231-DF234) โดยมี TD50 $\square$ 20 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง KB และ/หรือ MCF-7 (รูปที่ 5.1 ก. และ ข.)

รูปที่ 5.1 แผนภูมิสรุปฤทธิ์ต้านเริ่ม, Selectivity และฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของ
ส่วนสกัด และสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่ได้จากการแยกส่วนของสารสกัดหยาบจาก
Croton cascarilloides Raeusch (ก), *Dunbaria bella* Prain (ข),
Hymenocardia punctata Wall. ex. Lindl. (ค), *Xylopia vielana* Pierre (ด)
และ *Ziziphus rugosa* Lamk. var. *rugosa* (ค) ด้วยเทคนิค Chromatography







บรรณานุกรม

- เกียรติ รักษ์รุ่งธรรม. Advances on AIDS: Pathogenesis and therapy. In *Color atlas of HIV infection* (สิริ เชี่ยวชาญวิทย์, Ed.) ปีปี ฟอเรนส์ บุ๊ค เซนเตอร์ 2540 หน้า 1-2.
- นพมาศ สุนทรเจริญมาศ, ธนุชา บุญจรัส, รุ่งระวี เต็มศิริฤกษ์กุล, วิจิต เปานิล, อาทร รื้อไพบูลย์. สารานุกรมสมุนไพรเล่ม 4 กกยาอีสาน. มุลินธิมหาวิทยาลัยมหิดล 2542 หน้า 234-235.
- นันทวัน บุญยะประภัศร, อรณัฐ โชคชัยเจริญพร. สมุนไพรไม้พุ่มบ้าน (2). บริษัทประชาชน จำกัด 2541 หน้า 613-614.
- นันทวัน บุญยะประภัศร, อรณัฐ โชคชัยเจริญพร. สมุนไพรไม้พุ่มบ้าน (3). บริษัทประชาชน จำกัด 2542 หน้า 416.
- พิไลพันธ์ พุทวณะ ลักษณะทั่วไปในการเพิ่มจำนวนของไวรัส ใน: *ไวรัสวิทยา* (พิไลพันธ์ พุทวณะ, บรรณาธิการ) สำนักพิมพ์อักษรสมัย กรุงเทพฯ 2540, หน้า 3.1-3.7.
- วงศ์สถิตย์ ฉั่วสกุล, จวีวรรณ ใจแก้ว. สมุนไพรพื้นบ้านจังหวัดอุบลราชธานี (3). วารสารสมุนไพร 2541; 5 (2): 28-51.
- วงศ์สถิตย์ ฉั่วสกุล, นพมาศ สุนทรเจริญมาศ. สมุนไพรพื้นบ้านจังหวัดอุบลราชธานี (1). วารสารสมุนไพร 2540; 4 (2): 29-61.
- วันดี กฤษณพันธ์. ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ. ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล 2536 หน้า 117-129.
- สุรางค์ ดันตวิณิช Herpes simplex virus ใน: *ไวรัสวิทยา* (พิไลพันธ์ พุทวณะ, บรรณาธิการ) สำนักพิมพ์อักษรสมัย กรุงเทพฯ 2540, หน้า 16.11-16.15.
- Abraham Z, Bhakuni SD, Garg HS, Goel AK, Mehrotra BN, Patnaik GK. Screening of Indian plants for biological activity. Part XII. *Indian J Exp Biol* 1986; 24:48-68.
- Bastow KF & Akanitapichat P. Antiviral agents, DNA. In: *Burger's medicinal chemistry and drug discovery* (Wolf ME, Ed.) Wiley, New York, USA, 1997, pp. 497-549.
- Benedetti J, Corey L, Ashley R. Recurrence rates in genital herpes after symptomatic first-episode infection. *Ann Intern Med* 1994; 121: 847-854.
- Benedetti J, Corey L, Ashley R. Recurrence rates in genital herpes after symptomatic first-episode infection. *Ann Intern Med* 1994; 121: 847-854.
- Bhakuni OS, Dhar ML, Dhar MM, Dhawan BN, Mehrotra BN. Screening of Indian plants for biological activity. Part II. *Indian J Exp Biol* 1969; 7: 250-262.

- Bhandary MJ, Chandrashekar KR, Kaveriappa KM. Medical ethnobotany of the Siddis of Uttara Kannada district, Karnataka, India. *J Ethnopharmacol* 1995; **47**: 149-158.
- Chen CY, Ballard RC, Beck-Sague CM, Dangor Y, Radebe F, Schmid S, Weiss JB, Tshabalala V, Fehler G, Htun Y, Morse SA. Human immunodeficiency virus infection and genital ulcer disease in South Africa: the herpetic connection. *Sex Transm Dis* 2000; **27**: 21-29.
- Cheng HY, Lin CC, Lin TC. Antiherpes simplex virus type 2 activity of casuarinin from the bark of *Terminalia arjuna* Linn. *Antiviral Res.* 2002; **55**: 447-455.
- Cowan FM, Johnson AM, R. Ashley, L. Corey, and A. Mindel. Antibody to herpes simplex virus type 2 as serological marker of sexually lifestyle in populations. *Br Med J* 1994; **309**: 132-139.
- Dickerson MC, Johnston J, Delea TE, White A, Andrews E. The causal role for genital ulcer disease as a risk factor for transmission of human immunodeficiency virus. An application of the Bradford Hill criteria. *Sex Transm Dis* 1996; **23**: 429-440.
- Fleming DT, McQuillan GM, Johnson RE, Nahmias AJ, Aral SO, Lee FK, St Louis ME. Herpes simplex virus type 2 in the United States, 1976 to 1994. *New Engl J. Med* 1997; **337**: 1105-1111.
- Forsgren MF, Skoog E, Jeansson S, Oloffson S, Giesecke J. Prevalence of antibodies to herpes simplex virus in pregnant women in Stockholm in 1969, 1983 and 1989: implications for STD epidemiology. *Int J. Sex Trasm Dis AIDS* 1994; **5**: 113-116.
- Garcia CC, Talarico L, Almeida N, Colombres S, Duschatzky C, Damonte EB. Virucidal activity of essential oils from aromatic plants of San Luis, Argentina. *Phytother Res.* 2003; **17**: 1073-1075.
- Garland SM, Lee TN, Ashley RL, Corey L, Sacks SL. Automated microneutralization: method and comparison with western blot for type-specific antibodies in two pregnant populations. *J Virol Methods* 1995; **55**: 285-294.
- Goncalves JL, Leitao SG, Monache FD, Miranda MM, Santos MG, Romanos MT, Wigg MD. In vitro antiviral effect of flavonoid-rich extracts of *Vitex polygama* (Verbenaceae) against acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1. *Phytomedicine.* 2001; **8**: 477-480.
- Gwanzura L, McFarland W, Alexander D, Burke RL, Katzenstein D. Association between human immunodeficiency virus and herpes simplex virus type 2

- seropositivity among male factory workers in Zimbabwe. *J Infect Dis* 1998; **177**: 481-484.
- Holmberg SD, Stewart JA, Gerber AR, Byers RH, Lee FK, O'Malley PM, Nahmias AJ. Prior herpes simplex virus type 2 infection as a risk factor for HIV infection. *JAMA* 1988; **259**: 1048-1050.
- Hook EW, Cannon RO, Nahmias AJ, Lee FF, Campbell CH Jr, Glasser D, Quinn TC. Herpes simplex virus infection as a risk factor for human immunodeficiency virus infection in heterosexuals. *J Infect Dis* 1992; **165**: 251-255.
- Johnson RE, Nahmias AJ, Magdar LS, Lee FK, Brooks CA, Snowden CB. A seroepidemiologic survey of the prevalence of herpes simplex virus type 2 infection in the United States. *New Engl J. Med* 1989; **321**: 7-12.
- Keet IP, Lee FK, van Griensven GJ, Lange JM, Nahmias A, Coutinho RA. Herpes simplex virus type 2 and other genital ulcerative infections as a risk factor for HIV-1 acquisition. *Genitourin Med* 1990; **66**: 330-333.
- Khosa RL, Pandey VB, Singh JP. *Indian drugs* 1983; **20**: 241-245.
- Kulshreshtha MJ and Rastogi RP. Chemical constituents of *Zizyphus rugosa* Lam. *Int J Cancer* 1972; **10**: 152-154.
- Nieto M, Sevenet T, Leboeuf M, Cave A. Plants of new Caledonia. XL. Alkaloids of Annonaceae: alkaloids of *Xylopia pancheri*. *Planta Medica* 1976; **30**: 489-494.
- Obasi A, Mosha F, Quigley M, Sekirassa Z, Gibbs T, Munguti K, Todd J, Grosskurth H, Mayaud P, Chagalucha J, Brown D, Mabey D, Hayes R. Antibody to herpes simplex virus type 2 as a marker of sexual risk behavior in rural Tanzania. *J Infect Dis* 1999; **179**: 16-24.
- Pelosi E, Mulamba GB, Coen DM. Penciclovir and pathogenesis phenotypes of drug-resistant Herpes simplex virus mutants. *Antiviral Res.* 1998; **37**: 17-28.
- Pottage JC, Kessler HA. Herpes simplex virus resistance to acyclovir: clinical relevance. *Infect Agents Dis* 1995; **4**: 115-124.
- Roizman B. Herpes simplex viruses and their replication. In *Fields Virology* (Fields BN, Knipe DM, Howley PM, ed) Lippincott-Raven, Philadelphia, pp. 2231-2295.
- Ruiter de JC, Thin RN. Genital herpes – a guide to pharmacological therapy. *Drugs* 1994; **47**: 297-304.

- Russell DB, Tabrizi SN, Russell JM, Garland SM. Seroprevalence of herpes simplex virus types 1 and 2 in HIV-Infected and uninfected homosexual men in a primary care setting. *J Clin Virol* 2001; **22**: 305-13.
- Schuhmacher A, Reichling J, Schnitzler P. Virucidal effect of peppermint oil on the enveloped viruses herpes simplex virus type 1 and type 2 in vitro. *Phytomedicine*. 2003; **10**: 504-510.
- Stamm WE, Handsfield HH, Rompalo AM, Ashley RL, Roberts PL, Corey L. The association between genital ulcer disease and acquisition of HIV infection in homosexual men. *JAMA* 1988; **260**: 1429-1433.
- Stanberry L, Cunningham A, Mertz G, Mindel A, Peters B, Reitano M, Sacks S, Wald A, Wassilew S, Woolley P. New developments in the epidemiology, natural history and management of genital herpes. *Antiviral Res* 1999; **42**: 1-14.
- Tripathy YC, Devi S, Pandey VB, Shah AH. Phytochemical study of *Zizyphus rugosa*. *Fitoterapia* 1988; **2**: 1582-1588.
- Wasserheit JN. Epidemiological synergy. Interrelationships between human immunodeficiency virus infection and other sexually transmitted diseases. *Sex Transm Dis* 1992; **19**: 61-77.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

อยู่ระหว่างการดำเนินการเตรียมและส่งผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ
(Journal of Ethnopharmacology)

ภาคผนวก ก.

การเสนอผลงานโปสเตอร์

ในการประชุม “นักวิจัยรุ่นใหม่...พบ...เมธีวิจัยอาวุโส สกว.” 9-11 มค. 2547 จัด
โดย สกว. ที่โรงแรมเฟลิทรี ริเวอร์แคว กาญจนบุรี

ANTICANCER AND ANTIVIRAL ACTIVITIES OF MEDICINAL PLANTS FROM UBON RATCHATHANI

Pannarat Akanitapichat^{1*}, Aree Wangmaneerat¹, Kenneth F. Bastow², Prapon Wilairat³

¹ Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand

² School of Pharmacy, University of North Carolina at Chapel Hill Chapel Hill, North Carolina, 27599-7360, USA; e-mail Ken_Bastow@unc.edu

³ Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400

Abstract: Five medicinal plants from Ubon Ratchathani, used by traditional healers to treat viral infection, were selected for evaluation of *in vitro* anticancer and antiviral activities. From a bioassay-guided fractionation procedure, some fractions obtained from *Croton cascarilloides* Raeusch and *Dunbaria bella* Prain exerted antiproliferative activity against malignant cell lines, with 50% cytotoxic concentration (CC_{50}), ranging from 6 to 20 $\mu\text{g/ml}$. In addition, the fraction (DF372) from *Dunbaria bella* Prain showed pronounced activity against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and 2 (HSV-2). The 50% HSV inhibitory concentration (EC_{50}) of DF372 was 1.2 $\mu\text{g/ml}$ with about 17-fold selectivity. Preliminary characterization of its antiviral action showed that the observed HSV inhibitory activities were not associated with virucidal effects. Moreover, anti-HSV efficacy depended on multiplicity of infection.

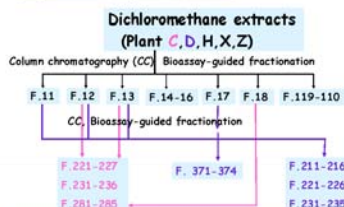
Objective

1. Evaluate *in vitro* antiviral and/or anticancer of partially purified fractions obtained from five medicinal plants, used by traditional healers to treat viral infection, from Ubon Ratchathani.
2. Preliminarily characterize anti-HSV action of antiviral fractions.

Material and Methods



Preparation of plant fractions



1. Viral yield assay. Vero confluent cells were infected with HSV at a multiplicity of either 0.01 ($moi = 0.01$) or 1 PFU ($moi = 1$). One hour after infection, the inoculate was replaced with medium containing 0.5% FBS and supplemented with test fractions. Viral production at 23 hour postinfection was determined by serial dilution and plaque assay. Plaque assay was performed as previously described (1). 2. Cell growth inhibition. Cell growth inhibition by test fractions was measured using Sulforhodamine B-staining (2). 3. Virucidal effect. Virus stock solution was mixed with different concentrations of test fractions and incubated at 37°C. Surviving virus titers were determined by plaque reduction assay.

Fractions	CC_{50} (KB) $\mu\text{g/ml}$	CC_{50} (MCF-7) $\mu\text{g/ml}$
CF222	16	>20
CF232	14	16.6
CF282	15	20
DF211	5.8	6
DF221	18.5	21.8
DF222	13	15.6
DF231	20	14.5
DF232	14	13.7
DF233	6.3	6.6

Table 1. Fractions with anticancer activity.

Table 2. Anti-HSV activity of DF372.

Virus	EC_{50} * ($\mu\text{g/ml}$)	CC_{50} (Vero) ($\mu\text{g/ml}$)	Selectivity (CC_{50}/EC_{50})
HSV-1	1.22±0.04	20.50±0.25	16.8
HSV-2	1.24±0.08	20.50±0.25	16.5

* Confluent Vero cells were infected at $moi = 1$.

KB and MCF-7 were nasopharyngeal and breast cancer cells, respectively.

Results and Discussion

Of nine fractions with antiproliferative activities, DF211 and DF233 were the most active (Table 1). For antiviral fractions, DF372 displayed significant inhibitory activity against both HSV-1 and HSV-2, with the most antiviral selectivity (Table 2).

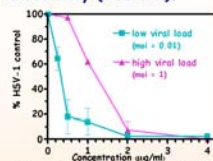


Figure 1. Effect of viral load on DF372 anti-HSV activity.

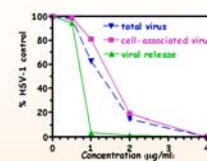


Figure 2. Effect of DF372 on HSV growth. ($moi = 1$)

Preliminary studies of DF372 anti-HSV action showed that its ED_{50} was about four-fold decrease under the low viral load (Figure 1). Preincubation of DF372 (even at 20 $\mu\text{g/ml}$) with either HSV-1 or HSV-2 did not affect the HSV infectivity (data not shown). Moreover, its ED_{50} of cell-associated HSV production is similar to that of total viral production (Figure 2). These results suggested that antiviral activity of DF372 was not associated with virucidal effect. The DF372 mode of anti-HSV action was likely due to processes affecting intracellular viral production/maturation than viral release.

References

- (1) Akanitapichat P, Lowden CT & Bastow KF. 1,3-Dihydroxyacridone derivatives as Inhibitors of Herpes Virus Replication. *Antiviral Res* 45: 123-34 (2000).
- (2) Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S & Boyd MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Inst* 82: 1107-1112, 1990.

Acknowledgement

This work was financially supported by the Thailand Research Fund.

ฤทธิ์ต้านมะเร็งและฤทธิ์ต้านไวรัสของสมุนไพรพื้นบ้านจังหวัดอุบลราชธานี

ANTICANCER AND ANTIVIRAL ACTIVITIES OF MEDICINAL PLANTS FROM UBON RATCHATHANI

พรณรัตน์ อภินิษฐาภิชาติ^{1*}, อารี วัฒนรัตน์¹, Kenneth F. Bastow² และ ประพนธ์ วิไลรัตน์³

^{1*} Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190;

² School of Pharmacy, University of North Carolina at Chapel Hill Chapel Hill, North Carolina, 27599-7360, USA; e-mail Ken_Bastow@unc.edu; ³ Department of Biochemistry, Faculty of

Science, Mahidol University, Bangkok 10400

Abstract : Five medicinal plants from Ubon Ratchathani, used by traditional healers to treat viral infection, were selected for evaluation of *in vitro* anticancer and antiviral activities. From a bioassay-guided fractionation procedure, some fractions obtained from *Croton cascarilloides* Raeusch and *Dunbaria bella* Prain exerted antiproliferative activity against malignant cell lines, with 50% cytotoxic concentration (CC₅₀), ranging from 5 to 20 µg/ml. In addition, the fraction (DF-372) from *Dunbaria bella* Prain showed pronounced activity against herpes simplex virus (HSV) type 1 and 2. The 50% HSV inhibitory concentration (EC₅₀) of DF-372 was 1.5 µg/ml with 13.8-fold selectivity. Preliminary characterization of its antiviral action showed that the observed HSV inhibitory activities were not associated with virucidal effects. Moreover, anti-HSV efficacy depended on multiplicity of infection.

Methodology : 1. Viral yield and plaque assay. Vero confluent cells were infected with HSV at 1 pfu/cell. One hour after infection, the inoculate was replaced with medium containing 0.5% FBS and supplemented with test fractions. Viral production at 23 hour postinfection was determined by serial dilution and plaque assay. Plaque assay was performed as previously described (1). 2. Cell growth inhibition. Cell growth inhibition by test fractions was measured using Sulforhodamine B-staining (2). 3. Virucidal effect. Virus stock solution was mixed with different concentrations of test fractions and incubated at 37°C. Surviving virus titers were determined by plaque reduction assay.

Results, Discussion and Conclusion: Dichloromethane extracts of five medicinal plants from Ubon Ratchathani were partially purified by column chromatography and investigated for anticancer and antiviral activities using cultured cell models. Antiproliferative activities against nasopharyngeal carcinoma (KB) and breast carcinoma (MCF-7) cell lines were found in three fractions (CF-222, CF-232 and CF282) from *Croton cascarilloides* Raeusch, and six fractions (DF-211, DF-221, DF-222, DF-231, DF-232 and DF-233) from *Dunbaria bella* Prain. DF-211 and DF-231 strongly inhibited KB cells [CC₅₀ (DF-211) = 5.8 µg/ml, CC₅₀ (DF-231) = 6.3 µg/ml], as well as MCF-7 [CC₅₀ (DF-211) = 6 µg/ml, CC₅₀ (DF-231) = 6.6 µg/ml]. For antiviral fractions, only one fraction (DF-372) from *Dunbaria bella* Prain was active and selective against both HSV-1 and HSV-2. The EC₅₀ and CC₅₀ of DF-372 were 1.5 µg/ml and 20.8 µg/ml, respectively. Incubation of HSV and DF-372 at 20 µg/ml minimally inactivated the viral infectivity, inferring its antiviral action was not primarily due to virucidal effect. Additionally, the five-fold reduction of DF-372 EC₅₀ under the low viral load suggested that its anti-HSV efficacy was multiplicity-dependent.

References: (1) Akanitapichat, et al. *Antiviral Res* **45**: 123-134 (2000).
(2) Skehan, et al. *J Natl Inst* **82**: 1107-1112 (1990).

Keywords: anticancer, antiviral, anti-HSV

ภาคผนวก ข.

การเตรียมสารละลาย

Acetic acid 1% (v/v) solution

Acetic acid	1	ml
Distilled water qs to	100	ml

Anisaldehyde 0.5% (v/v)

Anisaldehyde	0.5	ml
Glacial acetic acid	10	ml
Sulfuric acid	5	ml
Methanol qs to	100	ml

Crystal violet 0.8% (w/v) solution

Crystal violet	0.8	g
Formaldehyde	3	ml
Ethanol qs to	100	ml

Dragendorff reagent

1. เตรียมสารละลาย 1 โดยละลาย bismuth nitrate 4 g ใน nitric acid 6 ml
2. เตรียมสารละลาย 2 โดยละลาย potassium iodide ในน้ำกลั่น 25 ml
3. ผสมสารละลาย 2 ลงในสารละลาย 1 ทิ้งไว้ให้ตกตะกอน
4. รินเอาส่วนบนแล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 50 ml

Dulbecco's Phosphate-buffered saline solution (sterile)

Dulbecco's Phosphate-buffered saline powder	1	ซอง
Distilled water qs to	1000	ml

(Filter solution through a 0.22 μ m filter and adjust final solution pH to 7.0-7.2)

Ferric chloride TS

Ferric chloride	1	g
Distilled water qs to	100	ml

Methyl cellulose 2% solution (sterile)

Methyl cellulose	2	g
Distilled water qs to	100	ml
(Autoclave)		

Ninhydrin 1% (w/v)

Ninhydrin	1	g
Distilled water qs to	100	ml

Overlay media (sterile)

2XRPMI-1640 media (sterile)	50	ml
Methyl cellulose 2% solution (sterile)	50	ml
FBS	0.5	ml

RPMI-1640 media (sterile)

RPMI-1640 powder	1	g
Herpes	5958	mg
Sodium bicarbonate	2	g
Distilled water qs to	1000	ml

(Filter solution through a 0.22 μ m filter and adjust final solution pH to 7.0-7.2)

SRB 0.4% (w/v) solution

SRB	0.4	g
Acetic acid 1% qs to	100	ml

TCA 50% (w/v) solution

TCA	50	g
-----	----	---

Distilled water qs to	100	ml
-----------------------	-----	----

Tris 10 mM

Tris (hydroxymethyl)-aminomethane	121.14	mg
-----------------------------------	--------	----

Distilled water qs to	100	ml
-----------------------	-----	----

(adjust final solution pH to 10)

Trypsin-EDTA solution (sterile, 10X)

Trypsin	0.5	g
---------	-----	---

EDTA	0.2	g
------	-----	---

NaCl	0.85	g
------	------	---

Distilled water qs to	100	ml
-----------------------	-----	----

(Filter solution through a 0.22 μ m filter)