



รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

การศึกษาฤทธิ์ของพืชสมุนไพรไทยต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของ
ไวรัสพอร์อาร์เอสในเซลล์เพาะเลี้ยง MARC-145

Evaluation of anti-viral effects of Thai medicinal plants in inhibition of
porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication in
MARC-145 cells

โดย

วสิน เจริญทัศน์ธนกุล และ รุ่งทิพย์ กาวารี

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

2555

รหัสโครงการวิจัย มจ.1-54-056



รายงานผลการวิจัย

เรื่อง การศึกษาฤทธิ์ของพืชสมุนไพรไทยต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสพอร์อาร์เอสในเซลล์เพาะเลี้ยง MARC-145

Evaluation of anti-viral effects of Thai medicinal plants in inhibition of porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication in MARC-145 cells

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย

ประจำปี 2554

จำนวน 216,600 บาท

หัวหน้าโครงการ

นายวสิน เจริญทัศน์ธนกุล

ผู้ร่วมโครงการ

นางสาวรุ่งทิพย์ กาวารี

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

3/9/2555

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	ข
สารบัญภาพ	ค
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
กิตติกรรมประกาศ	3
คำนำ	4
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	5
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
การตรวจเอกสาร	6
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย	16
ผลการวิจัย	24
วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย	39
เอกสารอ้างอิง	40
ภาคผนวก	47

สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1	ผลผลิตสุทธิต่อไร่ของสารสกัดสมุนไพรในตัวอย่างต่างๆ
ตาราง 2	การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดพลูคว
ตาราง 3	การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดพญาขอ
ตาราง 4	การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดทองพันชั่ง
ตาราง 5	ไคเตอร์ของไวรัสพาร์อาร์เอสในการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดพลูคว ต่อการติดเชื้อเซลล์ MARC-145
ตาราง 6	ไคเตอร์ของไวรัสพาร์อาร์เอสในการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดพลูคว ต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัส
ตาราง 7	ไคเตอร์ของไวรัสพาร์อาร์เอสในการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดพญาขอ ต่อการติดเชื้อเซลล์ MARC-145
ตาราง 8	ไคเตอร์ของไวรัสพาร์อาร์เอสในการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดพญาขอ ต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัส
ตาราง 9	ไคเตอร์ของไวรัสพาร์อาร์เอสในการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดทองพันชั่ง ต่อการติดเชื้อเซลล์ MARC-145
ตาราง 10	ไคเตอร์ของไวรัสพาร์อาร์เอสในการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดทองพันชั่ง ต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัส
ตาราง 11	ฤทธิ์ยับยั้งไวรัสพาร์อาร์เอสจากสารสกัด 50% เอทานอลของพลูคว
ตาราง 12	ฤทธิ์ยับยั้งไวรัสพาร์อาร์เอสจากสารสกัด 50% เอทานอลของพญาขอ
ตาราง 13	ฤทธิ์ยับยั้งไวรัสพาร์อาร์เอสจากสารสกัด 50% เอทานอลของทองพันชั่ง
ตาราง 14	ค่า Rf ที่คำนวณได้จากสารผลิตภัณฑ์เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพ 1	พลูคาว (<i>Houttuynia cordata</i> Thunb.)	8
ภาพ 2	พญาขอ (<i>Clinacanthus nutans</i> (Burm.f.) Lindau)	11
ภาพ 3	ทองพันชั่ง (<i>Rhinacanthus nasutus</i> (Linn.) Kurz)	14
ภาพ 4	ลักษณะของเซลล์ MARC-145 ระหว่างเซลล์ปกติกับเซลล์ที่เกิด CPE	29
ภาพ 5	ปริมาณ plaque ในระยะ pre-infection หลังจากทดสอบด้วยสารสกัด 50% เอทานอลของพลูคาว (ก) เปรียบเทียบกับไวรัสกลุ่มควบคุม (ข)	34
ภาพ 6	ปริมาณ plaque ในระยะ post-infection หลังจากทดสอบด้วยสารสกัด 50% เอทานอลของพลูคาว (ก) เปรียบเทียบกับไวรัสกลุ่มควบคุม (ข)	34
ภาพ 7	ปริมาณ plaque ในระยะ pre-infection หลังจากทดสอบด้วยสารสกัด 50% เอทานอลของพญาขอ (ก) เปรียบเทียบกับไวรัสกลุ่มควบคุม (ข)	35
ภาพ 8	ปริมาณ plaque ในระยะ post-infection หลังจากทดสอบด้วยสารสกัด 50% เอทานอลของพญาขอ (ก) เปรียบเทียบกับไวรัสกลุ่มควบคุม (ข)	36
ภาพ 9	ปริมาณ plaque ในระยะ pre-infection หลังจากทดสอบด้วยสารสกัด 50% เอทานอลของทองพันชั่ง (ก) เปรียบเทียบกับไวรัสกลุ่มควบคุม (ข)	37
ภาพ 10	ปริมาณ plaque ในระยะ post-infection หลังจากทดสอบด้วยสารสกัด 50% เอทานอลของทองพันชั่ง (ก) เปรียบเทียบกับไวรัสกลุ่มควบคุม (ข)	37
ภาพ 11	ผลการทำโครมาโทกราฟีจากสารสกัด 50% เอทานอลของพลูคาว เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน rutin (ซ้าย) และ สาร quercetin (ขวา)	38

การศึกษาฤทธิ์ของพืชสมุนไพรไทยต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของ
ไวรัสพ็อร์อาร์เอสในเซลล์เพาะเลี้ยง MARC-145

Evaluation of anti-viral effects of Thai medicinal plants in inhibition of
porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication in

MARC-145 cells

วสิน เจริญตันธนกุล และ รุ่งทิพย์ กาวารี
Wasin Charerntantanakul and Rungthip Kawaree

สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่ 50290

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชสมุนไพร 3 ชนิด คือ พลูดาว (*Houttuynia cordata* Thunb) พญาขอ (*Clinacanthus nutans* (Burm.f) Lindau) และทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus* (Linn.) Kurz) ต่อการยับยั้งการติดเชื้อเซลล์ของไวรัสพ็อร์อาร์เอส (pre-infection) และการแบ่งตัวของไวรัสภายหลังติดเชื้อเซลล์เพาะเลี้ยง MARC-145 แล้ว (post-infection) พืชสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดถูกนำมาสกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่ น้ำ และเอทานอล 50%, 70% และ 95% และนำสารสกัดที่ได้มาทดสอบหาความเข้มข้นที่สูงที่สุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ MARC-145 เพื่อนำความเข้มข้นที่ได้ไปศึกษาฤทธิ์ต้านไวรัส ผลการศึกษาพบว่าสารสกัด 50% เอทานอลของพืชสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดมีฤทธิ์ต้านไวรัสดีที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายอื่นๆ โดยที่สารสกัด 50% เอทานอลของพญาขอมีฤทธิ์ต้านไวรัสสูงที่สุดโดยสามารถลดไตเตอร์ไวรัสได้จาก 10^7 TCID₅₀/มล. เหลือ $10^{2.41}$ และ $10^{0.75}$ TCID₅₀/มล. ในระยะ pre-infection และระยะ post-infection ตามลำดับ รองลงมาคือ สารสกัด 50% เอทานอลของทองพันชั่งที่สามารถลดไตเตอร์ไวรัสได้เหลือ $10^{2.41}$ และ $10^{2.5}$ TCID₅₀/มล. ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัด 50% เอทานอลของพลูดาวมีฤทธิ์ต้านไวรัสได้ดีเฉพาะในระยะ post-infection เท่านั้น โดยลดไตเตอร์ไวรัสลงเหลือ $10^{5.75}$ และ $10^{2.33}$ TCID₅₀/มล. ตามลำดับ การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากพืชสมุนไพร

พลูควาว พญาขอ และทองพันชั่งมีฤทธิ์ต้านไวรัสพรีอาร์อาร์เอสทั้งก่อนและหลังไวรัสติดเข้าสู่เซลล์ ซึ่งองค์ความรู้นี้อาจนำไปประยุกต์ใช้เพื่อควบคุมโรคพรีอาร์อาร์เอสในภาคการผลิตได้ในอนาคต
 คำสำคัญ: พลูควาว, พญาขอ, ทองพันชั่ง, ไวรัสพรีอาร์อาร์เอส

Abstract

This study aims at investigating the antiviral potentials of crude extract of three Thai medicinal plants, i.e. *Houttuynia cordata* Thunb, *Clinacanthus nutans* (Burm.f) Lindau, and *Rhinacanthus nasutus* (Linn.) Kurz, against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) replication in MARC-145 cells. The plants were extracted by four different solvents – water and ethanol at 50%, 70%, and 95% v/v. Highest concentration of each crude extract that showed no cytotoxicity to MARC-145 cells was obtained and subsequently used for antiviral assays. Among all crude extracts, crude extracts from 50% ethanol showed highest anti-PRRSV potentials in all three plant types. The *H. cordata* crude extract could reduce PRRSV titers from 10^7 TCID₅₀/ml to $10^{2.41}$ and $10^{0.75}$ TCID₅₀/ml in pre-infection and post-infection assays, respectively. Likewise, the *C. nutans* crude extract could reduce PRRSV titers to $10^{2.41}$ and $10^{2.5}$ TCID₅₀/ml, respectively. On the other hand, the *R. nasutus* crude extract could reduce PRRSV titers only in post-infection assay and the PRRSV titers after *R. nasutus* treatment were $10^{5.75}$ and $10^{2.33}$ TCID₅₀/ml, respectively. Results of this study showed that these three types of Thai medicinal plants have a potential to interfere with PRRSV replication *in vitro*, and further suggested that they may be exploited for future PRRSV control strategy.

Keyword: *Houttuynia cordata* Thunb, *Clinacanthus nutans* (Burm.f) Lindau, *Rhinacanthus nasutus* (Linn.) Kurz, porcine reproductive and respiratory syndrome virus

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่องการศึกษาฤทธิ์ของพืชสมุนไพรไทยต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสพอร์อาร์เอสในเซลล์เพาะเลี้ยง MARC-145 (Evaluation of Anti-viral Effects of Thai Medicinal Plants in Inhibition of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Replication in MARC-145 Cells) ได้สำเร็จลุล่วง โดยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปีงบประมาณ 2554 ผู้วิจัยขอขอบคุณสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่อนุเคราะห์เรื่องสถานที่และอุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยให้เสร็จสมบูรณ์ ผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณเรือนแก้ว ประพฤติ ที่ช่วยเหลือเรื่องการทำปฏิบัติการและการใช้อุปกรณ์วิทยาศาสตร์

ผู้วิจัย

คำนำ

ไวรัส porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) หรือไวรัสพอร์อาร์เอส เป็นอาร์เอ็นเอ (RNA) ไวรัสที่ก่อปัญหาทางระบบสืบพันธุ์และระบบทางเดินหายใจของสุกร สุกรที่ติดเชื้อไวรัสพอร์อาร์เอสจะแสดงปัญหาผสมติดยาก แท้ง ลูกตายแรกคลอดสูง ลูกที่เกิดมาโตช้า และมีอัตราการติดเชื้อแทรกซ้อนสูง สุกรขุนที่ติดเชื้อไวรัสพอร์อาร์เอสจะแสดงอาการปอดอักเสบ โตช้า และเสียชีวิต

โรคติดเชื้อไวรัสพอร์อาร์เอสเป็นโรคอุบัติใหม่ของสุกร พบครั้งแรกในทวีปยุโรปเมื่อประมาณปี พ.ศ. 2534 จากนั้นมีการระบาดทั่วโลกอย่างรวดเร็ว พบครั้งแรกในประเทศไทยประมาณปี พ.ศ. 2536 ปัจจุบันฟาร์มสุกรในทุกภาคของประเทศไทยติดเชื้อไวรัสพอร์อาร์เอส

เชื้อไวรัสพอร์อาร์เอสมีความสามารถในการกดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของสุกรทั้งต่อตัวไวรัสเองและต่อเชื้อก่อโรคชนิดอื่นๆ เช่น ไวรัสสัวัดสุกร ไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียม และกลุ่มแบคทีเรียที่ก่อโรคทางระบบทางเดินหายใจในสุกร ส่งผลให้สุกรป่วยด้วยโรคติดเชื้อต่างๆ ง่ายขึ้น และรุนแรงขึ้น สุกรมีอัตราการเจริญเติบโตที่ช้าลงอย่างมีนัยสำคัญ จากเดิมสุกรขุนใช้ระยะเวลาเลี้ยงทั้งหมดตั้งแต่แรกคลอดจนถึงส่งโรงงานแปรรูปประมาณ 6 เดือน ปัจจุบันใช้ระยะเวลาเลี้ยงทั้งหมด 6.5 ถึง 7 เดือน ทำให้เกษตรกรผู้เลี้ยงสุกรมีต้นทุนการผลิตสุกรสูงขึ้น รวมถึงมีค่าใช้จ่ายด้านเวชภัณฑ์เพื่อการรักษาโรคติดเชื้อแทรกซ้อนมากขึ้น ในประเทศสหรัฐอเมริกา มีรายงานการประเมินมูลค่าความเสียหายทางเศรษฐกิจที่เกิดจากเชื้อไวรัสพอร์อาร์เอสต่ออุตสาหกรรมการผลิตสุกรคิดเป็นมูลค่าประมาณปีละ 500 ล้านดอลลาร์สหรัฐ ในประเทศไทย มูลค่าความสูญเสียทางเศรษฐกิจที่เกิดจากไวรัสพอร์อาร์เอสยังไม่มีรายงานอย่างเป็นทางการแต่เป็นที่ยอมรับในกลุ่มเกษตรกรผู้ผลิตสุกรว่าไวรัสพอร์อาร์เอสทำให้ผลผลิตสุกรของฟาร์มลดลงอย่างชัดเจน

ในปัจจุบัน ยังไม่มีวิธีการจัดการใดที่สามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัสพอร์อาร์เอสในสุกรได้อย่างมีประสิทธิภาพ การฉีดวัคซีนป้องกันโรคพอร์อาร์เอสเป็นวิธีหนึ่งในหลายวิธีที่เกษตรกรนิยมใช้ เพราะมีค่าใช้จ่ายที่ไม่สูงมากและสามารถป้องกันโรคได้ แต่ว่าการฉีดวัคซีนป้องกันโรคพอร์อาร์เอสมีข้อจำกัดคือวัคซีนจะป้องกันโรคได้ต่อเมื่อสุกรมีการติดเชื้อซ้ำภายหลังได้รับวัคซีนไปแล้วอย่างน้อย 1 เดือน ซึ่งเป็นระยะเวลานานมาก ถ้าหากสุกรติดเชื้อซ้ำภายในระยะเวลา 1 เดือนหลังฉีดวัคซีน สุกรจะแสดงอาการป่วยไม่แตกต่างจากสุกรที่ไม่ได้รับวัคซีนเลย นอกจากนี้ ภูมิคุ้มกันที่สุกรสร้างขึ้นยังมีความจำเพาะกับสายพันธุ์ของไวรัส สุกรที่ได้รับวัคซีนและมีการติด

เชื้อซ้ำด้วยไวรัสที่ต่างสายพันธุ์กับของวัคซีนอาจป่วยด้วยโรคพ็อาร์อาร์เอสได้และความรุนแรงของโรคอาจไม่แตกต่างกับสุกรที่ไม่ได้รับวัคซีน

การใช้สมุนไพรเพื่อยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสพ็อาร์อาร์เอสมอาจช่วยลดระดับความรุนแรงของโรคพ็อาร์อาร์เอสได้ สารสกัดจากพืชสมุนไพรไทยอย่างน้อย 3 ชนิด ได้แก่ พลูคาว (*Houttuynia cordata* Thunb) พญาขอ (*Clinacanthus nutans* (Burm.f.) Lindau) และทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus* (Linn.) Kurz) มีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสก่อโรคที่สำคัญในมนุษย์หลายชนิด เช่น herpes simplex virus-1 (HSV-1), SARS coronavirus, influenza virus และ human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) เป็นต้น ฤทธิ์ของสมุนไพรเหล่านี้ต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสในสุกรยังไม่เคยมีการศึกษา ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยมุ่งเน้นศึกษาการใช้ประโยชน์จากพืชสมุนไพรไทยทั้ง 3 ชนิดเพื่อยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสพ็อาร์อาร์เอสในเซลล์เพาะเลี้ยง ซึ่งพืชสมุนไพรเหล่านี้มีต้นทุนการผลิตที่ไม่สูงและสามารถนำไปใช้ได้จริงในภาคปฏิบัติ อีกทั้งยังสามารถพัฒนาเพื่อประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ได้ด้วย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดพืชสมุนไพรไทย 3 ชนิด ได้แก่ พลูคาว พญาขอ และทองพันชั่งในการยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสพ็อาร์อาร์เอสในเซลล์เพาะเลี้ยง MARC-145

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตสุกร

พลูคาว พญาขอและทองพันชั่งอาจช่วยยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสพ็อาร์อาร์เอส ทำให้สุกรมีโอกาสป่วยด้วยโรคพ็อาร์อาร์เอสลดลงในระหว่างที่สุกรกำลังสร้างภูมิคุ้มกันจากวัคซีนหรือจากการติดไวรัสซ้ำต่างสายพันธุ์ ฤทธิ์การยับยั้งไวรัสของพืชสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดจะช่วยลดปริมาณของไวรัสพ็อาร์อาร์เอสในตัวสุกรลง ช่วยลดโอกาสของการแพร่เชื้อไวรัสภายในฟาร์ม และช่วยลดความเสี่ยงของการติดเชื้อแทรกซ้อนต่างๆ ของสุกร

2. การผลิตเชิงอุตสาหกรรมและเชิงพาณิชย์

สารสกัดพืชสมุนไพรไทยสามารถผลิตในเชิงพาณิชย์เพราะมีต้นทุนการผลิตที่ไม่สูงและองค์ความรู้ที่ได้สามารถนำไปใช้ได้จริงในภาคปฏิบัติ โดยเกษตรกรมีต้นทุนเพียงค่าพืชสมุนไพร

เท่านั้น เกษตรกรสามารถใช้พืชสมุนไพรในรูปแบบผสมอาหารหรือทำเป็นน้ำหมักชีวภาพสำหรับผสมน้ำดื่มให้สุกร

3. พัฒนาศักยภาพระดับบัณฑิตศึกษา

งานวิจัยนี้สร้างนักวิจัยระดับปริญญาโทของสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ในด้านไวรัสวิทยาในสัตว์ ซึ่งปัจจุบันมหาวิทยาลัยแม่โจ้ต้องการบุคลากรทางด้านนี้

การตรวจเอกสาร

ไวรัสพอร์อาร์เอสเป็นอาร์เอ็นเอไวรัสที่ก่อปัญหาทางระบบสืบพันธุ์และระบบทางเดินหายใจของสุกร สุกรติดเชื้อไวรัสพอร์อาร์เอสจะแสดงปัญหาผสมติดยาก แท้ง ลูกตายแรกคลอด สูง ลูกที่เกิดมาโตช้า แคระแกร็นและมีอัตราการติดเชื้อแทรกซ้อนจากไวรัสและแบคทีเรียก่อโรคอื่นๆ สูง (Mengeling *et al.*, 1998; Thacker *et al.*, 1998; van der Linden *et al.*, 2003) สุกรขุนที่ติดเชื้อไวรัสพอร์อาร์เอสแสดงอาการปอดอักเสบ โตช้า และเสียชีวิต (Halbur *et al.*, 1995; Halbur *et al.*, 1996; Rossow *et al.*, 1998; van der Linden *et al.*, 2003)

โรคติดเชื้อไวรัสพอร์อาร์เอสเป็นโรคอุบัติใหม่ของสุกร พบครั้งแรกในทวีปยุโรปเมื่อประมาณปี พ.ศ. 2534 จากนั้นมีการระบาดทั่วโลกอย่างรวดเร็ว พบครั้งแรกในประเทศไทยประมาณปี พ.ศ. 2536 ปัจจุบันฟาร์มสุกรในทุกภาคของประเทศไทยติดเชื้อไวรัสพอร์อาร์เอส (Thanawongnuwech *et al.*, 2004)

เชื้อไวรัสพอร์อาร์เอสมีความสามารถในการกดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของสุกรทั้งต่อตัวไวรัสเองและต่อเชื้อก่อโรคชนิดอื่นๆ เช่น ไวรัสสัวัดสุกร ไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียม และกลุ่มแบคทีเรียที่ก่อโรคทางระบบทางเดินหายใจในสุกร ส่งผลให้สุกรป่วยด้วยโรคติดเชื้อต่างๆ ง่ายขึ้น และรุนแรงขึ้น (Thacker, 2001) สุกรมีอัตราการเจริญเติบโตที่ช้าลงอย่างมีนัยสำคัญ จากเดิมสุกรขุนใช้ระยะเวลาเลี้ยงทั้งหมดตั้งแต่แรกคลอดจนถึงส่งโรงงานแปรรูปประมาณ 6 เดือน ปัจจุบันใช้ระยะเวลาเลี้ยงทั้งหมด 6.5 ถึง 7 เดือน ทำให้เกษตรกรผู้เลี้ยงสุกรมีต้นทุนการผลิตสุกรสูงขึ้น รวมถึงมีค่าใช้จ่ายด้านเวชภัณฑ์เพื่อการรักษาโรคติดเชื้อแทรกซ้อนมากขึ้น ในประเทศสหรัฐอเมริกา มีรายงานการประเมินมูลค่าความเสียหายทางเศรษฐกิจที่เกิดจากเชื้อไวรัสพอร์อาร์เอส ต่ออุตสาหกรรมการผลิตสุกรคิดเป็นมูลค่าปีละประมาณ 500 ล้านดอลลาร์สหรัฐ (Neumann *et al.*, 2005) ในประเทศไทย มูลค่าความสูญเสียทางเศรษฐกิจที่เกิดจากไวรัสพอร์อาร์เอสยังไม่มี

รายงานอย่างเป็นทางการแต่เป็นที่ยอมรับในกลุ่มเกษตรกรผู้ผลิตสุกรว่าไวรัสพ็อร์อาร์เอสทำให้ผลผลิตสุกรของฟาร์มลดลงอย่างชัดเจน

ในปัจจุบัน ยังไม่มีวิธีการจัดการใดที่สามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัสพ็อร์อาร์เอสในสุกรได้อย่างมีประสิทธิภาพ การฉีดวัคซีนป้องกันโรคพ็อร์อาร์เอสเป็นวิธีหนึ่งในหลายวิธีที่เกษตรกรนิยมใช้ เพราะมีค่าใช้จ่ายที่ไม่สูงมากและสามารถป้องกันโรคได้ แต่ว่าการฉีดวัคซีนป้องกันโรคพ็อร์อาร์เอสมีข้อจำกัดคือวัคซีนจะป้องกันโรคได้ต่อเมื่อสุกรมีการติดเชื้อซ้ำภายหลังได้รับวัคซีนไปแล้วอย่างน้อย 1 เดือน ซึ่งเป็นระยะเวลาที่นานมาก ถ้าหากสุกรติดเชื้อซ้ำภายในระยะเวลา 1 เดือนหลังฉีดวัคซีน สุกรจะแสดงอาการป่วยไม่แตกต่างจากสุกรที่ไม่ได้รับวัคซีนเลย (Zuckermann *et al.*, 2007) นอกจากนี้ภูมิคุ้มกันที่สุกรสร้างขึ้นภายหลังการฉีดวัคซีนยังมีความจำเพาะกับสายพันธุ์ของไวรัส สุกรที่ได้รับวัคซีนและมีการติดเชื้อซ้ำด้วยไวรัสที่มีสายพันธุ์แตกต่างจากของวัคซีน อาจป่วยด้วยโรคพ็อร์อาร์เอสได้และความรุนแรงของโรคอาจไม่แตกต่างกับสุกรที่ไม่ได้รับวัคซีน (Zuckermann *et al.*, 2007)

วิธีการจัดการอื่นร่วมกับการใช้วัคซีนป้องกันโรคที่อาจช่วยลดระดับความรุนแรงของโรคพ็อร์อาร์เอสได้ดียิ่งขึ้น เช่น การใช้สมุนไพรเพื่อยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสพ็อร์อาร์เอส สารสกัดด้วยน้ำและกลอโรฟอร์มจากพืชสมุนไพรอย่างน้อย 3 ชนิด ได้แก่ พลุควา (*Houttuynia cordata* Thunb.) พญาขอ (*Clinacanthus nutans* (Burm.f.) Lindau) และทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus* (Linn.) Kurz) มีฤทธิ์ยับยั้งการติดเชื้อสู่เซลล์และการแบ่งตัวของไวรัสก่อโรคที่สำคัญในมนุษย์หลายชนิด เช่น HSV-1, SARS coronavirus, influenza virus และ HIV-1 เป็นต้น (Chiang *et al.*, 2003; Hayashi *et al.*, 1995; Lau *et al.*, 2008; Sangkitporn *et al.*, 1993; Sangkitporn *et al.*, 1995) ฤทธิ์การยับยั้งของสมุนไพรเหล่านี้ต่อการติดเชื้อสู่เซลล์และการแบ่งตัวของไวรัสพ็อร์อาร์เอสยังไม่เคยมีการศึกษา

ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับสมุนไพรที่ศึกษา

1. พลุควา (ภาพ 1)

พลุควาเป็นพันธุ์ไม้ล้มลุก พบได้ทั่วไปในทวีปเอเชีย ตั้งแต่แถบเทือกเขาหิมาลัยไปจนถึงเวียดนาม จีน รวมทั้งไทย และญี่ปุ่น สำหรับประเทศไทยพลุควาจะเป็นพันธุ์ไม้ทางภาคเหนือ ขึ้นตามบริเวณที่ชื้นและริมน้ำ

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Houttuynia cordata* Thunb.

Family Saururaceae

ชื่ออื่นๆ ผักลาวทอง ผักลาวปลา (ภาคเหนือ) ผักลาวทอง พูลลาว (ภาคกลาง)



ภาพ 1 พูลลาว (*Houttuynia cordata* Thunb.)

ที่มา : www.herblpg.com (2007)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

- ต้น : เป็นไม้ขนาดเล็ก ต้นสูงประมาณ 6-12 นิ้ว ลำต้นสีเขียวทอดไปตามพื้นดิน
- ใบ : แตกกิ่งก้านใบแผ่อยู่เหนือดินเล็กน้อย ใบเดี่ยวเหมือนพลูแต่หนากว่าเล็กน้อย โคนใบเว้าลึกยาว 2-3 นิ้ว ใบมีกลิ่นฉุนเหมือนปลาช่อน ดอกช่อขนาดเล็กไม่มีก้าน ต้นและใบมีสีเขียวเข้ม
- ดอก : ออกเป็นช่อตรงส่วนยอดของต้น ช่อดอกประกอบด้วยดอกเล็กๆ จำนวนมาก ติดกันแน่นเป็นรูปทรงกระบอก ยาว 1 นิ้ว ดอกสีขาวออกเหลือง แต่ละช่อดอกมีกลีบรอง ดอกสีขาวอยู่ 4 กลีบ ปลายกลีบมน
- ผล : มีลักษณะเมล็ดกลมรี ตรงปลายผลแยกออกเป็น 3 แฉก จะออกรวมตัวกันแน่นยาวเป็นรูปทรงกระบอก
- การขยายพันธุ์ : ใช้วิธีการแยกต้นและปักชำ

สรรพคุณในตำรายาไทย

- ต้น : ใช้รักษาโรคติดเชื้อและทางเดินหายใจ ฝีหนองในปอด ปอดบวม ปอดอักเสบ ใช้มาลาเรีย แก้บิด ขับปัสสาวะ ลดอาการบวม น้ำ นิ้ว ขับระดูขาว ริดสีดวงทวาร แก้โรคผิวหนัง ผื่นคัน ฝีฝีบวม แผลเปื่อย ติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ แก้ไอ หลอดลมอักเสบ
- ราก : ขับปัสสาวะ

ใบ : แก้วบีด หัด โรคผิวหนัง รีดสีดวงทวาร หนองใน

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

1. ฤทธิ์ยับยั้งไวรัส

สารประกอบ n-decyl-aldehyde, n-dodecyl aldehyde และ methyl-n-nonyl ketone ที่พบในน้ำมันหอมระเหยจากพลูคาวสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อไวรัสที่มีเปลือกหุ้ม 3 ชนิด ได้แก่ HSV-1, influenza virus และ HIV-1 และไวรัสที่ปราศจากเปลือกหุ้ม 2 ชนิด คือ poliovirus และ coxsackie virus และพบว่าสารที่สกัดได้จากการกลั่นด้วยไอน้ำมีผลโดยตรงต่อการยับยั้ง HSV-1, influenza virus และ HIV-1 โดยไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ (Hayashi *et al.*, 1995; Chiang *et al.*, 2003)

Lau *et al.* (2008) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดพลูคาวต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) พบว่าสารสกัดเมทานอลของพลูคาวออกฤทธิ์ขัดขวางกลไกการทำงานของเอนไซม์ SARS-CoV 3C-like protease (3CL^{pro}) และ RNA-dependent RNA polymerase

นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงคุณสมบัติของสารสกัดพลูคาวต่อฤทธิ์ยับยั้งไวรัส จากสารสำคัญในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ได้แก่ สาร rutin, hyperoside, afzelin, quercetin, quercitrin, houttuynoside A และ houttuynamide A (Chou *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2006)

รายงานของ Choi *et al.* (2009a) ได้ศึกษาฤทธิ์ของสาร quercetin 7-rhamnoside (Q7R) จากการแยกบริสุทธิ์ด้วยวิธี high-performance liquid chromatography (HPLC) ต่อฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) พบว่า สาร Q7R ที่พบในสารสกัดเมทานอลจากพลูคาวสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส PEDV ในเซลล์เพาะเลี้ยง vero cell ได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อเปรียบเทียบกับยาด้านไวรัส ribavirin, interferon alpha (INF α) และสารในธรรมชาติ ได้แก่ coumarin และ tannin acid อีกทั้งยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเหนี่ยวนำให้เกิดพยาธิสภาพ ที่ค่า CC₅₀ ที่มากกว่า 100 มก/มล. และค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.014 ± 0.005 มก/มล. ในขณะที่ ribavirin, coumarin, tannin acid และ INF α มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 4.1, 4.7, 4.9 มก/มล. และ 0.52 unit ตามลำดับ ในปีเดียวกัน ยังมีรายงานฤทธิ์ยับยั้ง influenza A virus จากกลไกการออกฤทธิ์ของสาร quercetin 3-rhamnoside (Q3R) ที่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ influenza A ได้โดยตรงต่ออนุภาคไวรัส ก่อนติดเข้าสู่เซลล์ (Choi *et al.*, 2009b)

Lin *et al.* (2009) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากสมุนไพรจำนวน 22 ชนิดในการยับยั้งการติดเชื้อ enterovirus 71 (EV71) พบว่าสารสกัดจากพลูคาวสามารถยับยั้งการเกิดพยาธิสภาพต่อเซลล์เพาะเลี้ยง vero cell มีค่าการยับยั้ง IC_{50} เท่ากับ 125.92 ± 27.84 มก/มล. และส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์ (apoptosis) หลังการติดเชื้อได้อีกด้วย

2.ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

Chen *et al.* (2008) ได้ทำการศึกษาแยกส่วนน้ำมันหอมระเหยจากพลูคาวที่ปลูกในประเทศจีน พบว่ามีส่วนประกอบทั้งสิ้น 21 ชนิด และสารที่เป็นสารออกฤทธิ์สำคัญทางชีวภาพ ได้แก่ α -pinene, camphene, β -phellandrene, β -pinene, myrcene, limonene, 4-terpineol, α -terpineol, bornyl acetate, 2-undecanone, 2-dodecanone, caryophyllene, decanoyl acetaldehyde, 2-tridecanone, 2-ethyl-1-decene และ isoelemicin

Yadav and Temjenmongla. (2011) รายงานว่า สารสกัดเมทานอลจากพลูคาวมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *E.coli* จากกลไกการยับยั้งในกระบวนการสร้างผนังเซลล์ โดยขัดขวางการสังเคราะห์ folic acid

3.ฤทธิ์ต้านการอักเสบ

Lu *et al.* (2006) ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดน้ำจากพลูคาวต่อฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยการกระตุ้นให้หนูเมาส์และหนูแรท เกิดการอักเสบจากสารก่อการอักเสบ carrageenan พบว่าสารสกัดน้ำจากพลูคาว 80 ไมโครลิตร/20 กรัม น้ำหนักตัว มีฤทธิ์ลดอาการบวมและยับยั้งอาการอักเสบในเยื่อหุ้มปอดของหนูได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ได้รับยามาตรฐาน และ dexamethasone ซึ่งให้ผลที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ มีค่าการยับยั้ง IC_{50} เท่ากับ 0.26 ± 0.07 , 0.16 ± 0.09 และ 0.10 ± 0.05 มก/มล. ตามลำดับ

Li *et al.* (2011) รายงานว่า สารในกลุ่มน้ำมันหอมระเหยสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cyclooxygenase-2 ซึ่งทำหน้าที่ในการสร้าง prostaglandin E_2 ซึ่งเป็นสารกระตุ้นการอักเสบ

4.ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอื่นๆ

Wang *et al.* (2002) ศึกษาฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันจากสารสกัดพลูคาวในหนูถีบจักร พบว่าสารประกอบระหว่าง sodium bisulfate และ houttuyinin (polymer ของ essential oil) มีส่วนในการช่วยเพิ่มการสร้างแอนติบอดีและส่งเสริมการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครฟาจโดยการเพิ่มปริมาณของ lysosomal enzyme และส่งเสริมการเพิ่มจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ อีกทั้งยังพบว่าสามารถยับยั้งการแสดงออกของไซโตไคน์ชนิด IL-4 และ IL-5 ในการ

ตอบสนองต่อ phorbol 12-myristate และ calcium ionophore ใน Jurkat T cell และ human mast cell line (Lee *et al.*, 2008)

นอกจากนี้ Kim *et al.* (2001) พบว่า สารสกัดจากเมทานอลของพลูความีฤทธิ์ด้านการก่อการกลายพันธุ์ สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งปอด (A-549) มะเร็งรังไข่ (SK-OV-3) มะเร็งลำไส้ (HCT-15) เนื้องอก (MEL-2) และมะเร็งที่ระบบประสาทส่วนกลาง (XF-498) ในขณะที่ Chang *et al.* (2001) และ Qu *et al.* (2011) รายงานว่าสารสกัดดังกล่าวมีฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (leukemic cell lines) และด้านการจับตัวของเกล็ดเลือด ตามลำดับ

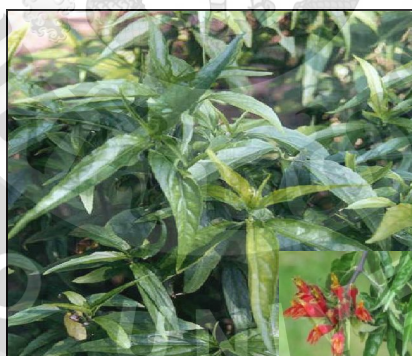
2. พญาขอ (ภาพ 2)

พญาขอ เป็นไม้พุ่มกึ่งเลื้อย นิยมปลูกเป็นไม้ประดับ พบได้ทั่วไปตามป่าในประเทศไทย

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Clinacanthus nutans* (Burm.f.) Lindau

Family Acanthaceae

ชื่ออื่นๆ ผักมันไก่ ผักลิ้นเจียด พญาปล้องคำ พญาปล้องดำ โปะโซ่จาง
เสลดพังพอนตัวเมีย



ภาพ 2 พญาขอ (*Clinacanthus nutans* (Burm.f.) Lindau)

ที่มา : [http:// xn-n3cga6af7 bxa8aed4a.blogspot.com](http://xn-n3cga6af7 bxa8aed4a.blogspot.com) (2012)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ลำต้น : กลมผิวเรียบ เป็นปล้อง กิ่งก้านสีเขียว สูง 1-3 เมตร

ใบ : ใบเดี่ยวรูปรีแคบ ออกบริเวณตรงข้ามกันขนาดกว้าง 0.5-1.5 เซนติเมตร ยาวประมาณ 2.5 - 13 เซนติเมตร ปลายและโคนแหลม ริมใบเรียบ

ดอก : เป็นช่อออกเป็นกระจุก ที่ปลายกิ่ง มี 5 ดอกย่อยขึ้นไป กลีบดอกสีแดงส้ม
โคนกลีบสีเขียวติดกันเป็นหลอดปลายแยกเป็น 2 ส่วน

ผล : ผลแห้งแตกได้ เจริญเติบโตได้ในดินที่สมบูรณ์ แสงแดดปานกลาง

การขยายพันธุ์ : นิยมใช้วิธีการปักชำ

สรรพคุณในตำรายาไทย

ทั้งต้น : คั้นเอาน้ำดื่ม แก้พิษงู แก้บิด ถอนพิษไข้ รักษาโรคริมฝีปาก

ใบ : ใช้รักษาอาการอักเสบเฉพาะที่ ถอนพิษแมลงกัดต่อย แก้เมื่ดผดผื่นคัน

ราก : ทาแก้พิษ ตะขบ แมงป่อง

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

1. ฤทธิ์ยับยั้งไวรัส

Jayavasit *et al.* (1992) รายงานว่าสารสกัดเอทานอลจากใบของพญาขอมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อไวรัส HSV-2 ได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อเปรียบเทียบกับยาต้านไวรัส acyclovir เมื่อทดสอบในเซลล์ baby hamster kidney (BHK cell line) โดยวัดการเกิด plaque ซึ่งผลการทดลองในห้องปฏิบัติการสอดคล้องกับรายงานทางคลินิก ที่พบว่าสารสกัดจากใบพญาขอมีประสิทธิภาพในการรักษาผู้ป่วยโรคริมฝีปากที่อักเสบ โดยผู้ป่วยที่ได้รับยาครีมพญาขอทาทุกวัน วันละ 4 ครั้ง ติดต่อกัน 6 วัน จะมีระยะเวลาการหายของแผลภายใน 7 วัน ซึ่งไม่ต่างจากระยะเวลาการหายของแผลในผู้ป่วยที่ได้รับยา acyclovir

Janwitayanuchit (2003) และ Santi *et al.* (2008) ศึกษาสารอนุพันธ์ของสารคลอโรฟิลล์ (chlorophyll a) และ คลอโรฟิลล์บี (chlorophyll b) ต่อฤทธิ์ต้านไวรัส HSV-1 ในเซลล์เพาะเลี้ยง vero cell พบว่าสาร 13²-hydroxy-(13²-R)-phaeophytin a, 13²-hydroxy (13²-S)-phaeophytin a และ 13²-hydroxy-(13²-R)-phaeophytin b จากสารสกัดน้ำของใบพญาขอมีความสามารถในการทำลายไวรัส HSV-1 โดยทำลายโครงสร้างไกลโคโปรตีนและเปลือกหุ้มไวรัสและแทรกแซงที่กระบวนการ adsorption หรือ penetration โดยจับกับ anti-receptor ของไวรัสทำให้ไวรัสไม่สามารถจับกับตัวรับบริเวณผิวเซลล์ของเซลล์เจ้าบ้านได้ นอกจากนี้ Yoosook *et al.* (1999) รายงานว่ามีสารในกลุ่ม glycolipids จากใบพญาขอ ได้แก่ 1,2-O-dilinolenoyl-3-O-b-d-glucopyranosyl-sn-glycerol ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสาร monoglycosyl diglycerides มีฤทธิ์ยับยั้ง HSV-2 ในเซลล์เพาะเลี้ยง BHK cell line โดยยับยั้งกระบวนการสร้างสารพันธุกรรมและโปรตีนของไวรัส

Jayavasut et al. (1992) และ Thawaranantha et al. (1992) ศึกษาพบว่าสารสกัดพญาขอมมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัส Varicella Zoster ในขั้นตอน adsorption กับเซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งการศึกษาดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานทางคลินิกในผู้ป่วยโรคสุกใสว่าผู้ป่วยที่ได้รับยาครีมพญาขอมทาทุกวัน วันละ 5 ครั้ง ติดต่อกัน 7-14 วัน จะมีแผลหายภายใน 7-10 วัน ซึ่งเร็วกว่ากลุ่มที่รักษาด้วยยาหลอก และระดับความเจ็บปวดของโรคจะหายเร็วกว่ากลุ่มที่ได้รับยาหลอก

2. ฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบ

Pongphasuk et al. (2005) ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเมทานอลจากใบพญาขอม พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ myeloperoxidase และ Wanikiat et al. (2008) ศึกษาเพิ่มเติมพบว่าสารสกัดเมทานอลจากใบพญาขอม มีประสิทธิภาพในการลดการตอบสนองของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล (neutrophil) ส่งผลให้การเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดขาวดังกล่าวลดลงและช่วยลดอาการบวมจากอาการอักเสบในสัตว์ทดลองได้ภายในระยะเวลา 6 ชั่วโมงหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ

3. ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอื่นๆ

Kittisiripornkul et al. (1987) และ Satayavivad et al. (1996) รายงานว่าสารสกัดเอานิวทานอล (n-butanol) จากใบพญาขอม มีฤทธิ์ระงับปวดในหนูถีบจักรที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วยกรดอะซิติก ในขณะที่สารสกัด 50% เอทานอล ไม่มีฤทธิ์ดังกล่าว

Pannangpetch et al. (2007) รายงานว่าสารสกัดพญาขอมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant) ช่วยยับยั้งการสร้าง peroxide ในเม็ดเลือดขาวที่ถูกกระตุ้นด้วย phorbol myristate 13-acetate และช่วยป้องกันการแตกของเม็ดเลือดแดงจากอนุมูลอิสระ

3. ทองพันชั่ง (ภาพ 3)

ทองพันชั่งเป็นพืชล้มลุก ส่วนใหญ่นิยมปลูกเป็นไม้ประดับตามบ้านเรือนและสวนหย่อมทั่วไป เป็นพืชที่ชอบดินที่ชุ่มชื้น สามารถพบได้ทั่วไปในประเทศเขตร้อน เช่น อินเดีย มาเลเซีย และไทย

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Rhinacanthus nasutus* (Linn.) Kurz

Family Acanthaceae

ชื่ออื่นๆ ทองคันชั่ง หญ้ามันไก่ ทองพันคูลย์



ภาพ 3 ทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus* (Linn.) Kurz)

ที่มา : <http://www.oknation.net/blog/nonglek> (2009)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

- ลำต้น : ลักษณะเป็นพุ่มสูงประมาณ 5 ฟุต กิ่งอ่อนเป็นเหลี่ยม กิ่งแก่ค่อนข้างกลม เป็นไม้เนื้อแข็ง เปลือกเกลี้ยงสีซีดๆ
- ใบ : เดี่ยว ขึ้นตรงข้ามกัน มีลักษณะเป็นวงรี โคนและปลายใบแหลมเรียว ขอบใบเรียบเป็นคลื่นเล็กน้อย เนื้อใบบางและเกลี้ยง
- ดอก : ออกดอกเป็นช่อสั้นๆ สีขาวตามบริเวณซอกใบ กลีบดอกแคบและยาว มี 5 กลีบ แบ่งเป็นกลีบบนและกลีบล่าง ขอบข้างๆ ม้วนกลับมาข้างหลัง ปลายกลีบแยกเป็น 2 แฉก กลีบล่างกว้างมี 3 แฉก
- ผล : เป็นฝักรูปกลมยาว ผลมีขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร
- การขยายพันธุ์ : ขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเมล็ดหรือกิ่งปักชำ

สรรพคุณในตำรายาไทย

- ราก : แก้กลากเกลื้อน รักษาโรคมะเร็ง รักษาโรคผิวหนัง ดับพิษไข้ แก้พิษงูเห่านตามผิวหนัง
- ทั้งต้น : รักษาโรคผิวหนัง แก้เนื้อเหลืองเสีย แก้กลากเกลื้อน ผื่นคัน รักษา มะเร็ง กุดทะราด ขับพยาธิ แก้ไส้เลื่อน
- ต้น : บำรุงร่างกาย รักษาโรคผมร่วน
- ใบ : รักษาโรคผิวหนัง รักษาโรคมะเร็ง รักษาโรคความดันสูง แก้พิษงู

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

1. ฤทธิ์ยับยั้งไวรัส

Sendl *et al.* (1996) รายงานว่าทองพันชั่งมีสารในกลุ่มไรนาแคนทิน (rhinacanthin) ได้แก่ rhinacanthin-C, rhinacanthin-D และ rhinacanthin-N และสารอื่นๆ เช่น oxymethylantraquinone, quinone และ rutin (quercetin-3-rutinoside) เป็นองค์ประกอบ ซึ่งสารเหล่านี้มีฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส HSV-1 และ cytomegalovirus แต่กลไกการออกฤทธิ์ของสารเหล่านี้ยังไม่ทราบแน่ชัด

Kernan *et al.* (1997) และ Akanitapichat *et al.* (2002) ศึกษาต่อมาในภายหลังพบว่าทองพันชั่งยังมีสาร rhinacanthin E และ F ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัส influenza A virus ได้

2. ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์

Cheeptham and Towers. (2002) ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดทองพันชั่งต่อการต้านเชื้อแบคทีเรีย พบว่าสารสกัดเอทานอลจากใบทองพันชั่งมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* K147 methicillin-sensitive, *E. coli* (wild) และ *Pseudomonas aeruginosa* 187 (wild)

Sattar *et al.* (2004) และ Puttarak *et al.* (2010) ศึกษาเพิ่มเติม พบว่า rhinacanthin-C ที่ได้จากทองพันชั่งมีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Streptococcus mutans*, *Propionibacterium acne*, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* และเชื้อรา *Candida albicans*

นอกจากนี้ Sattar *et al.* (2004) ยังรายงานว่าสาร rhinacanthin-C, D และ N ที่สกัดได้จากสารสกัดน้ำ แอลกอฮอล์ และคลอโรฟอร์มจากใบและกิ่งของทองพันชั่ง มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum gypseum* และ *Trichophyton rubrum* ที่ทำให้เกิดโรคผิวหนังได้ และสารสกัดเมทานอล ไดคลอโรมีเทน และเฮกเซน ยังมีผลต่อการต้านเชื้อรา *Trichophyton mentagrophytes* ที่ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งได้ (minimum inhibitory concentration) เท่ากับ 512, 64 และ 64 มก/มล. ตามลำดับ

3. ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอื่นๆ

ทองพันชั่งมีรายงานว่ามียุทธศาสตร์ด้านการอักเสบ โรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง ต้านมะเร็ง และใช้รักษาโรคความผิดปกติทางจิตได้ (Punturee *et al.*, 2004; Punturee *et al.* 2005; Siripong *et al.*, 2006; Tewtrakul *et al.*, 2009)

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

อุปกรณ์

1. ไวรัสพรีอาร์อาร์เอส สายพันธุ์ 01NP1 ได้รับความอนุเคราะห์จากคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. เซลล์เพาะเลี้ยง MARC-145 ได้รับความอนุเคราะห์จากคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
3. สมุนไพรที่ใช้ในการทดสอบ
 - 3.1 พลูควา จาก อ.สันทราย จ.เชียงใหม่
 - 3.2 พญาขอ จาก อ.เมือง จ.เชียงใหม่
 - 3.3 ทองพันชั่ง จาก อ.เมือง จ.เชียงใหม่
4. อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์
 - 4.1 MEM (Gibco)
5. สารเคมี
 - 5.1 สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์
 - 5.1.1 Fetal Bovine Serum (FBS) (PAA, Germany)
 - 5.1.2 Antibiotic-Antimycotic, 100X (PAA, Germany)
 - 5.1.3 0.1% Trypsin-EDTA (PAA, Germany)
 - 5.1.4 Phosphate Buffered Saline (PBS)
 - 5.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบสารสกัดสมุนไพร
 - 5.2.1 Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma)
 - 5.2.2 Hexane AR grade (Lab scan)
 - 5.2.3 Ethyl acetate, AR grade (Lab scan)
 - 5.2.4 Methanol AR grade (Lab scan)
 - 5.2.5 Acetic acid, AR grade (Lab scan)
 - 5.2.6 Dichloromethane (Lab scan)
 - 5.2.7 Rutin hydrate 95% HPLC (Sigma Aldrich)
 - 5.2.8 Quercetin hydrate 98% HPLC (Sigma Aldrich)
 - 5.2.9 Acetone/ Methanol (60/40)

5.2.10 Sorenson Buffer pH 4.2

5.2.11 Ethanol 50%, 70, 95%

5.2.12 ผงวุ้นอะกาโรส

5.2.13 Sterile water

5.3 สีย้อมเซลล์

5.3.1 0.25% Coomassie Brilliant Blue G-250 (Panreac)

5.3.2 0.5% Crystal violet ใน 20% ethanol (Gibco)

6. เครื่องมือ

- 6.1 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) (Tomy Japan)
- 6.2 เครื่องนับจำนวนเซลล์ (Hemacytometer) (Clay-Adams U.S.A)
- 6.3 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Binder GmbH)
- 6.4 เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลต (Microplate reader) (Bio-RAD Model 680XR)
- 6.5 ตู้เก็บเซลล์ (CO₂ incubator) (Forma Scientific Infrared)
- 6.6 ตู้เย็น (Sanyo)
- 6.7 ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส (Sanyo)
- 6.8 ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส (Sanyo)
- 6.9 เครื่องชั่งอย่างละเอียด (Sartorius)
- 6.10 เครื่องดูดสารอัตโนมัติ (Autopipette) (High tech lab solution)
- 6.11 เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (Rotary evaporator) (BCCHI, Switzerland)
- 6.12 กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (Invert Microscope) (Olympus CK2)
- 6.13 กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ (Compound Microscope) (Olympus)
- 6.14 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) (Hettich Lab Technology)
- 6.15 ตู้เป่าเชื้อ (Laminar flow cabinet) (Microtech)
- 6.16 เครื่องชั่งอย่างละเอียด (Metler Toledo รุ่น PG 802-S)
- 6.17 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) (Julabo Labortechnik GMBH)
- 6.18 เครื่องฟั่นฝอย (Freeze dry)
- 6.19 เครื่องปั๊มสุญญากาศ (Vacuum pump)
- 6.20 เครื่องไมโครเวฟ (microwave)

7. วัสดุและอุปกรณ์อื่นๆ

7.1 Sterile syringe	ขนาด 10 มล.
7.2 จานเพาะเลี้ยงเซลล์	ขนาด 24 และ 96 หลุม
7.3 ขวดเลี้ยงเซลล์ (T25 flask)	ขนาด 25 cm ²
7.4 Nylon syringe filter	ขนาด 0.22 และ 0.45 µm
7.5 ปีกเกอร์	ขนาด 250 มล.
7.6 ปิเปต	ขนาด 1 และ 5 มล.
7.7 ขวด Duran	ขนาด 100, 250, 500 และ 1,000 มล.
7.8 ขวด Universal	ขนาด 30 มล.
7.9 ขวด Medical flat	ขนาด 100 มล.
7.10 กระบอกตวง	ขนาด 100 และ 500 มล.
7.11 ขวดรูปชมพู่	ขนาด 100, 125 และ 500 มล.
7.12 Pipette tip	ขนาด 20 และ 200 มล. และ 1 และ 5 มล.
7.13 ขวด Vial	
7.14 แผ่น TLC Silica gel ₆₀ F ₂₄₅	
7.15 Capillary tube	
7.16 TLC tank	
7.17 Microcentrifuge tubes	
7.18 กระดาษกรอง (Whatman No.1)	

วิธีการวิจัย

1. การเตรียมสารออกฤทธิ์จากพืชสมุนไพร

- 1.1 นำส่วนต่างๆของพลูควา พญาขอ และทองพันชั่ง ล้างทำความสะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ตากแดด แล้วอบแห้งที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน นำมาบดละเอียด
- 1.2 แบ่งการสกัดออกเป็น 2 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 สกัดด้วยน้ำกลั่น (water extract) โดยต้มสมุนไพรในน้ำเดือด 1 ชั่วโมง กรองสารละลายด้วยผ้าขาวบาง และกระดาษกรอง (whatman No. 1) จากนั้นนำไประเหยแห้งภายใต้ระบบสุญญากาศ (rotary evaporator) ก่อนทำแห้งด้วยวิธีการพ่นฝอย (spray dryer)

กลุ่มที่ 2 สกัดแบบชง (percolation) ด้วยตัวทำละลาย 50%, 70% และ 95% เอทานอล โดยแช่สมุนไพรที่บดละเอียดในตัวทำละลายชนิดต่างๆ นาน 1 ชั่วโมง เพื่อให้สมุนไพรพองตัวเต็มที่ ก่อนหมักทิ้งไว้ในถังหมัก (percolator) 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดระยะเวลา จึงไขเอาสารสกัดออกจากถังหมักโดยค่อยเติมตัวทำละลายเหนือสมุนไพรพยายามอย่าให้สารละลายแห้ง จนการสกัดสมบูรณ์ บีบกากเอาสารสกัดออกให้มากที่สุด นำสารสกัดที่เก็บได้ทั้งหมดกรองผ่านกระดาษกรอง และนำไประเหยแห้งภายใต้ระบบสุญญากาศ เพื่อระเหยเอาตัวทำละลายออกจนหมด

1.3 ทำการละลายกลับสารสกัดหยาบ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (MEM^{++} ; $MEM^{++}+10\%$ FBS+1% antibiotic/antimycotic+1% DMSO)

1.4 ปรับความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดพืชสมุนไพรทั้ง 2 กลุ่ม ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 100 มก./มล. กรองสารละลายสารสกัดพืชสมุนไพรผ่านตัวกรอง $0.22\ \mu m$ เก็บเป็น stock solution ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์ MARC-145

2.1 นำเซลล์ MARC -145 ที่เจริญเต็มผิวภาชนะเพาะเลี้ยง T25 flask (5×10^5 เซลล์/มล.) มา subculture โดยเทอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM^{++} ออกจาก flask เดิม

2.2 ล้างด้วย PBS (1X) ปริมาตร 5 มล. แล้วเท PBS ทิ้ง จากนั้นเติม 0.1 % Trypsin-EDTA 100 มล. ทิ้งไว้ให้เซลล์ถูกเอนไซม์ย่อยออกจากผิว flask ค่อยๆ เคาะให้เซลล์หลุดออก

2.3 เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM^{++} ปริมาตร 10 มล. ลงในภาชนะ และแบ่งเซลล์ใส่ flask ใหม่ โดยใช้ split ratio เท่ากับ 1:1 (5 มล. : 5 มล.)

2.4 เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM^{++} จนครบปริมาตร 10 มล. และเอียง flask ไปมาเพื่อให้เซลล์กระจายทั่ว flask แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มที่มีความชื้นและ 5% CO_2 นาน 2-3 วัน สังเกตการเจริญเติบโต จากการส่องกล้องจุลทรรศน์หัวกลับ เมื่อเซลล์เจริญเป็นชั้น monolayer นำไป subculture ใหม่ ตามวิธีข้างต้น

3. การเพิ่มจำนวนไวรัส

3.1 ปิเปิดอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM^{++} ออกจากนำภาชนะเพาะเลี้ยง T25 flask ที่มีเซลล์เจริญอยู่เป็นชั้น monolayer ปริมาตร 9 มล.

3.2 เติมไวรัสจาก stock 100 มก. ปล่อยให้เกาะติดกับเซลล์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มที่มีความชื้นและ 5% CO₂ นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด เทไวรัสส่วนเกินทิ้ง

3.3 เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM⁺⁺ ปริมาตร 2-3 มล. แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มที่มีความชื้นและ 5% CO₂ นาน 2-3 วัน

3.4 สังเกตการเกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ

3.5 เก็บภาชนะเพาะเลี้ยง T25 flask ที่มีเชื้อไวรัส ไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส และละลายที่อุณหภูมิห้อง ทำเช่นนี้สลับกัน 2 ครั้ง (freeze-thaw) เพื่อให้เซลล์แตก และเก็บเชื้อไวรัสในอาหารเลี้ยงเซลล์โดยเก็บเป็น stock ไวรัส

4. การทดสอบความเป็นพิษ ของสารสกัดพืชสมุนไพรต่อเซลล์เพาะเลี้ยง MARC-145 (cytotoxicity assay)

4.1 เจือจางสารละลายสารสกัดพืชสมุนไพรให้ได้ความเข้มข้น 100 มก/มล. นำมาเจือจางต่อแบบ 2 เท่า (2-fold dilution) ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ ได้สารสกัดที่มีความเข้มข้น 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39, 0.19, 0.097, 0.048, 0.024 และ 0.012 มก/มล.

4.2 บ่มเพาะเซลล์ MARC-145 (5x10⁵ เซลล์/มล.) ร่วมกับสารละลายสารสกัดพืชสมุนไพรในจานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มที่มีความชื้นและ 5% CO₂ นาน 72 ชั่วโมง

4.3 วิเคราะห์อัตราการตายของเซลล์ MARC-145 โดยการย้อมสี 0.5% crystal violet และ Sorenson's citrate buffer และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรด้วยเครื่อง microplate reader (Fernandes *et al.*, 2005) จากนั้นคำนวณความมีชีวิตรอดของเซลล์ และเลือกความเข้มข้นของสารสกัดพืชสมุนไพรมากที่สุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์

สูตรคำนวณความมีชีวิตรอดของเซลล์

$$\% \text{ Cell viability} = (\text{sample OD} / \text{control OD}) \times 100$$

5. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดพืชสมุนไพรต่อการยับยั้งก่อนติดเชื้อเซลล์ของไวรัสพาร์อาร์เอส (pre-infection)

5.1 ปิเปตเซลล์ MARC-145 (5x10⁵ เซลล์/มล.) ปริมาตร 10 มล. ลงในภาชนะเพาะเลี้ยง T25 flask บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในตู้บ่มที่มีความชื้นและ 5% CO₂ นาน 24 ชั่วโมง

5.2 ผสมสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 5 มล. ร่วมกับไวรัสพาร์อาร์เอส ปริมาตร 1 มล. ในหลอดทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในตู้บ่มที่มีความชื้นและ 5% CO₂ นาน 1 ชั่วโมง

5.3 เทอาหารในภาชนะเพาะเลี้ยงออก (ข้อ 5.1) เดิมสารสกัดที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ที่เตรียมไว้ (ข้อ 5.2) ลงในภาชนะเพาะเลี้ยง ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM⁺⁺ บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในตู้บ่มที่มีความชื้นและ 5% CO₂ นาน 4 วัน สังเกตการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเซลล์เพาะเลี้ยงภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ

5.4 เก็บ flask ที่เพาะเลี้ยงไวรัสโดยใช้พาราฟินหุ้มภาชนะให้มิดชิด แล้วนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำออกมา freeze-thaw ก่อนจะเก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ทดสอบในครั้งต่อไป

6. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสพาร์อาร์เอสหลังติดเชื้อเซลล์ (post-infection)

6.1 ปิเปตเซลล์ MARC-145 (5×10^5 เซลล์/มล.) ปริมาตร 10 มล. ลงในภาชนะเพาะเลี้ยง T25 flask บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในตู้บ่มที่มีความชื้นและ 5% CO₂ นาน 24 ชั่วโมง

6.2 เทอาหารออกจากภาชนะเพาะเลี้ยง และเติมไวรัสพาร์อาร์เอส ปริมาตร 1 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในตู้บ่มที่มีความชื้นและ 5% CO₂ นาน 1 ชั่วโมง

6.3 เดิมสารละลายสารสกัดที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่เป็นพิษกับเซลล์ ปริมาตร 5 มล. พร้อมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM⁺⁺ อีก 4 มล. ลงในภาชนะเพาะเลี้ยง T25 flask บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มที่มีความชื้นและ 5% CO₂ นาน 4 วัน สังเกตการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเซลล์เพาะเลี้ยง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ

6.4 เก็บ flask ที่เพาะเลี้ยงไวรัสโดยใช้พาราฟินหุ้มภาชนะให้มิดชิด แล้วนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำออกมา freeze-thaw ก่อนจะเก็บแช่แข็ง ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ทดสอบในครั้งต่อไป

7. การทดสอบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเซลล์ด้วยวิธี Cytopathic effect (CPE) assay

7.1 ไวรัสที่แช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (ข้อ 5.4 และ 6.4) นำออกมา freeze-thaw จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที

7.2 คุนส่วนใส แบ่งใส่หลอด microcentrifuge tube ที่ปราศจากเชื้อ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็น stock ไวรัส

7.3 นำส่วนใส (ไวรัส) จากข้อ 7.2 มาเจือจางตามลำดับแบบ 10 เท่า (10-fold dilution) กับอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM⁺⁺

7.4 ปิเปตไวรัส ปริมาตร 100 มคล. ลงในถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม ที่มีเซลล์ MARC-145 (5×10^5 เซลล์/มล.) ปริมาตร 100 มคล. เตรียมไว้อยู่ก่อน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มที่มีความชื้นและ 5% CO₂ นาน 4 วัน

7.5 สังเกตการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเซลล์เพาะเลี้ยงภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ เพื่อวิเคราะห์หาไตเตอร์ของไวรัส

7.6 กำหนดหาความเข้มข้นของไวรัสโดยวิธีของ Reed and Muench ซึ่งมีหน่วยเป็น TCID₅₀/มล. (tissue culture infective dose)₅₀/มล.

8. การตรวจหาไตเตอร์ของไวรัสวิธี Plaque formation assay

8.1 ปิเปตเซลล์ MARC-145 ปริมาตรหลุมละ 500 มคล. (5×10^5 เซลล์/มล.) ลงในจานเพาะเลี้ยงชนิด 24 หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในตู้บ่มที่มีความชื้นและ 5% CO₂ นาน 24 ชั่วโมง

8.2 ดูอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากจานเพาะเลี้ยงเซลล์

8.3 นำไวรัสจาก stock (ข้อ 7.2) ทำการเจือจางแบบ 10 เท่า (10^{-1} - 10^{-8} dilution) ปิเปตเชื้อไวรัส แต่ละความเจือจางลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุม ปริมาตรหลุมละ 450 มคล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในตู้บ่มที่มีความชื้นและ 5% CO₂ นาน 1 ชั่วโมง

8.4 ปิเปตไวรัสที่บ่มไว้ (ข้อ 8.3) ออกจากจานเพาะเลี้ยง จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ ปริมาตรหลุมละ 500 มคล. และ 0.6% agarose gel (37 องศาเซลเซียส) ปริมาตรหลุมละ 500 มคล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มที่มีความชื้นและ 5% CO₂ นาน 4 วัน

8.5 ดูอาหารและ agarose gel ในแต่ละหลุมทิ้ง แล้วล้างด้วย PBS ปริมาตร 2 มล. จำนวน 2 ครั้ง fix เซลล์ด้วย 60/40 acetone/methanol ปริมาตรหลุมละ 500 มคล. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลานำออกมาและปิเปตเอาสารละลายทิ้ง จากนั้นคว่ำจานเพาะเลี้ยงทิ้งไว้จนแห้งสนิท

8.6 ย้อมสีไวรัสด้วย 0.25% Coomassie Brilliant Blue R250 ที่ละลายอยู่ใน acetic acid และ 50% methanol (1:9; v:v) ปริมาตร หลุมละ 200 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที แล้วดูคดีย้อมทิ้ง (Kim *et al.*, 2008)

8.7 ล้างสารละลายออกด้วย PBS ปริมาตร หลุมละ 200 มคล. จำนวน 2 ครั้ง

8.8 ตรวจสอบการย้อมของเซลล์ติดเชื้อและนับปริมาณ plaque ของไวรัสที่เกิดขึ้น (เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสจะไม่ติดสีย้อม) จากนั้นคำนวณหาไตเตอร์ของไวรัส
สูตรคำนวณหาไตเตอร์ของไวรัส

$$(\text{plaques}) / (d \times v) = \text{PFU} / \text{มล.}$$

plaques = ค่าเฉลี่ยของจุดที่พบเห็นด้วยตาเปล่า

d = dilution factor

v = ปริมาตรของไวรัสที่เจือจางแล้วที่ใส่ลงในหลุม

9. การเตรียมสารสกัดสมุนไพรสำหรับการวิเคราะห์หาสารพฤกษเคมีเบื้องต้นด้วยวิธี thin layer chromatography (TLC)

9.1 การสกัดแบบเป็นขั้นตอน (ภาคผนวก จ) โดยเรียงลำดับความมีขั้วจากตัวทำละลายไม่มีขั้ว (non-polar solvent) จนถึงตัวทำละลายมีขั้ว (polar solvent) คือ hexane – dichloromethane – ethyl acetate – n-butanol และน้ำ ตามลำดับ (Elizabeth *et al.*, 1996)

9.2 นำส่วนที่สกัดแยกได้ (partition) ออกมาระเหยแห้งภายใต้ระบบสุญญากาศ เพื่อระเหยเอาตัวทำละลายออก

9.3 นำสารสกัดที่ได้จากการแยกมาละลาย โดยใช้อัตราส่วน 1 มก/มล.

9.3.1 ละลายส่วน hexane ด้วย dichloromethane

9.3.2 ละลายส่วน dichloromethane ethyl acetate n-butanol ด้วย methanol

9.3.3 ละลายส่วนน้ำด้วยน้ำ

9.4 นำแผ่น TLC มาตัดให้มีขนาด 10x10 เซนติเมตร

9.5 เตรียมสารละลายเคลื่อนที่ (developing solvent)

9.5.1 dichloromethane: ethyl acetate: formic acid ในอัตราส่วน 10:6:1

สำหรับวิเคราะห์หาสาร quercetin

9.5.2 ethyl acetate: formic: acetic: H₂O ในอัตราส่วน 100:11:11:26

สำหรับวิเคราะห์หาสาร rutin

9.6 การเตรียม tank สำหรับ TLC นำสารละลายที่ใช้เป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่ ใส่ลงใน tank ขนาด 20x20 นิ้ว ให้สูงประมาณ 1 เซนติเมตร วางกระดาษกรองไว้ที่ด้านข้าง ภายใน tank ปิดฝาทิ้งไว้ประมาณ 30 นาทีเพื่อให้ไอของตัวทำละลายเคลื่อนที่อิ่มตัวใน tank

9.7 หยดสารสกัดหยาบลงบนแผ่น TLC ให้ห่างจากกันประมาณ 1 เซนติเมตร เป็นแถวยาว ติดกัน รอให้สารละลายแห้งแล้วจุดสารซ้ำลงไปอีกครั้ง นำแผ่น TLC ที่เตรียมได้ใส่ลงไปใน tank เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่ถึง solvent front จึงนำออกจาก tank ทิ้งไว้ในตู้ดูดควันประมาณครึ่งชั่วโมง เพื่อให้สารตัวทำละลายเคลื่อนที่ระเหยไปจนหมด

9.8 ตรวจสอบโครมาโทกราฟี แสดงแถบต่างๆ และส่องภายใต้รังสี ultraviolet (UV) ที่ความยาวคลื่น 254 และ 356 นาโนเมตร

10. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่เก็บรวบรวมได้มาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของไคเตอร์ของไวรัส ที่ตรวจด้วยวิธี CPE assay และ plaque formation assay ระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ กับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัด โดยวิธี one-way analysis of variance และ Dunnett's t test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการวิจัย

1. ผลผลิตสุทธิ (%yield) ของสารสกัดสมุนไพรในตัวทำละลายต่างๆ

ผลผลิตสุทธิของสารสกัดน้ำและสารสกัด 50%, 70% และ 95% เอทานอล มีปริมาณผลผลิตสุทธิดังแสดงในตารางที่ 1

2. การตรวจสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์เพาะเลี้ยง

สารสกัดน้ำและสารสกัด 50%, 70% และ 95% เอทานอลของพลูควา ที่ความเข้มข้น 1.56, 1.56, 1.56 และ 0.78 มก/มล. ตามลำดับ เป็นความเข้มข้นที่สูงที่สุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ MARC-145 (ตาราง 2)

สารสกัดน้ำและสารสกัด 50%, 70% และ 95% เอทานอลของพญาขอ ที่ความเข้มข้น 25, 25, 12.5 และ 6.25 มก/มล. ตามลำดับ เป็นความเข้มข้นที่สูงที่สุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ MARC-145 (ตาราง 3)

สารสกัดน้ำและสารสกัด 50%, 70% และ 95% เอทานอลของทองพันชั่ง ที่ความเข้มข้น 0.09, 0.02, 0.02, และ 0.02 มก/มล. เป็นความเข้มข้นที่สูงที่สุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ MARC-145 (ตาราง 4)

ตาราง 1 ผลผลิตสุทธิของสารสกัดสมุนไพรในตัวทำละลายต่างๆ

สมุนไพร	ตัวทำละลาย	น้ำหนักสุทธิ	%yield
พลูคาว	น้ำ	7.07	0.70
	50% เอทานอล	152.23	15.22
	70% เอทานอล	114.65	11.46
	95% เอทานอล	47.62	4.76
พญายอ	น้ำ	87.51	8.75
	50% เอทานอล	219.55	21.95
	70% เอทานอล	193.98	19.39
	95% เอทานอล	58	5.80
ทองพันชั่ง	น้ำ	35.35	3.53
	50% เอทานอล	144.16	14.42
	70% เอทานอล	92.77	9.28
	95% เอทานอล	43.16	4.32

ตาราง 2 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดพลูควา

ความเข้มข้น ของสารสกัด (มก/มล.)	สารสกัดน้ำ (n=4)		50% เอทานอล (n=4)		70% เอทานอล (n=4)		95% เอทานอล (n=4)	
	Mean	sd	Mean	sd	Mean	sd	Mean	sd
100	0.469	0.085	1.269	0.891	1.282	0.056	1.389	1.094
50	0.629	0.475	1.327	0.289	1.549	0.029	0.489	0.242
25	0.866	0.276	1.103	0.195	1.182	0.144	0.773	0.722
12.5	2.166	0.125	1.275	0.091	1.863	1.206	0.823	0.905
6.25	2.364	0.179	1.843	0.586	1.714	1.039	2.197	0.765
3.125	2.594	0.365	1.897	0.385	2.217	0.126	2.637	0.664
1.56	2.737*	0.552	2.713*	0.553	2.587*	0.431	2.561	0.574
0.78	2.741	0.184	2.606	0.072	2.657	0.373	2.739*	0.430
MEM ⁺⁺	2.797	0.132	2.747	0.229	2.613	0.057	2.859	0.017
1%DMSO	2.698	0.156	2.637	0.133	2.438	0.264	2.729	0.250
0.5% crystal**	0.162	0.054	0.165	0.020	0.157	0.006	0.144	0.042
Blank	0.035	0.000	0.035	0.005	0.034	0.003	0.029	0.002

หมายเหตุ

*ไม่เป็นพิษต่อเซลล์สูงสุด

** crystal violet control คือหุ้มน้ปลาที่ย้อมด้วย 0.5% crystal violet

ตาราง 3 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดพญาขอ

ความเข้มข้น ของสารสกัด (มก/มล.)	สารสกัดน้ำ (n=4)		50% เอทานอล (n=4)		70% เอทานอล (n=4)		95% เอทานอล (n=4)	
	Mean	sd	Mean	sd	Mean	sd	Mean	sd
100	0.131	0.117	0.140	0.148	0.047	0.005	0.110	0.100
50	1.022	1.225	0.221	0.036	0.644	0.707	0.197	0.023
25	2.269*	0.745	2.003	1.129	2.654*	0.177	1.444	1.771
12.5	2.353	0.978	2.557*	0.477	3.045	0.221	2.359	0.890
6.25	2.649	0.704	3.206	0.225	3.184	0.288	2.824*	0.211
3.125	2.684	0.115	3.258	0.365	2.546	0.007	2.682	0.524
1.562	2.268	0.812	2.783	0.704	2.409	0.024	2.730	0.559
0.781	2.407	0.720	3.002	0.334	1.746	0.029	2.815	0.529
MEM ⁺⁺	2.315	1.271	2.635	0.150	2.760	0.458	2.921	0.034
1%DMSO	1.084	1.236	1.490	1.873	1.144	1.410	1.574	1.919
0.5% crystal**	0.155	0.065	0.161	0.001	0.171	0.118	0.435	0.420
Blank	0.349	0.447	0.161	0.180	0.204	0.259	0.154	0.183

หมายเหตุ

*ไม่เป็นพิษต่อเซลล์สูงสุด

** crystal violet control คือหลุมเปล่าที่ย้อมด้วย 0.5% crystal violet

ตาราง 4 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดทองพันชั่ง

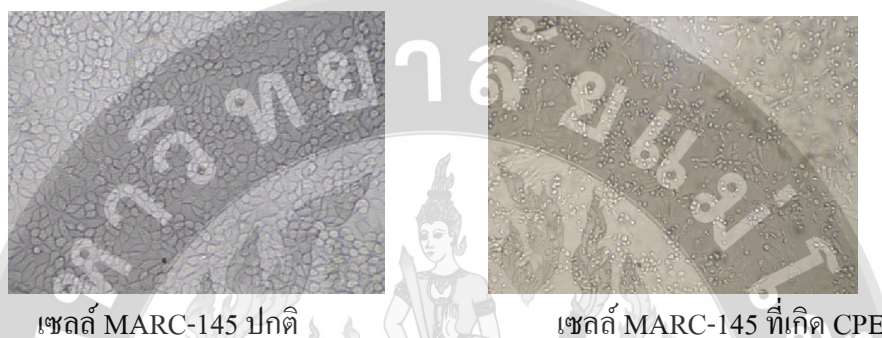
ความเข้มข้น ของสารสกัด (มก/มล.)	สารสกัดน้ำ (n=4)		50% เอทานอล (n=4)		70% เอทานอล (n=4)		95% เอทานอล (n=4)	
	Mean	sd	Mean	sd	Mean	sd	Mean	sd
100	0.870	0.753	0.513	0.058	0.409	0.102	1.085	0.848
50	0.490	0.350	0.370	0.152	0.386	0.284	0.953	0.830
25	0.466	0.316	0.331	0.241	0.314	0.203	0.695	0.712
12.5	1.456	0.980	0.664	0.310	0.360	0.154	0.526	0.481
6.25	2.176	1.347	0.647	0.124	0.736	0.208	1.097	0.013
3.125	2.254	1.108	0.565	0.264	0.438	0.059	1.008	0.445
1.562	2.320	0.936	0.385	0.039	0.446	0.175	0.814	0.843
0.781	2.181	1.057	0.343	0.044	0.400	0.244	0.987	1.051
0.39	2.362	0.154	0.124	0.018	0.176	0.066	0.130	0.004
0.19	2.416	0.078	0.116	0.007	0.562	0.479	0.134	0.003
0.09	2.453*	0.130	0.142	0.028	1.507	0.857	0.139	0.004
0.04	2.329	0.305	0.158	0.006	2.329	0.304	0.201	0.083
0.02	2.245	0.187	1.483*	0.465	2.496*	0.068	1.430*	0.240
MEM ⁺⁺	2.731	0.539	2.648	0.536	3.024	0.482	2.561	0.908
1% DMSO	2.720	0.442	2.836	0.554	2.239	1.239	2.858	0.305
0.5% crystal**	0.710	0.705	0.736	0.769	0.762	0.799	0.813	0.890
Blank	0.058	0.034	0.052	0.027	0.053	0.033	0.057	0.039

หมายเหตุ *ไม่เป็นพิษต่อเซลล์สูงสุด

** crystal violet control คือหลุมเปล่าที่ย้อมด้วย 0.5% crystal violet

3. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดต่อการติดเชื้อเซลล์และการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอส โดยวิธี CPE assay

การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเซลล์หลังการติดเชื้อไวรัส ได้แก่ เซลล์มีลักษณะกลมวาว (spherical cell) หยุ่น (shrink cell) บางบริเวณมีการรวมตัวกันเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ (syncytial cell) และหลุดออกจากผิวภาชนะเพาะเลี้ยง (ภาพ 4)



ภาพ 4 ลักษณะของเซลล์ MARC-145 ระหว่างเซลล์ปกติกับเซลล์ที่เกิด CPE

3.1 ฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดพลูควา

3.1.1 ฤทธิ์ยับยั้งการติดเชื้อเซลล์ MARC-145

สารสกัดน้ำสามารถลดไตเตอร์ของไวรัสจาก 10^6 TCID₅₀/มล. เหลือ $10^{5.75}$ TCID₅₀/มล. สารสกัด 50% เอทานอลสามารถลดไตเตอร์ของไวรัสจาก 10^7 TCID₅₀/มล. เหลือ $10^{5.75}$ TCID₅₀/มล. ในขณะที่สารสกัด 70% เอทานอลสามารถลดไตเตอร์ไวรัสจาก 10^7 TCID₅₀/มล. เหลือ $10^{6.66}$ TCID₅₀/มล. และสารสกัด 95% เอทานอลสามารถลดไตเตอร์ของไวรัสจาก 10^6 TCID₅₀/มล. เหลือ $10^{5.6}$ TCID₅₀/มล. (ตาราง 5)

ผลการทดลองพบว่าทุกกลุ่มทดสอบมีไตเตอร์ของไวรัสลดลงเป็นทิศทางเดียวกัน แต่สังเกตได้ว่าสารสกัดพลูความีความสามารถยับยั้งไวรัสพาร์อาร์เอส ในระยะก่อนติดเชื้อเซลล์ได้ค่อนข้างน้อย

ตาราง 5 ไตเตอร์ของไวรัสฟิอาร์อาร์เอสในการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดพลูควาดต่อการติดเข้าสู่เซลล์ MARC-145 (แสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลองซ้ำ 3 การทดลอง)

สารสกัด	ความเข้มข้น (มก/มล.)	Log ไวรัสเริ่มต้น (TCID ₅₀ /มล.)	Log ไวรัสหลังทดสอบ (TCID ₅₀ /มล.)	S.E.M
น้ำ	1.56	10 ⁶	10 ^{5.75}	10 ^{0.07}
50% เอทานอล	1.56	10 ⁷	10 ^{5.75}	10 ^{0.31}
70% เอทานอล	1.56	10 ⁷	10 ^{6.66}	10 ^{0.14}
95% เอทานอล	0.78	10 ⁶	10 ^{5.66}	10 ^{0.11}
ควบคุม	-	10 ⁷	10 ⁷	-

3.1.2 ฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสฟิอาร์อาร์เอส

สารสกัด 50% เอทานอลสามารถลดไตเตอร์ของไวรัสจาก 10⁷ TCID₅₀/มล. เหลือ 10^{2.33} TCID₅₀/มล. สารสกัด 70% เอทานอลลดไตเตอร์ของไวรัสจาก 10⁷ TCID₅₀/มล. เหลือ 10^{3.75} TCID₅₀/มล. ในขณะที่สารสกัดน้ำและสารสกัด 95% เอทานอลลดไตเตอร์ของไวรัสจาก 10⁶ TCID₅₀/มล. เหลือ 10^{5.91} TCID₅₀/มล. และ 10^{5.75} TCID₅₀/มล. ตามลำดับ (ตาราง 6)

ตาราง 6 ไตเตอร์ของไวรัสฟิอาร์อาร์เอสในการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดพลูควาดต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัส (แสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลองซ้ำ 3 การทดลอง)

สารสกัด	ความเข้มข้น (มก/มล.)	Log ไวรัสเริ่มต้น (TCID ₅₀ /มล.)	Log ไวรัสหลังทดสอบ (TCID ₅₀ /มล.)	S.E.M
น้ำ	1.56	10 ⁶	10 ^{5.91}	10 ^{0.10}
50% เอทานอล	1.56	10 ⁷	10 ^{2.33}	10 ^{0.07}
70% เอทานอล	1.56	10 ⁷	10 ^{3.75}	10 ^{0.17}
95% เอทานอล	0.78	10 ⁶	10 ^{5.75}	10 ^{0.07}
ควบคุม	-	10 ⁷	10 ⁷	-

3.2 อุทกียับยั้งจากสารสกัดพญาขอ

3.2.1 อุทกียับยั้งการติดเชื้อเซลล์ MARC-145

สารสกัดน้ำสามารถลดไตเตอร์ของไวรัส จาก 10^8 TCID₅₀/มล. เหลือ $10^{4.08}$ TCID₅₀/มล. ในขณะที่สารสกัด 50% เอทานอลสามารถลดไตเตอร์ของไวรัสจาก 10^8 TCID₅₀/มล. เหลือ $10^{2.41}$ TCID₅₀/มล. ส่วนสารสกัด 70% เอทานอลสามารถลดไตเตอร์ของไวรัสจาก 10^6 TCID₅₀/มล. เหลือ $10^{4.33}$ TCID₅₀/มล. และสารสกัด 95% เอทานอลลดไตเตอร์ของไวรัสจาก 10^7 TCID₅₀/มล. เหลือ $10^{5.66}$ TCID₅₀/มล. (ตาราง 7) ผลการทดลองพบว่าสารสกัด 50% เอทานอลมีความสามารถในการลดไตเตอร์ของไวรัสได้สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากตัวทำละลายอื่นๆ

ตาราง 7 ไตเตอร์ของไวรัสพาร์อาร์เอสในการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดพญาขอต่อการติดเชื้อเซลล์ MARC-145 (แสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลองซ้ำ 3 การทดลอง)

สารสกัด	ความเข้มข้น (มก/มล.)	Log ไวรัสเริ่มต้น (TCID ₅₀ /มล.)	Log ไวรัสหลังทดสอบ (TCID ₅₀ /มล.)	S.E.M
น้ำ	25	10^8	$10^{4.08}$	$10^{0.05}$
50% เอทานอล	12.5	10^8	$10^{2.41}$	$10^{0.14}$
70% เอทานอล	25	10^6	$10^{4.33}$	$10^{0.07}$
95% เอทานอล	6.25	10^7	$10^{5.66}$	$10^{0.11}$
ควบคุม	-	10^8	10^8	-

3.2.2 อุทกียับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอส

สารสกัดน้ำสามารถลดไตเตอร์ของไวรัสจาก 10^8 TCID₅₀/มล. เหลือ 10^4 TCID₅₀/มล. ในขณะที่สารสกัด 50% เอทานอลสามารถลดไตเตอร์ของไวรัสจาก 10^8 TCID₅₀/มล. เหลือ $10^{0.75}$ TCID₅₀/มล. ส่วนสารสกัด 70% เอทานอลสามารถลดไตเตอร์ของไวรัสจาก 10^6 TCID₅₀/มล. เหลือ $10^{4.41}$ TCID₅₀/มล. และสารสกัด 95% เอทานอลลดไตเตอร์ของไวรัสจาก 10^7 TCID₅₀/มล. เหลือ $10^{5.75}$ TCID₅₀/มล. (ตาราง 8) ผลการทดลอง พบว่าสารสกัด 50% เอทานอล สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสหลังติดเชื้อเซลล์ได้สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากตัวทำละลายอื่นๆ

ตาราง 8 ไตเตอร์ของไวรัสฟิอาร์อาร์เอสในการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดพญาขอต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัส (แสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลองซ้ำ 3 การทดลอง)

สารสกัด	ความเข้มข้น (มก/มล.)	Log ไวรัสเริ่มต้น (TCID ₅₀ /มล.)	Log ไวรัสหลังทดสอบ (TCID ₅₀ /มล.)	S.E.M
น้ำ	25	10 ⁸	10 ⁴	-
50% เอทานอล	12.5	10 ⁸	10 ^{0.75}	10 ^{0.17}
70% เอทานอล	25	10 ⁶	10 ^{4.41}	10 ^{0.05}
95% เอทานอล	6.25	10 ⁷	10 ^{5.75}	10 ^{0.07}
ควบคุม	-	10 ⁸	10 ⁸	-

3.3 ฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดทองพันชั่ง

3.3.1 ฤทธิ์ยับยั้งการติดเชื้อเซลล์ MARC-145

สารสกัดน้ำสามารถลดไตเตอร์ของไวรัสจาก 10⁸ TCID₅₀/มล. เหลือ 10^{5.33} TCID₅₀/มล. ในขณะที่สารสกัด 50% เอทานอลสามารถลดไตเตอร์ของไวรัสจาก 10⁸ TCID₅₀/มล. เหลือ 10^{2.41} TCID₅₀/มล. ส่วนสารสกัด 70% เอทานอลสามารถลดไตเตอร์ของไวรัสจาก 10⁷ TCID₅₀/มล. เหลือ 10^{6.16} TCID₅₀/มล. และสารสกัด 95% เอทานอลสามารถลดไตเตอร์ของไวรัสจาก 10⁷ TCID₅₀/มล. เหลือ 10^{5.83} TCID₅₀/มล. (ตาราง 9) ผลการทดลองพบว่า สารสกัด 50% เอทานอลมีความสามารถในการลดไตเตอร์ของไวรัสได้สูงสุดเมื่อเทียบกับสารสกัดจากตัวทำละลายอื่นๆ

ตาราง 9 ไตเตอร์ของไวรัสฟิอาร์อาร์เอสในการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดทองพันชั่งต่อการติดเชื้อเซลล์ MARC-145 (แสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลองซ้ำ 3 การทดลอง)

สารสกัด	ความเข้มข้น (มก/มล.)	Log ไวรัสเริ่มต้น (TCID ₅₀ /มล.)	Log ไวรัสหลังทดสอบ (TCID ₅₀ /มล.)	S.E.M
น้ำ	3.12	10 ⁸	10 ^{5.33}	10 ^{0.2}
50% เอทานอล	0.02	10 ⁸	10 ^{2.41}	10 ^{0.16}
70% เอทานอล	0.19	10 ⁷	10 ^{6.16}	10 ^{0.07}
95% เอทานอล	0.02	10 ⁷	10 ^{5.83}	10 ^{0.11}
ควบคุม	-	10 ⁷	10 ⁷	-

3.3.2 การยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอส

สารสกัดน้ำสามารถลดไตเตอร์ของไวรัส จาก 10^8 TCID₅₀/มล. เหลือ $10^{4.83}$ TCID₅₀/มล. ในขณะที่สารสกัด 50% เอทานอล สามารถลดไตเตอร์ของไวรัสจาก 10^8 TCID₅₀/มล. เหลือ $10^{2.5}$ TCID₅₀/มล. ส่วนสารสกัด 70% เอทานอลและสารสกัด 95% เอทานอลสามารถลดไตเตอร์ของไวรัสจาก 10^7 TCID₅₀/มล. เหลือ $10^{5.08}$ TCID₅₀/มล. (ตาราง 10) ผลการทดลองพบว่าสารสกัด 50% เอทานอลมีความสามารถในการลดไตเตอร์ของไวรัสได้สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากตัวทำละลายอื่นๆ

ตาราง 10 ไตเตอร์ของไวรัสพาร์อาร์เอสในการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดทองพันชั่งต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัส (แสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลองซ้ำ 3 การทดลอง)

สารสกัด	ความเข้มข้น (มก/มล.)	Log ไวรัสเริ่มต้น (TCID ₅₀ /มล.)	Log ไวรัสหลังทดสอบ (TCID ₅₀ /มล.)	S.E.M
น้ำ	3.12	10^8	$10^{4.83}$	$10^{0.25}$
50% เอทานอล	0.02	10^8	$10^{2.50}$	$10^{0.18}$
70% เอทานอล	0.19	10^7	$10^{5.08}$	$10^{0.21}$
95% เอทานอล	0.02	10^7	$10^{5.08}$	$10^{0.24}$
ควบคุม	-	10^7	10^7	-

4. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดยับยั้งไวรัสพาร์อาร์เอสโดยวิธี Plaque forming assay

เมื่อนำไวรัสพาร์อาร์เอสที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัดหยาบพริกขี้หนู พญาขอ และทองพันชั่ง ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ มาทำการเพาะเลี้ยงในเซลล์ MARC-145 (5×10^5 เซลล์) เพื่อวิเคราะห์หาไวรัสจากปริมาณ plaque ที่ลดลงเปรียบเทียบกับกลุ่มไวรัสควบคุม พบว่าสารสกัดที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุด คือ สารสกัด 50% เอทานอลของสารสกัดพริกขี้หนู พญาขอ และทองพันชั่ง ในการยับยั้งไวรัสและสามารถลดปริมาณ plaque ได้ดังนี้

4.1 การยับยั้งไวรัสพาร์อาร์เอสของสารสกัดพริกขี้หนู

สารสกัด 50% เอทานอลของพริกขี้หนูที่ความเข้มข้น 1.56 มก/มล. สามารถยับยั้งไวรัสพาร์อาร์เอสในระยะก่อนติดเข้าสู่เซลล์ที่ระดับความเจือจางของไวรัส 1,000 เท่า เท่ากับ 7×10^4 PFU/มล. และมีค่าการยับยั้งเท่ากับร้อยละ 86 และสูงสุดที่ระดับความเจือจางของไวรัส 10,000 เท่า

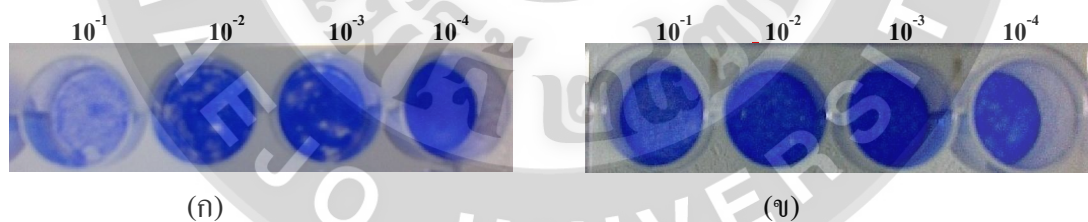
สามารถยับยั้งไวรัสในระยะก่อนติดเข้าสู่เซลล์ ได้สูงสุดร้อยละ 100 เมื่อเปรียบเทียบกับไวรัสในกลุ่มควบคุม (ตาราง 11, ภาพ 5)

ในขณะที่การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสหลังเข้าสู่เซลล์แล้วของสารสกัด 50% เอทานอล พบว่ามีค่ายับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสหลังเข้าสู่เซลล์ได้สูงสุดเท่ากับร้อยละ 97 ที่ระดับความเข้มข้น 10,000 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับไวรัสในกลุ่มควบคุม พบว่ามีปริมาณเท่ากับ 7.5×10^4 PFU/มล. (ภาพ 6)

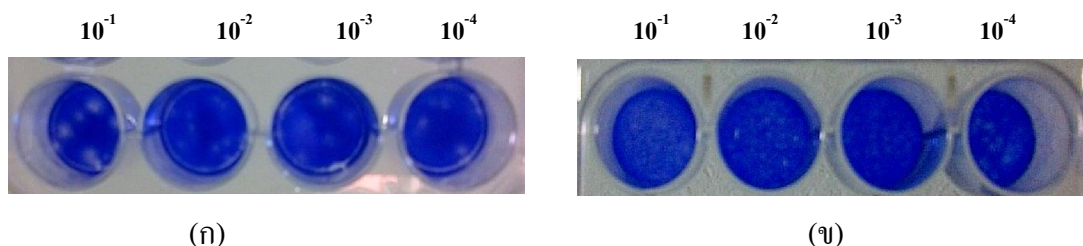
ตาราง 11ฤทธิ์ยับยั้งไวรัสพาร์อาร์เอสจากสารสกัด 50% เอทานอลของพลูควา

ความเจือจาง (เท่า)	Pre-infection		Post-infection	
	# Plaque	% ยับยั้ง ^a	# Plaque	% ยับยั้ง ^a
10	> 100	0	8	92
100	> 100	0	9	91
1,000	14	86	7	93
10,000	0	100	3	97

หมายเหตุ: ^a = ค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ครั้ง



ภาพ 5 ปริมาณ plaque ในระยะ pre-infection หลังจากทดสอบด้วยสารสกัด 50% เอทานอลของพลูควา (ก) เปรียบเทียบกับไวรัสกลุ่มควบคุม (ข)



ภาพ 6 ปริมาณ plaque ในระยะ post-infection หลังจากทดสอบด้วยสารสกัด 50% เอทานอลของพลูควา (ก) เปรียบเทียบกับไวรัสกลุ่มควบคุม (ข)

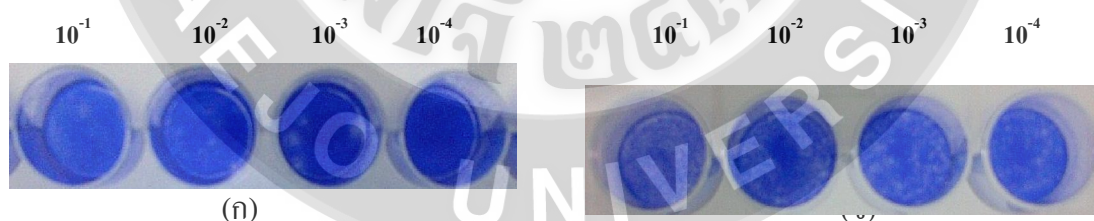
4.2 ฤทธิ์ยับยั้งไวรัสพาร์อาร์เอสของสารสกัดพญายอ

สารสกัด 50% เอทานอลของพญายอที่ความเข้มข้น 12.5 มก/มล. มีความสามารถในการยับยั้งไวรัสพาร์อาร์เอส ได้ทั้งในระยะก่อนและหลังติดเข้าสู่เซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยพบว่าในระยะก่อนติดเข้าสู่เซลล์ มีจำนวน plaque ลดลงอย่างเห็นได้ชัด เมื่อเปรียบเทียบกับไวรัสในกลุ่มควบคุม และมีไตเตอร์ของไวรัสเท่ากับ 5×10^2 PFU/มล. (ตาราง 12, ภาพ 7) มีค่าการยับยั้งร้อยละ 97 และในระยะการเพิ่มจำนวนของไวรัสหลังติดเข้าสู่เซลล์นั้น มีค่าการยับยั้งสูงสุดเท่ากับร้อยละ 100 และพบว่าไม่มี plaque ปรากฏขึ้นในจานเพาะเลี้ยงไวรัส (ภาพ 8)

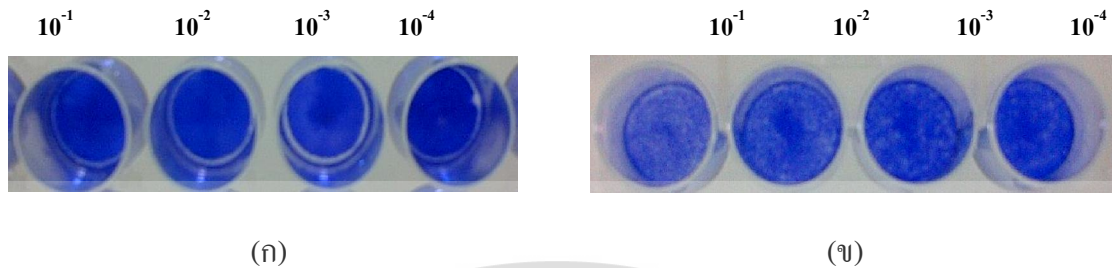
ตาราง 12 ฤทธิ์ยับยั้งไวรัสพาร์อาร์เอสจากสารสกัด 50% เอทานอลของพญายอ

ความเจือจาง (เท่า)	Pre-infection		Post-infection	
	# Plaque	% ยับยั้ง ^a	จำนวน Plaque	% ยับยั้ง ^a
10	3	97	0	100
100	4	96	0	100
1,000	4	96	0	100
10,000	0	100	0	100

หมายเหตุ: ^a = ค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ครั้ง



ภาพ 7 ปริมาณ plaque ในระยะ pre-infection หลังจากทดสอบด้วยสารสกัด 50% เอทานอลของพญายอ (ก) เปรียบเทียบกับไวรัสกลุ่มควบคุม (ข)



ภาพ 8 ปริมาณ plaque ในระยะ post-infection หลังจากทดสอบด้วยสารสกัด 50% เอทานอลของ พญายอ (ก) เปรียบเทียบกับไวรัสกลุ่มควบคุม (ข)

4.3 ฤทธิ์ยับยั้งไวรัสฟิอาร์อาร์เอสของสารสกัดทองพันชั่ง

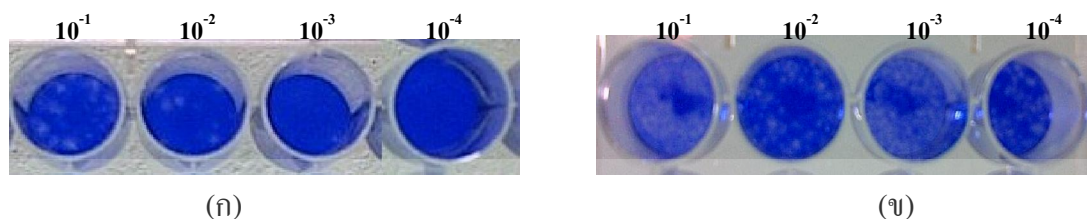
สารสกัด 50% เอทานอลของทองพันชั่งที่ความเข้มข้น 0.02 มก/มล. สามารถยับยั้งไวรัสฟิอาร์อาร์เอสได้ในระยะก่อนติดเข้าสู่เซลล์ ที่ระดับความเจือจางไวรัส 1,000 เท่า มีค่าการยับยั้งสูงสุดเท่ากับร้อยละ 100 และที่ระดับความเจือจางของไวรัส 100 เท่า และมีค่าการยับยั้งเท่ากับร้อยละ 91 และพบว่ามีไตเตอร์ของไวรัส เท่ากับ 2.25×10^3 PFU/มล. (ตาราง 13, ภาพ 9)

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสหลังติดเข้าสู่เซลล์ พบว่าที่ระดับความเจือจางไวรัส 1,000 เท่า มีค่าการยับยั้งสูงสุดเท่ากับร้อยละ 100 และที่ระดับความเจือจางของไวรัส 100 เท่า พบว่า มีค่าการยับยั้งเท่ากับร้อยละ 93 และมีไตเตอร์ของไวรัส เท่ากับ 1.75×10^3 PFU/มล. (ภาพ 10)

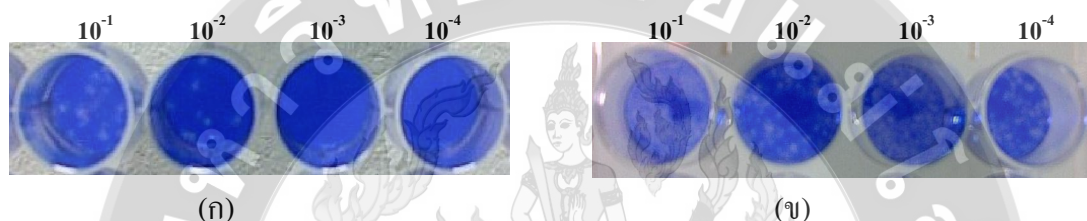
ตาราง 13 ฤทธิ์ยับยั้งไวรัสฟิอาร์อาร์เอสจากสารสกัด 50% เอทานอลของทองพันชั่ง

ความเจือจาง (เท่า)	Pre-infection		Post-infection	
	# Plaque	% ยับยั้ง ^a	จำนวน Plaque	% ยับยั้ง ^a
10	20	80	15	85
100	9	91	7	93
1,000	0	100	0	100
10,000	0	100	0	100

หมายเหตุ: ^a = ค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ครั้ง



ภาพ 9 ปริมาณ plaque ในระยะ pre-infection หลังจากทดสอบด้วยสารสกัด 50% เอทานอลของ
ทองพันชั่ง (ก) เปรียบเทียบกับไวรัสกลุ่มควบคุม (ข)

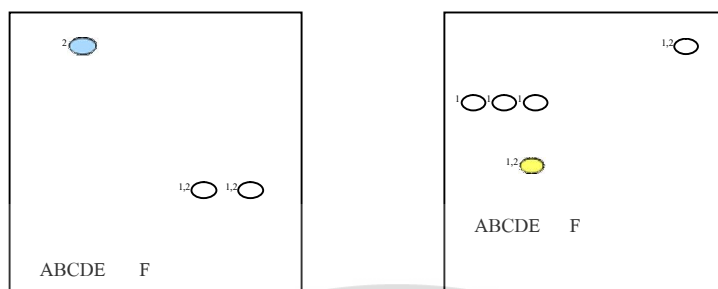


ภาพ 10 ปริมาณ plaque ในระยะ post-infection หลังจากทดสอบด้วยสารสกัด 50% เอทานอลของ
ทองพันชั่ง (ก) เปรียบเทียบกับไวรัสกลุ่มควบคุม (ข)

5. ผลการวิเคราะห์หาสารพฤษเคมีเบื้องต้นด้วยวิธี TLC

เมื่อนำสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งสูงสุด คือ สารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 50% เอทานอลของพืชสมุนไพรพลูควง พญาขอ และทองพันชั่ง มาทดสอบหาสารพฤษเคมี โดยการสกัดแยกสารแบบเป็นขั้นตอน ก่อนนำไปศึกษาองค์ประกอบทางเคมีด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ โดยใช้ solvent system ระบบ ethatyl acetate: formic: acetic: H_2O (100:11:11:26) และ ระบบ dichloromethane: ethatyl acetate: formic acid (10:6:1) (Veronika., 1995) เพื่อวิเคราะห์หาสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านไวรัสคือ สาร rutin และ quercetin ตามลำดับ

จากการตรวจสอบหาสารพฤษเคมีเบื้องต้นด้วยเทคนิคดังกล่าวโดยทำการสกัดแยกองค์ประกอบทางเคมีด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ โดยเรียงลำดับความมีขั้วจากตัวทำละลายไม่มีขั้วจนถึงตัวทำละลายมีขั้ว คือ hexane, dichloromethane: ethatyl, acetate, n-butanol และน้ำ ตามลำดับ เปรียบเทียบ สารสกัดเอทานอล 50% ของสมุนไพรพลูควง พญาขอ และทองพันชั่ง กับสารมาตรฐาน rutin และ quercetin พบว่า สารสกัดพลูควงที่แยกสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย n-butanol แสดงแถบของสารเคลื่อนที่ตรงกับสารมาตรฐาน rutin (ภาพ 11) ที่ค่า $R_f = \sim 0.56$ (ตาราง 14) เมื่อมองด้วยตาเปล่า และส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร



ภาพ 11 ผลการทำโครมาโทกราฟีจากสารสกัด 50% เอทานอลของพลูควา เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน rutin (ซ้าย) และ สาร quercetin (ขวา)

หมายเหตุ (A) hexane, (B) dichloromethane, (C) ethatyl acetate, (D) n-butanol, (E) water, (F) สารมาตรฐาน, ¹ ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และ ² ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร

จากภาพ 11 การทำโครมาโทกราฟีของสาร rutin จากสารสกัด 50% เอทานอลของพลูควา ทั้ง 5 ตัวทำละลาย มานำมาคำนวณหาค่าการเคลื่อนที่ (Rf) ของสารผลิตภัณฑ์แต่ละค่า ซึ่งคำนวณได้จากการเคลื่อนที่ของสาร rutin ตั้งต้นเปรียบเทียบกับสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ ดังตารางที่แสดง

ตาราง 14 ค่า Rf ที่คำนวณได้จากสารผลิตภัณฑ์เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

สารละลาย	พลูควา	พญายอ	ทองพันชั่ง
rutin/quercetin	0.56/0.92	0.84/0.8	0.90/0.7
- Hexane	-/-	-/-	-/-
- Dichloromethane	0.76/0.73	-	-
- Ethylacetate	-/0.41	-	-
- n-Butanol	0.56*/0.78	-	-
- water	-/0.76	-	-

หมายเหตุ - = ไม่มีปรากฏว่ามีสารสำคัญ ; * = ค่า Rf เท่ากับสารมาตรฐาน

วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย

จากการทดสอบสารสกัดหยาบของสมุนไพรพลูคาว พญาขอและทองพันชั่ง ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง MARC-145 cell พบว่า สารสกัดน้ำจากพลูคาว พญาขอ และทองพันชั่ง มีค่าเท่ากับ 1.56, 25 และ 0.02 มก/มล. ตามลำดับ และสารสกัดเอทานอลจากพลูคาว พญาขอ และทองพันชั่ง มีความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ดังนี้ สารสกัด 50% เอทานอล เท่ากับ 1.56, 12.5 และ 0.02 มก/มล. ตามลำดับ สารสกัด 70% เอทานอล เท่ากับ 1.56, 25 และ 0.09 มก/มล. ตามลำดับ และสารสกัด 95% เอทานอล เท่ากับ 1.56, 6.25, 0.02 มก/มล. ตามลำดับ การทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดน้ำและสารสกัดเอทานอลของสมุนไพรทั้ง 3 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดสมุนไพร จะเห็นได้ว่า สารสกัดทองพันชั่งมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มากที่สุด รองลงมาคือสารสกัดพลูคาว และสารสกัดพญาขอมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยที่สุด จึงทำให้ทราบได้ว่าวิธีการสกัดที่อาศัยความร้อนในกระบวนการสกัดนั้นไม่มีผลต่อประสิทธิภาพของสารสกัด เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดน้ำ และสารสกัดเอทานอล

จากการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งไวรัสพาร์อาร์เอสของสารสกัดหยาบ ทั้งใน ระยะก่อนติดเข้าสู่เซลล์ และระยะการเพิ่มจำนวนของไวรัสหลังเข้าสู่เซลล์ MARC-145 พบว่า สารสกัด 50% เอทานอลมีความสามารถในการยับยั้งไวรัสได้สูงที่สุด โดยพบว่า สารสกัด 50% เอทานอลของพญาขอสามารถยับยั้งได้ทั้งในระยะก่อนติดเข้าสู่เซลล์และยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสพาร์อาร์เอสหลังเข้าสู่เซลล์ โดยสามารถลดไตเตอร์ได้ เหลือเท่ากับ $10^{2.41}$ TCID₅₀/มล. และ $10^{0.75}$ TCID₅₀/มล. ตามลำดับ และสารสกัด 50% เอทานอลของทองพันชั่ง สามารถลดไตเตอร์ของไวรัสได้เหลือเท่ากับ $10^{2.41}$ TCID₅₀/มล. ในระยะก่อนติดเข้าสู่เซลล์และ $10^{2.5}$ TCID₅₀/มล. ในระยะการเพิ่มจำนวนของไวรัสพาร์อาร์เอส ในขณะที่สารสกัด 50% เอทานอลของพลูคาวสามารถลดไตเตอร์ไวรัสได้ดีในระยะการเพิ่มจำนวนของไวรัสพาร์อาร์เอสหลังติดเข้าสู่เซลล์ ได้เหลือเท่ากับ $10^{2.33}$ TCID₅₀/มล. และจากการวิเคราะห์หาไตเตอร์ของไวรัสโดยวิธี plaque forming assay ทำให้ทราบว่าสารสกัด 50% เอทานอลของพญาขอที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่เป็นพิษกับเซลล์มี ประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ดีที่สุด โดยสารสกัดพญาขอสามารถยับยั้งเชื้อไวรัสในระยะก่อนติดเข้าสู่เซลล์ ได้ในปริมาณ 5×10^2 PFU/มล. เท่ากับ 96% และมีประสิทธิภาพยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสได้ถึง 100% เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดที่ใช้ตัวทำละลายต่างๆกัน ในขณะที่จากการตรวจสอบ

หาสารพฤษเคมี พบว่า สารสกัด 50% เอทานอลของพลูควาที่สกัดแยกโดยใช้ตัวทำละลาย n-butanol มีสาร rutin เป็นองค์ประกอบสำคัญ

ข้อเสนอแนะ

1. จากการทดลองจะสังเกตได้ว่าระดับความเข้มข้นสูงสุดที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดนั้นแตกต่างกัน เนื่องจากความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ทดสอบซึ่งต้องคำนึงความเป็นพิษต่อเซลล์เพราะไวรัสต้องอาศัยเซลล์เจ้าบ้านในการแบ่งตัว ด้วยสาเหตุนี้จึงทำให้สารสกัดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้อย่างจำกัดโดยที่สารสกัดพลาไคมีมีความเข้มข้นสูงสุดและสารสกัดทองพันชั่งมีความเข้มข้นต่ำที่สุด อาจเป็นไปได้ว่าฤทธิ์ในการยับยั้งไวรัสจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัด

2. ผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งทั้งในระยะก่อนติดเข้าสู่เซลล์และการเพิ่มจำนวนหลังไวรัสเข้าสู่เซลล์ พบว่า สารสกัดทั้ง 3 ชนิด มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสได้ แต่ไม่สามารถอธิบายถึงกลไกการออกฤทธิ์ได้ ดังนั้น จึงควรที่จะทำการทดสอบ โดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม เพื่ออธิบายถึงกลไกการออกฤทธิ์ต่อไป

3. ผลจากแยกสารสกัดหยาบแล้ว นำมาสกัดแยกต่อโดยใช้ TLC ควรมีการนำสารสกัดที่ได้จาก TLC มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัสอีกครั้งหนึ่ง เพื่อหาค่า Rf ว่าสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อเป็นสารตัวเดียวกันกับที่ได้จาก TLC โดยตรงหรือไม่ เพื่อจะเป็นประโยชน์ในการวิเคราะห์หาสารบริสุทธิ์ และนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Akanitapichat, P., M. Kurokawa, S. Tewtrakul and M. Hattori. 2002. Inhibitory activities of Thai medicinal plants against herpes simplex type 1, poliovirus type 1, and measles virus. **J Trad Med.** 19: 174-180.
- Chang, J.S., L.C. Chang, C.C. Chen, L.T. Liu, K.C. Wang and C.C. Lin. 2001. Antileukemic activity of *Bidens pilosa* L. var. *minor* (Blume) Sherff and *Houttuynia cordata* Thunb. **Am J Chin Med.** 29(2): 303-12.
- Cheeptham, N and G.H.N. Towers. 2002. Light-mediated activities of some Thai medicinal plant

- teas. **Fitoterapia** 73: 651–662.
- Chen, L., W. Wu, C. Huang, Y. Yang and Y.L. Zheng. 2008. Composition and variability of the essential oil of *Houttuynia* of China. **Chem Nat Compounds**. 44(6): 778-783.
- Chiang, L.C., J.S. Chang, C.C. Chen, L.T. Ng and C.C. Lin. 2003. Anti-herpes simplex virus activity of *Bidens pilosa* and *Houttuynia cordata*. **Am J Chin Med**. 31(3): 355-362.
- Choi, H.J., J.H. Kim, C.H. Lee, Y.J. Ahn, J.H. Song, S.H. Baek and D.H. Kwon. 2009a. Antiviral activity of quercetin 7-rhamnoside against porcine epidemic diarrhea virus. **Antiviral Res**. 81(1): 77-81.
- Choi, H.J., J.H. Song, K.S. Park and D.H. Kwon. 2009b. Inhibitory effects of quercetin 3-rhamnoside on influenza A virus replication. **Eur J Pharm Sci**. 37(3-4): 329-333.
- Chou, S.C., C.R. Su, Y.C. Ku and T.S. Wu. 2009. The constituents and their bioactivities of *Houttuynia cordata*. **Chem. Pharm. Bull**. 57(11): 1227-1230.
- Elizabeth, M., D. Williamson, T. Okpako and F.J. Evas. 1996. **Selection, Preparation and Pharmacological Evaluation of Plant Material**. England: Johnwiley&Son Ltd. 228 p.
- Fernandes, M.J.B., C. Limas, M.H. Rossi, E. Gonçalves and I.C. Simoni. 2005. Cytotoxicity of subfractions and compounds from *Polymnia sonchifolia*. **Brazilian J Microbiol**. 36: 338-341.
- Halbur, P.G., P.S. Paul, M.L. Frey, J. Landgraf, K. Eernisse and X.J. Meng. 1995. Comparison of the pathogenicity of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. **Vet Pathol**. 32: 648-60.
- Halbur, P.G., P.S. Paul, X.J. Meng, M.A. Lum, J.J. Andrews and J.A. Rathje. 1996. Comparative pathogenicity of nine US porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolate in a five-week-old cesarean-derived, colostrums-deprived pig model. **J. Vet. Diagn. Invest**. 8(1): 11-20.
- Hayashi, K., M. Kamiya and T. Hayashi. 1995. Virucidal effects of the steam distillate from *Houttuynia cordata* and its components on HSV-1, influenza virus, and HIV. **Planta Med**. 61, 237–241.

- Janwitayanuchit, W., K. Suwanborirux, C. Patarapanich, S. Pummangura, V. Lipipun and T.Vilaivan. 2003. Synthesis and anti-herpes simplex viral activity of monoglycosyl diglycerides. **Phytochemistry**. 64(7): 1253-1264.
- Jayavaru, C., P. Chavaltitumrong, K. Polachandara, N. Dechatiwongse, T. Na Ayudhaya and T. Jongtrakulsiri. 1992. The virucidal activity of *Clinacanthus nutans* Lindau extract against herpes simplex virus type 2 - an in vitro study. **Bulletin of Department of Medical Science**. 34: 153-158.
- Kernan, M.R., A. Sendl, J.L. Chen, S.D. Jolad, P. Blanc, J.T. Murphy, C.A. Stoddart, W. Nanakorn, M.J. Balick and E.J. Rozhon. 1997. Two new lignans with activity against influenza virus from the medicinal plant *Rhinacanthus nasutus*. **J Nat Prod**. 60: 635-637.
- Kim, S.K., S.Y. Ryu, J. No, S.U. Choi and Y.S. Kim. 2001. Cytotoxic Alkaloids from *Houttuynia cordata*. **Arch Pharm Res**. 24(6): 518-521.
- Kim, W.I., J.J. Kim, S.H. Cha and K.J. Yoon. 2008. Different biological characteristics between wild-type PRRS viruses and vaccine viruses and identification of the corresponding genetic determinants. **J. Clin. Microbiol**. 10: 1128.
- Kittisiripornkul S, N. Bunyaphatsara, W. Tanasomwong and J. Satayavivad. 1987. **The anti-inflammatory action and toxicological studies of *Clinacanthus nutans***. Princess Congress, Bangkok, Thailand, 10-13 Dec 1987.
- Lau, K.M., K.M. Lee, C.M. Koon, C.S.F. Cheung, C.P. Lau, H.M. Ho, M.Y.H. Lee, S.W.N. Au, C.H.K. Cheng, C.B.S. Lau, S.K.W. Tsui, D.C.C Wan, M.M.Y. Waye, K.B. Wong, C.K. Wong, C.W.K. Lam, P.C. Leung and K.P. Fung. 2008. Immunomodulatory and anti-SARS activities of *Houttuynia cordata*. **J Ethnopharmacol**. 118(1): 79-85.
- Lee, J.S., I.S. Kim, J.H. Kim, J.S. Kim, D.H. Kim and C.Y. Yun. 2008. Suppressive effects of *Houttuynia cordata* Thunb (Saururaceae) extract on Th2 immune response. **J Ethnopharmacol**. 117(1): 34-40.
- Lin, T.Y., Y.C. Liu, J.R. Jheng, H.P. Tsai, J.T. Jan, W.R. Wong and J.T. Horng. 2009. Anti-enterovirus 71 activity screening of Chinese herbs with anti-infection and inflammation activities. **Am J Chin Med**. 37(1): 143-158.

- Li, W., P. Zhou, Y. Zhang and L. He. 2011. *Houttuynia cordata* a novel and selective COX-2 inhibitor with anti-inflammatory activity. **J Ethnopharmacol.** 133: 922-927.
- Lu, H.M., Y.Z. Liang, L.Z. Yi and X.J. Wu. 2006. Anti-inflammatory effect of *Houttuynia cordata* injection. **J Ethnopharmacol.** 104(1-2): 245-249.
- Mengeling, W.L., K.M. Lager and A.C. Vorwald. 1998. Clinical consequences of exposing pregnant gilts to strains of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus isolated from field cases of "atypical" PRRS. **Am J Vet Res.** 59: 1540-4
- Neumann, E.J., J.B. Kliebenstein, C.D. Johnson, J.W. Mabry, E.J. Bush, A.H. Seitzinger, A.L. Green and J.J. Zimmerman. 2005. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. **J Am Vet Med Assoc.** 227: 385-92.
- Pannangpetch, P., P. Laupattarakasem, V. Kukongviriyapan, U. Kukongviriyapan, B. Kongyingyoes and C. Aromdee. 2007. Antioxidant activity and protective effect against oxidative hemolysis of *Clinacanthus nutans* (Burm.f) Lindau. **Songklanakarin J. Sci. Technol.** 29 (Suppl.1): 1-9.
- Pongphasuk, N., W. Khunkitti and M. Chitcharoenthum. 2005. Anti-inflammatory and analgesic activities of the extract from *garcinia mangostana* linn. **Acta Hort.** 680: 125-130.
- Puttarak, P., T. Charoonratana and P. Panichayupakaranant. 2010. Antimicrobial activity and stability of rhinacanthins-rich *Rhinacanthus nasutus* extract. **Phytomedicine.** 17: 323-327.
- Punturee, K., C.P. Wild and U. Vinitketkumneun. 2004. Thai medicinal plants modulate nitric oxide and tumor necrosis factor- α in J774.2 mouse macrophages. **J Ethnopharmacol.** 95: 183-189.
- Punturee, K., C.P. Wild, W. Kasinrerak and U. Vinitketkumneun. 2005. Immunomodulatory activities of *Centella asiatica* and *Rhinacanthus nasutus* extracts. **Asian Pac J Cancer Prev.** 6: 396-400.
- Qu, W., F.H. Wu, J. Li. and J.Y. Liang. 2011. Alkaloids from *Houttuynia cordata* and their antiplatelet aggregation activities. **Chinese J Nat Med** 9(6): 425-428.
- Rossow, K.D. 1998. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome. **Vet. Pathol.** 35, 1-20.

- Sangkitporn, S., K. Polchan, P. Thawatsupa, M. Bunjob and P. Chawalitthumrong. 1993. Treatment of recurrent genital herpes simplex virus infection with *Clinacanthus nutans* extract. Bulletin of the Department of Medical Services, Ministry of Public Health, Thailand. 18(5): 226-31
- Sangkitporn, S., S. Chaiwat, K. Balachandra, T. Dechatiwongse, M. Bunjob and C. Jayavas. 1995. Treatment of herpes zoster with *Clinacanthus nutans* (bi phaya yaw). **J Med Assoc Thai.** 78(11): 624-7
- Santi, S., S. Aussavashai, T. D. N. Ayudhya, P. G. Waterman and G. Karagianis. 2008. Chemical composition investigation of the *Clinacanthus nutans* Lindau leaves. **Thai J Phytopharm.** 13(2): 13-24.
- Satayavivad, J., N. Bunyapraphatsara, S. Kitisiripornkul and W. Tanasomwang. 1996. Analgesic and anti-inflammatory activities of extracts of *Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau. **Thai J Phytopharm.** 3(1): 7-17.
- Sattar, A.M., A.N. Abdullah., H.A. Khan and M.A. Noor. 2004. Evaluation of anti-bacterial activity of a local plant *Rhinacanthus nasutus* (L.). **J Biological Sci.** 4(4): 498-500.
- Sendl, A., L.J. Chen, D.S. Jolad and M. Kernan. 1996. Two new naphthoquinones with antiviral activity from *Rhinacanthus nasutus*. **J Nat Prod.** 59(11-808).
- Siripong, P., J. Yahuafai, K. Shimizu, K. Ichikawa, S. Yonezawa, T. Asai, K. Kanokmedakul, S. Ruchirawat and N. Oku. 2006. Induction of apoptosis in tumor cells by three naphthoquinone esters isolated from Thai medicinal plant: *Rhinacanthus nasutus* Kurz. **Biological & Pharmaceutical Bulletin.** 29: 2070–2076.
- Tewtrakul, S., P. Tansakul and P. Panichayupakaranant. 2009. Anti-allergic principles of *Rhinacanthus nasutus* leaves. **Phytomedicine.** 16(10): 929-934.
- Thacker, E.L. Immunology of the porcine respiratory disease complex. 2001. **Vet Clin North Am Food Anim Pract.** 17: 551-65
- Thacker, E.L., P.G. Halbur, P.S. Paul and B.J. Thacker. 1998. Detection of intracellular porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein in porcine macrophages by flow cytometry. **J Vet Diagn Invest.** 10: 308-11
- Thanawongnuwech, R., A. Amonsin, A. Tatsanakit and S. Damrongwatanapokin. 2004. Genetics

- and geographical variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Thailand. **Vet Microbiol.** 101: 9-21
- Thawaranantha, D., K. Balachandra, S. Jongtrakulsiri, P. Chavalittumrong, J. Bhumiswasdi and C. Jayavasut. 1992. In vitro antiviral activity of *Clinacanthus nutans* on varicella-zoster virus. **Siriraj. Hosp. Gaz.** 44(4): 285-291.
- van der Linden, I.F., J.J. Voermans, E.M. van der Linde-Bril, A.T. Bianchi and P.J. Steverink. 2003. Virological kinetics and immunological responses to a porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection of pigs at different ages. **Vaccine.** 21: 1952-7
- Veronika, R. 1996. **Plant drug analysis a thin layer chromatography atlas.** 2nd ed. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 364p.
- Wang, D., Q. Yu, P. Eikstadt, D. Hammond, Y. Feng and N. Chen. 2002. Studies on adjuvanticity of sodium houttuynia and its mechanism. **Inter Immunopharmacol.** 2(10): 1411-1418.
- Wanikiat, P., A. Panthong, P. Sujayanon, C. Yoosook, A.G. Rossi and V. Reutrakul. 2008. The anti-inflammatory effects and the inhibition of neutrophil responsiveness by *Barleria lupulina* and *Clinacanthus nutans* extracts. **J Ethnopharmacol.** 116(2): 234-244.
- Xu, X., H. Ye, W. Wang, L. Yu and G. Chen. 2006. Determination of flavonoids in *Houttuynia cordata* Thunb. and *Saururus chinensis* (Lour.) Bail. by capillary electrophoresis with electrochemical detection. **Talanta.** 68(3): 759-764.
- Yadav, A and T. Temjenmongla. 2011. Anticestodal activity of *Houttuynia cordata* leaf extract against *Hymenolepis diminuta* in experimentally infected rats. **J Parasitic Dis.** 35(2): 190-194.
- Yoosook, C., Y. Panpisutchai, S. Chaichana, T. Santisuk and V. Reutrakul. 1999. Evaluation of anti-HSV-2 activities of *Barleria lupulina* and *Clinacanthus nutans*. **J Ethnopharmacol.** 67(2): 179-187.
- Zuckermann, F.A., E.A. Garcia, I.D. Luque, J. Christopher-Hennings, A. Doster, M. Brito and F. Osorio. 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. **Vet Microbiol.** 123: 69-85.

http://web.agri.cmu.ac.th/ppath/course/360301/lesson5_inoculation_prepare.htm

<http://www.herblpg.com>

<http://www.oknation.net/blog/nonglek>

<http://xn-n3cga6af7 bxa8aed4a.blogspot.com>





อาหารและสารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์สูตร MEM⁺⁺

- dH ₂ O	938	มล.
- MEM	10	กรัม
- NaHCO ₃	2.2	กรัม
- FBS	50	มล.
- Antibiotic-Antimycotic	10	มล.

ปรับ pH ให้ได้ 7.2

ผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน กรองผ่านตัวกรองขนาด 0.2 µm ลงขวดปลอดเชื้อ

2. Growth medium

- MEM	89	มล.
- FBS	10	มล.
- Antibiotic-Antimycotic	1	มล.

ปรับ pH ให้ได้ 7.2

ผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน กรองผ่านตัวกรองขนาด 0.2 µm ลงขวดปลอดเชื้อ

3. การเตรียมอาหารสำหรับเก็บเซลล์

- MEM	50	มล.
- FBS	40	มล.
- DMSO	10	มล.

ผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน กรองผ่านตัวกรองขนาด 0.2 µm ลงขวดปลอดเชื้อ

4. สารละลาย Phosphate buffer saline (PBS) ประกอบด้วย

- Sodium chloride (NaCl)	8	กรัม
- Potassium chloride (KCl)	0.2	กรัม
- Sodium phosphate (NaHPO ₄)	1.25	กรัม
- Potassium dihydrogen phosphate (KH ₂ PO ₄)	0.2	กรัม

นำแต่ละส่วนค่อยๆละลายในน้ำบริสุทธิ์ 975 มล. จากนั้นทำการปรับค่า pH ให้ได้ 7.4 แล้ว
ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ และเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

5. การเตรียม Trypsin 0.25% (w/v)

- Trypsin	0.25	กรัม
- PBS	100	มล.
ปรับ pH ให้ได้ 7.4 -7.6		
กรองผ่านตัวกรองขนาด 0.2 μm ลงหลอดบรรจุ		

6. การเตรียม crystal violet (0.5%; w/v)

- สารละลาย citric acid 0.1 M	95	มล.
- Crystal violet	0.5	กรัม

7. การเตรียม 0.25% Coomassie brilliant blue R250

- Coomassie Brilliant Blue R250	0.25	กรัม
- Absolute acetic acid	10	มล.
- 50% methanol	90	มล.

8. การเตรียม 50% เอทานอล (ปริมาตร 1 ลิตร)

- 95% เอทานอล	526	มล.
- dH ₂ O	474	มล.

9. การเตรียม 70% เอทานอล

- 95% เอทานอล	736	มล.
- dH ₂ O	264	มล.

10. การเตรียม 0.6% agarose gel

- dH ₂ O	50	มล.
- Agarose	0.3	กรัม

ปรับ pH ให้ได้ 7.4 แล้วฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อต้องการใช้ให้อุ่นในไมโครเวฟจนเดือด ควนคูลอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส

11. สารละลาย Sorenson's buffer

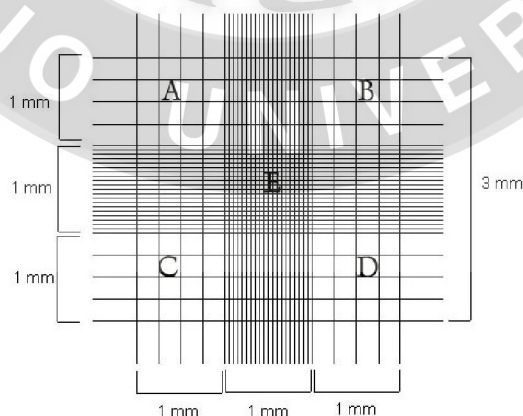
- Sodium citrate	5.88	กรัม
- เอทานอล	100	มล.
- dH ₂ O	100	มล.
- ปรับ pH ให้ได้ 4.2		

12. สารละลาย 1 N NaOH (100 มล.)

- Sodium hydroxide	4	กรัม
- dH ₂ O	100	มล.

การนับจำนวนเซลล์และสูตรคำนวณ

นำเซลล์ 20 มล. ผสมกับ 0.2% trypan blue ใน PBS 20 มล. ผสมกันในหลอด microcentrifuge จากนั้นใช้ micropipette ดูดส่วนผสมที่ได้ออกมาประมาณ 10 มล. เติมลงใน hemacytometer ต้องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ นับเซลล์ภายในช่อง A, B, C และ D



ภาพผนวก 1 ตารางนับเซลล์ในเครื่องนับจำนวนเซลล์

ที่มา: http://web.agri.cmu.ac.th/ppath/course/360301/lesson5_inoculation_prepare.htm

สูตรการหาจำนวนเซลล์ทั้งหมด (total cell count)

$$T = (N \times V) \times 10^4 / 4$$

T	=	Total cell count (เซลล์/มล.)
N	=	จำนวนเซลล์ทั้งหมดที่นับได้ในช่อง A, B, C, D
V	=	ปริมาตรรวมของเซลล์ที่หยอดเข้าไป

สูตรการหาร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ (% viability)

$$\% \text{ Viability} = 100X / X + Y$$

%	=	% การรอดชีวิตของเซลล์
X	=	ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (ไม่ติดสี trypan blue)
Y	=	ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่ตายแล้ว (ติดสี trypan blue)

สูตรคำนวณความเข้มข้นของไวรัสโดยวิธี Reed and Muench

TCID₅₀/มล. เป็นค่า 50% ของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสโดยการสังเกตการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเซลล์ (CPE) เมื่อป้อนเซลล์ร่วมกับไวรัส การคำนวณหาค่า TCID₅₀/มล. ซึ่งอยู่ระหว่างค่า 2 ค่า ทำได้โดยการหาค่า Proportionate distance (PD) โดยกำหนดให้

$$PD = (A - 50) / (A - B)$$

A	=	% สะสม ค่าแรกที่สูงกว่า 50%
B	=	% สะสมค่าแรกที่น้อยกว่า 50%

เมื่อได้ค่า PD แล้วนำมาคำนวณต่อตามสูตร Log of 50% end point

$$\text{Log 50\% end point} = (\log C) - (PD \times \log D)$$

C	=	ความเจือจางของไวรัสที่ให้ค่า A
D	=	Dilution factor

สูตรคำนวณหาไตเตอร์ของไวรัส

$$(\text{Plaques}) / (D \times V) = \text{PFU/มล.}$$

Plaques	=	จำนวนของ plaque ที่เกิดขึ้น
D	=	dilution factor
V	=	ปริมาตรของไวรัสที่เจือจางแล้วที่ใส่ลงในหลุม