ภาคผนวก

สมุนไพรไทยย่านพาโหมและขมิ้นชันต่อต้านเชื้อไข้หวัดนก H5N1

จากสถานการณ์ระบาดของโรคไข้หวัดนก H5N1 (Avian Influenza) ทำให้เกิดความเสียหายมากมายแก่เกษตรกรและอุตสาหกรรมเลี้ยงไก่ของประเทศไทย

กลุ่มนักวิจัย ม. เกษตรศาสตร์ นำโดย รศ.ดร. งามผ่อง คงคาทิพย์ หัวหน้าโครงการวิจัย และทีมวิจัยประกอบด้วย ผศ.ดร.ชนินทร์ ติรวัฒนวานิช ผศ.ดร.ศิริรักษ์ จันทครุ รศ.ดร. ทวีศักดิ์ ส่งเสริม นางยุพา มงคลสุข ดร.มะลิวัลย์ ธนะสมบัติ และ รศ.ดร. บุญส่ง คงคาทิพย์

ได้ทำการวิจัยทางด้านสมุนไพรไทย 2 ชนิดในการต่อต้านเชื้อไข้หวัดนก คือ ย่านพาโหม และขมิ้นชัน พบว่า สมุนไพรย่านพาโหม สามารถป้องกัน และยับยั้งเชื้อไข้หวัดนกได้ ในขณะที่ขมิ้นชันสามารถป้องกันเชื้อไข้หวัดนกได้ คณะวิจัยได้ทำการทดสอบสารสกัดสมุนไพรทั้ง 2 ชนิดนี้ด้วยการใช้ตัวทำละลายต่างๆ และพบตัวทำละลายที่ดีที่สกัดสารจากสมุนไพร ย่านพาโหม และขมิ้นชันและสามารถยับยั้งเชื้อไข้หวัดนกได้ หลังจากนั้นได้นำสารสกัดสมุนไพรที่ยับยั้งเชื้อไข้หวัดนกได้ มาทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ เพื่อที่จะหาสารออกฤทธิ์ จนขณะนี้ได้พบสารบริสุทธิ์ 1 ชนิด จากขมิ้นชันที่สามารถยับยั้งเชื้อไข้หวัดนกได้ และพบสารบริสุทธิ์ 2 ชนิด จากย่านพาโหมที่สามารถป้องกันเชื้อไข้หวัดนกได้ ซึ่งผลการวิจัยเป็นที่น่ายินดีว่า คณะวิจัยได้ค้นพบสารใหม่ทั้ง 3 ชนิด จากสมุนไพรไทยที่ยับยั้งเชื้อไข้หวัดนก ซึ่งขณะนี้คณะผู้วิจัยกำลังหาทุนสนับสนุนเพื่อจะศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารเหล่านี้ โดยการวิจัยในปีแรก ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) คณะผู้วิจัยมีความหวังเป็นอย่างยิ่งว่า ถ้าได้ทุนสนับสนุนในการศึกษากลไกการออกฤทธิ์แล้ว จะสามารถพัฒนาสมุนไพรทั้ง 2 ชนิดนี้ผสมในอาหารไก่ เป็นสูตรอาหารไก่ที่ป้องกันและยับยั้งเชื้อไข้หวัดนกได้

หน่วยงานที่ทำการวิจัยประกอบด้วย

1.หน่วยปฏิบัติการวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและเคมีอินทรีย์สังเคราะห์ (NPOS) ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม.เกษตรศาสตร์

2.ภาควิชาสรีรวิทยา ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ ม.เกษตรศาสตร์

3.สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร(KAPI) ม.เกษตรศาสตร์

ถ้าผู้ใดสนใจติดต่อ รศ.ดร. งามผ่อง คงคาทิพย์ โทร.02-5625444 ต่อ 2139 ; 089-0898287987

กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์

1. ได้**จัดแสดงผลงานวิจัยในรูปแบบโปสเตอร์ในงานเกษตรแฟร์** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน ในปี 2551, 2552 และ 2553

2. จากผลงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยได้**ดำเนินการจดสิทธิบัตร 2 ฉบับ ดังนี้**

   ก. Ngampong Kongkathip, Sirirak Chantakru, Chanin Tirawattanawanich, Boonsong Kongkathip, Taveesak Songserm, Virus and target cell interaction inhibition, International Application no. PCT/SG2008/000456 (for PCT Patent) (2008)

   ข. งามผ่อง คงคาทิพย์, ศิริรักษ์ จันทครุ, ชนินทร์ ติรวัฒนวานิช, บุญส่ง คงคาทิพย์, ทวีศักดิ์ ส่งเสริม การยับยั้งการทำปฏิสัมพันธ์กันของไวรัสกับเซลล์เป้าหมาย Thailand Patent Application No. 0901005341 (2009)

3. คณะผู้วิจัย**ได้รับรางวัลประกาศเกียรติคุณผลงานประดิษฐ์คิดค้นจากสำนักงานคณะกรรมการสภาวิจัยแห่งชาติ (วช.) ปี 2553** เรื่อง ตำรับอาหารไก่สมุนไพรขมิ้นชันสำหรับป้องกันการติดเชื้อไวรัสในไก่

4. ได้นำผลงานวิจัยไปใช้เป็นตัวอย่างในการบรรยายหัวข้อ "การเขียนข้อเสนอโครงงานวิจัย" ณ สถานที่และช่วงเวลาดังนี้

4.1 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตศรีราชา	28 — 29 พฤษภาคม 2551
4.2 โรงเรียนพรหมานุสรณ์ จังหวัดเพชรบุรี	9 มีนาคม 2552
4.3 มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร	8 — 9 มีนาคม 2553
4.4 โรงแรมมารวยการ์เด้น	30 มีนาคา 2552 — 2 เมษายน 2552
4.5 KU HOME มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	1 — 2 เมษายน 2553
4.6 สำนักงานวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	25 — 26 พฤษภาคม 2553

รายละเอียดผลการดำเนินงานของโครงการตามแผนงานโดยสรุป

วัตถุประสงค์	กิจกรรมที่วางแผนไว้	กิจกรรมที่ดำเนินการ	ผลที่ได้รับ
1.จัดเตรียมสมุนไพรเพื่อสกัด	1. การเตรียมสารสกัดสมุนไพร	1.1.1ได้เก็บตัวอย่างสมุนไพรขมิ้นชันจากราชบุรีและกาญจนบุรีอบให้แห้งและบดละเอียด 1.1.2ได้เก็บตัวอย่างย่านพาโหมจากอำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม ผึ่งให้แห้งและบดให้ละเอียด	1.1.1ได้ตัวอย่างสมุนไพรขมิ้นชันและย่านพาโหมที่มีคุณภาพตามต้องการเพื่อการสกัด
2.เพื่อให้ได้สารสกัดจากการสกัดสมุนไพรด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ และวิเคราะห์สารสกัดที่ได้ด้วย TLC และส่งทดสอบการออกฤทธิ์	2.1สกัดสมุนไพรขมิ้นชันด้วยตัวทำละลายต่างๆและวิเคราะห์สารสกัดที่ได้จากสมุนไพรขมิ้นชันด้วย TLC และ/หรือ HPLC	2.1.1ได้ทำการสกัดสมุนไพรขมิ้นชันด้วยตัวทำละลายต่างๆ โดยวิธี Soxhlet extraction ดังนี้ -เฮกเซน -เอทิลอะซีเตท -เอทานอล -เอทานอล โดยวิธี Maceration -น้ำ -70%เอทานอล/น้ำ -น้ำ/โซเดียมคาร์บอเนต -ไอโซโพรพานอล 2.1.1.2 ทำการสกัดขมิ้นชันสดด้วยวิธี Steam distillation 2.1.2 ทำการแยกสาร Curcuminoids จากขมิ้นชันโดยนำขมิ้นชันมาทำการสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนและนำกากมาทำการ	2.1.1ได้สารสกัดของสมุนไพรขมิ้นชันด้วยตัวทำละลายต่างๆ และเพียงพอต่อการทดสอบดังนี้ -สารสกัดด้วยเฮกเซน **(NKSS-1)** -สารสกัดด้วยเอทิลอะซีเตท **(NKSS-2)** -สารสกัดด้วยน้ำ/โซเดียมคาร์บอเนต **(NKSS-3)** -สารสกัดด้วยน้ำ **(NKSS-4)** -สารสกัดด้วย70%เอทานอล/น้ำ **(NKSS-5)** -สารสกัดด้วยเอทานอล **(NKSS-6)** -สารสกัดด้วยเอทานอล โดยวิธี Maceration **(NKSS-7)** -สารสกัดด้วยไอโซโพรพานอล **(NKNL-3)** 2.1.1.2 ได้น้ำมันหอมระเหยของขมิ้นชัน **(NKSS-19)** 2.1.2 ได้สาร Curcuminoids **(NKSS-17)** ผลึกสีส้ม 6.5 % ต่อน้ำหนักพืชแห้ง

		สกัดต่อด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตท จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาทำการตกผลึกจนได้ Curcuminoids	
		2.1.3วิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดขมิ้นชันและ Curcuminoids โดยใช้ Mobile phase system ที่เหมาะสมในการแยกสารองค์ประกอบ ทำให้เราทราบองค์ประกอบคร่าวๆในสารสกัด	2.1.3ได้ TLC โครมาโตแกรม ของสารสกัดขมิ้นชันด้วยตัว ทำละลายชนิดต่างๆ และของ Curcuminoids
		2.1.4 วิเคราะห์ปริมาณกลุ่ม Curcuminoids ในสารสกัดขมิ้นชันด้วย HPLC โดยวิธี External standard โดยใช้ Mobile phase system ที่เหมาะสม	2.1.4 ได้ทราบปริมาณสาร Curcuminoids ในสารสกัดชนิดต่างๆเป็น เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักขมิ้นชัน แห้ง ดังนี้ -สารสกัดด้วยเอทานอล **(NKSS-6)** มีปริมาณ 14.84% -สารสกัดด้วย 70%เอทานอล/น้ำ **(NKSS-5)** มีปริมาณ 6.25% -สารสกัดด้วยไอโซโพรพานอล **(NKNL-3)** มีปริมาณ 6.08% -สารสกัดด้วยน้ำ **(NKSS-4)** มีปริมาณ 1.90% -สารสกัดด้วยน้ำ/โซเดียมคาร์บอเนต **(NKSS-3)** มีปริมาณ 0.59%
	2.2สกัดสมุนไพรย่านพาโหมด้วยตัวทำละลายต่างๆ และวิเคราะห์สารสกัดที่ได้จากสมุนไพรย่านพาโหมด้วย TLC	2.2.1ทำการสกัดต้นและใบย่านพาโหมด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆดังนี้ - น้ำ - เอทานอล - ไอโซโพรพานอล	2.2.1 ได้สารสกัดของสมุนไพรย่านพาโหมด้วยตัวทำละลายต่างๆ และเพียงพอในการทดสอบดังนี้ - สารสกัดด้วยน้ำ - สารสกัดด้วยเอทานอล **(NKPTE)**

		- เฮกเซนตามด้วย ไดคลอโรมีเทน และ เอทานอล หลังจากระเหยเอาตัวทำละลายออกได้สารสกัดชนิดต่างๆ เพื่อการทดสอบการต้านเชื้อไข้หวัดนก 2.2.2 วิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดย่านพาโหม TLC โดยใช้ Mobile phase system ต่างๆที่เหมาะสม ที่สามารถแยกองค์ประกอบได้ดี ทำให้ทราบองค์ประกอบคร่าวๆในการสกัด 2.2.3 ส่งสารสกัดชนิดต่างๆทดสอบการออกฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสไข้หวัดนก	- สารสกัดด้วยไอโซโพรพานอล **(NKAS-1)** - สารสกัดด้วยเฮกเซน - สารสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน - สารสกัดด้วยเอทานอล (หลังจากสกัดด้วยเฮกเซนและไดคลอโรมีเทน) 2.2.2 ได้ TLC โครมาโตแกรมของสารสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ 2.2.3 ได้ส่งสารสกัดของย่านพาโหมเพื่อทดสอบการออกฤทธิ์ต้านเชื้อไข้หวัดนก
3. การแยกสารสกัดออกเป็นส่วนสกัดและสารบริสุทธิ์ พร้อมทั้งทดสอบการออกฤทธิ์	3.1 ทำการแยกสารสกัดขมิ้นชันด้วยเอทานอล โดย Vacuum Liquid Chromatography (VLC) ออกเป็นส่วนๆเพื่อที่จะทดสอบการออกฤทธิ์ต้านเชื้อไข้หวัดนก	3.1 นำสารสกัดขมิ้นชันด้วย เอทานอลซึ่งออกฤทธิ์ต้านเชื้อไข้หวัดนก มาทำการแยกออกเป็นส่วนๆ โดย Vacuum Liquid Chromatography (VLC) โดยใช้ซิลิกาเจล หมายเลข 7736 โดย eluents ที่ใช้มีดังนี้ เฮกเซน, ไดคลอโรมีเทน:เฮกเซน, เอทิลอะซีเตท/ไดคลอโรมีเทน และ เอทานอล ได้ 119 ส่วน นำส่วนที่มี TLC โครมาโตแกรม คล้ายกันรวมกันได้ส่วนสกัดทั้งหมด 5 ส่วน ซึ่งพบว่า 3 ส่วนเป็นสารบริสุทธิ์ ทำการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยวิธีทางสเปกโตรสโกปี (IR, ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, MS)	3.1 ได้ส่วนสกัดทั้งหมด 5 ส่วน ดังนี้ -น้ำมันขมิ้นชัน **(NKSS-1)** -Curcumin **(NKSS-18)** -Demethoxycurcumin (สารบริสุทธิ์) -bisdemethoxycurcumin (สารบริสุทธิ์) -ส่วนของ High Polar partially purified fraction **(HPCE)** ซึ่งทั้ง 5 ส่วนนี้ส่งเพื่อทดสอบ การออกฤทธิ์ต้านเชื้อไข้หวัดนก

	3.2 ทำการแยกน้ำมันขมิ้นชันให้ได้สารบริสุทธิ์	3.2.1 จากการทดสอบพบว่าน้ำมันขมิ้นชันออกฤทธิ์ป้องกันเชื้อ ไข้หวัดนก จึงทำการแยกโดย Column chromatography (CC) โดยใช้ซิลิกาเจล หมายเลข 7734 เป็น supporting material โดย eluents ที่ใช้มีดังนี้ เฮกเซน, อะซีโตน/เฮกเซน, เอทานอล, ได้ส่วนทั้งหมด 492 ส่วน และรวมส่วนที่ได้ที่มี TLC โครมาโตแกรมคล้ายกันได้ส่วนสกัดทั้งหมด 10 ส่วน (T_1-T_{10})	3.2.1 ได้ส่วนสกัดทั้งหมด 10 ส่วน (T_1-T_{10})
		3.2.2 นำส่วนสกัด T_4 มาทำการวิเคราะห์ด้วย GC-MS พบว่ามีความบริสุทธิ์ 90% จึงนำไปทดสอบการออกฤทธิ์พบว่าสามารถยับยั้งการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงได้ หลังจากนั้นจึงนำ T_4 มาทำการแยกให้บริสุทธิ์โดยวิธีการ Medium Pressure Liquid Chromatography (MPLC) โดย eluents คือ เฮกเซน ได้สารทั้งหมด 90 ส่วน และรวมส่วนที่ได้ที่ TLC โครมาโตแกรมคล้ายกันได้ส่วนสกัดทั้งหมด 2 ส่วน คือ $T_{4/1}$ และ $T_{4/2}$ **(NKSS-20)** เป็นสารบริสุทธิ์ที่ออกฤทธิ์ฯและทำการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยวิธีทางสเปกโตรสโกปี ส่วนสารกึ่งบริสุทธิ์วิเคราะห์ด้วย GC-MS	3.2.2 **NKSS-20** เป็นสารบริสุทธิ์จากข้อมูลทางสเปกโตรสโกปีทำให้ทราบโครงสร้างของ NKSS-20 ส่วน $T_{4/1}$ เป็นสารผสมที่มีสาร NKSS-20 ในปริมาณ 76% (โดย GC-MS)จากการทดสอบการออกฤทธิ์พบว่า NKSS-20 ออกฤทธิ์ต้านเชื้อไข้หวัดนก
	3.3 ทำการแยกสารสกัดย่านพาโหมส่วนต้นและใบด้วยตัวทำละลายเอทานอลที่ได้ โดย	3.3.1 เนื่องจากพบว่าสารสกัดย่านพาโหมด้วยเอทานอลออกฤทธิ์ต้านเชื้อไข้หวัดนก ดังนั้นจึงนำสาร	3.3 ได้ส่วนสกัดทั้งหมด 9 ส่วน คือ NKPTE 1- NKPTE 9 พบว่า NKPTE 1 และ 2 เป็นสารบริสุทธิ์

	Vacuum Liquid Chromatography (VLC) ออกเป็นส่วนๆ เพื่อที่จะทดสอบการออกฤทธิ์ต้านเชื้อไข้หวัดนก	สกัดนี้มาทำการแยกออก เป็นส่วนๆ โดย Vacuum Liquid Chromatography (VLC) โดยใช้ซิลิกาเจลหมายเลข 7736 เป็น supporting material โดย eluents ที่ใช้มีดังนี้ เฮกเซน, เอทิลอะซีเตท/เฮกเซน, เอทานอล นำแต่ละส่วนมา spot ลงบน TLC เพื่อจะทำการรวมส่วนที่มี pattern คล้ายคลึงกันมารวมกันจนเหลือ 9 ส่วน คือ NKPTE 1- NKPTE 9 พบว่า NKPTE 1 เป็นสารบริสุทธิ์จึงทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีทางสเปกโทรสโกปี ได้ทำการวิเคราะห์ NKPTE 2 ด้วย GC-MS พบว่าเป็นสารบริสุทธิ์ จึงทำการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยวิธี ทางสเปกโตรสโกปี	จึงทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีทางสเปกโตรสโกปีเพื่อวิเคราะห์โครงสร้างสาร NKPTE 1 และ 2 จากการทดสอบพบว่าสารบริสุทธิ์ทั้งสองออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไข้หวัดนก
4. เตรียมเชื้อไวรัส Avian Influenza H5N1	4.1 เตรียมเชื้อไวรัส Avian Influenza H5N1 โดยการเพิ่มจำนวนไข่ฟัก	4.1 นำเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้จากไก่ (A/Chicken/Thailand/KU-06/2004) ที่มารับการชันสูตรโรคไข้หวัดนกจากจังหวัดสุพรรณบุรี โดยวิธีมาตรฐานหลักของ OIE นำตัวอย่างเชื้อที่แยกได้มาเพิ่มจำนวนโดยการฉีดเข้า Allantoic sac ของไข่ไก่	4.1 ได้ปริมาณเชื้อไวรัส H5N1 ตามต้องการ
	4.2 ทดสอบสเตรนของเชื้อไวรัส Avian Influenza H5N1 โดยวิธี PCR ไตเตรทหาปริมาณไวรัสในรูป EID_{50}	4.2.1 ทดสอบ Hemagglutination (HA) และ Hemagglutination inhibition (HA-HI) test เพื่อยืนยันการแยกชนิดย่อย H5 ของเชื้อไข้หวัดนก ตามหลักการของ OIE,2000	4.2 ยืนยันสเตรนของเชื้อไวรัสที่นำมาใช้ทดสอบ ทราบค่า EID_{50} ของไวรัสที่นำมาใช้