ส่วนที่ 3

1.) การเตรียมเชื้อไวรัส H5N1 และหาปริมาณ

2.) การทดสอบการออกฤทธิ์ของสารสกัด, ส่วนสกัด และสาร บริสุทธิ์โดยวิธี Plaque Reduction Test

3.) การทดสอบการออกฤทธิ์ของสารสกัด, ส่วนสกัด และ สาร บริสุทธิ์โดยวิธี *In vitro* Hemagglutination – Inhibition Assay.

4.) การทดสอบส่วนสกัดย่านพาโหมที่มีต่อการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสในเซลล์เป้าหมาย

1. การเตรียมเชื้อไวรัส Avian Influenza H5N1 และหาปริมาณไวรัสในรูป EID_{50}

การเตรียมเชื้อไวรัสจากสัตว์ปีกที่ป่วยด้วยโรคไข้หวัดนก HPAI H5N1

นำเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้จากไก่ (A/chicken/Thailand/KU-06/2004) ที่มารับการชันสูตรโรคไข้หวัดนก จากจังหวัดสุพรรณบุรี โดยวิธีมาตรฐานหลักของ OIE ณ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ตัวอย่างเชื้อไข้หวัดนกที่แยกได้นำมาเพิ่มจำนวนโดยการฉีดไวรัสเข้า Allantoic sac ของไข่ไก่ฟักอายุ 9-12 วันของการฟัก ใช้ไข่ฟักที่ไม่มีภูมิคุ้มกันต่อโรคไข้หวัดนกมาก่อน โดยการฉีดของเหลวที่กรองได้จำนวน 0.2 ml ต่อไข่ฟัก 1 ฟอง จำนวนทั้งสิ้น 20 ฟอง นำไข่ฟักที่ฉีดเข้าตู้ฟัก และตรวจดูการตายของตัวอ่อนทุกๆ 24 ชั่วโมง ดูดเอาแต่ Allantoic fluid จากไข่ฟักที่ตัวอ่อนตาย นำไปทดสอบ Hemagglutination (HA) test และ hemagglutination- inhibition (HA-HI) test เพื่อยืนยันการแยกชนิดย่อย H5 ของเชื้อไข้หวัดนก ตามหลักการของ OIE, 2000

ยืนยันการแยกชนิดของไข้หวัดนกชนิดย่อย N 1ด้วยวิธี Reverse transcriptase –polymerase chain reaction (RT-PCR) โดยใช้หลักการของ Poddar, 2002.

เก็บ Allantoic fluid ที่ได้มารวมกันเพื่อทำการไตเตรทหาความเข้มข้นของไวรัสตามวิธีของ Reed and Muench, 1996

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส H5N1 ในห้องปฏิบัติการโดยวิธี Plaque Reduction Test

เปรียบเทียบปริมาณการเกิด Plaque ระหว่างกลุ่มทดสอบสารสกัดสมุนไพรและกลุ่มควบคุม โดยสมุนไพรที่ออกฤทธิ์ต้านไวรัสจะลดปริมาณ plaque ที่เกิดขึ้น

ขั้นตอนการศึกษามีดังนี้

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์ MDCK ที่นำเข้าจาก American Tissue Culture Collection (ATCC) และเพิ่มจำนวนเซลล์ในปริมาณมากเพื่อทำการเก็บรักษาใน liquid nitrogen เพื่อการทดสอบต่อไป
2. ทดลองเลี้ยงไวรัส H5N1 ในเซลล์ MDCK ที่เลี้ยงขึ้นในห้องปฏิบัติการ โดยใช้เชื้อที่ได้จากไก่ป่วยด้วยโรคไข้หวัดนกในประเทศไทย ที่ผ่านการแยกเชื้อบริสุทธิ์ในไข่ไก่ฟัก
3. ทดสอบการเกิด plaque และหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบการเกิด plaque เปรียบเทียบหาปริมาณความเข้มข้นของไวรัส และช่วงระยะเวลาการบ่มเชื้อไวรัสกับเซลล์ ที่เหมาะสม
4. ทดสอบสารสกัดจากพืชสมุนไพร เพื่อหาฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส H5N1 ในห้องปฏิบัติการ

2.1 วิธีการทดสอบ Plaque Assay

1. เลี้ยงเซลล์ MDCK (ATCC CL-2) ใน 6-well plates ใช้ Dulbecco Modified Eagle Medium ที่มี 10% Fetal Calf Serum (FCS) และ 10,000 IU Penicillin และ Streptomycin ที่อุณหภูมิ 37 °C และมี 5% CO_2
2. เมื่อเซลล์เจริญเต็มพื้นที่ (confluence) แล้ว เติมไวรัส H5N1 ที่ได้จากการแยกบริสุทธิ์ในไข่ไก่ฟัก ที่ความเข้มข้น 1×10^{2} $TCID_{50}$ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ทดสอบแล้วในเบื้องต้นว่าทำให้เกิด plaque ในปริมาณที่เหมาะสม โดยบ่มเชื้อกับเซลล์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาพแวดล้อมและใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ดังในข้อ 1 ต่อไปอีก 72 ชั่วโมง
3. ย้อมเซลล์ด้วย crystal violet และตรวจสอบปริมาณ plaque ที่เกิดขึ้น ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (inverted microscope)

2.2 วิธีทดสอบสารสกัดจากขมิ้นชันต่อฤทธิ์การทำลายเซลล์เป้าหมายของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก

<u>วิธีทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดที่มีต่อการเกิด Plaque</u>

1. เลี้ยงเซลล์ MDCK ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 6 หลุมจนได้เซลล์เต็มพื้นที่ (confluency)
2. เตรียมสารละลายจากการสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่างๆ
3. เติมสารละลายจากสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่างๆ ความเข้มข้นละ 3 หลุม ปริมาตร 1ml. ลงบนเซลล์ทุกหลุมทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
4. ดูดสารสกัดออกและล้างด้วย 100 mM PBS 2 ครั้ง เติม ไวรัสที่ผสมใน trypsin ที่ความเข้มข้น 3 µg/ml ใน DMEM ปริมาตร 1 ml. ลงบนเซลล์ทุกหลุมทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที
5. ดูดเชื้อไวรัสออกเติม 5% agarose ใน DMEM ปริมาตร 3 ml. ทิ้งไว้จนจับตัวเป็นก้อนแข็ง เพาะบ่มที่อุณหภูมิห้อง 37 °C 5% CO_2 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง
6. เก็บ agarose ออกจากผิวเซลล์ fix ด้วย 10% neutral buffer formalin และย้อมด้วย 0.5% crystal violet
7. ตรวจดูจากการเกิด plague

<u>วิธีการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดที่มีต่อการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสในเซลล์เป้าหมาย</u>

1. เลี้ยงเซลล์ MDCK ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 6 หลุมจนได้เซลล์เต็มพื้นที่
2. เตรียมสารละลายจากการสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่างๆ
3. เติมสารละลายจากการสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่างๆ ความเข้มข้นละ 3 หลุม ปริมาตร 1 ml. ลงบนเซลล์ทุกหลุม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
4. ดูดสารสกัดออกและล้างเซลล์ด้วย 100 mM PBS 2 ครั้ง เติมไวรัสที่ผสมใน trypsin ในที่ความเข้มข้น 3 µg/ml DMEM ปริมาตร 1 ml. ลงบนเซลล์ทุกหลุม เพาะบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที
5. ดูดเชื้อไวรัสออก เติม DMEM ที่มี 2% fetal calf serum ปริมาตร 2 ml. เพาะบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C 5% CO_2 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง
6. ทดสอบหาไตเตอร์ของไวรัสในอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยนำอาหารเลี้ยงเซลล์จางทีละเท่าตัว (2-fold dilution) จากนั้นนำมาตกตะกอนกับเม็ดเลือดแดงไก่ที่ความเข้มข้น 0.5% 50 µl

7. ตรวจดูผลการตกตะกอนเม็ดเลือดแดง

3. วิธีการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงไก่ด้วยเชื้อไวรัสไข้หวัดนก (*In vitro* Hemagglutination – Inhibition Assay)

<u>วิธีการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรที่มีต่อการตกตะกอนของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก</u>

1. นำสารสกัดสมุนไพรมาละลายใน Dimethyl Sulfoxide (DMSO) จากนั้นเตรียมสารละลายจากสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้ 1%DMSO ใน 100 mM PBS เติมลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม ปริมาตรหลุมละ 25 µl ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ
2. เติมเชื้อไวรัสไข้หวัดนก 25 µl เพาะบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที หลุมที่เป็นหลุมควบคุมที่ให้ผลบวก (positive control) ประกอบด้วย สารละลาย 1% DMSO ใน PBS และไม่มีเชื้อไวรัส
3. เติมเม็ดเลือดแดงไก่ที่ความเข้มข้น 0.5% หลุมละ50 µl ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
4. ตรวจดูผลการตกตะกอนเม็ดเลือดแดง

4. วิธีการทดสอบฤทธิ์ของสารสมุนไพรที่มีต่อการปกป้องเม็ดเลือดแดงจากเชื้อไวรัสไข้หวัดนก (*In vitro* Hemagglutination – Inhibition Assay)

<u>การทดสอบฤทธิ์ต้านไวรัสของสารสกัดสมุนไพร</u>

1. เตรียมสารสกัดสมุนไพร เริ่มจากความเข้มข้น 1% โดยการละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี FCS และยาปฏิชีวนะดังชี้แจงข้างต้น จากนั้นกรองผ่าน 0.2 micron และเตรียม 2-fold dilutions
2. แบ่งทดสอบฤทธิ์สารสกัดสมุนไพรออกเป็น 3 กลุ่ม คือ
    ก. บ่มเชื้อไวรัส H5N1 กับสารสกัดสมุนไพรเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนที่จะเติมส่วนผสมทั้งสองลงในเซลล์
    ข. บ่มเชื้อไวรัส H5N1 กับเซลล์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารสกัดสมุนไพรลงบนเซลล์
    ค. บ่มสารสกัดสมุนไพรกับเซลล์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมไวรัส H5N1 ลงบนเซลล์
3. ในแต่การทดสอบจะมีกลุ่มควบคุม 3 กลุ่ม คือ
    ก. บ่มเซลล์กับไวรัส H5N1 โดยไม่มีสารสกัดสมุนไพร
    ข. บ่มเซลล์กับสารสกัดสมุนไพร โดยไม่มีไวรัส H5N1
    ค. บ่มเลี้ยงเซลล์โดยไม่มีการเติมสารสกัดสมุนไพรและเชื้อไวรัส H5N1
4. ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรและแต่ละกลุ่มทดสอบ

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ผลการทดลอง

1. **ผลการเตรียมเชื้อไวรัส Avian Influenza H5N1 และหาปริมาณไวรัสในรูป EID_{50}** ให้ผลดังนี้

   ได้ปริมาณเชื้อไวรัส H5N1ที่แยกได้จากไก่ที่ตายด้วยไข้หวัดนกจากจังหวัดสุพรรณบุรีซึ่งมีความเข้มข้น10^8 EID_{50}/ml เพียงพอต่อการทดสอบฯ

2. **ผลการทดสอบสารสกัดจากขมิ้นชันต่อฤทธิ์การทำลายเซลล์เป้าหมายของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก**

   การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากขมิ้นชันดังนี้ **NKSS-1, NKSS-6** และ **NKNL-3** ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน พบว่าสารสกัดจากขมิ้นชันทั้งสามชนิดทุกความเข้มข้นไม่สามารถยับยั้งการทำลายเซลล์เป้าหมาย**(ตารางที่ 13)** พบ plaque เกิดขึ้นใน MDCK cell เมื่อเติมสารสกัดจากขมิ้นชัน **NKSS-1** ก่อนการเติมเชื้อไวรัส มีลักษณะใกล้เคียงกันกับหลุมควบคุมที่ไม่เติมสารสกัดสมุนไพร เมื่อเติมเชื้อไวรัสไข้หวัดนก **(ภาพที่ 8-12)** เซลล์ที่ได้รับสารสกัดสมุนไพร **NKSS-6** ก่อนติดเชื้อไวรัสไข้หวัดนกเกิด viral plaque เช่นเดียวกันกับเซลล์ MDCK ที่ได้รับสารสกัด **NKSS-1 (ภาพที่ 13-15)** การใช้สารสกัดจากขมิ้นชัน **NKNL-3** เพื่อป้องกันการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดนก พบว่าเซลล์MDCK ถูกทำลายที่ทุกความเข้มข้น แม้ว่าจะมีลักษณะการทำลายที่รุนแรงลดลงในเซลล์ที่ได้รับสารสกัด **NKNL-3** ที่ความเข้มข้น 20 และ 200 ng/ml **(ภาพที่ 16-19)**

ตารางที่ 13: ผลการทดสอบสารสกัดจากขมิ้นชันต่อการเกิด viral plaque

สารสกัด	ความเข้มข้น	ผลการเกิด plaque	
NKSS-1	50 µg/ml	(2/3)	
(สารสกัดด้วยเฮกเซน	5.0 µg/ml	(3/3)	
หรือ น้ำมันขมิ้นชัน)	500 ng/ml	(3/3)	
	50 ng/ml	(1/3)	
	5.0 ng/ml	(2/3)	
	0.50 ng/ml	(3/3)	
		Rep1	Rep2
NKSS-6	14 µg/ml	(2/3)	
(สารสกัดด้วยเอทานอล)	1.4 µg/ml	(3/3)	
	140 ng/ml	(2/3)	(3/3)
	14 ng/ml	(2/3)	(3/3)

	1.4 ng/ml 0.14 ng/ml			(3/3) (3/3)
		Rep 1	Rep 2	Rep 3
NKNL-3 (สารสกัดด้วยไอโซโพรพานอล)	20 µg/ml 2.0 µg/ml 200 ng/ml 20 ng/ml 2.0 ng/ml	(3/3) (2/3) (3/3)	(3/3) (2/3) (1/3)	 (3/3) (2/3) (3/3) (3/3)

3. ผลการทดสอบสารสกัดจากขมิ้นชันและย่านพาโหมต่อการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงไก่ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก

3.1 ผลการทดสอบสารสกัดจากขมิ้นชันต่อการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงไก่ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก

3.1.1 ผลการทดสอบสารสกัดจากขมิ้นชันต่อการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงไก่ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก จากการผสมสารสกัดกับเชื้อไวรัส 30 นาทีก่อนนำมาตกตะกอนเม็ดเลือดแดงไก่

ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากขมิ้นชัน พบว่า เมื่อเติมสารสกัดจากสมุนไพรขมิ้นชันลงในเชื้อไวรัส สารสกัดจากขมิ้นชันทั้งหมดไม่สามารถยับยั้งการตกตะกอนเม็ดเลือดแดง **(ตารางที่ 14)**

ตารางที่ 14 ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อไวรัสในการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงไก่โดยใช้สารสกัดจากขมิ้นชัน

สารสกัด	ความเข้มข้น	ผลการตกตะกอนเป็นบวก*
ขมิ้นชัน **NKSS-1** (สารสกัดด้วยเฮกเซน หรือ น้ำมันขมิ้นชัน)	2.5 mg/ml 250 µg/ml 25 µg/ml 2.5 µg/ml 250 ng/ml 25 ng/ml 2.5 ng/ml 0.25 ng/ml	(3/3) (3/3) (3/3) (3/3) (3/3) (3/3) (3/3) (3/3)

ขมิ้นชัน **NKSS-2** (สารสกัดด้วยเอทิลอะซีเตท)	2.5 mg/ml	(3/3)
	250 µg/ml	(3/3)
	25 µg/ml	(3/3)
	2.5 µg/ml	(3/3)
	250 ng/ml	(3/3)
	25 ng/ml	(3/3)
	2.5 ng/ml	(3/3)
	0.25 ng/ml	(3/3)
ขมิ้นชัน **NKSS-5** (สารสกัดด้วย 70%เอทานอล/น้ำ)	2.5 mg/ml	(3/3)
	250 µg/ml	(3/3)
	25 µg/ml	(3/3)
	2.5 µg/ml	(3/3)
	250 ng/ml	(3/3)
	25 ng/ml	(3/3)
	2.5 ng/ml	(3/3)
	0.25 ng/ml	(3/3)
ขมิ้นชัน **NKSS-6** (สารสกัดด้วยเอทานอล โดยวิธี Soxhlet extraction)	2.5 mg/ml	(3/3)
	250 µg/ml	(3/3)
	25 µg/ml	(3/3)
	2.5 µg/ml	(3/3)
	250 ng/ml	(3/3)
	25 ng/ml	(3/3)
	2.5 ng/ml	(3/3)
	0.25 ng/ml	(3/3)
NKSS-7 (สารสกัดด้วยเอทานอล โดยวิธี Maceration)	2.5 mg/ml	(3/3)
	250 µg/ml	(3/3)
	25 µg/ml	(3/3)

	2.5 µg/ml	(3/3)
	250 ng/ml	(3/3)
	25 ng/ml	(3/3)
	2.5 ng/ml	(3/3)
	0.25 ng/ml	(3/3)
NKNL-3 (สารสกัดด้วยไอโซโพรพานอล)	2.5 mg/ml	(3/3)
	250 µg/ml	(3/3)
	25 µg/ml	(3/3)
	2.5 µg/ml	(3/3)
	250 ng/ml	(3/3)
	25 ng/ml	(3/3)
	2.5 ng/ml	(3/3)
	0.25 ng/ml	(3/3)
NKSS-17 (Curcuminoids)	2.5 mg/ml	(3/3)
	250 µg/ml	(3/3)
	25 µg/ml	(3/3)
	2.5 µg/ml	(3/3)
	250 ng/ml	(3/3)
	25 ng/ml	(3/3)
	2.5 ng/ml	(3/3)
	0.25 ng/ml	(3/3)
NKSS-18 (Curcumin)	2.5 mg/ml	(3/3)
	250 µg/ml	(3/3)
	25 µg/ml	(3/3)
	2.5 µg/ml	(3/3)
	250 ng/ml	(3/3)
	25 ng/ml	(3/3)

	2.5 ng/ml	(3/3)
	0.25 ng/ml	(3/3)
NKSS – 19 (น้ำมันหอมระเหยจากขมิ้นชัน)	2.5 mg/ml	(3/3)
	250 µg/ml	(3/3)
	25 µg/ml	(3/3)
	2.5 µg/ml	(3/3)
	250 ng/ml	(3/3)
	25 ng/ml	(3/3)
	2.5 ng/ml	(3/3)
	0.25 ng/ml	(3/3)

***หมายเหตุ** ผลการทดสอบแสดงจำนวนหลุมที่พบว่าไวรัสสามารถตกตะกอนเม็ดเลือดแดงไก่ได้ ต่อจำนวนหลุมที่ทดสอบ

3.1.2 ผลการทดสอบสารสกัดจากขมิ้นชันต่อการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงไก่ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกจากการผสมสารสกัดกับเม็ดเลือดแดงไก่ 30 นาที ก่อนเติมเชื้อไวรัสไข้หวัดนก (ตารางที่ 15)

เมื่อเติมสารสกัดลงในเซลล์เม็ดเลือดแดงก่อนเติมไวรัส พบว่า **สารสกัดจากขมิ้นชัน NKSS-1 ทุกความเข้มข้น (0.1 ng/ml ถึง 1 mg/ml) ป้องกันการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงได้ NKSS-2 ป้องกันการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงที่ความเข้มข้น 2.5 µg/ml NKSS-5 ป้องกันการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงที่ความเข้มข้น 25 ng/ml NKSS-7 ป้องกันการตกตะกอนของเซลล์เม็ดเลือดแดงอย่างสมบูรณ์ ที่ความเข้มข้น 2.5 µg/ml, 25 µg/ml และ 250 µg/ml และป้องกันได้บางส่วนที่ความเข้มข้น 25 ng/ml และ 250 ng/ml ส่วนสาร Curcuminoids (NKSS-17) และ สารบริสุทธิ์ Curcumin (NKSS-18) ไม่ออกฤทธิ์ฯ**

ตารางที่ 15: ผลการทดสอบการใช้สารสกัดจากขมิ้นชัน เพื่อปกป้องเม็ดเลือดแดงจากการตกตะกอนโดยเชื้อไวรัสไข้หวัดนก

สารสกัด	ความเข้มข้น	ผลการตกตะกอนเป็นบวก*	
		Rep1	Rep2
NKSS – 1 (สารสกัดด้วยเฮกเซน หรือ น้ำมันขมิ้นชัน)	1 mg/ml	(0/3)	(0/3)
	100 µg/ml	(0/3)	(0/3)
	10 µg/ml	(0/3)	(0/3)

	1 µg/ml	(0/3)	(0/3)
	100 ng/ml	(0/3)	(0/3)
	10 ng/ml	(0/3)	(0/3)
	1 ng/ml	(0/3)	(0/3)
	0.1 ng/ml	(0/3)	(0/3)
NKSS - 2 (สารสกัดด้วยเอทิลอะซีเตท)	2.5 mg/ml	(3/3)	
	250 µg/ml	(3/3)	
	25 µg/ml	(3/3)	
	2.5 µg/ml	(0/3)	
	250 ng/ml	(3/3)	
	25 ng/ml	(3/3)	
	2.5 ng/ml	(3/3)	
	0.25 ng/ml	(3/3)	
NKSS - 5 (สารสกัดด้วย 70%เอทานอล/น้ำ)	2.5 mg/ml	(3/3)	
	250 µg/ml	(3/3)	
	25 µg/ml	(3/3)	
	2.5 µg/ml	(3/3)	
	250 ng/ml	(3/3)	
	25 ng/ml	(0/3)	
	2.5 ng/ml	(3/3)	
	0.25 ng/ml	(3/3)	
NKSS - 7 (สารสกัดด้วยเอทานอล โดยวิธี Maceration)	2.5 mg/ml	(3/3)	
	250 µg/ml	(0/3)	
	25 µg/ml	(0/3)	
	2.5 µg/ml	(0/3)	
	250 ng/ml	(1/3)	
	25 ng/ml	(1/3)	

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

	2.5 ng/ml	(3/3)
	0.25 ng/ml	(3/3)
NKSS – 17	2.5 mg/ml	(3/3)
(Curcuminoids)	250 µg/ml	(3/3)
	25 µg/ml	(3/3)
	2.5 µg/ml	(3/3)
	250 ng/ml	(3/3)
	25 ng/ml	(3/3)
	2.5 ng/ml	(3/3)
	0.25 ng/ml	(3/3)
NKSS – 18	2.5 mg/ml	(3/3)
(curcumin)	250 µg/ml	(3/3)
	25 µg/ml	(3/3)
	2.5 µg/ml	(3/3)
	250 ng/ml	(3/3)
	25 ng/ml	(3/3)
	2.5 ng/ml	(3/3)
	0.25 ng/ml	(3/3)
NKSS – 19	2.5 mg/ml	(3/3)
(น้ำมันหอมระเหยจากขมิ้นชัน)	250 µg/ml	(3/3)
	25 µg/ml	(3/3)
	2.5 µg/ml	(3/3)
	250 ng/ml	(3/3)
	25 ng/ml	(3/3)
	2.5 ng/ml	(3/3)
	0.25 ng/ml	(3/3)

***หมายเหตุ** : ผลการทดสอบแสดงจำนวนหลุมที่พบว่าไวรัสสามารถตกตะกอนเม็ดเลือดแดงไก่ได้ ต่อจำนวนหลุมที่ทดสอบ

3.1.3 ผลการทดสอบสารบริสุทธิ์ Sesquiterpene NKSS – 20 และส่วนสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่มีขั้วสูง HPCE ที่แยกได้จากสารสกัดขมิ้นชันต่อการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงไก่ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก จากการผสมสารบริสุทธิ์หรือสารสกัดกับเชื้อไวรัส 30 นาที ก่อนนำมาตกตะกอนเม็ดเลือดแดงไก่

เมื่อเติมสารบริสุทธิ์ **NKSS – 20** และส่วนสกัดกึ่งบริสุทธิ์ **HPCE** ที่แยกได้จากสารสกัดขมิ้นชันลงในเชื้อไวรัสที่ความเข้มข้นต่างๆกัน พบว่า **NKSS – 20 สามารถยับยั้งการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงที่ความเข้มข้น 250 ng/mL – 0.25 ng/mL และ HPCE สามารถยับยั้งการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงที่ความเข้มข้น 25 μg/ml — 0.25 ng/mL (ตารางที่ 16)**

ตารางที่ 16: ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อไวรัสในการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงไก่โดยใช้สารบริสุทธิ์ NKSS – 20 และ สารกึ่งบริสุทธิ์ HPCE

สารสกัด	ความเข้มข้น	ผลการตกตะกอนเป็นบวก*
High polar crude extract **(HPCE)**	2.5 mg/ml	(3/3)
	250 μg/ml	(3/3)
	25 μg/ml	(0/3)
	2.5 μg/ml	(0/3)
	250 ng/ml	(0/3)
	25 ng/ml	(0/3)
	2.5 ng/ml	(0/3)
	0.25 ng/ml	(0/3)
NKSS-20 (สารบริสุทธิ์ Sesquiterpene)	2.5 mg/ml	(3/3)
	250 μg/ml	(3/3)
	25 μg/ml	(1/3)
	2.5 μg/ml	(1/3)
	250 ng/ml	(0/3)
	25 ng/ml	(0/3)
	2.5 ng/ml	(0/3)
	0.25 ng/ml	(0/3)

***หมายเหตุ** : ผลการทดสอบแสดงจำนวนหลุมที่พบว่าไวรัสสามารถตกตะกอนเม็ดเลือดแดงไก่ได้ ต่อจำนวนหลุมที่ทดสอบ

3.1.4 ผลการทดสอบสารบริสุทธิ์ Sesquiterpene NKSS – 20 และส่วนสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่มีขั้วสูง HPCE ที่แยกได้จากสารสกัดขมิ้นชันต่อการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงไก่ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก จากการผสมสารบริสุทธิ์หรือสารสกัดกับเม็ดเลือดแดงไก่ 30 นาที ก่อนเติมเชื้อไวรัสไข้หวัดนก

สารบริสุทธิ์ NKSS – 20 และ ส่วนสกัดกึ่งบริสุทธิ์ HPCE ไม่สามารถปกป้องการตกตะกอนเม็ดเลือดแดง **(ตารางที่ 17)**

ตารางที่ 17 ผลการทดสอบการใช้สารกึ่งบริสุทธิ์ HPCE และ สารบริสุทธิ์ NKSS – 20 เพื่อปกป้องเม็ดเลือดแดงจากการตกตะกอนโดยเชื้อไวรัสไข้หวัดนก

สารสกัด	ความเข้มข้น	ผลการตกตะกอนเป็นบวก*
High polar crude extract **(HPCE)**	2.5 mg/ml	(3/3)
	250 µg/ml	(3/3)
	25 µg/ml	(3/3)
	2.5 µg/ml	(3/3)
	250 ng/ml	(2/3)
	25 ng/ml	(2/3)
	2.5 ng/ml	(2/3)
	0.25 ng/ml	(2/3)
NKSS-20 (สารบริสุทธิ์ Sesquiterpene)	2.5 mg/ml	(3/3)
	250 µg/ml	(3/3)
	25 µg/ml	(3/3)
	2.5 µg/ml	(3/3)
	250 ng/ml	(3/3)
	25 ng/ml	(3/3)
	2.5 ng/ml	(3/3)
	0.25 ng/ml	(3/3)

***หมายเหตุ** : ผลการทดสอบแสดงจำนวนหลุมที่พบว่าไวรัสสามารถตกตะกอนเม็ดเลือดแดงไก่ได้ ต่อจำนวนหลุมที่ทดสอบ

3.2 ผลการทดสอบสารสกัดจากย่านพาโหมต่อการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงไก่ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก

3.2.1 ผลการทดสอบสารสกัดจากย่านพาโหมต่อการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงไก่ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก จากการผสมสารสกัดกับเชื้อไวรัส 30 นาที ก่อนนำมาตกตะกอนเม็ดเลือดแดงไก่

เมื่อเติมสารสกัดจากสมุนไพรย่านพาโหมลงในเชื้อไวรัสพบว่า **สารสกัดจากย่านพาโหม NKAS – 1 และ NKPTE สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสไม่ให้ตกตะกอนของเซลล์เม็ดเลือดแดงได้อย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้น 100ng/mL (ตารางที่ 18)**

ตารางที่ 18: ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อไวรัสในการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงไก่โดยใช้สารสกัดจากย่านพาโหม NKAS – 1 และ NKPTE

สารสกัด	ความเข้มข้น	ผลการตกตะกอนเป็นบวก*		
		Rep1	Rep 2	Rep 3
NKAS-1 (สารสกัดด้วยไอโซโพรพานอล)	100 µg/ml	(3/3)	(3/3)	(1/3)
	10 µg/ml	(3/3)	(3/3)	(1/3)
	1 µg/ml	(0/3)	(1/3)	(0/3)
	100 ng/ml	(0/3)	(0/3)	(0/3)
	10 ng/ml	(0/3)	(3/3)	(2/3)
	1 ng/ml	(3/3)	(3/3)	(3/3)
	0.1 ng/ml	(3/3)	(3/3)	(2/3)
	0.01 ng/ml	(0/3)	(3/3)	(0/3)
		Rep1	Rep-2	Rep 3
NKPTE (สารสกัดด้วยเอทานอล)	100 µg/ml	(3/3)	(3/3)	(3/3)
	10 µg/ml	(3/3)	(3/3)	(0/3)
	1 µg/ml	(1/3)	(3/3)	(0/3)
	100 ng/ml	(0/3)	(1/3)	(1/3)
	10 ng/ml	(1/3)	(1/3)	(3/3)
	1 ng/ml	(3/3)	(1/3)	(3/3)
	0.1 ng/ml	(3/3)	(1/3)	(3/3)
	0.01 ng/ml	(1/3)	-	(1/3)

***หมายเหตุ** : ผลการทดสอบแสดงจำนวนหลุมที่พบว่าไวรัสสามารถตกตะกอนเม็ดเลือดแดงไก่ได้ ต่อจำนวนหลุมที่ทดสอบ

3.2.2 ผลการทดสอบส่วนสกัดจากย่านพาโหม (NKPTE -1, -2, -4, -5, -7 และ -8) ต่อการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงไก่ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก จากการผสมสารสกัดกับเชื้อไวรัส 30 นาที ก่อนนำมาตกตะกอนเม็ดเลือดแดงไก่

NKPTE-1, NKPTE-2, NKPTE-4 และ **NKPTE-5** ที่ทุกความเข้มข้นไม่สามารถยับยั้งการตกตะกอนเม็ดเลือดแดง **NKPTE-7 ยับยั้งการตกตะกอนของเซลล์เม็ดเลือดแดงบางส่วนที่ความเข้มข้น 62.5 mg/ml, 125 mg/ml และ 250 mg/ml และ ยับยั้งการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงอย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้น 15.625 mg/ml NKPTE-8 ยับยั้งการตกตะกอนของเซลล์เม็ดเลือดแดงบางส่วนที่ความเข้มข้น 125 mg/ml และ ยับยั้งการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงอย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้น 15.625 mg/mL (ตารางที่ 19)**

ตารางที่ 19: ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อไวรัสในการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงไก่โดยใช้ส่วนสกัดจากย่านพาโหม NKPTE - 1, - 2, - 4, - 5, - 7 และ NKPTE - 8

สารสกัด	ความเข้มข้น	ผลการตกตะกอนเป็นบวก*
NKPTE-1	500 µg/ml	(3/3)
	50 µg/ml	(3/3)
	5 µg/ml	(3/3)
	500 ng/ml	(3/3)
	50 ng/ml	(3/3)
	5 ng/ml	(3/3)
	0.5 ng/ml	(3/3)
	0.05 ng/ml	(3/3)
NKPTE-2	500 µg/ml	(3/3)
	50 µg/ml	(3/3)
	5 µg/ml	(3/3)
	500 ng/ml	(3/3)
	50 ng/ml	(3/3)
	5 ng/ml	(3/3)
	0.5 ng/ml	(3/3)
	0.05 ng/ml	(3/3)

NKPTE-4	500 µg/ml	(3/3)
	50 µg/ml	(3/3)
	5 µg/ml	(3/3)
	500 ng/ml	(3/3)
	50 ng/ml	(3/3)
	5 ng/ml	(3/3)
	0.5 ng/ml	(3/3)
	0.05 ng/ml	(3/3)
NKPTE-5	500 µg/ml	(3/3)
	50 µg/ml	(3/3)
	5 µg/ml	(3/3)
	500 ng/ml	(3/3)
	50 ng/ml	(3/3)
	5 ng/ml	(3/3)
	0.5 ng/ml	(3/3)
	0.05 ng/ml	(3/3)
NKPTE-7	250 mg/ml	Incomplete (0/3)
	125 mg/ml	Incomplete(0/3)
	62.5 mg/ml	Incomplete (0/3)
	31.25 mg/ml	Incomplete(0/3)
	15.625 mg/ml	(0/3)
	7.812 mg/ml	(3/3)
	3.906 mg/mll	(3/3)
	1.953 mg/ml	(3/3)
	0.940 mg/ml	(3/3)
	0.469 mg/ml	(3/3)
	0.234 mg/ml	(3/3)

	0.117 mg/ml	(3/3)
	500 μg/ml	(3/3)
	50 μg/ml	(3/3)
	5 μg/ml	(3/3)
	500 ng/ml	(3/3)
	50 ng/ml	(3/3)
	5 ng/ml	(3/3)
	0.5 ng/ml	(3/3)
	0.05 ng/ml	(3/3)
NKPTE-8	250 mg/ml	(3/3)
	125 mg/ml	Incomplete
	62.5 mg/ml	(3/3)
	31.25 mg/ml	(3/3)
	15.625 mg/ml	(0/3)
	7.812 mg/ml	(3/3)
	3.906 mg/ml	(3/3)
	1.953 mg/ml	(3/3)
	0.940 mg/ml	(3/3)
	0.469 mg/ml	(3/3)
	0.234 mg/ml	(3/3)
	0.117 mg/ml	(3/3)
	500 μg/ml	(3/3)
	50 μg/ml	(3/3)
	5 μg/ml	(3/3)
	500 ng/ml	(3/3)
	50 ng/ml	(3/3)
	5 ng/ml	(3/3)
	0.5 ng/ml	(3/3)

	0.05 ng/ml	(3/3)

***หมายเหตุ** : ผลการทดสอบแสดงจำนวนหลุมที่พบว่าไวรัสสามารถตกตะกอนเม็ดเลือดแดงไก่ได้ ต่อจำนวนหลุมที่ทดสอบ

3.2.3 ผลการทดสอบสารสกัดจากย่านพาโหมต่อการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงไก่ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก จากการผสมสารสกัดกับเม็ดเลือดแดงไก่ 30 นาที ก่อนเติมเชื้อไวรัสไข้หวัดนก

เมื่อเติมสารสกัดลงในเซลล์เม็ดเลือดแดงก่อนเติมไวรัสพบว่าสารสกัดจากย่านพาโหม **NKAS-1 ทุกความเข้มข้น (0.5 ng/ml ถึง 5 μg/ml) ยับยั้งการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงได้อย่างสมบูรณ์ และ บางส่วนที่ความเข้มข้น 50 μg/ml และ 5 mg/ml ส่วนสารสกัด NKPTE ที่ความเข้มข้น ตั้งแต่ 2.5 μg/ml ถึง 2.5 mg/ml สามารถยับยั้งการตกตะกอนของเซลล์เม็ดเลือดแดงได้อย่างสมบูรณ์(ตารางที่ 20)**

ตารางที่ 20 : ผลการทดสอบการใช้สารสกัดจากย่านพาโหม NKAS-1และNKPTEเพื่อปกป้องเม็ดเลือดแดงจากการตกตะกอนโดยเชื้อไวรัสไข้หวัดนก

สารสกัด	ความเข้มข้น	ผลการตกตะกอนเป็นบวก*
NKAS-1	5 mg/ml	(1/3)
(สารสกัดด้วยไอโซโพรพานอล)	500 μg/ml	(0/3)
	50 μg/ml	(1/3)
	5 μg/ml	(0/3)
	500 ng/ml	(0/3)
	50 ng/ml	(0/3)
	5 ng/ml	(0/3)
	0.5 ng/ml	(0/3)
NKPTE	2.5 mg/ml	(0/3
(สารสกัดด้วยเอทานอล)	250 μg/ml	(0/3)
	25 μg/ml	(0/3)
	2.5 μg/ml	(0/3)
	250 ng/ml	(2/3)
	25 ng/ml	(2/3)
	2.5 ng/ml	(3/3)

	0.25 ng/ml	(3/3)

***หมายเหตุ** : ผลการทดสอบแสดงจำนวนหลุมที่พบว่าไวรัสสามารถตกตะกอนเม็ดเลือดแดงไก่ได้ ต่อจำนวนหลุมที่ทดสอบ

3.2.4 ผลการทดสอบส่วนสกัดจากย่านพาโหม (NKPTE – 1, – 2, – 4, – 5, – 7 และ –8 ต่อการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงไก่ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก จากการผสมส่วนสกัดกับเม็ดเลือดแดงไก่ 30 นาที ก่อนเติมเชื้อไวรัสไข้หวัดนก

NKPTE-1ที่ความเข้มข้น ตั้งแต่ 0.05 ng/ml, 5 ng/ml และ 50 ng/ml ป้องกันการตกตะกอนของเซลล์เม็ดเลือดแดงได้อย่างสมบูรณ์ NKPTE-2 ที่ความเข้มข้น ตั้งแต่ 0.05 ng/ml ถึง 500 ng/ml ยับยั้งการตกตะกอนของเซลล์เม็ดเลือดแดงได้อย่างสมบูรณ์ NKPTE-4 ที่ความเข้มข้น ตั้งแต่ 0.05 ng/ml ถึง 50 µg/ml ยับยั้งการตกตะกอนของเซลล์เม็ดเลือดแดงได้อย่างสมบูรณ์ NKPTE-5ยับยั้งการตกตะกอนของเซลล์เม็ดเลือดแดงได้อย่างสมบูรณ์ ที่ความเข้มข้น ตั้งแต่ 0.05 ng/ml ถึง 500 ng/ml (ตารางที่ 21)

ตารางที่ 21: ผลการทดสอบการใช้ส่วนสกัดจากย่านพาโหม NKPTE-1,-2,-4,-5,-7และNKPTE-8 เพื่อปกป้องเม็ดเลือดแดงจากการตกตะกอนโดยเชื้อไวรัสไข้หวัดนก

สารสกัด	ความเข้มข้น	ผลการตกตะกอนเป็นบวก
NKPTE – 1	500 µg/ml	(3/3)
	50 µg/ml	(3/3)
	5 µg/ml	(2/3)
	500 ng/ml	(3/3)
	50 ng/ml	(0/3)
	5 ng/ml	(0/3)
	0.5 ng/ml	(2/3)
	0.05 ng/ml	(0/3)
NKPTE – 2	500 µg/ml	(3/3)
	50 µg/ml	(3/3)
	5 µg/ml	(3/3)
	500 ng/ml	(0/3)
	50 ng/ml	(0/3)
	5 ng/ml	(0/3)

	0.5 ng/ml	(0/3)
	0.05 ng/ml	(0/3)
NKPTE - 4	500 µg/ml	(3/3)
	50 µg/ml	(0/3)
	5 µg/ml	(0/3)
	500 ng/ml	(0/3)
	50 ng/ml	(0/3)
	5 ng/ml	(0/3)
	0.5 ng/ml	(0/3)
	0.05 ng/ml	(0/3)
NKPTE - 5	500 µg/ml	(3/3)
	50 µg/ml	(3/3)
	5 µg/ml	(2/3)
	500 ng/ml	(0/3)
	50 ng/ml	(0/3)
	5 ng/ml	(0/3)
	0.5 ng/ml	(0/3)
	0.05 ng/ml	(0/3)
NKPTE - 7	500 µg/ml	(3/3)
	50 µg/ml	(3/3)
	5 µg/ml	(3/3)
	500 ng/ml	(3/3)
	50 ng/ml	(3/3)
	5 ng/ml	(3/3)
	0.5 ng/ml	(3/3)
	0.05 ng/ml	(3/3)

NKPTE – 8	500 μg/ml	(3/3)
	50 μg/ml	(3/3)
	5 μg/ml	(3/3)
	500 ng/ml	(3/3)
	50 ng/ml	(3/3)
	5 ng/ml	(2/3)
	0.5 ng/ml	(3/3)
	0.05 ng/ml	(3/3)

***หมายเหตุ** : ผลการทดสอบแสดงจำนวนหลุมที่พบว่าไวรัสสามารถตกตะกอนเม็ดเลือดแดงไก่ได้ ต่อจำนวนหลุมที่ทดสอบ

4. ผลการทดสอบฤทธิ์ของส่วนสกัดย่านพาโหมที่มีต่อการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสในเซลล์เป้าหมาย

จาก**ตารางที่ 21** พบว่าส่วนสกัดย่านพาโหมจากตารางที่ 18 คือ **NKPTE – 7** และ **NKPTE – 8** สามารถยับยั้งการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงไก่ได้จึงได้นำส่วนสกัดทั้ง 2 ชนิดนี้มาทำการทดสอบฤทธิ์ที่มีต่อการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสในเซลล์เป้าหมาย ผลการทดสอบมีดังนี้

NKPTE – 7 และ NKPTE – 8 ที่มีความเข้มข้น 0.177mg/mL ถึง 250 mg/ml สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสในเซลล์ โดยค่าไตเตอร์ที่ได้จากเซลล์ที่เติมสารสกัดทั้งสองชนิดเป็นศูนย์ ขณะที่ไตเตอร์ที่ได้จากหลุมควบคุมที่เลี้ยงเซลล์ที่ไม่เติมสารสกัดมีค่าเท่ากับ 8

สรุปผลการทดลอง

1. จากการสกัดเหง้าขมิ้นชัน ด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ได้สารสกัดขมิ้นชันทั้งหมด 7 ชนิด คือ
   1.1 สารสกัดด้วยน้ำ
   1.2 สารสกัดด้วย 70%เอทานอล/น้ำ
   1.3 สารสกัดด้วยโซเดียมคาร์บอเนต/น้ำ
   1.4 สารสกัดด้วยไอโซโพรพานอล
   1.5 สารสกัดด้วยเอทานอล
   1.6 สารสกัดด้วยเฮกเซน
   1.7 สารสกัดด้วยเอทิลอะซีเตท

โดยพบว่า ตัวทำละลาย 2 ชนิดคือ โซเดียมคาร์บอเนต/น้ำ และ น้ำสามารถสกัดสารได้สูงสุด และรองลงมาในปริมาณ 47.90% และ 39.33 % ต่อน้ำหนักพืชแห้งตามลำดับ ส่วนตัวทำละลายไอโซโพรพานอล, เอทานอล, 70%เอทานอล/น้ำ สกัดสารจากขมิ้นชันได้ในปริมาณ 21.16%, 24.86% และ 32.89% ต่อน้ำหนักพืชแห้งตามลำดับ

จากการวิเคราะห์ด้วย TLC พบว่าสารสกัดด้วยไอโซโพรพานอล, เอทานอล, 70%เอทานอล/น้ำ มีองค์ประกอบคล้ายกันโดยประกอบด้วยส่วนของน้ำมันหอมระเหยและส่วนของ Curcuminoids ส่วนสารสกัดด้วยน้ำ และ โซเดียมคาร์บอเนต/น้ำ ประกอบด้วยสารกลุ่ม Curcuminoids และสารที่มีขั้วสูงกว่า Curcuminoids

จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอล, 70%เอทานอล/น้ำ และ ไอโซโพรพานอล มีปริมาณ Curcuminoids 14.08%, 6.25% และ 6.08% ต่อน้ำหนักพืชแห้งตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าสารสกัดด้วยน้ำ และ โซเดียมคาร์บอเนต/น้ำ ซึ่งมีปริมาณ Curcuminoids 1.90% และ 0.59% ต่อน้ำหนักพืชแห้งตามลำดับ

2. ได้แยกสารกลุ่ม Curcuminoids ซึ่งประกอบด้วย Curcumin, Demethoxycurcumin และ Bisdemethoxycurcumin จากสารสกัดขมิ้นชัน สารกลุ่ม Curcuminoids ลักษณะเป็นผลึกสีส้ม มีจุดหลอมเหลว = 176 – 178°C ตรวจวิเคราะห์ด้วย HPLC เทียบกับ Curcuminoids มาตรฐาน
3. ได้แยกสารบริสุทธิ์ Curcumin, demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin จากสารสกัดขมิ้นชันพร้อมทั้งวิเคราะห์โครงสร้างด้วยวิธีทางสเปกโทรสโกปี
4. ได้แยกสารบริสุทธิ์ Sesquiterpene จากสารสกัดขมิ้นชันและวิเคราะห์โครงสร้างด้วยวิธีทางสเปกโทรสโกปี
5. ได้สารสกัดย่านพาโหมด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆทั้งหมด 6 ชนิด คือ
   5.1 สารสกัดด้วยน้ำ

5.2 สารสกัดด้วยเอทานอล

5.3 สารสกัดด้วยไอโซโพรพานอล

5.4 สารสกัดด้วยเฮกเซน

5.5 สารสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน

5.6 สารสกัดด้วยเอทานอล (หลังจากสกัดด้วยเฮกเซนและไดคลอโรมีเทน)

โดยพบว่าการสกัดทั้งใบและต้นจะได้ปริมาณสารสกัดสูงกว่าการสกัดจากต้นอย่างเดียว การสกัดทั้งใบและต้นของย่านพาโหมด้วยตัวทำละลายน้ำจะได้ปริมาณสารสกัดสูงสุด คือ 24.84 % ของน้ำหนักพืชแห้ง และรองลงมาคือการสกัดด้วยเอทานอลได้ปริมาณสารสกัด 10.81 % ต่อน้ำหนักพืชแห้ง

จากการวิเคราะห์ด้วย TLC พบว่าสารสกัดด้วยน้ำมีองค์ประกอบต่างจากสารที่สกัดด้วยเอทานอลและไอโซโพรพานอล โดยการสกัดด้วยน้ำจะมีสารที่มีขั้วสูงกว่าการสกัดด้วยเอทานอลและไอโซโพรพานอล สารที่สกัดด้วยเอทานอลและไอโซโพรพานอล มีองค์ประกอบของสารที่มีขั้วต่ำถึงปลานกลาง

6. ได้สารบริสุทธิ์ 2 ชนิดจากสารสกัดย่านพาโหม และวิเคราะห์โครงสร้างด้วยวิธีทางสเปกโทรสโกปี
7. ได้ปริมาณเชื้อไวรัส H5N1ที่แยกได้จากไก่ที่ตายด้วยไข้หวัดนกจากจังหวัดสุพรรณบุรีโดยมีความเข้มข้น 108 EID_{50}/ml
8. เซลล์ MDCK ที่ใช้ในการศึกษานี้สามารถใช้เพาะเลี้ยงไวรัส H5N1 ที่ก่อให้เกิดโรคไข้หวัดนกในประเทศไทยได้ดี และแสดงการทำลายเซลล์โดยเกิด plaque ที่ชัดเจน เหมาะสมสำหรับใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านไวรัสของสารสกัดสมุนไพร ด้วยวิธี plaque reduction test
9. สารสกัดสมุนไพรขมิ้นชันและย่านพาโหม ที่สกัดโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย ไม่มีผลต้านเชื้อไวรัสจากการทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยงในการศึกษานี้
10. ผลการทดสอบสารสกัดจากขมิ้นชันต่อฤทธิ์การทำลายเซลล์เป้าหมายของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก สารสกัดย่านพาโหมสามารถยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสในเซลล์ โดยค่าไตเตอร์ของไวรัสที่ได้จากเซลล์ที่เติมสารสกัดทั้งสองชนิดเป็นศูนย์ ขณะที่ไตเตอร์ที่ได้จากหลุมควบคุมที่เลี้ยงเซลล์ที่ไม่เติมสารสกัดมีค่าเท่ากับ 8 ในขณะที่สารสกัดจากขมิ้นชันไม่สามารถยับยั้งการทำลายเซลล์เป้าหมาย
11. ผลการทดสอบสารสกัดจากขมิ้นชันและย่านพาโหมต่อการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงไก่ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกพบว่า สารสกัดย่านพาโหมสามารยับยั้งและปกป้องการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงไก่ โดยเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่ระดับความเข้มข้นช่วง 0.5 ng/ml – 5 mg/ml สารสกัดขมิ้นชันไม่สามารถยับยั้งแต่ปกป้องการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงที่ระดับความเข้มข้นช่วง 0.1ng/ml – 1 mg/ml

12. ผลการทดสอบสารบริสุทธิ์ต่อการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงไก่ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกได้พบสาร**บริสุทธิ์ 1 ชนิด** คือสาร **Sesquiterpene (NKSS – 20)** ที่แยกได้จากสารสกัดขมิ้นชันออกฤทธิ์ยับยั้งการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงไก่ ส่วนสาร Curcuminoids และสารบริสุทธิ์ Curcumin ไม่ออกฤทธิ์ฯ ในขณะที่ได้พบ**สารบริสุทธิ์ 2 ชนิด (NKPTE – 1 และ NKPTE – 2)** แยกได้จากย่านพาโหมออกฤทธิ์ปกป้องการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงไก่

<u>วิจารณ์ผลการทดลอง</u>

1. สารสกัดสมุนไพรย่านพาโหมและขมิ้นชันสามารถยับยั้งและปกป้องการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงไก่โดย Avian Influenza Virus (H5N1) ได้
2. เนื่องจากการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงเป็นผลจากการจับตัวของ Hemagglutinin (H) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ผิวของไวรัสกับ receptor ที่ผิวเซลล์เม็ดเลือดแดง จึงเป็นไปได้ว่าการยับยั้งการตกตะกอนของสารสกัดสมุนไพรที่พบนี้เป็นผลขัดขวางที่ H และ/หรือ receptor
    ก. สารสกัดย่านพาโหมอาจออกฤทธิ์โดยตรงต่อ H เนื่องจากเมื่อบ่มเชื้อไวรัสกับสารสกัดก่อนทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดง สามารถยับยั้งการตกตะกอนได้
    ข. สารสกัดขมิ้นชันอาจออกฤทธิ์โดยอ้อมต่อ receptor เนื่องจากเมื่อบ่มเชื้อไวรัสกับขมิ้นชันก่อนทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดง ไม่สามารถยับยั้งการตกตะกอนได้ แต่เมื่อบ่มสารสกัดกับเม็ดเลือดแดงก่อนทำปฏิกิริยากับไวรัส ทำให้การตกตะกอนเม็ดเลือดแดงถูกขัดขวางได้สำเร็จ
3. เนื่องจาก H มีบทบาทสำคัญต่อการเข้าสู่เซลล์ของ Avian Influenza virus และต่อความรุนแรงของการก่อโรค ฤทธิ์ขัดขวางปฏิกิริยาระหว่าง H กับ receptor อาจมีส่วนสำคัญต่อการป้องกันการติดเชื้อไวรัสหรือลดความรุนแรงของโรคได้ อย่างไรก็ตามกระบวนการขัดขวางการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงเป็นผลทดสอบขั้นต้น ซึ่งต้องพิสูจน์ต่อไปว่ามีความเกี่ยวโยงกับการทำลาย ยับยั้งการติดเชื้อ หรือลดความรุนแรงของโรคได้หรือไม่อย่างไร ซึ่งงานวิจัยนี้อยู่ในระหว่างการศึกษากระบวนการออกฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรเพิ่มเติม โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงเป็นแบบทดสอบ และในอนาคตยังมีความจำเป็นต้องทำการศึกษาเชิงลึก ทั้งในแง่มุมที่ครอบคลุมทั้งโครงสร้างและคุณสมบัติของตัวสารออกฤทธิ์และกระบวนการออกฤทธิ์ รวมถึงประโยชน์ในการนำสารสกัดไปใช้ ทั้งหมดขั้นตอนหลักที่สำคัญที่ควรพัฒนาต่อไป ซึ่งกระบวนการศึกษาจะต้องให้คำตอบทั้งในระดับเซลล์และระดับโมเลกุล
4. จากผลการทดลองข้างต้น เพื่อพิสูจน์ว่าการยับยั้งปฏิกิริยาระหว่าง H และ receptor ดังที่พบในการทดสอบ HA มีผลต่อการติดเชื้อไวรัสและการทำลายเซลล์โดยไวรัสหรือไม่ ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง MDCK ในการทดสอบ ผลการศึกษาที่ไม่พบการเพิ่มจำนวนไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงจากการตรวจสอบด้วย HA อาจบ่งชี้ได้ดังนี้
    ก. สารสกัดย่านพาโหมออกฤทธิ์ป้องกันการเข้าสู่เซลล์ของไวรัส
    ข. สารสกัดย่านพาโหมออกฤทธิ์ป้องกันการแพร่กระจายของไวรัสออกจากเซลล์หลังจากเข้าสู่เซลล์แล้ว

เมื่อพิจารณาผลการศึกษา HA และการศึกษาในเซลล์ MDCK อาจเสนอแนะได้ว่า สารสกัดย่านพาโหมออกฤทธิ์ต้านไวรัส H5N1 โดยขบวนการออกฤทธิ์เกี่ยวข้องกับการขัดขวางการจับของ H กับ receptor ที่ผิวเซลล์เป้าหมาย และผลการขัดขวางดังกล่าวมีผลยับยั้งการติดเชื้อไวรัส H5N1 ในเซลล์เป้าหมายได้

เพื่อให้สามารถมองเห็นการยับยั้งการติดเชื้อของเซลล์เป็นการยืนยันผลให้ชัดเจนมากขึ้น คณะผู้วิจัยกำลังดำเนินการศึกษาต่อ โดยใช้เทคนิคทาง immunohistochemistry เพื่อตรวจว่ามีการปรากฏของเชื้อภายในเซลล์หรือไม่ ด้วยเทคนิคดังกล่าวยังจะสามารถตรวจดูตำแหน่งที่ปรากฏของเชื้อว่าอยู่ที่ผิวเซลล์หรือภายในเซลล์ (หากปรากฏเชื้อ)ได้ด้วย นอกจากนั้นอาจดำเนินการศึกษาในขั้นตอนต่อไปด้วยการใช้ Electronmicroscopic image ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อไวรัส H5N1 เป็นเชื้อที่ก่อโรครุนแรงและพบการแพร่สู่คนซึ่งก่อโรคร้ายแรงมากจนทำให้อัตราการเสียชีวิตของผู้ติดเชื้อสูงมาก ผู้วิจัยจึงพยายามใช้ขบวนการศึกษาหลายขบวนการด้วยกันเพื่อตรวจสอบผลการยับยั้งเชื้อไวรัสให้มีความถูกต้องแม่นยำมากที่สุด

สำหรับการตรวจสอบขบวนการต้านเชื้อไวรัส H5N1 ของสารสกัดสมุนไพรในด้านอื่น เช่น การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ neuraminidase อยู่ในระหว่างการดำเนินการทดสอบ

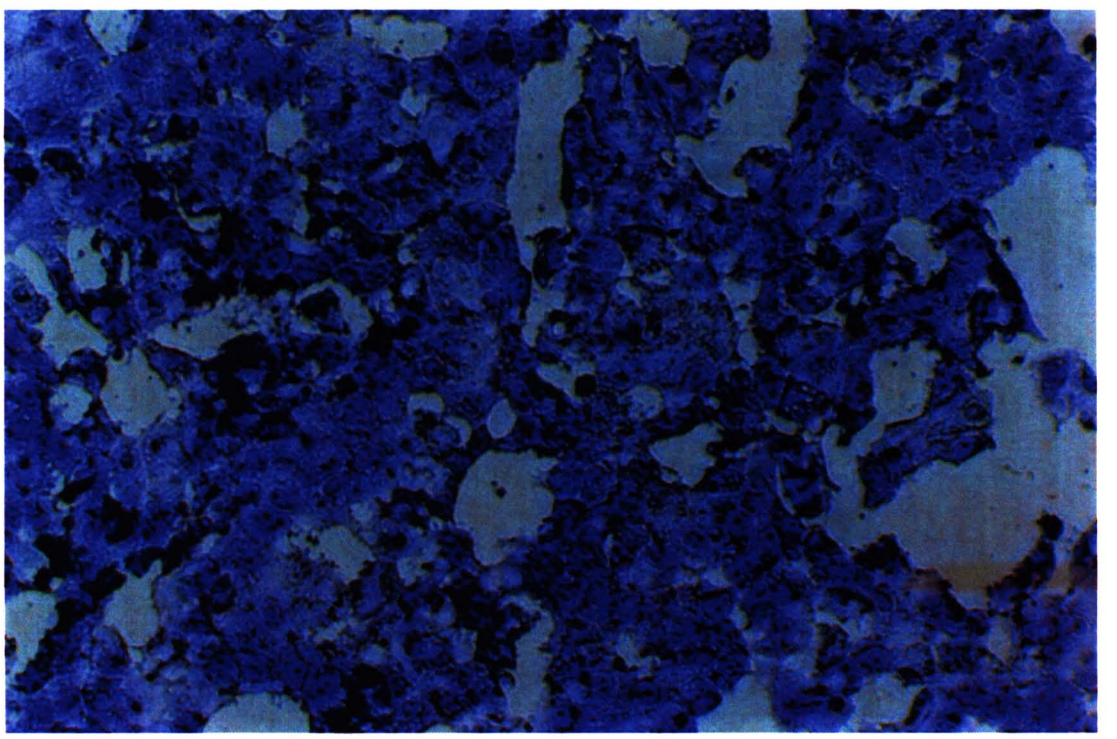
5. จากการที่ได้พบสารยับยั้งเชื้อไข้หวัดนกจากการสกัดขมิ้นชันชนิดใหม่ ซึ่งเป็นสาร sesquiterpene คณะวิจัยได้ทำการจดสิทธิบัตรต่างประเทศและในประเทศนั้น **(ข้อ 8)** นับเป็นองค์ความรู้ใหม่ที่สำคัญยิ่งที่ควรจะมีการพัฒนาต่อไป
6. จากการศึกษาเบื้องต้นโดยใช้ docking experiment พบว่า curcumin ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ H5N1 แต่จากผลการทดลองจริงพบว่า curcumin ไม่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ H5N1 ซึ่งคณะผู้วิจัยได้พบอยู่บ่อยๆว่าการศึกษาโดย docking experiment (แบบจำลอง) มีผลตรงข้ามกับการทดลองจริง
7. จากการที่พบสารบริสุทธิ์ 2 ชนิดจากย่านพาโหมที่ออกฤทธิ์ปกป้องการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดงในไก่ แต่จากการทดสอบพบว่าสารสกัดย่านพาโหมออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไข้หวัดนกด้วย ดังนั้นการแยกสารบริสุทธิ์พร้อมทั้งทดสอบการออกฤทธิ์ฯเพิ่มเติม มีความสำคัญยิ่งเพื่อหาสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ H5N1 ชนิดใหม่ จากย่านพาโหม
8. **จากผลงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยได้ดำเนินการจดสิทธิบัตร 2 ฉบับดังนี้**
    - 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)**
9. **คณะผู้วิจัยได้รับรางวัลประกาศเกียรติคุณผลงานประดิษฐ์คิดค้นจากสำนักงานคณะกรรมการสภาวิจัยแห่งชาติ(วช.) ปี 2553 เรื่อง ตำรับอาหารไก่สมุนไพรขมิ้นชันสำหรับป้องกันการติดเชื้อไวรัสในไก่**

งานวิจัยที่จะต้องทำต่อไปในปีที่ 2

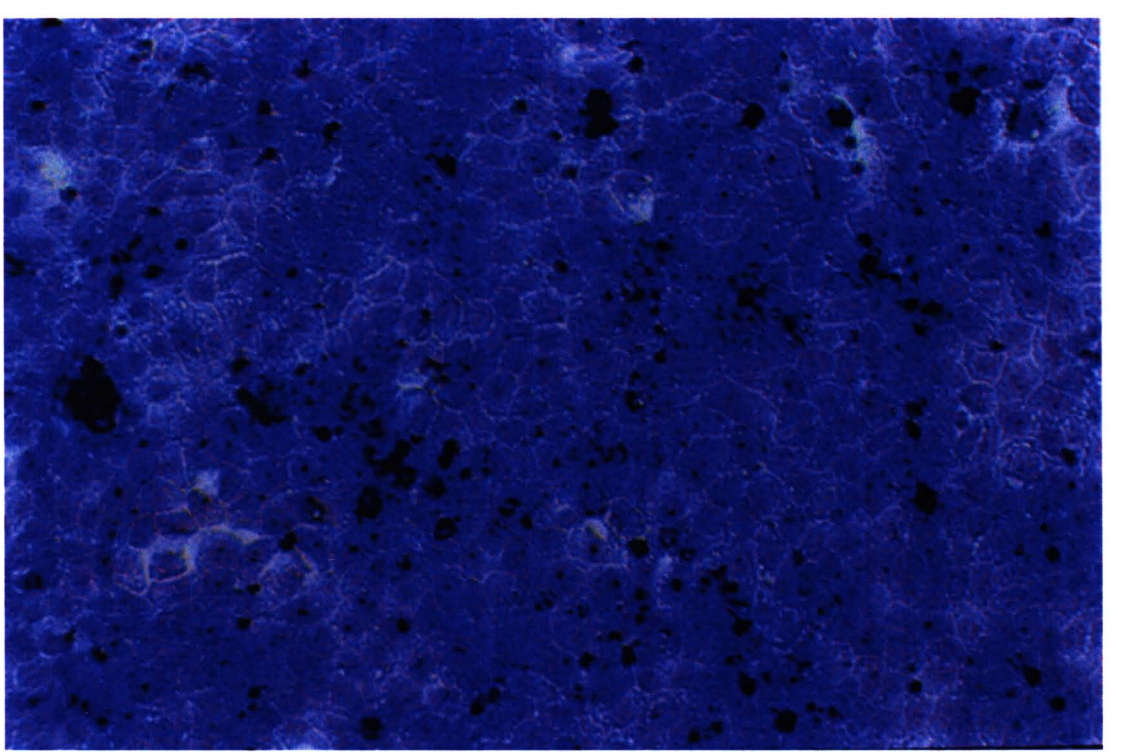
1. ทำการแยกสารออกฤทธิ์ให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นพร้อมทั้งวิเคราะห์โครงสร้าง (ต่อ)
2. ทำการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารในการยับยั้งเชื้อไข้หวัดนกโดย Docking experiment และการทดสอบจริงโดยใช้เทคนิคทาง immunohistochemistry และอาจจะทำการศึกษาต่อโดย Electromicroscopic image

เอกสารอ้างอิง

1. Poddar, S. K. Influenza virus types and subtypes detection by single step tube multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and agarose gel electrophoresis. J. Virol. Methods. 99: 63-70. 2002.
2. Office International des Epizootics. Highly pathogenic avian influenza. In: Manual of standards for diagnostic tests and vaccines, 4th ed. Office International des Epizootics, Paris, France. 2000.
3. Reed, L. J. and H. Muench Quantitation of virus. In: Virology methods manual. Ed. B.W.J. Mahy and H. O. Kangro. Academic Press. Harcourt Brace & company. pp. 33-39. 1996.
4. Peret - Almeide, L. Cherubino, A.P.F., Alves, R. J., Dufosse, L., and Gloria, M.B.A. Separation and determination of the physico - chemical characteristics of curcumin, demethoxycurcumin and bis demethoxycurcumin *Food Research International*, pp. 1039 - 1044, 2005

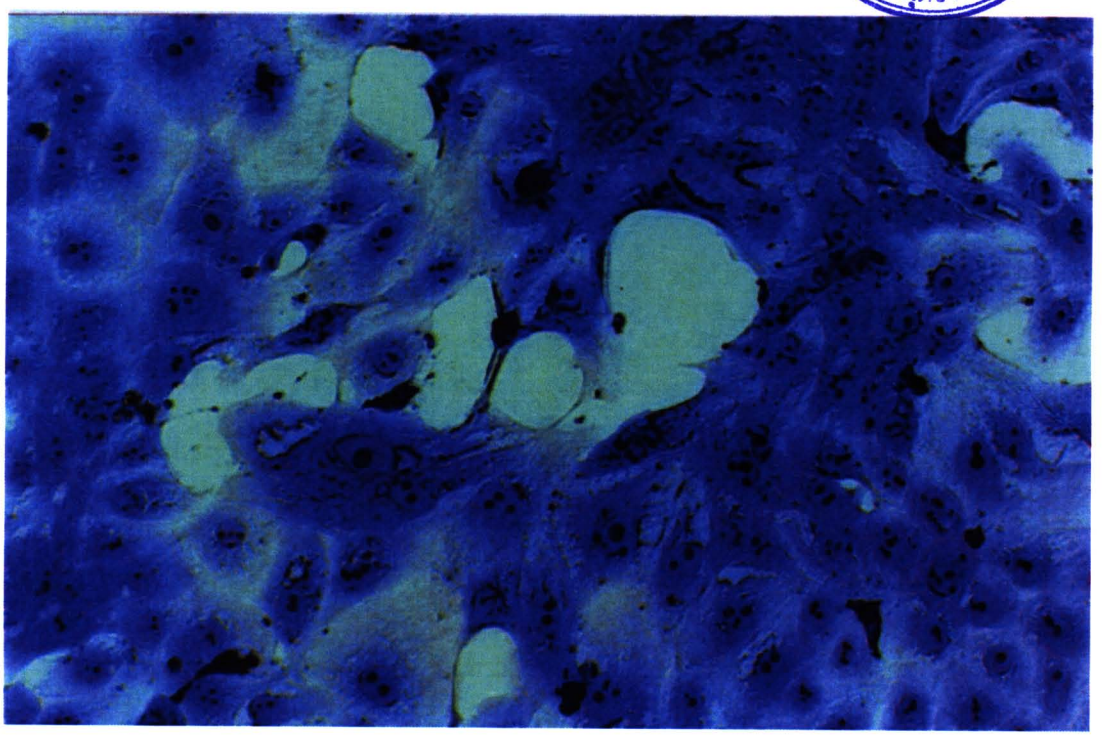


ภาพที่ 8 : แสดงเซลล์ MDCK

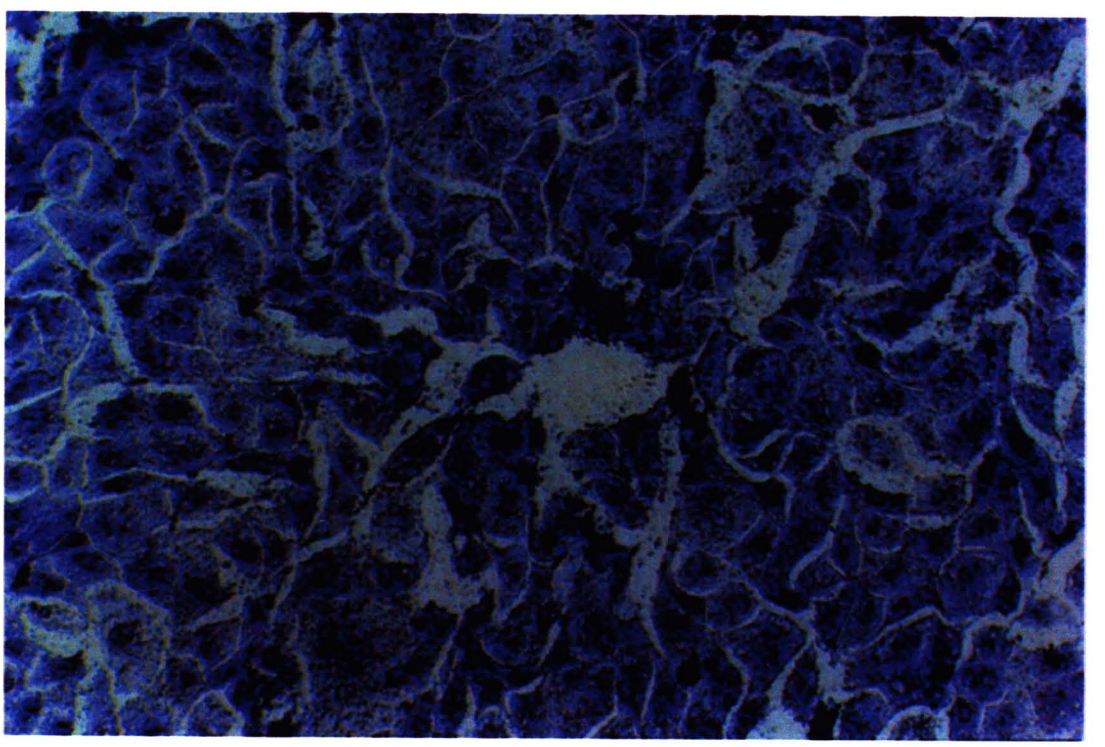


ภาพที่ 9 : แสดง Viral plague ในเซลล์ MDCK

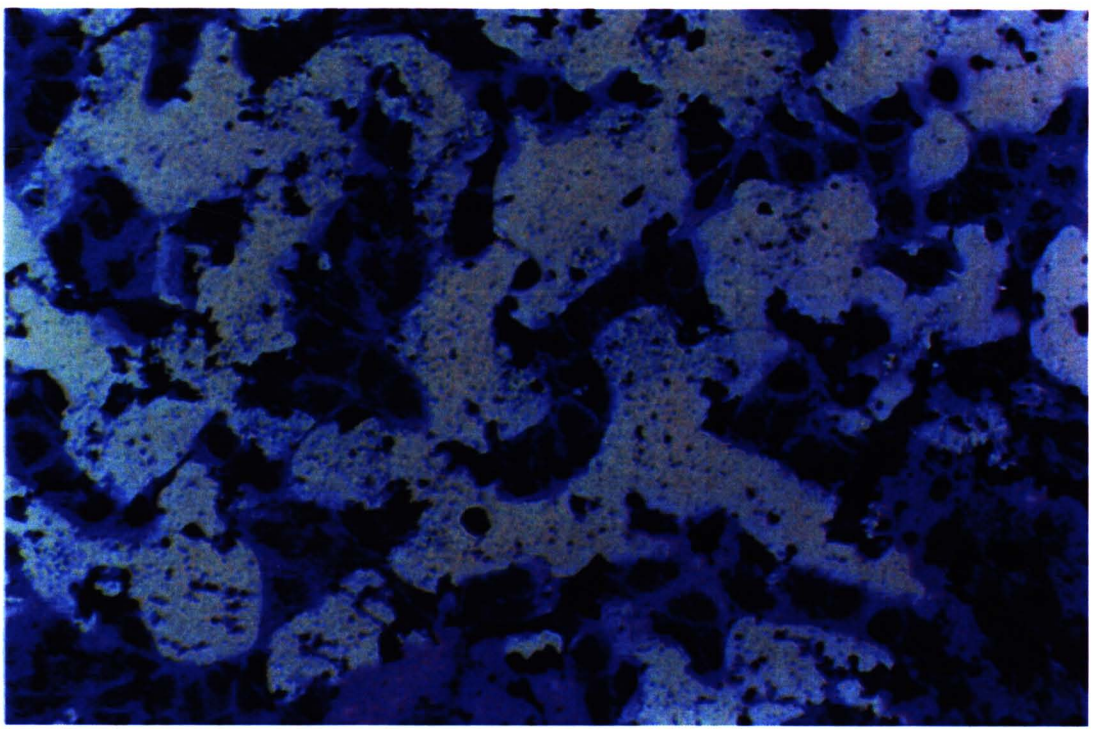
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย



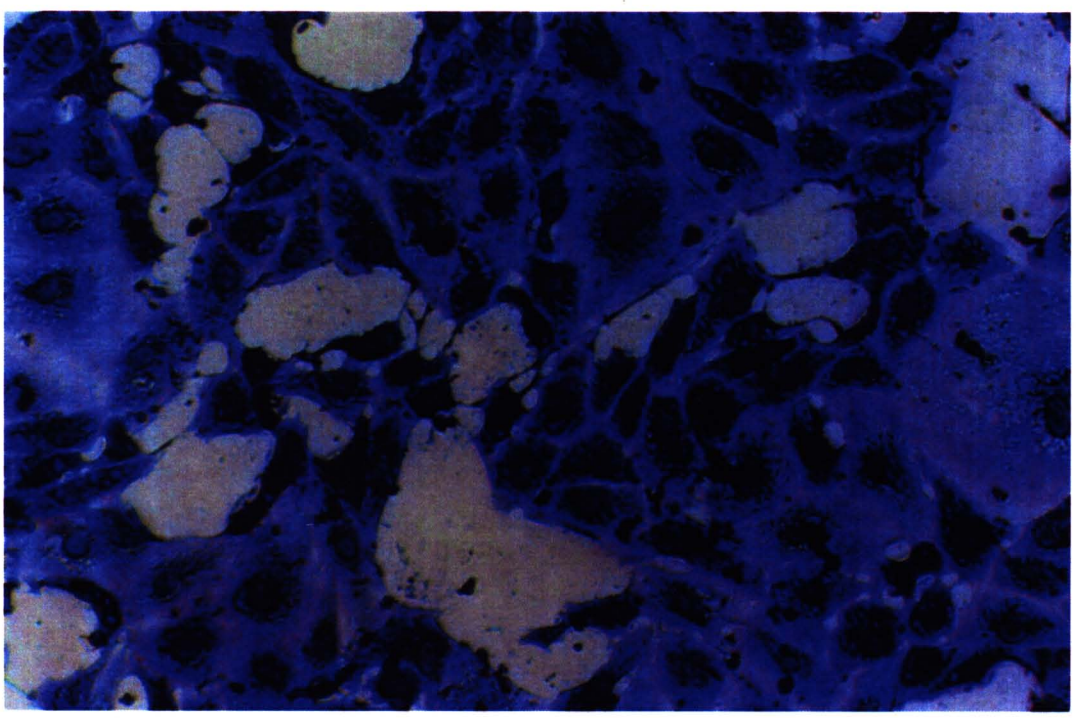
ภาพที่ 10 : แสดง Viral plague ในเซลล์ MDCK หลังจากการเติมสารสกัดสมุนไพรขมิ้นชัน NKSS – 1 ที่ความเข้มข้น 50 µg/mL



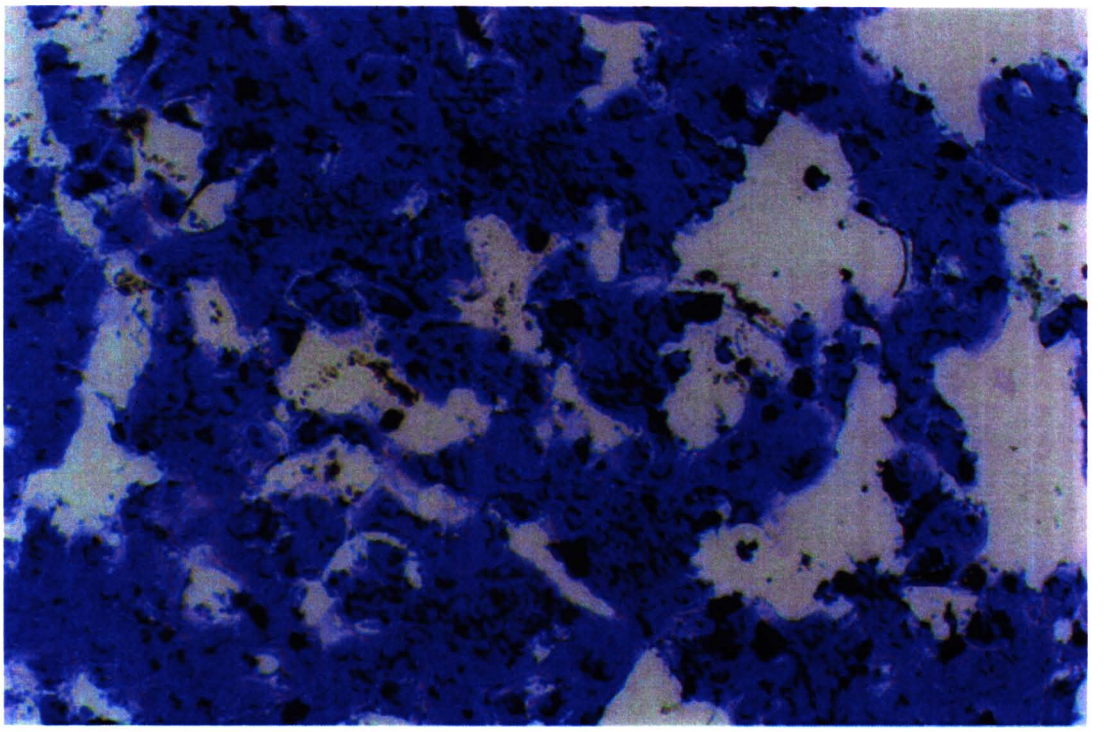
ภาพที่ 11 : แสดงเซลล์ MDCK ที่ถูกทำลายจากเชื้อไวรัสไข้หวัดนก หลังจากเติมสารสกัดสมุนไพรขมิ้นชัน NKSS – 1 ที่ความเข้มข้น 500 ng/mL



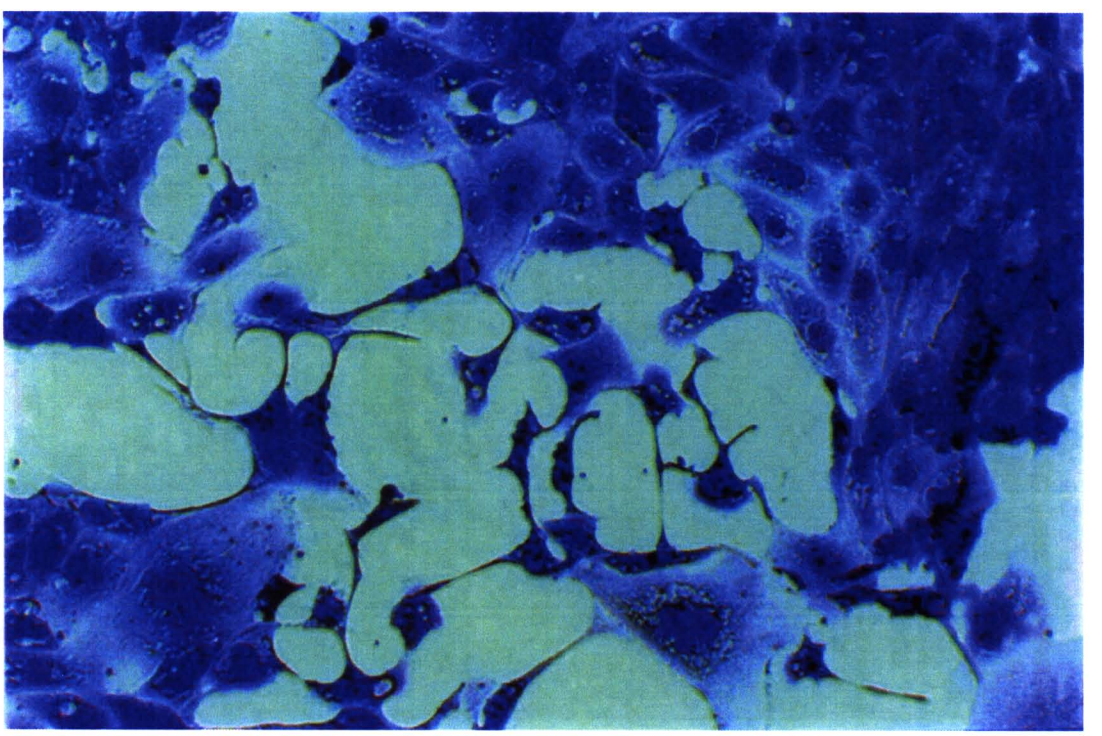
ภาพที่ 12 : แสดง Viral plague ในเซลล์ MDCK หลังจากการเติมสารสกัดสมุนไพรขมิ้นชัน NKSS – 1 ที่ความเข้มข้น 0.5 ng/mL



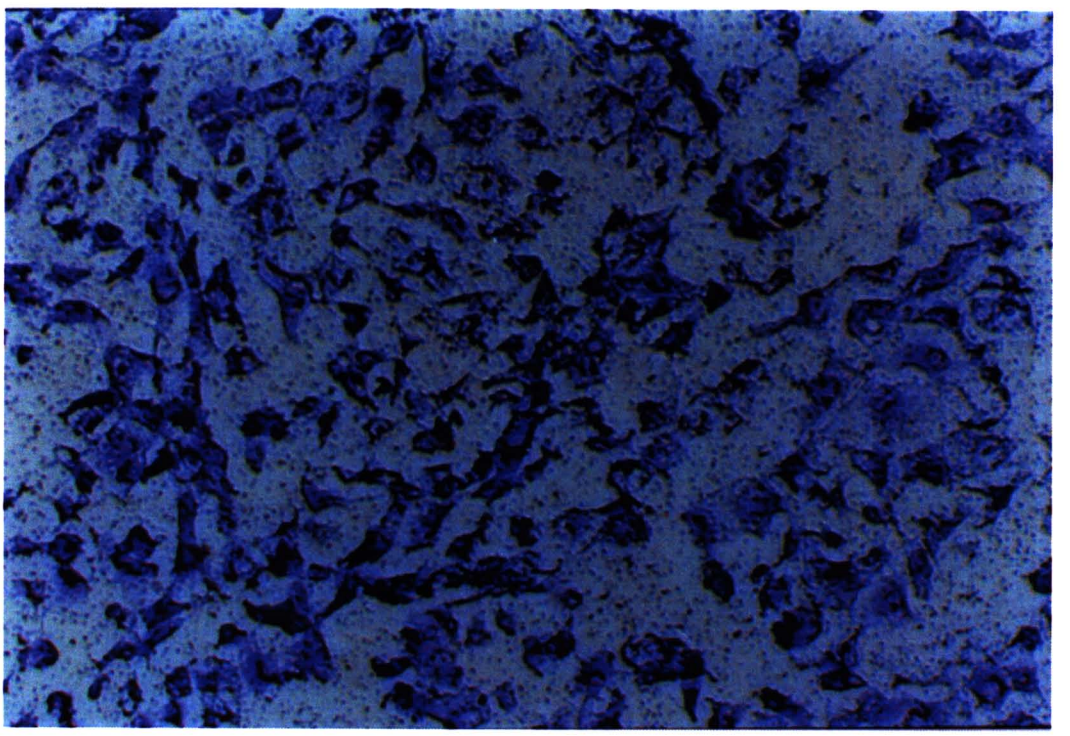
ภาพที่ 13 : แสดงเซลล์ MDCK ที่ถูกทำลายจากเชื้อไวรัสไข้หวัดนก หลังจากการเติมสารสกัดสมุนไพรขมิ้นชัน NKSS – 6 ที่ความเข้มข้น 140 ng/mL



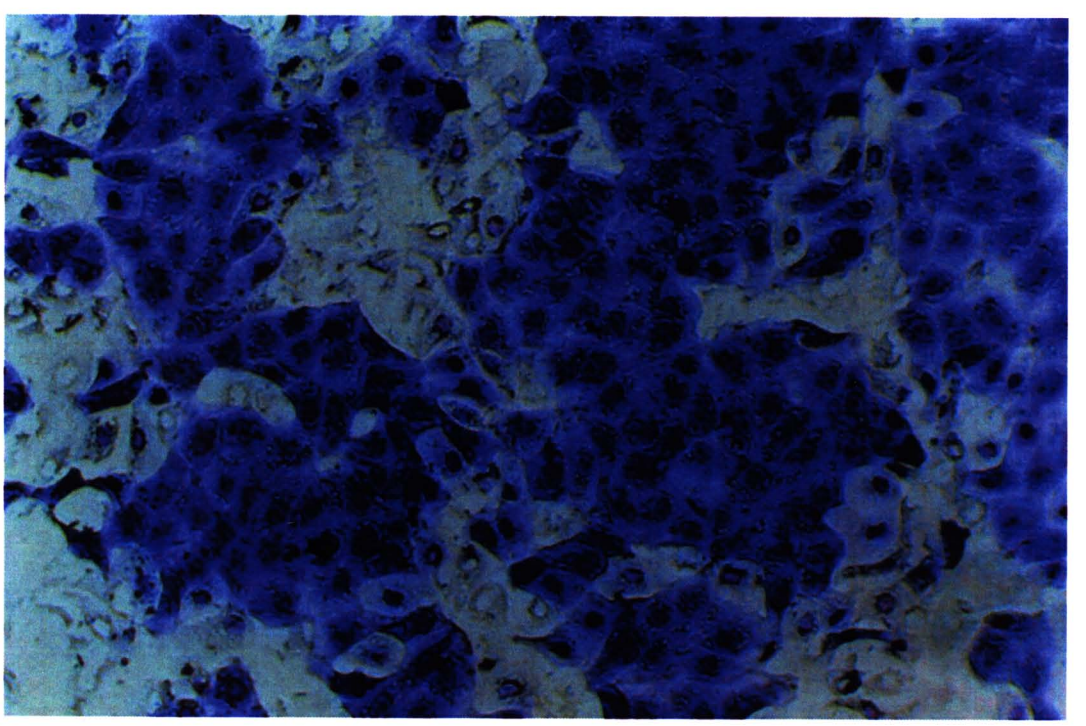
ภาพที่ 14 : แสดง Viral plague ในเซลล์ MDCK หลังจากการเติมสารสกัดสมุนไพรขมิ้นชัน NKSS – 6 ที่ความเข้มข้น 14 ng/mL



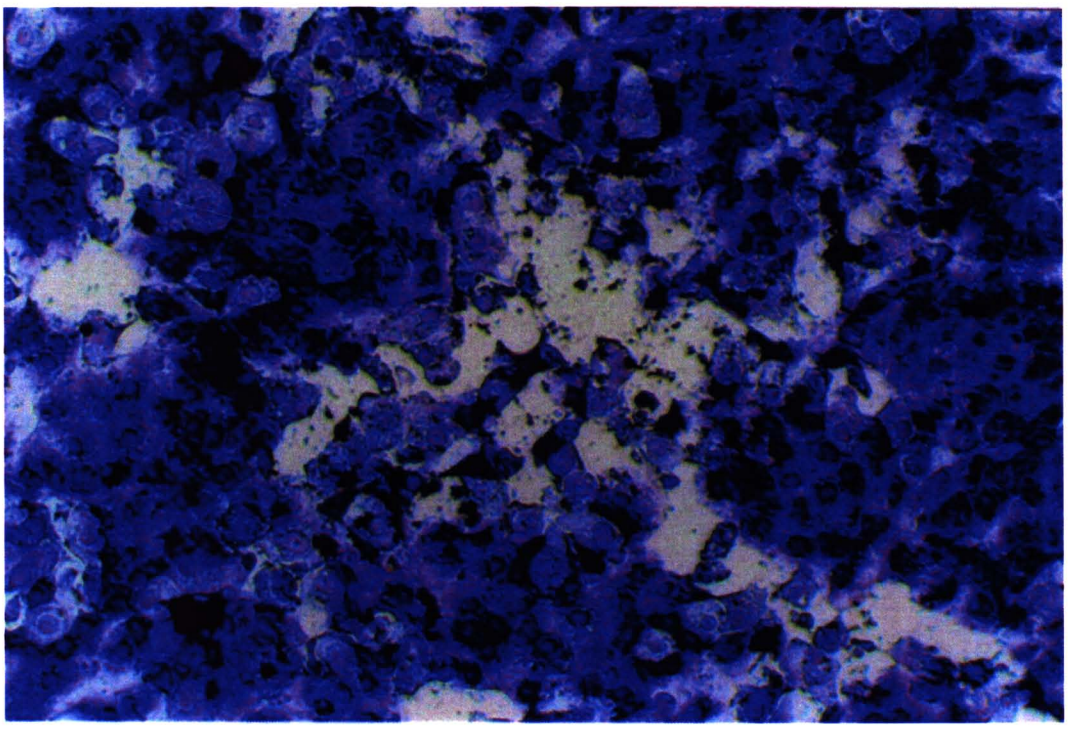
ภาพที่ 15 : แสดงเซลล์ MDCK ที่ถูกทำลายจากเชื้อไวรัสไข้หวัดนก หลังจากการเติมสารสกัดสมุนไพรขมิ้นชัน NKSS-6 ที่ความเข้มข้น 1.4 ng/mL



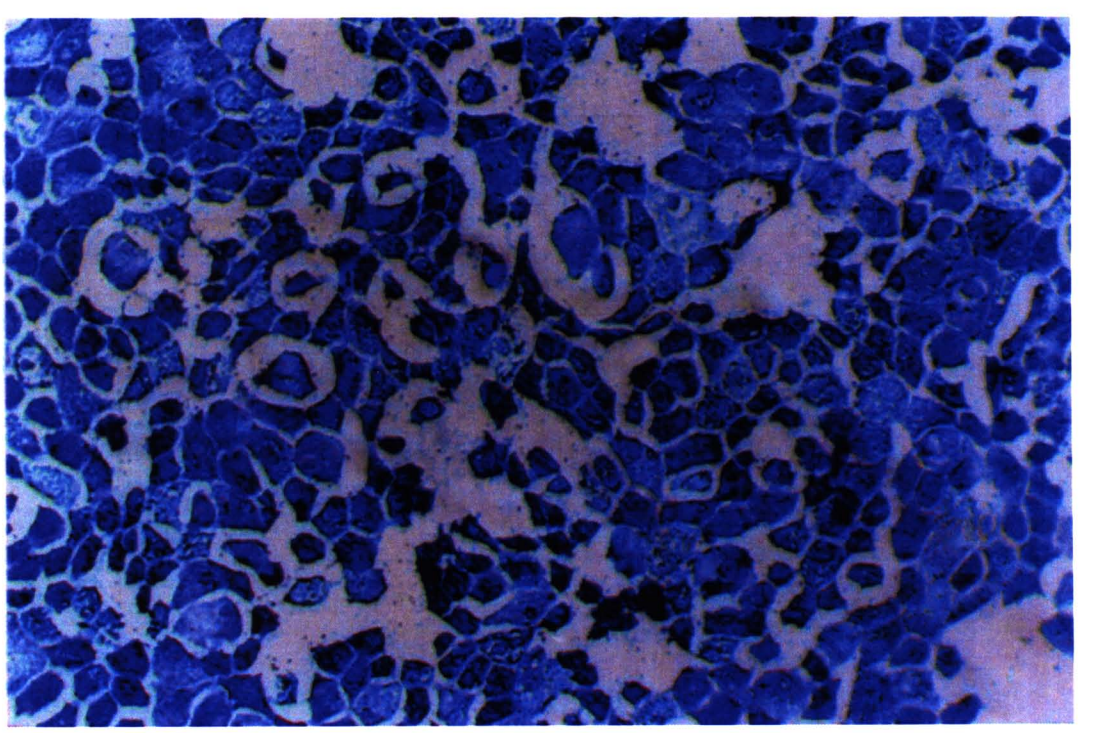
ภาพที่ 16 : แสดงเซลล์ MDCK ที่ถูกทำลายจากเชื้อไวรัสไข้หวัดนก หลังจากการเติมสารสกัดสมุนไพรขมิ้นชัน NKNL-3 ที่ความเข้มข้น 20 μg/mL



ภาพที่ 17 : แสดง Viral plague ในเซลล์ MDCK หลังจากการเติมสารสกัดสมุนไพรขมิ้นชัน NKNL-3 ที่ความเข้มข้น 200 ng/mL



ภาพที่ 18 : แสดง Viral plague ในเซลล์ MDCK หลังจากการเติมสารสกัดสมุนไพรขมิ้นชัน NKNL-3 ที่ความเข้มข้น 20 ng/mL



ภาพที่ 19 : แสดงเซลล์ MDCK ที่ถูกทำลายจากเชื้อไวรัสไข้หวัดนก หลังจากการเติมสารสกัดสมุนไพรขมิ้นชัน NKNL-3 ที่ความเข้มข้น 2 ng/mL