

การทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาฤทธิ์ยับยั้งไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพลกซ์ของสารสกัดสมุนไพรไทยบางชนิด



นางสาว ชติณัฏ์ กันตสุข

ศุภณีย์วิทยธรพยากร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาด้านหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2535

ISBN 974-581-157-2

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

018353

112 104 215

PRELIMINARY TEST FOR ANTI-HERPES SIMPLEX VIRUS ACTIVITY
OF EXTRACTS FROM SOME THAI MEDICINAL PLANTS



MISS CHUTINUN KANTASUK

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy
Department of Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

1992

ISBN 974-581-157-2

หัวข้อวิทยานิพนธ์ : การทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาฤทธิ์ยับยั้งไวรัสเฮอร์ปส์ซิมเพลกซ์ของสารสกัดสมุนไพรไทยบางชนิด
โดย : นางสาว ชุตินันท์ กันตสุข
ภาควิชา : จุลชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.ชโลบล อยู่สุข
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : รองศาสตราจารย์ ดร.วิมลมาศ ลิปิพันธ์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบัณฑิต

ดร.ถาวร วัชรากัญ

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชรากัญ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ดร.ศิริพร วัชรพงษ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์สारी วัชรพงษ์)

ศูนย์วิทยบริการ

ดร.ชโลบล อยู่สุข

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.ชโลบล อยู่สุข)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ดร.วิมลมาศ ลิปิพันธ์

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.วิมลมาศ ลิปิพันธ์)

ดร.พิเชษฐพงษ์ ทรัพย์เพชร

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิเชษฐพงษ์ ทรัพย์เพชร)



C275350 : ภาควิชาจุลชีววิทยา
คำสำคัญ : ไวรัสเซอร์ปัสซิซึมเพลกซ์/สมุนไพโรไทย

ชุดนิพนธ์ กั้นตสุข : การทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาฤทธิ์ยับยั้งไวรัสเซอร์ปัสซิซึมเพลกซ์ของสารสกัด
สมุนไพโรไทยบางชนิด. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : รศ.ดร.ชโลบล อยู่สุข และ
รศ.ดร.วิมลมาศ ลิปิพันธ์. จำนวน 173 หน้า.

การทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาฤทธิ์ในการต้านไวรัสเซอร์ปัสซิซึมเพลกซ์ทัยป์-1 และทัยป์-2 ของ
สมุนไพโรไทย 10 ชนิด ประกอบด้วย ใบน้ำเต้า ใบว่านมหากาฬ ใบพญาขอ ใบเสลดพังพอน เหง้าขมิ้นชัน
ใบชุมเห็ดเทศ ใบและก้านมะม่วง ใบน้อยหน่า และแก่นแกล แแบ่งตามวิธีการสกัดเป็น 2 ชนิด คือ สาร
สกัดด้วยน้ำและแอลกอฮอล์นำมาทดสอบหาความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์และความสามารถในการต้านไวรัส
เซอร์ปัสซิซึมเพลกซ์ทั้ง 2 ทัยป์ ที่ระดับความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดวีโร ด้วยวิธีการ
ตรวจวัดการลดลงของจำนวนพลาทที่เกิดขึ้นเมื่อเติมสมุนไพโรพร้อมกับไวรัส และเติมสมุนไพโรลงในอาหาร
เพาะเลี้ยงเซลล์หลังจากไวรัสเข้าสู่เซลล์แล้ว เปรียบเทียบกับอะซัยคลอเวียร์ซึ่งเป็นตัวควบคุม พบว่า
ใบน้ำเต้า (*Lagenaria leucantha* Rusby. วงศ์ Cucurbitaceae) และ ใบพญาขอ
(*Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau. วงศ์ Acanthaceae) ชนิดสกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์
ในการต้านไวรัสทั้ง 2 ทัยป์โดยตรงก่อนที่ไวรัสจะเข้าสู่เซลล์ ส่วนใบชุมเห็ดเทศ (*Cassia alata* L.
วงศ์ Leguminosae) ใบน้ำเต้า และ ใบบัวบก (*Centella asiatica* L. วงศ์ Umbelliferae)
ชนิดสกัดด้วยแอลกอฮอล์มีฤทธิ์ในการต้านไวรัสเซอร์ปัสซิซึมเพลกซ์เฉพาะทัยป์-2 ก่อนที่ไวรัสจะเข้าสู่เซลล์
ในขณะที่ใบและก้านมะม่วงเขียวเสวย (*Mangifera indica* L. วงศ์ Anacardiaceae)
ใบบัวบก และแก่นแกล (*Cudrania javanensis* Frec. วงศ์ Moraceae) ชนิดสกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์
ทำลายไวรัสโดยตรง และมีผลยับยั้งการเพิ่มปริมาณของไวรัสทั้ง 2 ทัยป์ภายในเซลล์ หลังจากไวรัส
เข้าสู่เซลล์แล้ว แต่สมุนไพโรเหล่านี้ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งไวรัสโพลีโอทัยป์-2 และเมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์
ในการต้านไวรัสเซอร์ปัสซิซึมเพลกซ์ทั้ง 2 ทัยป์กับอะซัยคลอเวียร์ พบว่า อะซัยคลอเวียร์มีฤทธิ์ในการ
ยับยั้งการเพิ่มปริมาณไวรัสภายในเซลล์ดีกว่าสมุนไพโรเหล่านี้ โดยปริมาณความเข้มข้นที่ใช้ยับยั้งไวรัส
ต่ำกว่ามาก

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา
สาขาวิชา.....เภสัชศาสตร์
ปีการศึกษา.....2534

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

C275350 : MICROBIOLOGY

KEY WORD : HERPES SIMPLEX VIRUS/THAI MEDICINAL PLANTS

CHUTINUN KANTASUK : PRELIMINARY TEST FOR ANTI-HERPES SIMPLEX VIRUS
ACTIVITY OF EXTRACTS FROM SOME THAI MEDICINAL PLANTS. THESIS
ADVISOR : ASSO. PROF. CHALOBON YOOSOOK, Ph.D. AND ASSO. PROF.
VIMOLMAS LIPIPAN, Ph.D. 173pp. ISBN 974-581-157-2

A preliminary test for anti-herpes simplex virus activity was performed to study 10 Thai medicinal plants that included Lagenaria leucantha Rusby., Gynura pseudochina Dc. var. hispidula Thv., Clinacanthus nutans (Burm. f.) Lindau., Barleria lupulina Lindl., Curcuma domestica L., Cassia alata L., Mangifera indica L., Annona squamosa L., Centella asiatica L., Cudrania javanensis Frec. Water and alcoholic extracts were determined for 50% cytotoxic concentration in Vero cells and effects on both types of herpes simplex virus investigated by plaque reduction assay. The extracts were added into cell culture either with the virus or after viral adsorption. The results demonstrated that water extracts from leaves of Lagenaria leucantha Rusby. (Cucurbitaceae) and Clinacanthus nutans (Burm. f.) Lindau. (Acanthaceae) have direct virucidal effects on HSV-1 and HSV-2 before viral adsorption onto cells. While alcoholic extracts from leaves of Cassia alata L. (Leguminosae), Lagenaria leucantha Rusby. and Centella asiatica L. (Umbelliferae) have only virucidal effects on HSV-2 before viral adsorption. The water extracts from leaves and branches of Mangifera indica L. (Anacardiaceae), leaves of Centella asiatica L. and woods of Cudrania javanensis Frec. (Moraceae) appeared to inhibit HSV-1 and HSV-2 not only before viral adsorption but also intracellular viral replication as well. However, these extracts did not inhibit plaque formation by poliovirus type-2 in Vero cells. Results of inhibitory doses of these extracts were also compared with that of acyclovir. The antiviral activity of acyclovir was better than those of crude extracts because of its lower inhibitory concentration.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา..... จุลชีววิทยา
สาขาวิชา..... เภสัชศาสตร์
ปีการศึกษา..... 2534

ลายมือชื่อนิสิต..... ช.วิจิตรพงศ์.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... ชัยณรงค์.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... วิมลมาส ลิปิพาน.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้สำเร็จลุล่วงไปด้วยความช่วยเหลือจากหลายท่าน ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณในความกรุณาและความช่วยเหลือที่ได้รับจาก รองศาสตราจารย์ ดร.ชาลบล อยู่สุข และ รองศาสตราจารย์ ดร.วิมลมาศ ลิปิพันธ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งท่านได้ให้ความแนะนำข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ อีกทั้งยังตลอดจนให้ความอนุเคราะห์ด้านต่างๆ รวมทั้งช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี พร้อมกันนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ สารี วิรุฬผลและ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิณทิพย์ พงษ์เพชร ที่กรุณาให้คำแนะนำและพิจารณาตรวจสอบแก้ไขเพิ่มเติม เพื่อให้วิทยานิพนธ์สมบูรณ์ยิ่งขึ้น และขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.นันทวัน บุณยะประภัศร หัวหน้าหน่วยข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่กรุณาเอื้อเฟื้อสารสกัดสมุนไพรสำหรับงานวิจัยครั้งนี้ นอกจากนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณ ดร.ภาวพันธ์ ภักทรโกศล ดร.वलันต์ จันทราทิตย์ และ อจ.วีระพงศ์ ลุลิตานนท์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำเกี่ยวกับเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและไวรัสเบื้องต้น ตลอดจนการใช้อุปกรณ์ได้อย่างถูกต้องและเหมาะสม

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ประจำห้อง Pr621 ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้อนุญาตและให้ความร่วมมืออย่างดีในการใช้ห้องทดลองสำหรับการทำวิจัยครั้งนี้ และเนื่องจากทุนการวิจัยครั้งนี้บางส่วนได้รับมาจากทุนอุดหนุนการวิจัยของบัณฑิตวิทยาลัย จึงขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัยมา ณ ที่นี้ด้วย

ท้ายที่สุดนี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และที่ ๆ ทุกท่าน ขอขอบคุณเพื่อนๆ น้อง ๆ ที่มีส่วนสนับสนุน กระตุ้น และให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

ชุตินันท์ กั่นคลุข

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญภาพ.....	ซ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฅ
บทที่	
1. บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	4
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	5
1.4 ประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัย.....	7
2. วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ไวร้สเริ่ม.....	8
2.2 โบลิโอไวร้ส.....	27
2.3 อะซัยคลอเวียร์.....	31
2.4 สมุนไพรไทยที่นำมาวิจัย	
2.4.1 น้ำเต้า.....	37
2.4.2 ว่านมหากาฬ.....	41
2.4.3 พญาอ.....	43
2.4.4 เสลดพังพอน.....	47
2.4.5 ขมิ้นชัน.....	51
2.4.6 ชุ่มเห็ดเทศ.....	60

	หน้า
2.4.7 มะม่วง.....	66
2.4.8 น้อยหน่า.....	70
2.4.9 บ๊วย.....	77
2.4.10 แกแล.....	83
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเรื่องการศึกษา.....	85
3. วิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 เชลล์เพาะเลี้ยง การเพาะเลี้ยงและการเก็บเชลล์เพาะเลี้ยง ในสภาพแช่แข็ง	
3.1.1 การเพาะเลี้ยง Vero cells	90
3.1.2 การเก็บ Vero cells ในสภาพแช่แข็ง.....	91
3.2 ไวรัส การเตรียม seed ไวรัส และการหาไตเตอร์ของไวรัส	
3.2.1 การเตรียม seed ไวรัส.....	92
3.2.2 การหาไตเตอร์ของ seed ไวรัส.....	93
3.3 สารสกัดจากพืชสมุนไพร.....	94
3.4 การศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิและ เวลาที่มีผลต่อไตเตอร์ของ HSV-1 และ HSV-2	96
3.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อเชลล์.....	98
3.5.1 polyvinyl pyrrolidone (PVP).....	98
3.5.2 อะซัยคลอเวียร์.....	99
3.5.3 สารสกัดสมุนไพร.....	99
3.6 การทดสอบความสามารถในการต้าน HSV ของอะซัยคลอเวียร์	100
3.7 การทดสอบความสามารถในการต้าน HSV ของสมุนไพร.....	101
3.8 การทดสอบความสามารถในการต้านไวรัสกลุ่มอื่นของสารสกัด สมุนไพรที่ทดสอบแล้วว่ามียกฤทธิ์ในการต้าน HSV.....	102

	หน้า
4. รายงานผลการวิจัย.....	103
5. วิเคราะห์และอภิปรายผลการวิจัย.....	119
6. สรุปการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	131
เอกสารอ้างอิง.....	134
ภาคผนวก.....	151
ประวัติผู้เขียน.....	161



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. คุณสมบัติแตกต่างระหว่าง HSV-1 และ HSV-2.....	13
2. ฤทธิ์ของสารต้านไวรัสชนิดต่าง ๆ ต่อไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพลกซ์.....	33
3. ฤทธิ์ของอะซัยคลอเวียร์ต่อเฮอร์ปีส์ไวรัสอื่น ๆ.....	34
4. น้ำหนักของสุมุนไพรรักษาและน้ำหนักของสารสกัดสุมุนไพรรักษาที่ได้.....	95
5. ค่าไตเตอร์เจ็ลลีย์และค่า log ของไตเตอร์ของ HSV-1 ที่สภาวะ อุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ กัน.....	103
6. ค่าไตเตอร์เจ็ลลีย์และค่า log ของไตเตอร์ของ HSV-2 ที่สภาวะ อุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ กัน.....	105
7. ค่า 50% cytotoxic dose (CD ₅₀) ของสารสกัดสุมุนไพรรักษา.....	109
8. ค่า 50% inhibitory dose (ID ₅₀) ของ ACV ต่อ HSV เมื่อ เติม ACV ลงไปพร้อมกับ HSV.....	112
9. ค่า 50% inhibitory dose (ID ₅₀) ของ ACV ต่อ HSV เมื่อ เติม ACV ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์หลังจากไวรัสเข้าสู่เซลล์แล้ว....	112
10. ค่า 50% inhibitory dose (ID ₅₀) ของสารสกัดสุมุนไพรรักษาไทย บางชนิดต่อ HSV เมื่อเติมสารสกัดสุมุนไพรรักษาพร้อมกับไวรัส.....	114
11. ค่า 50% inhibitory dose (ID ₅₀) ของสารสกัดสุมุนไพรรักษาไทย บางชนิดต่อ HSV เมื่อเติมสารสกัดสุมุนไพรรักษาในอาหารเพาะเลี้ยง เซลล์หลังจากไวรัสเข้าสู่เซลล์แล้ว.....	115
12. เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการต้าน HSV ของสารสกัดสุมุนไพรรักษา 2 วิธีโดยแสดงเป็นค่า ID ₅₀	117
13. ผลการทดลองและการเตรียมข้อมูลเพื่อการคำนวณหาค่า CD ₅₀	155
14. ตัวอย่างค่าสัมประสิทธิ์ของสหสัมพันธ์ (r) โดยใช้สมการแบบ linear และ log regression.....	159

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1. ส่วนประกอบโครงสร้างของอนุภาคไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพลกซ์.....	9
2. โครงสร้างของอะซัยคลอเวียร์และ deoxyguanosine.....	31
3. โครงสร้างแบบย่อของอะซัยคลอเวียร์และ deoxyguanosine.....	32
4. การสังเคราะห์อะซัยคลอเวียร์.....	32
5. น้ำเต้า.....	38
6. ว่านมหากาฬ.....	42
7. พญาอ.....	44
8. เสดคั้งพอน.....	48
9. ชมันชัน.....	52
10. ชุมเห็ดเทศ.....	61
11. มะม่วง.....	67
12. น้อยหน้า.....	71
13. บ้าบก.....	78
14. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า log ของไตเตอร์ของ HSV-1 กับเวลาที่สภาวะของอุณหภูมิต่าง ๆ กัน.....	104
15. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า log ของไตเตอร์ของ HSV-2 กับเวลาที่สภาวะของอุณหภูมิต่าง ๆ กัน.....	106
16. กราฟแสดงระยะตัดกันของ Y (intercept = a) และความลาด ของเส้นกตกอย (slope = b).....	158

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

สัญลักษณ์และคำย่อ	ความหมาย
ก.	กรัม
กก.	กิโลกรัม
ซม.	เซนติเมตร
° ซ.	องศาเซลเซียส
° ฟ.	องศาฟาเรนไฮต์
นน.	น้ำหนัก
มก.	มิลลิกรัม
มม.	มิลลิเมตร
มล.	มิลลิลิตร
ACV	acyclovir หรือ อะซัยคลอเวียร์
CD ₅₀	50% cytotoxic dose
CPE	cytopathic effect
ED ₅₀	50% effective dose
HSV	Herpes simplex virus หรือ เฮอร์ปีส์ซิมเพลกซ์ไวรัส
ID ₅₀	50% inhibitory dose
IgM	Immunoglobulin-M
M 199-GM	medium 199-growth medium
M 199-MM	medium 199-maintenance medium
PFU	plaque forming unit
PVP	polyvinyl pyrrolidone
TCID ₅₀	50% tissue culture infectious dose
>	มากกว่า หรือเท่ากับ
<	น้อยกว่า หรือเท่ากับ