สารที่มีฤทธิ์ต้านไวรัสเริมจากเอื้องมอนไข่

นายนราวิชญ์ วามานนท์ 5136582433

โครงการปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

เภสัชศาสตรบัณฑิต

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2555

Anti *Herpes Simplex* viral agents from *Dendrobium densiflorum*

Narawit Wamanon 5136582433

A Senior Project Submitted in Partial Fulfillment of Requirement

For the Bachelor of Science Program in Pharmacy

Chulalongkorn University

2012

หัวข้อโครงการปริญญานิพนธ์	สารที่มีฤทธิ์ต้านไวรัสเริมจากเอื้องมอนไข่
นิสิตผู้ดำเนินโครงการ	นายนราวิชญ์ วามานนท์
สาขาวิชา	เภสัชกรรมผลิตภัณฑ์ แขนงการค้นพบยา (เภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์)
อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์	รองศาสตราจารย์ เภสัชกร ดร.บุญชู ศรีตุลารักษ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ ดร.ศุภกาญจน์ ชำนิ

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้โครงการปริญญานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตร์บัณฑิต

.....คณบดี
(รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.พิณทิพย์ พงษ์เพ็ชร)

.....ประธานแขนงการค้นพบยา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.บุญศรี องค์พิพัฒนกุล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์
(รองศาสตราจารย์ เภสัชกร ดร.บุญชู ศรีตุลารักษ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(อาจารย์ ดร.ศุภกาญจน์ ชำนิ)

โครงการลำดับที่ 3.4

วันที่ 7 มกราคม 2556

บทคัดย่อปริญญานิพนธ์

ชื่อโครงการ(ภาษาไทย) : สารที่มีฤทธิ์ต้านไวรัสเริมจากเอื้องมอนไข่

ชื่อโครงการ(ภาษาอังกฤษ) : Anti *Herpes Simplex* viral agents from *Dendrobium densiflorum*

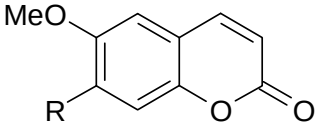
หัวหน้าโครงการ : นายนราวิชญ์ วามานนท์ 5136582433

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ : รศ.ภก.ดร.บุญชู ศรีตุลารักษ์ , อ.ดร.ศุภกาญจน์ ชำนิ

ภาควิชา : เภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์

โรคเริมเป็นโรคติดต่อที่เกิดจากเชื้อ *Herpes Simplex* Virus (HSV) ซึ่งมี 2 ชนิดคือ HSV-1 และ HSV-2 โดยมีอาการแสดงคือ เป็นรอยแดง ต่อมาจะกลายเป็นตุ่มน้ำใสกระจุกเป็นกลุ่ม ซึ่งจะแห้งใน 7-10 วัน และหายไปโดยไม่มีแผล อาจจะมีไข้ร่วมด้วย มักเป็นบริเวณปากและอวัยวะเพศ สามารถติดต่อได้จากน้ำลาย น้ำเหลือง หรืออสุจิของผู้ป่วย เป็นโรคที่ไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ และสามารถกลับมาเป็นซ้ำได้เมื่อมีปัจจัยกระตุ้น เช่น ความเครียด ร่างกายอ่อนแอ และพักผ่อนไม่เพียงพอ โดยยาที่ใช้ในการรักษาคือ Acyclovir แต่ในปัจจุบันเริ่มพบปัญหาเชื้อดื้อต่อยา acyclovir เพิ่มขึ้น การวิจัยเพื่อหาสารชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ต้านไวรัสเริมจากพืชสมุนไพรจึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่มีความน่าสนใจ และจากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัสเริมเบื้องต้นของสมุนไพรหลายชนิดด้วยวิธี Plaque reduction assay พบว่าสารสกัดหยาบจากเมทานอลของเอื้องมอนไข่ (*Dendrobium densiflorum*) สามารถต้านไวรัสเริมได้ร้อยละ 70 ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จึงเป็นที่มาของงานวิจัยนี้ เพื่อที่จะหาสารที่เป็นตัวออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัสเริม เพื่อเป็นสารต้นแบบและนำไปสู่การพัฒนาเป็นยาต่อไป

การศึกษาครั้งนี้สามารถแยกสารบริสุทธิ์ในกลุ่ม coumarins ได้ 2 ชนิดคือ scoparone (1)และ scopoletin(2)ซึ่งได้มีการพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารที่ได้โดยการวิเคราะห์สเปคตรัมของ MS และ NMR ร่วมกับการเปรียบเทียบข้อมูลของสารที่ทราบโครงสร้างแล้ว และเมื่อนำสารทั้ง 2 ตัวมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไวรัสเริมด้วยวิธี Plaque reduction assay พบว่าสารทั้ง 2 ตัวไม่มีฤทธิ์ยับยั้งไวรัสเริม (HSV-1 , HSV-2) โดยใช้ Acyclovir เป็น positive control



1 R = OMe

2 R = OH

ฝ่ายวิชาการ คณะเภสัชศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

.....

อาจารย์ที่ปรึกษา

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาโครงการปริญญานิพนธ์นี้ ผู้ศึกษาขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ เภสัชกร ดร.บุญชู ศรีตุลารักษ์ อาจารย์ที่ปรึกษา และอาจารย์ ดร.ศุภกาญจน์ ชำนิ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่อง ตลอดจนให้ความรู้และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อโครงการนี้

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.วิมลมาศ ลิปิพันธ์ ภาควิชาชีวเคมีและจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในการทดสอบฤทธิ์ต้านไวรัสเริมของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

ขอขอบคุณ พี่นิสิตปริญญาโท , นิสิตปริญญาเอก เพื่อนๆ และเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ สำหรับความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในด้านต่างๆ

คำนำ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรเภสัชศาสตรบัณฑิต ประจำปีการศึกษา 2555 โดยมุ่งเน้นให้นิสิตได้เรียนรู้ด้วยตนเอง มีการแก้ปัญหา วางแผนการปฏิบัติงาน เพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ตามเป้าหมายที่ได้วางไว้ โดยมีอาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม พี่นิสิตปริญญาโท นิสิตปริญญาเอก เพื่อนๆ และเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์เป็นผู้ให้คำปรึกษา ให้ความช่วยเหลือ และให้คำแนะนำจนกระทั่งงานประสบความสำเร็จ สำหรับหัวข้อปริญญานิพนธ์เล่มนี้ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งไวรัสเริมจากกล้วยไม้เอื้องมอนไข่ ซึ่งทางผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่า โครงการปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ จะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่เป็นประโยชน์สำหรับผู้ที่สนใจดำเนินงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการสกัดสารบริสุทธิ์ และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ รวมถึงหัวข้ออื่นๆที่เกี่ยวข้องต่อไปในอนาคต หากโครงการปริญญานิพนธ์ฉบับนี้มีข้อผิดพลาดประการใด ผู้วิจัยต้องขออภัยไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ผู้จัดทำ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

กิตติกรรมประกาศ ..... จ

คำนำ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ฌ

สารบัญรูปภาพ ..... ญ

บทที่

1. บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

2. ปริทัศน์วรรณกรรม 3

2.1 โรคเริม 3

2.2 งานวิจัยเกี่ยวกับพืชที่มีฤทธิ์ในการต้านไวรัสเริม 5

2.3 พืชที่นำมาใช้ในการวิจัย 7

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

3. วิธีดำเนินการวิจัย 9

3.1 พืชสมุนไพร อุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องมือ 9

3.2 การเตรียมสิ่งสกัดหยาบ 11

3.3 การสกัดแยกสารบริสุทธิ์ 12

3.4 การวิเคราะห์หาโครงสร้างโดย NMR spectroscopy 18

3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านไวรัสเริม 18

แผนภูมิการสกัดสารจากกล้วยไม้เอื้องมอนไข่ 19

4. ผลการวิจัย 20

4.1 การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างด้วย NMR spectroscopy 20

4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านไวรัสเริม 22

5. อภิปรายและสรุปผลการวิจัย 23

รายการอ้างอิง 24

ภาคผนวก 26

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงการแยก fraction จากสิ่งสกัดหยาบ 12

ตารางที่ 2 แสดงการแยก fraction จาก fraction V 13

ตารางที่ 3 แสดงการแยก fraction จาก fraction 14-18 16

ตารางที่ 4 แสดงการแยก fraction จาก fraction 21-22 17

ตารางที่ 5 ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR ของ DDen 4 (1) และ scoparone 20

ตารางที่ 6 ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR ของ DDen 6 (2) และ scopoletin 21

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 โครงสร้างของ naphthoquinones 5

รูปที่ 2 โครงสร้างของ flavonoids 5

รูปที่ 3 ตัวอย่างสาร monoterpenoids ที่พบใน volatile oils 6

รูปที่ 4 เอื้องมอนไข่ *Dendrobium densiflorum* Lindl. ex Wall. 8

รูปที่ 5 TLC แสดงการแยก fraction จากสิ่งสกัดหยาบภายใต้ UV 254 nm 13

รูปที่ 6 TLC แสดงการแยก fraction ย่อยจาก fraction V ภายใต้ UV 254 nm 15

รูปที่ 7 TLC แสดงการแยก fraction ย่อยจาก fraction 14-18 ภายใต้ UV 254 nm 16

รูปที่ 8 TLC แสดงการแยก fraction ย่อยจาก fraction 21-22 ภายใต้ UV 254 nm 17

รูปที่ 9 โครงสร้างทางเคมีของ scoparone 21

รูปที่ 10 โครงสร้างทางเคมีของ scopoletin 22

บทที่ 1

บทนำ

<u>ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา</u>

โรคเริมเป็นโรคติดต่อที่เกิดจากเชื้อ *Herpes Simplex* Virus (HSV) ซึ่งมี 2 ชนิดคือ HSV-1 และ HSV-2 โดยมีอาการแสดงคือ เป็นรอยแดง ต่อมาจะกลายเป็นตุ่มน้ำใสกระจุกเป็นกลุ่ม ซึ่งจะแห้งใน 7-10 วัน และหายไปโดยไม่มีแผล อาจจะมีไข้ร่วมด้วย มักเป็นบริเวณปากและอวัยวะเพศ สามารถติดต่อได้จากน้ำลาย น้ำเหลือง หรืออสุจิของผู้ป่วย เป็นโรคที่ไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ เพราะเชื้อสามารถเข้าไปหลบอยู่ในปมประสาท และสามารถกลับมาเป็นซ้ำได้เมื่อมีปัจจัยกระตุ้น เช่น ความเครียด ร่างกายอ่อนแอ และพักผ่อนไม่เพียงพอ

ในปัจจุบันยาที่ใช้ในการรักษาคือ acyclovir ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายคลึงกับ nucleoside โดยรับประทาน 200 mg 5 ครั้ง ทุก 4 ชั่วโมง 10-14 วัน หรือ 400 mg 3 ครั้ง ทุก 8 ชั่วโมง 10-14 วัน สำหรับการเป็นครั้งแรก และ 400 mg 3 ครั้ง ทุก 8 ชั่วโมง 5 วัน สำหรับการเป็นซ้ำ[1]

ในปัจจุบันเริ่มพบปัญหาเชื้อดื้อต่อยา acyclovir เนื่องจากเชื้อมีการปรับเปลี่ยนเอนไซม์ thymidine kinase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้เติมหมู่ phosphate ให้กับ acyclovir ทำให้ยาไม่ถูกเติมหมู่ phosphate จึงไม่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งไวรัสได้[2] การวิจัยเพื่อหาสารชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ต้านไวรัสเริมจากพืชสมุนไพรจึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่มีความน่าสนใจ และจากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัสเริมเบื้องต้นของสมุนไพรหลายชนิดด้วยวิธี Plaque reduction assay พบว่าสารสกัดหยาบจากเมทานอลของเอื้องมอนไข่ (*Dendrobium densiflorum*) สามารถต้านไวรัสเริมได้ร้อยละ 70 ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จึงเป็นที่มาของงานวิจัยนี้ เพื่อที่จะหาสารที่เป็นตัวออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัสเริม เพื่อเป็นสารต้นแบบและนำไปสู่การพัฒนาเป็นยาต่อไป

<u>วัตถุประสงค์ของการวิจัย</u>

1. เพื่อสกัดสารบริสุทธิ์จากเอื้องมอนไข่
2. เพื่อศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้
3. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารที่แยกได้ในการต้านไวรัสเริมเปรียบเทียบกับ acyclovir

<u>ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ</u>

1. ค้นพบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัสเริม
2. สามารถนำผลการทดลองที่ได้มาเป็นความรู้พื้นฐานเพื่อนำไปพัฒนาเป็นยาต่อไปในอนาคต

บทที่ 2

ปริทัศน์วรรณกรรม

2.1 โรคเริม[3]

สาเหตุ

เป็นโรคติดต่อที่เกิดจากเชื้อไวรัส คือ *Herpes Simplex* Virus (HSV) ซึ่งมี 2 ชนิดคือ HSV-1 (มักก่อให้เกิดเริมตามบริเวณผิวหนังและในช่องปากเป็นส่วนใหญ่) และ HSV-2 (มักก่อให้เกิดเริมที่อวัยวะเพศ) สามารถติดต่อได้จากน้ำลาย น้ำเหลือง หรืออสุจิของผู้ป่วย

อาการ

แรกเริ่มจะเป็นรอยแดงๆ ก่อน ร่วมกับมีอาการแสบๆ คันๆ ต่อมาจะกลายเป็นตุ่มน้ำใสกระจุกกันเป็นกลุ่ม ขนาด 2-3 มิลลิเมตรจากนั้นตุ่มน้ำใสนี้จะกลายเป็นสีเหลืองแล้วแตกเป็นสะเก็ด หายไปเองโดยไม่มีแผลใน 7-10 วัน อาจจะมีไข้ร่วมด้วย โดยตำแหน่งที่พบบ่อย ได้แก่ ริมฝีปาก แก้ม จมูก หู ตา ก้น อวัยวะเพศ นอกจากนี้ ต่อมน้ำเหลืองบริเวณใกล้เคียงมักโตและเจ็บด้วย เป็นโรคที่ไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ เพราะเชื้อสามารถเข้าไปหลบอยู่ในปมประสาท และสามารถกลับมาเป็นซ้ำได้เมื่อมีปัจจัยกระตุ้น เช่น ความเครียด ร่างกายอ่อนแอ และพักผ่อนไม่เพียงพอ ประจำเดือน เป็นต้น

อาการแทรกซ้อน

- บริเวณตุ่มอาจกลายเป็นหนองหรือแผลพุพอง (เป็นอาการอักเสบเนื่องจากเกิดการติดเชื้อแบคทีเรียร่วมด้วย)
- อาจทำให้สมองอักเสบ (meningitis / encephalitis) ซึ่งพบน้อยมาก
- ถ้าเกิดที่ตา อาจทำให้กระจกตาอักเสบ (keratitis) ถึงขั้นตาบอดได้
- ในหญิงตั้งครรภ์ เชื้ออาจผ่านเข้าสู่รก ทำให้ทารกพิการได้ หรือทารกที่คลอดออกมาอาจได้รับเชื้อทางช่องคลอดจนเสียชีวิตได้
- ถ้าติดเชื้อที่ปากมดลูก ทำให้มีโอกาสเป็นมะเร็งปากมดลูกเพิ่มขึ้น

การรักษา

1. รักษาตามอาการ เช่น ถ้าปวดหรือมีไข้ ให้ยาแก้ปวดลดไข้ ถ้าแสบคัน ทาด้วยยาแก้ผดผื่นคัน ไม่ควรใช้ topical steroids เพราะจะทำให้ติดเชื้อแทรกซ้อนได้ ขณะที่เป็นตุ่มน้ำใสระยะแรก อาจใช้เข็มสะกิดให้แตก แล้วเช็ดแผลด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ

2. ในผู้ป่วยเด็ก ให้ดื่มน้ำมากๆ บ้วนปากด้วยน้ำเกลือ แล้วใช้เจนเชียนไวโอเลตป้ายในช่องปากวันละ 3-4 ครั้ง

3. ถ้าเป็นรุนแรงหรือติดเชื้อในตาดำควรรีบไปพบแพทย์ทันที

- กระจกตาอักเสบจากไวรัสเริม : trifluridine eye drop 1% หยอดครั้งละ 1 หยด วันละ 9 ครั้ง ห่าง 2-3 ชั่วโมง หรือ acyclovir ointment 3% ป้ายวันละ 5 ครั้ง นาน 1-2 สัปดาห์

- เริมที่อวัยวะเพศ : รับประทาน acyclovir 200 mg วันละ 5 ครั้ง ครั้งละ 1 เม็ด ทุก 4 ชั่วโมง 10-14 วัน หรือ 400 mg 3 ครั้ง ทุก 8 ชั่วโมง 10-14 วัน สำหรับการเป็นครั้งแรก และ 400 mg 3 ครั้ง ทุก 8 ชั่วโมง 5 วัน สำหรับการเป็นซ้ำ อาจใช้ acyclovir cream 5% หรือครีมพญายอทาร่วมด้วย เพื่อให้แผลหายเร็วขึ้น

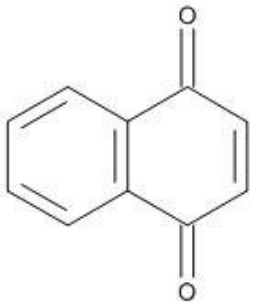
ข้อแนะนำ

- เนื่องจากเป็นโรคติดต่อ ไม่ควรใช้สิ่งของร่วมกับผู้ป่วย และควรงดการมีเพศสัมพันธ์ในช่วงที่มีอาการของโรค
- ในผู้ป่วยหญิง ถ้าเป็นที่ปากมดลูก ควรตรวจหามะเร็งปากมดลูกปีละครั้ง ในรายที่ตั้งครรภ์หรือใกล้คลอด ควรพบแพทย์เพื่อผ่าตัดคลอดทางช่องท้อง
- ผู้ที่โรคกำเริบถี่มาก เป็นรุนแรงหรือเป็นแผลเรื้อรังเกิน 1 เดือน ควรตรวจเลือดหาเชื้อ HIVs เพราะอาจจะเป็นเอดส์ได้

2.2 งานวิจัยเกี่ยวกับพืชที่มีฤทธิ์ในการต้านไวรัสเริม

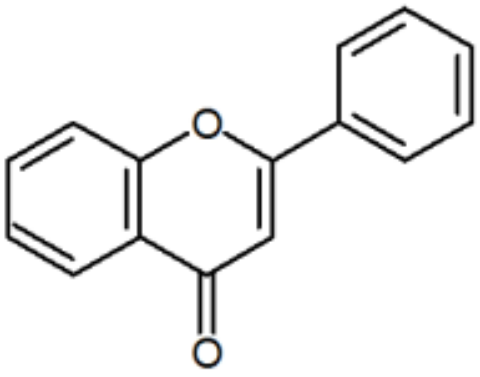
ในธรรมชาติมีสารจากพืชสมุนไพรหลายชนิดที่มีฤทธิ์ในการต้านไวรัสเริม โดยในที่นี้จะยกตัวอย่างเป็นกลุ่มสาร ได้แก่

1. สารสกัดจากใบทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus*)ในน้ำ และเอทานอล เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านไวรัสเริม ด้วยวิธี plaque reduction assay พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อไวรัส *Herpes simplex* type1 (HSV-1) ได้ จากศึกษาองค์ประกอบทางเคมีพบว่าสารที่ออกฤทธิ์คือ rhinacanthin ซึ่งเป็นสารประกอบในกลุ่ม naphthoquinones[4,5]



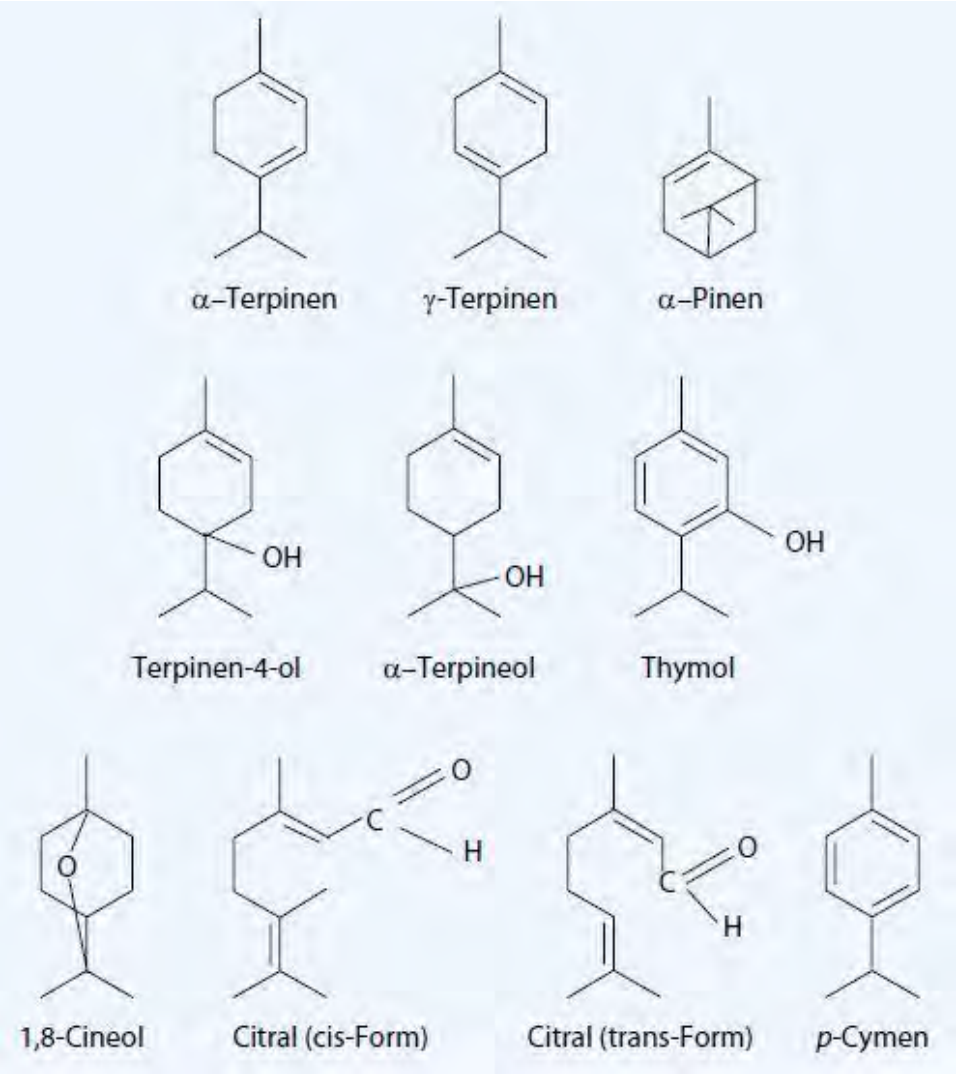
รูปที่ 1 โครงสร้างของ naphthoquinones

2. จากการศึกษาพบว่า สารประกอบ flavonoids หลายชนิดเช่น catechin และอนุพันธ์ , naringenin , quercetin เป็นต้น สามารถยับยั้งเชื้อไวรัส *Herpes simplex* ได้[6]



รูปที่ 2 โครงสร้างของ flavonoids

3. จากการศึกษาพบว่า สารประกอบ monoterpenoids ใน volatile oil หลายชนิด เช่น balm oil, tea tree oil , peppermint oil เป็นต้น สามารถยับยั้งเชื้อไวรัส *Herpes simplex* ที่ดื้อต่อ acyclovir ได้ในหลอดทดลอง [7]



รูปที่ 3 ตัวอย่างสาร monoterpenoids ที่พบใน volatile oils (Schnitzler P, Reichling J. Efficacy of plant products against herpetic infections. HNO. 2011; 59(12): 1176-84.)

2.3 พืชที่นำมาใช้ในการวิจัย[8]

ชื่อไทย : เอื้องมอนไข่

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Dendrobium densiflorum* Lindl. ex Wall.

ชื่ออื่นๆ : เอื้องมอนไข่เหลี่ยม , เอื้องมอนไข่เหลือง , เอื้องมอนคำ

วงศ์ : Orchidaceae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์: ราก เป็นแบบรากกึ่งอากาศ ลำต้น ลักษณะ เป็นลำลูกกล้วยสูง 30-45 ซม. ลำเป็นสี่เหลี่ยม เส้นผ่านศูนย์กลาง 2 ซม. ใบ หนา รูปไข่ ปลายแหลม มีประมาณ 3-4 ใบ ใกล้ปลายลำ ใบยาวประมาณ 12-18 ซม. ช่อ ดอกเป็นช่อห้อย ดอกค่อนข้างแน่น มีจำนวนดอกได้ถึง 50 ดอกต่อช่อ ขนาดดอก 3-5 ซม. ดอกมีสีขาวจนถึงเหลือง ปากมีสีส้ม มีกลิ่นหอม ออกดอกในช่วงเดือนสิงหาคมถึงกันยายน ดอกบานนาน 1-2 สัปดาห์

แหล่งที่พบ : ภาคเหนือ และ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน

การใช้ประโยชน์ : ในประเทศจีนใช้เป็นยาบำรุงกระเพาะอาหาร ลดไข้ กระตุ้นการสร้างสารคัดหลั่งต่างๆในร่างกาย

สารเคมีที่พบ : พบหลายกลุ่มเช่น coumarins , phenanthrenes , flavonoids เป็นต้น[9]

รูปที่ 4 เอื้องมอนไข่ *Dendrobium densiflorum* Lindl. ex Wall.

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 พืชสมุนไพร อุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องมือ

พืชสมุนไพร

กล้วยไม้เอื้องมอนไข่ *(Dendrobium densiflorum)* ซื้อจากร้านค้าในตลาดนัดสวนจตุจักร น้ำหนักแห้ง 0.6 Kg

อุปกรณ์

1. Erlenmeyer flask ขนาด 250 ml , 500 ml และ 1000 ml

2. Stirring rod

3. Column chromatography ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 นิ้ว และ 2 นิ้ว

4. Dropper

5. Stainless steel tank

6. Round bottom flask ขนาด 500 ml

7. TLC tank

8. TLC silica gel 60 F_{254}

9. Aluminium foil

10. Cylinder ขนาด 10 ml , 50 ml , 100 ml และ 500 ml

11. Beaker ขนาด 50 ml , 100 ml , 250 ml และ 500 ml

12. Forcep

13. Capillary tube

14. ขวดรับ fraction

15. สำลี

สารเคมี

1. Silica gel 60

2. Sephadex LH 20

3. Hexane

4. Dichloromethane

5. Ethyl acetate

6. Acetone

7. Methanol

เครื่องมือ

1. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (AG-135)

2. Rotary evaporator (Buchi rotavapor R-114)

3. Aspirator (Vacuum pump : Buchi B-169)

4. เครื่องกลั่น solvent

5. Dessicator

6. เครื่องฉายแสง UV (254 nm และ 365 nm)

7. Sonicator

8. NMR spectrophotometer

3.2 การเตรียมสิ่งสกัดหยาบ

นำกล้วยไม้เอื้องมอนไข่มาล้างให้สะอาด บดหยาบๆให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปอบให้แห้ง ได้น้ำหนักแห้ง 0.6 กิโลกรัม จากนั้นนำมาแช่สกัดด้วยวิธี maceration โดยใช้ methanol เป็นตัวทำละลาย เริ่มจากนำกล้วยไม้ที่บดหยาบและอบแห้งแล้วใส่ลงใน stainless steel tank เติม methanol ลงไป ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ไขเก็บสารละลาย methanol ไว้ จากนั้นแช่ด้วย methanol ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง นำสารละลาย methanol ที่ได้ทั้งหมดมาระเหยตัวทำละลายออกไปจนแห้งภายใต้ความดันต่ำด้วยเครื่อง rotary evaporator ได้สิ่งสกัดหยาบปริมาณ 50 กรัม

3.3 การสกัดแยกสารบริสุทธิ์

นำสิ่งสกัดหยาบที่ได้มาแยกโดยนำไปผ่าน quick column chromatography ซึ่งใช้ silica gel เป็น stationary phase และ mobile phase ดังนี้

Fractions ที่ 1-5	:	Hexane
Fractions ที่ 6-10	:	5 % EtOAc/hexane
Fractions ที่ 11-15	:	10 % EtOAc/hexane
Fractions ที่ 16-20	:	20 % EtOAc/hexane
Fractions ที่ 21-25	:	30 % EtOAc/hexane
Fractions ที่ 26-30	:	40 % EtOAc/hexane
Fractions ที่ 31-35	:	50% EtOAc/hexane

Fractions ที่ 36-40 : EtOAc

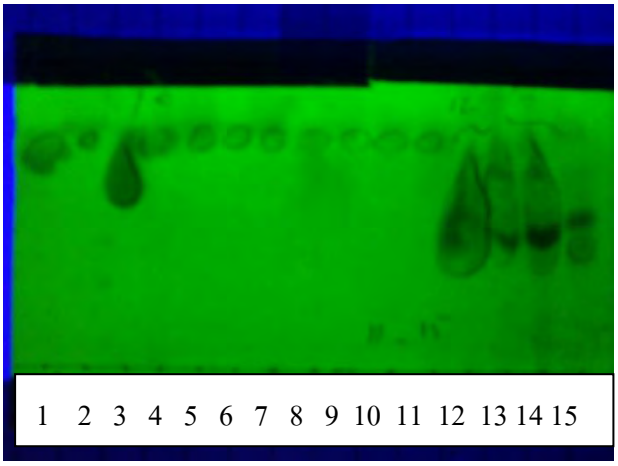
Fractions ที่ 41-42 : Acetone

Fractions ที่ 43-46 : MeOH

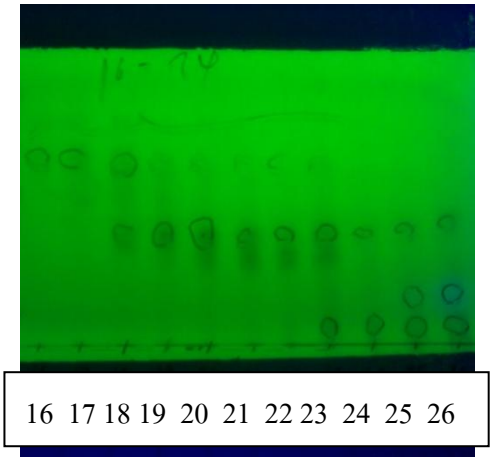
รับ fraction ครั้งละ 500 ml นำ fraction ที่เก็บได้ไปนำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator แล้วตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีโดยใช้ thin layer chromatography (TLC normal phase : silica gel) โดยใช้ระบบตัวทำละลายคือ 10% EtOAc/hexane , 50% EtOAc/hexane และ EtOAc นำ fraction ที่มีลักษณะเหมือนกันบนแผ่น TLC มารวมกันได้ 8 fraction

ตารางที่ 1 แสดงการแยก fraction จากสิ่งสกัดหยาบ

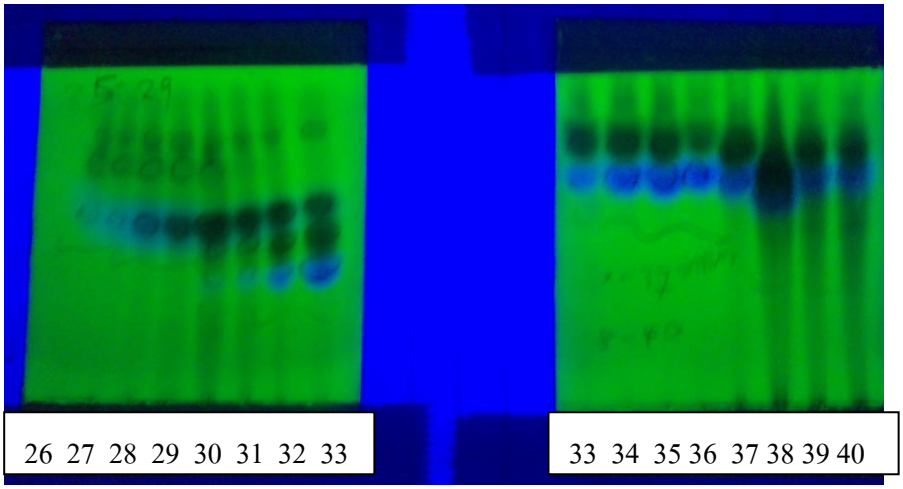
Fraction	น้ำหนักสาร(กรัม)
I(1-10)	0.12
II(11-15)	0.32
III(16-24)	1.20
IV(25-29)	0.50
V(30-37)	2.04
VI(38-40)	2.50
VII(41-45)	3.90
VIII(46)	30.00



ก.



ข.



ค.

รูปที่ 5 TLC แสดงการแยก fraction จากสิ่งสกัดหยาบภายใต้ UV 254 nm

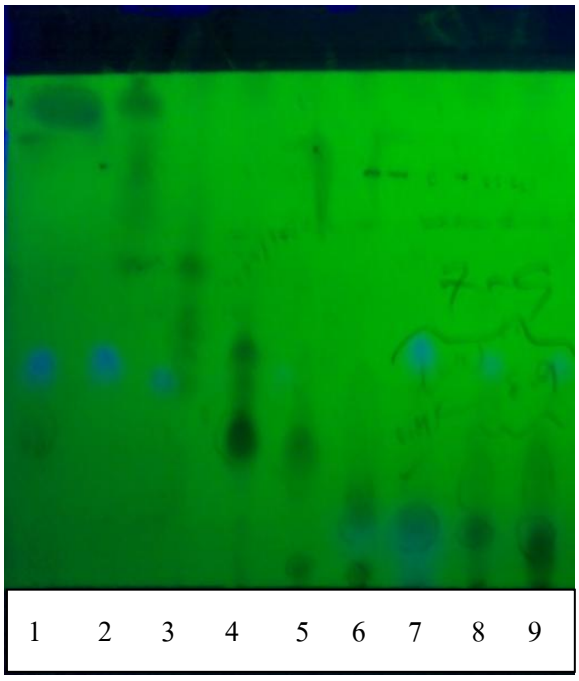
ก) fractions 1-15 ข) fractions 16-26 ค) fractions 26-40

นำ fraction V (2.04 กรัม) มาผ่าน column chromatography (CC ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 นิ้ว) ซึ่งใช้ silica gel เป็น stationary phase และ mobile phase คือ EtOAc และ hexane โดยค่อยๆเพิ่มความมีขั้วของตัวทำละลาย ตามด้วย acetone สุดท้ายจึงชะด้วย methanol เก็บ fraction ได้ 30 fraction จากนั้นนำ fraction ที่เก็บได้ไปนำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator แล้วตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีโดยใช้ TLC (silica gel) โดยใช้ระบบตัวทำละลายคือ 10 % EtOAc/hexane และ 50% EtOAc/hexane นำ fraction ที่มีลักษณะเหมือนกันบนแผ่น TLC มารวมกันได้ดังนี้

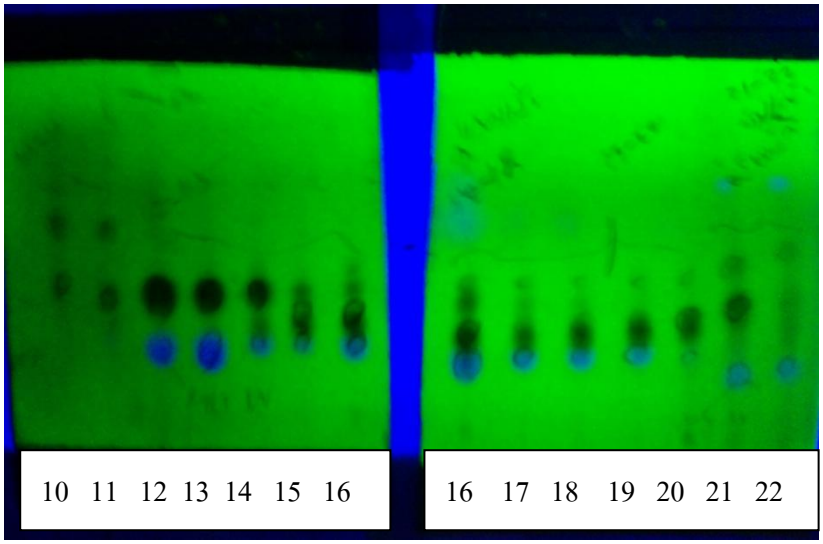
ตารางที่ 2 แสดงการแยก fraction จาก fraction V

Fraction	น้ำหนักสาร(มิลลิกรัม)
1	343
2	57
3	28
4	41
5	107
6	86
7	50

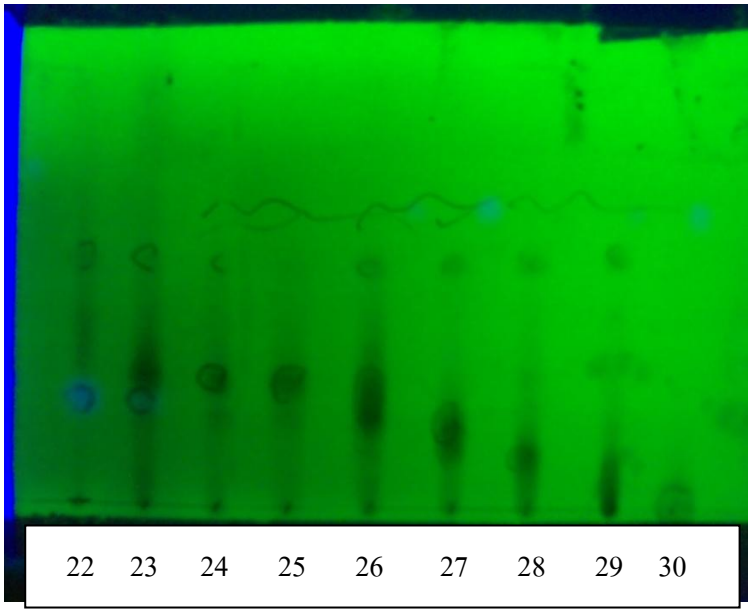
Fraction	น้ำหนักสาร(มิลลิกรัม)
8-9	86
10-11	41
12-13	241
14-18	713
19-20	88
21-22	56
23	27
24-25	21
26-27	60
28	33
29-30	38



ก.



ข.



ค.

รูปที่ 6 TLC แสดงการแยก fraction ย่อยจาก fraction V ภายใต้ UV 254 nm

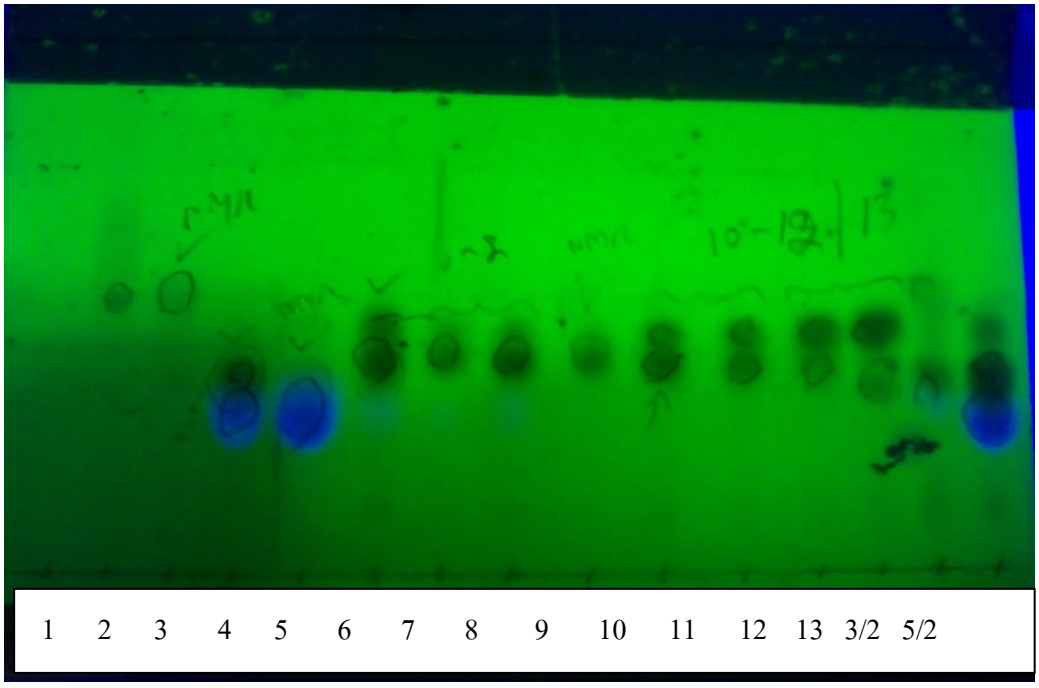
ก) fractions 1-9 ข) fractions 10- 22 ค) fractions 22-30

นำ fractions 14-18 (713 มิลลิกรัม) มาผ่าน column chromatography (เส้นผ่านศูนย์กลาง 1 นิ้ว) ซึ่งใช้ sephadex LH-20 เป็น stationary phase (แยกสารตามขนาดโมเลกุล) และ mobile phase คือ acetone เก็บ fraction ได้ 13 fraction จากนั้นนำ fraction ที่เก็บได้ไปนำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator แล้วตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีโดยใช้ TLC (silica gel) โดยใช้ระบบตัวทำละลายคือ 50% EtOAc/hexane นำ fraction ที่มีลักษณะเหมือนกันบนแผ่น TLC มารวมกันได้ดังนี้

ตารางที่ 3 แสดงการแยก fraction จาก fractions 14-18

Fraction	น้ำหนักสาร(มิลลิกรัม)
1	79
2	16
3	17
4	161
5	215
6-8	31
9	17
10-12	11
13	6

นำ fraction 5 มาตกผลึกซ้ำด้วย MeOH ได้สารบริสุทธิ์ มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็ม ไม่มีสี ตั้งชื่อสารว่า DDen 4 (**1**) น้ำหนัก 61 mg



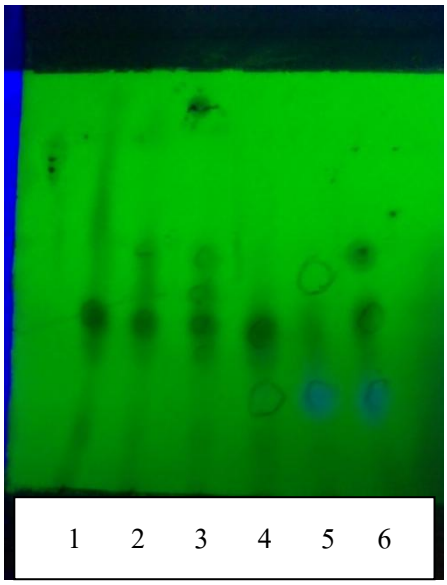
รูปที่ 7 TLC แสดงการแยก fraction ย่อยจาก fractions 14-18 ภายใต้ UV 254 nm

จากนั้นนำ fractions 21-22 (56 มิลลิกรัม) จาก fraction V มาผ่าน sephadex LH-20 column ชะด้วย acetone เก็บ fraction ได้ 6 fraction จากนั้นนำ fraction ที่เก็บได้ไปนำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator แล้วตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีโดยใช้ TLC (silica gel) โดยใช้ระบบตัวทำละลายคือ 50% EtOAc/hexane นำ fraction ที่มีลักษณะเหมือนกันบนแผ่น TLC มารวมกันได้ดังนี้

ตารางที่ 4 แสดงการแยก fraction จาก fractions 21-22

Fraction	น้ำหนักสาร(มิลลิกรัม)
1	17
2-3	32
4	8
5	15
6	4

นำ fraction 5 มาตกผลึกซ้ำด้วย MeOH ได้สารบริสุทธิ์ มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็ม ไม่มีสี ตั้งชื่อสารว่า DDen 6 (**2**) น้ำหนัก 1 mg



รูปที่ 8 TLC แสดงการแยก fraction ย่อยจาก fractions 21-22 ภายใต้ UV 254 nm

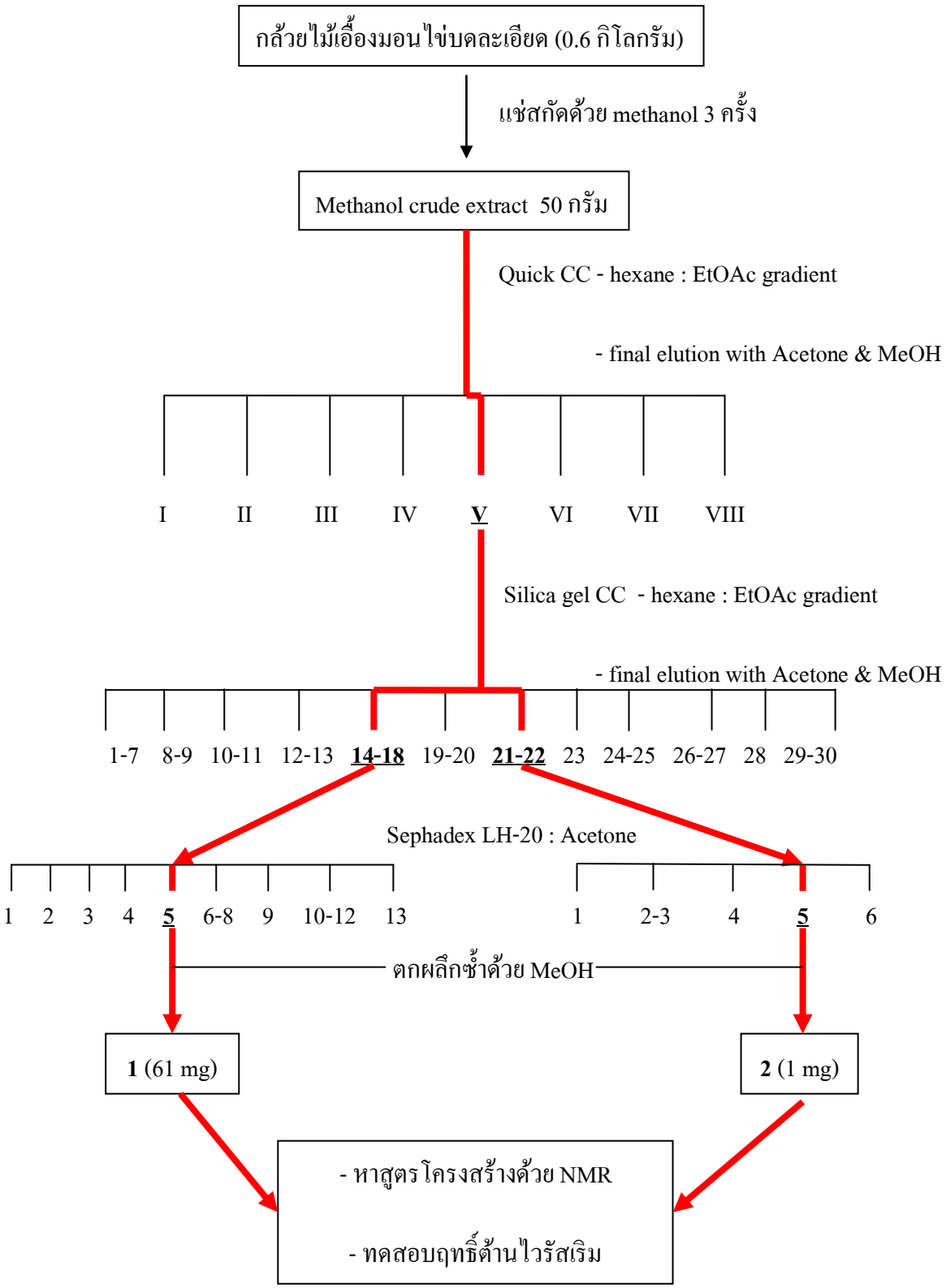
3.4 การวิเคราะห์หาโครงสร้าง NMR spectroscopy

ละลายสาร DDen 4 (**1**) และ DDen 6 (**2**) ใน $CDCl_3$ วิเคราะห์ผลด้วย ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR และเปรียบเทียบ spectrum กับสารที่เคยที่การรายงานในงายวิจัยจากการปริทัศน์วรรณกรรม

3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านไวรัสเริม

ส่งสารไปทดสอบฤทธิ์ต้านไวรัสเริม ที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีวเคมีและจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยความอนุเคราะห์ของรองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.วิมล มาศ ลิปิพันธ์ โดยทำการทดสอบกับเชื้อไวรัส *Herpes Simplex* type I (HSV-1) และ *Herpes Simplex* type II (HSV-2) ด้วยวิธี Plaque reduction assay (เป็นวิธีการตรวจหาปริมาณไวรัส หรือ Quantitative assay) ซึ่งจะเป็นการนำเชื้อ HSV-1 และ HSV-2 มา infect ใน vero cells ที่อยู่ใน 96-well microtiter plates จากนั้นนำสารที่ต้องการทดสอบในความเข้มข้นต่างๆกับ medium เติมลงไปในแต่ละ wells นำไป incubate ไว้ 3 วันที่ 35 - 37 °C จากนั้นย้อมสีด้วยสี Neutral red , สี Tryphan blue หรือสี crystal violet เสร็จแล้วล้างสีออก บริเวณของ cell monolayer ที่ติดเชื้อไวรัสจะเป็นช่องว่างไม่ติดสีเรียกว่า plaque ซึ่งแต่ละ plaque อาจถือได้ว่าเกิดจากไวรัส 1 ตัว หน่วยที่ใช้นับ Plaque คือ Plaque Forming Unit/ml (PFU/ml)[10] จากนั้นประเมินผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของไวรัสโดยวิธีการนับ virus plate forming บน vero cells เปรียบเทียบกับ acyclovir ซึ่งใช้เป็น positive control

แผนภูมิการสกัดสารจากกล้วยไม้เอื้องมอนไข่



บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างด้วย NMR spectroscopy

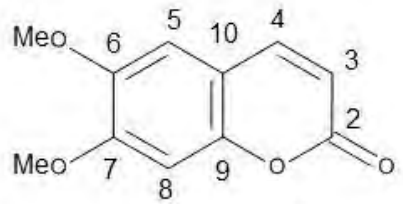
4.1.1 สาร DDen 4 (1)

จากการวิเคราะห์ด้วย NMR มีค่าดังตารางนี้[11]

ตารางที่ 5 ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR ของ DDen 4 (**1**) และ scoparone

Position	DDen 4 ($CDCl_3$)		Scoparone ($CDCl_3$)	
	^{1}H(mult.,*J* in Hz)	^{13}C	^{1}H(mult.,*J* in Hz)	^{13}C
2	-	161.3	-	161.1
3	6.26 (d,9.5)	113.4	6.30 (d,9.6)	113.2
4	7.61 (d,9.5)	143.2	7.95 (d,9.6)	144.9
5	6.85 (s)	108.0	7.26 (s)	109.4
6	-	146.3	-	146.4
7	-	149.9	-	149.9
8	6.81 (s)	99.9	7.08 (s)	100.5
9	-	152.8	-	153.1
10	-	111.3	-	111.7
OMe-6	3.90 (s)	56.2	3.81 (s)	56.4
OMe-7	3.93 (s)	56.3	3.87 (s)	56.7

จากการวิเคราะห์ด้วย ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR ของ DDen 4 (**1**) เปรียบเทียบกับสารที่มีการรายงาน พบว่า สาร DDen 4 (**1**) คือ scoparone โดยมีโครงสร้างดังนี้



รูปที่ 9 โครงสร้างทางเคมีของ scoparone

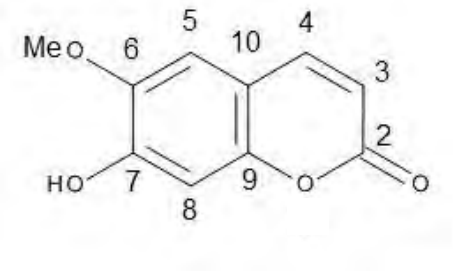
4.1.2 สาร DDen 6 (2)

จากการวิเคราะห์ด้วย NMR มีค่าดังตารางนี้[12,13]

ตารางที่ 6 ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR ของ DDen 6 (**2**) และ scopoletin

Position	DDen 6 ($CDCl_3$)		Scopoletin ($CDCl_3$)	
	^{1}H(mult.,*J* in Hz)	^{13}C	^{1}H(mult.,*J* in Hz)	^{13}C
2	-	161.5	-	161.5
3	6.29 (d,9.5)	113.4	6.28 (d,9.5)	113.4
4	7.61 (d,9.5)	143.3	7.60 (d,9.5)	143.3
5	6.86 (s)	107.5	6.85 (s)	107.4
6	-	144.0	-	144.0
7	-	150.3	-	150.2
8	6.94 (s)	103.2	6.92 (s)	103.2
9	-	149.7	-	150.2
10	-	111.5	-	111.5
OMe-6	3.99 (s)	56.4	3.96 (s)	56.4
OH-7	-	-	6.17 (s)	-

จากการวิเคราะห์ด้วย ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR ของ DDen 6 (**2**) เปรียบเทียบกับสารที่มีการรายงาน พบว่า สาร DDen 6 (**2**) คือ scopoletin โดยมีโครงสร้างดังนี้



รูปที่ 10 โครงสร้างทางเคมีของ scopoletin

4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านไวรัสเริม

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านไวรัสเริม (HSV-1 , HSV-2) พบว่าสาร DDen 4 (**1**) และ DDen 6 (**2**) ที่สกัดแยกได้จากกล้วยไม้เอื้องมอนไข่ ไม่มีฤทธิ์ต้านไวรัสเริม (HSV-1 , HSV-2) โดยใช้ acyclovir เป็น positive control

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

เมื่อนำสารสกัดหยาบชั้น MeOH ของกล้วยไม้เอื้องมอนไข่ มาทำการแยกสารบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคทาง chromatography คือ silica gel column chromatography และ sephadex LH-20 column chromatography (size exclusion chromatography) สามารถสกัดแยกสารบริสุทธิ์ได้ 2 ชนิด คือ DDen 4 (**1**) มีน้ำหนัก 61 mg และ DDen 6 (**2**) น้ำหนัก 1 mg โดยจากการเปรียบเทียบ ^{1}H NMR และ ^{13}C NMR กับสารที่มีรายงานมาก่อนพบว่า สาร DDen 4 (**1**) คือ scoparone ส่วน DDen 6 (**2**) คือ scopoletin และเมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านไวรัสเริม (HSV-1 , HSV-2) โดยใช้วิธี Plaque reduction assay พบว่าสาร DDen 4 (**1**) และ DDen 6 (**2**) ไม่มีฤทธิ์ต้านไวรัสเริม (HSV-1 , HSV-2) โดยใช้ acyclovir เป็น positive control

รายการอ้างอิง

1. Dipiro JT, Talbert RL, Yee GC, Matzke GR, Wells BG, Posey LM. Phamacotherapy A Pathophysiologic Approach. 7th edition. New York: McGraw-Hill; 2008: 1924-27.

2. Pottage JC, Kessler HA. *Herpes simplex* virus resistance to acyclovir: clinical relevance. Infect Agents Dis. 1995; 4(3):115-24.

3. สุรเกียรติ อาชานานุภาพ. ตำราการตรวจรักษาโรคทั่วไป 2. พิมพ์ครั้งที่ 4 ฉบับปรับปรุง. กรุงเทพมหานคร: โฮลิสติก พับลิชชิ่ง; 2551: 969-74.

4. Akaanitapichat P, Kurokawa M, Tewtrakul S, Pramyothin P, Sripanidkulchai B, Shiraki K, et al. Inhibitory activities of Thai medicinal plants against Herpes simplex type 1, Poliovirus type 1, and measles virus. The Sixth JSPS-NRCT Joint Seminar: Recent Advances in Natural Medicine Research, Dec 2-4, 2003.

5. Sendl A, Chen JL, Jolad SD, Stoddart C, Rozhon E, Kernan M. Two new naphthoquinones with antiviral activity from *Rhinacanthus nasutus*. J Nat Prod. 1996; 59: 808-11.

6. Lyu SY, Rhim JY, Park WB. Antiherpetic activities of flavonoids against *Herpes Simplex* virus type 1(HSV-1) and type 2(HSV-2) *In Vitro*. Arch Pharm Res. 2005; 28(11): 1293-301.

7. Schnitzler P, Reichling J. Efficacy of plant products against herpetic infections. HNO. 2011; 59(12): 1176-84.

8. นันทิยา วรรธนะภูติ. ดอกเอื้อง. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์; 2555: 104.

9. Fan C, Wang W, Wang Y, Qin G, Zhao W. Chemical constituents from *Dendrobium densiflorum*. Phytochemistry. 2001; 57(8): 1255-8.

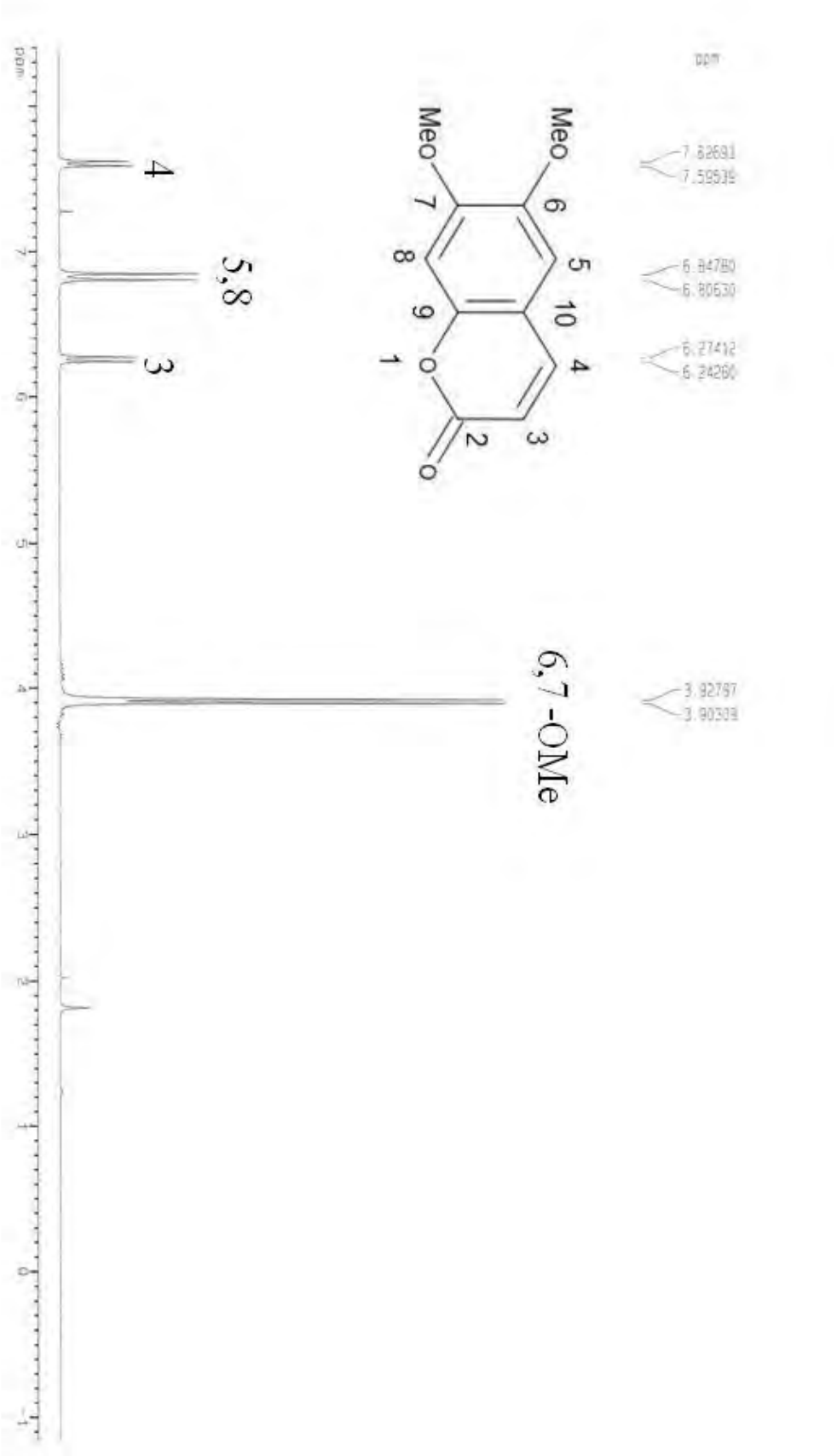
10. Whitley RJ. Fields Virology : *Herpes simplex* viruses. 4th edition. New York: Raven Press.

11. Choi WS, Jang DY, Nam SW, Park BS, Lee HS, Lee SE. Antiulcerogenic Activity of Scoparone on HCl/Ethanol-induced Gastritis in Rats. J Korean Soc Appl Biol Chem. 2012; 55: 159-63.

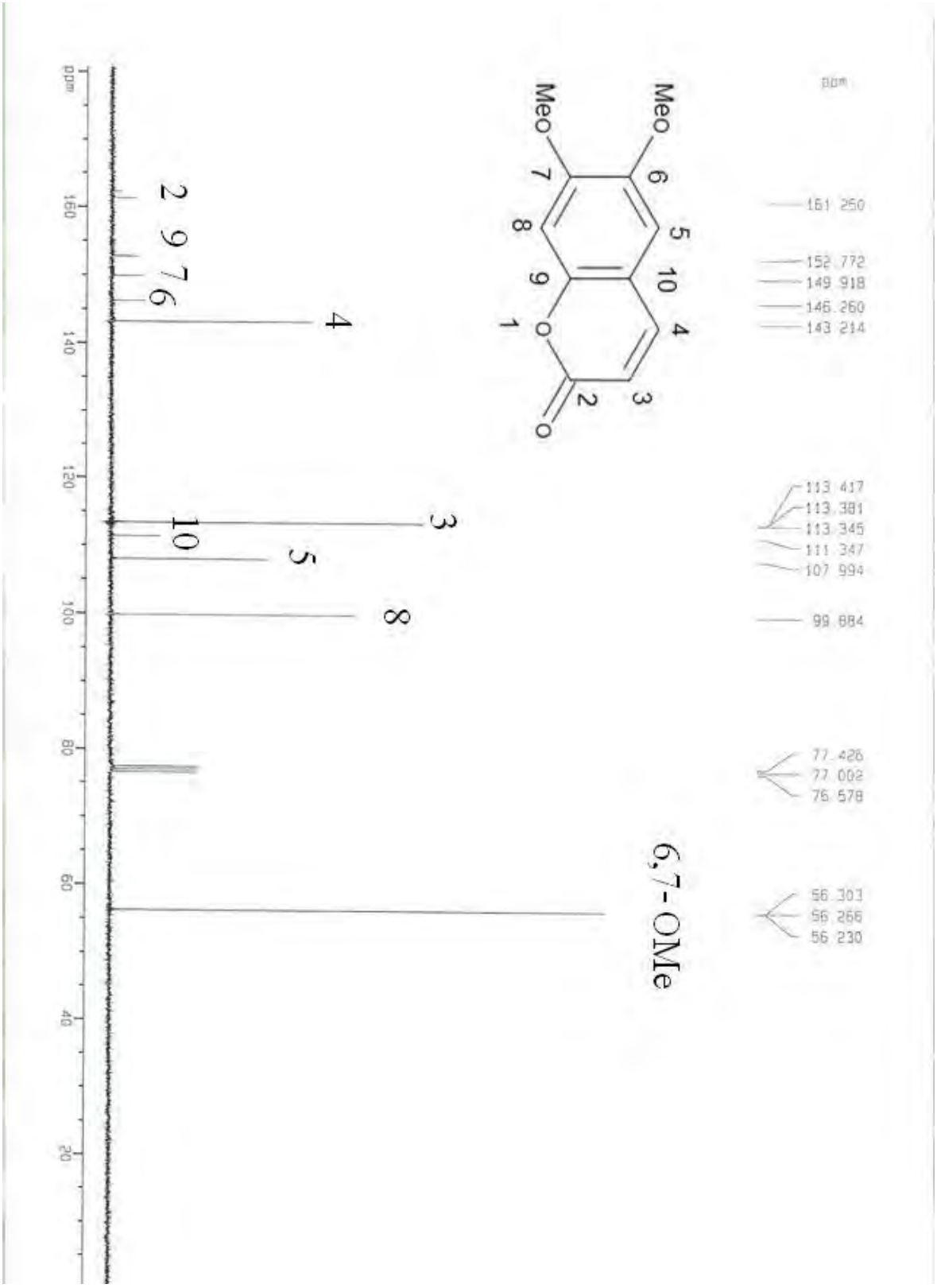
12. Lin LC, Yang LL, Chou CJ, Constituents from the Stems of *Ecdysanthera rosea*. J Chin Med. 2002; 13(4): 191-5.

13. Hisham DM, Lip JM, Zaidi JA, Normah A. Main non-polar chemical constituent from *Morinda citrifolia* fruits. J Trop Agric and Fd Sc. 2010; 38(1): 97-102.

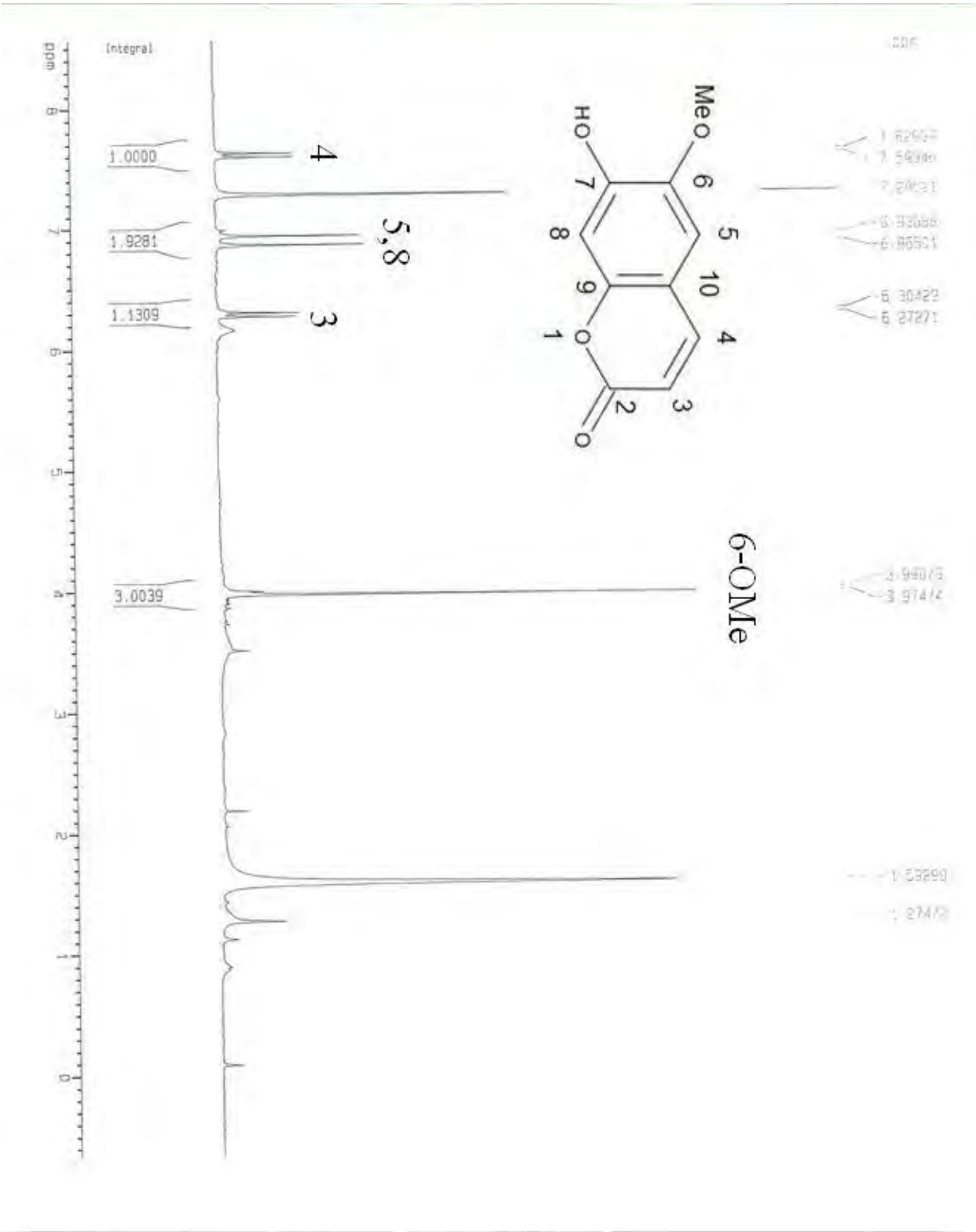
ภาคผนวก



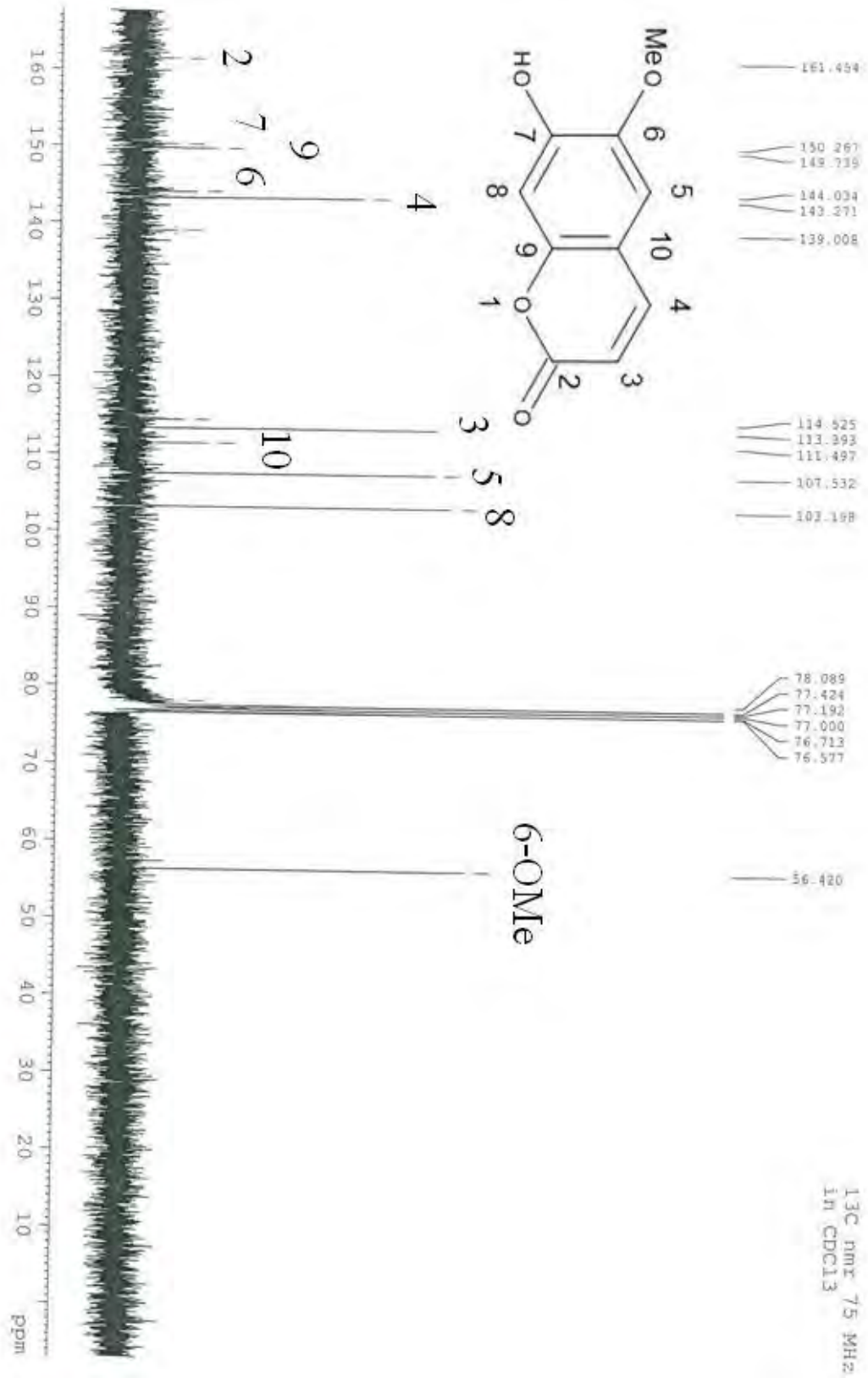
[1]H-NMR spectrum ของสาร DDen 4 (300 MHz , $CDCl_3$)



[13]C-NMR spectrum ของสาร DDen 4 (75 MHz , $CDCl_3$)



^{1}H-NMR spectrum ของสาร DDen 6 (300 MHz , $CDCl_3$)



^{13}C-NMR spectrum ของสาร DDen 6 (75 MHz , $CDCl_3$)