

บุษยรัตน์ ไมขุนทด : การคัดเลือกสมุนไพรไทยเพื่อเป็นสารเชื้อไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 และศึกษากลไกการออกฤทธิ์โดยการติดตามการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลในเซลล์ไลน์ (SCREENING OF THAI MEDICINAL PLANTS AS POTENTIAL ANTI-SARS-COV-2 AGENTS AND STUDY OF MECHANISM OF ACTION BY REVEALING THE CHANGES OF BIOMOLECULAR PROFILE IN INFECTED CELL LINES) อาจารย์ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร.หนึ่ง เตียอำรุง, 139 หน้า.

คำสำคัญ: สมุนไพร/Anti-SARS-CoV-2/LC-HRMS/Molecular docking/FTIR/หม่อน/กลไกการต้านไวรัส/โรคโควิด 19

การค้นหารสสารต้านไวรัสที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งไวรัส SARS-CoV-2 ที่ก่อโรคโควิด 19 ยังคงเป็นสิ่งสำคัญที่ต้องศึกษา โดยเฉพาะสำหรับการมองหาการรักษาแบบทางเลือก หรือเพื่อเสริมกับการใช้ยาแผนปัจจุบัน เนื่องจากยาต้านไวรัสที่ใช้ปัจจุบันมีราคาแพงและยังไม่มียาหรือวิธีการรักษาที่จำเพาะต่อไวรัสชนิดนี้ งานวิจัยนี้ได้คัดกรองพืชสมุนไพรไทย 19 ชนิดเพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านไวรัส SARS-CoV-2 ด้วยการทดสอบความสามารถในการต้านไวรัสในระดับหลอดทดลอง พบว่าสารสกัดที่แสดงประสิทธิภาพสูงที่สุดในการต้านไวรัส SARS-CoV-2 คือ สารสกัดจากใบหม่อน (*Morus alba*) ซึ่งเป็นสารสกัดส่วนที่ละลายน้ำที่ได้จากวิธีการแยกส่วนด้วยตัวทำละลายต่างขั้ว คือ การใช้ Ethyl Acetate ร่วมกับน้ำ (WF-EtAct) จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของ WF-EtAct ด้วยเทคนิค Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry พบว่า WF-EtAct อุดมไปด้วยสารกลุ่มโพลีฟีนอลิก ได้แก่ กรดคลอโรจีนิก และไกลโคไซด์ของฟลาโวนอยด์ เช่น Rutin Isoquercitrin และ Astragalin เป็นต้น จากนั้นทำการประเมินปฏิสัมพันธ์การจับของสารเหล่านี้กับเอนไซม์ Main Protease (Mpro) ของไวรัส SARS-CoV-2 ด้วยวิธีจำลองการจับกันของโมเลกุล (Molecular Docking) เพื่อทำนายศักยภาพการต้านไวรัสจากกลไกการขัดขวางการทำงานของ Mpro ทั้งนี้พบสารหลายชนิดมีแนวโน้มการจับตัวที่ดี โดยเฉพาะ Myricetin 3-O- β -D-galactopyranoside ซึ่งมีค่าพลังงานการจับตัวสูงสุด (-9.6 kcal/mol) แสดงถึงแนวโน้มที่อาจมีประสิทธิภาพสูงกว่ายาต้านไวรัสโมลนูพิราเวียร์ (-6.21 kcal/mol)

เพื่อให้กระบวนการสกัดง่ายขึ้นและลดการใช้สารเคมีอันตราย ได้ทำการปรับปรุงกระบวนการสกัด โดยใช้ยาเพียงอย่างเดียวในขั้นตอนการแยกส่วนสารสกัดหยาบใบหม่อนด้วยตัวทำละลายต่างขั้ว (WF-W) โดยจากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมียืนยันว่า WF-W มีองค์ประกอบทางเคมีที่คล้ายกับ WF-EtAct พร้อมกับมีค่าความเป็นพิษระดับเซลล์ต่ำ ซึ่งบ่งบอกด้วยค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้เซลล์มีชีวิตรอด 50% (CC₅₀) ที่ค่าความเข้มข้นสารสกัดสูงกว่า 500 μ g/mL และยังคงมีฤทธิ์ต้านไวรัสสูง โดยเมื่อทดสอบ WF-W ที่ความเข้มข้น 100 μ g/mL ทั้งในรูปแบบการยับยั้งไวรัส

ลายมือชื่อนักศึกษา นิพนธ์
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา นิพนธ์
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม นิพนธ์

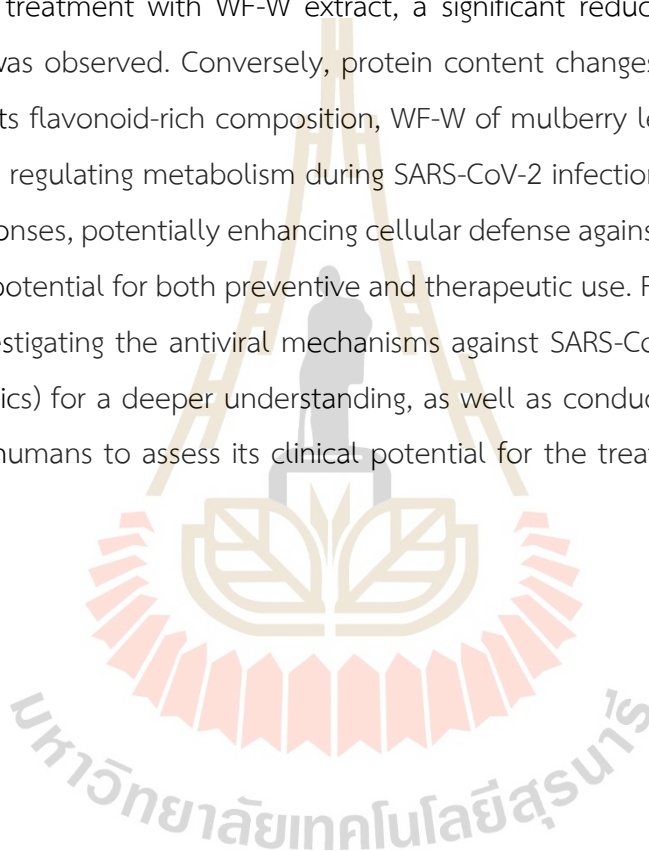
BUSSAYARAT MAIKHUNTHOD : SCREENING OF THAI MEDICINAL PLANTS AS
POTENTIAL ANTI-SARS-COV-2 AGENTS AND STUDY OF MECHANISM OF ACTION
BY REVEALING THE CHANGES OF BIOMOLECULAR PROFILE IN INFECTED CELL
LINES. THESIS ADVISOR : PROF. NEUNG TEAUMROONG, Ph.D. 139 PP.

Keyword: Herb/Anti-SARS-CoV-2/LC-HRMS/Molecular docking/FTIR/Mulberry/Antiviral
mechanism/COVID-19

The search for effective antiviral compounds capable of inhibiting SARS-CoV-2, the causative agent of COVID-19 disease, remains a crucial area of study, particularly for alternative treatments or as adjuncts to conventional therapies. This need arises from the high cost of currently available antiviral drugs and the lack of specific medications or definitive treatments for this virus. This study screened 19 Thai medicinal plants for antiviral activity against SARS-CoV-2 using *in vitro* assays. Among them, the water-soluble fraction obtained from the liquid-liquid fractionation of mulberry (*Morus alba*) leaf crude extract using ethyl acetate and water (WF-EtAct) showed the highest efficacy. Chemical composition analysis using Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry revealed that WF-EtAct is rich in polyphenolic compounds, including chlorogenic acids and flavonoid glycosides, such as rutin, isoquercitrin and astragalin. Molecular docking was used to evaluate the binding interactions of these compounds with the SARS-CoV-2 main protease (Mpro) to predict their potential as Mpro inhibitors. Several compounds showed promising binding, with myricetin 3-O- β -D-galactopyranoside exhibiting the strongest affinity (-9.6 kcal/mol), suggesting greater efficacy than molnupiravir (-6.21 kcal/mol).

To simplify the extraction and reduce hazardous chemical use, the ethyl acetate–water fractionation of mulberry crude extract was modified using only water, yielding a modified water-soluble fraction (WF-W). Chemical composition analysis of WF-W confirmed that WF-W retained a similar chemical profile to the WF-EtAct while exhibiting low cytotoxicity, with a 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) greater than 500 μ g/mL. WF-W demonstrated enhanced antiviral activity, achieving a 99.6% viral reduction (Log Reduction Value = 2.448) at 100 μ g/mL in both pre-entry and post-infection modes. In the pre-entry mode, WF-W exhibited the lowest half-maximal

inhibitory concentration (IC_{50}) of 0.0011 $\mu\text{g/mL}$, outperforming both molnupiravir and rutin. In contrast, WF-W showed a higher IC_{50} than molnupiravir and rutin in the post-infection mode. The antiviral dose-response curve in post-infection mode revealed that WF-W efficacy decreased more rapidly than molnupiravir and rutin at concentrations below 1 $\mu\text{g/mL}$. Mechanistic studies using Synchrotron Radiation-FTIR on SARS-CoV-2-infected Calu-3 host cells revealed significant changes in biomolecular composition, particularly an increase in lipid content, especially in the C=O functional group of lipid heads. Upon treatment with WF-W extract, a significant reduction in this C=O lipid component was observed. Conversely, protein content changes showed an opposite trend. Given its flavonoid-rich composition, WF-W of mulberry leaf extract may play a critical role in regulating metabolism during SARS-CoV-2 infection and stimulating host immune responses, potentially enhancing cellular defense against future infection. This highlights its potential for both preventive and therapeutic use. Future research should focus on investigating the antiviral mechanisms against SARS-CoV-2 at the gene level (Transcriptomics) for a deeper understanding, as well as conducting studies in animal models and humans to assess its clinical potential for the treatment and prevention of COVID-19.



School of Biotechnology
Academic Year 2024

Student's Signature B. Main
Advisor's Signature N.T.W.
Co-advisor's Signature G. Eunkub