

กฤษณ์ ธิรพันธุ์เมธี : การศึกษาวิธีวิเคราะห์เพื่อทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อเอชไอวี-1 (STUDY OF THE ASSAY METHODS FOR SCREENING OF HIV-1 PROTEASE INHIBITORS). คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: จันทร์เพ็ญ วิวัฒน์, ป.ร.ด., วิชา จิรจรรยาคุณ, Dr. rer. nat. 85 หน้า. ISBN 974-662-764-3

การศึกษาเปรียบเทียบวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์เพื่อทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อเอชไอวี-1 3 วิธีคือ spectrophotometry, high performance liquid chromatography (HPLC) และ sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) วิธี spectrophotometry และ HPLC ใช้ตรวจหาผลิตภัณฑ์ (Phe(NO₂)-Glu-Ala-Nle-Ser-NH₂) ที่ได้จากปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์และสับสเตรท (His-Lys-Ala-Arg-Val-Leu-Phe(NO₂)-Glu-Ala-Nle-Ser-NH₂) ส่วนวิธี SDS-PAGE ใช้ตรวจวัดความเข้มของแถบโปรตีนที่ลดลงจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยใช้ น้ำ หรือ dimethyl sulfoxide เป็นสารควบคุมในกรณีที่ไม่ได้มีสารยับยั้งปฏิกิริยา และ pepstatin A เป็นสารควบคุมในการยับยั้งปฏิกิริยา ผลการศึกษาพบว่าวิธี spectrophotometry เป็นวิธีที่เหมาะสมในการทดสอบเพื่อหาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อเอชไอวี-1 จากนั้นได้นำสารสกัดน้ำจากพืชสมุนไพร 6 ชนิด สารสกัด ethanol ของพืชสมุนไพร 9 ชนิด ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร และสารเคมีสังเคราะห์ 8 ชนิด (หมายเลข 1-8) ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบ ผลปรากฏว่าสารสกัดน้ำจากเหง้าพุทธรักษาและคนที่สอดต้นยับยั้งปฏิกิริยาได้ 100% จากมะระขี้นกสามารถยับยั้งปฏิกิริยาได้ 78.95% จากผักนึ่งขันธ์และคนที่เขมาสามารถยับยั้งปฏิกิริยาได้ 57.89% จากข่าไก่ขาวไม่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาได้ สารสกัด ethanol จากข่าไก่ดำ ฟ้าทะลายโจร คนที่สอดต้นและคนที่เขมาสามารถยับยั้งปฏิกิริยาได้ 100% จากสันโศก ผักนึ่งขันธ์ เหง้าพุทธรักษา ใบระบาศสามารถยับยั้งปฏิกิริยาได้ 78.95, 68.42, 56.52 และ 4.35% ตามลำดับ จากข่าไก่ขาวไม่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาได้ ส่วนสารเคมีสังเคราะห์พบว่าสารหมายเลข 1, 2, 3, 4, 6 และ 8 สามารถยับยั้งปฏิกิริยาได้ 28.57, 33.33, 88.10, 79.52, 57.14 และ 57.14% ตามลำดับ สารหมายเลข 5 และ 7 ไม่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาได้

KEY WORDS : HIV-1 PROTEASE, HIV PROTEASE SUBSTRATE,
PROTEASE INHIBITORS

KRIT THIRAPANMETHEE : STUDY OF THE ASSAY METHODS FOR
SCREENING OF HIV-1 PROTEASE INHIBITORS. THESIS ADVISORS :
CHANPEN WIWAT, Ph.D., WEENA JIRATCHARIYAKUL, Dr. rer. nat. 85 p.
ISBN 974-662-764-3

Three assay methods for screening of HIV-1 protease inhibitors, spectrophotometry, high performance liquid chromatography (HPLC) and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), were compared for the selection of the most appropriate method for screening of HIV-1 protease inhibitors of some medicinal plants and chemical compounds. Spectrophotometry and HPLC were used to detect the product, Phe(NO₂)-Glu-Ala-Nle-Ser-NH₂, which was cleaved from substrate, His-Lys-Ala-Arg-Val-Leu-Phe(NO₂)-Glu-Ala-Nle-Ser-NH₂, by recombinant HIV-1 protease enzyme. SDS-PAGE was used to detect the intensity of the substrate band which was decreased by enzymatic reaction. Water (or dimethyl sulfoxide (DMSO)) and pepstatin A were used as negative and positive control, respectively. The results showed that spectrophotometric method was the most appropriate method for screening of HIV-1 protease inhibitors. Water extracts from six medicinal plants and ethanol extracts of nine medicinal plants with concentration of 5 µg/µl, and eight chemical compounds (No.1-8) with concentration of 20 µg/ml were tested for HIV-1 protease inhibitory effect. For water extracts, the results showed that *Momordica charantia* Linn. exhibited inhibitory activity on HIV-1 protease with 78.95%. *Ipomoea crassicaulis* Roxb. and *Vitex negundo* Linn. exhibited inhibitory activity on HIV-1 protease with 57.89%. *Canna orientalis* Rosc. and *Vitex trifolia* Linn. exhibited inhibitory activity on HIV-1 protease with 100%. *Justicia vulgaris* Nees. did not inhibit HIV-1 protease *in vitro*. For ethanol extracts, the results showed that *Justicia valida* Ridl. var. *grandulosa* Fisch., *Andrographis paniculata* (Burm.) Wall. ex. Nees., *Vitex trifolia* Linn., and *Vitex negundo* Linn. exhibited inhibitory activity on HIV-1 protease with 100%. *Clausena excavata* Burm. f., *Ipomoea crassicaulis* Roxb., *Canna orientalis* Rosc., and *Argyreia nervosa* (Burm. f.) Boj. exhibited inhibitory activity on HIV-1 protease with 78.95, 68.42, 56.52, and 4.35% respectively. *Justicia vulgaris* Nees. did not inhibit HIV-1 protease *in vitro*. For chemical compounds, compounds 1, 2, 3, 4, 6 and 8 exhibited inhibitory activity on HIV-1 protease with 28.57, 33.33, 88.10 79.52, 57.14, and 57.14%. Compounds 5 and 7 did not inhibit HIV-1 protease *in vitro*.