

การศึกษาความปลอดภัยและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของตำรับยาแก้ไข้ผสมฟ้าทะลายโจร (G531/64) ต่อการยับยั้งเอนไซม์ SARS-CoV-2 main protease และโคโรนาไวรัสในแมว
(Evaluation of Safety and Pharmacological Effects of the Antipyretic Herbal Formula (G531/64) on Inhibition of SARS-CoV-2 Main Protease and Feline Coronavirus)

กาญจณันท์ คงสาโรจน์^{1*} และเรณู ผ่องใส²

Kanjanan Khongsarote ^{1*} and Renu Pongsaree ²

บริษัทเทพรักษาสมุนไพรไทยจำกัด^{1*} และมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา²

THEPRUKSA Thaiherb Co. Ltd.^{1*} and Suan Sunandha Rajabhat University²

*Corresponding author: Kanjanan Khongsarote; Email: nnnkan1966@gmail.com

Received 18/11/2025

Revised 26/12/2025

Accepted 30/12/2025

บทคัดย่อ

บทนำ: โรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขสำคัญของโลก การพัฒนายาจากสมุนไพรที่มีความปลอดภัยและมีฤทธิ์ยับยั้งไวรัสจึงเป็นแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจ ตำรับยาแก้ไข้ผสมฟ้าทะลายโจร (G531/64) ซึ่งประกอบด้วยสมุนไพร 8 ชนิด ได้รับการพัฒนาขึ้นเพื่อประเมินศักยภาพในการต้านไวรัสและความปลอดภัย

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาความปลอดภัยและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของตำรับยา G531/64 โดยเฉพาะฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอสหลักของไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ซาร์ส-โควี-2 และการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสโคโรนาในแบบจำลองระดับหลอดทดลอง

วิธีการศึกษา: เป็นการศึกษาเชิงทดลองในห้องปฏิบัติการ โดยวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ในตำรับยา G531/64 ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวควบคู่แมสสเปกโตรเมตรี (LC-ESI-QTOF-MS/MS) และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ตับสายพันธุ์ HepG2 รวมถึงประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอสหลักของไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ซาร์ส-โควี-2 และการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสโคโรนาในแมว (FIPV) ซึ่งเป็นแบบจำลองของไวรัสในกลุ่มเดียวกัน

ผลการศึกษา: สารสำคัญในตำรับยา ได้แก่ กรดอัมเลอิก (Amlaic acid) ลิกวิริทิเจนิน (Liquiritigenin) ไกลไซร์ริซิน (Glycyrrhizin) และแอนโดรกราฟีดิน เอ (Andrographidin A) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านไวรัสและด้านการอักเสบ ตำรับยา G531/64 มีค่าความเป็นพิษปานกลางต่อเซลล์ตับ ($IC_{50} = 60.29$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอสหลักของไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ซาร์ส-โควี-2 ได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยที่ความเข้มข้น 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเอนไซม์ได้ร้อยละ 96.87 และ 100 ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่ายาโลพินาเวียร์และริโทนาเวียร์ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่สามารถยับยั้งได้ร้อยละ 65.11

และ 60.61 ตามลำดับ นอกจากนี้ ตำรับยังช่วยลดการติดเชื้อไวรัสในเซลล์ CRFK ที่ติดเชื้อไวรัสโคโรนาในแนวได้ร้อยละ 20

สรุปผลการศึกษา: ตำรับยาแก้ไข้ผสมฟ้าทะลายโจร (G531/64) มีศักยภาพในการเป็นยาสมุนไพรเสริมต้านเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ซาร์ส-โควี-2 โดยแสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอสหลักของไวรัสและลดการติดเชื้อในแบบจำลองในระดับเซลล์ (CRFK cell line) ทั้งนี้ควรมีการศึกษาต่อเนื่องในระดับในร่างกาย (*in vivo*) และการประเมินความปลอดภัยในมนุษย์ เพื่อยืนยันประสิทธิภาพและความปลอดภัยของตำรับยาในเชิงคลินิก

คำสำคัญ: ตำรับยา G531/64 ฟ้าทะลายโจร เอนไซม์โปรตีเอสหลักของไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ซาร์ส-โควี-2 สมุนไพรไทย ฤทธิ์ต้านไวรัส

Abstract

Background: Coronavirus disease 2019 (COVID-19) remains a major global health issue, prompting interest in the development of safe herbal medicines with antiviral properties. G531/64, an antipyretic herbal formulation made from eight medicinal plants, including *Andrographis paniculata*, was created to assess its antiviral potential and safety.

Objective: To assess the safety and pharmacological effects of G531/64, particularly its inhibitory activity against the main protease of SARS-CoV-2 and its antiviral effect in *in vitro* models.

Methods: This *in vitro* study examined the active compounds of G531/64 through LC-ESI-QTOF-MS/MS. It assessed cytotoxicity in HepG2 liver cells and evaluated inhibitory activity against SARS-CoV-2 main protease and feline coronavirus (FIPV) as an *in vitro* model.

Results: Amlaic acid, liquiritigenin, glycyrrhizin, and andrographidin A are important bioactive substances that have antiviral qualities. G531/64 exceeded lopinavir and ritonavir, exhibiting considerable cytotoxicity ($IC_{50} = 60.29 \mu\text{g/mL}$) and inhibiting SARS-CoV-2 main protease by 96.87% and 100% at doses of 10 and 100 $\mu\text{g/mL}$, respectively. It also reduced feline coronavirus infection in CRFK cells by 20%.

Conclusion: G531/64 demonstrates potential as an adjunct herbal medicine against SARS-CoV-2 infection, exhibiting protease inhibition and antiviral activity *in vitro*. Further *in vivo* studies and human safety evaluations are warranted to confirm its efficacy and safety in clinical settings.

Keywords: G531/64, *Andrographis paniculata*, SARS-CoV-2 main protease, Thai herbal medicine, antiviral activity

บทนำ

งานวิจัยนี้มุ่งทดสอบประสิทธิภาพและความปลอดภัยของตำรับยา G531/64 ซึ่งพัฒนาจากสมุนไพรที่มีรายงานฤทธิ์ต้านไวรัสโคโรนา ผสานกับองค์ความรู้การแพทย์แผนไทย โดยทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไวรัสในระดับหลอดทดลอง (*in vitro*) ตามมาตรฐานสากล ตำรับยา G531/64 เป็นยาสามัญประจำบ้านสำหรับแก้ไข้ มีส่วนประกอบหลัก คือ ฟาโทะลายโจร บอระเพ็ด และลูกใต้ใบ ใช้ได้สะดวกเมื่อเริ่มมีอาการ ช่วยลดไข้ ลดการอักเสบ และยับยั้งไวรัส อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่ยืนยันประสิทธิภาพอย่างครบถ้วน

ไวรัส SARS-CoV-2 ที่ก่อโรคโควิด-19 เป็นไวรัส RNA สายเดี่ยว โดยอาศัยเอนไซม์หลัก 2 ชนิดคือ RdRp สำหรับจำลองสารพันธุกรรม และเอนไซม์โปรติเอส (Main Protease) เอนไซม์นี้มีหน้าที่สำคัญในการย่อยโพลีโปรตีนสายยาวของไวรัสที่ไม่สามารถทำงานได้ให้อยู่ในรูปที่ทำงานได้ โดยโพลีโปรตีนดังกล่าวจะไปทำหน้าที่ในกระบวนการเพิ่มจำนวนของไวรัสในเซลล์ติดเชื้อ (Nazir et al., 2024) ดังนั้น หากมีสารยับยั้งที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสของไวรัสได้ก็จะสามารถยับยั้งกระบวนการเพิ่มจำนวนของไวรัสในเซลล์ติดเชื้อได้ ซึ่งเป็นเป้าหมายหลักของการพัฒนายาต้านไวรัสเพื่อยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสในผู้ป่วย

โคโรนาไวรัสในแมว (Feline coronavirus หรือ FCoV) จัดเป็นไวรัสที่พบในลำไส้ของแมว ที่สามารถพัฒนาไปเป็นโรคเยื่อช่องท้องอักเสบในแมว (Feline Infectious Peritonitis; FIP) ได้ (Zwicklbauer, Bergmann, Alberer, von Both, & Hartmann, 2025) ไวรัสโคโรนาในแมว และไวรัส SARS-CoV-2 ทั้งสองชนิดนี้อยู่ในตระกูลเดียวกัน คือ Coronaviridae มีลักษณะโครงสร้างไวรัสที่มีหนามแหลมคล้ายมงกุฎ (corona) รอบตัว ซึ่งเป็นโปรตีน spike ที่ไวรัสใช้จับกับเซลล์เจ้าบ้าน ความคล้ายคลึงกันหลักระหว่างไวรัสโคโรนาในแมวและ SARS-CoV-2 ได้แก่ ทั้งสองเป็นไวรัส RNA สายเดี่ยวเชิงบวก (single-stranded positive-sense RNA virus) มีโปรตีน spike (S protein) ที่ใช้จับกับตัวรับบนเซลล์เพื่อเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน มีโครงสร้างไวรัสคล้ายกันประกอบด้วยโปรตีนโครงสร้างหลัก ได้แก่ spike envelope membrane และ nucleocapsid protein ใช้เอนไซม์โปรติเอส เช่น main protease ในการตัดโปรตีนโพลีเมอร์ไวรัส มีวงจรชีวิตในเซลล์เจ้าบ้านที่คล้ายคลึงกัน เช่น การเข้าเซลล์ การจำลอง RNA การสังเคราะห์โปรตีนไวรัส และการประกอบไวรัสใหม่ (Park et al., 2024)

งานวิจัยนี้ทำการทดสอบยาตำรับ G531/64 เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพด้วยเทคนิคขั้นสูงโดยใช้เครื่อง LC-ESI-TOF-MS/MS วิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในระดับหลอดทดลอง การทดสอบความเป็นพิษในระดับเซลล์ รวมถึงฤทธิ์ต้านเชื้อ COVID-19 โดยศึกษาการต้านการทำงานของเอนไซม์ SARS-CoV-2 main protease และนำผลวิจัยที่ได้ออกมาเป็นเครื่องยืนยันให้เห็นว่าการใช้สมุนไพรหลายชนิดประกอบเป็นตำรับนั้นส่งผลต่อการรักษาได้อย่างครอบคลุม นอกจากนี้ยังได้ทำการทดสอบในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสโคโรนาในแมว (FIPV) ใช้เป็นโมเดลเพื่อทดสอบการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสในกลุ่มของไวรัสโคโรนา ซึ่งเป็นกลุ่มเดียวกับเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 เพื่อนำข้อมูลที่ได้เหล่านี้ไปใช้ในการพัฒนายาแผนโบราณตามแนวทางการพัฒนายาแผนปัจจุบันต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาความปลอดภัยและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของตำรับยาแก้ไข้ผสมฟ้าทะลายโจร (G531/64) ในระดับหลอดทดลอง (*in vitro*) ตามมาตรฐานสากล
2. เพื่อตรวจสอบสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพของตำรับยา G531/64 ด้วยเทคนิค LC-ESI-TOF-MS/MS

ระเบียบวิธีศึกษา

การเตรียมตัวอย่าง

1.1 การผลิตตำรับยาแก้ไข้ผสมฟ้าทะลายโจร

ตำรับยาแก้ไข้ผสมฟ้าทะลายโจรผลิตภายใต้การควบคุมของ พท.กาญจพันธ์ คงสาโรจน์ ในโรงงานมาตรฐาน Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme (PIC/S) ของบริษัทเทพรักษา สมุนไพรไทย จำกัด โดยใช้สมุนไพร 8 ชนิดคือ ฟ้าทะลายโจร ลูกใต้ใบ บอระเพ็ด ลูกผักชีลา มะขามป้อม สมอทิพย์ สมอไทย และชะเอมเทศ ผ่านขั้นตอนทำความสะอาด อบแห้ง บดละเอียด ผสมสมุนไพรทั้ง 8 ชนิดในอัตราส่วนฟ้าทะลายโจรร้อยละ 26.67 บอระเพ็ดร้อยละ 13.33 ลูกใต้ใบร้อยละ 13.33 และสมุนไพรอื่น ๆ อีก 5 ชนิดร้อยละ 46.67 ผสมด้วยเครื่อง Ribbon Mixer แล้วบรรจุลงในแคปซูล

1.2 ชั่งตัวอย่างน้ำหนัก 1 กรัม ละลายในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide, DMSO) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 1 นาที ทุก 15 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบ/นาที นาน 30 นาที จากนั้นกรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมครอน จากนั้นทำการกำจัด DMSO ออกด้วยวิธีการแลกเปลี่ยนตัวทำละลายเป็นน้ำแล้วทำแห้งแบบแช่แข็ง (Lyophilization) เมื่อได้ผงแห้งของสารสกัดแล้วให้ละลายด้วยไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide, DMSO) ให้ได้ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้วิเคราะห์ต่อไป พร้อมคำนวณผลผลิตสารสกัด (%yield crude extract) สามารถคำนวณได้จากสมการต่อไปนี้

$$\% \text{yield} = [A/B] \times 100$$

เมื่อ A = น้ำหนักของสารที่สกัดได้ (กรัม)

B = น้ำหนักวัตถุดิบสมุนไพรตั้งต้นที่ใช้ (กรัม)

การวิเคราะห์หองค์ประกอบทางเคมี

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีด้วยเครื่อง LC-ESI-QTOF-MS/MS โดยเตรียมตัวอย่างตำรับ G531/64 น้ำหนัก 500 มิลลิกรัม ผสมเมทานอล 15 มิลลิลิตร สกัดด้วยการเขย่า 2 นาที กรองด้วยกระดาษ Whatman® เบอร์ 1 และแผ่นกรอง 0.22 ไมครอน ใช้สารละลายกรดฟอร์มิกเจือจาง 0.1 เปอร์เซ็นต์ พร้อมใช้อะซีโตนไนโตรล์ที่มีกรดฟอร์มิก 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่แบบไล่สัดส่วน (Gradient) ปรับเพิ่มสัดส่วนของสารละลายกรดฟอร์มิกจากปริมาณร้อยละ 5 ไปจนถึงร้อยละ 90 ในเวลา 30 นาที ในการแยกสาร ใช้ไฟฟ้ากระแสเชิงบวกและลบที่ 3.5 และ 2.5 กิโลวัตต์ อุณหภูมิคาลารี 250 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ช่วง 100 –

1500 m/z ใช้ซอฟต์แวร์ Xcalibur (Thermo Scientific, CA, USA) และ Compound Discoverer v.3.1 (ThermoFisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) ประมวลผลข้อมูลมวลต่อโมล (Molar mass, MS)

การทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

1. การทดสอบความเป็นพิษในระดับเซลล์ด้วยเทคนิค MTT assay

เป็นการศึกษาความปลอดภัยของตำรับยาแก้ไข้ผสมฟ้าทะลายโจรตาม Al-Sheddi et al. (Al-Sheddi et al., 2019) โดยเลี้ยงเซลล์ HepG2 จำนวน 100,000 เซลล์ต่อหลุมในเพลท 96 หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางตำรับยาให้ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ใน DMEM เติมสารทดสอบ 100 ไมโครลิตรที่ความเข้มข้น 500 ถึง 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร บ่ม 72 ชั่วโมง เติม MTT 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร 10 ไมโครลิตร บ่ม 3 ชั่วโมง ดูด MTT ออก เติม DMSO 50 ไมโครลิตร วัดการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร ด้วยไมโครเพลตรีดเดอร์ และคำนวณ IC₅₀ โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 8.0.1 ทำซ้ำ 3 ครั้ง

2. การทดสอบประสิทธิภาพยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสของไวรัส SARS-CoV-2 หรือ COVID-19 (SARS-CoV-2 main protease) ของตำรับ G531/64 กับยาโลพินาเวียร์ (Lopinavir) และยาริโทนาเวียร์ (Ritonavir) ด้วยวิธีการใช้สารเรืองแสง (Fluorogenic assay) (Ihssen, Faccio, Yao, Sirec, & Spitz, 2021) โดยเจือจางสารทดสอบจากข้อ 3.1.2 ในบัฟเฟอร์ Tris-HCl pH 7.5 NaCl 100 mM DTT 2 mM EDTA 0.05 mM ให้ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร และเจือจางต่อเป็น 1 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เตรียมสารเปรียบเทียบยาโลพินาเวียร์และยาริโทนาเวียร์ที่ 100 ไมโครกรัมมิลลิตร เอนไซม์โปรติเอส SARS-CoV-2 ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ บ่มเอนไซม์ 200 นาโนโมลาร์กับสารทดสอบ 10 นาติ ที่อุณหภูมิห้อง เติมสารตั้งต้นเรืองแสง Dabcyl-KTSAVLQSGFRKM-E (Edans) ที่ 40 ไมโครโมลาร์ รวมปริมาตร 25 ไมโครลิตร วัดแสงฟลูออเรสเซนซ์ทุก 1 นาติ เป็นเวลา 30 นาติ ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น 340 นาโนเมตร และความยาวคลื่นปล่อย 430 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง TECAN fluorescence micro-plate reader คำนวณร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ (% Relative inhibition) ทดสอบ 3 ครั้ง

$$\% \text{ Relative Inhibition} = \frac{[(V_0 \text{ Enzyme} - V_0 \text{ Blank}) - (V_0 \text{ Sample} - V_0 \text{ Blank})]}{[(V_0 \text{ Enzyme} - V_0 \text{ Blank})]} \times 100$$

3. การทดสอบการยับยั้งโคโรนาไวรัสจากแมว

ใช้เทคนิคที่ประยุกต์จากการศึกษาของ Harun และคณะ (Harun et al., 2013) โดยเฉพาะเลี้ยงไวรัส Feline infectious peritonitis (FIP) ในเซลล์ CRFK ด้วยอาหารเลี้ยง EMEM เสริม horse serum 10 เปอร์เซ็นต์ แอลกลูตามีน 0.1 เปอร์เซ็นต์ non-essential amino acid 0.2 เปอร์เซ็นต์ และ gentamycin 0.1 เปอร์เซ็นต์ เปลี่ยนอาหารวันเว้นวัน เมื่อเซลล์หนาแน่นร้อยละ 80-90 ย้าย 150,000 เซลล์ต่อหลุม ในเพลท 24 หลุม บ่ม 24-48 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ยึดเกาะจนหนาแน่นร้อยละ 90-100 จากนั้นแทนที่อาหารด้วยสารทดสอบและไวรัสที่ 1

มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 400 ไมโครลิตร บ่ม 2 ชั่วโมง เติมน้ำอาหารครบ 1 มิลลิตร บ่ม 24 ชั่วโมง เปลี่ยนอาหารใหม่ 1 มิลลิตร บ่มต่อ 72 ชั่วโมง เก็บ RNA วิเคราะห์ qRT-PCR และย้อมเซลล์ด้วย crystal violet

การวิเคราะห์ข้อมูล

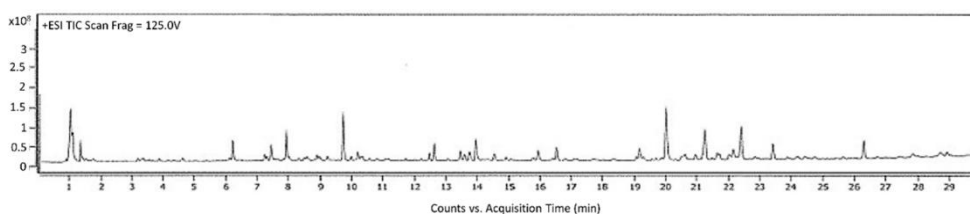
วิเคราะห์ค่าเฉลี่ย (Mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) จากการทดลอง 3 ซ้ำ ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Microsoft Excel วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ SPSS และเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี ANOVA โดยใช้ Dunca new multiple range test

ผลการศึกษา

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค LC-ESI-QTOF-MS/MS

การสกัดตำรับยาแก้ไข้ผสมฟ้าทะลายโจร G531/64 ด้วยตัวทำละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ได้ปริมาณสารสกัด (%yield crude extract) เท่ากับร้อยละ 6.96 ± 0.13 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัด G531/64 ด้วยเทคนิค LC-ESI-QTOF-MS/MS สามารถตรวจวัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในแบบที่ ได้รับโปรตรอน หรือได้รับประจุบวก ใช้วิธีการแยกแบบเป็นลำดับขั้นเป็นเวลา 30 นาที โดยพบมีสารประกอบที่มีสัญญาณสูง 39 ชนิด ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 สเปกตรัม LC-ESI-QTOF-MS/MS ของสารสกัดตำรับยา G531/64

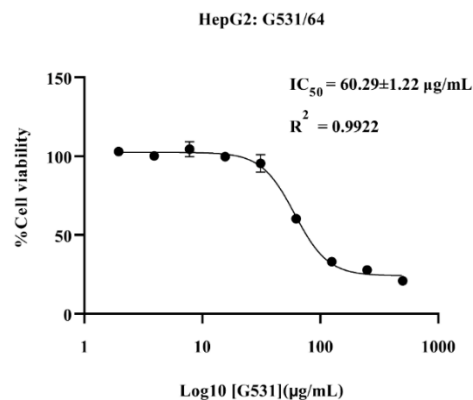
ตำรับยาแก้ไข้ผสมฟ้าทะลายโจร G531/64 ได้รับการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟี LC-ESI-QTOF-MS/MS พบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงถึง 39 ชนิด (ตารางที่ S1) โดยพบในสมุนไพรส่วนประกอบมี 7 ชนิด ได้แก่ มะขามป้อมมีสาร Amlaic acid ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ SARS-CoV-2 ชะเอมเทศมีสาร Liquiritigenin Neoliquiritigenin 2-apioside Liquiritin Licoricesaponin G2 และ Glycyrrhizin โดย Liquiritigenin ด้านการอักเสบ มะเร็ง และอนุมูลอิสระ Neoliquiritigenin 2-apioside บรรเทาอาการไอ Liquiritin และ Licoricesaponin G2 ด้านการอักเสบ Glycyrrhizin ยับยั้ง SARS-CoV-2 ต้านไวรัสและด้านการอักเสบ ฟ้าทะลายโจรมีสาร Andrographidin A ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ SARS-CoV-2 (Dowluru & Rao, 2020; Y. W. Kim et al., 2009; Kuang, Li, Fan, Qiao, & Ye, 2018; Y. Qin et al., 2024; Ashfaq, Masoud, Nawaz, & Riazuddin, 2011; Akamatsu, Komura, Asada,

& Niwa, 1991; Shafa Shavira, 2023) สารออกฤทธิ์เหล่านี้ในตำรับสนับสนุนฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในการต้านไวรัสและต้านการอักเสบ ซึ่งสำคัญต่อการต่อสู้กับ COVID-19 และสามารถใช้เป็น marker สำหรับตรวจสอบคุณภาพยา

การทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

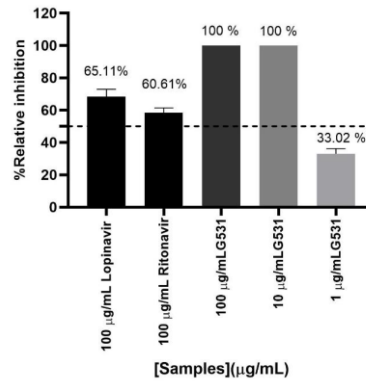
1. การทดสอบความเป็นพิษในระดับเซลล์ด้วยเทคนิค MTT

ผลการทดสอบความเป็นพิษของตำรับ G531/64 ต่อเซลล์ตับ HepG2 โดยใช้เทคนิค MTT เปรียบเทียบกับน้ำกลั่นซึ่งใช้เป็นกลุ่มควบคุมและมี DMSO เข้มข้นร้อยละ 10 เป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก ตำรับ G531/64 ที่ส่งผลให้เซลล์ตับมีร้อยละการรอดชีวิตลดลงกว่าร้อยละ 50 (IC_{50}) มีค่าเท่ากับ 60.29 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ดังแสดงในภาพที่ 2



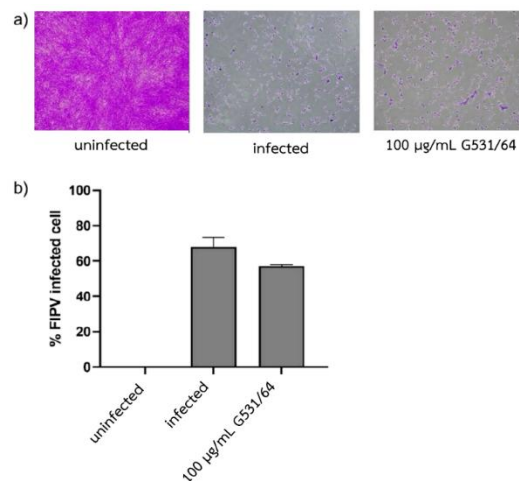
ภาพที่ 2 การทดสอบความเป็นพิษของตำรับ G531/64 ต่อเซลล์ตับ HepG2

2. ผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอสของไวรัส SARS-CoV-2 พบว่าตำรับยาแก้ไข้ผสมฟ้าทะลายโจร G531/64 ที่ความเข้มข้น 1 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร มีร้อยละการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ (% Relative inhibition) เพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นของตำรับยาที่เพิ่มขึ้น โดยที่ความเข้มข้น 1 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรของตำรับยามีร้อยละการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เป็น 33.02 และ 100 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับยาโลพินาเวียร์ และยาริโทนาเวียร์ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร มีร้อยละการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 65.11 และ 60.61 ดังแสดงในภาพที่ 3



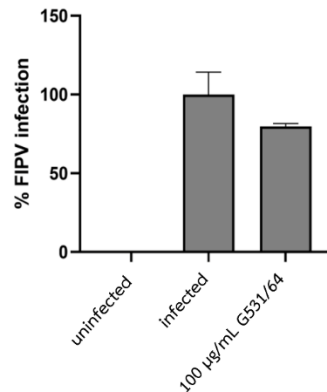
ภาพที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ SARS-CoV 2 main Protease (%Relative inhibition) กับความเข้มข้นของตำรับยาแก้ไข้ผสมฟ้าทะลายโจร G531/64 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เทียบกับยาโลพินาเวียร์ และริโทนาเวียร์

3. การทดสอบผลยับยั้งโคโรนาไวรัสจากแมวโมเดลการติดเชื้อในเซลล์ CRFK จากผลการลอง พบว่า ตำรับยาแก้ไข้ผสมฟ้าทะลายโจร G531/64 ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการติดเชื้อไวรัสโคโรนาในแมวได้ โดยลดลงจาก 67 เปอร์เซ็นต์ เป็น 57 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพที่ 4 ที่ทำการย้อมเซลล์ด้วยสีย้อมคริสตัลไวโอเล็ต โดยเซลล์ที่ติดสีม่วง คือ เซลล์ที่ไม่ติดเชื้อไวรัสโคโรนา



ภาพที่ 4 ผลการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสโคโรนาในแมว (FIPV) ในเซลล์ CRFK a) เซลล์ที่ย้อมด้วยสีย้อมคริสตัลไวโอเล็ต b) ผลการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสด้วยตำรับยาแก้ไข้ผสมฟ้าทะลายโจร G531/64 ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เมื่อทำการวิเคราะห์หาการติดเชื้อไวรัสในเซลล์ CRFK ด้วยวิธี qRT-PCR พบว่า ตำรับยาแก้ไข้ผสมฟ้าทะลายโจร G531/64 ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการติดเชื้อไวรัสโคโรนาในแมวได้ ลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ เป็น 80 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 ผลการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสโคโรนาในเซลล์ CRFK โดยวิธี qRT-PCR

อภิปรายผล

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีเพื่อศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยเครื่อง LC/MS พบว่าสารออกฤทธิ์ในพืชขึ้นกับการเลือกตัวทำละลาย วิธีสกัด และการเก็บรักษา (Peiris, Fernando, Senadeera, & Ranaweera, 2023) การศึกษาพบสารออกฤทธิ์ 7 ชนิดในตำรับยาแก้ไข้ผสมฟ้าทะลายโจร ได้แก่ Amlaic acid ในมะขามป้อม Liquiritigenin Neoliquiritigenin 2-apioside Liquiritin Licoricesaponin G2 และ Glycyrrhizin ในชะเอมเทศ และ Andrographidin A ในฟ้าทะลายโจร กรด Amlaic acid Glycyrrhizin และ Andrographidin A มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ SARS-CoV-2 ขณะที่ Liquiritigenin Liquiritin Licoricesaponin G2 และ Arjunglucoside มีรายงานการออกฤทธิ์ทางชีวภาพในชะเอมเทศจำนวนมาก (Y W Kim et al., 2008; Ramalingam, Kim, Lee, & Lee, 2018; Wang, Lu, Shi, & Zhang, 2017; H. Qin et al., 2022; Ma et al., 2024; Pawar & Bhutani, 2005) สาร Amlaic acid จากมะขามป้อม ช่วยยับยั้งและควบคุมโรคโควิด-19 (Dowluru & Rao, 2020) และ Liquiritigenin สามารถยับยั้งเอนไซม์หลักของโควิด-19 ได้แก่ main protease spike protein และ ACE2 (Fu et al., 2023) Liquiritin มีผลการทดลองกับเซลล์ Vero E6 โดย EC₅₀ เท่ากับ 2.39 ไมโครโมล (Zhu et al., 2020) สาร Glycyrrhizin แสดงฤทธิ์ต้าน COVID-19 ผ่านการยับยั้งเอนไซม์และด้านการอักเสบ (Al-Kamel & Grundmann, 2021; Bailly & Vergoten, 2020; Chrzanowski, Chrzanowska, & Graboń, 2021; Gomaa & Abdel-Wadood, 2021; Murck, 2020) สำหรับฟ้าทะลายโจรมีสรรพคุณป้องกันไข้ทั่วไป แต่มีข้อมูลการต้านโควิด-19 ได้โดยพบ Andrographidin A เพียงชนิดเดียวในตำรับ G531/64 ซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์ SARS-CoV-2 (Shafa Shavira, 2023)

ตำรับ G531/64 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ระดับความเข้มข้น 60.29 ± 1.22 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยฟ้าทะลายโจรซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักประมาณร้อยละ 27 มีค่าความเป็นพิษในช่วงกว้าง เช่น เอทานอลและน้ำสกัดใบฟ้าทะลายโจรที่ระดับความเข้มข้น 90 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ (Suriyo, Chotirat, Rangkadilok, Pholphana, & Satayavivad, 2021) สมุนไพรอื่นๆ ในตำรับ เช่น บอระเพ็ด มีความเป็นพิษต่ำมากที่ระดับความเข้มข้นสูงกว่า 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Tungpradit, Sinchaikul, Phutrakul, Wongkham, & Chen) ลูกใต้ใบ มีค่าความเป็นพิษที่ 120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Li Yong, Li Xin, Wang JiaKun, Kuang Yan, & Qi MingXiu, 2017) มะขามป้อม มีค่าความเป็นพิษรายงานแตกต่างกันระหว่าง 30.47 ถึงประมาณ 170 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Lu, Yang, Hsia, Wu, & Yen, 2016; (Pinmai, Chunlaratthanabhorn, Ngamkitidechakul, Soonthornchareon, & Hahnvanawong, 2008; Sahragard et al., 2021) สมอพิเภกมีค่าความเป็นพิษ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและบางงานรายงานค่าแตกต่างกันไปตั้งแต่ 0.3 ถึง 750 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Patra et al., 2020; (Aliyu-Amoo, Isa, Njoya, & McGaw, 2021; (Wangkiri, Sarnsri, Thongkanjana, Sae-Tan, & Resources, 2021; Sahragard et al., 2021) ขณะที่สมอไทยมีค่าความเป็นพิษในช่วง 35 ถึง 81 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและยังพบว่าไม่เป็นพิษที่ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ชะเอมเทศมีค่าอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ร้อยละ 50 ที่ระดับความเข้มข้น 248.5-550 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Basar et al., 2015; (Popovich, Yeo, Zhang, & Medicine, 2011) โดยรวมตำรับ G531/64 และส่วนประกอบสมุนไพรมีความเป็นพิษในระดับที่แตกต่างกันแต่ส่วนใหญ่ถือว่าปลอดภัยในความเข้มข้นที่ใช้ทดลอง

ตำรับ G531/64 มีประสิทธิภาพยับยั้งเอนไซม์ SARS-CoV-2 main protease สูงกว่ายาต้านเชื้อโควิด-19 บางชนิด เช่น ยาฟาริพิราเวียร์ที่มีค่า EC_{50} ในช่วง 10-78 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่ตำรับ G531/64 ยับยั้งได้ ที่ความเข้มข้นเพียง 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีการยับยั้งร้อยละ 33.02 (ภาพที่ 4.3) ยาต้านไวรัสโลพินาเวียร์ และริโทนาเวียร์ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยับยั้งเอนไซม์ได้ร้อยละ 18 และ 50 ตามลำดับ แต่ตำรับ G531/64 ที่ความเข้มข้นเดียวกันยับยั้งได้สูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ที่ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเพิ่มความเข้มข้นยาเป็น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โลพินาเวียร์และริโทนาเวียร์ยับยั้งได้ร้อยละ 65 และ 60 ซึ่งยังต่ำกว่าตำรับ G531/64 ที่ระดับเดียวกัน (Seetaha et al., 2022) ตำรับสมุนไพรนี้แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อย่างขึ้นกับขนาดยา (dose dependent) และมีประสิทธิภาพมากกว่าสารสกัดสมุนไพรเชิงเดี่ยว เช่น ฟ้าทะลายโจร ที่ยับยั้งได้ร้อยละ 22-40 ที่ความเข้มข้น 10-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่ตำรับ G531/64 ยับยั้งได้ร้อยละ 76.46-100 ที่ความเข้มข้นเดียวกัน ดังนั้นตำรับ G531/64 เป็นตำรับยาสมุนไพรที่มีศักยภาพต้าน SARS-CoV-2 main protease สูงกว่ายาต้านเชื้อบางชนิดและสมุนไพรเดี่ยวที่ใช้กันทั่วไปในความเข้มข้นต่ำกว่าและมีประสิทธิภาพดีกว่าอย่างชัดเจน เนื่องจากตำรับ G531/64 เป็นตำรับที่มีการผสมรวมของสมุนไพรหลายชนิดเข้าด้วยกัน โดยแต่ละชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งการติดเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 เช่น มะขามป้อม ชะเอมเทศ และฟ้าทะลายโจร ในสมุนไพรเหล่านี้ มีสารสำคัญหลายชนิดที่มีรายงานว่าออกฤทธิ์ในการยับยั้งการติดเชื้อ COVID-19 โดยผ่านทางเอนไซม์โปรติเอสจึง

ส่งผลให้ยาดำรับนี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ SARS-CoV-2 main protease ได้สูงกว่ายาดำต้นไวรัสโลพินาเวียร์และริโทนาเวียร์ หรือสมุนไพรวัดเดียว

ตำรับยา G531/64 ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการติดเชื้อไวรัสโคโรนาในแมวได้อย่างชัดเจน โดยเพิ่มจำนวนเซลล์มีชีวิตและลดปริมาณไวรัสลงประมาณร้อยละ 20 จากการย้อมเซลล์ด้วยสียคริสตัลไวโอเลตและการวัดด้วย qRT-PCR อย่างไรก็ตาม ประสิทธิภาพในการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสนี้ต่ำกว่าการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ main protease ซึ่งอาจเกิดจากการที่ยาไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ได้อย่างสมบูรณ์ ส่งผลให้ผลลัพธ์ที่ได้ต่ำกว่าการทดสอบกับเอนไซม์โดยตรง โมเดลการติดเชื้อในเซลล์ CRFK ที่ใช้ไวรัส FIPV เป็นแบบจำลอง มีความคล้ายคลึงกับการติดเชื้อ SARS-CoV-2 ในแง่การติดเชื้อและผลกระทบต่อเซลล์ ทั้งช่วยประเมินประสิทธิภาพสารออกฤทธิ์และลดการใช้สัตว์ทดลอง (Gao et al., 2022; Paltrinieri, Giordano, Stranieri, & Lauzi, 2021) ผลนี้ชี้ว่า G531/64 มีสารออกฤทธิ์ต้านไวรัสที่มีศักยภาพต่อไวรัสโคโรนา และอาจพัฒนาเป็นยาดำต้นไวรัสที่มีประสิทธิภาพในอนาคต โดยควรขยายการศึกษาระดับ *in vivo* และทดสอบความปลอดภัยในมนุษย์ต่อไป เพื่อใช้เป็นทางเลือกในการจัดการโรค COVID-19 ดังนั้น ตำรับ G531/64 จึงเป็นหนึ่งในตัวเลือกยาเสริมต้านไวรัสที่น่าสนใจทั้งในสัตว์ทดลองและเชิงคลินิก ด้วยศักยภาพยับยั้งไวรัสโคโรนาในแมวซึ่งเป็นแบบจำลองที่ใกล้เคียงกับ SARS-CoV-2

สรุป

ตำรับสมุนไพรวัดเดียว G531/64 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำในระดับปานกลางที่ IC_{50} ประมาณ 60.29 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอสของไวรัส SARS-CoV-2 อย่างมีประสิทธิภาพในลักษณะขึ้นกับขนาดยา โดยที่ความเข้มข้น 1 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งได้ 44.26 96.87 และ 100.03 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่ายาโลพินาเวียร์และริโทนาเวียร์ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน นอกจากนี้ การทดสอบในเซลล์แมวที่ติดเชื้อไวรัสโคโรนาแสดงให้เห็นว่ายาดำรับ G531/64 ลดปริมาณไวรัสได้ประมาณร้อยละ 20 แสดงศักยภาพในการยับยั้งไวรัสระดับเซลล์อย่างชัดเจน โดยสรุป ตำรับ G531/64 เป็นตำรับสมุนไพรวัดเดียวที่มีประสิทธิภาพต้านไวรัสได้สูงและควรมีการศึกษาความเป็นพิษระยะยาวและเปรียบเทียบกับยาดำต้นไวรัสอื่น เช่น เรมเดซิเวียร์ โมลนูพิราเวียร์ และแพ็กโลวิด เพื่อยืนยันศักยภาพทางคลินิกในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

Akamatsu, H., Komura, J., Asada, Y., & Niwa, Y. (1991). Mechanism of anti-inflammatory action of glycyrrhizin: Effect on neutrophil functions including reactive oxygen species generation. *Planta Medica*, 57(2), 119–121. <https://doi.org/10.1055/s-2006-960045>

- Al-Kamel, H., & Grundmann, O. (2021). Glycyrrhizin as a potential treatment for the novel coronavirus (COVID-19). *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 21(16), 2204–2208. <https://doi.org/10.2174/1389557521666210210160237>
- Al-Sheddi, E. S., Al-Zaid, N. A., Al-Oqail, M. M., Al-Massarani, S. M., El-Gamal, A. A., & Farshori, N. N. (2019). Evaluation of cytotoxicity, cell cycle arrest, and apoptosis induced by *Anethum graveolens* L. essential oil in human hepatocellular carcinoma cell line. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 27(7), 1053–1060. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2019.09.001>
- Aliyu-Amoo, H., Isa, H. I., Njoya, E. M., & McGaw, L. J. (2021). Antiproliferative effect of extracts and fractions of the root of *Terminalia avicennioides* (Combretaceae) Guill. & Perr. On HepG2 and Vero cell lines. *Clinical Phytoscience*, 7, Article 71. <https://doi.org/10.1186/s40816-021-00307-y>
- Ashfaq, U. A., Masoud, M. S., Nawaz, Z., & Riazuddin, S. (2011). Glycyrrhizin as an antiviral agent against the hepatitis C virus. *Journal of Translational Medicine*, 9, Article 112. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-112>
- Bailly, C., & Vergoten, G. (2020). Glycyrrhizin: An alternative drug for the treatment of COVID-19 infection and the associated respiratory syndrome? *Pharmacology & Therapeutics*, 214, 107618. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107618>
- Basar, N., Oridupa, O. A., Ritchie, K. J., Nahar, L., Osman, N. M. M., Stafford, A., ... Sarker, S. D. (2015). Comparative cytotoxicity of *Glycyrrhiza glabra* roots from different geographical origins against immortal human keratinocyte (HaCaT), lung adenocarcinoma (A549), and liver carcinoma (HepG2) cells. *Phytotherapy Research*, 29(6), 944–948. <https://doi.org/10.1002/ptr.5329>
- Chrzanowski, J., Chrzanowska, A., & Graboń, W. (2021). Glycyrrhizin: An old weapon against a novel coronavirus. *Phytotherapy Research*, 35(2), 629–636. <https://doi.org/10.1002/ptr.6852>
- Deb, A., Gupta, S., & Mazumder, P. B. (2023). Study on anti-cancer activity of fruit extract of *Terminalia chebula* Retz. by exosome-mediated drug delivery system in HepG2 cell line. *Educational Administration: Theory and Practice*, 29(4), 908–915. <https://doi.org/10.53555/kuey.v29i4.4925>

- Dowluru, K. S., & Rao, K. S. (2020). Phylogenetic analysis and in silico screening of drug targets for ACE2 in human and spike glycoprotein in SARS-CoV-2 for control of COVID-19 [Preprint]. *Research Square*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-23862/v1>
- Fu, Y., Fang, Y., Gong, S., Xue, T., Wang, P., She, L., & Huang, J. (2023). Deep learning-based network pharmacology for exploring the mechanism of licorice for the treatment of COVID-19. *Scientific Reports*, 13(1), 5844. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31380-7>
- Gao, Y. Y., Liang, X. Y., Wang, Q., Zhang, S., Zhao, H., Wang, K., ... Gao, F. S. (2022). Mind the feline coronavirus: Comparison with SARS-CoV-2. *Gene*, 825, 146443. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.146443>
- Gomaa, A. A., & Abdel-Wadood, Y. A. (2021). The potential of glycyrrhizin and licorice extract in combating COVID-19 and associated conditions. *Phytomedicine Plus*, 1(3), 100043. <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2021.100043>
- Harun, M. S., Kuan, C. O., Selvarajah, G. T., Wei, T. S., Arshad, S. S., Hair-Bejo, M., & Omar, A. R. (2013). Transcriptional profiling of feline infectious peritonitis virus infection in CRFK cells and in PBMCs from FIP-diagnosed cats. *Virology Journal*, 10, 329. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-329>
- Ihssen, J., Faccio, G., Yao, C., Sirec, T., & Spitz, U. (2021). Fluorogenic in vitro activity assay for the main protease (Mpro) from SARS-CoV-2 and its adaptation to the identification of inhibitors. *STAR Protocols*, 2(3), 100793. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100793>
- Kim, Y. W., Kang, H. E., Lee, M. G., Hwang, S. J., Kim, S. C., Lee, C. H., & Kim, S. G. (2009). Liquiritigenin, a flavonoid aglycone from licorice, has a choleretic effect and the ability to induce hepatic transporters and phase II enzymes. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 296(2), G372–G381. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.90524.2008>
- Kim, Y. W., Zhao, R. J., Park, S. J., Lee, J. R., Cho, I. J., Yang, C. H., ... Kim, S. C. (2008). Anti-inflammatory effects of liquiritigenin as a consequence of the inhibition of NF- κ B-dependent iNOS and proinflammatory cytokines production. *British Journal of Pharmacology*, 154(1), 165–173. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.79>

- Kuang, Y., Li, B., Fan, J., Qiao, X., & Ye, M. (2018). Antitussive and expectorant activities of licorice and its major compounds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 26(1), 278–284. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.11.046>
- Lee, H.-H., Paudel, K. R., & Kim, D.-W. (2015). *Terminalia chebula* fructus inhibits migration and proliferation of vascular smooth muscle cells and production of inflammatory mediators in RAW 264.7. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 502182. <https://doi.org/10.1155/2015/502182>
- Li, Y., Li, X., Wang, J., Kuang, Y., & Qi, M. (2017). Anti-hepatitis B viral activity of *Phyllanthus niruri* L. (Phyllanthaceae) in HepG2/C3A and SK-HEP-1 cells. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 16(8), 1873–1879. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v16i8.17>
- Lu, C.-C., Yang, S.-H., Hsia, S.-M., Wu, C.-H., & Yen, G.-C. (2016). Inhibitory effects of *Phyllanthus emblica* L. on hepatic steatosis and liver fibrosis in vitro. *Journal of Functional Foods*, 20, 20–30. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.10.012>
- Ma, J., Ding, L., Zang, X., Wei, R., Yang, Y., Zhang, W., ... Tong, X. (2024). Licoricesaponin G2 ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via targeting the TNF- α signaling pathway and inhibiting the epithelial–mesenchymal transition. *Frontiers in Pharmacology*, 15, 1437231. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1437231>
- Murck, H. (2020). Symptomatic protective action of glycyrrhizin (licorice) in COVID-19 infection? *Frontiers in Immunology*, 11, 1239. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01239>
- Nazir, F., John Kombe Kombe, A., Khalid, Z., Bibi, S., Zhang, H., Wu, S., & Jin, T. (2024). SARS-CoV-2 replication and drug discovery. *Mol Cell Probes*, 77, 101973. doi:10.1016/j.mcp.2024.101973
- Paltrinieri, S., Giordano, A., Stranieri, A., & Lauzi, S. (2021). Feline infectious peritonitis (FIP) and coronavirus disease 19 (COVID-19): Are they similar? *Transbound Emerg Dis*, 68(4), 1786–1799. doi:10.1111/tbed.13856
- Park, E.-s., Kuroda, Y., Uda, A., Kaku, Y., Okutani, A., Hotta, A., . . . Maeda, K. (2024). The comparison of pathogenicity among SARS-CoV-2 variants in domestic cats. *Scientific Reports*, 14(1), 21815. doi:10.1038/s41598-024-71791-8
- Patra, S., Panda, P. K., Naik, Prajna P., Panigrahi, D. P., Praharaj, P. P., Bhol, C. S., . . . Bhutia, S. K. (2020). *Terminalia bellirica* extract induces anticancer activity through modulation of

- apoptosis and autophagy in oral squamous cell carcinoma. Food and Chemical Toxicology, 136, 111073. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.111073>
- Pawar, R. S., & Bhutani, K. K. (2005). Effect of oleanane triterpenoids from Terminalia arjuna — a cardioprotective drug on the process of respiratory oxyburst. Phytomedicine, 12(5), 391-393. doi:<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.11.007>
- Peiris, D. S. H. S., Fernando, D. T. K., Senadeera, S. P. N. N., & Ranaweera, C. B. (2023). Phytochemical Screening for Medicinal Plants: Guide for Extraction Methods. Asian Plant Research Journal, 11(4), 13-34. doi:10.9734/aprj/2023/v11i4216
- Pinmai, K., Chunlaratthanabhorn, S., Ngamkitidechakul, C., Soonthornchareon, N., & Hahnvanawong, C. J. W. J. O. g. W. (2008). Synergistic growth inhibitory effects of Phyllanthus emblica and Terminalia bellerica extracts with conventional cytotoxic agents: doxorubicin and cisplatin against human hepatocellular carcinoma and lung cancer cells. 14(10), 1491.
- Popovich, D. G., Yeo, S. Y., Zhang, W. J. E. B. C., & Medicine, A. (2011). Ginseng (Panax quinquefolius) and Licorice (Glycyrrhiza uralensis) Root Extract Combinations Increase Hepatocarcinoma Cell (Hep-G2) Viability. 2011(1), 408273.
- Qin, H., Song, Z., Zhao, C., Yang, J., Xia, F., Wang, L., Zheng, W. (2022). Liquiritigenin Inhibits Lipid Accumulation in 3T3-L1 Cells via mTOR-Mediated Regulation of the Autophagy Mechanism. 14(6), 1287.
- Qin, Y., Zhou, M., Hao, Y., Huang, X., Tong, D., Huang, L., . . . Zhu, T. (2024). Amplified positive effects on air quality, health, and renewable energy under China’s carbon-neutral target. Nature Geoscience, 17(5), 411-418. doi:10.1038/s41561-024-01425-1
- Ramalingam, M., Kim, H., Lee, Y., & Lee, Y.-I. (2018). Phytochemical and Pharmacological Role of Liquiritigenin and Isoliquiritigenin From Radix Glycyrrhizae in Human Health and Disease Models. Volume 10 - 2018. doi:10.3389/fnagi.2018.00348
- Sahragard, A., Alavi, Z., Abolhassanzadeh, Z., Moein, M., Mohammadi-Bardbori, A., Omid, M., & Zarshenas, M. M. J. B. R. I. (2021). Assessment of the cytotoxic activity of Triphala: A semisolid traditional formulation on HepG2 cancer cell line. 2021(1), 6689568.

- Seetaha, S., Khamplong, P., Wanaragthai, P., Aiebchun, T., Ratanabunyong, S., Krobthong, S., . . . Choowongkamon, K. (2022). KERRA, Mixed Medicinal Plant Extracts, Inhibits SARS-CoV-2 Targets Enzymes and Feline Coronavirus. 2(5), 621-632.
- Shafa Shavira, S. H., Fatmaria Fatmaria. (2023). The in-silico potential of *Andrographis paniculata* phytocompounds as antiviral for the treatment of COVID-19: A systematic review %J Journal of Applied Pharmaceutical Science (Vol. Volume: 13): Issue: 8.
- Suriyo, T., Chotirat, S., Rangkadilok, N., Pholphana, N., & Satayavivad, J. (2021). Interactive effects of *Andrographis paniculata* extracts and cancer chemotherapeutic 5-Fluorouracil on cytochrome P450s expression in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. Journal of Herbal Medicine, 26, 100421. doi:<https://doi.org/10.1016/j.hermed.2021.100421>
- Tungpradit, R., Sinchaikul, S., Phutrakul, S., Wongkham, W., & Chen, S.-T. Anti-cancer compound screening and isolation: *Coscinium fenestratum*, *Tinospora crispa*, and *Tinospora cordifolia*.
- Wang, A., Lu, Y., Shi, P., & Zhang, H. (2017). Hydroxyl and hydroperoxyl radicals scavenging by isoliquiritigenin and liquiritigenin: a quantum chemical study. Structural Chemistry, 28(4), 1181-1186. doi:10.1007/s11224-017-0924-0
- Wangkiri, N., Sarnsri, T., Thongkanjana, T., Sae-Tan, S. J. A., & Resources, N. (2021). Antioxidant potentials and inhibitory activities against α -amylase and α -glucosidase, and glucose uptake activity in insulin-resistant HepG2 cells of some medicinal plants. 55(1), 98-104.
- Zhu, J., Deng, Y.-Q., Wang, X., Li, X.-F., Zhang, N.-N., Liu, Z., . . . Xie, Z. (2020). An artificial intelligence system reveals that liquiritin inhibits SARS-CoV-2 by mimicking type I interferon. bioRxiv. doi:10.1101/2020.05.02.074021
- Zwicklbauer, K., Bergmann, M., Alberer, M., von Both, U., & Hartmann, K. (2025). [Feline infectious peritonitis - a current overview]. Tierärztl. Prax. Ausg. K Kleintiere Heimtiere, 53(2), 96-102. doi:10.1055/a-2524-3760