

ชื่อโครงการ การพัฒนาผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพรแผนปัจจุบันรักษาโรคมะเร็งประสิทธิภาพสูงทั้งแบบ
ตำรับเดี่ยวและแบบตำรับผสม (cocktail) สเปคตรัมกว้าง

บทคัดย่อภาษาไทย

ศาสตราจารย์เกียรติคุณ ดร. ภญ. อรัญญา มโนสร้อย และคณะ
11 ตุลาคม 2561

โครงการวิจัยนี้ได้คัดเลือกตำรับยาสมุนไพรต้านมะเร็งจากฐานข้อมูลตำรับยาสมุนไพรประเทศไทย “มโนสร้อย ๓” ที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งสูงเป็น 10 อันดับแรกในเซลล์มะเร็ง 4 ชนิด ซึ่งได้แก่ มะเร็งช่องปาก มะเร็งปากมดลูก มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งตับ จำนวนรวม 29 ตำรับมาเตรียมเป็นสารสกัดโดยวิธีการที่ระบุในตำรับ จากผลการเตรียมสารสกัดพบว่า สารสกัดที่ได้ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นผงร่วนหยาบหรือเหนียวติดกันเป็นก้อน สีน้ำตาลอมแดง ไปจนถึงสีน้ำตาลเข้ม มีเปอร์เซ็นต์ผลผลิตอยู่ในช่วง 3.25 - 25.25 % จากนั้นนำสารสกัดตำรับยาสมุนไพรที่เตรียมได้ไปทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง พบว่า สารสกัดตำรับ S015 สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB), มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29), มะเร็งปอด (A549) และมะเร็งลำไส้ใหญ่ (Caco2) ได้สูงสุด โดยมีความ IC₅₀ เท่ากับ 42.37±5.54, 8.95±3.55, 7.54±3.07 และ 0.47±0.27 µg/ml ซึ่งมีความแรงคิดเป็น 0.0054, 2.3721, 0.7865 และ 0.1702 เท่าของยามาตรฐาน cisplatin ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดตำรับ N040, N092, NE013 และ S003 สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa), มะเร็งตับ (Hep G2), มะเร็งต่อมลูกหมาก (DU145) และมะเร็งเต้านม (MCF7) ได้สูงสุด โดยมีความ IC₅₀ เท่ากับ 15.98±2.74, 6.63±4.49, 0.10±0.09 และ 5.13±3.67 µg/ml ซึ่งมีความแรงคิดเป็น 0.0094, 0.0015, 5.3000 และ 1.3138 เท่าของยามาตรฐาน cisplatin ตามลำดับ ดังนั้น จึงได้นำสารสกัดตำรับยาดังกล่าวจำนวน 5 ตำรับ ซึ่งได้แก่ S015, N040, N092, NE013 และ S003 มาผสมเพื่อเตรียมเป็นสารสกัดแบบผสม (cocktails) ตำรับยาสมุนไพรต้านมะเร็งจำนวนทั้งหมด 26 ตัวอย่าง จากนั้น นำสารสกัดแบบผสมที่เตรียมได้ไปทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง พบว่า สารสกัดแบบผสม AC, DE, ABE, BC, ABC, ACDE, ACE และ AE สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB), มะเร็งปากมดลูก (HeLa), มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29), มะเร็งตับ (Hep G2), มะเร็งต่อมลูกหมาก (DU145), มะเร็งเต้านม (MCF7), มะเร็งปอด (A549) และมะเร็งลำไส้ใหญ่ (Caco2) ได้สูงสุด ซึ่งมีความเข้มข้นที่ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง 50% (IC₅₀) เท่ากับ 0.14±0.13, 1.45±0.74, 0.04±0.01, 9.24±6.85, 6.29±1.66, 1.19±0.63, 0.07±0.05 และ 0.06±0.02 µg/ml โดยมีความแรงคิดเป็น 1.6429, 0.1034, 530.7500, 0.0011, 0.0843, 5.6639, 84.7143 และ 1.3333 เท่าของยามาตรฐาน cisplatin ตามลำดับ ดังนั้น จึงได้คัดเลือกสารสกัดแบบผสมของตำรับยาสมุนไพรต้านมะเร็งที่มีฤทธิ์ครอบคลุมด้านการเจริญของเซลล์มะเร็งสูงสุด 2 อันดับแรก ซึ่งได้แก่ สารสกัดแบบผสม AE และ ACE ซึ่งมีฤทธิ์ครอบคลุมด้านการเจริญของเซลล์มะเร็งจำนวน 7 และ 6 ชนิด ตามลำดับ มาทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งปากมดลูกและมะเร็งลำไส้ใหญ่ในสัตว์ทดลอง สารสกัดแบบผสม AE สามารถออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) ได้ โดยมีความ % maximum inhibition เท่ากับ 63.81 % ซึ่งมีความแรงคิดเป็น 0.89 เท่า ของยามาตรฐาน cisplatin ในขณะที่ สารสกัดแบบผสม ACE สามารถออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) ได้

*** ลิขสิทธิ์ของกองทุนภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย

โดยมีค่า % maximum inhibition เท่ากับ 41.07 % ซึ่งมีความแรงคิดเป็น 1.81 เท่า ของยา
มาตรฐาน 5-fluorouracil โดยสารสกัดแบบผสมทั้ง 2 ตัวอย่าง มีความปลอดภัยในการนำไปใช้
เนื่องจากไม่พบว่ามี การตาย การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักและผลข้างเคียงของหนูที่ได้รับสารสกัด
เมื่อนำสารสกัดแบบผสม AE และ ACE ไปทดสอบความเป็นพิษแบบเฉียบพลันในสัตว์ทดลอง พบว่า มี
ความปลอดภัยในระดับสูง โดยขนาดที่ทำให้หนูตายครั้งหนึ่ง (LD₅₀) มีค่ามากกว่า 5,000 mg / kg
body weight ในการศึกษาสมบัติทางเคมีและกายภาพและทางพิษวิทยาของสารสกัดแบบผสมจาก
ตำรับยาสมุนไพรต้านมะเร็ง พบว่า สารสกัดแบบผสม AE และ ACE สามารถละลายได้ในน้ำและมีความ
คงตัวต่อกรดแก่ (HCl) กรดอ่อน (CH₃COOH) สารออกซิไดส์ (H₂O₂) และเกลือ (CH₃COONa)
สารสกัดแบบผสม AE และ ACE ให้ผลบวกต่อการทดสอบ glycoside, steroid, tannin, triterpene
และ xanthone นอกจากนี้ ได้จัดทำ HPLC finger print ของสารสกัดแบบผสม AE และ ACE โดย
ใช้สารมาตรฐาน gallic acid เป็น marker โดยพบ gallic acid เท่ากับ 0.88±0.08 และ
10.38±1.74 % ตามลำดับ จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้น สามารถจัดทำ specification ของสารสกัด
แบบผสม AE และ ACE สำหรับการควบคุมคุณภาพสารสกัด จากการทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยา
ออกซิเดชันของสารสกัดแบบผสมจากตำรับยาสมุนไพรต้านมะเร็ง พบว่าสารสกัดแบบผสม AE มีฤทธิ์
จับอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันไม่อิ่มตัว โดยมีค่า SC₅₀ และ IPC₅₀
เท่ากับ 0.57 และ 0.02 mg/ml ซึ่งมีความแรงคิดเป็น 0.1053 และ 3.5000 เท่า ของสารมาตรฐาน
ascorbic acid ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดแบบผสม ACE มีฤทธิ์จับอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้ง
ปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันไม่อิ่มตัว โดยมีค่า SC₅₀ และ IPC₅₀ เท่ากับ 0.20 และ 0.05 mg/ml ซึ่ง
มีความแรงคิดเป็น 0.3000 และ 1.4000 เท่าของสารมาตรฐาน ascorbic acid ตามลำดับ สารสกัด
แบบผสมทั้ง 2 ตัวอย่าง ไม่มีฤทธิ์ในการจับโลหะ ในการทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการตายแบบอะพอพโต
ซิสของสารสกัดแบบผสมจากตำรับยาสมุนไพรต้านมะเร็ง พบว่า สารสกัดแบบผสม AE สามารถ
กระตุ้นการตายแบบอะพอพโตซิสในเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) โดยมีค่า maximum apoptosis
เท่ากับ 53.75 % มีความแรงคิดเป็น 2.9501, 2.4735 และ 0.8973 เท่าของยามาตรฐาน
vincristine, cisplatin และ 5-FU ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดแบบผสม ACE สามารถกระตุ้นการ
ตายแบบอะพอพโตซิสในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) โดยมีค่า maximum apoptosis เท่ากับ
9.63 % ซึ่งมีความแรงคิดเป็น 0.6973, 0.6854 และ 1.1237 เท่าของยามาตรฐาน vincristine,
cisplatin และ 5-FU ตามลำดับ คณะผู้วิจัยได้เลือกสารสกัดแบบผสม AE ซึ่งมีคะแนนรวมสูงสุด
(1,130 คะแนน) ไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพรแผนปัจจุบันประสิทธิภาพสูงแบบตำรับผสม
(cocktail) สเปคตรัมกว้าง เพื่อใช้รักษาโรคมะเร็ง สูตรตำรับแคปซูลของสารสกัดแบบผสม AE ที่
เตรียมโดยใช้ Cap-O-Sil เป็นสารช่วยดูดซับมี lactose monohydrate และ Comprecel M101
เป็นสารเพิ่มปริมาณ มีคุณสมบัติทางกายภาพ ซึ่งได้แก่ ความผันแปรของน้ำหนักแกรนูลและ
ระยะเวลาการแตกตัวของแคปซูลผ่านเกณฑ์ที่กำหนด นอกจากนี้ยังมีความคงตัวของปริมาณ gallic
acid ซึ่งใช้เป็น marker ในแคปซูลสารสกัดแบบผสม AE หลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ ที่ 4±2,
25±2 และ 45±2 °C เป็นเวลา 3 เดือน จากการประเมินความพึงพอใจผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพรแผน
ปัจจุบันประสิทธิภาพสูงแบบตำรับผสม (cocktail) สเปคตรัมกว้างในรูปแบบแคปซูลจากสารสกัดแบบ
ผสม AE พบว่า อาสาสมัครส่วนใหญ่มีความพึงพอใจในผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้ไม่พบการปนเปื้อนของ
จุลินทรีย์ก่อโรคทั้ง 4 ชนิด ตามประกาศสำนักงานอาหารและยา ซึ่งได้แก่ *S. aureus*, *Clostridium*
spp., *Salmonella* spp. และ *E. coli* ในผลิตภัณฑ์แคปซูลสารสกัดแบบผสม AE และผลิตภัณฑ์

ดังกล่าวมีการตรวจพบการปนเปื้อนของสารหนู (As) และตะกั่ว (Pb) เท่ากับ 0.88 และ 0.41 mg/kg ตามลำดับ แต่มีค่าอยู่ในเกณฑ์ตามมาตรฐานกำหนดในประกาศกระทรวงสาธารณสุข เมื่อนำผลิตภัณฑ์แคปซูลสารสกัดแบบผสม AE ไปทดสอบความเป็นพิษแบบเฉียบพลันในสัตว์ทดลอง พบว่ามีความปลอดภัยในระดับสูง โดยขนาดที่ทำให้หนูตายครึ่งหนึ่ง (LD₅₀) มีค่ามากกว่า 5,000 mg / kg body weight จากผลการวิจัยที่ได้ สามารถจัดทำ specification ของผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพรแผนปัจจุบันประสิทธิภาพสูงแบบตำรับผสม (cocktail) สเปคตรัมกว้างในรูปแบบแคปซูลจากสารสกัดแบบผสม AE สำหรับสำหรับใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงผลิตภัณฑ์ในการนำไปประกอบการยื่นขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์เสริมอาหารตามประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) ได้ สำหรับต้นทุนการผลิตสารสกัดแบบผสม AE มีค่าเท่ากับ 631.74 บาท/100 g ในขณะที่ต้นทุนการผลิตผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพรแผนปัจจุบันประสิทธิภาพสูงแบบตำรับผสม (cocktail) สเปคตรัมกว้างในรูปแบบแคปซูลจากสารสกัดแบบผสม AE มีค่าเท่ากับ 195.79 บาท/ 100 แคปซูล หรือ 1.95 บาท ต่อ 1 แคปซูล โดยผลิตภัณฑ์แคปซูลสารสกัดแบบผสม AE มีราคาสูงกว่า Taxol[®] ซึ่งเป็นยาต้านมะเร็งจากสมุนไพรที่มีจำหน่ายในท้องตลาดประมาณ 32 เท่า นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวยังมีราคาสูงกว่า Kanglaite[®] injection และ Kanglaite[®] capsule ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ต้านมะเร็งจากลูกเดือยที่มีจำหน่ายในท้องตลาดประมาณ 4 และ 11 เท่าตามลำดับ ดังนั้น การพัฒนาผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพรแผนปัจจุบันประสิทธิภาพสูงแบบตำรับผสม (cocktails) ต้านมะเร็งสเปคตรัมกว้างในรูปแบบแคปซูลจากสารสกัดแบบผสม AE จึงมีศักยภาพสูงในเชิงพาณิชย์

Research project Development of High Efficiency Broad Spectrum
Anti-cancer from Single or Cocktails of Thai Medicinal Plant Recipes

Abstract

Prof. Emeritus Dr. Aranya Manosroi et. al.

11th October 2018

The 29 Thai medicinal plant anti-cancer recipes from the Thai medicinal plant recipe Database MANOSROI III which were the top ten anti-proliferative activity against 4 human cancer cell lines including mouth, cervical, colorectal and liver cancers were extracted using the traditional method indicated in the recipe. Most extracts were reddish-brown to brown paste. The percentage yields of the 29 recipe extracts were in the range of 3.25-25.25 %. Anti-proliferative activity of the 29 recipe extracts on cancer cell lines was investigated. The extract of recipe S015 showed the highest anti-proliferative activity against human mouth epidermal carcinoma (KB), human colon adenocarcinoma (HT-29), human lung carcinoma (A549) and human colon adenocarcinoma (Caco2) with the IC₅₀ values of 42.37±5.54, 8.95±3.55, 7.54±3.07 and 0.47±0.27 µg/ml which were 0.0054, 2.3721, 0.7865 and 0.1702 folds of cisplatin, respectively. While, the extracts of recipes N040, N092, NE013 and S003 exhibited the highest anti-proliferative activity against human cervical adenocarcinoma (HeLa), human hepatocellular carcinoma (Hep G2), human prostate carcinoma (DU145) and human breast adenocarcinoma (MCF7) with the IC₅₀ values of 15.98±2.74, 6.63±4.49, 0.10±0.09 and 5.13±3.67 µg/ml which were 0.0094, 0.0015, 5.3000 and 1.3138 folds of cisplatin, respectively. Hence, the amounts of the 5 recipe extracts including S015, N040, N092, NE013 and S003 were calculated according to their IC₅₀ values and mixed to obtain the 26 cocktails. Anti-proliferative activity of the 26 cocktails on 8 cancer cell lines were investigated. The cocktails AC, DE, ABE, BC, ABC, ACDE, ACE and AE showed the highest anti-proliferative activity against KB, HeLa, HT-29, Hep G2, DU145, MCF7, A549 and Caco2 with the IC₅₀ values of 0.14±0.13, 1.45±0.74, 0.04±0.01, 9.24±6.85, 6.29±1.66, 1.19±0.63, 0.07±0.05 and 0.06±0.02 µg/ml which were 1.6429, 0.1034, 530.7500, 0.0011, 0.0843, 5.6639, 84.7143 and 1.3333 folds of cisplatin, respectively. The 2 cocktails including AE and ACE which demonstrated broad spectrum anti-proliferative activity against 7 and 6 cancer cell lines, respectively were selected and investigated for *in vivo* anti-cancer activity in the HeLa and HT-29 xenograft nude mice models. Cocktail AE demonstrated anti-tumor activity against HeLa with the percentages of maximum inhibition of 63.81 % which was 0.89 fold of the standard anti-cancer drug, cisplatin. While, cocktail ACE

showed anti-tumor activity against HT-29 with the percentages of maximum inhibition of 41.07 % which was 1.81 folds of the standard anti-cancer drug, 5-fluorouracil (5-FU). There was no mortality, weight loss and noticeable major side effects of the animals treated with the extracts at all doses of the cocktails AE and ACE. In acute toxicity study, the cocktails AE and ACE exhibited high safety in mice with the LD₅₀ value higher than 5,000 mg/kg body weight. Physicochemical properties and phytochemicals of these 2 selected cocktails were performed in order to standardize and establish their specifications. The cocktails AE and ACE were slightly soluble in water and stable in strong acid (HCl), weak acid (CH₃COOH), oxidizing agent (H₂O₂) and salt (CH₃COONa). Glycosides, steroids, tannins, triterpenes and xanthenes were the most abundant phytochemicals found in the two cocktails. Besides, the HPLC fingerprints of cocktails AE and ACE were constructed by using gallic acid as a marker. The gallic acid contents in the cocktails AE and ACE were 0.88±0.08 and 10.38±1.74 %, respectively. The 2 cocktails were further examined for anti-oxidative and apoptotic activities. Cocktail AE demonstrated free radical scavenging and lipid peroxidation inhibitory activities with the SC₅₀ and IPC₅₀ of 0.57 and 0.02 mg/ml which were 0.1053 and 3.5000 folds of ascorbic acid, respectively. While, cocktail ACE gave free radical scavenging and lipid peroxidation inhibitory activities with the SC₅₀ and IPC₅₀ of 0.20 and 0.05 mg/ml which were 0.3000 and 1.4000 folds of ascorbic acid, respectively. Metal chelating activity was not detected in the 2 cocktails. For apoptotic activity, cocktail AE showed the apoptosis induction on HeLa with the maximum apoptosis of 53.75 % which was 2.9501, 2.4735 and 0.8973 folds of vincristine, cisplatin and 5-FU, respectively. While, cocktail ACE exhibited the apoptosis induction on HT-29 with the maximum apoptosis of 9.63 % which was 0.6973, 0.6854 and 1.1237 folds of vincristine, cisplatin and 5-FU, respectively. The cocktail AE which gave the highest biological activity scores of 1,130 points was selected for further the development as capsule formulations. In the formulation of cocktail AE capsule, granules were prepared using Cap-O-Sil as absorbent while lactose monohydrate and Comprecel M101 were used as diluents. The developed cocktail AE capsules passed the quality control of weight variation and disintegration. The active constituent, gallic acid in the developed cocktail AE capsules were stable in various conditions at 4±2, 25±2 and 45±2°C for 3 months. In the satisfaction study in volunteers, most volunteers satisfied in the developed cocktail AE capsules. For the microbial and heavy metal contamination examinations, the developed cocktail AE capsules did not have any microbial contamination including *S. aureus*, *Clostridium* spp., *Salmonella* spp. and *E. coli*. The developed product was found the contamination of arsenic (As) and lead (Pb) at 0.88 and 0.41 mg/kg, respectively, but still in the acceptable allowable standard range of the Thai FDA. In acute toxicity

study, the developed cocktail AE capsules demonstrated high safety in mice with the LD₅₀ value higher than 5,000 mg/kg body weight. The specification of the developed cocktail AE capsules was performed for the further dietary supplement registration to Thai FDA. The production cost of the cocktail AE and the developed cocktail AE capsules were 631.74 baht/100 g and 195.79 baht/100 capsules (1.95 Baht/capsule), respectively. In comparison with the commercial anti-cancer drug from herbs, Taxol[®], the cost of Taxol[®] was 32 times more expensive than our developed cocktail AE capsules. Besides, the cost of the commercial anti-cancer products from Job's Tear including Kanglaite[®] injection and Kanglaite[®] capsule were 4 and 11 times more expensive than our developed product, respectively. Hence, this study has indicated high efficiency broad spectrum anti-cancer of the developed cocktail AE capsule that has potential to be marketed as a food supplement or anti-cancer herbal medicinal pharmaceutical for the further commercialization.

