



รายงานฉบับสมบูรณ์

(31 มกราคม 2557 – 30 มกราคม 2558)

โครงการวิจัยเรื่อง

“การพัฒนาผลิตภัณฑ์ตำรับยาสมุนไพรไทยต้านมะเร็งจาก
ฐานข้อมูลคัมภีร์ตำรายาสมุนไพรไทย ปีที่ 3”

(Development of anti-cancer Thai medicinal plant recipe products
from Thai medicinal plant recipe database, The 3rd year)

ได้รับทุนสนับสนุนจากกองทุนภูมิปัญญาแพทย์แผนไทย
กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก
กระทรวงสาธารณสุข

งบประมาณปี พ.ศ. 2557

โดย

ศาสตราจารย์ ดร. ภก. จีรเดช มโนสร้อย (หัวหน้าโครงการวิจัย)

และคณะ

หน่วยวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเพื่อการแพทย์แผนไทย

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

ภาควิชาวิทยาศาสตร์เภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์

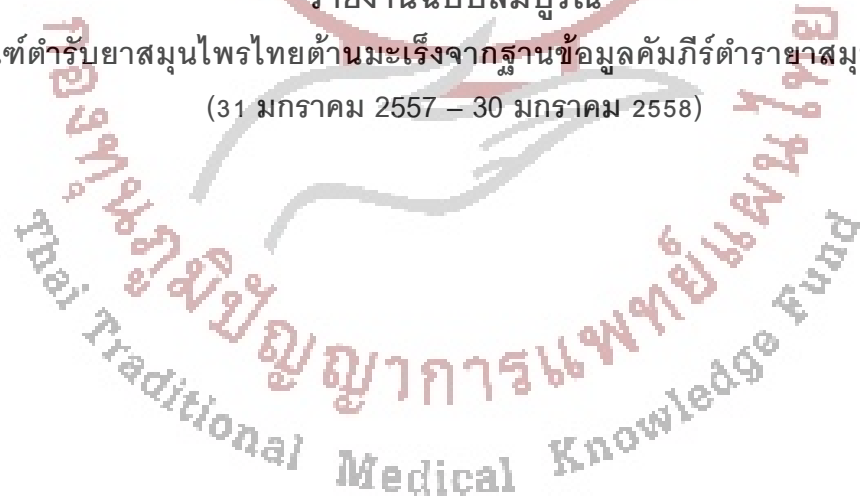
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง “การพัฒนาผลิตภัณฑ์ตำรับยาสมุนไพรไทยด้านมะเร็งจากฐานข้อมูลคัมภีร์ตำรายาสมุนไพรไทย ปีที่ 3” งบประมาณปี พ.ศ. 2557
(31 มกราคม 2557 – 30 มกราคม 2558)

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง “การพัฒนาผลิตภัณฑ์ตำรับยาสมุนไพรไทยด้านมะเร็งจากฐานข้อมูลคัมภีร์ตำรายาสมุนไพรไทย ปีที่ 3” งบประมาณปี พ.ศ. 2557
(31 มกราคม 2557 – 30 มกราคม 2558)



บทคัดย่อภาษาไทย

โครงการวิจัยปีที่ 3 นี้ได้รวบรวมและคัดเลือกคัมภีร์ตำรับยาสมุนไพรจากภาคเหนือ/ ล้านนาและภาคอื่นๆในประเทศไทย แล้วนำมาปริวรรต (แปล) เพื่อจัดทำฐานข้อมูลสนับสนุน : ตำรับยาสมุนไพรด้านมะเร็ง “ฐานข้อมูลคัมภีร์ตำรับยาสมุนไพรของประเทศไทยมโนสร้อย ๓” โดยได้ตำรับยาสมุนไพรเพิ่มจากโครงการวิจัยปีที่ 2 อีกจำนวน 36 ตำรับ เป็นรวมทั้งสิ้น 723 ตำรับ โดยสามารถสืบค้นจากคำสำคัญ 2 คำ ซึ่งได้แก่ ฐาน และมะเร็ง จากนั้นคัดเลือกตำรับยาสมุนไพรที่มีศักยภาพในการต้านมะเร็งโดยใช้ความถี่ได้ตำรับยาสมุนไพรด้านมะเร็ง ทั้งนี้ในปี 3 ที่มีตำรับยาสมุนไพรด้านมะเร็งที่จะต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมจากปีที่ 2 อีกจำนวน 20 ตำรับ รวมทั้งสิ้น 191 ตำรับ มาเตรียมเป็นสารสกัดโดยวิธีการที่ระบุในตำรับ จากผลการเตรียมสารสกัดพบว่า percentage yield อยู่ในช่วง 10.45– 41.00 % สารสกัดที่ได้ส่วนใหญ่ให้ผลบวกกับสารประเภท glycosides, tannins, flavonoids และ xanthones จากนั้นนำสารสกัดตำรับยาสมุนไพรที่เตรียมได้ไปทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็ง 4 ชนิด ในหลอดทดลองโดยวิธี sulforhodamine B (SRB) assay ซึ่งได้แก่ มะเร็งช่องปาก (KB) มะเร็งปากมดลูก (HeLa) มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) และ มะเร็งตับ (Hep G2) พบว่า ตำรับยาสมุนไพรที่คัดเลือกเพิ่มเติมทั้ง 20 ตำรับ ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) มะเร็งปากมดลูก (HeLa) มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) และมะเร็งตับ (Hep G2) โดยมีค่า IC_{50} มากกว่า 1,000 $\mu\text{g/ml}$ อย่างไรก็ตาม เมื่อนำผลการทดสอบดังกล่าวมาพิจารณาร่วมกับผลการทดสอบของสารสกัดตำรับยาสมุนไพรที่คัดเลือกมาแล้วจำนวน 171 ตำรับ ในโครงการวิจัยปีที่ 1 และ 2 เป็นรวมจำนวนทั้งสิ้น 191 ตำรับ พบว่าตำรับ อส028 น040 น092 และ น036 เป็นตำรับที่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปาก มะเร็งปากมดลูก มะเร็งลำไส้ใหญ่และ มะเร็งตับได้สูงสุด ตามลำดับ ตำรับดังกล่าวนี้มีศักยภาพสูงสุดที่จะสามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ตำรับยาสมุนไพรไทยด้านมะเร็งต่อไป ในการเตรียมสารสกัดจากตำรับสมุนไพรด้าน มะเร็งที่คัดเลือกมาจำนวน 4 ตำรับ พบว่า percentage yield อยู่ในช่วง 6.43–19.50 % จากการทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งแบบอะพอพโตซิสของสารสกัดตำรับยาสมุนไพรด้าน มะเร็งที่คัดเลือกมาโดยวิธีย้อมสีผสม acridine orange และ ethidium bromide (AO/EB) พบว่า สารสกัดตำรับ อส028 น040 น092 และ น036 สามารถกระตุ้นการตายแบบอะพอพโตซิสได้ใน เซลล์มะเร็งทั้ง 4 ชนิด ซึ่งได้แก่ เซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) มะเร็งปากมดลูก (HeLa) มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) และ มะเร็งตับ (Hep G2) โดยมีค่า maximum apoptosis เท่ากับ 16.95, 2.65, 5.33 และ 4.57 % ตามลำดับ ซึ่งมีความแรงคิดเป็น 1.8606, 0.7615, 1.9453 และ 1.5083 เท่า ของยามาตรฐาน cisplatin ตามลำดับ นอกจากนี้สารสกัดตำรับยาทั้ง 4 ตำรับดังกล่าว ยังสามารถ กระตุ้นการตายแบบอะพอพโตซิสต่อเซลล์มะเร็งโดยมีผลในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์

caspase-3 โดยสารสกัดตำรับ อส028 น040 น092 และ น036 มีค่า fold increasing ต่อเซลล์มะเร็ง KB, HeLa, HT-29 และ Hep G2 เท่ากับ 1.63, 1.21, 2.87 และ 1.21 เท่าของกลุ่มควบคุมตามลำดับ ซึ่งมีฤทธิ์กระตุ้นการตายแบบอะพอพโตซิสคิดเป็น 1.52, 1.05, 2.33 และ 1.05 เท่าของยามาตรฐาน cisplatin ในการศึกษาสมบัติทางเคมีและกายภาพและจัดทำ specification ของสารสกัดจากตำรับยาสมุนไพรต้านมะเร็งที่คัดเลือกมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ พบว่าสารสกัดตำรับ อส028, น040 และ น092 สามารถละลายในน้ำได้แบบ sparingly soluble ในขณะที่สารสกัดตำรับยาสมุนไพร น036 ละลายในน้ำได้แบบ slightly soluble สารสกัดทั้ง 4 ตำรับ ไม่คงตัวต่อเบสแก่และ reducing agent เมื่อนำสารสกัดตำรับยาที่คัดเลือกมาทั้ง 4 ตำรับ ไปศึกษาความปลอดภัยและฤทธิ์ต้านมะเร็งในสัตว์ทดลองพบว่า สารสกัดตำรับยา น040 อส028 น092 และ น036 มีความปลอดภัยในสัตว์ทดลองโดยไม่พบสัตว์ทดลองตายและไม่มีอาการผิดปกติในระหว่างการทดสอบความเป็นพิษแบบกึ่งเรื้อรัง (subchronic toxicity) รวมทั้งมีผลการตรวจวิเคราะห์ทางโลหิตวิทยาและชีวเคมีอยู่ในเกณฑ์ปกติ สำหรับพยาธิสภาพของอวัยวะภายในของสัตว์ทดลองพบว่าสารสกัดตำรับยาสมุนไพรทำให้มีความเป็นพิษต่อบางอวัยวะซึ่งได้แก่ ปอด ตับ ไต และ ลำไส้เล็ก อย่างไรก็ตาม เนื่องจากขนาดของสารสกัดตำรับยาสมุนไพรดังกล่าวที่ใช้ในการทดสอบมีขนาดค่อนข้างสูง (1,000 mg/kg body weight) ซึ่งมีขนาดสูงกว่าขนาดยาที่ใช้ในการรักษาของสารสกัดตำรับยา น040 อส028 น092 และ น036 ประมาณ 112, 186, 61 และ 109 เท่าตามลำดับ ดังนั้น สารสกัดตำรับยาดังกล่าวจึงมีความปลอดภัยในสัตว์ทดลองและสามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ยาต้านมะเร็งเพื่อใช้รักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งต่อไป สำหรับผลการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งในสัตว์ทดลองโดยวิธี human tumor xenograft พบว่าสารสกัดตำรับยาสมุนไพรรักษาโรคมะเร็ง ตำรับ น040 อส028 และ น092 สามารถออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) มะเร็งช่องปาก (KB) และมะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) ได้ โดยมีค่า % maximum inhibition ของตำรับ น040 และ อส028 เท่ากับ 57.23 และ 49.26% ตามลำดับ ซึ่งมีความแรงคิดเป็น 0.65 และ 0.69 เท่าของยามาตรฐาน cisplatin ตามลำดับและค่า % maximum inhibition ของตำรับ น092 เท่ากับ 77.90% ซึ่งมีความแรงคิดเป็น 1.76 เท่าของยามาตรฐาน 5-fluorouracil โดยสารสกัดตำรับยาดังกล่าวมีความปลอดภัยในการนำไปใช้เนื่องจากไม่พบว่ามี การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักและไม่มีผลข้างเคียงในหนูที่ได้รับการรักษาด้วยสารสกัดตำรับยาดังกล่าว ดังนั้น ตำรับยาสมุนไพรรักษาโรคมะเร็งทั้ง 3 ตำรับ จึงมีศักยภาพสูงในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต้านมะเร็งปากมดลูก มะเร็งช่องปาก และมะเร็งลำไส้ใหญ่ อย่างไรก็ตาม เนื่องจากเซลล์มะเร็งตับ (Hep G2) ไม่มีคุณสมบัติเหนียวนำไปเกิดก้อนมะเร็ง จึงไม่สามารถนำมาศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งตับของตำรับยา น036 ในสัตว์ทดลองได้ อย่างไรก็ตาม ตำรับยา น036 ยังคงมีศักยภาพสูงในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต้านมะเร็งตับ เนื่องจากตำรับยาดังกล่าวมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งตับ (Hep G2) ในหลอด

ทดลองสูงสุดและสามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งเติบโตเกิดการตายแบบอะพอพโตซิส ตลอดจนมีความปลอดภัยในสัตว์ทดลอง ดังนั้นจึงได้คัดเลือกสารสกัดตำรับทั้ง 4 ตำรับดังกล่าว ไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์รูปแบบแคปซูลจากสารสกัดตำรับยาสมุนไพรไทยต้านมะเร็งที่อยู่ในรูปแกรนูลโดยใช้ lactose monohydrate และ Comprecel M101 เป็นสารเพิ่มปริมาณ โดยไม่ใช้สารยึดเกาะ ตำรับแคปซูลทั้ง 4 ตำรับ ที่พัฒนาได้มีค่าการแปรปรวนของน้ำหนักและการแตกตัวอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด รวมถึงมีความคงตัวของปริมาณสารสำคัญ ซึ่งได้แก่ tannin สำหรับสารสกัดตำรับ อส028 และ brazilin สำหรับสารสกัดตำรับ น040 และ น036 และ gallic acid สำหรับสารสกัดตำรับ น092 เมื่อเก็บไว้ในสภาวะต่างๆ ที่ 4 ± 2 , 25 ± 2 และ $45\pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 3 เดือน จากการประเมินความพึงพอใจผลิตภัณฑ์แคปซูลที่มีส่วนผสมของสารสกัดตำรับยาสมุนไพรต้านมะเร็งในอาสาสมัคร พบว่า อาสาสมัครส่วนใหญ่มีความพึงพอใจในลักษณะภายนอกของแกรนูลของผลิตภัณฑ์แคปซูลจากสารสกัดตำรับยาสมุนไพรทั้ง 4 ตำรับ คณะผู้วิจัยได้คัดเลือกผลิตภัณฑ์แคปซูลสารสกัดตำรับยาสมุนไพรรักษาโรคมะเร็งตำรับ น040 ไปทดสอบในผู้ป่วยโรคมะเร็งปากมดลูก ที่ดำเนินการโดยกรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข เนื่องจากสารสกัดตำรับยาดังกล่าวมีฤทธิ์ต้านมะเร็งปากมดลูก (HeLa) ในหลอดทดลองและสัตว์ทดลอง และมีความปลอดภัยในสัตว์ทดลอง ตลอดจนผลิตภัณฑ์แคปซูลจากสารสกัดตำรับยาดังกล่าวมีความคงตัวทางกายภาพและเคมีโดยมีปริมาณสารสำคัญซึ่งได้แก่ brazilin คงเหลือมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับตำรับอื่นหลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 3 เดือน สำหรับต้นทุนการผลิตของสารสกัดตำรับยาสมุนไพรรักษาโรคมะเร็ง น040 มีค่าเท่ากับ 315.90 บาท/100 g ในขณะที่ต้นทุนการผลิตผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพรรักษาโรคมะเร็งในรูปแบบแคปซูลจากสารสกัดตำรับยาสมุนไพร น040 มีค่าเท่ากับ 206.59 บาท/ 100 แคปซูล หรือ 2.07 บาท ต่อ 1 แคปซูล โดยสารสกัดตำรับยาสมุนไพร น040 และผลิตภัณฑ์ยาแคปซูลจากสารสกัดตำรับยาสมุนไพร น040 สามารถเพิ่มมูลค่าของสมุนไพรที่เป็นองค์ประกอบในตำรับได้ประมาณ 24 เท่า เมื่อเทียบกับสารสกัดมีราคาถูกกว่า Taxol[®] ประมาณ 30 เท่า จากผลการวิจัยดังกล่าว คณะผู้วิจัยยื่นจดสิทธิบัตรเรื่อง “ผลิตภัณฑ์และกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์เพื่อรักษาโรคมะเร็งรูปแบบรับประทานจากตำรับยาสมุนไพรไทย” โดยขณะนี้อยู่ในขั้นตอนการยื่นขอจด และได้ตีพิมพ์บทความวิจัยเรื่อง “Potent anti-cervical cancer activity: Synergistic effects of Thai medicinal plants in recipe N040 selected from the MANOSROI III database” แล้ว ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ Journal of Ethnopharmacology, 143(2013) : 288-296 (Impact factor = 2.939) จากผลการวิจัยนี้ สามารถสรุปได้ว่าตำรับยาสมุนไพรไทยต้านมะเร็งจากฐานข้อมูล “มโนสร้อย ๓” มีศักยภาพสูงที่จะสามารถนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต้านมะเร็งได้

Abstract

The Thai medicinal plant anti-cancer recipes from the Lanna region and all over Thailand were collected, translated and recorded in the Thai medicinal plant anti-cancer recipe database MANOSROI III. At present, this database increased from 36 to 723 anti-cancer recipes. The keywords for cancer “San” and “Ma-reng” were used to select the anti-cancer recipes. The recipes selected from the “MANOSROI III” database increased from 20 to 191 recipes. The 20 medicinal plant recipes from the research project in this phase (the third year) were extracted using the method indicated in the recipe. The percentage yields of the 20 recipe extracts were in the range of 10.45-41.00 %. Glycosides, tannins, flavonoids and xanthenes were the most abundant phytochemicals found in the extracts. Anti-proliferative activity of 20 recipes on 4 cancer cell lines including human mouth epidermal carcinoma (KB), human cervical adenocarcinoma (HeLa), human colon adenocarcinoma (HT-29) and human hepatocellular carcinoma (Hep G2) were investigated by the sulforhodamine B (SRB) assay. The 20 recipe extracts gave inactive anti-proliferative activity on KB, HeLa, HT-29 and Hep G2 with the IC_{50} values more than 100 μ g/ml. From the anti-proliferative activity of the 191 recipe extracts collected from the research project of the 1st to the 3rd year, the extracts of recipe NE028, N040, N092 and N036 showed the highest anti-proliferative activity against KB, HeLa, HT-29 and Hep G2, respectively. This has demonstrated the potential of these recipes for the further development as the anti-cancer herbal drugs. The percentage yields of the 4 selected recipe extracts were in the range of 6.43-19.50 %. The extracts of the 4 recipes were further examined for apoptotic activity by acridine orange and ethidium bromide (AO/EB) staining method. The extracts of recipes NE028, N040, N092 and N036 demonstrated the apoptosis induction on KB, HeLa, HT-29 and Hep G2, respectively with the maximum apoptosis of 16.95, 2.65, 5.33 and 4.57 %, respectively.

respectively which were 1.8606, 0.7615, 1.9453 and 1.5083 folds of cisplatin. Moreover, the apoptosis induction on KB, HeLa, HT-29 and Hep G2 via caspase-3 activation was observed in the extracts of recipes NE028, N040, N092 and N036, respectively. The increasing folds of recipes NE028, N040, N092 and N036 were 1.63, 1.21, 2.87 and 1.21, respectively which were 1.52, 1.05, 2.33 and 1.05 folds of cisplatin. Physicochemical properties of the 4 selected recipe extracts were performed in order to standardize and establish their specifications. The extracts of recipes NE028, N040 and N092 were sparingly soluble in water, whereas that of recipe N036 was slightly soluble in water. All recipe extracts were unstable in strong basic (NaOH) and reducing agent (FeCl₃). Safety evaluation and anti-cancer activity in animals of the 4 selected recipe extracts were investigated. In the subchronic toxicity study, recipes N040, NE028, N092 and N036 indicated no mortality, abnormal animal behaviors and toxic signs in rats, and also no alteration in hematology and clinical blood chemistry. Only minor lesions of some organs including lung, liver, kidney and small intestine were observed. However, the minor toxicity of the extracts might be due to the high dose (1,000 mg/kg body weight) of N040, NE028, N092 and N036 used in the study, which was about 112, 186, 61 and 109 folds of the normal traditional dose, respectively. These results indicated the safety of N040, NE028, N092 and N036 recipe for the further development as anti-cancer herbal drugs for cancer patients. The *in vivo* anti-cancer activity of the 4 selected recipe extracts was investigated using the human tumor xenograft. The recipes N040 and NE028 and N092 demonstrated anti-tumor activity against HeLa, KB and HT-29 respectively. The percentages of maximum inhibition of recipes N040, NE028 and N092 were 57.23 % (0.65 fold of cisplatin), 49.26 % (0.69 fold of cisplatin) and 77.90 % (1.76 folds of 5-fluorouracil), respectively. There were no mortality, weight loss and noticeable major side effects of the animals treated with the extracts at all doses of the N040, NE028 and N092 extracts, cisplatin and 5-fluorouracil. This has demonstrated the potential of these recipes for the further development as herbal drugs

for cervical, mouth and colorectal cancers. Due to the lack of tumorigenicity of Hep G2 cell line, in the *in vivo* anti-cancer activity of recipe N036 on Hep G2 cannot be performed. However, the recipe N036 which showed the highest anti-proliferative and apoptotic activities with safety in rats was still selected for the further development of the herbal drug product for liver cancer. Therefore, the extracts of recipes N040, NE028, N092 and N036 were prepared as the capsule dosage forms. Granules of the 4 recipe extracts were prepared using lactose monohydrate and Compracol M101 as diluents and water as a binder. The developed N040, NE028, N092 and N036 capsules passed the quality control of weight variation and disintegration. The active constituents including tannin (for NE028) and brazilin (for N040 and N036) and gallic acid (for N092) in the developed capsules were stable in various conditions at 4 ± 2 , 25 ± 2 and $45\pm 2^{\circ}\text{C}$ for 3 months. In the satisfaction study in volunteers, most volunteers satisfied the physical appearance of the developed N040, NE028, N092 and N036 capsules. Since the recipe N040 indicated the *in vitro* and *in vivo* anti-cancer activities on HeLa with safety in rats and gave the highest stability of active constituent (brazilin) after stored in various conditions for 3 months. The developed N040 capsules were selected for efficacy study in cervical cancer patients. This clinical study has been performed by the Department for Development of Thai Traditional and Alternative Medicine, Ministry of Public Health in Thailand. The production cost of the recipe N040 extract and the developed N040 capsules were 315.90 baht/100 g and 206.59 baht/100 capsules or 2.07 baht/capsule respectively. The average values of the extracts were 24 folds of the medicinal plants composing in the recipe. The cost of the developed N040 capsules was cheaper than Taxol[®] of 30 folds. Therefore, the N040 extract and capsules improved the values of the medicinal plants composing in the recipe. From the results of the project, the patent entitled "Products and production process of the anti-cancer herbal drugs from the Thai medicinal plant recipes" has been prepared and submitted which is in the registration process. The research article entitled "Potent anti-cervical

cancer activity: Synergistic effects of Thai medicinal plants in recipe N040 selected from the MANOSROI III database” has been published in Journal of Ethnopharmacology 149 (2013), 288-296 (Impact factor = 2.939). Finally, this study has indicated the potential of the Thai medicinal plant recipe from the “MANOSROI III” database for the further development as anti-cancer herbal drugs.

