

บทคัดย่อ

เบญจกูลเป็นยาปรับธาตุในยาไทยประกอบด้วยพืช 5 ชนิดคือ ผลดิบลิ้ รากข้าวพลู เถา สะค้าน รากเจตมูลเพลิงแดงและเหง้าชิง ในทางการแพทย์แผนไทยจะใช้ตำรับนี้ในการปรับสมดุลร่างกายให้เป็นปกติ จากการสัมภาษณ์หมอพื้นบ้านภาคใต้พบว่าหมอพื้นบ้านใช้เบญจกูลก่อนการรักษาเมื่เริ่ม การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ องค์ประกอบทางเคมี และความคงตัว (stability) ของสารสกัดเบญจกูลด้วยเอทานอล 95% โดยการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพจะทำได้โดยการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 4 ชนิด คือ มะเร็งปอด (COR-L23) เต้านม (MCF-7) ปากมดลูก (Hela) และตับ (HepG2) และทดสอบกับเซลล์ปกติของปอดชนิดไฟโบรบลาส (MRC5) โดยใช้วิธีการ SRB assay พบว่า สารสกัดด้วยเอทานอล 95% ของผลดิบลิ้ เถาสะค้าน รากเจตมูลเพลิงแดง เหง้าชิงและตำรับเบญจกูล มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอดมากที่สุด (IC_{50} เท่ากับ 15.82, 18.40, 3.43, 7.90 และ 19.80 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ)

เมื่อนำสารสกัดมาแยกเพื่อหาสารออกฤทธิ์ โดยวิธี bioassay-guide fractionation ได้สารสำคัญ 3 ชนิดคือ piperine, plumbagin และ 6-gingerol ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก ตับ เต้านมและปอด พบว่า plumbagin เป็นสารที่ออกฤทธิ์ต้านมะเร็งได้ทุกชนิด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.78, 0.49, 0.43 และ 0.48 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ นอกจากนั้นสาร plumbagin ยังมีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติอีกด้วย แสดงให้เห็นว่าสาร plumbagin นั้นแสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์แบบไม่จำเพาะ (non specific)

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดเบญจกูล ด้วยเทคนิค โครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) โดยสารสำคัญที่ใช้เป็นตัวเทียบ (marker) คือ piperine และ plumbagin นอกจากนั้นยังต้องมีการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (validate method) โดยพิจารณาจากความตรง (linearity) ความเที่ยง (precision) ความถูกต้อง (accuracy) ปริมาณต่ำสุดของสารที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) และปริมาณต่ำสุดของสารที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOQ) พบว่าวิธีวิเคราะห์ที่นำมาใช้นั้นมีความตรง ความเที่ยง ความถูกต้อง รวมทั้งปริมาณต่ำสุดของสารที่สามารถตรวจวัดได้ และปริมาณต่ำสุดของสารที่สามารถวิเคราะห์ได้ก็มีค่าต่ำ

การศึกษาความคงตัวของสารสกัด ภายใต้สภาวะเร่งที่อุณหภูมิ $45\pm 2^{\circ}\text{C}$ ความชื้นสัมพัทธ์ $75\pm 5\%$ RH เป็นเวลา 4 เดือนพบว่าปริมาณของ piperine ลดลงเพียงเล็กน้อย โดยมีปริมาณเหลืออยู่ 84.91% เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (120 วัน) ส่วนปริมาณของ plumbagin นั้นลดลงอย่างรวดเร็ว โดยมีปริมาณเหลืออยู่เพียง 25.74% เมื่อครบเวลา 120 วัน

จากผลการทดลองทั้งหมดสรุปได้ว่า สารสกัดด้วยเอทานอล 95% ของตำรับเบญจกูลสามารถต้านเซลล์มะเร็งปอดได้ดี ส่วนสารที่แยกได้จากตำรับเบญจกูล โดยเฉพาะ plumbagin นั้น สามารถนำได้ทั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูก ตับ เต้านมและปอด ซึ่งข้อมูลเหล่านี้สนับสนุนการใช้ตำรับเบญจกูลในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งของหมอพื้นบ้าน ในส่วนของการควบคุมคุณภาพและการทดสอบความคงตัว แสดงให้เห็นว่า สาร plumbagin ไม่คงตัว ดังนั้นวิธีการเก็บรักษาสารสกัดเบญจกูลในเบื้องต้น ควรเก็บที่อุณหภูมิต่ำ หรืออุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นต้น เพื่อป้องกันการสูญเสียของสารสำคัญในตำรับ

ABSTRACT

Benjakul (BEN), a Thai Traditional medicine preparation, is composed of five plants; *Piper chaba* fruit (PC), *Piper sarmentosum* root (PS), *Piper interruptum* stem (PI), *Plumbago indica* root (PL) and *Zingiber officinale* rhizome (ZO). It is a balanced health preparation in Thai traditional medicine. From selective interviews of folk doctors in Southern Thailand, it was found that Benjakul was used as the adaptogen drug for cancer patients. The objectives of this research were to study on biological and chemical fingerprints of ethanolic extract of Benjakul preparation, and also its stability for quality control of the extract. The biological fingerprint of Benjakul preparation and its ingredients were investigated by studied cytotoxicity activity against four human cancer cell lines, lung cancer cell lines (COR-L23), breast cancer cell lines (MCF-7), cervical cancer cell lines (Hela), liver cancer cell line (HepG2), and also tested one normal fibroblast cell (MRC-5) using by SRB assay. Benjakul preparation was also isolated for pure compounds and tested cytotoxic activity. The chemical fingerprints of Benjakul preparation was investigated by high performance liquid chromatography (HPLC) and also tested stability under accelerated condition. The results found that PC, PI, PL ZO and BEN showed high cytotoxic against COR-L23 ($IC_{50} = 15.82, 18.40, 3.43, 7.90$ and $19.80 \mu\text{g/ml}$, respectively).

Bioassay guided fractionation was used for isolation of ethanolic extract of Benjakul preparation which showed the highest activity. Three pure compounds were found including piperine (BENS1), plumbagin (BENS1) and 6-gingerol (BENS3). These compounds were tested cytotoxic activities. The results exhibited that plumabagin showed the highest activity against Hela, HepG2, MCF-7 and COR-L23 with IC_{50} value of 0.78, 0.49, 0.43 and 0.48 $\mu\text{g/ml}$, respectively. Although plumbagin exhibited high cytotoxic activity against all types of cancer cell lines, but also showed cytotoxic activity against normal cell line (MRC-5). It showed that plumbagin had nonspecific cytotoxic activity.

The study on chemical fingerprint was carried out using Reverse Phase High performance liquid chromatography (RP-HPLC) and including the study on linearity, precision, accuracy, limit of detection (LOD) and limit of quantitation

(LOQ) for validate the HPLC method. The results exhibited that HPLC method showed good linearity, precision, accuracy and lower LOD and LOQ. The stability of the ethanolic extract of Benjakul preparation was evaluated under accelerated condition ($45\pm 2^{\circ}\text{C}$ with $75\pm 5\%$ RH for 4 months) and determined contents of piperine and plumbagin as marker compounds by using HPLC method. The results found that the amount of piperine was slightly reduced (84.91% after day 120) but plumbagin was greatly reduced (25.74% after day 120).

In summary, the ethanolic extract of Benjakul preparation showed high *in vitro* cytotoxic activity against lung cancer cells. Three pure compounds were isolated and plumbagin showed highest cytotoxic against all cancer cell lines. These results supported the use of Benjakul as a drug for cancer patients especially lung cancer. However plumbagin was unstable. Thus, Benjakul preparation should be kept in the freezer or -20°C for use.