

## ABSTRACT

Ridsiduangmahakan (RSD) preparation was derived and used as natural treatment for hemorrhoid patients in hospital more than 20 years ago. The preparation consists of twenty-two plants as follow: *Anacyclus pyrethrum* L., *Anethum graveolens* L., *Angelica sylvestris* L., *Artemisia vulgaris* L., *Cinnamomum bejolghota* (Buch.-Ham.) Sweet, *Cinnamomum zeylanicum* L., *Commiphora abyssinica* Berg., *Cuminum cyminum* L., *Foeniculum vulgare* Mill., *Lepidium sativum* L., *Myristica fragrans* L., *Nigella sativa* L., *Picrorrhiza kurroa* Royle. Ex Benth. *Piper chaba* Hunt, *Piper nigrum* L., *Piper ribesioides* Wall., *Platycladus orientalis* (L.) Franco, *Pouzolzia pentandra* J.J. Bennett, *Terminalia chebula* Retz gall, *Zingiber officinale* Roscoe. This study is aimed to investigate anti-inflammation by three pathway (inhibitory activity on LPS induced NO production, TNF- $\alpha$  release and LPS-stimulated PGE<sub>2</sub>) in macrophage cells (RAW264.7) and cytotoxic activities against colon and rectum cancer cell lines (LS174T and SW480) of RSD preparation and its plant ingredients. The quality control of the plant ingredients and preparation were also done by investigation of physical standardization as follow: loss on drying, total ash and acid insoluble ash, extractive value, and determination of contamination from the danger heavy metals such as arsenic, cadmium and lead. We found that plant ingredients and RSD preparation values were accepted on qualified values according to standardization of Thai herbal pharmacopoeia. The ethanolic extract of preparation gave the percentage of yields as 16.30% (it showed of oil 4.68% and solid 11.62%) which related with the ethanol extractive value (16.89%).

The results of RSD extract (oil and solid) on inhibitory activity on LPS induced NO production showed IC<sub>50</sub> values of 48.1 $\pm$ 1.8 and 56.9 $\pm$ 5.1  $\mu$ g/ml, respectively and no cytotoxicity observed. Its IC<sub>50</sub> value on NO production inhibitory effect exhibited less than indomethacin (IC<sub>50</sub> = 56.78  $\mu$ M or 20.32  $\mu$ g/ml). The results of RSD preparation on inhibitory effects on LPS-induced TNF- $\alpha$  release in RAW 264.7 cells were found that RSD (oil) and indomethacin (positive control) gave the results with IC<sub>50</sub> value of 31.86 $\pm$ 1.86  $\mu$ g/ml and 51.41 $\pm$ 3.58  $\mu$ g/ml (143.69 $\pm$ 10.01

$\mu\text{M}$ ). In addition, the inhibitory effects of RSD (oil) on LPS-stimulated  $\text{PGE}_2$  gives the best  $\text{IC}_{50}$  value of  $8.85 \pm 1.60 \mu\text{g/ml}$  followed by RSD (solid+oil)  $16.80 \pm 4.04 \mu\text{g/ml}$  and RSD (solid)  $21.22 \pm 3.29 \mu\text{g/ml}$  ( $\text{IC}_{50}$  value of indomethacin =  $1.00 \pm 0.43 \mu\text{g/ml}$  or  $2.80 \pm 1.20 \mu\text{M}$ ). These results lead to conclusion that RSD preparation is anti-inflammatory drug through COX-2 inhibition rather than through TNF- $\alpha$  and NO production.

Investigation on cytotoxic against colon and rectum cancer cell line (LS174T and SW480) by SRB assay. The results were found that the ethanolic extract of RSD (oil), RSD (solid+oil) and RSD (solid) showed specific cytotoxicity against LS174T ( $\text{IC}_{50}$  values =  $66.62 \pm 3.08$ ,  $35.44 \pm 1.07$  and  $46.54 \pm 2.92 \mu\text{g/ml}$ , respectively) but less cytotoxicity against SW480, however this fraction showed no cytotoxicity against normal cells. *Zingiber officianale* is an ingredient of this preparation showed specific cytotoxicity against both colon cancer LS174T and SW480 but less cytotoxic against normal cells.

Investigation of chemical compound of the preparation which exhibited anti-inflammation was done by bioassay-guided fractionation. Piperine was pure compound isolated from the preparation.  $\text{IC}_{50}$  values of Piperine which exhibits inhibitory effect on LPS induced NO production, on LPS-induced TNF- $\alpha$  release and LPS-stimulated  $\text{PGE}_2$  were  $59.57 \pm 16.12$ ,  $220.96 \pm 27.54$  and  $71.35 \pm 6.62 \mu\text{M}$ , respectively. These results indicated that piperine is one of the anti-inflammatory compounds of RSD preparation.

From these results it is suggested that oil of RSD preparation should be selected to develop as hemorrhoid preparation because it showed anti-inflammatory activity through at least three pathways and also showed cytotoxicity against colon cancer cell but not against normal cells. These results will support the use of this preparation by Thai folk doctors for reducing inflammation from hemorrhoids. In addition, it can reduce the development of colon and rectum cancer growth or may treat colon and rectum cancer.

## บทคัดย่อ

ตำรับริดสีดวงมหาภาพเป็นตำรับยาที่นิยมใช้ในการรักษาโรคริดสีดวงทวารในโรงพยาบาลอายุรเวทหลายแห่ง มากกว่า 20 ปีมาแล้ว ประกอบด้วยพืช 22 ชนิด ได้แก่ เทียนดำ เทียนแดง เทียนขาว เทียนข้าวเปลือก เทียนตาตุ๊กแตน โกฐสอ โกฐกั๊กกรา โกฐจุฬาลัมพา โกฐก้านพร้าว โกฐพุงปลา ลูกจันทน์ ดอกจันทน์ ขิง พริกไทย ดีปลี สะค้าน มดยอบ สนเทศ สมุลแว้ง อบเชย ขอบชะนางขาว และขอบชะนางแดง วัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบ ได้แก่การยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ การยับยั้งการหลั่ง  $\text{TNF-}\alpha$  และการยับยั้งการสร้างพรอสตาแกลนดิน (prostaglandin  $\text{E}_2$  หรือ  $\text{PGE}_2$ ) โดยใช้เอนไซม์ไซโคลออกซิจีเนส-2 (cyclooxygenase-2 หรือ COX-2) ในเซลล์แมคโครฟาจ (RAW 264.7) และศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้และทวารหนัก 2 ชนิด ได้แก่ LS174T และ SW480 ของพืชสมุนไพรเดี่ยวและสมุนไพรทั้งตำรับที่สกัดด้วยเอทานอล 95% รวมถึงการศึกษา มาตรฐานสมุนไพรแต่ละชนิดตามมาตรฐานเภสัชตำรับ ได้แก่ ปริมาณความชื้น ปริมาณเถ้าทั้งหมดและเถ้าที่ไม่ละลายในกรด ปริมาณสารสกัดที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์และน้ำ และปริมาณโลหะหนัก ได้แก่ สารหนู แคดเมียม และ ตะกั่ว ซึ่งพบว่าสมุนไพรทั้งหมดและตำรับผ่านเกณฑ์ตามที่มาตรฐานเภสัชตำรับกำหนดไว้

เมื่อสกัดสารสกัดตำรับริดสีดวงมหาภาพด้วยเอทานอล 95% พบว่าสารสกัด มีปริมาณคิดเป็น 16.30% ซึ่งสัมพันธ์กับค่า extractive value ซึ่งได้ 16.89% สารสกัดแยกชั้นแบ่งออกเป็น 2 ชั้น คือชั้นน้ำมัน (4.68%) และชั้นของแข็ง (11.62%) ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์พบว่าสารสกัดตำรับชั้นน้ำมันและชั้นของแข็งมีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ  $48.1 \pm 1.8$  และ  $56.9 \pm 5.1$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยที่สารสกัดไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจที่ทดสอบ และสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งต่ำกว่ายามาตรฐานอินโดเมตาซิน ( $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ 20.32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการหลั่ง  $\text{TNF-}\alpha$  พบว่าสารสกัดตำรับชั้นน้ำมันมีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ  $31.86 \pm 1.86$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งดีกว่ายามาตรฐานอินโดเมตาซินที่มีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ  $51.41 \pm 3.58$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 143.69  $\pm$  10.01 ไมโครโมล และการศึกษา

ฤทธิ์การยับยั้งการสร้าง  $\text{PGE}_2$  พบว่าสารสกัดตำรับชันน้ำมัน สารสกัดตำรับรวม และสารสกัดตำรับชันของแข็งมีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ  $8.85 \pm 1.60$   $16.80 \pm 4.04$  และ  $21.22 \pm 3.29$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ยามาตรฐานอินโดเมตาซินที่มีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ  $1.00 \pm 0.43$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จึงสรุปได้ว่าสารสกัดตำรับแสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ COX-2 ได้ดีกว่าฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์และ TNF- $\alpha$

การศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ 2 ชนิด คือ LS174T และ SW480 โดยวิธี SRB assay พบว่าสารสกัดตำรับชันน้ำมัน สารสกัดตำรับรวม และสารสกัดตำรับชันของแข็งมีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ LS174T โดยมีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ  $66.62 \pm 3.08$   $35.44 \pm 1.07$  และ  $46.54 \pm 2.92$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่สารสกัดตำรับทั้งสามชั้นไม่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ SW480 และไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (MRC5) ด้วย นอกจากนี้พบว่าสารสกัดชิง ที่เป็นส่วนประกอบของตำรับ มีฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ทั้ง 2 ชนิด แต่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ

เมื่อศึกษาสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของตำรับพบว่า piperine เป็นสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากสารสกัดตำรับ โดยวิธีการ bioassay guide fractionation และมีฤทธิ์ด้านการอักเสบ ได้แก่ การยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ การยับยั้งการหลั่ง TNF- $\alpha$  และการยับยั้งการสร้าง  $\text{PGE}_2$  โดยมีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ  $59.57 \pm 16.12$ ,  $220.96 \pm 27.54$  และ  $71.35 \pm 6.62$  ไมโครโมล ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า piperine เป็นสารประกอบตัวหนึ่งของตำรับที่แสดงฤทธิ์ด้านการอักเสบ จากการศึกษาทำให้ทราบว่าสารสกัดตำรับชันน้ำมันแสดงฤทธิ์ด้านการอักเสบและฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งได้ดีกว่าสารสกัดตำรับรวมและสารสกัดตำรับชันของแข็ง อย่างไรก็ตามผลการศึกษสรุปได้ว่าสารสกัดตำรับริดสีดวงมหากาฬสามารถลดการอักเสบได้ในหลายกระบวนการ และยังมีแนวโน้มที่จะสามารถพัฒนาเพื่อใช้เป็นยารักษา มะเร็งลำไส้ต่อไปได้