

การควบคุมมาตรฐานสมุนไพร ฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง พิษวิทยา และการติดตาม
ผลการรักษาโรคมะเร็งตับด้วยยาเบญจอำมฤตย์ตามศาสตร์การแพทย์แผนไทย

ชื่อเจ้าของผลงาน : ดวงแก้ว ปัญญาญ

สังกัด : สถาบันวิจัยการแพทย์แผนไทย กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวง
สาธารณสุข

ชื่อแหล่งทุน : กองทุนภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก

ผู้วิจัยร่วม : วิวรรณ วรกุลพาณิชย์^๑, มณฑกา ธีรชัยสกุล^๑, ปราโมทย์ เสถียรรัตน์^๒, ปรีชา หนูทิม^๓, กมลวรรณ
บานชื่น^๑, กุลสิริ ยศเสถียร^๑, สุเมธี นามเกิด^๑, อังสนาภรณ์ พาณิชยอนุเคราะห์กุล^๓, ปวีณา สื่อมโน
ธรรม^๓, กิตติยา ชันทอง^๓, กัมปชาญ เจียวนา^๓, ปาริณกุล ตั้งสุขฤทัย^๔, อรุณพร อิฐรัตน์^๕

สังกัด : ^๑สถาบันวิจัยการแพทย์แผนไทย กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวง
สาธารณสุข

^๒กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข

^๓โรงพยาบาลการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ผสมผสาน กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและ
การแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข

^๔วิทยาลัยแพทยศาสตร์นานาชาติจุฬาภรณ์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

^๕คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อควบคุมคุณภาพวัตถุดิบ ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง พิษวิทยา ร่วมกับ
ติดตามผลการรักษาโรคมะเร็งตับด้วยยาเบญจอำมฤตย์ตามศาสตร์การแพทย์แผนไทย ซึ่งผลการศึกษาพบว่า ยาเบญจอำ
มฤตย์มีความชื้นและเถ้าสูงกว่ามาตรฐานเล็กน้อยเนื่องจากประกอบด้วยดีเกลือ ซึ่งเป็นสารที่มีความชื้นและเถ้าสูง ผลการ
ทดสอบการปนเปื้อนโลหะหนัก พบว่า ความเข้มข้นของสารหนู ตะกั่ว และแคดเมียมอยู่ต่ำกว่าค่าที่กำหนด การวิเคราะห์
องค์ประกอบทางเคมีของตำรับยาเบญจอำมฤตย์ที่สกัดด้วย ๙๕% เอทานอล ด้วยแก๊สโครมาโตกราฟี พบว่าสารที่มีปริมาณสูง
ที่สุด คือ Androsterene รองลงมา คือ Delta-cadinene ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง โดยใช้ SRB assay พบว่าสาร
สกัดในเอทานอลเท่านั้นที่ให้ผลยับยั้งเซลล์มะเร็ง โดยในจำนวนมะเร็ง ๕ ชนิด ได้แก่ มะเร็งตับ มะเร็งปอด มะเร็งลำไส้ มะเร็ง
ปากมดลูก และมะเร็งต่อมลูกหมาก พบว่าสารสกัดสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งตับได้ดีที่สุด โดยความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ลดลง
ครึ่งหนึ่งมีค่าเท่ากับ ๐.๔๐๖±๐.๓๓๙ มคก./มล. และผลการติดตามผลการรักษาโรคมะเร็งตับโดยการให้ยาเบญจอำมฤตย์ตาม
ศาสตร์การแพทย์แผนไทย จำนวน ๘๙ ราย พบว่า ผู้ป่วยส่วนใหญ่ที่มาติดตามการรักษาอย่างต่อเนื่อง (เดือนที่ ๑ จำนวน ๘๙
ราย, เดือนที่ ๕ จำนวน ๑๒ ราย, เดือนที่ ๗ จำนวน ๕ ราย, และเดือนที่ ๑๓ จำนวน ๒ ราย) มีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น (มีความสุข
สบายขึ้น อากาศร้อนแห้งท้องและอาการท้องผูกลดลง ผู้ป่วยสามารถรับประทานอาหารรวมทั้งนอนหลับได้ดีขึ้น) และ
นอกจากนั้น ไม่พบอาการไม่พึงประสงค์ที่รุนแรงในผู้ป่วยทุกราย ดังนั้น จึงสรุปว่าตำรับยาเบญจอำมฤตย์เป็นตำรับยาที่มี
ศักยภาพในการดูแลผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ แต่อย่างไรก็ตาม เนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้เป็นเพียงการติดตามการรักษา ซึ่งควรมี
การศึกษาเพิ่มเติมทั้งทางด้านกรวิจัยทางคลินิก และการพัฒนาผลิตภัณฑ์ เพื่อยืนยันประโยชน์และความปลอดภัยในผู้ป่วย
โรคมะเร็งที่ชัดเจนต่อไป

คำสำคัญ : ฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง ยาเบญจอำมฤตย์ โรคมะเร็งตับ

Abstract

The objectives of this research were to investigate cytotoxic activity, quality control of Bencha-ammarit
preparation and the traditional treatment of Bencha-ammarit Recipe in liver cancer patients was also
monitored. The results of quality control found that the recipe showed higher moisture and total ash

values than standard, while heavy metals were less than standard of Thai herbal pharmacopoeia. The active ingredients which showed the highest content by GC-MS were Androsterone and Delta-cadinene, respectively. Cytotoxic activity of ๙๕% ethanolic extract against liver (HepG๒), colon (LS-๑๗๔T), lung (COR-L๒๓), cervical (Hela), and prostate (PC๓) cancer cell lines were tested by SRB assay. The results indicated that the ethanolic extract had cytotoxicity to cancer cell lines, especially liver cancer cells. The inhibiting concentration of the extract against HepG๒ at IC_{50} was 0.406 ± 0.339 mcg/mL. The monitoring of traditional treatment of Bencha-ammart Recipe in liver cancer patients found that patients reported an improved quality of life. Serious adverse events were not found in any cases. It was concluded that the Bencha-ammart recipe has a potential as a cytotoxic agent. However, further investigation is needed through clinical trial and drug development.

Keywords: Cytotoxic Activity, Bencha-ammart, Liver Cancer disease

Email address : kpanyaphu@gmail.com

หลักการและเหตุผล

โรคมะเร็งตับเป็นสาเหตุของการตายอันดับแรกๆของการเจ็บป่วยทั้งในและต่างประเทศ จากข้อมูลของ World Cancer Research Fund International (WCRF International) (www.wcrf.org) พบว่ามะเร็งตับเป็นมะเร็งที่พบได้บ่อยเป็นอันดับ ๖ ของโลก และในปี พ.ศ. ๒๕๕๕ ตรวจพบผู้ป่วยใหม่อีกประมาณ ๗๘๒,๐๐๐ ราย ทั้งนี้ปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญคือ การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี และซี แบบเรื้อรัง และการได้รับสารพิษจากสิ่งแวดล้อมอย่างต่อเนื่อง สำหรับสถานการณ์ในประเทศไทย จากสถิติที่รวบรวมโดยสถาบันมะเร็งแห่งชาติ (www.nci.go.th) พบอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งตับ ชนิด Hepatocellular carcinoma: HCC เป็นอันดับหนึ่งในเพศชายและอันดับสองในเพศหญิง รองลงมาจากมะเร็งเต้านม และจากสถิติผู้ป่วยโรคมะเร็งของกระทรวงสาธารณสุขปีพ.ศ. ๒๕๕๒ (www.thaihealth.or.th) พบว่า คนไทยป่วยเป็นโรคมะเร็งเพิ่มขึ้น ๒๓% และสาเหตุการตายของมะเร็งที่สำคัญอันดับ ๑ คือ มะเร็งตับและทางเดินน้ำดี ตามด้วยมะเร็งปอด มะเร็งเต้านม มะเร็งเม็ดเลือดขาว มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก และมะเร็งในช่องปาก

การรักษาโรคมะเร็งในปัจจุบันของประเทศไทยซึ่งมีการใช้ระบบการแพทย์แผนตะวันตกเป็นการแพทย์แผนหลัก จะมีการใช้ยาเคมี การผ่าตัด และการฉายรังสี ดังนั้นจึงหลีกเลี่ยงไม่ได้ที่จะมีการนำเข้ายาตลอดจนวัสดุอุปกรณ์จากต่างประเทศ โดยจากข้อมูลการนำเข้ายาจากต่างประเทศในปี พ.ศ. ๒๕๕๓ (<http://drug.fda.moph.go.th>) พบว่ามีการนำเข้ายากลุ่มรักษาโรคมะเร็งมากกว่า ๑๕,๐๐๐ ล้านบาท ซึ่งนับเป็นมูลค่าที่สูงมาก และสะท้อนให้เห็นว่า นอกจากมะเร็งจะเป็นปัญหาสาธารณสุขในปัจจุบันแล้ว ยังมีแนวโน้มที่จะก่อให้เกิดปัญหาระยะยาวทั้งในด้านค่าใช้จ่ายด้านยาและเวชภัณฑ์ ตลอดจนก่อให้เกิดความทุกข์ทรมานให้กับผู้ป่วยที่ไม่สามารถประเมินค่าได้

อย่างไรก็ตาม ในศาสตร์การแพทย์แผนไทย มีคัมภีร์แพทยศาสตร์สงเคราะห์ (๒๔๙๗) ซึ่งจัดได้ว่าเป็นตำราฉบับหลวงของไทย ได้กล่าวถึงตำรับยาสมุนไพรที่ใช้รักษาอาการที่ใกล้เคียงกับอาการของโรคมะเร็งตับ เช่น ตำรับยาที่ชื่อว่ายาเบญจอำมฤตย์ ซึ่งประกอบด้วยสมุนไพรจำนวน ๙ ชนิด ได้แก่ มหาหิงคุ์ (*Ferula assafoetida* L.) ยาดำ (*Aloe barbadensis* Miller) รงทอง (*Garcinia hanburyi* Hook. f.) มะกรูด (*Citrus hystrix* DC.) ชิงแห้ง (*Zingiber officinale* Roscoe.) ดีปลี (*Piper retrofractum* Vahl) พริกไทยดำ (*Piper nigrum* L.) ตองแตก (*Baliospermum montanum* Muell. Arg.) และดีเกลือ (Sodium Sulfate) ซึ่งในคัมภีร์ได้กล่าวว่ายาดำเบญจอำมฤตย์สามารถรักษาอาการที่เกิดจากการผิดปกติของธาตุทั้ง ๔ คือ ดิน น้ำ ลม และ ไฟ ซึ่งอาการผิดปกติดังกล่าวเป็นสาเหตุทำให้ผู้ป่วยมีอาการหอบและไอ บริโภคอาหารไม่ได้ หายใจไม่ทั่วท้อง เป็นฝีในตับ และถ่ายเป็นเลือดสด ซึ่งอาการที่พบนี้เป็นอาการที่รักษาได้ยาก ซึ่งหากเมื่อนำมาเทียบเคียงกับอาการของโรคตามหลักของการแพทย์แผนปัจจุบันแล้ว จะพบว่าอาการที่ระบุนี้คืออาการของโรคมะเร็งตับนั่นเอง

จากสรรพคุณของตำรับยาเบญจอำมฤตย์ที่ได้กล่าวในตำราแพทยศาสตร์สงเคราะห์นี้ จึงเป็นที่มาของความสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง โดยเฉพาะเซลล์มะเร็งตับของสารสกัดจากตำรับยาเบญจอำมฤตย์ โดยในศึกษานี้ ได้ทำการศึกษาในเซลล์มะเร็งรวม ๕ ชนิด ได้แก่ มะเร็งตับ มะเร็งลำไส้ มะเร็งปอด มะเร็งปากมดลูก และมะเร็งต่อมลูกหมาก ร่วมกับการควบคุมมาตรฐานวัตถุดิบสมุนไพรในตำรับ การศึกษาทางพิษวิทยา และการติดตามผลการรักษาผู้ป่วยโดยใช้เบญจ

อำมฤตย์ตามศาสตร์การแพทย์แผนไทย ซึ่งหากข้อมูลเชิงประจักษ์พบว่าให้ผลดี ก็จะสามารถนำไปเป็นทางเลือกให้กับผู้ป่วยโรคมะเร็งที่ไม่ได้รับการรักษา และ/หรือ มีข้อจำกัดในด้านการรักษาตามหลักของการแพทย์แผนปัจจุบัน ตลอดจนสามารถนำไปเป็นข้อมูลเพื่อการศึกษาต่อยอดในด้านการใช้ตำรับยาไทยร่วมกับการแพทย์แผนปัจจุบัน เพื่อลดการใช้จ่ายด้านยาและเวชภัณฑ์จากต่างประเทศซึ่งมีราคาแพงได้ต่อไป

วัตถุประสงค์

๑. เพื่อควบคุมคุณภาพวัตถุดิบ ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งของตำรับยาเบญจอำมฤตย์ในหลอดทดลอง และเพื่อศึกษาพิษวิทยาของตำรับ

๒. เพื่อติดตามผลการรักษาโรคมะเร็งตับด้วยยาเบญจอำมฤตย์ตามศาสตร์การแพทย์แผนไทย

แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคมะเร็งตับ มะเร็งตับ (Hepatocellular carcinoma) (HCC) หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Hepatoma คือมะเร็งตับปฐมภูมิ หมายถึง เนื้องอกชนิดร้ายแรงของเซลล์ตับ จากรายงานของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ มะเร็งตับพบบ่อยที่สุดของมะเร็งที่พบในเพศชาย คิดเป็นร้อยละ ๑๖.๓ โรคนี้นับได้ทุกอายุ แต่ส่วนใหญ่พบในวัยกลางคน อายุเฉลี่ยประมาณ ๔๘ ปี พบในเพศชายมากกว่าเพศหญิงประมาณ ๔.๕ เท่า และมีภาวะตับแข็งร่วมด้วยร้อยละ ๓๙ - ๘๗ สาเหตุที่แท้จริงยังไม่ทราบแน่ชัด แต่การเปลี่ยนแปลงจากจุดเริ่มต้นจนกลายเป็นเซลล์มะเร็งนั้น จะผ่านขั้นตอนหลายระยะ เชื่อว่ามีความสัมพันธ์กับสารก่อมะเร็งตับ (hepatic carcinogen) โดยสารก่อมะเร็งจะจับตัวกับ DNA แต่จะเกิดมะเร็งขึ้นหรือไม่ขึ้น ขึ้นอยู่กับความสามารถของร่างกายที่จะซ่อมแซม DNA หรือมีความต้านทาน หรือดื้อต่อสารก่อมะเร็งมากน้อยเพียงใด

ลักษณะทางคลินิก อาการส่วนใหญ่จะเป็นไปช้า ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะแรกมักจะไม่มีอาการ หรือถ้ามีก็จะเป็นอาการที่ไม่เฉพาะเจาะจง เช่น ปวดท้อง (อาจเพียงจุกแน่นตื้อๆ) จนถึงปวดรุนแรง ตำแหน่งจะอยู่บริเวณใต้ชายโครงขวาหรือลิ้นปี่ ผู้ป่วยจะมาพบแพทย์ด้วยอาการจุกเสียด เนื่องจากมีก้อนบริเวณใต้ชายโครงขวาหรือบริเวณยอดอกซึ่งก้อนจะโตขึ้นเรื่อยๆ ผลการตรวจร่างกายจะพบว่าตับเป็นก้อนนูน และมักพบว่ามีการร่วมด้วยเสมอ หากมีอาการมากขึ้นจะพบอาการเหลืองท้องมาน, อาการของ portal hypertension หรืออาจมาพบแพทย์ด้วยอาการอาเจียนเป็นเลือด, อาการทางสมองเนื่องจากสารพิษจากตับ (hepatic encephalopathy) เป็นต้น

องค์ความรู้ สูตรตำรับยาเบญจอำมฤตย์ สรรพคุณ และวิธีการใช้ตามศาสตร์การแพทย์แผนไทย

เบญจอำมฤตย์ เป็นตำรับยาที่มาจากคัมภีร์แพทยศาสตร์สงเคราะห์ พบบันทึกรายละเอียดส่วนประกอบ วิธีการเตรียมยา และขนาดที่ใช้ในคัมภีร์ประถมจินดา (บันทึกโรคและการรักษาสำหรับเด็ก) และ คัมภีร์ธาตุบรรจบ (บันทึกอาการและโรค เกี่ยวกับอุจจาระธาตุ) พจนานุกรมฉบับราชบัณฑิตยสถานได้ให้ความหมายของคำว่า เบญจ และ อำมฤตย์ไว้ดังต่อไปนี้ "เบญจ" หมายถึง ห้า ส่วนคำว่า "อำมฤตย์" หรือ อมฤต หมายถึง น้ำทิพย์หรือเครื่องทิพย์ เบญจอำมฤตย์จึงน่าจะแปลได้ว่า เครื่องทิพย์ห้าประการ หรือน้ำทิพย์ทั้งห้าก็ได้ แต่อย่างไรก็ตาม แม้จะมีคำว่าเบญจ แต่ตำรับยานี้มิได้อยู่ในพิภักดยาเบญจ เนื่องจากประกอบไปด้วยเครื่องยาลงถึงเก้าชนิด ซึ่งในตำรายาได้กล่าวถึงการเตรียมยา ดังนี้

"เอามหาหิงค์ ๑ ยาดำบริสุทธ์ ๑ เอาสีงละ ๑ สลึง รงทอง ๒ สลึง มะกรูด ๓ ผล เอามหาหิงค์, ยาดำ, รงทอง ใส่ในมะกรูดสิ่งละผล แล้วเอามูลโคพอกสุ่มไฟกลบให้สุก ชิงแห้ง ๑ ตีปลี ๑ พริกไทย ๑ เอาสีงละ ๑ สลึง รากทนต์ ๒ สลึง ตีเกลือ ๔ บาท ยาห้าสิ่งนี้ประสมกับมะกรูดที่สุ่มไว้ ทำเป็นจุนละลายน้ำส้มมะขามเปียก ให้รับประทานน้ำหนัก ๑ สลึง พอกอุจจาระอันลามกให้สิ้นโทษ ชำระลำไส้อันเป็นเมือกมัน แลประระเมหะทั้งปวง"

วิธีการศึกษา

วัสดุและอุปกรณ์

- สมุนไพรในตำรับจำนวน ๙ ชนิด
- Ethyl alcohol, เครื่องมือสำหรับการสกัด เช่น evaporator, กระจกทรง, เครื่องแก้ว
- Ethyl alcohol, chloroform, วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการควบคุมมาตรฐาน อาทิ gas chromatography, ICP-MS, desiccator, crucible, เตาเผา, เครื่องอบ, อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ อาทิ เซลล์มะเร็งลำไส้, มะเร็งปอด, มะเร็งปากมดลูก, มะเร็งต่อมลูกหมาก, สารมาตรฐานที่ใช้สำหรับเป็น positive control, อาหารเลี้ยงเชื้อ, incubator เป็นต้น

การเตรียมสมุนไพร

บดสมุนไพรแต่ละชนิดให้เป็นผงละเอียด แล้วแบ่งผงสมุนไพรออกเป็น ๒ ส่วน คือ

๑) สำหรับการสกัดยาเบญจอำมฤตย์ ผสมผงสมุนไพรแต่ละชนิดให้เข้ากันในอัตราส่วนดังนี้ ๙.๙๒% รงทอง ๔.๙๖% ยาตำ ๒.๔๘% พริกไทยดำ ๒.๔๘% ดีปลี ๒.๔๘% มะกรูด ๓๓.๐๖% มหาหิงค์ ๒.๔๘% ขิงแห้ง ๒.๔๘% และดีเกลือ ๓๙.๖๗% รวม ๓ กิโลกรัม

๒) สำหรับการวิเคราะห์ Extractive value, Total ash, Acid insoluble ash, Loss on drying และการวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักชนิดละ ๕๐ กรัม

วิธีการสกัด (โดยวิธี maceration)

สารสกัดชั้นเอทานอล

๑) นำสมุนไพรที่ซังไว้ มาคลุกเคล้าให้เข้ากันในภาชนะที่มีฝาปิด และเทเอทานอล ๙๕% ให้พอท่วม เขย่าให้เข้ากันอีกครั้ง และตั้งทิ้งไว้ ๗๒ ชั่วโมง

๒) กรองแยกส่วนของเหลวที่ได้จากการหมัก ส่วนกากสมุนไพรหมักต่อด้วยเอทานอล ๙๕% หมักซ้ำอีก ๗๒ ชั่วโมง

๓) นำส่วนของเหลวที่ได้จากการกรองมาทำการระเหยที่อุณหภูมิ ๔๐ องศาเซลเซียส และค่อยๆ ลดความดันลง มาที่ ๕๐ mbar เพื่อระเหยเอทานอลออกให้หมด เก็บสารสกัดที่ได้เพื่อวิเคราะห์ร้อยละของผลผลิตที่ได้ต่อไป

๔) ทำการหมักและกรองจนครบ ๓ ครั้ง นำสารที่ได้จากการระเหยมารวมกัน ซึ่งน้ำหนักและคิรร้อยละของผลผลิตที่ได้ เป็นสารสกัดชั้นเอทานอล ๙๕%

สารสกัดชั้นน้ำ

๑) ต้มน้ำให้เดือด และเมื่อนำกากของสมุนไพรใส่ลงไปต้มให้ลดอุณหภูมิลง จับเวลา ๓๐ นาที

๒) กรองเอากากสมุนไพรออก แล้วนำส่วนของเหลวที่ได้มาเคี่ยวต่อด้วยอุณหภูมิต่ำจนเหลือ ๑ ใน ๓ ของปริมาตรทั้งหมด

๓) นำส่วนที่เหลือจากการเคี่ยวมาทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (freeze dry) เรียกสารสกัดที่ได้จากการทำแห้งว่า สารสกัดชั้นน้ำ

การวิเคราะห์หามาตรฐานวัตถุบของตำรับ

การทำมาตรฐานสมุนไพร โดยการวิเคราะห์ปริมาณ Loss on drying, การวิเคราะห์ปริมาณ Total ash และ acid insoluble ash, การวิเคราะห์ปริมาณ Extractive value, การวิเคราะห์ Water soluble extractive value, วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัด วิเคราะห์การปนเปื้อนโลหะหนักด้วย วิธี ICP-MS โดยใช้มาตรฐานของทางเภสัชเวช

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (Biological activity)

การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ มะเร็งลำไส้ มะเร็งปอด มะเร็งปากมดลูก และมะเร็งต่อมลูกหมาก โดยวิธี SRB assay (Skehan *et al.*, ๑๙๙๐) โดยการนำเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) มะเร็งลำไส้ (LS-๑๗๔T) มะเร็งปอด (COR-L๒๓) มะเร็งปากมดลูก (Hela) และมะเร็งต่อมลูกหมาก (PC๓) เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย Fetal bovine serum และ penicillin-streptomycin ใน flask เลี้ยงเซลล์ ๗๕ cm^๓ ก่อนทำการถ่ายเซลล์ลงใน ๙๖-microplate หลุมละ ๑๐๐ μ l จากนั้นนำมาเติมสารละลายตัวอย่างที่อยู่ใน culture media ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ คือ ๑๐๐, ๕๐, ๑๐ และ ๑ μ g/ml โดยเติมหลุมละ ๑๐๐ μ l ทำซ้ำ ๔ หลุม เลี้ยงใน CO₂ incubator เป็นเวลา ๗๒ ชั่วโมง จากนั้นค่อย ๆ ดูด culture media ออก ล้างเซลล์ แล้วเติม culture media อีก ๒๐๐ μ l นำไปเลี้ยงใน CO₂ incubator เป็นเวลา ๗๒ ชั่วโมง เพื่อดูการรอดของเซลล์มะเร็ง เมื่อเทียบกับ non-treated control และ solvent control ด้วยวิธี SRB assay (sulforhodamine B assay)

*หมายเหตุ อาหารเลี้ยงเซลล์มะเร็งแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน กล่าวคือ

- ชนิด Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ใช้สำหรับเซลล์ LS-๑๗๔T, HepG2
- ชนิด Minimum Essential Medium Eagle (MEM) ใช้สำหรับเซลล์ Hela
- ชนิด RPMI ใช้สำหรับมะเร็ง COR-L๒๓, PC๓

**สารสกัดชั้นเอทานอล ๙๕% จะใช้ DMSO เป็นตัวทำละลายและสารสกัดชั้นน้ำจะใช้ Sterile water เป็นตัวทำละลายในการทดสอบกับเซลล์มะเร็ง

***การสรุปว่าสารสกัดสมุนไพรมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งจะต้องมีค่า IC₅₀ ไม่เกิน ๓๐ µg/ml ซึ่งเป็นค่ามาตรฐานของ National Cancer Institute หรือ NCI (สหรัฐอเมริกา)

การศึกษาทางพิษวิทยา

การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลัน โดยกรอกสารสกัดยาเบญจอำมฤตย์ที่ละลายใน ๒.๕% Tween ๘๐ ในขนาด ๒, ๓, และ ๔.๕ g./kg. แก่หนูเมาส์ทางปาก แล้วทำการสังเกตอาการภายใน ๒๔ ชั่วโมง

การศึกษาความเป็นพิษเรื้อรัง ใช้หนูแรท สายพันธุ์วิสตัดาร์จำนวน ๑๖๘ ตัว แบ่งออกเป็น ๗ กลุ่ม กลุ่มละ ๒๔ ตัว (เพศละ ๑๒ ตัว) โดยกลุ่มควบคุม สองกลุ่มได้รับน้ำกลั่นและสารละลาย Tween ๘๐ ที่มีความเข้มข้น ๒.๕% ตามลำดับ ส่วนกลุ่มทดลองจำนวน ๕ กลุ่ม ได้รับสารสกัดยาตำรับเบญจอำมฤตย์ โดยป้อนทางปากในขนาด ๕, ๕๐, ๒๕๐, ๕๐๐, และ ๕๐๐-R mg./กก./วัน เป็นระยะเวลา ๖ เดือน โดยกลุ่มสุดท้าย (๕๐๐-R) เป็นกลุ่มศึกษาการฟื้นตัวหลังหยุดให้สารสกัด ๒ สัปดาห์

วิธีการติดตามการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งตับโดยการใช้ยาเบญจอำมฤตย์ตามศาสตร์การแพทย์แผนไทย

การติดตามการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งตับโดยการใช้ยาเบญจอำมฤตย์ตามศาสตร์การแพทย์แผนไทยในครั้งนี้ ได้ทำการติดตามผู้ป่วยที่สมัครใจมารับบริการการรักษาโรคมะเร็งตับโดยการใช้ยาเบญจอำมฤตย์ตามศาสตร์การแพทย์แผนไทย ณ โรงพยาบาลในเครือข่ายที่เข้าร่วมวิจัย จำนวน 6 แห่ง ซึ่งการติดตามได้บันทึกอาการแรกเริ่ม และอาการของผู้ป่วยที่มาติดตามการรักษาตามนัด โดยแต่ละครั้งจะมีการบันทึกอาการทางคลินิกร่วมกับการบันทึกอาการที่ไม่พึงประสงค์ และทดสอบคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยโดยใช้แบบประเมินคุณภาพชีวิต Thai Modified Function Living Index Cancer Questionnaire Version ๒ (T-FLIC ๒) ซึ่งโครงการติดตามผลการรักษาโรคมะเร็งตับด้วยตำรับยาเบญจอำมฤตย์นี้ได้ผ่านการอนุมัติจากคณะกรรมการพิจารณาการศึกษาวิจัยในคนของกรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือกเรียบร้อยแล้ว (รหัสการศึกษา ๐๓-๒๕๕๗)

การวิเคราะห์ผลการติดตามผู้ป่วยในโครงการ ใช้สถิติเชิงพรรณนา และการเปรียบเทียบคุณภาพชีวิตผู้ป่วยก่อนและหลังการรักษา โดยใช้ Paired t-test

ข้อค้นพบ

ผลการควบคุมมาตรฐานสมุนไพร

ผลการศึกษาพบว่า ตำรับยาเบญจอำมฤตย์ มีความชื้น ปริมาณเถ้า และเถ้าที่ไม่ละลายในกรดสูงกว่ามาตรฐาน (มาตรฐานเภสัชตำรับระบุความชื้นไม่ควรเกินร้อยละ ๑๐) เนื่องจากตำรับประกอบด้วยดีเกลือ ซึ่งเป็นสารที่มีความชื้นและเถ้าสูง ซึ่งไม่ใช่เป็นการปนเปื้อนทราย หิน และโลหะหนัก ส่วนการวิเคราะห์การปนเปื้อนสารหนู ตะกั่วและแคดเมียม พบว่าอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข คือ ไม่เกิน ๔.๐, ๑๐ และ ๐.๓ mg/kg ตามลำดับ ตำรับมีปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอลและน้ำ เท่ากับ ๑๕.๒๕±๐.๑๙% และ ๔๙.๖๐±๐.๗๐% ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของตำรับยาเบญจอำมฤตย์ที่สกัดด้วย ๙๕% EtOH ด้วยแก๊สโครมาโตกราฟี พบว่าสารที่มีปริมาณสูงสุด คือ Androsterone ที่ retention time ๕๐.๘๒ รองลงมา คือ Delta-cadinene ที่ retention time ที่ ๓๓.๗ รายละเอียดของการควบคุมมาตรฐานตำรับยา ได้แสดงดังตาราง ๑ และ ๒ ตามลำดับ

ตารางที่ ๑ แสดงผลการควบคุมมาตรฐานสมุนไพรในตำรับเบญจอำมฤตย์

ตำรับ	การควบคุมมาตรฐานสมุนไพร					
	ปริมาณความชื้น (%)	ปริมาณเถ้าทั้งหมด (%)	ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (%)	ปริมาณโลหะหนัก (mg/kg)		
				สารหนู	ตะกั่ว	แคดเมียม
เบญจอำมฤตย์	๑๔.๓๐๕± ๐.๑๔๒	๒๔.๑๑๐± ๐.๐๓๙	๒.๘๒๕ ± ๐.๐๒๗	๐.๑๐๓± ๐.๐๔๘	๐.๐๓๖ ± ๐.๐๐๐	๐.๒๑๕ ± ๐.๐๗๖

ตารางที่ ๒ แสดงปริมาณสารสกัดและองค์ประกอบสูงสุดในตำรับเบญจอำมฤตย์ที่วิเคราะห์ด้วยแกสโครมาโตกราฟี

รายการ	ชนิดสารสกัด	
	สารสกัดตำรับยาเบญจอำมฤตย์ในน้ำ	สารสกัดตำรับยาเบญจอำมฤตย์ในเอทานอล
ปริมาณสารสกัด (%)	๔๙.๖๐ ± ๐.๗๐	๑๕.๒๕ ± ๐.๑๙
องค์ประกอบสูงสุด	Alpha-glyceryl linoleate	Androsterene, รองลงมา คือ Delta-cadinene

ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

ในการศึกษาถึงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดตำรับยาเบญจอำมฤตย์ โดยศึกษาในเซลล์มะเร็งรวม ๕ ชนิด คือ มะเร็งตับ มะเร็งลำไส้ มะเร็งปอด มะเร็งปากมดลูก และมะเร็งต่อมลูกหมาก ซึ่งได้ผลการทดลอง พบว่า ตำรับยาเบญจอำมฤตย์มีฤทธิ์ต้านมะเร็งที่ดีที่สุด รองลงมา คือ มะเร็งปอด ต่อมลูกหมาก ลำไส้ และปากมดลูก โดยมีค่า specific index (ค่า IC_{๕๐} ของเซลล์ปกติ/ IC_{๕๐} ของเซลล์มะเร็ง) ของตับมากที่สุดคือ ๑๔.๖๗ รองลงมาคือ ปอด ต่อมลูกหมาก ลำไส้ และปากมดลูก แสดงว่าตำรับนี้มีความจำเพาะต่อมะเร็งตับ (ซึ่งตรงกับการใช้ของหมอแผนไทยที่ใช้ตำรับยาเบญจอำมฤตย์รักษาผู้ป่วยมะเร็งตับ) รายละเอียดของการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งได้แสดงในตารางที่ ๓

ตารางที่ ๓ ผลการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ ลำไส้ ปอด ปากมดลูก ต่อมลูกหมาก และเซลล์ปกติของตำรับยาเบญจอำมฤตย์

วิธีสกัด	ผลการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง Inhibition Concentration (IC _{๕๐}) ± SEM (µg/ml) (n=๓)					
	มะเร็งตับ	มะเร็งลำไส้	มะเร็งปอด	มะเร็งปากมดลูก	มะเร็งต่อมลูกหมาก	เซลล์ปกติ
Water	>๕๐	>๕๐	>๕๐	>๕๐	>๕๐	NT
๙๕% Ethanol	๐.๔๐๖±๐.๓๓๙	๔.๙๕๕±๐.๐๑๘	๒.๑๒๖±๐.๘๓๘	๕.๒๒๓±๐.๕๒๖	๔.๕๘๖±๐.๔๘๑	๕.๙๕๐

*NT = not test

ผลการทดสอบทางพิษวิทยา

การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลัน พบว่า สารสกัดที่ทำให้เกิดอาการพิษเฉียบพลันและมีค่า LD_{๕๐} เท่ากับ ๓.๕๕ ก./กก.

การศึกษาความเป็นพิษเรื้อรัง พบว่า หนูแรท สายพันธุ์วิสตัดาร์เพศผู้ที่ได้รับสารสกัดยาตำรับเบญจอำมฤตย์ ในขนาด ๒๕๐ และ ๕๐๐ มก./กก./วัน มีน้ำหนักตัวน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่น้ำหนักของอวัยวะสำคัญ ได้แก่ สมอง ปอด ตับ กระเพาะอาหาร ไต และอวัยวะทั้งสองข้างของหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด ๕๐๐ และ ๕๐๐-R สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ การศึกษาต่อระบบโลหิตวิทยา พบว่า หนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดขนาด ๕๐๐ มก./กก. มีปริมาณเม็ดเลือดขาวเซลล์นิวโทรฟิล และเกล็ดเลือดสูงแต่มีฮีโมโกลบินต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมทั้งสอง และกลุ่ม ๕๐๐-R มีปริมาณเม็ดเลือดแดงสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ แต่มีค่า MCV และ MCH ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ การศึกษาต่อค่าทางเคมีคลินิก พบว่าระดับเอนไซม์ ALT และ AST ของหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด ๕๐๐ และ ๕๐๐-R สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และ AST ยังมีระดับสูงภายหลังหยุดให้สารสกัด ขณะที่กลูโคส และ ระดับไขมันไตรกลีเซอไรด์และโคเลสเตอรอลลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แต่อย่างไรก็ตาม ผลการตรวจอวัยวะภายในทางจุลพยาธิวิทยา แสดงให้เห็นว่า สารสกัดไม่ก่อให้เกิดรอยโรคอย่างสัมพันธ์กับขนาดที่ได้รับ

ผลการติดตามการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งตับโดยการใช้ยาเบญจอำมฤตย์ตามศาสตร์การแพทย์แผนไทย

ข้อมูลทั่วไป ผู้ป่วยโรคมะเร็งตับที่สมัครใจมารับการรักษาด้วยยาเบญจอำมฤตย์ ณ โรงพยาบาลเครือข่ายที่เข้าร่วมวิจัย ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. ๒๕๕๗ ถึง มกราคม พ.ศ. ๒๕๕๙ พบว่า เป็นผู้ป่วยชายจำนวน ๗๓ ราย หญิง ๑๖ ราย รวม ๘๙ ราย ที่ได้รับวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งตับระยะลุกลาม และปัจจุบันได้รับการรักษาด้วยการแพทย์แผนปัจจุบันแบบ

ระดับประคอง ในจำนวนนี้ พบว่า ผู้ป่วย ๕ รายมีประวัติแพ้ยาและอาหารแบบไม่รุนแรง และ ๑๔ รายมีการใช้ยาสมุนไพร อาทิ เห็ดหลินจือ ทูเรียนเทศ ขมิ้นชัน ร่วมด้วย รายละเอียดข้อมูลทั่วไปของผู้ป่วยได้แสดงดังตารางที่ ๔

ตารางที่ ๔ ข้อมูลทั่วไปของผู้ป่วยโรคมะเร็งตับที่มารับการรักษาด้วยตำรับยาเบญจอำมฤตย์ ณ โรงพยาบาล เครือข่าย จำนวน ๘๙ ราย

ข้อมูล	จำนวน (ราย)
เพศ	
- ชาย	๗๓
- หญิง	๑๖
อายุ (ปี)	
- ต่ำสุด	๒๘
- สูงสุด	๗๖
- เฉลี่ย	๕๗
มีประวัติการแพ้ยาและอาหาร	๕
ประวัติการรักษาด้วยวิธีอื่น ๆ ร่วมด้วย	ไม่มีข้อมูล
การรักษาด้วยสมุนไพรอื่นร่วมด้วย	๑๔

ผลการติดตามการรักษาด้วยศาสตร์การแพทย์แผนไทย การรักษาด้วยศาสตร์การแพทย์แผนไทย ณ โรงพยาบาล เครือข่ายที่เข้าร่วมโครงการ ซึ่งมีการใช้ยาเบญจอำมฤตย์ขนาด ๓๐๐ มก. รับประทาน ๒ เวลาเช้า-เย็น ร่วมกับการให้ยา บรรเทาอาการอื่นๆที่เป็นร่วมด้วย อาทิ ใช้ยาธาตุอบเชยบรรเทาอาการแน่นท้อง ท้องอืดเพื่อ ยาระงับคลื่นไส้อาเจียน บรรเทาอาการ ท้องผูก หรือให้ยาต้มเฉพาะราย เพื่อรักษาอาการอื่นๆที่เป็นร่วมด้วย เป็นต้น ซึ่งผลการรักษา พบว่า ผู้ป่วยทุกรายที่มาติดตาม การรักษา มีอาการสุขสบายขึ้น อาการอึดแน่นท้องลดลง สามารถรับประทานอาหารและนอนหลับได้ดีขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม ในแต่ละเดือนมีจำนวนผู้ป่วยที่มารับการรักษาตามนัดลดลงเรื่อยๆ ซึ่งสาเหตุของการไม่มาติดตามการรักษาตามแพทย์นัด ส่วนหนึ่งเกิดจากผู้ป่วยเสียชีวิต และส่วนหนึ่งเกิดเนื่องจากผู้ป่วยอาศัยอยู่ต่างจังหวัดทำให้มีความลำบากในการเดินทาง และบางรายพบว่าเมื่อมีอาการดีขึ้นจึงไม่ได้มาตามนัด และในจำนวนนี้พบว่าเป็นผู้ป่วยที่เสียชีวิตจำนวน ๓๕ ราย (ข้อมูล ณ วันที่ ๓๐ เมษายน ๒๕๕๙)

สำหรับการประเมินคุณภาพชีวิต เนื่องจากผู้ป่วยที่มาติดตามการรักษามีจำนวนลดลงตามเวลา แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบคุณภาพชีวิตระหว่างแรกรับกับการติดตามครั้งที่ ๑, ๒, ๓, ๔, ๕, ๗, และ ๑๓ พบว่า ผู้ป่วยส่วนใหญ่มีคะแนนคุณภาพชีวิตเพิ่มขึ้น แต่ความแตกต่างยังไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งรายละเอียดผลการเปรียบเทียบคุณภาพชีวิตในแต่ละเดือนได้แสดงดังใน ตารางที่ ๕

ตารางที่ ๕ คุณภาพชีวิตของผู้ป่วยโรคมะเร็งตับที่มารับการรักษาด้วยตำรับยาเบญจอำมฤตย์ ณ เดือนต่างๆ

เดือนที่(จำนวนผู้ป่วย)	ค่าเฉลี่ย		P-value
	ก่อนการรักษา	หลังการรักษา	
๑ (๘๙ ราย)	๒.๙๖ (ต่ำสุด ๑.๕๔, สูงสุด ๔.๐๐)		
๒ (๖๒ ราย)	๓.๑๕	๓.๒๐	๐.๔๕
๓ (๓๗ ราย)	๓.๒๒	๓.๒๒	๑.๐๐
๔ (๒๐ ราย)	๓.๒๗	๓.๓๕	๐.๕๔
๕ (๑๒ ราย)	๓.๒๑	๓.๓๖	-
๗ (๕ ราย)	๓.๐๔	๓.๓๙	-
๑๓ (๒ ราย)	๓.๕๐	๓.๙๑	-

สำหรับ ผลการติดตามอาการที่ไม่พึงประสงค์ พบว่า ไม่พบผู้ป่วยที่มีอาการไม่พึงประสงค์ที่รุนแรง พบเพียงอาการไม่พึงประสงค์เล็กน้อยที่สามารถจัดการได้ เช่น อาการแสบร้อนท้องซึ่งแก้ไข โดยการเปลี่ยนเวลากินยาจากก่อนอาหารเป็นกินหลังอาหารทันที และอาการปวดท้องและท้องเสีย ซึ่งสามารถแก้ไขโดยการให้ยาที่ป้องกันการใช้ท้องตลอดจนปรับขนาดยาเบญจอำมฤตย์ให้เหมาะสมกับผู้ป่วยเฉพาะราย

อภิปราย

การศึกษาครั้งนี้มุ่งหวังที่จะศึกษาประสิทธิผลและความปลอดภัยเบื้องต้นของตำรับยาเบญจอำมฤตย์ซึ่งเป็นตำรับยาไทยที่ได้บันทึกอยู่ในตำรับตำราของชาติ ซึ่งในส่วนการตรวจสอบความปลอดภัยเบื้องต้น ได้มีการควบคุมมาตรฐานวัตถุดิบ การศึกษาความเป็นพิษของตำรับทั้งพิษเฉียบพลันและเรื้อรัง และการติดตามการให้ยาของผู้ป่วยที่สมัครใจรับการรักษาโรคมะเร็งตับตามศาสตร์การแพทย์แผนไทย ซึ่งผลการศึกษาพบว่า วัตถุดิบที่พบในท้องตลาดมีคุณภาพดี และการใช้ตำรับยาหากมีการใช้ตามภูมิปัญญาและอยู่ในความควบคุมของแพทย์แผนไทยผู้มีความชำนาญแล้ว จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ป่วยโดยไม่พบอาการไม่พึงประสงค์ที่ร้ายแรง รวมทั้งสามารถแก้ไขอาการไม่พึงประสงค์เล็กน้อยๆได้ ในส่วนของการศึกษาประสิทธิผลของการใช้ยาเบื้องต้น โดยการใช้ตำรับยาเบญจอำมฤตย์ในผู้ป่วยมะเร็งตับระยะลุกลามและไม่ตอบสนองต่อการรักษามาตรฐานร่วมกับการดูแลอื่นๆตามภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย อาทิ การพอกยา การเผายา ฯลฯ พบว่า ผู้ป่วยส่วนหนึ่งได้รับประโยชน์จากการดูแล ซึ่งพบว่าผู้ป่วยบางรายมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้นจากการขับถ่ายของเสียได้มากกว่าเดิม ทำให้อาการอึดอัดแน่นท้อง ท้องมาน และอาการคันตามผิวหนังลดลง และส่งผลให้ผู้ป่วยกินและนอนพักได้มากกว่าเดิม ขณะที่ผู้ป่วยส่วนหนึ่งไม่ตอบสนองต่อการรักษา ซึ่งสถานการณ์ดังกล่าวนี้มีความคล้ายคลึงกับการรักษาด้วยการแพทย์แผนปัจจุบัน ที่มีทั้งผู้ป่วยที่ตอบสนองและไม่ตอบสนองต่อการรักษา โดยผู้ป่วยที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษาบางส่วนก็จะไม่มาพบแพทย์ตามนัด

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาครั้งนี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นของตำรับยาไทยที่ยังต้องการการการต่อยอดการวิจัยทางคลินิก ที่ทำการศึกษาในผู้ป่วยจำนวนมากมาสนับสนุน และนอกจากนี้ การดูแลผู้ป่วยโรคมะเร็งตับยังมีในส่วนของ การป้องกันและรักษาในรูปแบบอื่นๆมาเกี่ยวข้อง ซึ่งการรักษาแบบผสมผสาน ที่บูรณาการการดูแลทั้งการแพทย์แผนปัจจุบัน การแพทย์แผนไทย และการแพทย์ทางเลือกอื่นๆ น่าจะทำให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อผู้ป่วย

บรรณานุกรม

กระทรวงสาธารณสุข. (๒๕๕๗) *ตำราแพทย์ศาสตร์สงเคราะห์ ฉบับหลวง*. กรุงเทพฯ.

Skehan P, Storeng R, Scudiero D *et al.* (๑๙๙๐). "New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening". *J Natl Cancer Inst.* ๘๒(๑๓): ๑๑๐๗-๑๑๒.

มูลค่าการนำเข้ายาจากต่างประเทศ จาก http://drug.fda.moph.go.th/zone_law/law๒๗.asp

สถานการณ์โรคมะเร็งในประเทศไทย จาก http://www.nci.go.th/th/File_download/D_index/NCCP_๒๕๕๖-๒๕๖๐.pdf

อัตราการตายจากโรคมะเร็งในประเทศไทย จาก <http://www.thaihealth.or.th/>

อัตราการตายจากโรครีเออร์ จาก <http://www.wcrf.org/>