

บทคัดย่อ

บาราคอลเป็นสารออกฤทธิ์คล้ายกังวลสกัดได้จากใบขี้เหล็ก ซึ่งอยู่ในบัญชีรายชื่อสมุนไพรในตำรายาแผนโบราณได้บรรยายสรรพคุณมีฤทธิ์ช่วยหลับ ภูมิปัญญาไทยได้นำใบขี้เหล็กมาประกอบเป็นอาหารพื้นบ้านเป็นเวลานานโดยไม่มีรายงานความเป็นพิษ อย่างไรก็ตาม ได้พบอุบัติการณ์ความเป็นพิษต่อดับเฉียบพลันในผู้ป่วยที่รับประทานผลิตภัณฑ์ใบขี้เหล็กติดต่อกัน โดยปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลที่ชัดเจนเกี่ยวกับสาเหตุหรือกลไกความเป็นพิษต่อดับของขี้เหล็ก สาเหตุความเป็นพิษของขี้เหล็กอาจเกิดจากบาราคอลซึ่งเป็นสารสำคัญในใบขี้เหล็ก หรือสารที่เกิดจากการสลายตัวของบาราคอล ดังนั้น วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อประเมินความคงตัวของบาราคอล และหาสาเหตุความเป็นพิษของบาราคอลในระดับชีววิทยาโมเลกุล การศึกษาความคงตัวของบาราคอลได้ประเมินตามข้อกำหนดมาตรฐานสากล ICH ด้วยเทคนิค HPLC-DAD พบว่าบาราคอลสลายตัวอย่างรวดเร็วในสารละลายต่าง และสลายตัวอย่างช้า ๆ เมื่ออยู่ในภาวะที่มีอุณหภูมิสูงและในภาวะที่มี 3% H_2O_2 แต่จะคงตัวได้ดีในสภาวะกรด โดยแสดงค่าคงที่ของอัตราเร็วของการสลายตัว (K_{obs}) ของบาราคอลในสารละลายต่างที่ pH 12 และ pH 13 เท่ากับ 0.00003 และ 0.00960 ต่อนาที ตามลำดับ จาก Arrhenius plot คำนวณค่า activation energy ของบาราคอลในสารละลายต่าง pH 13 ช่วงอุณหภูมิ 12 ถึง 51 องศาเซลเซียสได้เท่ากับ 22.344 กิโลแคลอรีต่อโมล เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างบาราคอลที่สลายตัวในสารละลายต่างและในภาวะอุณหภูมิสูงด้วยเทคนิค LC-MS และยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค NMR พบว่าเป็นตัวเดียวกันคือ cassiachromone และยังพบว่าเป็นสารชนิดเดียวกับเมื่อนำบาราคอลละลายอยู่ในสภาวะเลียงเซลล์

ความเข้าใจในเรื่องความคงตัวของบาราคอลได้นำมาวิเคราะห์ร่วมกับ การประเมินความเป็นพิษของบาราคอลต่อเซลล์ฟิสิบเก้ด้วยวิธี XTT พบว่าความเข้มข้นของบาราคอลที่ทำให้เซลล์มีชีวิตรอด 50% (IC_{50}) มีค่าเท่ากับ 1.5 มิลลิโมลาร์ ที่ความเข้มข้นดังกล่าวพบว่าเป็นการตายแบบอะพอพโทซิสถึง 35% เมื่อวิเคราะห์หาสาเหตุที่บาราคอลทำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิสพบว่า บาราคอลชักนำให้มีการสะสมอนุมูลอิสระชนิด superoxide และ hydroxy ในไมโทคอนเดรียเป็นจำนวนมากเมื่อย้อมเซลล์ด้วยสี DCFH-DA และยังทำให้การแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ลดลงเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Western Blot ส่งผลให้เมมเบรนของไมโทคอนเดรียเสียสภาพทำให้อนุมูลอิสระและ cytochrome c แพร่เข้าสู่ไซโตซอล ไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ caspase-9 ตามด้วยเอนไซม์ caspase-3 ซึ่งไปกระตุ้นการล่าเหยื่อโปรตีน CAD เข้านิวเคลียสเพื่อไปย่อยสลายดีเอ็นเอ ทำให้สังเกตเห็น DNA ladder บน agarose gel electrophoresis ซึ่งเป็นรูปแบบที่พบทั่วไปในเซลล์ที่ตายแบบอะพอพโทซิส โดยสรุปสาเหตุที่บาราคอลเป็นพิษต่อเซลล์เกิดจากการสะสมอนุมูลอิสระมากผิดปกติภายในเซลล์ ร่วมกับการส่งสัญญาณผ่านทางโปรตีน Bcl-2 ที่ผิดปกติซึ่งไปกระตุ้นวิถีการทำงานของเอนไซม์ caspase เป็นผลให้ดีเอ็นเอในนิวเคลียสถูกย่อยสลายและทำให้เซลล์ฟิสิบเก้ตายแบบอะพอพโทซิส ดังนั้น การพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพรขี้เหล็กจะต้องคำนึงสถานะการเก็บผลิตภัณฑ์เพื่อไม่ให้บาราคอลสลายตัว รวมทั้งควบคุมคุณภาพให้ปริมาณบาราคอลในสมุนไพรขี้เหล็กอยู่ในขนาดที่เหมาะสมกับประสิทธิผลทางเภสัชวิทยา โดยต้องกำหนดข้อควรระวังหรือข้อบ่งชี้ความเป็นพิษเมื่อใช้บาราคอลเกินขนาด หรือเมื่อใช้อย่างต่อเนื่อง ซึ่งความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์สมุนไพรขี้เหล็กมาจากได้รับบาราคอลมากเกินไปและ/หรือสารที่ได้จากการสลายตัวของบาราคอล

ABSTRACT

Barakol is a natural anxiolytic agent extracted from young leaves of *Cassia siamea* Lam., which has been used in folk medicine for the treatment of insomnia. Leaves of *C. siamea* has had centuries of use as traditional food without side effects. However, acute hepatitis associated with herbal products containing *C. siamea* leaves was reported in patients. There is still debate whether the hepatotoxicity of *C. siamea* might be related to barakol or the presence of its degradation products. Therefore, the aim of the present study was to investigate the degradation behavior of barakol under different ICH prescribed stress conditions, using reversed-phase HPLC-DAD assay as well as its cytotoxicity at a molecular level. For the stability study, extensive degradation of barakol was found to occur in alkaline condition through a base-catalyzed hydrolysis. Mild degradation of barakol was observed under thermal and oxidative stress while barakol was stable in acidic condition. The characteristic of barakol degradation under alkaline condition at pHs 12 and 13, represented by reaction rate constants (K_{obs}), were 0.00003 and 0.00960 min⁻¹, respectively. The activation energy according to Arrhenius plot was calculated to be 22.344 kcal mol⁻¹ at pH 13 and temperatures between 12 and 51 °C. A major degradation product of barakol under both alkaline and thermal stress conditions was characterized by LC-MS and NMR as cassiachromone, which was also present when barakol dissolved in culture medium.

Understanding degradation behavior of barakol gained a critical impact on the evaluation of its cytotoxicity. Barakol-induced apoptosis in P19 embryonic carcinoma cells was therefore investigated. Treatment with barakol decreased cell viability in a dose-dependent manner with an IC₅₀ of 1.5 mM. Barakol significantly increased intracellular reactive oxygen species (ROS), which was accompanied by Bcl-2 down-regulation. Subsequently, the activation of caspase-9 cascade was induced, leading to the translocation of CAD following by DNA fragmentation, an indication of apoptosis. Pretreatment with antioxidants N-acetylcysteine (NAC) and glutathione (GSH) significantly suppressed barakol-induced ROS generation as well as apoptosis. Additionally, these antioxidants dramatically inhibited barakol-induced Bcl-2 down-regulation. Inhibitory study in the pathway of ROS generation intracellularly using MnTBAP, catalase, and sodium formate also defined that superoxide anion and hydroxyl radical were responsible as the ROS induced by barakol in P19 cells. The present study revealed that barakol induced apoptosis in P19 cells via ROS-dependent mechanism with the involvement of Bcl-2 down-regulation and the activation of caspase cascade. These findings thus provide an explanation for the underlying mechanism of barakol-induced apoptosis in P19 cells. Understanding degradation behavior of barakol as well as its cytotoxicity might be critical in pharmaceutical development of herbal product as barakol and its degradation product might play a significant impacts on drug efficacy, safety profile, and drug toxicity.