

นิพนธ์ฉบับ

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมกับระยะเวลาการสกัดและการศึกษาความคงตัวของผงยาตำรับตรีผลา

สร้อยเพชร เนตรอนงค์*, พีระพงศ์ กิติมาวงศ์**, ศรีโสภา เรืองหนู*, อรุณพร อิฐรัตน์* ***

บทคัดย่อ

- บทนำ:** ตำรับยาตรีผลา ประกอบด้วยสมุนไพร ๓ ชนิด ได้แก่ สมอไทย สมอพิเภก และมะขามป้อม อัตราส่วนที่เท่ากัน ในบัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. ๒๕๕๔ ระบุข้อบ่งใช้สำหรับบรรเทาอาการไอ ขับเสมหะ ส่วนในคัมภีร์แพทย์แผนไทยมีสรรพคุณช่วยรักษาอาการป่วยในคิมหันตฤดู (ฤดูร้อน) และลดความอ้วน แต่ยังไม่มียารงานการศึกษาวิธีการควบคุมคุณภาพของผงยาตรีผลา ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระยะเวลาการแช่สกัดที่ดีที่สุดในการสกัดผงยา เพื่อนำไปใช้ทดสอบความคงตัวของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของผงยาตรีผลา
- วิธีการศึกษา:** แช่สกัดผงยาตรีผลาด้วย ๕๕% เอทานอล ในระยะเวลาต่างกัน คือ ๑, ๓, ๕, ๗, ๙ และ ๑๑ วัน หรือผงยาตรีผลาสกัดน้ำด้วยวิธีการต้มที่ระยะเวลาต่างกัน คือ ๑๕, ๓๐, ๔๕ และ ๖๐ นาที จากนั้นนำไปคำนวณหาร้อยละปริมาณสารสกัดที่ได้ต่อน้ำหนักพืชแห้ง (%yield) ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH assay และหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu นอกจากนี้เก็บผงยาตรีผลาในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิ ๔๐ ± ๒ องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ ๗๕ ± ๕ เป็นเวลา ๖ เดือน แล้วสุ่มตัวอย่างในวันที่ ๐, ๑๕, ๓๐, ๖๐, ๙๐, ๑๒๐, ๑๕๐ และ ๑๘๐ วัน ตามลำดับ สกัดผงยาโดยใช้ระยะเวลาที่ดีที่สุดจากผลการศึกษาข้างต้น แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลรวม
- ผลการศึกษา:** การสกัดตรีผลาด้วย ๕๕% เอทานอล มีปริมาณสารสกัดที่ได้ต่อน้ำหนักพืชแห้งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม ปริมาณมากกว่าสารสกัดน้ำ โดยสารสกัดที่ใช้เวลาการแช่สกัดด้วยเอทานอลเป็นเวลา ๑, ๓, ๕, ๗, ๙ และ ๑๑ วัน มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > ๐.๐๕$) คือ EC_{50} อยู่ในช่วง ๓.๐๙ ± ๐.๕๙ ถึง ๔.๑๗ ± ๐.๓๘ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารประกอบฟีนอลรวม มีปริมาณไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > ๐.๐๕$) มีค่าอยู่ในช่วง ๒๖๐.๒๒ ± ๓๑.๕๓ ถึง ๓๐๘.๑๐ ± ๑๐.๐๖ มิลลิกรัมแกลลิกแอซิดต่อกรัมสารสกัด ทดสอบความคงตัวของชีวภาพและเคมีของผงยาตรีผลาพบว่า เมื่อเก็บในสภาวะเร่งไม่ทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมเปลี่ยนแปลง ($p > ๐.๐๕$) เมื่อเทียบกับ Day 0 อย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าผงยาตรีผลาเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องได้เป็นเวลา ๒ ปี โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมไม่เปลี่ยนแปลง
- วิจารณ์ และสรุปผลการศึกษา:** สารสกัดตำรับตรีผลาที่ได้จากการแช่สกัดด้วยเอทานอลนาน ๓ วัน เป็นการสกัดที่ใช้เวลาน้อยที่สุดและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมไม่แตกต่างกับการแช่สกัดที่ระยะเวลามากขึ้น จึงเหมาะที่จะนำไปใช้สกัดเพื่อการวิเคราะห์และควบคุมมาตรฐานของผงยาตำรับตรีผลา และผงยาตรีผลามีความคงตัวสามารถเก็บไว้ได้นาน ๒ ปี โดยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระคงเดิม

คำสำคัญ: ตรีผลา, ต้านอนุมูลอิสระ, สารประกอบฟีนอลรวม, ระยะเวลาการสกัด, การทดสอบความคงตัว

วันที่รับบทความ: ๒๔ กุมภาพันธ์ ๒๕๕๘

วันที่อนุญาตให้ตีพิมพ์: ๓ กรกฎาคม ๒๕๕๘

* สถานการณ์แพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

** ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

*** ศูนย์ความเป็นเลิศทางการแพทย์แผนไทย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ผู้ติดต่อ รองศาสตราจารย์อรุณพร อิฐรัตน์, ศูนย์ความเป็นเลิศทางการแพทย์แผนไทย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

โทรศัพท์ ๐๒-๕๖๒๙๗๕๖ อีเมล iarunporn@yahoo.com

บทนำ

บัญชียาจากสมุนไพร พ.ศ. ๒๕๕๔ ยาตรีผลาจัดเป็นยาแผนไทยหรือยาแผนโบราณ ใช้รักษากลุ่มอาการระบบทางเดินหายใจ มีข้อบ่งใช้ คือ บรรเทาอาการไอ ขับเสมหะ ในสูตรตำรับประกอบด้วยเนื้อลูกสมอไทย เนื้อลูกสมอพิเภก เนื้อลูกมะขามป้อม หนักลิ้งละ ๓๐ กรัม^๑ ส่วนคัมภีร์แพทย์แผนไทย ที่ชี้ชื่อว่า คัมภีร์สรรพคุณยา กล่าวถึงตรีผลามีสรรพคุณช่วยระงับโรคที่เกิดจากดี แก้อเสมหะและลมในกองธาตุฤดูแล้งของอายุสมุฏฐาน^๒ หรือใช้เป็นยาป้องกันและรักษาโรคอันเกี่ยวกับฤดูกาล ภูมิอากาศ ส่วนในคัมภีร์วรัญนัยสารใช้ตรีผลาตำเป็นผง เป็นยาสำหรับลดความอ้วน^๓ การศึกษาพิษวิทยาพบว่า สารสกัดตรีผลาด้วยน้ำ (อัตราส่วน ๑:๑:๑ และ ๑:๒:๓) ไม่ก่อให้เกิดพิษเฉียบพลันในขนาด ๕,๐๐๐ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว และพิษเรื้อรังในขนาด ๒,๕๐๐ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว (ระยะเวลา ๒๗๐ วัน) มีความปลอดภัย ไม่มีผลต่อการทำงานของตับและไต^๔ แต่ในการศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลันของตรีผลา ตำรับแก้ว่าตะสมุฏฐาน (อัตราส่วนสมอไทย สมอพิเภก มะขามป้อม = ๑๒:๔:๘) พบครีเอตินินสูงกว่ากลุ่มควบคุม และผลทางจุลพยาธิวิทยา ยังแสดงให้เห็นว่าตับและไตของหนูเพศเมียมีความไวต่อพิษมากกว่าหนูเพศผู้ อาจเนื่องมาจากสารแทนนิน^๕ ส่วนรายงานการศึกษาในหลอดทดลอง พบตรีผลามีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านและยับยั้งเซลล์มะเร็ง ฤทธิ์ลดระดับไขมันในเลือด^๖ เช่นเดียวกับการศึกษาในหนูที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูงร่วมกับการได้รับตรีผลาแบบผง จะมีระดับไขมันลดลง และไม่พบความแตกต่างกันทางจุลพยาธิวิทยาของตับในหนูทั้งสองกลุ่ม^๗ นอกจากนี้ข้อมูลการศึกษาในอาสาสมัครสุขภาพดี รับประทานสารสกัดตรีผลาขึ้นเอทานอล ๕๕% อัตราส่วนสมุนไพร ๑:๑:๑ พบว่าสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ ไม่พบผลข้างเคียงที่อันตราย ซึ่งอาจใช้ตรีผลาเป็นยาเสริมในการเพิ่มภูมิคุ้มกันในผู้ป่วยเอชไอวีได้^๘ นอกจากนี้ยังสามารถลดระดับไขมัน (ไตรกลีเซอไรด์ และแอลดีแอลคอเลสเตอรอล) ได้จากการศึกษาประสิทธิผลของตำรับตรีผลาในผู้ที่มีไขมันในเลือดสูงเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่รับประทานยาหลอก ไม่พบการแพ้ยา มีเพียงผลข้างเคียงที่ไม่รุนแรงและสามารถหายได้เองเมื่อหยุดยาคือถ่ายเหลวขึ้น^๙

แต่อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานการศึกษาวิธีการควบคุมคุณภาพของตรีผลา ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อความเชื่อมั่นในการใช้ยาของผู้บริโภค ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาวิธีควบคุมคุณภาพของผงยา โดยการทดสอบสารประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ที่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดโรค เช่น โรคเรื้อรังหรือระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง หากมีสารต้านอนุมูลอิสระในสมุนไพร เช่น วิตามินซี ก็จะช่วยเสริมระบบการทำงานของเม็ดเลือดขาวและระบบภูมิคุ้มกัน บรรเทาโรคในระบบทางเดินหายใจ (อาการแพ้) หรือลดระยะเวลาการเป็นหวัดได้ ดังนั้น การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์คือ ศึกษาระยะเวลาการแช่สกัดที่ดีที่สุดในการสกัดผงยา เพื่อนำไปใช้ทดสอบความคงตัวของผงยาตรีผลาในด้านฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของตำรับ เพื่อประโยชน์ในการควบคุมมาตรฐานผงยาและศึกษางานวิจัยทางคลินิกต่อไป

วิธีการศึกษา

การเตรียมผงยาตรีผลา

ผลสมอไทย (*Terminalia chebula* Retz.) ผลสมอพิเภก (*Terminalia bellirica* (Gaertn.) Roxb.) และผลมะขามป้อม (*Phyllanthus emblica* L.) สดจากกาญจนบุรี จากนั้นนำสมุนไพรสดทั้งสามชนิด ล้างให้สะอาด อบให้แห้งในตู้อบ อุณหภูมิประมาณ ๗๐ - ๙๐ องศาเซลเซียส บดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดร่อนผ่านตะแกรงเบอร์ ๘๐ ซึ่งผงสมุนไพรแต่ละชนิดในปริมาณเท่ากัน แล้วผสมสมุนไพรแห้งแต่ละชนิดให้เข้ากันจนได้ผงยาตำรับตรีผลา

การสกัดผงยาตรีผลา

สารสกัดเอทานอล

แบ่งผงยาตรีผลาส่วนละ ๓๐ กรัม จำนวน ๖ ส่วน แช่ด้วย ๕๕% เอทานอล ในระยะเวลาต่างกัน คือ ๑, ๓, ๕, ๗, ๙ และ ๑๑ วัน จากนั้นนำสารสกัดไประเหยแห้ง โดยใช้เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) และคำนวณหาร้อยละปริมาณสารสกัดเอทานอลที่ได้ต่อน้ำหนักพืชแห้ง (%yield)

สารสกัดน้ำ

นำผงตรีผลาน้ำหนัก ๑๒๐ กรัม แบ่งออกเป็น ๔ ส่วนๆ ละ ๓๐ กรัม นำมาต้มน้ำที่ระยะเวลาต่างกัน คือ ๑๕, ๓๐, ๔๕ และ ๖๐ นาที กรอง นำส่วนที่กรองได้ไปทำแห้ง ด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dryer) และคำนวณหาร้อยละปริมาณสารสกัดน้ำที่ได้ต่อน้ำหนักพืชแห้ง (%yield)

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Free radical scavenging activity)

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH assay โดยใช้ BHT (Butylated hydroxytoluene) เป็นสารมาตรฐาน มีหลักการคือ หากสมุนไพรมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยการให้ไฮโดรเจนอะตอม แก่อนุมูล DPPH ซึ่งเป็นอนุมูลไนโตรเจนที่คงตัว จะแสดงให้เห็นโดยการเปลี่ยนสารละลาย DPPH สีม่วงในเอทานอลเป็นสารละลายสีเหลือง

วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay^{๑๑}

เตรียมสารละลายมาตรฐาน DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) โดยละลายใน absolute ethanol จากนั้นซึ่งสารมาตรฐาน BHT และสารสกัดสมุนไพรร้อยละ ๑๐ มิลลิกรัม สำหรับสารสกัดที่แช่สกัดด้วย ๙๕% เอทานอลละลายด้วย absolute ethanol ๑๐ มิลลิกรัม และสารสกัดน้ำที่ได้จากการต้มผงยาตรีผลา ละลายด้วยน้ำ (deionized water) ๑๐ มิลลิกรัม แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้น ๑๐๐, ๕๐, ๑๐ และ ๑ ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม จากนั้นหยอดสารมาตรฐาน BHT สารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่างๆ และสารละลายมาตรฐาน DPPH ใน 96 well plate หลุมละ ๑๐๐ ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา ๓๐ นาที วัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น ๕๒๐ นาโนเมตรด้วยเครื่อง microplate reader และหาค่าความเข้มข้นของสารที่มีประสิทธิภาพยับยั้งอนุมูลอิสระได้ลดลงร้อยละ ๕๐ (EC_{50}) จากค่ากราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดกับ %inhibition (dose response curve) ด้วยโปรแกรม prism

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม (Total phenolic compound)

ทดสอบสารประกอบฟีนอลรวม (Total phenolic compound) ด้วย Folin-Ciocalteu's reagent โดยใช้ gallic acid เป็นสารมาตรฐาน วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น ๗๖๕ นาโนเมตร

วิธีการทดสอบหาสารประกอบประกอบฟีนอลรวม^{๑๒}

เตรียมสารมาตรฐาน gallic acid และสารสกัดสมุนไพรร้อยละ ๑ มิลลิกรัม สำหรับสารสกัดที่แช่สกัดด้วย ๙๕% เอทานอล ละลายด้วย absolute ethanol ๑ มิลลิกรัม และสารสกัดน้ำที่ได้จากการต้มผงยาตรีผลา ละลายด้วยน้ำ (deionized water) ๑ มิลลิกรัม หยอดสารละลายตัวอย่าง ใน 96 well plate หลุมละ ๒๐ ไมโครลิตร จากนั้นหยอด Folin-Ciocalteu's reagent หลุมละ ๑๐๐ ไมโครลิตร และ

โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate: Na_2CO_3) ๘๐ ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้อุณหภูมิห้องเป็นเวลา ๓๐ นาที วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น ๗๖๕ นาโนเมตรด้วยเครื่อง microplate reader และคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมจากกราฟมาตรฐาน gallic acid ในหน่วยกรัมของแกลลิกแอซิดต่อกรัมสารสกัด (g GAE/g of extract)

การทดสอบความคงตัวของชีวภาพ (Stability test)

นำผงยาตรีผลาที่ผลิตได้เก็บในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 40 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ ๗๕ $\pm$ ๕ เป็นเวลา ๖ เดือน แล้วสุ่มตัวอย่างในวันที่ ๐, ๑๕, ๓๐, ๖๐, ๙๐, ๑๒๐, ๑๕๐ และ ๑๘๐ วัน ตามลำดับ เก็บตู้ -๒๐ องศาเซลเซียส เมื่อครบทุกตัวอย่างนำสารสกัดผงยาแช่ ๙๕% เอทานอล และระเหยแห้งพร้อมกัน โดยการใช้ระยะเวลาที่ดีที่สุดจากการผลการศึกษาข้างต้น คือ ๓ วัน แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม หากพบว่าผงยาตรีผลาที่คงตัวตลอดการทดสอบ จึงอนุมานได้ว่าผงยาตรีผลามีอายุไม่น้อยกว่า ๒ ปี ที่สภาวะอุณหภูมิห้อง^{๑๓}

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม และความคงตัวของชีวภาพ จะทำการทดสอบตัวอย่างละ ๓ ครั้ง ($n = 3$) นำผลที่ได้คิดค่าเฉลี่ย และหาค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของการวัด (Standard error of measurement; SEM) โดยจะแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ยความเข้มข้นที่ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระร้อยละ ๕๐ (EC_{50}) และค่าเฉลี่ยของปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม (GAE) ตามลำดับ ส่วนความแตกต่างของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมในแต่ละวัน วิเคราะห์สถิติโดยใช้ one-way ANOVA ($p < 0.05$) และความคงตัวของผงยาตรีผลา วิเคราะห์สถิติโดยใช้ paired t-test เปรียบความแตกต่างในแต่ละวันที่เก็บกับผงยาแช่สกัดด้วย ๙๕% เอทานอล ที่ระยะเวลา ๐ วัน หรือ Day 0 ($p < 0.05$)

ผลการศึกษา

เมื่อระเหยแห้งสารแช่สกัดผงยาตรีผลาด้วย ๙๕% เอทานอล พบว่า มีลักษณะชั้นเหนียวสีน้ำตาลเข้ม และเมื่อระเหยแห้งสารสกัดผงยาตรีผลาด้วยการต้มน้ำ พบว่ามีลักษณะเป็นผงร่วนแห้งสีน้ำตาลเหลือง มีร้อยละน้ำหนักเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักสมุนไพรร้อยละ ๑๐๐ (%yield) ในระยะเวลาต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ ๑

ตารางที่ ๑ น้ำหนักร้อยละ (%yield) ของสารสกัดที่ได้จากการแช่สกัดผงยาตรีผลาด้วย ๙๕% เอทานอล และการต้มน้ำที่ระยะเวลาต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักสมุนไพรแห้ง

รูปแบบการสกัด	ระยะเวลา	%yield	% เมื่อเทียบกับ %yield มากสุด
แช่ ๙๕% เอทานอล	๑ วัน	๑๕.๓๓*	๗๔.๖๔
	๓ วัน	๒๐.๑๘	๙๘.๒๕
	๕ วัน	๒๐.๐๔	๙๗.๕๗
	๗ วัน	๑๘.๗๒	๙๖.๑๔
	๙ วัน	๑๙.๖๐	๙๕.๔๒
	๑๑ วัน	๒๐.๕๔	๑๐๐
ต้มน้ำ	๑๕ นาที	๓.๙๘	๑๙.๓๘
	๓๐ นาที	๕.๑๓	๒๕.๙๘
	๔๕ นาที	๑๓.๑๐	๖๓.๗๘
	๖๐ นาที	๖.๕๗	๓๑.๕๐

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อ p-value < ๐.๐๕ (เทียบกับการสกัดในรูปแบบเดียวกัน)

ตารางที่ ๒ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม (mean $\pm$ SEM) ของสารสกัดที่ได้จากการแช่สกัดผงยาตรีผลาด้วย ๙๕% เอทานอล และการต้มน้ำที่ระยะเวลาต่างกัน (n = ๓)

รูปแบบการสกัด	ระยะเวลาการแช่สกัด	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ EC ₅₀ (μ g/ml)	ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม (mg GAE/g)
แช่ ๙๕% เอทานอล	๑ วัน	๓.๙๕ $\pm$ ๐.๕๑	๒๖๐.๒๒ $\pm$ ๓๑.๕๓
	๓ วัน	๔.๑๗ $\pm$ ๐.๓๘	๒๖๔.๓๒ $\pm$ ๓.๗๓
	๕ วัน	๓.๐๙ $\pm$ ๐.๕๙*	๒๙๓.๗๔ $\pm$ ๘.๕๕
	๗ วัน	๓.๘๘ $\pm$ ๐.๑๑	๒๙๙.๑๓ $\pm$ ๗.๙๕
	๙ วัน	๔.๐๕ $\pm$ ๐.๒๒	๓๐๐.๔๑ $\pm$ ๘.๐๘
	๑๑ วัน	๔.๑๖ $\pm$ ๐.๐๖	๓๐๘.๑๐ $\pm$ ๑๐.๐๖
ต้มน้ำ	๑๕ นาที	๕.๔๙ $\pm$ ๐.๓๓	๒๑๘.๖๗ $\pm$ ๔.๕๒
	๓๐ นาที	๖.๑๔ $\pm$ ๐.๗๗	๒๒๘.๔๐ $\pm$ ๑.๔๕
	๔๕ นาที	๕.๐๖ $\pm$ ๐.๑๐	๒๕๕.๔๐ $\pm$ ๒.๙๖
	๖๐ นาที	๕.๑๘ $\pm$ ๐.๒๓	๒๐๗.๕๓ $\pm$ ๒.๑๙
BHT		๑๔.๙๐ $\pm$ ๑.๖๕	

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p-value < ๐.๐๕) เมื่อเปรียบเทียบกับค่าต้มน้ำ ๓๐ นาที ด้วยวิธี multiple-comparison (scheffe)

ตารางที่ ๓ ความคงตัวของสารสกัดที่ได้จากการแช่สกัดผงยาตรีผลาด้วย ๙๕% เอทานอล ๓ วัน (n = ๓) ทดสอบโดยวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม (mean $\pm$ SEM)

ระยะเวลาที่เก็บความคงตัว (วัน)	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ EC ₅₀ (μ g/ml)	ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม (mg GAE/g)
๐	๔.๕๓ $\pm$ ๐.๒๕	๒๙๖.๔๖ $\pm$ ๐.๒๗
๑๕	๓.๘๘ $\pm$ ๐.๒๖	๓๐๑.๒๓ $\pm$ ๐.๑๘
๓๐	๓.๗๐ $\pm$ ๐.๔๘	๓๒๙.๑๕ $\pm$ ๐.๑๑
๖๐	๓.๖๕ $\pm$ ๐.๑๕	๓๒๘.๘๘ $\pm$ ๐.๐๘
๙๐	๔.๔๑ $\pm$ ๐.๒๐	๓๖๒.๗๑ $\pm$ ๐.๑๕
๑๒๐	๓.๕๗ $\pm$ ๐.๔๒	๓๓๗.๓๕ $\pm$ ๐.๑๒
๑๕๐	๔.๗๑ $\pm$ ๐.๔๘	๓๒๒.๐๔ $\pm$ ๐.๘๔
๑๘๐	๔.๔๖ $\pm$ ๐.๒๕	๒๙๓.๔๖ $\pm$ ๐.๘๙

วิจารณ์ และสรุปผลการศึกษา

การแช่สกัดผงยาตรีผลาด้วย ๙๕% เอทานอล ในระยะเวลาต่างกันพบว่าที่ระยะเวลา ๑๑ วัน มีร้อยละ น้ำหนักสารสกัดต่อน้ำหนักสมุนไพรแห้ง (%yield) มากที่สุด (ร้อยละ ๒๐.๕๔) เมื่อคิดสถิติเฉพาะผงยาตรีผลาที่แช่สกัดด้วย ๙๕% เอทานอล ที่เวลา ๓, ๕, ๗, ๙ และ ๑๑ วัน พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p < ๐.๐๕) แต่การแช่สกัดด้วย ๙๕% เอทานอล เป็นเวลา ๑ วัน มีสารสกัดน้อยกว่าวันอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารสกัดจากการแช่สกัดผงยาตรีผลาด้วย ๙๕% เอทานอล ที่ระยะเวลาต่างๆ พบว่า มีปริมาณมากกว่าปริมาณสารสกัดที่ได้จากการต้มในทุกระยะเวลา และการแช่สกัดผงยาตรีผลาด้วย ๙๕% เอทานอล มีแนวโน้มใกล้เคียงกัน ตั้งแต่ระยะเวลาตั้งแต่ ๓ วันขึ้นไป

ดังเห็นได้จากการคิดเทียบร้อยละของการสกัดในตารางที่ ๑ แสดงการแช่สกัดผงยาตรีผลาด้วย ๙๕% เอทานอล เป็นระยะเวลา ๓ วัน (ร้อยละ ๒๐.๑๘) ก็ได้สารสกัดในปริมาณที่ใกล้เคียงกับการแช่สกัดผงยาตรีผลาด้วย ๙๕% เอทานอล เป็นระยะเวลา ๑๑ วัน ซึ่งหากต้องใช้เวลานานในการแช่สกัดถึง ๑๑ วัน จะทำให้เสียเวลามากเกินไป สอดคล้องกับหลักการสกัดสมุนไพรที่อาศัยหลักการแพร่ (diffusion) คือเมื่อสารนั้นถึงจุดสมดุลมีความอิ่มตัวแล้ว การแพร่จะสิ้นสุดลง การสกัดด้วยระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น ก็ไม่ทำให้ได้ปริมาณสารที่มากกว่าเดิม

ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของการแช่สกัดผงยาตรีผลาด้วย ๙๕% เอทานอล และการต้มน้ำที่ระยะเวลาต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p < ๐.๐๕) โดยเมื่อเปรียบเทียบหาความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยใช้ Multiple-comparison (scheffe) พบว่า การแช่สกัดผงยาตรีผลาด้วย ๙๕% เอทานอล เป็นเวลา ๕ วัน มีความแตกต่างกับการต้มน้ำ ที่ระยะเวลา ๓๐ นาที ดังแสดงในตารางที่ ๒ แสดงให้เห็นว่าการแช่สกัดผงยาตรีผลาด้วย ๙๕% เอทานอล ที่ระยะเวลา ๕ วัน มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด คือ EC₅₀ เท่ากับ ๓.๐๙ $\pm$ ๐.๕๙ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ของสารสกัดเอทานอลตำรับตรีผลา มีค่า EC₅₀ เท่ากับ ๓.๙๑ $\pm$ ๐.๑๙^{๑๑} และ ๕.๙๔ $\pm$ ๐.๐๖๑๔ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดน้ำของตำรับตรีผลามีค่า EC₅₀ เท่ากับ ๔.๓๔ $\pm$ ๐.๓๕^{๑๒} ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับผลการศึกษาครั้งนี้ คือ EC₅₀ อยู่ในช่วง ๔.๘๘ ถึง ๗.๖๗ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของการแช่สกัดผงยาตรีผลาด้วย ๙๕% เอทานอล และการต้มน้ำที่ระยะเวลาต่างกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (p > ๐.๐๕) (ตารางที่ ๒) และพบว่า การแช่สกัดผงยาตรีผลาด้วย ๙๕% เอทานอล ที่ระยะเวลา ๑๑ วัน มีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมมากที่สุด คือ ๓๐๘.๑๐ $\pm$ ๑๐.๐๖ มิลลิกรัมแกลลิกแอซิดต่อกรัมสารสกัด ใกล้เคียงกับการศึกษาของ Deepa B และคณะ^{๑๔} ที่พบว่า

ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ของสารสกัดเอทานอลตำรับตรีผลา มีค่า 25.4 ± 0.3 มิลลิกรัม แกลลิกแอซิดต่อกรัมสารสกัด เปรียบเทียบการศึกษาของ Nag G และคณะ^๕ ซึ่งพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ของสารสกัดน้ำตำรับตรีผลา มีค่า 14.7 ± 0.1 มิลลิกรัมแกลลิกแอซิดต่อกรัมสารสกัด โดยการสกัดในการศึกษานี้มีค่ามากกว่า ๒๐๐ มิลลิกรัมแกลลิกแอซิดต่อกรัมสารสกัด

จากการศึกษาข้างต้น การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของการแช่สกัดผงยาตรีผลาด้วย ๙๕% เอทานอล เป็นเวลา ๓ วัน ($EC_{50} = 4.17 \pm 0.38$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นระยะเวลาที่สั้นและได้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ไม่แตกต่างจากแช่สกัดที่ใช้เวลามากกว่า และยังมีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมไม่ต่างกันทางสถิติกับวันที่ ๑๑ ซึ่งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมสูงที่สุด ($26.4.32 \pm 0.73$ และ $30.6.10 \pm 0.06$ มิลลิกรัมแกลลิกแอซิดต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ) อีกทั้งสารสกัดในวันที่ ๓ มีร้อยละปริมาณสารสกัดต่อน้ำหนักผงยาตรีผลาเท่ากับ ๒๐.๑๘ อยู่ในปริมาณที่ค่อนข้างสูงและใกล้เคียงกับ %yield สูงสุด (ร้อยละ ๒๐.๕๔) ดังนั้น การสกัดเพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพต่อสุขภาพ คือ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม เพื่อหามาตรฐานของผงยาตรีผลา ควรต้องแช่สกัดด้วย ๙๕% เอทานอล นาน ๓ วัน เป็นเวลาที่เหมาะสม ไม่นานเกินไป และเป็นวิธีการสกัดที่สะดวกและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าการสกัดด้วยน้ำ

ดังนั้นการทดสอบความคงตัวของผงยาตรีผลาในสภาวะเร่งคือที่อุณหภูมิ 40 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 ± 5 เป็นเวลา ๖ เดือน แล้วเก็บผงยาในวันที่ ๐, ๑๕, ๓๐, ๖๐, ๙๐, ๑๒๐, ๑๕๐ และ ๑๘๐ วัน ตามลำดับ เพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม ได้ผลดังแสดงในตารางที่ ๓ ผลการทดสอบพบว่า ผงยาตรีผลามีความคงตัว เพราะฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของวันแรกจนถึงวันสุดท้ายที่เก็บผงยาไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับวันแรก ($p > 0.05$) จึงสรุปได้ว่าผงยาตรีผลามีความคงตัว ๒ ปี ที่สภาวะอุณหภูมิห้อง โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมไม่เปลี่ยนแปลง

การควบคุมคุณภาพสารสกัดให้ได้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุดและใช้ระยะเวลาที่น้อยที่สุด ควรแช่สกัดผงยาตรีผลาด้วย ๙๕% เอทานอล เป็นระยะเวลา ๓ วัน และเมื่อเก็บอุณหภูมิห้องมีความคงตัว ๒ ปี โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมไม่เปลี่ยนแปลง

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและการพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติของสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กองทุนภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข และคณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

เอกสารอ้างอิง

๑. คณะกรรมการแห่งชาติด้านยา. บัญชียาจากสมุนไพร พ.ศ. ๒๕๕๔. โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก, ๒๕๕๔.
๒. มูลนิธิฟื้นฟูส่งเสริมการแพทย์ไทยเดิมฯ อายุรเวทวิทยาลัย (ชีวโกมารภักจ). ตำราการแพทย์ไทยเดิม (แพทยศาสตร์สงเคราะห์ ฉบับอนุรักษ์). พิมพ์ครั้งที่ ๒. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, สิงหาคม ๒๕๔๗.
๓. สถาบันภาษาไทย กรมวิชาการ กระทรวงศึกษาธิการ. แพทยศาสตร์สงเคราะห์: ภูมิปัญญาทางการแพทย์และมรดกทางวัฒนธรรมของชาติ. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว, ๒๕๕๒.
๔. ลีวนุรณ ลีรัฐวงศ์ และคณะ. โครงการย่อยที่ ๒ ความเป็นพิษเฉียบพลันและพิษเรื้อรังของตำรับมหาพิกัฏฐตรีผลา. สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ, ๒๕๕๓.
๕. ปราณี ชวลิตธำรง, เอมมนัส อัดติวิชัย, พิช รัชามั่น, ปราณี จันทเพ็ชร. พิษกึ่งเฉียบพลันของยาแผนโบราณตรีผลา. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ๒๕๓๙; ๓๘:๑๗๐-๑.
๖. Mukherjee PK, Rai S, Bhattacharyya S, Debnath P, Biswas TK, Jana U, et al. Clinical Study of 'Triphala': A well known phytomedicine from India. Iran J Pharmacol Ther 2006;5:51-4.

๗. Saravanan S, Srikumar R, Manikandan S, Jeya Parthasarathy N, Sheela Devi R. Hypolipidemic effect of triphala in experimentally induced hypercholesteremic rats Yakugaku Zasshi 2007;127:385-8.
๘. Phetkate P, Kummalue T, U-pratya Y, Kietinun S. Significant increase in cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells by triphala: a clinical phase I study. Evidence-based complementary and alternative medicine 2012;239856:1-6.
๙. เพ็ชรเกษม วิเชียรแสง, วิจิตร บุญยะโทตระ. การศึกษาประสิทธิผลของยาสมุนไพรไทยตำรับตรีผลาในการลดระดับไขมันในเลือดในผู้ที่มีภาวะไขมันในเลือดสูง. [วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต] เชียงราย: มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง, ๒๕๕๕.
๑๐. Bonina F, Puglia C, Tomaino A, Saija A, Mulinacci N, Romani A, et al. In-vitro antioxidant and in-vivo photoprotective effect of three lyophilized extracts of Sedum telephium L. leaves. J Pharm Pharmacol 2000;52:1279-85.
๑๑. Miliauskas G, Venskutonis PR, van Beek TA. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. Food Chemistry 2004;85:231-7.
๑๒. Rakwatin C. Data analysis to study drug stability of accelerated testing and long-testing. Center of stability testing, Office of drug analysis, Department of medical sciences, 1995.
๑๓. ศรีโสภณ เรืองหนู. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของตำรับตรีผลา. [วิทยานิพนธ์เภสัชศาสตรมหาบัณฑิต] สงขลา: มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, ๒๕๕๐.
๑๔. Deepa B, Prema G, Sai krishna B, Cherian KM. Antioxidant and free radical scavenging activity of triphala determined by using different in vitro models. J Med Plants Research 2013;7:2898-905.
๑๕. Nag G, De B. Acetylcholinesterase inhibitory activity of Terminalia chebula, Terminalia bellerica and Emblica officinalis and some phenolic compounds. Int. J Pharm Sci 2011;3:121-4.

Abstract

Free radical scavenging activity and total phenolic content of different times for extraction triphala powder and its stability study

Soiphet Net-anong*, Peerapong Kitipawong**, Srisopa Ruangnoo*, Arunporn Itharat* ***

* Department of Applied Thai Traditional Medicine, Faculty of Medicine, Thammasat University

** Department of Medicines, Faculty of Medicine, Thammasat University

*** Excellence Center of Research on Applied Thai Traditional Medicine, Thammasat University

Corresponding author: Assoc. Prof. Arunporn Itharat, Excellence Center of Research on Applied Thai Traditional Medicine, Thammasat University
Tel. 02-9269749 E-mail: iarunporn@yahoo.com

Introduction: Triphala recipe consists of *Terminalia chebula*, *Terminalia bellirica* and *Phyllanthus emblica* in equal proportions. It is in Herbal Essential Medicines of Thailand National List in A.D. 2011 and used for relieve cough. In Thai traditional medicine, triphala remedy is used in the form of powder drug for losing weight and curing symptoms in summer season. However, there is no report on quality control of triphala powder drug remedy. Thus, the purposes of this study were to investigate the best extraction procedure to obtain the best biological activity such as free radical scavenging activity and total phenolic content and study on stability of the extract.

Method: Triphala powder drug was macerated with 95% ethanol for six different period times as 1, 3, 5, 7, 9, 11 days and boiled in water for four different times as 15, 30, 45, 60 minutes. Percent yield was calculated and free radical scavenging activity was evaluated by using DPPH assay. Total phenolic content was determined using Folin-Ciocalteu reagent. Stability of the extract was studies using an accelerated condition (40 °C and 75% RH) of crude triphala remedy for 6 months and collected in 6 different times as 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180 days. Triphala extract was obtained using the best extraction condition and assayed for free radical scavenging activity and total phenolic content.

Result: Ethanolic extract of triphala showed percent yield, free radical scavenging activity and total phenolic content greater than triphala water extract. The ethanolic extract with six different period times as 1, 3, 5, 7, 9, 11 days were not significantly different ($p > 0.05$) in term of free radical scavenging activity and total phenolic content. Free radical scavenging activity as EC_{50} was between 3.09 ± 0.59 and 4.17 ± 0.38 $\mu\text{g/ml}$. Total phenolic content was 260.22 ± 31.53 to 308.10 ± 10.06 mg GAE/g. Stability test in term of free radical scavenging activity and total phenolic content was not significantly different ($p > 0.05$) when compared with Day 0. Thus, triphala powder drug was stable for 2 years at room temperature.

Discussion and Conclusion: Triphala was macerated with 95% ethanol at day 3 showed minimal extraction time, where free radical scavenging activity and total phenolic content were not significant different from the maximum extraction time. Thus, three days extraction period time was used for quality control that powder triphala for remedy was macerated with 95% ethanol for 3 days. According to the stability test condition, triphala powder drug was stable for 2 years at room temperature that free radical scavenging activity did not change significantly.

Key words: Triphala, Free radical scavenging activity, Total phenolic content, Extraction time, Stability test