สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยรังสิต
RANGSIT UNIVERSITY LIBRARY

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

ผลของสารสกัดตำรับตรีผลาต่อการยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรส

The effect of Triphala extract on the inhibition of pancreatic cholesterol esterase

โดย

ปฐมาภรณ์ ปฐมภาค

สนับสนุนโดย

สถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต

2557

ชื่อเรื่อง : ผลของสารสกัดตำรับตรีผลาต่อการยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรส

ผู้วิจัย : ปฐมาภรณ์ ปฐมภาค สถาบัน : คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต

ปีที่พิมพ์ : พ.ศ. 2559 สถานที่พิมพ์ : โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยรังสิต

แหล่งที่เก็บรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ : มหาวิทยาลัยรังสิต จำนวนหน้างานวิจัย : 54 หน้า

คำสำคัญ : ตรีผลา เอนไซม์คอเลสเตอรอล เอสเทอเรส การยับยั้งเอนไซม์ กรดแกลลิก แทนนิน

ลิขสิทธิ์ : มหาวิทยาลัยรังสิต

บทคัดย่อ

ภาวะคอเลสเตอรอลในเลือดสูง เป็นสาเหตุหลักของโรคหลอดเลือดหัวใจ เอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรส มีหน้าที่สำคัญในกระบวนการดูดซึมคอเลสเตอรอล โดยการปลดปล่อยคอเลสเตอรอลอิสระจากคอเลสเตอริลเอสเทอร์ ก่อนที่จะถูกขนส่งไปยังเซลล์ในร่างกาย การยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรส จึงเป็นทางเลือกที่ดีในการควบคุมระดับคอเลสเตอรอลในเลือด ตรีผลาเป็นสูตรตำรับสมุนไพรของไทยตั้งแต่สมัยโบราณที่ถูกใช้ในการรักษาโรคอย่างแพร่หลาย ตำรับตรีผลาประกอบไปด้วยผลของพืชสมุนไพร 3 ชนิด คือ สมอพิเภก สมอไทย และมะขามป้อม มีการรายงานว่าตำรับตรีผลามีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ฤทธิ์ต้านเบาหวาน และฤทธิ์ลดคอเลสเตอรอลในเลือดเป็นต้น วัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้คือการทดสอบผลของสารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลา และตรีผลาสูตรดัดแปลงอีก 4 สูตร และอัตราส่วนของพืชสมุนไพรในสูตรตำรับต่อการยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรส ปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณกรดแกลลิก และปริมาณแทนนิน ในการทดลองครั้งนี้แต่ละสูตรตำรับจะถูกสกัดสูตรละ 2 ซ้ำ คือ การสกัดครั้งที่ 1 และการสกัดครั้งที่ 2 ผลการทดลองพบว่าตรีผลาสูตรดัดแปลง 2 ซึ่งประกอบไปด้วยอัตราส่วนโดยน้ำหนักของสมอพิเภกมากที่สุด มีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงที่สุดที่ 514.4 ± 5.1 ไมโครกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมสารสกัด สำหรับการสกัดครั้งที่ 1และ 516.3 ± 22.9 ไมโครกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมสารสกัด สำหรับการสกัดครั้งที่ 2 โดยมีสมอพิเภกเป็นสมุนไพรเดี่ยวที่มีปริมาณฟีนอลิกรวมมากที่สุด วิเคราะห์ปริมาณกรดแกลลิกโดยใช้เทคนิคเดนซิโทเมทริกโครมาโทกราฟีผิวบาง ด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ประกอบไปด้วย โทลูอีน เอทิลอะซีเตต เมทานอล กรดฟอร์มิก ในอัตราส่วน 5:3:1.5:0.5 โดยปริมาตร และตรวจสอบที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร พบว่า

สารสกัดชั้นน้ำของตรีผลาสูตรดัดแปลงดัดแปลง 5 ซึ่งมีอัตราส่วนของมะขามป้อมมากที่สุด มีปริมาณเปอร์เซ็นต์กรดแกลลิกมากที่สุดที่ 2.42 ± 0.09 % สำหรับการสกัดครั้งที่ 1 และ 2.45 ± 0.09 % สำหรับการสกัดครั้งที่ 2 โดยมีสมุนไพรเดี่ยวมะขามป้อมมีปริมาณแกลลิกสูงที่สุด ทดสอบปริมาณแทนนินโดยการตกตะกอนด้วยอัลบูมินและใช้เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ในการตรวจสอบ พบว่าสารสกัดชั้นน้ำของตรีผลาสูตรดัดแปลงดัดแปลง 4 มีปริมาณแทนนินสูงที่สุดโดยมีค่าเท่ากับ 83.5 ± 6.9 เปอร์เซ็นต์สมมูลกรดแทนนิก สำหรับการสกัดครั้งที่ 1 และเท่ากับ 85.3 ± 3.4 เปอร์เซ็นต์สมมูลกรดแทนนิกสำหรับการสกัดครั้งที่ 2 ในขณะที่สารสกัดชั้นน้ำของตรีผลาสูตรดัดแปลง 3 ซึ่งมีอัตราส่วนของสมอไทยและมะขามป้อมสูงที่สุด กลับมีปริมาณแทนนินที่ต่ำกว่าสารสกัดชั้นน้ำของตรีผลาสูตรดัดแปลง 4 เอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรสถูกยับยั้งน้อยกว่า 30 % ด้วยสารสกัดชั้นน้ำของตรีผลาและตรีผลาสูตรดัดแปลงที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยตรีผลาสูตรดัดแปลง 2 มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ได้สูงที่สุดที่ 21.9 ± 0.5 % สำหรับการสกัดครั้งที่ 1 และตรีผลาสูตร 1 มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ได้สูงที่สุดที่ 20.7 ± 0.2 % สำหรับการสกัดครั้งที่ 2 กล่าวโดยสรุปสารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลาและตรีผลาสูตรดัดแปลง จัดเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรสที่ไม่ดีมาก ปริมาณแทนนินและการยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรสของสูตรตำรับ มีแนวโน้มที่ไม่แน่นอนและไม่มีความสัมพันธ์กับอัตราส่วนของสมุนไพรแต่ละชนิดในสูตรตำรับ ในขณะที่ปริมาณฟีนอลิกรวมและปริมาณกรดแกลลิกมีผลต่ออัตราส่วนของพืชสมุนไพรในสูตรตำรับอย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามเพื่อเป็นการเข้าใจถึงกลไกของตรีผลาในการลดปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือด จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคต

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Title : The Effect of Triphala Extract on the Inhibition of Pancreatic Cholesterol Esterase

Researcher : Pathamaporn Pathompak Institution : Rangsit University

Year of Publication : 2016 Publisher : Rangsit University Press

Sources : Rangsit University No. of page : 54 pages

Keywords : Triphala Cholesterol esterase Enzyme inhibition Gallic acid Tannins: Rangsit University

Abstract

Hypercholesterolemia is a main cause of coronary artery disease. Cholesterol esterase (CEase) plays an important role in cholesterol absorption by liberating free cholesterol from cholesteryl ester, before transported into enterocytes. Inhibition of CEase is a good alternative mechanism for controlling plasma cholesterol level. Triphala is an ancient Thai medicinal formula that widely used for treatments of illness. It composes of fruits of three medicinal plants including *Terminalia bellirica*, *Terminalia chebula* and *Phyllanthus emblica*. Triphala has been reported many biological activities such as anticancer, antidiabetic properties and blood cholesterol reducing property. The objective of this study is to investigate the effect of aqueous extract of Triphala (T.F.1) and four modified Triphala formulas (MT.F.2 – MT.F.5) and herbal plant ratio in formulas on cholesterol esterase inhibition, total phenolic, gallic acid and tannins contents. Each formula is extracted in duplicate called extraction 1 and extraction 2. The results demonstrate that modified Triphala formula 2 (MT.F.2), which contains the highest *T. bellirica* weight ratio, expresses the highest total phenolic content at 514.4 ± 5.1 and 516.3 ± 22.9 µg GAE/mg plant extract for extraction 1 and extraction 2, respectively, while the *T. bellirica* gives the highest total phenolic content. Gallic acid is quantified by TLC-densitometry method using toluene-ethyl acetate–methanol–formic acid (5 :3:1.5:0.5 v/v/v/v) as a mobile phase system and detected at 295 nm. MT.F.5 that consist of the highest *P. emblica* ratio exhibits the maximal gallic acid content at 2.42 ± 0.09 and 2.45 ± 0.09 % for extraction 1 and extraction 2, respectively. For herbal plant, *P. emblica* expresses the highest gallic

acid content. Tannins content is determined by albumin precipitation and used spectrophotometer for detection. The MT.F.4 exhibits the maximal tannins content at 83.5 ± 6.9 % tannic acid equivalent for extraction 1 and 85.3 ± 3.4 % tannic acid equivalent for extraction 2, respectively. Whereas the MT.F.3 that presents the highest *T. chebula* and *P. emblica* content shows lower tannins content than MT.F.4. The CEase is inhibited less than 30 % by aqueous extract of Triphala and modified Triphala formulas at concentration of 1.0 mg/ml. The MT.F.2 manifested the highest percent inhibitory values of 21.9 ± 0.5 for extraction 1, whereas the T.F.1 indicates highest value at 20.7 ± 0.2 % for extraction 2, respectively. In conclusion, the aqueous extract of Triphala and modified Triphala formulas is considered as less potent inhibitors for inhibition of CEase. Tannin content and CEase inhibition in formulas has unpredicted and is not related to the ratio of each herbal plant. Meanwhile total phenolic content and gallic acid content are markedly affected the herbal plant weight ratio in formulas. However, to understand the mechanism of triphala on blood cholesterol reduction, the future study is further investigated

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้จะสำเร็จลุล่วงไปไม่ได้หากขาดกำลังใจที่ดีจากครอบครัวของผู้ทำวิจัย นอกจากนี้ยังขอกราบขอบพระคุณครูบาอาจารย์ทุกท่านที่ได้ถ่ายทอดความรู้ และคอยห่วงใยลูกศิษย์คนนี้เสมอมา ขอขอบคุณเพื่อนๆ และพี่ๆทุกคนจากแล็บ Harbin ที่คอยเป็นกำลังใจ ให้คำปรึกษา และที่ขาดไม่ได้คือขอขอบคุณสถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต ที่ได้เล็งเห็นถึงความสำคัญของงานวิจัยพื้นฐาน โดยการให้งบประมาณและกำลังของเจ้าหน้าที่ในการสนับสนุนงานวิจัยในครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

จึงขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

ปฐมาภรณ์ ปฐมภาค

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		ค
กิตติกรรมประกาศ		จ
สารบัญ		ฉ
สารบัญตาราง		ช
สารบัญรูปภาพ		ฌ
บทที่ 1	บทนำ	1
	ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
	วัตถุประสงค์การวิจัย	3
	ขอบเขตของงานวิจัย	3
	กรอบแนวคิดในการวิจัย	4
	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
บทที่ 3	ระเบียบวิธีวิจัย	15
	เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	15
	สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	16
	การวิเคราะห์ข้อมูล	16
	วิธีการวิจัย	17
	การสกัดสมุนไพร	17
	การทดสอบหาปริมาณสารฟีนอลิกรวม	18
	การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรส	18
	การทดสอบหาปริมาณกรดแกลลิกในสารสกัด	19
	การทดสอบหาปริมาณแทนนินในสารสกัด	19
บทที่ 4	ผลการวิจัย	20
	ปริมาณสารฟีนอลิกรวม	20
	การยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรส	21
	ปริมาณกรดแกลลิกในสารสกัด	24
	ปริมาณสารแทนนินในสารสกัด	29

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 5	**อภิปราย สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ**	**31**
	อภิปรายผลการวิจัย	31
	สรุปผลการวิจัย	35
	ข้อเสนอแนะ	36
บรรณานุกรม		**37**
ภาคผนวก		**43**
	ประวัติผู้วิจัย	44

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ชนิดและอัตราส่วนของสมุนไพรที่เป็นส่วนประกอบของตำรับตรีผลา ตรีผลาสูตรดัดแปลง และสมุนไพรเดี่ยว	17
2	ปริมาณสารฟีนอลิกรวมของตำรับตรีผลา ตรีผลาสูตรดัดแปลง และสมุนไพรเดี่ยว	21
3	ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรส ของตำรับตรีผลา ตรีผลาสูตรดัดแปลงและสมุนไพรเดี่ยว ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	22
4	เปอร์เซ็นต์กรดแกลลิกในสารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลา ตรีผลาสูตร-ดัดแปลง และสมุนไพรเดี่ยวทั้งสามชนิด	28
5	ค่าเปอร์เซ็นต์สมมูลของกรดแทนนิกในสารสกัด	30

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่		หน้า
1.	โครงสร้างของคอเลสเตอริล เอสเทอร์ (cholesteryl ester)	6
2.	กระบวนการเกิดคอเลสเตอรอลอิสระจากคอเลสเตอริล เอสเทอเรส	7
3.	โครงสร้างหลักของ condened tannins และ hydralyzable tannins	13
4.	ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรส ของตำรับตรีผลา ตรีผลาสูตรดัดแปลง และสมุนไพรเดี่ยว ความเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากการสกัดครั้งที่ 1	23
5.	ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรส ของตำรับตรีผลา ตรีผลาสูตรดัดแปลง และสมุนไพรเดี่ยว ความเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากการสกัดครั้งที่ 2	24
6.	โครมาโตแกรมแสดงพีกของกรดแกลลิกที่ $R_f = 0.29$ ในสารมาตรฐานกรดแกลลิก สารสกัดชั้นน้ำของมะขามป้อม และสารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลาสูตรดัดแปลง 5	25
7.	overlay spectrum ของกรดแกลลิกที่ความยาวคลื่น 200 – 400 นาโนเมตร	26
8.	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟกับความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 50 – 550 นาโนกรัมต่อแถบ	27
9.	TLC ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก สารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลา ตรีผลาสูตรดัดแปลง และสมุนไพรเดี่ยวจากการสกัดครั้งที่ 1 และการสกัดครั้งที่ 2	28
10.	TLC densitometer-3D ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก สารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลา ตรีผลาสูตรดัดแปลง และสมุนไพรเดี่ยว จากการสกัดครั้งที่ 1 และการสกัดครั้งที่ 2	29

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคไขมันในเลือดสูง (hyperlipidemia) เกิดจากการที่ร่างกายมีปริมาณไตรกลีเซอไรด์ และ/หรือปริมาณคอเลสเตอรอลสูงกว่าระดับปกติ โดยเฉพาะภาวะคอเลสเตอรอลในเลือดสูง (hypercholesterolemia) เป็นปัญหาด้านการแพทย์และสาธารณสุขที่สำคัญอันดับต้นๆ ของประเทศไทย ปัจจุบันสาเหตุหลักในการเกิดโรคคอเลสเตอรอลในเลือดสูง คือ พฤติกรรมการบริโภคของคนไทยที่หันไปบริโภคอาหารจานด่วนแบบแนวตะวันตก อาหารทอด ที่มีส่วนประกอบของไขมันและคอเลสเตอรอลสูง การที่ร่างกายได้รับปริมาณสารอาหารจำพวกไขมันและคอเลสเตอรอลในปริมาณที่สูงเป็นประจำ จะมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจและโรคหลอดเลือดหลายชนิด โดยไขมันและคอเลสเตอรอลที่มีปริมาณมากในกระแสเลือดจะมีการสะสมบริเวณผนังหลอดเลือดแดง เมื่อเวลาผ่านไปทำให้เกิดการสะสมของไขมันที่ผนังหลอดเลือดแดงเพิ่มขึ้น และเกิดการตีบตันของหลอดเลือดแดง ร่างกายจึงไม่สามารถส่งเลือดไปเลี้ยงอวัยวะที่มีการตีบตันของหลอดเลือดได้ ทำให้อวัยวะดังกล่าวทำงานผิดปกติ ซึ่งอาจเป็นอันตรายถึงชีวิต ดังนั้นการลดปริมาณไขมันในเลือด โดยการปรับเปลี่ยนพฤติกรรมการบริโภค จัดเป็นการป้องกันและลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคได้หลายชนิด

อย่างไรก็ตามสำหรับผู้ป่วยที่มีอาการของโรคไขมันในเลือดสูง นอกจากการลดไขมันในเลือดโดยการควบคุมการบริโภคอาหารแล้ว การรับประทานยาที่มีฤทธิ์ลดการดูดซึมและการสะสมไขมันและคอเลสเตอรอล ก็จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาให้ดียิ่งขึ้น ยาแผนปัจจุบันที่นำมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคไขมันในเลือดสูงหลายชนิด มีกลไกในการออกฤทธิ์ผ่านการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ การย่อย หรือการดูดซึมไขมันและคอเลสเตอรอล ตัวอย่างเช่น ยา orlistat ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แพนครีเอติกไลเปส (pancreatic lipase) ซึ่งทำหน้าที่ในการสลายพันธะเอสเทอร์ของไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) เพื่อให้ได้มอนอกลีเซอไรด์ (monoglyceride) และกรดไขมันอิสระ (free fatty acid) ที่ร่างกายสามารถดูดซึมได้ หรือยา simvastatin ที่เป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขันของเอนไซม์เอชเอ็มจีโคเอ รีดักเทส (HMG CoA reductase) ที่ทำหน้าที่ในการเปลี่ยนเอชเอ็มจีโคเอ (HMG CoA) ไปเป็นเมวาโลเนท (mevalonate) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลในร่างกาย ดังนั้นหากเอนไซม์ดังกล่าวถูกยับยั้งร่างกายจะลดการดูดซึมไขมันเข้าสู่กระแสเลือด และลดการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลที่ตับลง มีผลทำให้ปริมาณไขมันและคอเลสเตอรอลในกระแสเลือดลดต่ำลง นอกจากเอนไซม์แพนครีเอติกไลเปสและเอสเอ็มจีโคเอ รีดักเทสแล้ว ในกระบวนการเมตาบอลิซึมของไขมันและคอเลสเตอรอลยังมีเอนไซม์หลายชนิดที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกัน โดยพบว่าเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรส (pancreatic cholesterol esterase) ที่มีหน้าที่ในการสลายพันธะเอสเทอร์ของ

คอเลสเตอรอล เอสเทอร์ (cholesterol ester) ให้ได้คอเลสเตอรอลอิสระ (free cholesterol) ที่ร่างกายสามารถดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดได้ เป็นเอนไซม์อีกชนิดที่มีความน่าสนใจเนื่องจากมีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์แสดงให้เห็นว่า ปริมาณของ LDL-cholesterol (low density lipoprotein-cholesterol) ที่มีหน้าที่ในการขนส่งคอเลสเตอรอลจากตับผ่านผนังหลอดเลือด ไปยังอวัยวะต่างๆ และปริมาณของ HDL-cholesterol (high density lipoprotein-cholesterol) ที่มีหน้าที่ในการขนส่งคอเลสเตอรอลจากส่วนต่างๆ ของร่างกายไปเก็บสะสมไว้ที่ตับ ก่อนที่จะมีการกำจัดคอเลสเตอรอลส่วนเกินออกจากร่างกาย มีผลต่อการเกิดโรคไขมันในเลือดสูงมากกว่าปริมาณของไตรกลีเซอไรด์ จะเห็นได้ว่าเมตาบอลิซึมของคอเลสเตอรอลเป็นปัจจัยสำคัญต่อการเพิ่มความเสี่ยงของการเกิดโรคไขมันในเลือดสูง ดังนั้นหากสามารถยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรส ที่มีหน้าที่หลักในการเพิ่มปริมาณคอเลสเตอรอลอิสระในร่างกายได้ ปริมาณคอเลสเตอรอลที่จะดูดซึมและขนส่งเข้าสู่กระแสเลือดก็จะลดลง อย่างไรก็ตามยาทั้งสองชนิดที่กล่าวมาก็ยังพบอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยา เช่น ยา orlistat ทำให้เกิดอาการมวนท้อง อยากถ่ายอุจจาระบ่อยและควบคุมการถ่ายอุจจาระลำบาก และถ้าใช้ติดต่อกันเป็นเวลานานจะส่งผลต่อการขาดวิตามินบางชนิด ส่วนยา simvastatin มีผลข้างเคียงทำให้คลื่นไส้อาเจียน ปวดศีรษะ มีอาการท้องผูก หากรุนแรงจะทำให้กล้ามเนื้อเกิดการสลายตัว หรือถึงขั้นมีอาการตับอักเสบด้วยผลของอาการข้างเคียงที่อาจเพิ่มรุนแรงขึ้น เมื่อใช้ยาติดต่อกันเป็นเวลานาน ปัจจุบันผู้ป่วยจำนวนมากจึงหันมาใช้ตำรับยาสมุนไพรในการรักษาอาการเจ็บป่วยเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากผู้ป่วยมีความเชื่อว่า ตำรับยาสมุนไพรที่ใช้ในการรักษาโรคตั้งแต่สมัยโบราณสามารถใช้รักษาได้จริง และยังมีการใช้กันอย่างต่อเนื่องจนถึงปัจจุบัน ที่สำคัญตำรับยาสมุนไพรเกิดจากการนำเอาส่วนผสมจากธรรมชาติมารวมกัน ดังนั้นน่าจะมีผลข้างเคียงน้อย หรืออาจไม่พบเลย ด้วยเหตุนี้การศึกษาเกี่ยวกับตำรับยาสมุนไพรจึงเป็นที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง

ตรีผลา เป็นตำรับยาสมุนไพรของไทยที่เป็นที่รู้จักกันมาตั้งแต่สมัยโบราณ และมีการใช้กันอย่างแพร่หลายในการแพทย์อายุรเวทของอินเดีย ปัจจุบันได้มีการผลิตตำรับยาสมุนไพรตรีผลาออกมาจำหน่ายตามท้องตลาดอย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีความเชื่อว่าตรีผลาเป็นตำรับสมุนไพรที่มีสรรพคุณทางยาหลายประการ ทั้งช่วยควบคุมและขับสารพิษออกจากร่างกาย ปรับสมดุลของธาตุ ช่วยกระตุ้นระบบไหลเวียนเลือด ควบคุมระดับความดัน และลดระดับน้ำตาลในเลือด ด้วยสรรพคุณทางยาที่ครอบคลุมการรักษาโรคได้หลายชนิด ตรีผลาจึงเป็นตำรับยาสมุนไพรที่ได้รับความสนใจนำมาใช้ในการรักษาโรคเป็นอย่างมาก นอกจากสรรพคุณที่กล่าวมาข้างต้นยังพบว่า ตรีผลายังมีฤทธิ์ในการลดไขมันในเลือด โดยมีงานวิจัยบางฉบับพบว่า ตรีผลามีผลต่อปริมาณ HDL-cholesterol และ LDL-cholesterol ในเลือดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่อย่างไรก็ตามกลไกของตรีผลาที่มีผลต่อการลดลงของปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือดยังไม่แน่ชัด จึงเป็นที่มาของการวิจัยในครั้งนี้ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลา และตรีผลาสูตรดัดแปลงต่อการยับยั้งการทำงานของ

เอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรส ศึกษาผลของอัตราส่วนของสมุนไพรที่เป็นส่วนประกอบของตำรับตรีผลา และตรีผลาสูตรดัดแปลงต่อฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรส และหาปริมาณสารฟีนอลิกรวม กรดแกลลิก และสารแทนนิน ในสารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลา ตรีผลาสูตรดัดแปลงและสมุนไพรเดี่ยว พร้อมทั้งศึกษาแนวโน้มความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารฟีนอลิกรวม กรดแกลลิก และสารแทนนิน ต่อฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรส ทั้งนี้เพื่อให้ทราบกลไกในการออกฤทธิ์ของยาสมุนไพรตำรับตรีผลาต่อการลดปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือดที่ชัดเจนขึ้น รวมทั้งใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนสรรพคุณของตำรับยาสมุนไพรไทยให้เป็นที่น่าเชื่อถือ และเพื่อเป็นการส่งเสริมการใช้สมุนไพรไทยในการรักษาโรคให้แพร่หลายมากยิ่งขึ้น

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลา ตรีผลาสูตรดัดแปลงและสมุนไพรเดี่ยวต่อการยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรส
2. เพื่อศึกษาผลของอัตราส่วนของสมุนไพรที่เป็นส่วนประกอบของตำรับตรีผลา และตรีผลาสูตรดัดแปลงต่อฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรส
3. เพื่อหาปริมาณสารฟีนอลิกรวม กรดแกลลิก และสารแทนนิน ในสารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลา ตรีผลาสูตรดัดแปลงและสมุนไพรเดี่ยว พร้อมทั้งศึกษาแนวโน้มความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารฟีนอลิกรวมกรดแกลลิก และสารแทนนิน ต่อฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรส

ขอบเขตของงานวิจัย

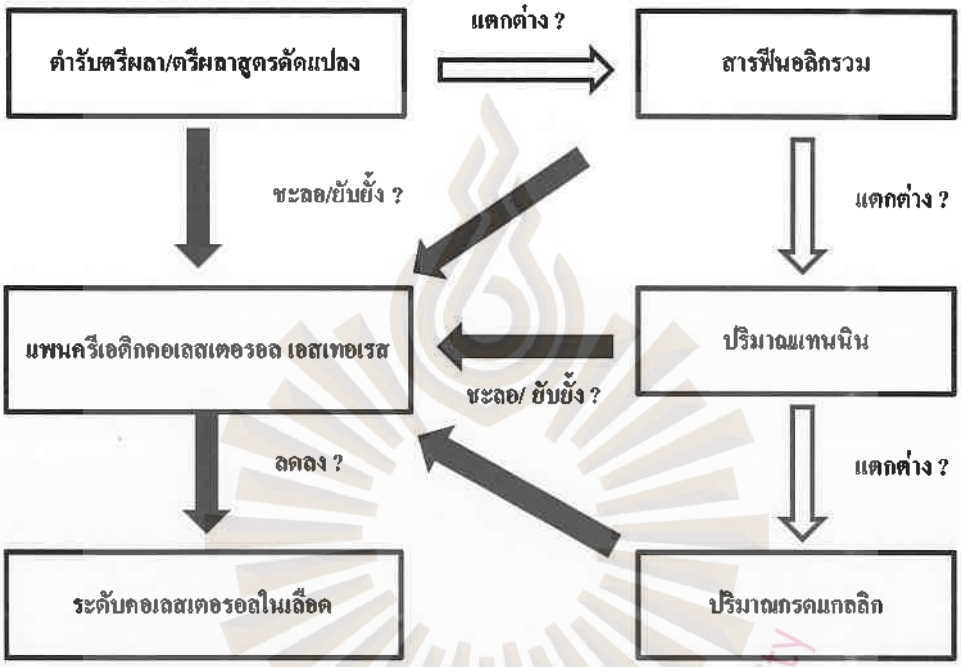
ด้านเนื้อหา: ศึกษาผลของสารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลา ตรีผลาสูตรดัดแปลงอัตราส่วนของสมุนไพรเดี่ยว ต่อการยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรส เปรียบเทียบปริมาณสารฟีนอลิกรวม กรดแกลลิก และสารแทนนิน ในสารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลา ตรีผลาสูตรดัดแปลงและสมุนไพรเดี่ยว รวมทั้งศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างผลของปริมาณสารฟีนอลิกรวม กรดแกลลิก และสารแทนนิน ต่อฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรส

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง: การศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้สกัดสารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลา ตรีผลาสูตรดัดแปลงและสมุนไพรเดี่ยว จำนวน 2 ชุด คือ การสกัดครั้งที่ 1 และการสกัดครั้งที่ 2 ทั้งนี้เพื่อเป็นการยืนยันผลที่ได้จากการสกัดทั้ง 2 ครั้งว่ามีความสอดคล้องกันหรือไม่ และในทุกการทดลองแต่ละตัวอย่างจะมีการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ระยะเวลาที่ดำเนินการวิจัย: การทดลองครั้งนี้เริ่มตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม 2558 ถึง 31 ธันวาคม 2558 รวมเป็นระยะเวลาทั้งสิ้น 1 ปี

กรอบแนวคิดในการวิจัย



ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบผลของสารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลา ตรีผลาสูตรดัดแปลงและสมุนไพรเดี่ยว ต่อการทำงานของเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรส

2. ทราบว่าอัตราส่วนของสมุนไพรที่เป็นส่วนประกอบของตำรับตรีผลา และตรีผลาสูตรดัดแปลงมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรสหรือไม่

3. ทราบว่าปริมาณสารฟีนอลิกรวม กรดแกลลิก และสารแทนนิน ในสารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลา ตรีผลาสูตรดัดแปลงและสมุนไพรเดี่ยว มีผลต่อฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรสหรือไม่

4. เป็นข้อมูลที่ช่วยในการตัดสินใจของผู้บริโภคว่าควรเลือกตำรับตรีผลาในการรักษาโรคไขมันในเลือดสูงที่มีสาเหตุจากปริมาณคอเลสเตอรอลสูงหรือไม่

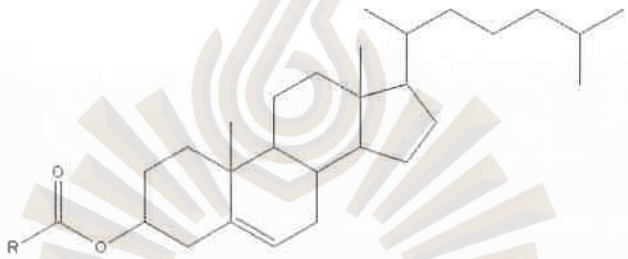
5. เป็นข้อมูลที่ใช้สนับสนุนประโยชน์ของสมุนไพรไทย และเป็นการเพิ่มความน่าเชื่อถือในการใช้สมุนไพรในการรักษาโรค

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ภาวะระดับไขมันในเลือดสูง (hyperlipidemia) เป็นภาวะที่ร่างกายมีระดับไขมันในเลือดที่สูงกว่าปกติ ซึ่งความผิดปกติของไขมันในเลือดมีหลายรูปแบบ เช่น ระดับคอเลสเตอรอลรวมสูง (high total cholesterol), ระดับไตรกลีเซอไรด์สูง (high total triglyceride), LDL-cholesterol สูง หรือ HDL-cholesterol ต่ำ ภาวะต่างๆ เหล่านี้เป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญของการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด อันได้แก่ โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคหลอดเลือดสมอง และโรคหลอดเลือดแดงส่วนปลายตีบ การเกิดภาวะไขมันในเลือดสูงเกิดจากหลายสาเหตุ ได้แก่ โรคหรือภาวะทางร่างกาย เช่น โรคอ้วน โรคเบาหวาน การตั้งครรภ์ การบริโภคยาบางชนิด เช่น ยาที่มีส่วนประกอบของฮอร์โมนเอสโตรเจน หรือแม้แต่การบริโภคอาหารที่มีคอเลสเตอรอลและกรดไขมันอิ่มตัวสูง ก็เป็นการเพิ่มอัตราเสี่ยงในการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด นอกจากปัจจัยดังกล่าวก็ยังมีปัจจัยภายในร่างกายที่มีผลต่อการเกิดภาวะไขมันในเลือดสูง เช่น ความผิดปกติจากทางพันธุกรรม ความผิดปกติของกระบวนการเมตาบอลิซึมของคอเลสเตอรอลและไขมันในร่างกาย กล่าวคือ เมื่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของคอเลสเตอรอลและไขมันในร่างกายเกิดขึ้นได้สมบูรณ์ เอนไซม์และสารที่เกี่ยวข้องกับการสลายคอเลสเตอรอลและไขมันไม่ถูกยับยั้ง ก็จะช่วยให้การดูดซึมคอเลสเตอรอลและไขมันเกิดขึ้นได้ดี และในทางตรงกันข้ามหากการทำงานของกระบวนการเมตาบอลิซึมไม่สมบูรณ์ก็จะทำให้การสลายและดูดซึมคอเลสเตอรอลและไขมันลดลงเช่นกัน ดังนั้นหากต้องการลดปริมาณคอเลสเตอรอลและไขมันในกระแสเลือด การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมของคอเลสเตอรอลและไขมัน ก็อาจควบคุมให้ปริมาณคอเลสเตอรอลและไขมันในร่างกายอยู่ในระดับที่ต่ำลงได้ จากการวิจัยพบว่าปริมาณ LDL-cholesteol ที่สูงจะมีผลเพิ่มอัตราเสี่ยงในการเกิดโรคมากกว่าเมื่อเทียบกับปริมาณไขมันชนิดอื่น (Elahi *et al.*, 2009) จากข้อมูลดังกล่าวพบว่าการควบคุมการสลายและดูดซึมของคอเลสเตอรอลในร่างกาย โดยการยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง อาจจะสามารถลดอัตราเสี่ยงในการเกิดโรคต่างๆ ซึ่งมีสาเหตุมาจากภาวะระดับไขมันในเลือดสูงได้

คอเลสเตอรอล (cholesterol) เป็นไขมันที่มีลักษณะคล้ายขี้ผึ้ง (wax) ประกอบด้วยโครงสร้างหลัก คือ steroid nucleus คอเลสเตอรอลเป็นส่วนประกอบของไขมันที่จำเป็นในร่างกาย คอเลสเตอรอลทำหน้าที่เป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ และเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารจำเป็นต่างๆ เช่น การสร้างวิตามินดี เกลือน้ำดี (bile salts) และฮอร์โมน เช่น เทสโทสเทอโรน (testosterone) เอสโตรเจน (estrogen) คอร์ติซอล (cortisol) ที่ช่วยให้การทำงานของเซลล์ต่างๆ เป็นไปอย่างปกติ โดยปกติร่างกายของมนุษย์สามารถผลิตคอเลสเตอรอลขึ้นได้เอง แต่เราก็สามารถรับคอเลสเตอรอลเพิ่มได้จากการรับประทานอาหาร คอเลสเตอรอลจากอาหารที่เข้าสู่ร่างกายมักอยู่ในรูปของคอเลสเตอริล เอสเทอร์

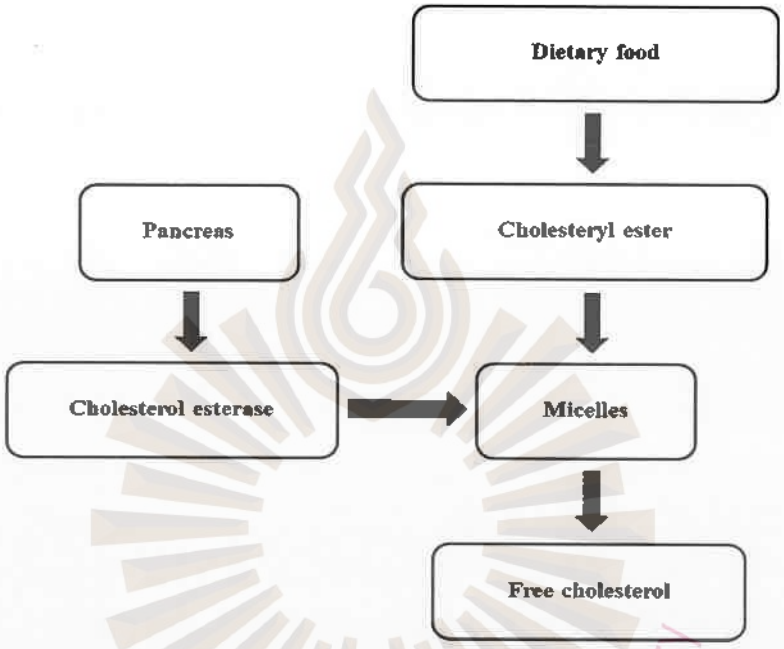
(cholesteryl ester) ซึ่งคอเลสเตอริล เอสเทอร์จะรวมตัวกับกรดไขมันอิสระ โมโนกลีเซอรอล ฟอสฟอลิปิดและเกลือน้ำดีกลายเป็นไมเซลล์ (Gershkovich *et al.*, 2012) ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างของคอเลสเตอริล เอสเทอร์ที่จะถูกย่อยโดยเอนไซม์คอเลสเตอรอล เอสเทอเรส (pancreatic cholesterol esterase) ที่สังเคราะห์จาก acinar cells ของตับอ่อน และเก็บไว้ใน zymogen granules ก่อนที่จะถูกหลั่งออกมาเป็นส่วนประกอบของ pancreatic juice ในลำไส้เล็ก เพื่อเร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะเอสเทอร์ของคอเลสเตอริล เอสเทอร์ ที่อยู่ในไมเซลล์จนได้คอเลสเตอรอลอิสระ (free cholesterol) ก่อนที่จะเคลื่อนที่ไปยังเซลล์มิวโคซา (intestinal mucosal cell) ที่เรียงอยู่บริเวณผิวหน้าของไมโครวิลไลในลำไส้เล็ก และแตกตัวออกเพื่อปลดปล่อยคอเลสเตอรอลอิสระออกมา (ภาพที่ 2) (Lopez-Candales *et al.*, 1993)



ภาพที่ 1 โครงสร้างของคอเลสเตอริล เอสเทอร์ (cholesteryl ester); R คือ หมู่อัลคิล (alkyl group)

คอเลสเตอรอลอิสระที่ถูกดูดซึมเข้าสู่เซลล์ของลำไส้เล็ก จะไปรวมตัวกับไตรเอซิลกลีเซอรอล ฟอสฟอลิปิด และโปรตีนที่จำเพาะ (apolipoproteins) ได้เป็นไลโปโปรตีน ก่อนส่งเข้าสู่กระแสเลือดและลำเลียงไปยังเซลล์ต่างๆในร่างกาย ซึ่งกระบวนการขนส่งคอเลสเตอรอลด้วยไลโปโปรตีนทำให้สามารถแบ่งชนิดของคอเลสเตอรอลได้เป็น 3 ชนิดตามความหนาแน่น เมื่อคอเลสเตอรอลจับตัวกับไลโปโปรตีน คือ HDL-cholesterol, LDL-cholesterol และ VLDL-cholesterolโดยไลโปโปรตีนเป็นอนุภาคที่ประกอบด้วยสองส่วนคือ ส่วนตรงกลางที่ไม่ชอบน้ำ ได้แก่ คอเลสเตอรอล หรือไตรกลีเซอไรด์ และส่วนด้านนอกที่ชอบน้ำประกอบด้วย ฟอสโฟลิปิด และโปรตีน ในส่วนของ LDL-cholesterol ประกอบด้วยคอเลสเตอรอลในปริมาณที่สูง (คอเลสเตอรอล 60 %, ไตรกลีเซอไรด์ 5 % และโปรตีน 35 %) จึงจัดได้ว่าเป็นไขมันที่ไม่ดี ส่วน HDL-cholesterol ประกอบด้วยโปรตีนและฟอสโฟลิปิดเป็นส่วนใหญ่ มีคอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในปริมาณน้อยมาก (ฟอสโฟลิปิด 25 %, คอเลสเตอรอล 20 %, ไตรกลีเซอไรด์ 5 % และโปรตีน 50 %) จึงจัดได้ว่าเป็นไขมันที่ดี ซึ่งไลโปโปรตีนแต่ละชนิดจะมีหน้าที่ลำเลียงคอเลสเตอรอลไปยังตำแหน่งที่แตกต่างกัน จะเห็นว่ากระบวนการย่อยและดูดซึมของคอเลสเตอรอล มีเอนไซม์ตัวหลัก คือ แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรส ที่นอกจากจะช่วยในการ

ดูดซึมคอเลสเตอรอลแล้ว ยังเพิ่มการขนส่งคอเลสเตอรอลอิสระไปยัง enterocyte มากขึ้น (Myers-Payne *et al.*,1995) ดังนั้นการศึกษาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว อาจมีผลลดการย่อยและการดูดซึมของคอเลสเตอรอล รวมทั้งเพิ่มแนวโน้มให้สามารถควบคุมระดับไขมันและคอเลสเตอรอลในกระแสเลือดได้



ภาพที่ 2 กระบวนการเกิดคอเลสเตอรอลอิสระจากคอเลสเตอริล เอสเทอเรส โดยผ่านการเร่งปฏิกิริยาจากเอนไซม์คอเลสเตอรอล เอสเทอเรสที่ถูกสร้างจากตับอ่อน

เอนไซม์คอเลสเตอรอล เอสเทอเรส (CEase, EC 3.1.1.13) มีชื่อพ้องคือ bile salt activated lipase, carboxyl ester lipase, pancreatic lysophospholipase (Tanaka *et al*, 1999) เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม serine hydrolase (bile salt-dependent hydrolysis) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะเอสเทอร์ของสเตียรอลเอสเทอร์ (sterol ester) พบครั้งแรกในตับอ่อน โดยเอนไซม์คอเลสเตอรอล เอสเทอเรส มีหน้าที่หลักในการเพิ่มคอเลสเตอรอลอิสระ กระตุ้นการเกิดไมเซลล์ (micelles) และการขนส่งคอเลสเตอรอลอิสระเข้าสู่เซลล์ และจากการศึกษาผลของ 6-chloro-3-(1-ethyl-2-cyclohexyl)-2-pyrone ต่อเอนไซม์คอเลสเตอรอล เอสเทอเรสในหนูแฮมเตอร์พบว่า สารดังกล่าวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอเลสเตอรอล เอสเทอเรสได้ โดยมีผลทำให้การดูดซึมคอเลสเตอรอลลดลง (Heidrich *et al*., 2004) ซึ่ง

จากการศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์คอเลสเตอรอล เอสเทอเรสกับยาที่รักษาโรคระบบหัวใจ และหลอดเลือด เช่น simvastatin และ lovastatin ที่มีการรายงานว่าเป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขันของเอนไซม์ HMG-CoA reductase พบว่ายาดังกล่าวสามารถยับยั้งเอนไซม์คอเลสเตอรอล เอสเทอเรสได้เช่นกัน โดยมีรูปแบบการยับยั้งแบบ reversible mixed-type inhibitor (Chiou *et al.*, 2006) นอกจากนี้ปัจจุบันได้มีการศึกษาสารจากธรรมชาติที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มากขึ้น เนื่องจากเชื่อว่ามีผลข้างเคียงน้อยกว่ายาแผนปัจจุบัน โดยมีการรายงานการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรสจากการใช้สารจากธรรมชาติในกลุ่มของฟีนอลิก เช่น สาร 3-alkoxy-4-chloroisocoumarin สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้แบบไม่ผันกลับ (irreversible inhibitor) (Heynekamp *et al.*, 2008) และสารฟีนอลิกพวก gallic acid, catechin และ epicatechin ที่ได้จากสารสกัดเมล็ดองุ่นมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์คอเลสเตอรอล เอสเทอเรส โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 27.27 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิด micelle ของคอเลสเตอรอล (Adisakwattana *et al.*, 2010; Adisakwattana *et al.*, 2011) แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการใช้สารดังกล่าวในการรักษาโรคไขมันในเลือดสูงอย่างจริงจัง ดังนั้นหากมีการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรสจากพืชหรือสมุนไพรที่มีการใช้เป็นยาในการรักษาโรคอยู่แล้ว ก็น่าจะเป็นการเพิ่มข้อมูลที่ช่วยอธิบายถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสมุนไพรดังกล่าว รวมทั้งเป็นการส่งเสริมให้มีการใช้สมุนไพรและเพิ่มความน่าเชื่อถือในการใช้สมุนไพรในการรักษาโรคให้แพร่หลายมากยิ่งขึ้น

ตำรับตรีผลา เป็นตำรับยาสมุนไพรที่เป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นตำรับยาสมุนไพรของไทยและอายุรเวทศาสตร์ของอินเดียที่มีมาแต่โบราณและได้รับการยอมรับว่าสามารถใช้ในการรักษาอาการป่วยของโรคหลายชนิด ตั้งแต่บรรเทาอาการไอ แก้ไข้ ไปจนถึงช่วยกระตุ้นระบบไหลเวียนเลือด ควบคุมระดับความดัน ลดระดับน้ำตาลและไขมันในเลือด ตำรับตรีผลาประกอบด้วยผลของสมุนไพร 3 ชนิด คือ สมอไทย สมอพิเภก และมะขามป้อม ในอัตราส่วนของสมุนไพรแต่ละชนิดเป็น 1:1:1 อย่างไรก็ตามอัตราส่วนของสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดสามารถแปรผันได้ตามรายละเอียดของโรค เช่น อาการป่วยด้วยธาตุไฟในฤดูร้อนจะใช้อัตราส่วนของสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดเป็น 8:12:4 อาการป่วยด้วยโรคธาตุน้ำในฤดูร้อนใช้อัตราส่วนของสมุนไพรคือ 4:8:12 เป็นต้น (ปราณี ชวลิตธำรง และคณะ, 2539) แพทย์แผนไทยนิยมใช้ตำรับตรีผลาปรับสมดุลของธาตุ (balance) และกำจัดสารพิษ (detoxification) ในร่างกาย แต่บัญชียาหลักแห่งชาติในส่วนของบัญชียาจากสมุนไพร ปี พ.ศ. 2556 ได้ระบุข้อบ่งใช้ของตำรับตรีผลาไว้ว่าใช้ในการบรรเทาอาการไอ ขับเสมหะเท่านั้น โดยชนิดผงให้ชงรับประทานครั้งละ 1 - 2 กรัม ในน้ำร้อนประมาณ 120 - 200 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 3 - 5 นาที ดื่มเมื่อมีอาการ

ไอ ทุก 4 ชั่วโมง ส่วนชนิดเม็ด ลูกกลอน และแคปซูล รับประทานครั้งละ 300-600 มิลลิกรัม วันละ 3 - 4 ครั้ง ทางด้านอายุรเวทศาสตร์ของอินเดียใช้ตำรับตรีผลาบำบัดอาการของโรคเกี่ยวกับหัวใจและหลอดเลือด (cardioprotective) รวมทั้งใช้ในการชะลอวัย (rejuvenation) (Puri, 2003) นอกจากความรู้ทางการแพทย์ที่ได้ถ่ายทอดถึงสรรพคุณของตำรับตรีผลากันมาเป็นเวลานานแล้ว ยังมีผลการวิจัยจำนวนมากสนับสนุนสรรพคุณทางยาของตำรับตรีผลา พบว่าสมุนไพรในตำรับตรีผลาที่มีสารประกอบฟีนอล/พอลีฟีนอลอยู่ในปริมาณสูง มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่ดีมาก เมื่อนำมาทดสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, hydroxyl radicals, superoxide radicals, $ABTS^{\cdot-}$ (Naik *et al.*, 2005; Naik *et al.*, 2006) มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง โดยพบว่าสารสกัดชั้นอะซีโตนของตรีผลา ที่มีสาร gallic acid ปรากฏอยู่ในปริมาณมาก สามารถยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็งชนิด breast cancer cells และ prostate cancer cells (Kaur *et al.*, 2005) มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) และเป็น neuroprotective reagent โดยสารสกัดของสมุนไพรที่เป็นส่วนประกอบของตำรับตรีผลา สามารถป้องกันการถูกทำลายของ neuroblastoma จากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และยับยั้งเอนไซม์ COX-1 และ COX-2 ซึ่งมีผลให้ลดการสร้างสาร prostaglandin E_2 ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ (Shukla *et al.*, 2012) มีฤทธิ์ในการลดไขมันในเลือด โดยพบว่าหนูที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะไขมันในเลือดสูง เมื่อได้รับสารสกัดตรีผลาที่ 1 กรัมต่อกิโลกรัม ของน้ำหนักตัว เป็นเวลา 48 วัน จะมีปริมาณไตรกลีเซอไรด์, LDL-cholesterol และ VLDL-cholesterol ลดลง 2 - 4 เท่า และมีปริมาณ HDL-cholesterol เพิ่มเป็น 2 เท่า (Saravanan *et al.*, 2007) และยังพบว่าสารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลามีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase แต่มีฤทธิ์การยับยั้งที่น้อยมากเมื่อเทียบกับสมุนไพรเดี่ยว (มะขามป้อม) ซึ่งมะขามป้อมสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase ได้ดีกว่าตำรับตรีผลาถึง 35 เท่า และมีค่าการยับยั้งใกล้เคียงกับ pravastatin ที่เป็นตัวควบคุมบวก (สุภวรรณ จันทบูรณ์ และคณะ, 2557)

สมอไทย มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Terminalia chebula* Retz. เป็นพืชในวงศ์ Combretaceae ผลของสมอไทยจะมีรสเปรี้ยว ขม ฝาด แทรกด้วยเค็ม มีสรรพคุณทางยาตามตำราแผนโบราณ คือ ใช้เป็นยาขับเสมหะ แก้ไอ แก้บิด แก้ไข้ ลดการกระหายน้ำ บำรุงน้ำดี สมานแผลในกระเพาะอาหาร และยังช่วยบำรุงให้ผิวพรรณเปล่งปลั่ง (ปารัณกุล ตั้งสุขฤทัย, 2552) จากการศึกษาทางเคมีพบว่าผลของสมอไทยประกอบไปด้วยสารฟีนอลิกจำพวก hydrolysable tannin ที่สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่มย่อย คือ phenolcarboxylic acids, gallotannins, ellagitannins และสารตัวอื่นๆ เช่น chebulic acid, neochebulinic acid (Juang *et al.*, 2004)

โดยพบว่าสารประกอบฟีนอลิกและแทนนินในสารสกัดชั้นน้ำของสมอไทยให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี เมื่อทดสอบด้วยวิธี Luminol-H_2O_2 System และ $CuSO_4$-Phen-Vc-H_2O_2 System เนื่องจากพบว่าให้ค่าการต้านอนุมูลอิสระ (IC_{50}) ใกล้เคียงกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานอย่างวิตามินซี และ trolox (Chang & Lin, 2012) นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของผลสมอไทยอีกหลายด้าน

เช่น ฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus epidermidis* (Kannan *et al*, 2009) ฤทธิ์ในการต้านการเติบโตของไมซีเลียม (mycelium) ของเชื้อ *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Phytophthora capsici* และ *Botrytis cinerea* (Vivek *et al*, 2010) ฤทธิ์การต้านเชื้อไวรัส โดยคาดว่าสาร tannic acid ในสารสกัดชั้นอะซิโตนของสมอไทยสามารถยับยั้งการติดเชื้อ swine influenza A virus ได้ (Hongbo *et al*., 2010) และพบว่าสารสกัดชั้นเอทานอลของสมอไทยช่วยป้องกันการเกิดการทำลายกล้ามเนื้อหัวใจ (myocardial damage) และลดการยับยั้งเอนไซม์ lysosomal enzymes ที่ได้จากเนื้อเยื่อหัวใจของหนู ที่ถูกชักนำด้วย isoproterenol ทำให้ลดความเสี่ยงต่อโรคที่มีสาเหตุจากการเกิดการอักเสบ และลดการทำลายเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Suchalatha & Devi, 2005) นอกจากนี้สารสกัดชั้นคลอโรฟอร์มของสมอไทยยังมีฤทธิ์ antidiabetic และ renoprotective effect โดยหนูที่ได้รับสารสกัดของสมอไทยหลังการชักนำให้เกิดโรคเบาหวานจะมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสในเลือดลดลงทันทีอย่างมีนัยสำคัญ และหากได้รับสารสกัดต่อเนื่องเป็นเวลา 8 สัปดาห์พบว่ามีผลป้องกันการเกิดอันตรายต่อไต (renoprotective) โดยการลดการขับ protein, albumin และ creatinine ออกทางปัสสาวะ (Rao & Nammi, 2006) ฤทธิ์ในการลดไขมันในเลือด โดยพบว่าหนูที่ได้รับสารสกัดสมอไทย พร้อมกับอาหาร atherogenic diet มีปริมาณ total cholesterol, triglyceride ในเลือดลดลง เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัดสมอไทย และมีปริมาณ HDL-cholesterol เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (Maruthappan & Sakthi, 2010)

สมอพิเภก มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Terminalia bellirica* (Gaertn.) Roxb.เป็นพืชในวงศ์ Combretaceae ผลของสมอพิเภกมีรสเปรี้ยวฝาดอมหวาน มีสรรพคุณตามตำรับยาแผนโบราณ คือ ผลดิบใช้เป็นยาระบาย ผลสุกใช้เป็นยาสมาน แก้โรคริดสีดวงทวาร ผลแห้งใช้แก้ไข้ ขับเสมหะ (สมาคม ร.ร. แพทย์แผนโบราณ สำนักวัดพระเชตุพนฯ พระนคร, 2516) การศึกษาทางเคมีพบว่าลูกสมอพิเภกประกอบไปด้วยสาร β-sitosterol, gallic acid, ellagic acid, ethyl gallate, chebulagic acid, saponins, lipid, cardiac glycoside สารพวกคาร์โบไฮเดรตอีกหลายชนิด (Awasthi & Nath, 1968; Row & Murty, 1970; Nandy *et al*., 1989)

โดยมีรายงานเกี่ยวกับกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของผลสมอพิเภก เช่น ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือด พบว่าหนูที่ถูกชักนำด้วยสาร alloxan ซึ่งทำให้เกิดภาวะ oxidative stress และมีระดับน้ำตาลในเลือดสูง เมื่อได้รับสารสกัด 75 % เอทานอลของผลสมอพิเภก จะช่วยลดการชักนำการเกิด alloxan-induced hyperglycemia ถึง 54 % และลดระดับสาร glutathione ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่ถูกผลิตเพิ่มขึ้นจากการชักนำด้วย alloxan รวมทั้งช่วยเพิ่มระดับเอนไซม์ superoxide dismutase และเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ catalase ในเลือดและตับ (Sabu & Ramadasan, 2009) และพบว่าสาร epigallocatechin gallate ซึ่งพบในสารสกัดชั้นคลอโรฟอร์ม-เอทิลอะซิเตต ของผลสมอพิเภกมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *E.coli*, *B. subtilis* และ *S. aureus* และยังสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

glucoamylase ได้ถึง 42 % เมื่อใช้สารตัวอย่างที่ปริมาณเพียง 2 ไมโครกรัม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดของผลสมอพิเภกมีคุณสมบัติเป็น hypoglycemic agent ที่ดี (Meshram *et al.*, 2011) ฤทธิ์ลดความดันเลือดในหลอดเลือดแดง โดยสารสกัดจากสมอพิเภกมีฤทธิ์ยับยั้งแรงและอัตราการบีบตัวของหลอดเลือดแดงในหนูที่ถูกชักนำด้วย phenylephrine และ K^+ ผ่านกลไกของ Ca^{++} antagonist (Arif-Ullah & Anwarl, 2008) ฤทธิ์ในการลดการหลั่งของเหลวในลำไส้ของหนูทดลอง ซึ่งมีผลต่อการลดการเกิดท้องร่วง (antidiarrheal) และลดอาการปวดของหนูที่ถูกชักนำด้วยกรดอะซิติก (Arif-Ullah & Anwarl, 2010) ฤทธิ์ในการลดไขมันในเลือด พบว่าหนูที่ถูกชักให้เกิดโรคเบาหวาน เมื่อได้รับสารสกัดจากผลสมอพิเภก พบว่า นอกจากระดับน้ำตาลในเลือดลดลงแล้ว ระดับของ total cholesterol, triglyceride, LDL-cholesterol ก็ลดลง โดยที่ระดับ HDL-cholesterol เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (Latha & Daisy, 2010) ฤทธิ์ลดความเป็นพิษต่อเซลล์ C2C12 cell line (cytotoxicity) ที่ได้รับการกระตุ้นจาก H_2O_2 โดยลดความเป็นพิษต่อเซลล์ถึง 60 % (Nampoothiri *et al.*, 2011)

มะขามป้อม มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Phyllanthus emblica* L. เป็นพืชในวงศ์ Euphorbiaceae ผลของมะขามป้อมมีรสเปรี้ยว ฝาดขม มีสรรพคุณตามตำรับยาแผนโบราณ คือ แก้ไข ขับเสมหะ ทำให้ชุ่มคอ น้ำคั้นจากผลใช้รับประทานแก้อาการท้องเสีย ช่วยขับปัสสาวะ การศึกษาทางเคมีพบว่าลูกมะขามป้อมประกอบไปด้วยสาร alkaloids, amino acids, carbohydrates, chebulagic acid, chebulinic acid, ellagic acid, ellagitannin, emblicanin-A,-B, flavonoid, gallic acid, phenolic compounds, quercetin, tannin, vitamin C (Khan, 2009)

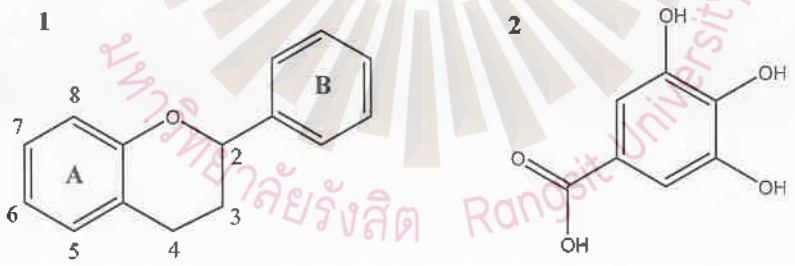
ซึ่งจากการศึกษาพบว่าผลของมะขามป้อมมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายชนิด เช่น สารฟีนอลิกที่ได้จากสารสกัดในเมทานอลของผลมะขามป้อม ซึ่งได้แก่ ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) และโปรแอนโทไซยานิดิน (proanthrocyanidin) มีความสัมพันธ์กับการต้านอนุมูลอิสระพวก superoxide radical ที่สูง มีความสามารถในการ chelating ferrous ที่ดีกว่า เมื่อเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานอย่าง quercetin และมีค่าใกล้เคียงกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH radicals, hydroxyl radicals, superoxide anion radicals และ lipid peroxidation (Liu *et al.*, 2008) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ mycelium ของเชื้อ *Aspergillus flavus* ได้ 98 % และยังยับยั้งฤทธิ์ของพิษ aflatoxin B_1 ได้ 100 % ที่ความเข้มข้นของสารสกัดมะขามป้อม 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Shukla *et al.*, 2012) นอกจากนี้สารพอลีฟีนอล 1,2,4,6-tetra-O-galloyl-β-D-glucose ที่พบในมะขามป้อมมีฤทธิ์ยับยั้งการติดเชื้อไวรัส Herpes simplex type 1 และ type 2 ในระยะเริ่มต้น และกดการแสดงออกของยีน E และ L รวมทั้งยับยั้งการจำลองตัวของดีเอ็นเอของไวรัส (Xiang *et al.*, 2011) มีฤทธิ์แก้อาการท้องผูกอาหารไม่ย่อย พบว่าสารสกัดชั้นน้ำของผลมะขามป้อมช่วยให้หนูทดลองเพิ่มการขับอุจจาระขึ้น 3 เท่า เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Mehmood *et al.*, 2013) มีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตเซลล์มะเร็งที่ได้จากส่วน ปอด ตับ คอ ทรวงอก รังไข่ และลำไส้ของมนุษย์ โดยเฉพาะเมื่อทดสอบกับเซลล์มะเร็งจากส่วนปอด (Hela

cell line) พบว่าสารสกัดจากผลของมะขามป้อมมีผลเพิ่มการแตกหักของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ เพิ่มการทำงานของเอนไซม์ caspase-3/7, caspase-8 และเพิ่มการควบคุมการทำงานของ Fas protein ที่เป็นสัญญาณแสดงถึงการตายของเซลล์แบบ apoptosis และยังมีผลต่อการลดจำนวนและขนาดก้อนมะเร็งที่ผิวของหนูทดลองอีกด้วย (Ngamkitidechakul *et al.*, 2010) และยังมีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดโรคเบาหวานและโรคไขมันในเลือดสูง โดยพบว่าหนูที่ถูกชักนำให้เกิดโรคเบาหวาน เมื่อได้รับสารสกัดเอทานอลของผลมะขามป้อมที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว มีปริมาณของน้ำตาลกลูโคสและอินซูลินในเลือดลดต่ำลง นอกจากนี้มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณของ HDL-cholesterol และลดลงของไตรกลีเซอไรด์, LDL-cholesterol, VLDL-cholesterol อย่างมีนัยสำคัญ (Krishnaveni *et al.*, 2010) นอกจากนี้ยังพบว่าสารฟลาโวนอยด์ในมะขามป้อมมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG CoA reductase ในตับหนูทดลองได้ (Anila & Vijayalakshmi, 2002)

จากข้อมูลเบื้องต้นพบว่าสมุนไพรเดี่ยวทั้ง 3 ชนิด ที่เป็นส่วนประกอบในตำรับตรีผลา มีสารกลุ่มหลัก คือ สารฟีนอลิก/พอลีฟีนอล จากการศึกษาที่ผ่านมาสารประกอบฟีนอลิกหลายชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เช่น สารประกอบฟีนอลิกในกลุ่มฟลาโวนอยด์ของสารสกัด *Deverra scoparia* เป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibitor) ของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอเรส จากตับหมู (porcine liver carboxylesterase) ซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะเอสเทอร์ของคาร์บอกซิลิกเอสเทอร์ (carboxylic ester) ของสารที่เป็นสิ่งแปลกปลอมหรือเป็นพิษต่อร่างกาย (Djeridane *et al.*, 2008) ยังพบอีกว่าสารสกัดจากเมล็ดองุ่นใน 95 % เอทานอล (ที่มีสาร flavonoids และ procyanidins) ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แพนครีเอติค ไลเปส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ช่วยในการสลายไขมันได้ถึง 80 % (Moreno *et al.*, 2003) หรือแม้แต่สารสกัดของ *Hibicus cannabinus* ที่มีองค์ประกอบทางเคมีในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบหลัก ได้แก่ tannic acid, sinapsic acid, gallic acid, catechin hydrate และฟีนอลิกชนิดอื่นประมาณ 5 % มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดภาวะคอเลสเตอรอลสูงในหนู โดยพบว่าหนูที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูงร่วมกับสารสกัด *H. cannabinus* มีปริมาณคอเลสเตอรอลรวมในเลือด และ LDL-cholesterol น้อยกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัด (Kai *et al.*, 2015) และเมื่อพิจารณาถึงกลุ่มสารที่พบได้มากในสมุนไพรที่เป็นส่วนประกอบของตำรับตรีผลา คือ สารประกอบฟีนอลิก ซึ่งได้แก่ กรดแกลลิก และสารกลุ่มแทนนิน ดังนั้นหากสารประกอบฟีนอลิกมีผลต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรส การศึกษาปริมาณกรดแกลลิกและสารกลุ่มแทนนิน ก็น่าจะทราบถึงความสัมพันธ์เบื้องต้นระหว่างผลของสารประกอบฟีนอลลิกต่อฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรส

สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารที่พืชสร้างขึ้นมาเพื่อประโยชน์เจริญเติบโต หรือป้องกันตัว โดยมีโครงสร้างหลักเป็นวงแหวนอะโรมาติก ที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) อย่างน้อยหนึ่งหมู่ต่อกับวงแหวนอะ

โรมาติก กรดแกลลิก (gallic acid, trihydroxybenzoic acid) มีสูตรทางเคมีคือ $C_6H_2(OH)_3COOH$ มีโครงสร้างดังแสดงในภาพที่ 3 เป็นสารประกอบฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็ง ฤทธิ์ต้านการอักเสบ เป็นต้น แทนนิน (tannins) เป็นสารประกอบพอลิฟีนอล ที่ประกอบไปด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl) พบมากในเปลือกและผลของพืชหลายชนิด มีหน้าที่ในการปกป้องพืชจากการถูกกินจากแมลงศัตรูพืช และมีคุณสมบัติในการจับกับโปรตีนและสามารถตกตะกอนโปรตีน รวมทั้งกรดอะมิโน และสารประกอบอินทรีย์ชนิดอื่นได้ สารแทนนินแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกคือ hydrolyzable tannins เป็นอนุพันธ์ของกรดแกลลิก ที่ถูกเชื่อมต่อกันจนมีโครงสร้างที่ซับซ้อน ตัวอย่างของ hydrolyzable tannins เช่น gallotannins และ ellagitannins กลุ่มที่สองคือ condensed tannins เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบไปด้วยโครงสร้างหลัก flavanoid skeleton (ภาพที่ 3) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะคาร์บอนของ C8-C4 ระหว่าง flavanoid 2 ตัว ตัวอย่างของ condensed tannins เช่น epicatechin gallate จากการศึกษาพบว่าสารในกลุ่มแทนนินมีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายอย่าง เช่น ฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ (antioxidant) เนื่องจากมีความสามารถในการเกิดปฏิกิริยา oxidation reduction มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย เชื้อไวรัส หรือแม้กระทั่งเซลล์มะเร็ง (Akiyama *et al*, 2001; Hagerman, 2002; Lin *et al*., 2004; Susumu *et al*., 2005)



Flavanoid skeleton **Gallic acid**

ภาพที่ 3 โครงสร้างหลักของ condened tannins (1) และ hydralyzable tannins (2)

นอกจากนี้กรดแกลลิกและสารแทนนินยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ เช่น เอนไซม์ฟอสโฟไลเปสเอทู (phospholipase A_2; PLA_2) ที่พบในเลือดงู ซึ่งทำให้เกิดการบวม และชักนำการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด มีพิษต่อระบบประสาทและกล้ามเนื้อ โดยพบว่าที่ความเข้มข้นของกรดแกลลิก และกรดแทนนิก 4 µM สามารถยับยั้งเอนไซม์ PLA_2 ได้ 100 % (Pereanez *et al*., 2011) นอกจากนี้ยังพบว่า hydrolyable

tannins ซึ่งได้แก่ ellagitannins และ gallotannins สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ poly (ADP-ribose) glycohydrolase ได้ดี (Tsai *et al.*, 1991)

จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่าสมุนไพรในตำรับตรีผลามีฤทธิ์ในการลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด แต่ยังไม่มีการรายงานถึงกลไกการลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดของตำรับตรีผลาอย่างชัดเจน นอกจากนี้ยังมีผลการศึกษายืนยันว่าสารประกอบฟีนอลิกบางชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรสที่ดี แต่อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีรายงานว่าสารประกอบฟีนอลิกซึ่งเป็นสารกลุ่มหลักที่พบในสมุนไพรเดี่ยวที่เป็นส่วนประกอบของตำรับตรีผลามีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรสได้จริง ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงศึกษาฤทธิ์การลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด โดยผ่านกลไกการยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรส ในหลอดทดลอง (*in vitro*) ซึ่งมีวัตถุประสงค์ คือ ศึกษาผลของสารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลา และตรีผลาสูตรดัดแปลงต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรส ศึกษาผลของอัตราส่วนของสมุนไพรที่เป็นส่วนประกอบของตำรับตรีผลา และตรีผลาสูตรดัดแปลงต่อฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรส และหาปริมาณสารฟีนอลิกรวม กรดแกลลิก และสารแทนนิน ในสารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลา ตรีผลาสูตรดัดแปลงและสมุนไพรเดี่ยว พร้อมทั้งศึกษาแนวโน้มความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารฟีนอลิกรวม กรดแกลลิก และสารแทนนิน ต่อฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรส ทั้งนี้เพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนว่ายาสมุนไพรตำรับตรีผลาที่มีสารประกอบฟีนอลิก เช่น กรดแกลลิก และสารแทนนิน อยู่ในปริมาณมาก มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรสหรือไม่ และเป็นการเพิ่มข้อมูลเกี่ยวกับกลไกในการออกฤทธิ์ของยาสมุนไพรตำรับตรีผลาต่อการลดปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือด รวมทั้งใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนสรรพคุณของตำรับยาสมุนไพรไทยให้เป็นที่น่าเชื่อถือ และเพื่อเป็นการส่งเสริมการใช้สมุนไพรไทยในการรักษาโรคให้แพร่หลายมากยิ่งขึ้น

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. Balance (Sartorius, USA)
2. Centrifuge (Model Rotofix 32A, Hettich, Germany)
3. Desiccator
4. Eppendorf 2.0 ml
5. Erlenmeyer flask 50, 100, 250, 500 ml
6. Falcon tube 15, 50 ml
7. Freeze dryer (model LGJ-18S, China)
8. Glass vial 20 ml
9. Hot plate stirrer (Kika Labortechnik, Germany)
10. HPTLC apparatus
    - Sample spotting Linomat 5 (Camag, Switzerland)
    - TLC scanner 4 (Camag, Switzerland)
    - Visualizer TLC (Camag, Switzerland)
    - WinCATS software (Camag, Switzerland)
11. Incubator (Model IN 110, Memmert, Germany)
12. Microplate spectrophotometer (Benchmark Plus™, Bio-Rad, USA)
13. Micropipette tip 200, 1,000 µl
14. Micropipette size 200, 1000 µl (Socorex, Switzerland)
15. Multichannel micropipette 20-200 µl (Socorex, Switzerland)
16. Parafilm
17. pH meter (Model SevenCompact™ S220, Mettler-Teledo, Switzerland)
18. Refrigerated showcase (Model SCM-320SAD, Sanden intercool, Thailand)
19. Sieve size 40 mesh (Endecotts LTD London, England)
20. TLC plate (silica gel 60 F254, E. Merck 0.2 mm thickness)
21. Water bath (model WNE, WPE, Memmert, Germany)
22. Whatman No.1 (GC Healthcare company, UK)
23. 96-well plate

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. Bovine serum albumin (A7906, Sigma-Aldrich, USA)
2. Cholesterol esterase from porcine pancreas (26745, Sigma-Aldrich, USA)
3. Dibasic sodium phosphate (Univar, Australia)
4. Dimethyl sulfoxide (Carlo Erba Reagents, USA)
5. Ethanol (Burdick & Jackson, Korea)
6. Ethyl acetate (J.T.Baker, USA)
7. Ferric chloride anhydrous (451695, Carlo Erba Reagents, USA)
8. Folin-Ciocalteu reagent (F9252, Sigma-Aldrich, USA)
9. Formic acid (J.T.Baker, USA)
10. Gallic acid (398225, Sigma-Aldrich, USA)
11. Hydrochloric acid (J.T.Baker, USA)
12. Methanol (Burdick & Jackson, Korea)
13. Monobasic sodium phosphate (Univar, Australia)
14. Orlistat (O4139, Sigma-Aldrich, USA)
15. *p*-Nitrophenyl butyrate (N9876, Sigma-Aldrich, USA)
16. Sodium carbonate (Univar, Australia)
17. Sodium chloride (Univar, Australia)
18. Sodium dodecyl sulfate (Univar, Australia)
19. Tannic acid (403040, Sigma-Aldrich, USA)
20. Taurocholic acid sodium salt hydrate (T4009, Sigma-Aldrich, USA)
21. Toluene (Carlo Erba Reagents, USA)
22. Triethanolamine (QRëc™, New Zealand)

การวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้ค่าเฉลี่ย (mean) $\pm$ ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) แสดงผลจากการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งในแต่ละตัวอย่าง ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (coefficient of determination; r^2) แสดงความสัมพันธ์ของข้อมูล X และ Y จากกราฟมาตรฐานที่ใช้ในการทดลอง ใช้ T-test ในการวิเคราะห์ทางสถิติของการสกัดครั้งที่ 1 กับครั้งที่ 2 และใช้ one-way analysis of variance (ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างสูตรตำรับตั้งแต่สามกลุ่มขึ้นไป โดยกำหนดให้ค่า $p \leq 0.05$ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

วิธีการวิจัย

การสกัดสมุนไพร (plant extraction)

นำสมุนไพรแห้งของสมอไทย สมอพิเภก และมะขามป้อม (ร้านเจริญสุขโอสถ จังหวัดนครปฐม) มาบดและแร่งผ่านตะแกรงเบอร์ 40 เตรียมสมุนไพรตำรับตรีผลา (T.F.1) ตรีผลาสูตรดัดแปลงจำนวน 4 สูตร (MT.F.2 – MT.F.5) และสมุนไพรเดี่ยวทั้ง 3 ชนิด สูตรละ 2 ชุด โดยชั่งสมุนไพรมาผสมกันในอัตราส่วนที่กำหนดตามตารางที่ 1 รวมกันให้ได้ 8.4 กรัมในแต่ละสูตร ต้มในน้ำเดือด 840 มิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาที กรองผงสมุนไพรทิ้งโดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman No.1) นำสารละลายที่ได้จากการกรองมาทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง freeze dryer บรรจุสารสกัดชั้นน้ำใส่ในขวด เก็บไว้ในโถควบคุมความชื้น และป้องกันแสง

ตารางที่ 1 ชนิดและอัตราส่วนของสมุนไพรที่เป็นส่วนประกอบของตำรับตรีผลา ตรีผลาสูตรดัดแปลงและสมุนไพรเดี่ยว

ชนิดสูตรตำรับ/สมุนไพร	อัตราส่วนของสมุนไพรแต่ละชนิด*			หมายเหตุ
	สมอไทย	สมอพิเภก	มะขามป้อม	
ตรีผลาสูตร 1 (T.F.1)	1	1	1	บัญชียาหลักแห่งชาติ
ตรีผลาสูตรดัดแปลง2 (MT.F.2)	8	12	4	ปิตะสมุฏฐาน
ตรีผลาสูตรดัดแปลง3 (MT.F.3)	12	4	8	วาตะสมุฏฐาน
ตรีผลาสูตรดัดแปลง4 (MT.F.4)	4	8	12	เสมหะสมุฏฐาน
ตรีผลาสูตรดัดแปลง5 (MT.F.5)	1	2	4	Suman Rana's thesis
สมอไทย	1	-	-	
สมอพิเภก	-	1	-	
มะขามป้อม	-	-	1	

*อัตราส่วนสมุนไพรแต่ละชนิดระบุตัวเลขตามบัญชียาหลักแห่งชาติ ตำราแพทย์แผนไทย และเอกสารอ้างอิงค้นฉบับ โดยมีอัตราส่วนรวมที่ใช้ในการเปรียบเทียบแต่ละสูตรเท่ากับ 42 ส่วน

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

การทดสอบหาปริมาณสารฟีนอลิกรวม (total phenolic content)

เตรียมสารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลาตรีผลาสูตรดัดแปลงและสมุนไพรเดี่ยวที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในน้ำกลั่น หาปริมาณฟีนอลิกรวมตามวิธีการของ Singleton และคณะ(1999) โดยเติมสารตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate ตามด้วย 10% Folin-Ciocalteu reagent 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 นาที เติม 7.5 % โซเดียมคาร์บอเนต 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มต่อเป็นเวลา 60 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ใช้สารมาตรฐานกรดแกลลิก (gallic acid) เป็นตัวควบคุมที่เป็นบวก (positive control) คำนวณหาปริมาณฟีนอลิกรวมจากกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก (ความเข้มข้น 12.5 – 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) รายงานปริมาณสารฟีนอลิกรวมในหน่วยของไมโครกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมสารสกัด (μg gallic acid equivalent (GAE)/mg extract)

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรส (pancreatic cholesterol esterase inhibition)

เตรียมสารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลา ตรีผลาสูตรดัดแปลง กรดแกลลิก และกรดแทนนิก (tannic acid) ใน 10 % DMSO ที่เข้มข้นความต่างๆ การศึกษาการยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรส ดัดแปลงจากวิธีของ Adisakwattana *et al.* (2011) โดยการเติมสารละลายตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate ตามด้วยเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรสที่เตรียมใน 100 มิลลิโมลาร์ของโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 (ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเท่ากับ 0.01 unit) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เริ่มปฏิกิริยาเอนไซม์โดยการเติมสารผสมซึ่งประกอบไปด้วย 0.2 มิลลิโมลาร์ของ taurochoic acid sodium salt, 0.2 มิลลิโมลาร์ของ *p*-nitrophenyl butyrate (*p*-NPB) ที่เตรียมใน 100 มิลลิโมลาร์ของโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 และ 100 มิลลิโมลาร์โซเดียมคลอไรด์ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลา นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ใช้ orlistat เป็นสารมาตรฐานในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรสโดยแต่ละตัวอย่างทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำ คำนวณหาค่าการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (% inhibition) จากสูตร

$$\%\,\text{Inhibition} = \frac{\left|A_0 - (A_1 - A_s)\right|}{A_0} \times 100$$

เมื่อ A_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาเอนไซม์ที่ไม่มีตัวยับยั้ง

A_1 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาเอนไซม์ที่มีสารละลายตัวอย่าง

A_s คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างที่ไม่มีเอนไซม์

RANGSIT UNIVERSITY LIBRARY

การทดสอบหาปริมาณกรดแกลลิกในสารสกัด (gallic acid content)

เตรียมกรดแกลลิกในตัวทำละลายเมทานอลที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งกรดแกลลิก 10 มิลลิกรัม ละลายในตัวทำละลายเมทานอลและปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตรจากนั้นเจือจางด้วยเมทานอลจนได้กรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมสารสกัดตัวอย่างโดยชั่งสารสกัดชั้นน้ำของตรีผลา ตรีผลาสูตรดัดแปลง และสมุนไพรเดี่ยว 25 มิลลิกรัม ละลายในตัวทำละลายเมทานอลและปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) นำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Linomat 5 โดยพ่นกรดแกลลิกปริมาตร 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 ไมโครลิตรต่อแถบ (50 – 550 นาโนกรัมต่อแถบ) และพ่นสารสกัดตัวอย่างลงบนแผ่นทีแอลซี (TLC-plate) ปริมาตร 5 ไมโครลิตรต่อแบนตามลำดับ จากนั้นนำแผ่นทีแอลซีไปพัฒนาในแทงค์ที่ถูกทำให้อิ่มตัวด้วยตัวทำละลายเคลื่อนที่ ซึ่งมีส่วนผสมของ โทลูอีน เอทิลอะซิเตต เมทานอล และกรดฟอร์มิก ในอัตราส่วนต่อปริมาตรเป็น 5:3:1.5:0.5 เพื่อแยกกรดแกลลิกออกจากสารผสมชนิดอื่น นำแผ่นทีแอลซีที่ได้ สแกนด้วยเครื่อง densitometer TLC scanner 3 ที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร โดยใช้โปรแกรม winCATS software ในการวิเคราะห์ นำพื้นที่ใต้พีกมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของกรดแกลลิกในสารตัวอย่าง โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก

การทดสอบหาปริมาณแทนนินในสารสกัด (tannins content)

ตามวิธีของ Kawpoombae *et al.* (2010) มีวิธีการดังนี้ ผสมโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin) 4 มิลลิกรัม กับสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำ) 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที (rpm) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เก็บเอาตะกอนมาละลายในสารผสม 1 มิลลิลิตร ของ 0.1 % โซเดียมโดดีซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate) ไตรเอทาโนลามีน (triethanolamine) และ 10 มิลลิโมลาร์ เฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3$) ในอัตราส่วน 2:2:1 จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร เทียบหาปริมาณสารแทนนิน (tannins) จากกราฟมาตรฐานของกรดแทนนิก (0.50-1.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) แสดงค่าในรูปของเปอร์เซ็นต์สมมูลของกรดแทนนิกในสารสกัด (% (w/w) tannic acid equivalent in extract) โดยทดลองซ้ำ 6 ครั้ง

บทที่ 4
ผลการวิจัย

ปริมาณสารฟีนอลิกรวม

จากผลการทดลองในตารางที่ 2 พบว่าสารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลา และตรีผลาสูตรดัดแปลงที่ได้จากการสกัดทั้งสองครั้งมีปริมาณฟีนอลิกรวมไม่แตกต่างกัน โดยตรีผลาสูตรดัดแปลง 2 มีปริมาณสารฟีนอลิกรวมสูงที่สุด มีค่าเท่ากับ 514.4 ± 5.1 และ 516.3 ± 22.9 ไมโครกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมสารสกัด สำหรับการสกัดครั้งที่ 1 และการสกัดครั้งที่ 2 ตามลำดับ ในขณะที่ตำรับตรีผลาสูตรดัดแปลง 3 มีปริมาณสารฟีนอลิกรวมต่ำที่สุดในการสกัดครั้งที่ 1 และตำรับตรีผลาสูตรดัดแปลง 5 มีปริมาณสารฟีนอลิกรวมต่ำที่สุดในการสกัดครั้งที่ 2 เมื่อพิจารณาปริมาณสารฟีนอลิกรวมในสมุนไพรเดี่ยวแต่ละชนิดพบว่า สารสกัดชั้นน้ำของสมอพิเภกมีปริมาณสารฟีนอลิกรวมมากที่สุด โดยมีค่าสูงกว่าสารสกัดชั้นน้ำของสมอไทยและมะขามป้อม 1.5 – 2.0 เท่า

เมื่อพิจารณาอัตราส่วนของสมุนไพรแต่ละชนิดในสารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลาสูตรต่างๆ พบว่าตำรับตรีผลาสูตรดัดแปลง 2 มีอัตราส่วนของสมอพิเภกสูงที่สุดคือ 21 ส่วนจากทั้งหมด 42 ส่วน และตำรับตรีผลาสูตรดัดแปลง 3 และ 5 มีอัตราส่วนของสมอพิเภกในสูตรตำรับน้อยที่สุดคือ 7 และ 12 ส่วนตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าปริมาณอัตราส่วนของสมอพิเภกในตำรับตรีผลาและตรีผลาสูตรดัดแปลงมีผลต่อปริมาณฟีนอลิกรวมมากกว่าปริมาณอัตราส่วนของสมอไทยและมะขามป้อมในสูตรตำรับ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 2 ปริมาณสารฟีนอลิกรวมของตำรับตรีผลา ตรีผลาสูตรดัดแปลงและสมุนไพรเดี่ยว

ชนิดสูตรตำรับ/สมุนไพร	ปริมาณสารฟีนอลิกรวม (ไมโครกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมสารสกัด)	
	สกัดครั้งที่ 1	สกัดครั้งที่ 2
ตรีผลาสูตร 1	398.0 ± 7.6	397.5 ± 13.8
ตรีผลาสูตรดัดแปลง 2	514.4 ± 5.1*	516.3 ± 22.9*
ตรีผลาสูตรดัดแปลง 3	368.3 ± 10.1	387.0 ± 9.5
ตรีผลาสูตรดัดแปลง 4	412.4 ± 1.0	395.6 ± 8.1
ตรีผลาสูตรดัดแปลง 5	375.5 ± 5.0	365.5 ± 5.2
สมอไทย	336.1 ± 3.8	334.4 ± 5.8
สมอพิเภก	592.2 ± 22.5	558.8 ± 6.5
มะขามป้อม	305.8 ± 5.9	291.9 ± 2.8

* ระดับนัยสำคัญที่ 0.05, n = 3

การยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรส

จากผลการทดลองในตารางที่ 3 ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการสกัดครั้งที่ 1 พบว่าตำรับตรีผลาสูตรดัดแปลง 2 มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรสสูงที่สุดที่ 21.9 ± 0.5 % โดยมีค่าแตกต่างจากสูตรอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญที่ช่วงความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ การสกัดครั้งที่ 2 พบว่าตำรับตรีผลาสูตร 1 มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรสสูงที่สุดที่ 20.7 ± 0. 2% โดยมีค่าแตกต่างจากสูตรอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และมีฤทธิ์ไม่แตกต่างกับสารสกัดชั้นน้ำของสมุนไพรเดี่ยว คือ สมอไทยและสมอพิเภก แต่เมื่อเปรียบเทียบสารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลา ที่มีค่ามากที่สุดกับสารสกัดชั้นน้ำของมะขามป้อม และสารมาตรฐาน orlistat พบว่าค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรสของสารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลามีค่าน้อยกว่าสารสกัดชั้นน้ำของมะขามป้อมประมาณ 2 เท่า และน้อยกว่า orlistat 4.8 เท่า โดยยังพบว่าสารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลา ตรีผลาสูตรดัดแปลง และสมุนไพรเดี่ยวที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรสสูงกว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.2 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4 และภาพที่ 5) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติก

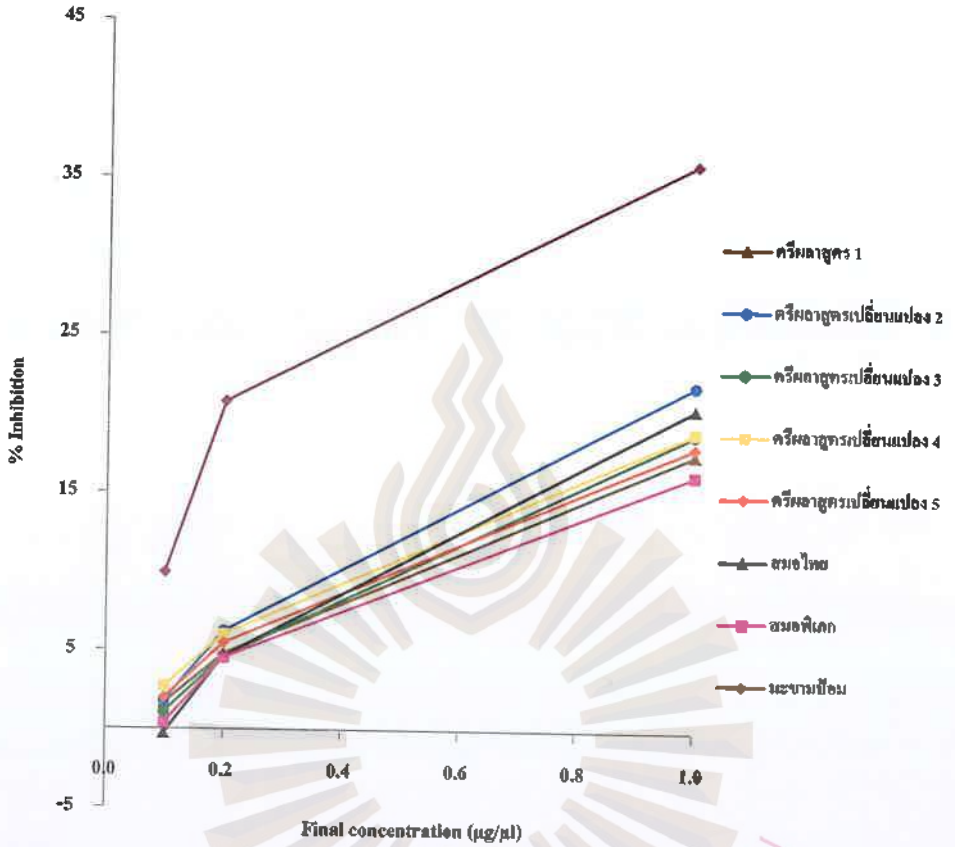
คอเลสเตอรอล เอสเทอเรสแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของสารสกัด แต่อย่างไรก็ตามพบว่าเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรสถูกยับยั้งได้น้อยมาก คือ ยับยั้งได้ไม่เกิน 30 % ที่ความเข้มข้นของสกัด 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เมื่อพิจารณาถึงอัตราส่วนของสมุนไพรเดี่ยวที่เป็นส่วนประกอบของตำรับตรีผลา และตรีผลาสูตรดัดแปลงพบว่ามะขามป้อมเป็นสมุนไพรเดี่ยวที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรสมากที่สุด แต่พบว่าตรีผลาสูตรดัดแปลง 5 และ 4 ซึ่งมีอัตราส่วนของสมุนไพรมะขามป้อมมากที่สุดและรองลงมา คือ มีอัตราส่วนของมะข้ามป้อม 24 และ 21 ส่วนใน 42 ส่วน ตามลำดับ กลับมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรสที่น้อยกว่าตำรับตรีผลาสูตรดัดแปลง 2 และ 1 ที่มีอัตราส่วนของมะขามป้อมเพียง 7 และ 14 ส่วน ดังนั้นจึงไม่สามารถสรุปได้ว่าอัตราส่วนของสมุนไพรเดี่ยวในสูตรตำรับมีผลต่อค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรส

ตารางที่ 3 ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรสของตำรับตรีผลาตรีผลาที่เปลี่ยนแปลง และสมุนไพรเดี่ยว ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

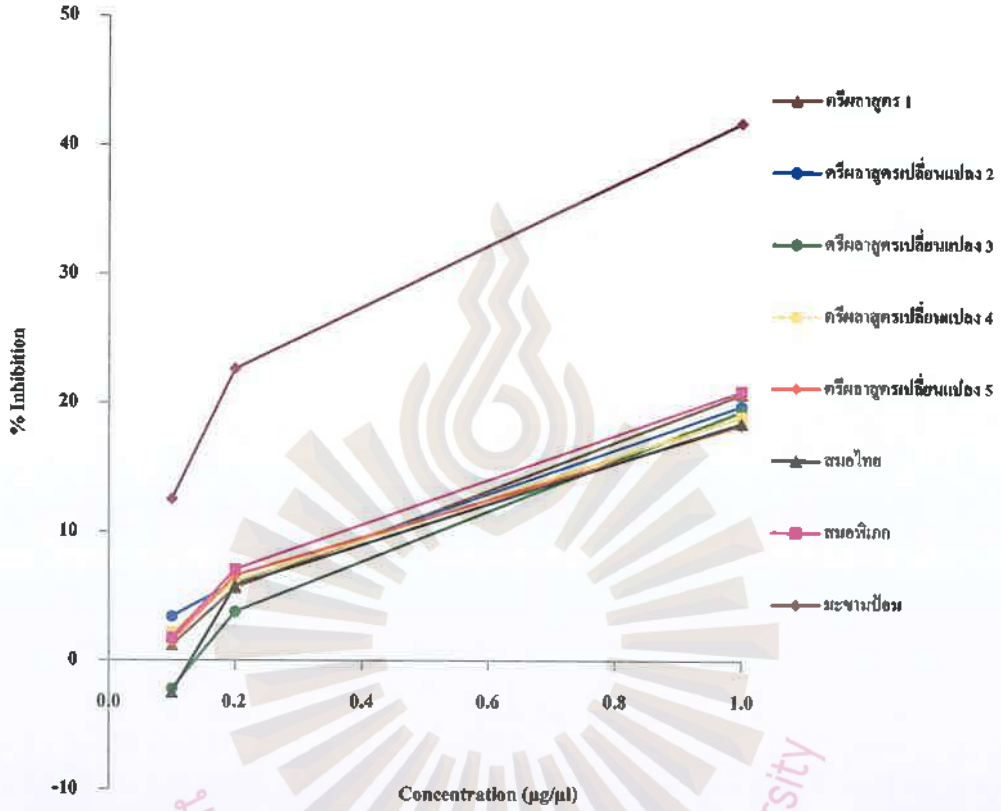
ชนิดสูตรตำรับ/สมุนไพร	สกัดครั้งที่ 1	สกัดครั้งที่ 2
ตรีผลาสูตร 1	17.4 ± 0.5	20.7 ± 0.2*
ตรีผลาสูตรดัดแปลง 2	21.9 ± 0.5*	19.8 ± 0.5
ตรีผลาสูตรดัดแปลง 3	18.8 ± 1.0	19.4 ± 0.6
ตรีผลาสูตรดัดแปลง 4	19.0 ± 0.4	19.0 ± 0.1
ตรีผลาสูตรดัดแปลง 5	18.0 ± 0.2	18.3 ± 0.3
สมอไทย	20.5 ± 0.3	18.5 ± 0.4
สมอพิเภก	16.2 ± 0.8	20.9 ± 0.2
มะขามป้อม	36.0 ± 0.2	41.8 ± 0.1
0.2 µg/ml orlistat (final conc.)	97.6 ± 0.1	97.3 ± 0.1

* ระดับนัยสำคัญที่ 0.05, n = 3



ภาพที่ 4 ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรสของตำรับตรีผลา ตรีผลาสูตรดัดแปลง และสมุนไพรเดี่ยว ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ได้จากการสกัดครั้งที่ 1

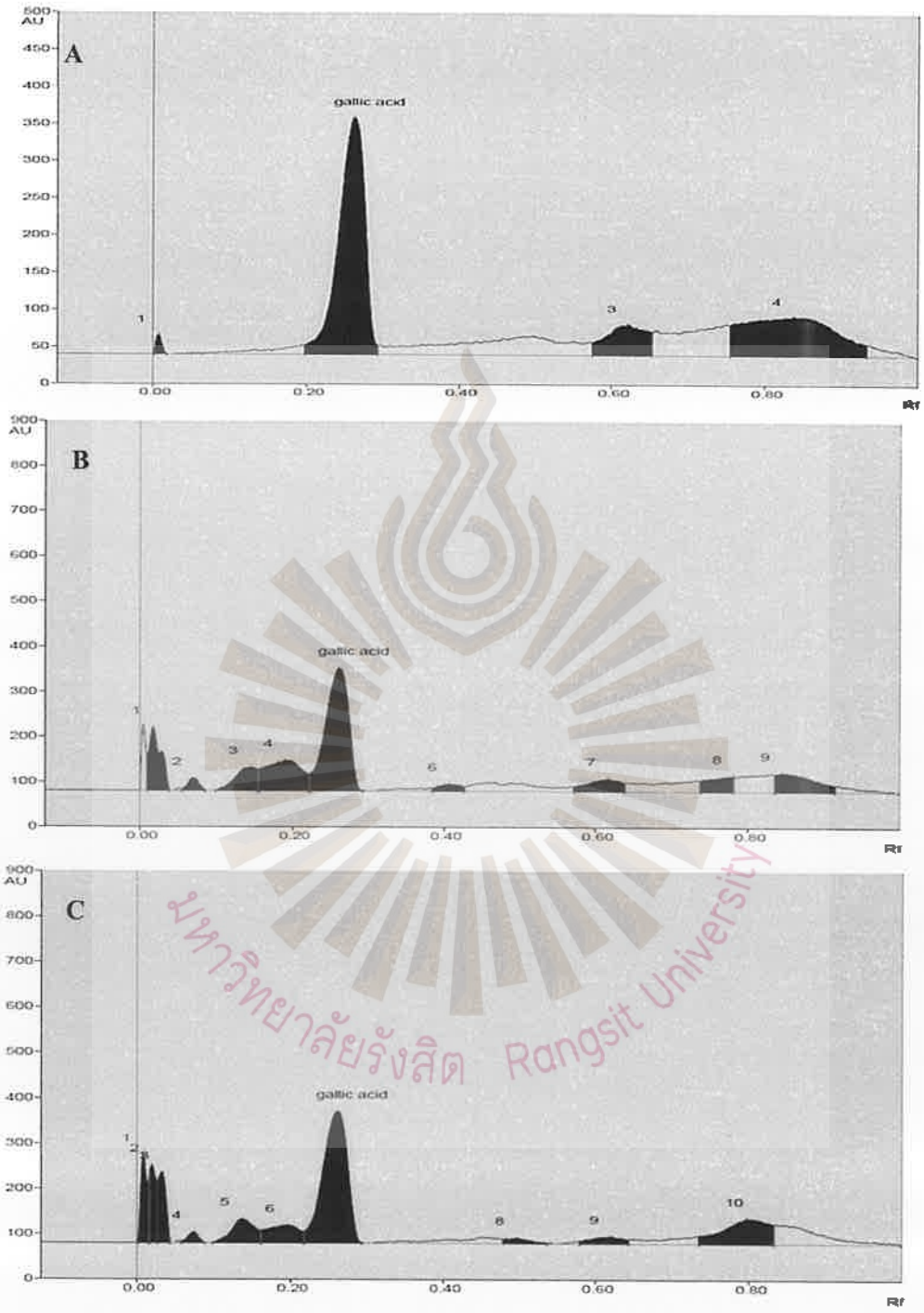
มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University



ภาพที่ 5 ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติก คอเลสเตอรอล เอสเทอเรสของตำรับตรีผลา ตรีผลาสูตรดัดแปลง และสมุนไพรเดี่ยว ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ได้จากการสกัดครั้งที่ 2

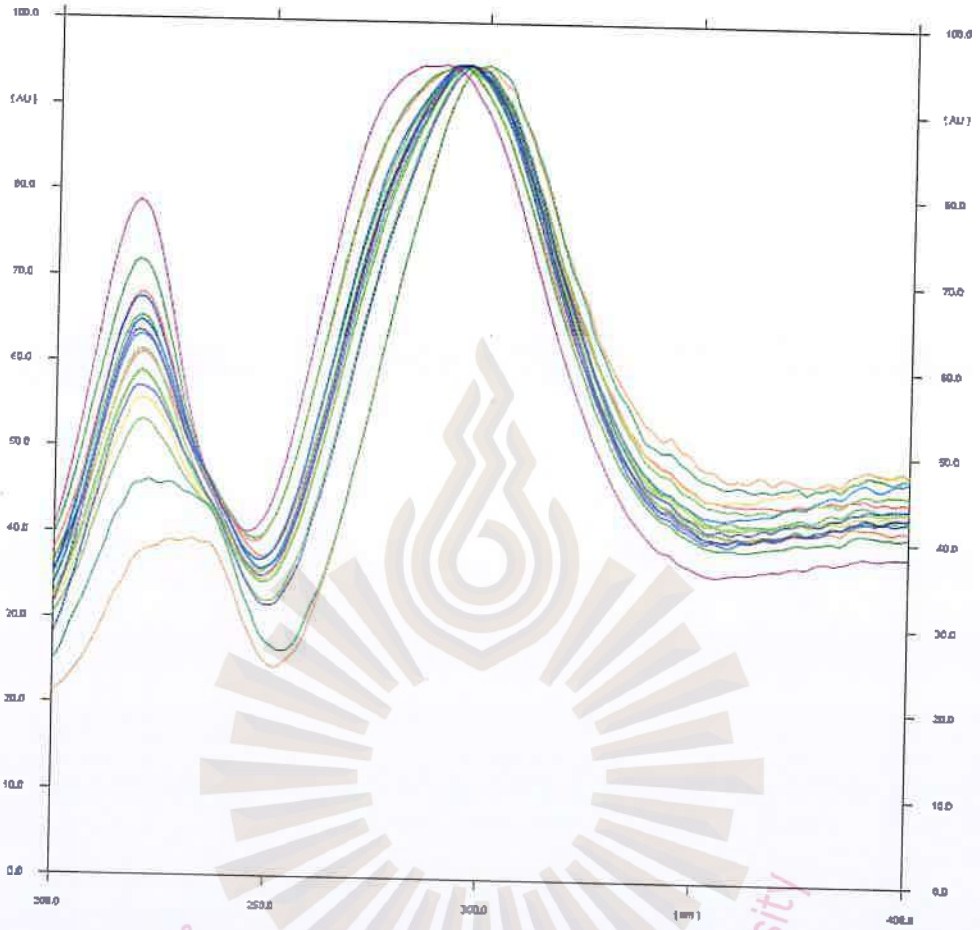
ปริมาณกรดแกลลิกในสารสกัด

จากผลการทดลองพบว่า ในระบบตัวทำละลายเคลื่อนที่ที่ประกอบไปด้วยโทลูอีน เอทิลอะซิเตต เมทานอล และกรดฟอร์มิก ในอัตราส่วนต่อปริมาตรเป็น 5: 3: 1.5 : 0.5 พีกของกรดแกลลิกจะถูกแยกออกมาที่ค่า R_f = 0.29 ดังโครมาโตแกรมที่ปรากฏในภาพที่ 6 และเมื่อตรวจสอบรูปแบบสเปคตรัมของสารมาตรฐานกรดแกลลิก และพีกของกรดแกลลิกในสารสกัดตั้งแต่ความยาวคลื่น 200 – 400 นาโนเมตร ดังแสดงในภาพที่ 7 พบว่ากรดแกลลิกมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) ที่ความยาวคลื่น 278 นาโนเมตร



ภาพที่ 6 โครมาโตแกรมแสดงพีกของกรดแกลลิกที่ R_f = 0.29 ในสารมาตรฐานกรดแกลลิก (A) สารสกัดชั้นน้ำของมะขามป้อม (B) และสารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลาสูตรดัดแปลง 5 (C)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

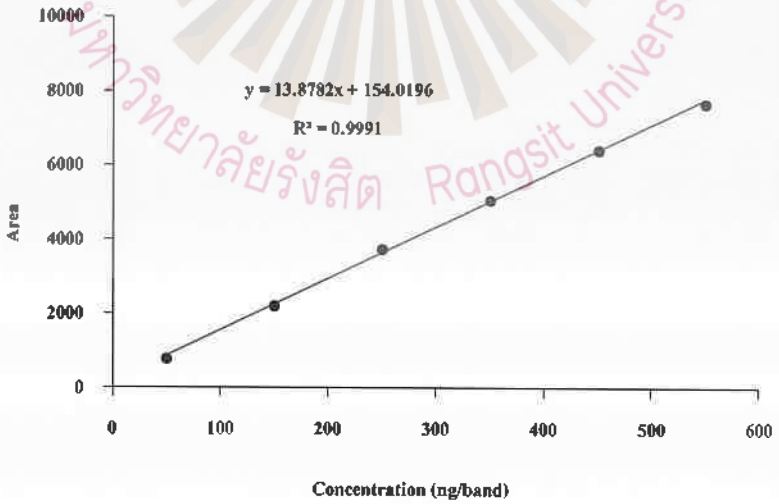


ภาพที่ 7 overlay spectrum ของกรดแกลลิกที่ความยาวคลื่น 200 – 400 นาโนเมตร ในสาร**มาตรฐานกรดแกลลิก** สารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลา ตรีผลาสูตรดัดแปลง และพืชสมุนไพรเดี่ยวจากการสกัดครั้งที่ 1 และการสกัดครั้งที่ 2

ปริมาณกรดแกลลิกในสารสกัดตัวอย่างได้จากการเปรียบเทียบพื้นที่ใต้กราฟของกรดแกลลิกในตัวอย่าง กับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกในภาพที่ 8 โดยใช้สมการ y = 13.8782x +154.0196 ในการคำนวณ ค่าที่ได้จากการคำนวณแสดงในตารางที่ 4 พบว่าสารสกัดชั้นน้ำของสมุนไพรเดี่ยวมะขามป้อมมีเปอร์เซ็นต์ของกรดแกลลิกมากที่สุดที่ 3.18 ± 0.04 % จากการสกัดครั้งที่ 1 (แถบที่ 13 ในรูปที่ 6, 7) และ 3.25 ± 0.04 เปอร์เซ็นต์ จากการสกัดครั้งที่ 2 (แถบที่ 21 ในภาพที่ 9, 10) โดยจะสังเกตว่าแถบที่ 13 และ 21 มีความเข้มของแถบหรือความสูงของพีกมากกว่าสารสกัดตัวอื่น รองลงมาคือ สมอไทยและสมอพิเภก ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบระหว่างตำรับตรีผลาและตรีผลาสูตรดัดแปลงพบว่า สารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลาสูตรดัดแปลง 5 มีเปอร์เซ็นต์ของกรดแกลลิกมากที่สุดที่ 2.42 ± 0.09 % และ

2.45 ± 0.09 % จากการสกัดครั้งที่ 1 และการสกัดครั้งที่ 2 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลาสูตรดัดแปลง 2 ที่มีค่าน้อยที่สุด แต่มีค่าไม่แตกต่างจากตำรับตรีผลาสูตร 1, 3 และ 4 โดยพบว่าการสกัดสมุนไพรทั้งสองครั้งให้ค่าเปอร์เซ็นต์ของกรดแกลลิกที่ไม่ต่างแตกกัน ($p \leq 0.05$)

เมื่อพิจารณาถึงอัตราส่วนของสมุนไพรเดี่ยวแต่ละชนิดที่เป็นส่วนประกอบของตำรับตรีผลาและตรีผลาสูตรดัดแปลงพบว่า ตรีผลาสูตรดัดแปลง 5 ซึ่งมีอัตราส่วนของมะขามป้อมมากกว่าตำรับตรีผลาสูตรอื่น คือมีอัตราส่วนของมะขามป้อม 28 ใน 42 ส่วน จึงทำให้มีปริมาณกรดแกลลิกสูงที่สุด รองลงมาคือ ตำรับตรีผลาสูตรดัดแปลง 3 ที่มีอัตราส่วนของมะขามป้อม 14 ใน 42 ส่วน ซึ่งน้อยกว่าตำรับตรีผลาสูตรดัดแปลง 4 ที่มีมะขามป้อม 21 ใน 42 ส่วน แต่อย่างไรก็ตามพบว่าตำรับตรีผลาสูตรดัดแปลง 3 มีอัตราส่วนของสมอไทยที่สูงด้วย จึงมีผลให้ปริมาณกรดแกลลิกในตำรับตรีผลาสูตรดัดแปลง3 สูงกว่าตำรับตรีผลาสูตรดัดแปลง 4 ในขณะที่ตำรับตรีผลาสูตรดัดแปลง 2 ซึ่งมีอัตราส่วนของสมอพิเภกที่สูง และมีอัตราส่วนของมะขามป้อมและสมอไทยที่ต่ำ จึงมีปริมาณกรดแกลลิกที่น้อยที่สุด ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าปริมาณกรดแกลลิกในตำรับตรีผลาและตรีผลาสูตรดัดแปลงแปรผันโดยตรงกับอัตราส่วนของสมุนไพรเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบในสูตรตำรับ โดยอัตราส่วนของมะขามป้อมที่สูงจะมีผลต่อปริมาณกรดแกลลิกในสูตรตำรับมากที่สุด รองลงมาคือ อัตราส่วนของสมอไทยและสมอพิเภกตามลำดับ



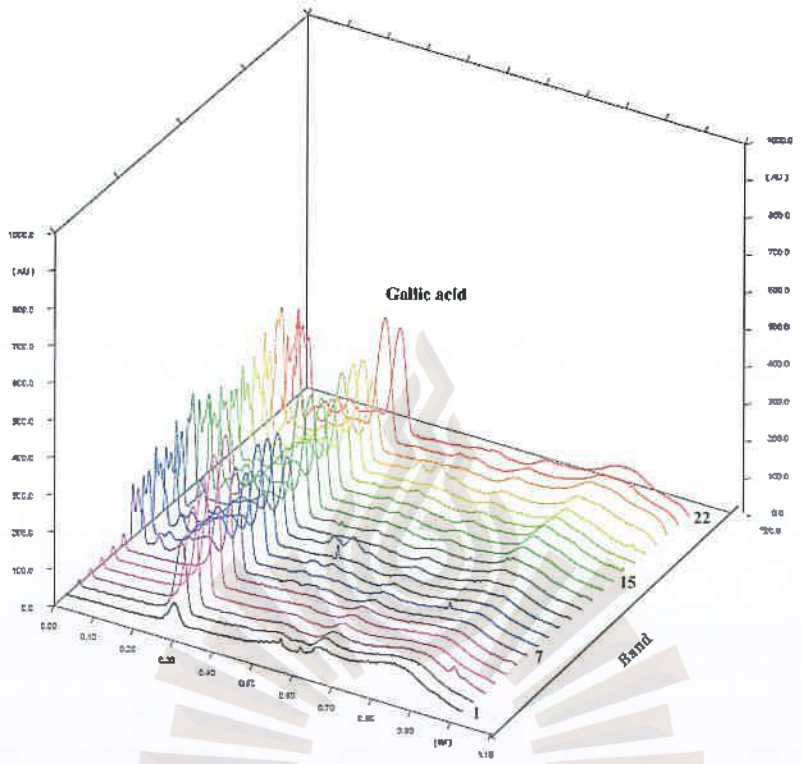
ภาพที่ 8 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ได้กราฟกับความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 50 – 550 นาโนกรัมต่อแถบ

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์กรดแกลลิกในสารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลา ตรีผลาสูตรดัดแปลงและสมุนไพรเดี่ยวทั้งสามชนิด

ชนิดสูตรตำรับ/สมุนไพร	สกัดครั้งที่ 1	สกัดครั้งที่ 2
ตรีผลาสูตร 1	2.21 ± 0.10	2.10 ± 0.09
ตรีผลาสูตรดัดแปลง 2	1.67 ± 0.05*	1.70 ± 0.02*
ตรีผลาสูตรดัดแปลง 3	2.37 ± 0.12	2.35 ± 0.10
ตรีผลาสูตรดัดแปลง 4	2.32 ± 0.17	2.31 ± 0.09
ตรีผลาสูตรดัดแปลง 5	2.42 ± 0.09	2.45 ± 0.09
สมอไทย	2.20 ± 0.19	2.14 ± 0.04
สมอพิเภก	1.05 ± 0.01	1.08 ± 0.07
มะขามป้อม	3.18 ± 0.04	3.25 ± 0.04

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ภาพที่ 9 TLC ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (แบนที่ 1- 6) สารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลาและพืชสมุนไพรเดี่ยวจากการสกัดครั้งที่ 1 (แถบที่ 7 – 14 คือ ตรีผลาสูตรที่ 1 2 3 4 สมอไทย สมอพิเภก มะขามป้อม และตรีผลาสูตร 5 ตามลำดับ) และสารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลาและพืชสมุนไพรเดี่ยวจากการสกัดครั้งที่ 2 (แถบที่ 15- 22 คือ ตรีผลาสูตรที่ 1 2 3 4 สมอไทย สมอพิเภก มะขามป้อม และตรีผลาสูตร 5 ตามลำดับ)



ภาพที่ 10 TLC densitometer-3D ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (แถบที่ 1- 6) สารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลาและพืชสมุนไพรเดี่ยวจากการสกัดครั้งที่ 1 (แถบที่ 7 – 14 คือ ตำรับตรีผลาสูตรที่ 1 2 3 4 สมอไทย สมอพิเภก มะขามป้อม และตรีผลาสูตร 5 ตามลำดับ) และสารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลาและพืชสมุนไพรเดี่ยวจากการสกัดครั้งที่ 2 (แถบที่ 15- 22 คือ ตำรับตรีผลาสูตร 1 2 3 4 สมอไทย สมอพิเภก มะขามป้อม และตรีผลาสูตร 5 ตามลำดับ)

ปริมาณสารแทนนินในสารสกัด

จากการทดลองในตารางที่ 5 พบว่าการสกัดครั้งที่ 1 และการสกัดครั้งที่ 2 มีค่าเปอร์เซ็นต์สมมูลของกรดแทนนิกไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยจากการสกัดครั้งที่ 1 สารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลาสูตรดัดแปลง 4 มีค่าเปอร์เซ็นต์สมมูลของกรดแทนนิกในสารสกัดมากที่สุดที่ 83.5 ± 6.9 % ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) จากสารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลาสูตร 1, 2 และ 3 แต่มีค่าไม่แตกต่างจากสารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลาสูตรดัดแปลง 5 โดยในสารสกัดชั้นน้ำของสมุนไพรเดี่ยวพบว่าสมอพิเภกมีค่าเปอร์เซ็นต์สมมูลของกรดแทนนิกต่ำที่สุดที่ 45.4 ± 4.9 % ส่วนสมอไทยและมะขามป้อมมีค่าไม่แตกต่างกัน จากการสกัดครั้งที่ 2 ที่สารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลาสูตรดัดแปลง 4 มีค่าเปอร์เซ็นต์

สมมูลของกรดแทนนิกในสารสกัดมากที่สุดที่ 85.3 ± 3.4 % ซึ่งแตกต่างจากอย่างมีนัยสำคัญกับสารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลาสูตรอื่น ($p \leq 0.05$) โดยมีสมุนไพรเดี่ยว คือ สมอพิเภก มีค่าเปอร์เซ็นต์สมมูลของกรดแทนนิกต่ำที่สุดเช่นกัน

เมื่อพิจารณาถึงอัตราส่วนของสมุนไพรเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของตำรับตรีผลาแต่ละสูตร พบว่า ตำรับตรีผลาสูตรดัดแปลง 3 ซึ่งมีอัตราส่วนของมะขามป้อมและสมอไทยมากถึง 35 ใน 42 ส่วน ซึ่งน่าจะมีค่าเปอร์เซ็นสมมูลกรดแทนนิกสูง แต่กลับพบว่าเปอร์เซ็นต์สมมูลของกรดแทนนิกมีค่าต่ำกว่าตรีผลาสูตรดัดแปลง 4 และ 5 ที่มีอัตราส่วนของมะขามป้อมและสมอไทย 30 และ 28 ส่วนตามลำดับ ดังนั้นปริมาณแทนนินในสูตรตำรับไม่มีความสัมพันธ์กับอัตราส่วนของสมุนไพรแต่ละชนิด

ตารางที่ 5 ค่าเปอร์เซ็นต์สมมูลของกรดแทนนิกในสารสกัด (% (w/w) tannic acid equivalent in extract) ชั้นน้ำของตำรับตรีผลา ตรีผลาสูตรดัดแปลงและสมุนไพรเดี่ยวทั้งสามชนิด

สูตรตำรับ/สมุนไพรเดี่ยว	สกัดครั้งที่ 1	สกัดครั้งที่ 2
ตรีผลาสูตร 1	75.2 ± 0.8	76.2 ± 1.4
ตรีผลาสูตรดัดแปลง 2	64.3 ± 5.4	62.0 ± 3.0
ตรีผลาสูตรดัดแปลง 3	75.5 ± 2.3	72.5 ± 1.6
ตรีผลาสูตรดัดแปลง 4	83.5 ± 6.9*	85.3 ± 3.4*
ตรีผลาสูตรดัดแปลง 5	79.1 ± 4.3	76.0 ± 2.0
สมอไทย	58.6 ± 1.3	61.0 ± 0.7
สมอพิเภก	45.4 ± 4.9	49.6 ± 1.4
มะขามป้อม	59.6 ± 0.6	60.1 ± 0.6

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 5
อภิปราย สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

อภิปรายผลการวิจัย

การทดลองครั้งนี้เน้นการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรส ในสารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลา ตรีผลาสูตรดัดแปลง และสมุนไพรเดี่ยว โดยศึกษาผลของอัตราส่วนสมุนไพรแต่ละชนิดที่เป็นส่วนประกอบในสูตรตำรับทั้ง 5 สูตร เปรียบเทียบกับสมุนไพรเดี่ยว และระหว่างสูตรตำรับที่ต่างกันทั้ง 5 สูตร รวมทั้งเปรียบเทียบปริมาณสารฟีนอลิกรวม กรดแกลลิก และสารแทนนินในสูตรตำรับ นอกจากนี้ยังศึกษาแนวโน้มความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารฟีนอลิกรวม กรดแกลลิก และสารแทนนิน ต่อฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรส ซึ่งจากผลการทดลองสามารถอภิปรายผลได้ดังนี้

จากการทดลองพบว่า สารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลา และตรีผลาสูตรดัดแปลง มีปริมาณสารฟีนอลิกรวมอยู่ในช่วง 300 – 600 ไมโครกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมสารสกัด ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Russell *et al.* (2011) ที่พบว่าสารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลามีปริมาณสารฟีนอลิกรวมที่ประมาณ 400 ไมโครกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมสารสกัด เมื่อพิจารณาถึงปริมาณฟีนอลิกรวมในสมุนไพรเดี่ยวแต่ละชนิด พบว่าสารสกัดชั้นน้ำของสมอพิเภกมีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงที่สุด รองลงมาคือ สมอไทยและมะขามป้อม ตามลำดับ ซึ่งให้ผลแตกต่างจากการทดลองของ Naik *et al.* (2005) ที่พบว่าสารสกัดชั้นน้ำของสมอไทยมีปริมาณสารฟีนอลิกรวมสูงที่สุด รองลงมาคือมะขามป้อม และสมอพิเภก ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตาม พบว่าปริมาณสารฟีนอลิกรวมในสารสกัดชั้นน้ำของสมุนไพรเดี่ยว และตำรับตรีผลามีค่าอยู่ในช่วง 300 - 450 ไมโครกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมสารสกัด ซึ่งมีค่าที่ไม่แตกต่างจากการทดลองครั้งนี้ แต่ลำดับปริมาณฟีนอลิกรวมของสมุนไพรที่ต่างกันอาจเนื่องมาจากวิธีการสกัด เวลา และอุณหภูมิ รวมทั้งแหล่งที่ปลูกพืชสมุนไพรที่นำมาใช้ในการสกัดที่แตกต่างกัน มีผลต่อปริมาณสารแต่ละชนิดในสารสกัด (Spigno *et al.*, 2007) นอกจากนี้การใช้สารละลาย Folin-Ciocalteu ในการทดสอบแม้จะเป็นวิธีที่นิยมในการหาปริมาณสารฟีนอลิกรวม แต่อย่างไรก็ตามพบว่า สารฟีนอลิกต่างชนิดกันจะมีความไวในการทำปฏิกิริยาต่อสารละลาย Folin-Ciocalteu ที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับโครงสร้างและหมู่ฟังก์ชั่นของสารฟีนอลิกแต่ละชนิดที่เป็นองค์ประกอบของพืช (Everette *et al.*, 2010) และเมื่อพิจารณาอัตราส่วนของสมุนไพรแต่ละชนิดในสารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลาสูตรต่างๆ พบว่าปริมาณฟีนอลิกรวมในตำรับตรีผลาสูตรต่างๆ สอดคล้องกับอัตราส่วนของสมุนไพรเดี่ยวที่เป็นส่วนผสมในสูตรตำรับ คือตำรับที่มีอัตราส่วนของสมอพิเภกในสูตรตำรับมาก ก็จะมีปริมาณสารฟีนอลิกรวมสูงด้วย ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าอัตราส่วนของสมุนไพรเดี่ยวในสูตรตำรับตรีผลาและตรีผลาสูตรดัดแปลงมีผลต่อปริมาณฟีนอลิกรวมในสูตรตำรับ

การวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์กรดแกลลิกโดยใช้เทคนิค TLC-densitometry ในสารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลา ตรีผลาสูตรดัดแปลง และสมุนไพรเดี่ยวที่ได้จากการทดลองครั้งนี้ มีค่าอยู่ในช่วง 1 – 3 % (w/w) และพบว่าสารสกัดชั้นน้ำของมะขามป้อมมีค่าเปอร์เซ็นต์กรดแกลลิกมากที่สุดที่ 3.2 % (w/w) รองลงมาคือ สมอไทยและสมอพิเภกตามลำดับ โดยเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองของ Jeganathan & Kannan (2008) ที่ใช้เทคนิค HPTLC วิเคราะห์หาปริมาณกรดแกลลิกในสารสกัดตรีผลา ในระบบตัวทำละลายเคลื่อนที่ที่ประกอบไปด้วยโทลูอีน เอทิลอะซิเตต เมทานอล และกรดฟอร์มิก ในอัตราส่วนต่อปริมาตรเป็น 3:3:0.2:0.8 พบว่ากรดแกลลิกจะมีค่า R_f = 0.56 โดยมีเปอร์เซ็นต์กรดแกลลิก 2.7 % (w/w) ในสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตต และยังพบอีกว่าเปอร์เซ็นต์กรดแกลลิกจะลดลงเมื่อสกัดในตัวทำละลายที่มีขั้วสูงขึ้น (เมทานอล) และจากการศึกษาของ Vazirian *et al.* (2011) พบว่าสารสกัดของสมุนไพรที่ได้จากการสกัดด้วย 70 % อะซิโตนในน้ำ ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี spectrophotometry มีค่าเปอร์เซ็นต์กรดแกลลิกน้อยกว่า 1-2 เท่า อย่างไรก็ตามทั้งสองการทดลองพบว่าในสมุนไพรเดี่ยวทั้ง 3 ชนิด มะขามป้อมมีค่าเปอร์เซ็นต์กรดแกลลิกสูงที่สุด โดยจะมีค่ามากหรือน้อย นอกจากจะขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของสมุนไพรแล้ว ก็ยังขึ้นกับชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ และวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วย เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเปอร์เซ็นต์กรดแกลลิกในสูตรตำรับกับอัตราส่วนของสมุนไพรเดี่ยวที่เป็นส่วนประกอบในสูตรตำรับ พบว่า ตำรับตรีผลา และตรีผลาสูตรดัดแปลงที่มีอัตราส่วนของมะขามป้อมมาก จะมีเปอร์เซ็นต์กรดแกลลิกสูงด้วย ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ คือ มะขามป้อมที่ได้จากการสกัดสมุนไพรในตัวทำละลายที่ประกอบไปด้วย 20 % อะซิโตไนไตรล์ ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี RP-HPLC มีเปอร์เซ็นต์กรดแกลลิกสูงที่สุด และเมื่อทดลองเตรียมสูตรสมุนไพรที่ได้จากการนำสมุนไพรเดี่ยวทั้ง 3 ชนิด มาผสมในอัตราส่วนที่ต่างกันพบว่า สูตรสมุนไพรที่มีอัตราส่วนของมะขามป้อมมากที่สุด มีค่าเปอร์เซ็นต์กรดแกลลิกสูงที่สุด (Pawar *et al.*, 2009) จากการทดลองจึงสามารถสรุปได้ว่าอัตราส่วนของสมุนไพรในตำรับตรีผลา และตรีผลาสูตรดัดแปลงมีผลต่อเปอร์เซ็นต์กรดแกลลิกในสูตรตำรับ โดยอัตราส่วนของมะขามป้อมมีผลต่อเปอร์เซ็นต์กรดแกลลิกมากที่สุด รองลงมาคือ สมอไทยและสมอพิเภกตามลำดับ

จากการทดลองวัดปริมาณแทนนินของสารสกัดชั้นน้ำของสมุนไพรเดี่ยวทั้ง 3 ชนิด พบว่ามีค่าเปอร์เซ็นต์สมมูลของกรดแทนนิกระหว่าง 40 – 60 % (w/w) โดยสมอไทยและมะขามป้อมมีเปอร์เซ็นต์สมมูลของกรดแทนนิกใกล้เคียงกัน และมีค่ามากกว่าสมอพิเภกประมาณ 1.2 เท่า ซึ่งจากการศึกษาก่อนหน้าก็มีการรายงานปริมาณสารแทนนินในสมุนไพรเดี่ยวทั้ง 3 ชนิดที่แตกต่างกันไป เช่น เมล็ดของสมอพิเภกที่ถูกสกัดใน 50 % เมทานอลในน้ำ เมื่อนำมาทำปฏิกิริยากับสาร Folin Denis reagent แล้ววิเคราะห์ด้วย spectrophotometer พบว่ามีค่าเปอร์เซ็นต์สมมูลของแทนนินเพียง 0.14 - 0.25 % (w/w) (Bharti & Vijaya, 2012) สารสกัดชั้นน้ำของมะขามป้อมที่ทำปฏิกิริยากับ indigo sulphuric acid ที่ไตเตรตด้วย 20 mM $KMnO_4$ มีค่าเปอร์เซ็นต์สมมูลของสารแทนนินที่ 35 – 65 % (w/w) (Poltanov *et al.*, 2009) หรือสาร

สกัดชั้นน้ำของสมอไทยที่ทดสอบโดยใช้ zinc ion ทำปฏิกิริยากับสารประกอบแทนนินในสภาวะที่เป็นด่าง ตรวจหาปริมาณ zinc ion ที่เหลือโดยการไทเทรตด้วย EDTA พบว่ามีปริมาณสารแทนนิน 40 % (w/w) (Chang & Lin, 2012) ในขณะที่สารสกัด 70 % เมทานอลของสมอไทยที่วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC พบว่าปริมาณของแทนนินที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเทียบกับสารมาตรฐานของ hydrolysable tannins จำนวน 10 ชนิด มีค่าเปอร์เซ็นต์แทนนินอยู่ประมาณ 21 % (w/w) ในสารสกัด (Juang *et al.*, 2004) จะเห็นได้ว่าปริมาณของแทนนินในสารสกัดของพืชแต่ละชนิดที่ได้จากศึกษาในแต่ละครั้งค่อนข้างแตกต่างกัน นอกจากปัจจัยภายในที่เป็นองค์ประกอบของสารที่มีอยู่ในพืชที่แตกต่างกันแล้ว ยังมีปัจจัยภายนอกอีกหลายอย่างที่ส่งผลต่อปริมาณสารที่ได้จากการวิเคราะห์ เช่น ตัวทำละลายที่ใช้ต้องสามารถสกัดสารที่ต้องการออกมาให้มากที่สุด วิธีการที่ใช้ทดสอบและการตรวจสอบต้องมีความจำเพาะ และมีความไวต่อสารที่ต้องการทดสอบอีกด้วย เมื่อพิจารณาถึงเปอร์เซ็นต์สมมูลกรดแทนนิกในสูตรตำรับกับอัตราส่วนของสมุนไพรเดี่ยวที่เป็นส่วนประกอบในสูตรตำรับพบว่า สูตรตำรับที่มีอัตราส่วนโดยรวมของสมอไทยและมะขามป้อมมากน่าจะมีเปอร์เซ็นต์สมมูลกรดแทนนิกสูงที่สุด แต่จากการทดลองกลับให้ผลที่แตกต่าง คือเปอร์เซ็นต์สมมูลกรดแทนนิกไม่ได้ขึ้นกับอัตราส่วนโดยรวมของสมอไทยและมะขามป้อม จากการทดลองจึงไม่สามารถสรุปได้ว่าอัตราส่วนของสมุนไพรเดี่ยวในตำรับตรีผลา และตรีผลาสูตรดัดแปลงมีผลต่อปริมาณแทนนินในสูตรตำรับ ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Pawar *et al.* (2009) ที่ตรวจหาปริมาณ hydrolysable tannins ซึ่งได้แก่ chebulagic acid และ chebulinic acid โดยการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดที่เป็นส่วนประกอบของตำรับตรีผลา พบว่าสารสกัดของสมอไทยมีปริมาณ hydrolysable tannins ทั้ง 2 ชนิดมากที่สุด และสูตรตำรับที่มีอัตราส่วนของสมอไทยมาก ก็มีปริมาณ chebulagic acid และ chebulinic acid สูงเช่นกัน

การยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรสแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของสารสกัด โดยสารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลา และตรีผลาสูตรดัดแปลงมีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรสต่ำกว่า 30 % ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าน้อยกว่าสารมาตรฐาน orlistat เกือบ 5 เท่า จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรส เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม serine hydrolase โดยตำแหน่ง active site มีลักษณะเป็น catalytic triad ซึ่งประกอบไปด้วยสามตำแหน่งหลักคือ เซอรีนที่ตำแหน่ง 194 (serine 194), ฮิสติดีนที่ตำแหน่ง 435 (histidine 435) และกรดแอสปาร์ติก ที่ตำแหน่ง 320 (aspartic acid 320) ซึ่งคล้ายกับ catalytic triad ของเอนไซม์ไลเปส ซึ่งกลไกของ orlistat ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปส คือ จับกับกรดอะมิโนเซอรีน (serine) ด้วยพันธะโควาเลนส์ตรง active site ของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาได้ ซึ่งกลไกดังกล่าวคล้ายกับตัวยับยั้ง isocoumarin derivative ของเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรส ที่มีรูปแบบการยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรส แบบ reversible inhibition และเมื่อเปรียบเทียบกับตัวยับยั้ง isocoumarin derivative ถือว่าตำรับตรีผลา และตรี

ผลาสูตรคัดแปลงมีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรสที่น้อยมาก โดยพบว่าสารที่มีโครงสร้างในโมเลกุลที่ประกอบไปด้วย lipophilic cycloalkyl group ที่เชื่อมกับโครงสร้างของ lactone หรือ lactone devivative โดยมีทิศทางของ carbonyl groupในโครงสร้าง lactone หันเข้าหาตำแหน่ง serine บน catalytic triad ของเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรส จึงจะสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แบบไม่ผันกลับได้ (irreversible inhibition) (Guerciolini, 1997; Heynekamp *et al*., 2008; Mendes *et al*., 2012)

เมื่อพิจารณาถึงโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิก อันได้แก่ กรดแกลลิก และสารแทนนินที่พบได้ในสมุนไพรเดี่ยวทั้ง 3 ชนิด พบว่าโมเลกุลของกรดแกลลิก ถึงแม้จะมี hydroxyl group และ carboxyl group ที่อาจสามารถสร้างพันธะโควาเลนส์กับกรดอะมิโนบน active site ของเอนไซม์ได้ แต่ด้วยโมเลกุลที่มีขนาดเล็ก โครงสร้างของกรดแกลลิกก็ยังไม่มีความจำเพาะกับ catalytic triad ของเอนไซม์ ดังนั้นจึงสามารถเห็นกรดแกลลิกมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรสได้บ้างเล็กน้อย (ข้อมูลไม่ได้แสดง) สำหรับสารแทนนิน จากการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ poly (ADP-ribose) glycohydrolase ของสารแทนนินบางตัว ซึ่งได้แก่ ellagitannins และ gallotannins พบว่าฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์จะแปรผันโดยตรงกับจำนวน galloyl group และการเกิด conjugation ของ galloyl group กับโมเลกุลกลูโคส (Tsai *et al*., 1991) โดยกลไกทั่วไปของสารแทนนินในการยับยั้งเอนไซม์ คือ การสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ hydroxyl ของแทนนิน กับหมู่ carboxyl ของโปรตีน ซึ่งทำให้เอนไซม์เปลี่ยนโครงสร้างจาก native form เป็น insoluble complex และสูญเสียคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยา โดยอัตราในการเกิด insoluble complex ยังขึ้นกับความเข้มข้นของเกลือ และค่า pH อีกด้วย (Buren & Robinson, 1969) นอกจากจำนวนของ hydroxyl group และ carboxyl group ในโมเลกุลแทนนินแล้ว โครงสร้าง lactone ของสารแทนนินใน chebulagic acid และ chebulinic acid ที่พบได้ในสมอไทย และสมอพิเภก ก็น่าจะเพิ่มความจำเพาะของโมเลกุลแทนนินกับ active site ของเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรสได้มากกว่าโมเลกุลของกรดแกลลิก แต่อย่างไรก็ตาม chebulagic acid และ chebulinic acid ไม่มีโครงสร้างของ lipophilic cycloalkyl group ในโมเลกุล ดังนั้นจึงอาจมีผลยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรสได้มากกว่ากรดแกลลิก แต่ก็ยังมีเปอร์เซ็นการยับยั้งที่ไม่สูงมาก ซึ่งเคยปรากฏในการทดลองก่อนหน้านี้เช่นกันว่า สารแทนนินที่ถูกแยกจากเปลือกของพืชในสกุล *Betula, Salix* และ *Pinus* สามารถตกตะกอนเอนไซม์ β-glucosidase แต่มีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ β-glucosidase น้อยมาก (Juntheikki & Julkunen-Tiitto, 2000)

สรุปผลการวิจัย

จากการทดสอบหาปริมาณและเปรียบเทียบสารฟีนอลิกรวม กรดแกลลิก สารแทนนิน และฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรส ของสารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลา ตรีผลาสูตรดัดแปลงและพืชสมุนไพรเดี่ยว พบว่า

- สารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลาสูตรดัดแปลง 2 ซึ่งมีอัตราส่วนของสมอพิเภกสูงกว่าตำรับตรีผลาสูตรอื่น มีปริมาณสารฟีนอลิกรวมสูงที่สุดที่ 514.4 ± 5.1 และ 516.3 ± 22.9 ไมโครกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมสารสกัด สำหรับการสกัดครั้งที่ 1 และการสกัดครั้งที่ 2 ตามลำดับ โดยสารสกัดชั้นน้ำของสมุนไพรเดี่ยวที่มีปริมาณสารฟีนอลิกรวมสูงที่สุดคือ สมอพิเภก
- สารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลาสูตรดัดแปลง 5 ซึ่งมีอัตราส่วนของมะขามป้อมสูงกว่าตำรับตรีผลาสูตรอื่น มีเปอร์เซ็นต์ของกรดแกลลิกมากที่สุดที่ 2.42 ± 0.09 % จากการสกัดครั้งที่ 1 และ 2.45 ± 0.09 % จากการสกัดครั้งที่ 2 โดยสารสกัดชั้นน้ำของสมุนไพรเดี่ยวที่มีปริมาณกรดแกลลิกสูงที่สุด คือ มะขามป้อม
- สารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลาสูตรดัดแปลง 4 ซึ่งมีอัตราส่วนรวมของมะขามป้อมและสมอไทยต่ำกว่าตำรับตรีผลาสูตรดัดแปลง 3 มีค่าเปอร์เซ็นต์สมมูลของกรดแทนนิกในสารสกัดมากที่สุดที่ 83.5 ± 6.9 % จากการสกัดครั้งที่ 1 และ 85.3 ± 3.4 % จากการสกัดครั้งที่ 2 โดยมีสมุนไพรเดี่ยวสมอไทยและมะขามป้อมมีค่าเปอร์เซ็นต์สมมูลของกรดแทนนิกในสารสกัดที่สูงและมีค่าไม่แตกต่างกัน
- ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรสเพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดมากขึ้น โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรส อยู่ระหว่าง 18 -22 % ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารสกัดชั้นน้ำของตรีผลาสูตรดัดแปลง 2 มีค่าสูงที่สุดสำหรับการสกัดครั้งที่ 1 และตรีผลาสูตร 1 มีค่าสูงที่สุดจากการสกัดครั้งที่ 2 แต่มีค่าต่ำกว่าสมุนไพรเดี่ยวมะขามป้อม และตัวยับยั้งที่ใช้เป็นตัวควบคุมบวก (orlistat) 2 เท่า และ 5 เท่า ตามลำดับ

จากการทดลองทั้งหมดพบว่าสารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลา และตรีผลาสูตรดัดแปลงมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรสน้อยมาก คือ มีค่าน้อยกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นของสารสกัดที่สูงถึง 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อัตราส่วนของสมุนไพรเดี่ยวในสารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลา และตรีผลาสูตรดัดแปลงมีผลต่อปริมาณฟีนอลิกรวม และปริมาณกรดแกลลิก แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณแทนนิน และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรส โดยปริมาณสารฟีนอลิกรวมในสารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลา และตรีผลาสูตรดัดแปลงอาจจะมีผลต่อฤทธิ์

การยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรส แต่ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรสไม่ได้แปรผันโดยตรงกับปริมาณกรดแกลลิก และสารแทนนิน

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาผลของสารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลา และตรีผลาสูตรดัดแปลงต่อฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรส พบว่าสารสกัดชั้นน้ำของตำรับตรีผลา และตรีผลาสูตรดัดแปลงมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรส ที่ต่ำ อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยอาจจะเลือกสารเดี่ยวที่พบได้ในสมุนไพรที่เป็นองค์ประกอบของตำรับตรีผลา และมีโครงสร้างคล้ายคลึงกับตัวยับยั้งแบบถาวรของเอนไซม์ 2 - 3 ชนิด มาทดลองจลนศาสตร์ของเอนไซม์แพนครีเอติกคอเลสเตอรอล เอสเทอเรสเพิ่มเติม ซึ่งอาจจะให้ข้อมูลเพิ่มเติมในการสนับสนุนฤทธิ์การลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดของตำรับตรีผลาได้

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บรรณานุกรม

ปารัณกุล ตั้งสุขฤทัย. (2552). ภูมิปัญญาไทย. *วารสารหมออนามัย, 18*(15), 54-56.

ปราณี ชวลิตธำรง,พัช รักษามั่น,ปราณี จันทเพ็ชร และเอมมนัส อัตตวิชญ์. (2539). พิษกึ่งเฉียบพลันของยาแผนโบราณตรีผลา. *วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 38*(3), 169-191.

สุภวรรณ จันทบูรณ์, ทิพาพรรณ ภูผิวคำ, พชรพันธุ์ พันธ์งาม, วิระพล ภิมาลย์ และประสบอร รินทอง. (2557). ผลของสารสกัดพิกัดตรีผลาต่อการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase. *วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน, 9*, 161.

สมาคม ร.ร. แพทย์แผนโบราณ สำนักวัดพระเชตุพนฯ พระนคร. (2516). *ปรมานสรรพคุณยาไทย* (ภาคสนาม), 171-172.

Adisakwattana, S., Intrawangso, J., Hemrid, A., Chanathong, B., & Mäkynen, K. (2011). Extracts of edible plants inhibit pancreatic lipase, cholesterol esterase and cholesterol micellization, and bind bile acids. *Food Technology and Biotechnology, 1*, 11–16.

Adisakwattana, S., Moonrat, J., Srichairat, S., Chanasit, C., Tirapongporn, H., Chanathong, B., *et al.* (2010). Lipid-lowering mechanisms of grape seed extract (*Vitis vinifera* L) and its antihyperlidemic activity. *Journal of Medicinal Plants Research, 4*, 2113-2120.

Akiyama, H., Kazuyasu, F., Yamasaki, O., Oono, T., & Iwatsuki, K. (2001). Antibacterial action of several tannins against *staphylococcus aureus*. *Journal of antimicrobial chemotherapy, 48*, 487-491.

Anila, L. & Vijayalakshmi, N.R. (2002). Flavonoids from *Emblica officinalis* and *Mangifera indica*-effectiveness for dyslipidemia. *Journal of Ethnopharmacology, 79*, 81-87.

Arif-Ullah, K., & Anwarl, H.G. (2008). Pharmacodynamic evaluation of *Terminalia belerica* for its antihypertensive effect. *Journal of Food and Drug Analysis, 16*, 6-14.

Arif-Ullah, K., & Anwarl, H.G. (2010). Antisecretory & analgesic activities of *Terminalia belerica*. *African Journal of Biotechnology, 9*(18), 2717-2719.

Awasthi, K.L. & Nath, B. (1968). Chemical examination of *Terminalia bellerica*, I. cardiac glycoside. *Journal of the Indian Chemical Society, 45*(10), 913-917.

Bharti, S., & Vijaya, K. (2012). Extraction of tannin by *Terminalia bellirica* (Gaertner) roxb seed from different provenances. *Journal of Phytology, 4*(6), 9-13.

Buren, J.P. & Robinson, W.B. (1969). Formation of complexes between protein and tannic acid. *Journal of Agriculture and Food Chemistry, 17*(4), 772–777.

Chang, C.L., & Lin, C.S. (2012). Phytochemical composition, antioxidant activity, and neuroprotective effect of *Terminalia chebula* Retzius extracts. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2012*, 1-7.

Chiou, S.Y., Lai, G.W., Lin, L.Y., & Lin, G. (2006). Kinetics and mechanisms of cholesterol esterase inhibition by cardiovascular drugs *in vitro*. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics, 43*(1), 52-55.

Djeridane, A., Brunel, J.M., Vidal, N., Yousfi, M., Ajandouz, E.H., & Stocker, P. (2008). Inhibition of porcine liver carboxylesterase by a new flavone glucoside isolated from *Deverra scoparia*. *Chemico-Biological Interactions, 172*(1), 22-26.

Elahi, M.M., Kong, Y.X., & Matata, B.M. (2009). Oxidative stress as a mediator of cardiovascular disease. *Oxidative Medicine and Cellular, 2*, 259–269.

Everette, J.D., Bryant, Q.M., Green, A.M., Abbey, Y.A., Wangila, G.W., & Walker, R.B. (2010). Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58*(14), 8139-8144.

Gershkovich, P., Sivak, O., Contreras-Whitney, S., Darlington, J.W., & Wasan, K.M. (2012). Assessment of cholesterol absorption inhibitors nanostructured aluminosilicate and cholestyramine using *in vitro* lipolysis model. *Journal of Pharmaceutical Sciences, 101*, 291-300.

Guerciolini, R. (1997). Mode of action of orlistat. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders, 21*(3), 12-23.

Hagerman, Ann E. 2002. Tannin chemistry. Miami University: Oxford, USA.

Heidrich, J.E., Contos, L.M., Hunsaker, L.A., Deck, L.M., & Vander Jag, D.L. (2004). Inhibition of pancreatic cholesterol esterase reduces cholesterol absorption in the hamster. *BMC Pharmacology, 4*, 1-9.

Heynekamp, J.J., Hunsaker, L.A., Vander Jagt, T.A., Royer, R.E., Deck, L.M., & Vander Jagt., D.L. (2008). Isocoumarin-based inhibitors of pancreatic cholesterol esterase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry, 16*, 5285–5294.

Hongbo, M, Yunpeng, D., Danyu, Z., Kun, L., & Tingguo, K. (2010). A new alternative to treat swine influenza a virus infection: extracts from *Terminalia chebula* Retz. *African Journal of Microbiology Research, 4*(6), 497-499.

Jeganathan, N.S., & Kannan, K. (2008). HPTLC method for estimation of ellagic acid and gallic acid in Triphala churanam formulations. *Research Journal of Phytochemistry*, *2*(1), 1-9.

Juang, L.J., Sheu, S.J., & Lin, T.C. (2004). Determination of hydrolyzable tannins in the fruit of *Terminalia chebula* Retz. by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Separation Science*, *27*(9), 718-724.

Juntheikki, M.R. & Julkunen-Tiitto, R. (2000). Inhibition of β-glucosidase and esterase by tannins from *Betula*, *Salix*, and *Pinus* species. *Journal of Chemical Ecology*, *26*(5), 1151-1165.

Kai, N.S., Nee, T.A., Ling, E.L., Ping, T.C, Kamariah, L., & Lin, N.K. (2015). Anti-hypercholesterolemic effect of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) seed on high-fat diet Sprague dawley rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, *8*(1), 6-13.

Kannan, P, Ramadevi, S.R., & Waheeta, H. (2009). Antibacterial activity of *Terminalia chebula* fruit extract. *African Journal of Microbiology Research*, *3*(4), 180-184.

Kaur, S., Michael, H., Arora, S., Harkonen, P.L., & Kumar, S. (2005). The *in vitro* cytotoxic and apoptotic activity of Triphala-an Indian herbal drug. *Journal of Ethnopharmacology*, *97*(1), 15-20.

Khan, K.H. (2009). Roles of *Emblica officinalis* in medicine-a review. *Botany Research International*, *2*(4), 218-228.

Krishnaveni, M., Mirunalini, S., Karthishwaran, K., & Dhamodharan, G. (2010). Antidiabetic and antihyperlipidemic properties of *Phyllanthus emblica* Linn. (Euphorbiaceae) on streptozotocin induced diabetic rats. *Pakistan Journal of Nutrition*, *9*(1), 43-45.

Latha, R.C.R., & Daisy, P. (2010). Influence of *Terminalia bellerica* Roxb. fruit extracts on biochemical parameters in streptozotocin Diabetic rats. *International Journal of Pharmacology*, *6*(2), 89-96.

Lin, L.U., Shu-wen, L., Shi-bo, J., & Shuguang, W . (2004). Tannin inhibits HIV-1 entry by targeting gp41 . *Acta Pharmacologica Sinica*, 25(2): 213-218.

Liu, X., Zhao, M., Wang, J., Yang, B., & Jiang, Y. (2008). Antioxidant activity of methanolic extract of emblica fruit (*Phyllanthus emblica* L.) from six regions in China. *Journal of Food Composition and Analysis*, *21*, 219–228.

Lopez-Candales, A., Bosner, M.S., Spilburg, C.A., & Lange, L.G. (1993). Cholesterol transport function of pancreatic cholesterol esterase: directed sterol uptake and esterification in enterocytes. *Biochemistry*, *32*(45), 12085-12089.

Maruthappan, V. & Sakthi, S.K. (2010). Hypolipidemic activity of Haritaki (*Terminalia chebula*) in artherogenic diet induced hyperlipidemic rats. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, *1*(2), 229-235.

Mehmood, M.H., Rehman, A., Rehman, N., & Gilani, A.H. (2013). Studies on prokinetic, laxative and spasmodic activities of *Phyllanthus emblica* in experimental animals. *Phytotherapy Research*, *27*, 1054–1060.

Mendes, A.A., Oliveira, P.C., & de Castro, H.F. (2012). Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *78*, 119– 134.

Meshram, G., Patil, B., Shinde, D., & Metangale, G. (2011). Effect of epigallocatedhin gallate isolated from *Terminalia bellerica* fruit rind on glucoamylase *activity in vitro*. *Journal of Appiled Pharmaceutical Science*, *1*(6), 115-117.

Moreno, D.A., Ilic, N., Poulev, A., Brasaemle, D.L., Fried, S.K., & Raskin, I. (2003). Inhibitory effects of grape seed extract on lipases. *Nutrition*, *19*, 876–879.

Myers-Payne, S.C., Hui, D.Y., Brockman, H.L., & Schroeder, F. (1995). Cholesterol esterase: a cholesterol transfer protein. *Biochemistry*, *34*(12), 3942-3947.

Naik, G.H., Priyadarsini, K.I., Bhagirathi, R.G., Mishra, B., Mishra, K.P., Banavalikar, M.M., *et al.* (2005). *In vitro* antioxidant studies and free radical reactions of Triphala, an Ayurvedic formulation and its constituents. *Phytotherapy Research*, *19*, 582–586.

Naik, G.H., Priyadarsini, K.I., & Mohan, H. (2006). Free radical scavenging reactions and phytochemical analysis of Triphala, an ayurvedic formulation. *Current Sciences*, *90*(8), 1100-1105.

Nandy, K.A., Podder, G., Sahu, P.N., & Mahato, B.S. (1989). Terpenoids and their glucosides from *Terminalia bellerica*. *Phytochemistry*, *28*(10), 2769-2772.

Nampoothiri, S.V., Prathapan, A., Cherian, O.L., Raghu, K.G., Venugopalan, V.V., & Sundaresan, A. (2011). *In vitro* antioxidant and inhibitory potential of *Terminalia bellerica* and *Emblica officinalis* fruits against LDL oxidation and key enzymes linked to type 2 diabetes. *Food and Chemical Toxicology*, *49*, 125–131.

Ngamkitidechakul, C., Jaijoy, K., Hansakul, P., Soonthornchareonnon, N., & Sireeratawong, S. (2010). Antitumour effects of *Phyllanthus emblica* L.: induction of cancer cell apoptosis and inhibition of *in vivo* tumour promotion and *in vitro* invasion of human cancer cells. *Phytotherapy Research*, *24*, 1405–1413.

Pawar, V., Lahorkar, P., & Anantha Narayana, D.B. (2009). Development of a RP-HPLC method for analysis of Triphala Curna and its applicability to test variations in Triphala Curna preparations. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *71*(4), 382–386.

Pereanez, J.A., Nunez, V., Patino, A.C., Londono, M., & Quintana, J.C. (2011). Inhibitory effects of plant phenolic compounds on enzymatic and cytotoxic activities induced by a snake venom phospholipase A_2. *Vitae Revista de la Facultad de Quimica Farmaceutica*, *18*(3), 295-304.

Poltanov, E.A., Shikov, A.N., Damien Dorman, H. J., Pozharitskaya, O.N., Makarov, V.G., Tikhonov, V.P., *et al.* (2009). Chemical and antioxidant evaluation of Indian gooseberry (*Emblica officinalis* Gaertn., syn. *Phyllanthus emblica* L.) supplements. *Phytotherapy Research*, *23*, 1309–1315.

Puri, H.S. 2003.Rasayana: Ayurvedic Herbs of Rejuvenation and Longevity. Taylor & Francis, London.

Rao, N.K., & Nammi, S. (2006). Antidiabetic and renoprotective effects of the chloroform extract of *Terminalia chebula* Retz. seeds in streptozotocin-induced diabetic rats. *BMC Complemenary and Alternative Medicine*, *6*, 1-17.

Row, L.R., & Murty, P.S. (1970). Chemical examination of *Terminalia bellerica*. *Indian Journal of Chemistry*, *8*(11), 1047-1048.

Russell L.H.Jr., Mazzio E, Badisa R.B., Zhu, Z.P., Agharahimi, M., Millington. D.J., *et al.* (2011). Differential cytotoxicity of Triphala and its phenolic constituent gallic acid on human prostate cancer LNCap and normal cells. *Anticancer Research*, *31*(11), 3739–3745.

Sabu, M.C., & Ramadasan, K. (2009). Antidiabetic and antioxidant activity of *Terminalia bellerica*. Roxb. *Indian Journal of Experimental Biology*, *47*, 270-275.

Saravanan, S., Srikumar, R., Manikandan, S., Jeya Parthasarathy, N., & Sheela Devi, R. (2007). Hypolipidemic effect of Triphala in experimentally induced hypercholesteremic rats. *The Pharmaceutical Society of Japan*, *127*(2), 385-388.

Shukla, R., Singh, P., Prakash, B., Anuradha, & Dubey, N.K. (2012). Antifungal, aflatoxin inhibitory and free radical-scavenging activities of some medicinal plants extracts. *Journal of Food Quality*, *35*, 182–189.

Singleton, V.L., Orthofer, R. & Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, *299*, 152-178.

Spigno, G., Tramelli, L., & de Faveri, D.M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, *81*, 200–208.

Suchalatha, S., & Devi, C.S. (2005). Protective effect of *Terminalia chebula* against lysosomal enzyme alterations in isoproterenol-induced cardiac damage in rats. *Experimental clinical cardiology*, *10*(2), 91-95.

Susumu, T., Ryoji, K., Takashi, T., Ying-Jun, Z., Isao, K., Michiaki, K. (2005) Suppression of tumor cell invasiveness by hydrolyzable tannins (plant polyphenols) via the inhibition of matrix metalloproteinase -2/-9 activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *330*, 1306–1313.

Tanaka, H., Mierau, I., & Ito, F. (1999). Purification and characterization of bovine pancreatic bile salt-activated lipase. *Journal of Biochemistry*, *125*, 883-890.

Tsai, Y.J., Abe, H., Maruta, H., Hatano, T., Nishina, H., Sakagami, H., *et al.* (1991). Effects of chemically defined tannins on poly (ADP-ribose) glycohydrolase activity. *Biochemistry International*, *24*, 889-897.

Vazirian, M., Khanavi, M., Amanzadeh, Y., & Hajimehdipoor, H. (2011). Quantification of gallic acid in fruits of three medicinal plants. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, *10*(2), 233-236.

Vivek K.B., Atiqur, R., Shruti, S., Savita, S., Yassir, A.S.M., Amzad, Hossain, M., & Archana, M. (2010). In *vitro* kinetics and antifungal activity of various extracts of *Terminalia chebula* seeds against plant pathogenic fungi. Archives of phytopathology and plant protection, *43*(8), 801-809.

Xiang, Y., Pei, Y., Qu, C., Lai, Z., Ren, Z., Yang, K., *et al.* (2011). *In vitro* antiHerpes Simplex virus activity of 1,2,4,6-tetra-O-galloyl-β-D-glucose from *Phyllanthus emblica* L. (Euphorbiaceae). *Phytotherapy Research*, *25*, 975–982.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ประวัติผู้วิจัย

นางสาวปฐมาภรณ์ ปฐมภาค (Miss Pathamaporn Pathompak)

เกิด 18 กรกฎาคม 2528

ที่ทำงาน คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ต.หลักหก อ.เมือง จ.ปทุมธานี 12000

เบอร์โทรศัพท์ +66866978964

Email: pathamaporm.p@gmail.com

ปริญญาตรี

สาขาชีววิทยา

ปีที่จบ พ.ศ. 2551

สถาบัน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ปริญญาโท

สาขาเภสัชศาสตร์

ปีที่จบ พ.ศ. 2555

สถาบัน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประเทศไทย

ผลงานวิจัย

Sakunpak, A., Suksaeree, J., Monton, C., **Pathompak, P.**, & Kraisintu, K. (2014). Quantitative analysis of γ-oryzanol content in cold pressed rice bran oil by TLC-image analysis method. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, *4*(2), 119-123.

Suksaeree, J., Monton, C., Charoenchai, L., & **Pathompak P.** (2014). Preparation and evaluation of rice bran oil mask. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, *6*(2), 530-533.

Sakunpak, A., Suksaeree, J., Monton, C., & **Pathompak P.** (2014). Development and quantitative determination of barakol in *Senna siamea* leaf extract by TLC-image analysis method. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, *6*(3), 267-270.

Sakunpak, A., Monton, C., **Pathompak, P.**, Settharaksa, S., Madaka, F., Kittiwisut, S., *et al.* (2013). Comparative evaluation of RP-HPLC and TLC-densitometric method for determination of barakol content in *Senna siamea* leaves. *Bull Health Science and Technology*, *11*(1), 13-18.

Charoonratana, T., Wungsintaweekul, J., **Pathompak, P.**, Georgiev M.I., Choi, Y.H., & Verpoorte, R. (2013). Limitation of mitragynine biosynthesis in *Mitragyna speciosa* (Roxb.) Korth. through tryptamine availability. *Zeitschrift für Naturforschung, 68*, 394-405.

Pathompak, P., & Wungsintaweekul, J. (2010). cDNA Cloning of Anthranilate Synthase Alpha-Subunits from Mitragyna speciosa. Proceeding of the 1st Current Drug Development International Conference. Woraburi Phuket Resort & Spa, Phuket, Thailand, May 6-8, 2010.

สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ

Molecular biology and Protein characterization

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University