

ชื่อวิทยานิพนธ์	การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของตำรับตรีผลา
ผู้เขียน	นางสาวศรีโสภา เรืองหนู
สาขาวิชา	เภสัชศาสตร์
ปีการศึกษา	2549

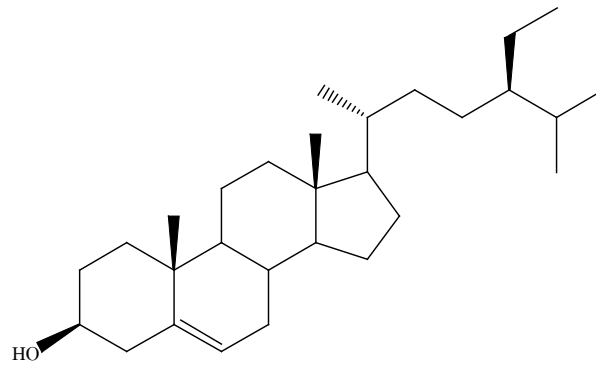
บทคัดย่อ

ตรีผลา เป็นตำรับยาสมุนไพรที่ใช้ปรับธาตุหรือรักษาความสมดุลของธาตุในร่างกาย ประกอบด้วย ผลมะขามป้อม (*Phyllanthus emblica* Linn.) ผลสมอไทย (*Terminalia chebula* Retz.) และผลสมอพิเภก (*Terminalia bellerica* Gaertn.) ในอัตราส่วน 1:1:1 การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ 4 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) เซลล์มะเร็งปากมดลูก (Hela) เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก (PC3) และเซลล์ปอด (MRC5) พร้อมทั้งหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในตำรับ วิธีการศึกษาทำโดยการนำสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด แบ่งเป็นส่วนเนื้อ และส่วนเมล็ด และตำรับตรีผลา มาสกัดด้วยน้ำและเอทานอลตามวิธีการสกัดที่หมอบ้านใช้ในการเตรียมยาเพื่อรักษาผู้ป่วย ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging และ lipid peroxidation in liposome ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี sulphorhodamine B (SRB) และหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยวิธี Folin-Ciocalteu สมุนไพรที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพดีที่สุดจะนำมาแยกสารสำคัญเพื่อใช้เป็น marker ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ จากการทดลองพบว่าสารสกัดชั้นน้ำและชั้นเอทานอลของสมุนไพรทั้งหมดและตำรับตรีผลา มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง โดยมีค่า EC_{50} อยู่ในช่วง 2.85 – 6.78 $\mu\text{g/ml}$ เนื้อมะขามป้อมชั้นเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 2.85 $\mu\text{g/ml}$ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดชั้นเอทานอลของสมุนไพรทุกชนิดที่เป็นส่วนประกอบของตำรับมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่าสารสกัดชั้นน้ำ การศึกษาฤทธิ์ต้าน lipid peroxidation พบว่าเมล็ดสมอไทยชั้นเอทานอลมีฤทธิ์ต้าน lipid peroxidation สูงสุด โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 5.01 $\mu\text{g/ml}$ และยังพบว่าสารสกัดชั้นเอทานอลของสมุนไพรทุกชนิดที่เป็นส่วนประกอบของตำรับและตำรับตรีผลา มีฤทธิ์ต้าน lipid peroxidation ดีกว่าสารสกัดชั้นน้ำ และพบว่าสารสกัดชั้นน้ำและชั้นเอทานอลของสมุนไพรทุกชนิดที่เป็นส่วนประกอบของตำรับและตำรับตรีผลา มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงอยู่ในช่วง 33.56 - 114.83

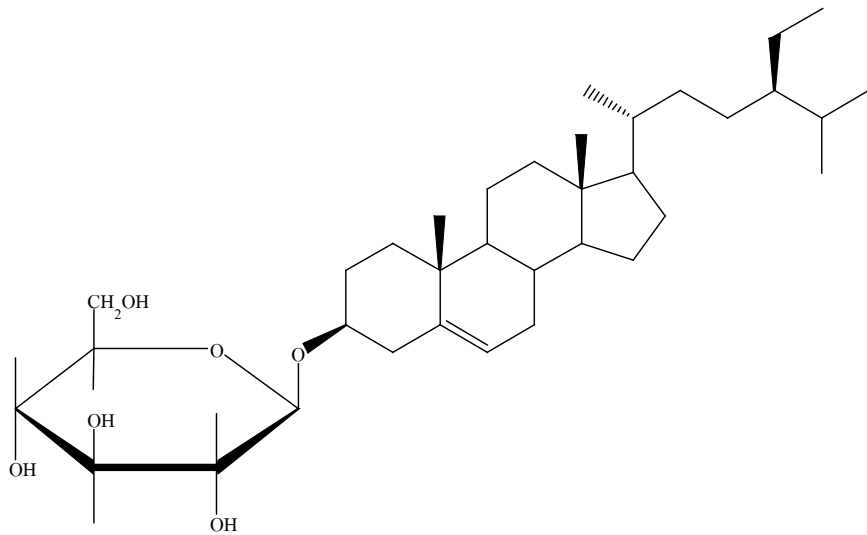
mg/g GAE และเนื้อสมอพิเภกชั้นน้ำมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุด 114.83 mg/g GAE สารสกัดชั้นน้ำมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงกว่าสารสกัดชั้นเอทานอล ยกเว้นชั้นเอทานอลของเนื้อมะขามป้อมซึ่งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงกว่าชั้นน้ำ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดชั้นน้ำและชั้นเอทานอลของสมุนไพรทั้งหมดและตำรับตรีผลามีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 3 ชนิดน้อย ($IC_{50} > 20 \mu\text{g/ml}$) สารสกัดเนื้อมะขามป้อมชั้นเอทานอลมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเต้านมสูงสุด ($IC_{50} = 29.863 \mu\text{g/ml}$) เนื้อมะขามป้อมชั้นน้ำมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งปากมดลูกมีค่า IC_{50} เท่ากับ $30.14 \mu\text{g/ml}$ และเนื้อสมอพิเภกชั้นน้ำมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากมีค่า IC_{50} เท่ากับ $33.79 \mu\text{g/ml}$ โดยสารสกัดทั้งหมดมีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ ($IC_{50} > 50 \mu\text{g/ml}$) ส่วนตำรับตรีผลาชั้นเอทานอลมีฤทธิ์จำเพาะกับมะเร็งปากมดลูก มีค่า IC_{50} เท่ากับ $35.82 \mu\text{g/ml}$

จากการศึกษาทางพฤกษเคมีของสารสกัดชั้นเอทานอลของเนื้อมะขามป้อมซึ่งเป็นพืชที่เป็นส่วนประกอบของตรีผลาและที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีที่สุด นำมาแยกสารบริสุทธิ์ ได้ 4 ชนิดคือ β -sitosterol (C2) β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside (C3) 5-hydroxymethylfurfural (C4) และ gallic acid (C5) เมื่อมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม ปากมดลูก ต่อมลูกหมาก และเซลล์ปกติ พบว่า gallic acid มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ $0.21 \mu\text{g/ml}$ ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม ปากมดลูก ต่อมลูกหมาก และเซลล์ปกติ โดยมีค่า $IC_{50} = 40.75, 69.12, 51.41$ และ มากกว่า $100 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ β -sitosterol, β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside และ 5-hydroxymethylfurfural ไม่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ($EC_{50} > 100 \mu\text{g/ml}$) และไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม ปากมดลูก และเซลล์ปกติ ($IC_{50} > 100 \mu\text{g/ml}$) เมื่อหาปริมาณ gallic acid โดย HPLC พบว่า gallic acid เป็นสารที่มีปริมาณมากในตำรับตรีผลา และสามารถใช้เป็น marker ในการวิเคราะห์ ในสารสกัดชั้นน้ำและชั้นเอทานอลของตำรับตรีผลามีค่าปริมาณ gallic acid เท่ากับ 6.00 และ 3.83 % w/w ตามลำดับ

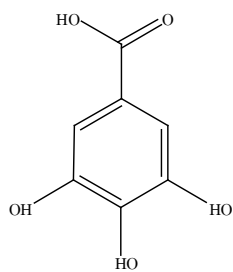
จากผลการศึกษารูปได้ว่า ตรีผลาเป็นตำรับยาไทยที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพเพราะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากพบสารกลุ่มฟีนอล คือ Gallic acid ในปริมาณที่สูง



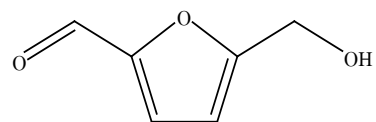
β -sitosterol



β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside



gallic acid



5-hydroxymethylfurfural

Thesis Title	Antioxidant and Cytotoxic Activities of Triphala Formula
Author	Miss Srisopha Ruangnoo
Major Program	Pharmaceutical Sciences
Academic Year	2006

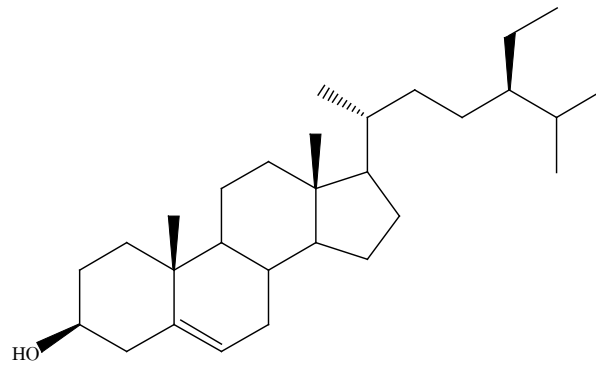
ABSTRACT

Triphala is a Thai traditional medicine used as adaptogen in the body. It consists of dried fruits of three kinds of dried fruits, *Phyllanthus emblica* Linn, *Terminalia chebula* Retz. and *Terminalia bellerica* Gaertn. in equal proportions. The objectives of this study were to determine antioxidant activity and total phenolic contents and evaluate cytotoxic activity against three types of human cancer cell lines; the human breast adenocarcinoma cell lines (MCF-7), the human cervical cancer cell lines (Hela) and prostate cancer (PC3) cell lines and one type of normal human cell line, lung cells (MRC5). DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging assay was used to test free radical scavenging activity and liposome assay was used to test lipid peroxidation, Folin-Ciocalteu's assay was used to determine the total content of phenolic contents and Sulphorhodamine B (SRB) assay was used to test cytotoxic activity against all types of the cell. The two extract procedures used water and ethanolic extraction were similar to those practiced by Thai traditional doctors. The pure compounds was isolated from the plant with the best activities. The results found that the all extracts exhibited high antioxidant activity with the EC₅₀ value in the range 2.85 – 6.78 µg/ml. The ethanolic extract of pulp of *P. emblica* had the highest antioxidant activity in DPPH assay with the EC₅₀ value of 2.85 µg/ml. The ethanolic extract of seeds of *T. chebula* Retz. showed the highest antioxidant activity in liposome assay (EC₅₀ = 5.01 µg/ml). Surprisingly the ethanolic extract of all plants showed higher antioxidant activity on both assay than water extracts. The both extracts of all plants showed high phenolic contents (33.56 - 114.83 mg/g GAE) and the water extract of pulp of *T. bellerica* had the highest total phenolic contents of 114.83 mg/g GAE. The total phenolic contents of the water extracts was found to be higher than the ethanolic extracts except for the pulp and seed of *P. emblica*. All plant extracts exhibited less cytotoxic activity against three types of cancer cell lines

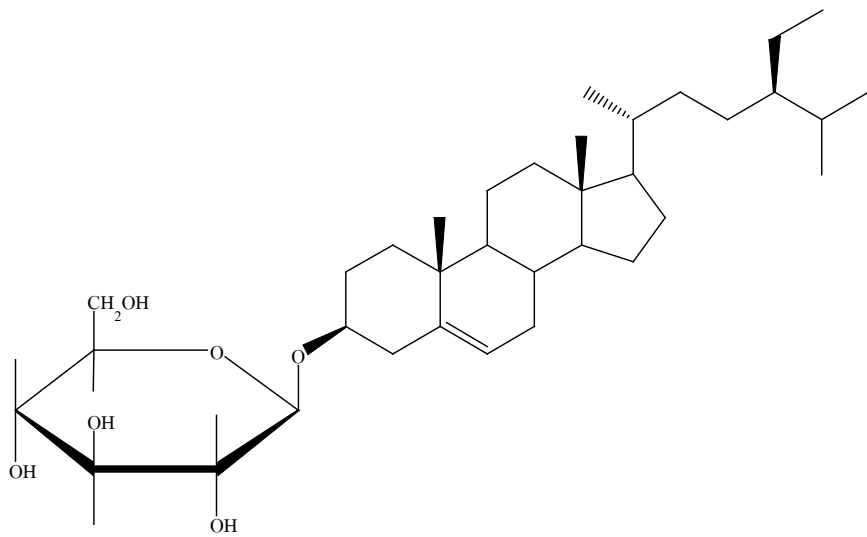
and normal cell. The IC_{50} value of the ethanolic extract of the pulp of *P. emblica* showed the highest cytotoxic activity against MCF-7 cancer cell line (IC_{50} = 29.86 μ g/ml) The water extract of the pulp of *P. emblica* showed the highest cytotoxic activity against Hela cancer cell lines (IC_{50} = 30.14 μ g/ml). In addition, the water extract of the pulp of *T. bellerica* showed the highest cytotoxic activity against PC3 cancer cell line (IC_{50} = 33.79 μ g/ml). They exhibited less active with normal cell line (IC_{50} > 50 μ g/ml). The ethanolic extract of Triphala showed specific cytotoxicity against Hela cancer cell lines (IC_{50} = 35.82 μ g/ml).

Bioassay guided fractionation was used for isolation of the pulp *Phyllanthus emblica* Linn. which showed the highest activity. Four pure compounds were found including β -sitosterol (C2), β -sitosterol-3-*O*- β -D-glucopyranoside (C3), 5-hydroxymethylfurfural (C4) and gallic acid (C5). These compounds were tested for antioxidant and cytotoxic activities. Among them, gallic acid is the only compound that indicates had antioxidant activity (EC_{50} = 0.21 μ g/ml) but no cytotoxicity against all type cancer cell lines (IC_{50} = 40.75, 69.12 and 51.41 μ g/ml of MCF7, Hela and PC3, respectively) and normal cell line (IC_{50} > 100 μ g/ml). β -sitosterol, β -sitosterol-3-*O*- β -D-glucopyranoside and 5-hydroxymethylfurfural exhibited no antioxidant activity (EC_{50} > 100 μ g/ml) and cytotoxicity against all types cancer cell lines and normal cell lines (IC_{50} > 100 μ g/ml). Analysis of gallic acid content by HPLC found that it is the main active ingredient in both water (6.00) and ethanolic (3.83) extract of Triphala.

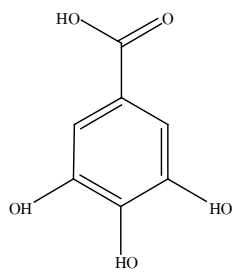
From these results concluded that Triphala is a useful preparation for health. It exhibited high antioxidant activity because it has high content of phenolic compounds such as gallic acid.



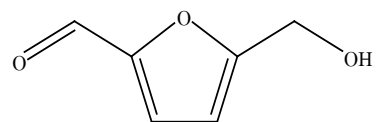
β -sitosterol



β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside



gallic acid



5-hydroxymethylfurfural