



ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านการอักเสบในหลอดทดลอง ของสารสกัดพิกัดตรีสมอ

Effects of Pikat Trisamo Extract on Antioxidant and Anti-inflammatory Activities

ดาริณา ใจเสรี¹ พรรณิภา แจ็กแดงพะเนาว์² รัชฎาวรรณ อรรคนิมาตย์¹ จตุพร ประทุมเทศ¹ และ ปราณี ศรีราช^{1*}

¹สาขาวิชาแพทย์แผนไทย คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร จังหวัดสกลนคร 47160

²สาขาวิชาแพทย์แผนไทย คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยเฉลิมกาญจนา จังหวัดศรีสะเกษ 33000

Dareena Jaiseri¹ Phahannipha Chekdaengphanao² Ratchadawan Aukkanimart¹ Jatuporn Prathumtet¹
and Pranee Sriraj^{1*}

¹Department of Thai Traditional Medicine, Faculty of Natural Resources, Rajamangala University of Technology Isan Sakon Nakhon Campus, Sakon Nakhon, 47160 Thailand

²Department of Thai Traditional Medicine, Faculty of Public Health, Chalermkarnchana University, Si Sa Ket, 33000 Thailand

*Corresponding Author, E-mail: srirajp11@gmail.com

Received: 11 June 2021 | Revised: 18 November 2021 | Accepted: 18 November 2021

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และต้านการอักเสบของสารสกัดสมุนไพรพิกัดตรีสมอที่ประกอบด้วย สมอไทย สมอเทศ และสมอพิเภก หมักด้วย 95% เอทานอล ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสารสกัดสมอเทศมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด โดยวิธี DPPH มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 4.89 ± 0.10 µg/mL วิธี ABTS มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 7.92 ± 0.15 µg/mL ซึ่งมีค่าต่ำกว่าสารมาตรฐาน Trolox ที่มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 6.29 ± 0.07 และ 10.96 ± 0.17 µg/mL และวิธี FRAP มีค่า FRAP value เท่ากับ 787.46 ± 8.02 mmol FeSO₄/g extract สมอเทศมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์มากที่สุดมีค่าเท่ากับ 583.37 ± 11.15 mg GAE/g extract และ 215.73 ± 3.06 mg QCE/g extract ตามลำดับ และนอกจากนี้สมอเทศมีฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง nitric oxide ได้ดีที่สุด โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 24.55 ± 0.53 µg/mL จากผลการศึกษานี้สรุปได้ว่าสารสกัดสมอเทศมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และต้านการอักเสบที่ดี

ABSTRACT

In this study were investigated the antioxidant and anti-inflammatory activities of Pikat Trisamo extracts, that including *Terminalia chebula* Retz., *Terminalia arjuna* Roxb. and *Terminalia belerica* Roxb. maceration with 95% ethanol. The results showed *T. arjuna* extracts had the highest antioxidant effects by DPPH assay with IC₅₀ values was 4.89 ± 0.10 µg/mL, ABTS assay with IC₅₀ values was 7.92 ± 0.15 µg/mL more than with standard Trolox IC₅₀ values were 6.29 ± 0.07 and 10.96 ± 0.17 µg/mL and FRAP assay value was 787.46 ± 8.02 mmol FeSO₄/g extract, respectively. *T. arjuna* had highest total phenolics and flavonoids content were 583.37 ± 11.15 mg GAE/g extract and 215.73 ± 3.06 mg QCE/g extract, respectively. Moreover, *T. arjuna* extracts can inhibit releasing of nitric

oxide with IC₅₀ value was 24.55 ± 0.53 µg/mL. The findings of this study indicated that the *T. arjuna* extract possesses the antioxidant and anti-inflammatory.

คำสำคัญ: พิกัดตรีสมอ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ

Keywords: Pikat Trisamo, Antioxidant, Anti-inflammation

บทนำ

การอักเสบเป็นการตอบสนองของร่างกายเมื่อได้รับการกระตุ้นจากสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรค ในกระบวนการอักเสบ เซลล์เม็ดเลือดขาว เช่น macrophage และ lymphocytes จะมีบทบาทที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ โดยหลั่ง inflammatory mediators ที่สำคัญออกมา ได้แก่ nitric oxide (NO), prostaglandins และ cytokine (Hseu et al., 2005) ซึ่ง NO เป็นอนุมูลอิสระที่ผลิตจากกระบวนการ L-arginine ได้เป็น L-citrulline โดยเอนไซม์ inducible NOS (iNOS) ระหว่างการอักเสบจากการกระตุ้นของสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย เช่น แบคทีเรีย รา และไวรัส (Sautebin, 2000)

อนุมูลอิสระ (free radicals) เป็นอะตอมที่มีโมเลกุลอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว ทำให้โมเลกุลไม่เสถียร ซึ่งสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่น ๆ ภายในเซลล์ส่งผลให้เกิดการทำลายเซลล์ และเนื้อเยื่อได้อย่างรุนแรง โดยทำลายสารพันธุกรรม และโปรตีน อาจก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ เช่น อัลไซเมอร์, พาร์กินสัน และโรคมะเร็ง เป็นต้น (Valko et al., 2007) ดังนั้นในปัจจุบันได้มีการศึกษาหาสารที่มาจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ในการต้านอักเสบ เนื่องจากสารธรรมชาติมีความปลอดภัย และมีผลข้างเคียงน้อยกว่า ยาหรือสารเคมีแผนปัจจุบันโดยส่วนใหญ่เป็นยากลุ่ม NSAIDs ซึ่งมีผลข้างเคียงทำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหาร (Vane and Botting, 1998) และในประเทศไทยมีการใช้สมุนไพรในการรักษาโรคกันเป็นระยะเวลานาน จากงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการค้นพบสารพฤกษเคมีจำนวนมากในสมุนไพร เช่น กลุ่มสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) (Tang and Halliwell, 2010) ซึ่งสารในกลุ่มนี้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (Shahidi et al., 1992) ต้านการอักเสบ (Zhang and Tsao, 2016) และต้านมะเร็ง (Tungmun-nithum et al., 2018) เป็นต้น มีรายงานหลายฉบับรายงานว่า สารสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ เช่น ขมิ้นชัน มีสาร curcumin สามารถลดการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจโดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ iNOS และ COX-2 (Cheung et

al., 2009) ดังนั้นการยับยั้ง NO เป็นหลักที่สำคัญในการยับยั้งหรือบรรเทากระบวนการอักเสบที่เกิดขึ้น

พิกัดยาตรีสมอ ประกอบด้วย สมุนไพรสสามชนิดคือ ผลสมอไทย (*Terminalia chebula* Retz.) ผลสมอเทศ (*Terminalia arjuna* Roxb.) และผลสมอพิเภก (*Terminalia belerica* Roxb.) โดยสรรพคุณทางเภสัชกรรมไทยนั้น มีสรรพคุณ แก้เสมหะ บำรุงธาตุ แก้ไข้ ผายธาตุ รู้ถ่ายรู้ปัดเอง จากงานศึกษาที่ผ่านมาพบว่า สมอไทย สมอเทศ และสมอพิเภก มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Sivalokanathan et al., 2006; Saha and Verma, 2016) ต้านการอักเสบ (Zhong et al., 2014; Gupta et al., 2021) ต้านมะเร็ง (Wang et al., 2015) ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Asae et al., 2019) เป็นต้น รวมถึงการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าพิกัดตรีสมอมีสาร phenolics และ flavonoids เป็นองค์ประกอบ (Chusri et al., 2015) และยังพบว่าพิกัดตรีสมอมีสารสำคัญอยู่หลายชนิด เช่น gallic acid, chebulagic acid และ chebulinic acid เป็นต้น (Suksaeree and Monton, 2021) นอกจากนี้ยังมีรายงานของสมุนไพรที่อยู่ในพิกัดตรีสมอคือสมอไทย และสมอพิเภก มีสาร gallic acid เป็นองค์ประกอบ (Department of Medical Sciences, 2017) ซึ่งมีรายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า สาร gallic acid สามารถต้านอนุมูลอิสระ และต้านการอักเสบ (Locatelli et al., 2013) โดยลดการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบ อาทิเช่น tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), และ iNOS เป็นต้น (Kim et al., 2006)

เนื่องจากสมุนไพรที่อยู่ในพิกัดตรีสมอมีสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย และต้านมะเร็ง ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ ทำการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยยับยั้งการสร้าง NO ของสมุนไพรพิกัดตรีสมอ เพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนในการใช้ประโยชน์ของสมุนไพรต่อไป

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. ตัวอย่างพืชสมุนไพร

สมุนไพรที่ใช้ในการวิจัยประกอบด้วย เนื้อผลสมอไทย สมอเทศ และสมอพิเภก นำมาจากอำเภอพังโคน จังหวัดสกลนคร และได้รับการตรวจยืนยันเอกลักษณ์ของสมุนไพรโดยผู้ช่วยศาสตราจารย์พิเศษฐ เวชวิฐาน สาขาแพทย์แผนไทย คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร จังหวัดสกลนคร ซึ่งเป็นผู้เชี่ยวชาญทางด้านพรรณพืชท้องถิ่นในภาคอีสาน

2. วิธีการเตรียมสารสกัด

ทำการนำส่วนของเนื้อผลสมอไทย สมอเทศ และสมอพิเภกบดให้ละเอียด และกรองร่อนผ่านตะแกรงเบอร์ 80 จากนั้นสกัดด้วยวิธีแช่หมัก (maceration) โดยนำผงสมุนไพรปริมาณ 900 กรัม ผสมกับตัวทำละลาย 95% เอทานอล ปริมาตร 1.8 ลิตร หรืออัตราส่วน (1:2) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลากรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman No. 1) และนำไประเหยตัวทำละลาย โดยใช้เครื่อง Rotary evaporator ซึ่งหาน้ำหนักของส่วนสารสกัดหาย (% Yield) เก็บไว้ในตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

3.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) เตรียมสารสกัดสมอไทย สมอเทศ สมอพิเภก และพิกัดตรีสมอที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0.5 1 2 4 8 16 และ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ 95% เอทานอลเป็นตัวทำละลาย เติมลงใน 96-well plate ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตามด้วยสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที ครบเวลาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร (Turapra et al., 2016) โดยใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐาน จากนั้นคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ และนำไปคำนวณค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งสารอนุมูลอิสระที่ร้อยละ 50 (IC₅₀) โดยมีสูตรคำนวณดังต่อไปนี้

$$\% \text{Radical Scavenging} = [1 - (AA - AB) / AC] \times 100$$

เมื่อ AA = ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดกับ DPPH

AB = ค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอล

AC = ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH กับเอทานอล

3.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี

2,2-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid (ABTS) เตรียมสารละลาย ABTS โดยซึ่งสารเอบีทีเอส 3.6 มิลลิกรัม ผสมกับ potassium persulfate 0.67 มิลลิกรัม โดยใช้ในน้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย ก่อนนำไปใช้ทำการบ่มในที่มืดเป็นระยะเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นทำการทดสอบกับสารสกัดสมอไทย สมอเทศ สมอพิเภก และพิกัดตรีสมอที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0.5 1 2 4 8 16 และ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการเติมสารสกัดปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตามด้วย สารละลาย ABTS^{•+} ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลาทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร (Turapra et al., 2016) โดยใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐาน จากนั้นคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ และนำไปคำนวณค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งสารอนุมูลอิสระที่ร้อยละ 50 (IC₅₀) โดยมีสูตรคำนวณดังต่อไปนี้

$$\% \text{Radical Scavenging} = [1 - (AA - AB) / AC] \times 100$$

เมื่อ AA = ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดกับ ABTS

AB = ค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอล

AC = ค่าการดูดกลืนแสงของ ABTS กับเอทานอล

3.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric

reducing antioxidant power (FRAP) การเตรียมสารละลาย FRAP reagent โดยการผสมสาร Acetate buffer pH 3.6 (300 มิลลิโมลาร์) สาร FeCl₃ (20 มิลลิโมลาร์) และ สาร TPTZ ในสารละลาย HCl (40 มิลลิโมลาร์) ในอัตราส่วน 10:1:1 เตรียมสารสกัดสมอไทย สมอเทศ สมอพิเภก และพิกัดตรีสมอที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายใน 95% เอทานอล จากนั้นเติมสารสกัดสมุนไพรปริมาตร 20 ไมโครลิตร และสารละลาย FRAP reagent 80 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate บ่มไว้ในที่มืดเป็นระยะเวลา 4 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร (Turapra et al., 2016) นำผลการทดลองที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟของสารมาตรฐาน ferrous sulfate และคำนวณให้อยู่ในหน่วยของ mg FeSO₄ equivalent/g Extracts

4. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ใช้เทคนิค Folin-Ciocalteu method ดัดแปลงวิธีของ Miliauskas et al. (2004) เทียบกับสารมาตรฐานคือ Gallic acid โดยนำสาร

ตัวอย่างความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เติมน้ำลงใน 96-well plate จากนั้นเติมสารละลาย 10% Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ 7.5% Sodium carbonate (Na_2CO_3) ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเทียบกับกราฟมาตรฐาน ปริมาณที่ได้แสดงในหน่วย mg GAE/g of extract (Miliauskas et al., 2004)

5. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดใช้เทคนิค Aluminium chloride colorimetric assay ตามวิธีของ Shackelford et al. (2009) เทียบกับสารมาตรฐาน คือ Quercetin โดยนำสารตัวอย่างความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เติมน้ำลงใน 96-well plate จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 125 ไมโครลิตร และ 5% NaNO_2 ปริมาตร 7.5 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดอุณหภูมิห้อง 5 นาที ครบเวลาเติม 10% Aluminium chloride (AlCl_3) ปริมาตร 15 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด 5 นาที เติมน้ำกลั่น 1 M NaOH ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 27.5 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเทียบกับกราฟมาตรฐาน ปริมาณที่ได้แสดงในหน่วย mg QCE/g of extract (Shackelford et al., 2009)

6. การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรต่อเซลล์แมคโครฟาจ

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์แมคโครฟาจใช้วิธี Sulforhodamine B assay เติมน้ำ Raw 264.7 ลง 96-well plate (1×10^5 cells/well) จากนั้นเติมสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ในปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากนั้นทำการยึดเซลล์ให้ติดกับเพลทโดยการเติม 10% TCA (Trichloroacetic acid) 70 ไมโครลิตร ทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 40 นาทีในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นล้างออกด้วยน้ำ ฝึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เมื่อแห้งแล้วนำเซลล์ที่ได้มาย้อมด้วย 0.4% SRB (Sulforhodamine B) 50 ไมโครลิตร เป็นระยะเวลา 30 นาที ล้างสีด้วย 1% acetic acid แล้วทิ้งให้แห้งที่

อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม 10 mM Tris base pH 8 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader ซึ่งค่าการดูดกลืนแสงจะบ่งบอกการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ นำมาคำนวณโดยใช้สูตรดังต่อไปนี้ (Skehan et al., 1990)

% Inhibition = $[(\text{OD control} - \text{OD test}) / \text{OD control}] \times 100$
เมื่อ OD control คือ ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ RAW 264.7 ที่ไม่ได้ใส่สารสกัด

OD test คือ ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ RAW 264.7 ที่ใส่สารสกัด

7. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ ดัดแปลงจากวิธีของ Kalaiselvan and Rasool (2016) การศึกษาครั้งนี้ใช้ RAW 264.7 (Mouse leukaemic monocyte macrophage) (cat. no. 91062702) โดยเฉพาะเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจ (Raw 264.7) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) ที่ประกอบด้วย 10% fetal bovine serum (FBS) 1% penicillin streptomycin 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และ L-glutamine 200 mM เพาะเลี้ยงเซลล์อยู่ในตู้สภาพ 5% คาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส Subculture ทุก ๆ 2 วัน เมื่อเซลล์เจริญเติบโตหนาแน่น 80% นำมาทดสอบ โดยเติม Raw 264.7 ลง 96-well plate (1×10^5 cells/well) บ่มไว้ที่ 5% คาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 90 นาที ครบเวลาดูดส่วนใสออกจากนั้นเติม lipopolysaccharide (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดสถานะการอักเสบ พร้อมกับสารตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเลี้ยงอยู่ในตู้ 5% คาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดส่วนใสปริมาตร 100 ไมโครลิตร ออกมาไว้ที่ 96-well plate ใหม่ และเติม Griess reagent (modified) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ในที่มืดอุณหภูมิห้อง 15 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้ indomethacin เป็นสารมาตรฐาน จากนั้นคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์มีสมการการคำนวณดังต่อไปนี้ และคำนวณหาค่า IC_{50}

% Inhibition = $[(A-B) / (A-C)] \times 100$

A-C : nitrite concentration; A : LPS (+), sample (-),

B : LPS (+), sample (+), C : LPS (-), sample (-)

8. วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การศึกษาค้นคว้านี้ทุกการทดสอบทำการเปรียบเทียบผลของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด และพิกัดตรีสมอ โดยคิดค่าเฉลี่ยของข้อมูลอย่างน้อย 3 ซ้ำ โดยเปรียบเทียบแบบ one-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรม SPSS ฉบับสมบูรณ์ V.19

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

1. ผลการสกัดสมุนไพรพิกัดตรีสมอ

ร้อยละผลผลิตของน้ำหนักแห้งของสมุนไพร (% Yield) จากการสกัดโดยวิธีการหมักกับตัวทำละลาย 95% เอทานอลของสมุนไพรสมอไทย สมอเทศ สมอพิเภก และพิกัดตรีสมอพบว่าสมุนไพรที่มีร้อยละผลผลิตของน้ำหนักแห้งมากที่สุดคือสมอไทย รองลงมาคือ พิกัดตรีสมอ สมอพิเภก และสมอเทศ โดยมีค่าร้อยละผลผลิตเท่ากับ 12.58 11.25 10.88 และ 10.46 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1

2. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบฤทธิ์ การต้านอนุมูลอิสระใช้เทคนิคที่แตกต่างกันทั้ง 3 วิธีคือ DPPH ABTS และ FRAP โดยผลการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมอไทย สมอเทศ สมอพิเภก พิกัดตรีสมอ และสารมาตรฐาน Trolox ดังแสดงในตารางที่ 1

การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เป็นการวัดความสามารถของสารสกัดที่สามารถให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระเมื่อ DPPH เกิดปฏิกิริยารีดักชันจากสารต้านอนุมูลอิสระจะเกิดการเปลี่ยนสีจากสีม่วงเข้มจะจางลงเป็นสีเหลือง โดยผลการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดพบว่า สารสกัดสมอเทศมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด รองลงมาคือ พิกัดตรีสมอ, สมอพิเภก และสมอไทย โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 4.89 ± 0.10 6.41 ± 0.04 6.70 ± 0.23 และ 14.52 ± 0.54 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ อีกทั้งยังพบว่าสารสกัดสมอเทศมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่าสารมาตรฐาน Trolox ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.29 ± 0.07 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) สอดคล้องกับงานวิจัยของ สร้อยเพชร และคณะ (2558) พบว่าตำรับตรีผลาที่มีส่วนประกอบของสมอไทย สมอพิเภก และมะขามป้อมที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์

การต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH มีค่า EC_{50} เท่ากับ 4.17 ± 0.38 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mahdi et al. (2011) รายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ของสาร gallic acid ในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.28 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (สร้อยเพชร และคณะ, 2558; Mahdi et al., 2011)

ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระวิธี ABTS เป็นการวัดคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระโดยการออกซิไดซ์สาร ABTS ด้วยโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ให้กลายเป็น $ABTS^{+}$ ที่มีสีฟ้าเขียว เมื่อนำมาทดสอบกับสารต้านอนุมูลอิสระค่าการดูดกลืนแสงของ $ABTS^{+}$ จะค่อย ๆ ลดลงซึ่งข้อดีของการทดสอบด้วยวิธีนี้สามารถทดสอบได้ทั้งสารที่ละลายในน้ำ และละลายในไขมัน โดยการศึกษาพบว่า สารสกัดพิกัดตรีสมอมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดรองลงมาคือ สมอพิเภก สมอเทศ และสมอไทย โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 7.18 ± 0.07 7.47 ± 0.03 7.92 ± 0.15 และ 12.00 ± 0.13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ อีกทั้งยังพบว่าสารสกัดสมอพิเภกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่าสารมาตรฐาน Trolox ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 10.96 ± 0.17 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Chusri et al. (2015) พบว่าพิกัดตรีสมอ มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้ดีรองลงมาจากพิกัดจตุผลาธิกะ ทำการทดสอบด้วยวิธี DPPH และ ABTS โดยพิกัดตรีสมอ มีค่า Scavenging capacity เท่ากับ 93.50 ± 0.3 และ 100.23 ± 0.19 ตามลำดับ ส่วนพิกัดจตุผลาธิกะ มีค่า Scavenging capacity เท่ากับ 90.96 ± 5.69 100.34 ± 0.22 ตามลำดับ (Chusri et al., 2015)

ผลทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP เป็นการทดสอบความสามารถของอนุมูลอิสระในการรีดิวซ์เฟอร์ริกหรือให้อิเล็กตรอนจาก Fe^{3+} -TPTZ เป็น Fe^{2+} -TPTZ โดยผลการศึกษา พบว่าสารสกัดสมอเทศมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดรองลงมาคือ พิกัดตรีสมอ, สมอพิเภก และสมอไทย ซึ่งมีค่าเท่ากับ 787.46 ± 8.02 779.26 ± 14.68 778.06 ± 18.84 และ 550.33 ± 24.51 mmol $FeSO_4/g$ ตามลำดับ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Babu et al. (2013) พบว่าตรีผลามีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้ดีเมื่อศึกษาด้วยวิธี FRAP แต่น้อยกว่า ascorbic acid (Babu et al., 2013) นอกจากนี้เมื่อนำสมุนไพรสมอไปทดสอบหาสารสำคัญด้วยเทคนิค High Performance Liquid

Chromatography พบว่าตรีสมอมือองค์ประกอบของสารสำคัญหลายชนิด เช่น gallic acid, chebulagic acid และ chebulinic acid เป็นต้น (Suksaeree and Monton, 2021) สารสำคัญ

หลายชนิดเป็นสารกลุ่มฟีนอลิกมีโครงสร้างหลักประกอบด้วย Aromatic ring ซึ่งมีไฮดรอกซิล (OH) เป็นองค์ประกอบดังนั้นทำให้มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้ดี

ตารางที่ 1 ร้อยละผลผลิต และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมอไทย สมอเทศ สมอพิเภก และพิกัดตรีสมอ

สารตัวอย่าง	% Yield	DPPH	ABTS	FRAP
		IC ₅₀ (µg/ml ± SEM)	IC ₅₀ (µg/ml ± SEM)	(mmol FeSO ₄ /g extract ± SEM)
สมอไทย	12.58	14.52 ± 0.54 ^c	12.00 ± 0.13 ^c	550.33 ± 24.51 ^a
สมอเทศ	10.46	4.89 ± 0.10 ^a	7.92 ± 0.15 ^a	787.46 ± 8.02 ^b
สมอพิเภก	10.88	6.70 ± 0.23 ^b	7.47 ± 0.03 ^a	778.06 ± 18.84 ^b
พิกัดตรีสมอ	11.25	6.41 ± 0.04 ^b	7.18 ± 0.07 ^a	779.26 ± 14.68 ^b
Trolox	-	6.29 ± 0.07 ^b	10.96 ± 0.17 ^b	-

หมายเหตุ: a, b, c ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์

สารตัวอย่าง	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก	ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์
	mg GAE/g of extract	mg QCE/g of extract
สมอไทย	266.78 ± 5.06 ^a	150.53 ± 4.05 ^a
สมอเทศ	583.37 ± 11.15 ^c	215.73 ± 3.06 ^c
สมอพิเภก	350.49 ± 22.54 ^b	187.60 ± 0.94 ^b
พิกัดตรีสมอ	424.12 ± 15.09 ^b	189.80 ± 1.36 ^b

หมายเหตุ: a, b, c ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

3. ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยใช้เทคนิค Folin-Ciocalteu method โดยสารประกอบฟีนอลจะทำปฏิกิริยาเชิงซ้อนกับ phosphotungstic acid และ phosphomolybdic acid เป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงินผลการศึกษาพบว่าสมอเทศมีสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด รองลงมาคือ พิกัดตรีสมอ, สมอพิเภก และสมอไทย โดยมีปริมาณเท่ากับ 583.37 ± 11.15 424.12 ± 15.09 350.49 ± 22.54 และ 266.78 ± 5.06 mg GAE/g of extract ดังแสดงในตารางที่ 2 สอดคล้องกับการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่พบว่าสมอเทศมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้ดี นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Chusri et al. (2015) พบว่าในยาจากสมุนไพรทั้งหมด 18 ตำรับมีองค์ประกอบของสารกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมดและยังมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกจะมีหมู่ฟีนอลบนวงเบนซีนทำให้สามารถให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ ดังนั้นจึงสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ (Chusri et al., 2015)

4. ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์โดยใช้เทคนิค Aluminium chloride colorimetric เป็นการทำให้ปฏิกิริยากันกับหมู่ไฮดรอกซิลบนวงฟีนอลเกิดเป็นหมู่คีโตจากนั้น aluminum ion จะไปจับหมู่คีโตบนวงฟีนอลของฟลาโวนอยด์เกิดเป็นโครงสร้างเชิงซ้อนขึ้นมาเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นเบสเนื่องจากส่วนใหญ่เป็นสารมีขั้วละลายง่าย ทำให้สามารถให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระได้ (Zhu et al., 2010) โดยผลการศึกษาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ พบว่าสมอเทศมีสารประกอบฟลาโวนอยด์มากที่สุดรองลงมาคือ พิกัดตรีสมอ, สมอพิเภก และสมอไทย โดยมีปริมาณเท่ากับ 215.73 ± 3.06 189.80 ± 1.36 187.60 ± 0.94 และ 150.53 ± 4.05 mg QCE/g of extract ดังแสดงในตารางที่ 2 สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ผลสมอเทศพบสาร arjunone (Amalraj and Gopi, 2017) ผลสมอไทยพบสาร luteolin และ quercetin (Klika et al., 2004; Kumar et al., 2009) ซึ่งเป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์

5. ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรรตอเซลล์แมคโครฟาจ Raw 264.7

จากการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรรตอเซลล์, สมอเทศ, สมอพิเภก และพิกัดตรีสมอต่อเซลล์แมคโครฟาจ ที่ความเข้มข้นมากที่สุดคือ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ Raw 264.7 เช่นเดียวกับสารมาตรฐาน ที่ความเข้มข้นที่ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 3 สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่าสาร gallic acid และ ellagic acid ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีพิษต่อเซลล์ Raw 264.7 เช่นเดียวกัน (BenSaad et al., 2017)

6. ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์

จากการศึกษาการสร้าง nitric oxide ของเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ซึ่ง NO เป็น free radical gas ที่ไม่เสถียรสามารถก่อให้เกิดความเสียหายกับเซลล์หรือเนื้อเยื่อ และเป็นสารสื่อกลางที่สำคัญในกระบวนการอักเสบ (Korhonen et al., 2005) จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสมอเทศมีฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ได้ดีที่สุดรองลงมาคือ พิกัดตรีสมอ สมอพิเภก และสมอไทย โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 24.55 ± 0.53 , 24.66 ± 1.06 , 31.01 ± 0.58 และ 49.76 ± 1.11 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน Indomethacin (IC_{50} เท่ากับ 19.51 ± 0.68 ไมโครกรัมต่อ

มิลลิลิตร) ดังแสดงในตารางที่ 3 ซึ่งการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า สารสกัดสมุนไพรรตอเซลล์มีสาร gallic acid, ascorbic acid, tannic acid, chebulagic acid และ chebulic acid (Kalaiselvan and Rasool, 2016) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของสารในกลุ่มฟีนอลิก สามารถยับยั้งการหลั่ง NO ในเซลล์ Raw 264.7 ลดการหลั่งโปรตีนที่ก่อให้เกิดการอักเสบของเซลล์ได้แก่ TNF- α , IL-1 β และ IL-6 เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่าสาร gallic acid และ ellagic acid สามารถยับยั้งการหลั่ง NO และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ เช่น IL-6, PGE-2 และ COX-2 เป็นต้น (BenSaad et al., 2017) ดังนั้นสมุนไพรรตอเซลล์ที่มีสารประกอบฟีนอลิกสูง มีความสัมพันธ์กับกระบวนการต้านอนุมูลอิสระ และต้านการอักเสบ

สรุปผลการวิจัย

ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ ฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง nitric oxide และความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรรตอเซลล์แมคโครฟาจ Raw 264.7 จากสารสกัดสมุนไพรรตอเซลล์ที่ประกอบด้วยผลสมอไทย สมอเทศ และสมอพิเภก โดยสมุนไพรรตอเซลล์ที่ได้ดีที่สุดคือ สมอเทศ ดังนั้นเพื่อสนับสนุนการเป็นการพัฒนาการใช้สมุนไพรรตอเซลล์ศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านอื่น ๆ ของสมุนไพรรตอไป

ตารางที่ 3 ผลการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์และความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์แมคโครฟาจ

สารตัวอย่าง	NO assay ($\mu\text{g/mL}$)	SRB assay ($\mu\text{g/mL}$)
สมอไทย	49.76 ± 1.11^d	>100
สมอเทศ	24.55 ± 0.53^b	>100
สมอพิเภก	31.01 ± 0.58^c	>100
พิกัดตรีสมอ	24.66 ± 1.06^b	>100
Indomethacin	19.51 ± 0.68^a	>50

หมายเหตุ: a, b, c, d ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณสำนักงานบริหารกองทุนภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปราณี ศรีราช ดร.รัชฎาวรรณ อรรถนิมาตย์ และมหาลัยเทคโนโลยีราชชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร ที่สนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

สร้อยเพชร เนตรอนงค์, พิระพงค์ กิติภาวรงค์, ศรีโสภา เรืองหนู, และอรุณพร อัฐรัตน์. (2558). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมกับระยะเวลาการสกัด และการศึกษาความคงตัวของผงยาตำรับตรีผลา. วารสารธรรมศาสตร์เวชสาร 15(3): 472-479.

- Amalraj, A. and Gopi, S. (2017). Medicinal properties of *Terminalia arjuna* (Roxb.) Wight & Arn.: a review. *Journal of Traditional and Complementary Medicine* 7(1): 65-78.
- Asae, A., Meemak, P., Poonthananiwatkul, B., Hemtragoonwong, R. and Sama-ae, S. (2019). Antibacterial Activity of Ethanolic Extract of Trisamo Against Diarrheal Pathogen. *Princess of Naradhiwas University Journal* 11(3): 241-248.
- Babu, D., Gurumurthy, P., Borra, S. K. and Cherian, K. M. (2013). Antioxidant and free radical scavenging activity of triphala determined by using different in vitro models. *Journal of Medicinal Plants Research* 7(39): 2898-2905.
- BenSaad, L. A., Kim, K. H., Quah, C. C., Kim, W. R. and Shahimi, M. (2017). Anti-inflammatory potential of ellagic acid, gallic acid and punicalagin A&B isolated from *Punica granatum*. *BMC complementary and alternative medicine*. 17(1): 1-10.
- Cheung, K. L., Khor, T. O. and Kong, A. N. (2009). Synergistic effect of combination of phenethyl isothiocyanate and sulforaphane or curcumin and sulforaphane in the inhibition of inflammation. *Pharmaceutical Research* 26(1): 224-231.
- Chusri, S., Singthong, P. and Kaewmanee, T. (2015). Antioxidant, anticancer, and cytotoxic effects of Thai traditional herbal preparations consumed as rejuvenators. *CyTA-Journal of Food* 13(1): 40-48.
- Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. (2017). *Thai Herbal Pharmacopoeia 2017*. Bangkok: The Agricultural Co-operative Federation of Thailand. pp. 410-428.
- Gupta, A., Kumar, R., Ganguly, R., Singh, A. K., Rana, H. K. and Pandey, A. K. (2021). Antioxidant, anti-inflammatory and hepatoprotective activities of *Terminalia bellirica* and its bioactive component ellagic acid against diclofenac induced oxidative stress and hepatotoxicity. *Toxicology reports* 8(1): 44-52.
- Hseu, Y. C., Wu, F. Y., Wu, J. J., Chen, J. Y., Chang, W. H., Lu, F. J. and Yang, H. L. (2005). Anti-inflammatory potential of *Antrodia camphorata* through inhibition of iNOS, COX-2 and cytokines via the NF- κ B pathway. *International Immunopharmacology* 5(13-14): 1914-1925.
- Klika, K. D., Saleem, A., Sinkkonen, J., Kähkönen, M., Loponen, J., Tähtinen, P. and Pihlaja, K. (2004). The structural and conformational analyses and antioxidant activities of chebulinic acid and its thrice-hydrolyzed derivative, 2, 4 - chebuloyl- β -D-glucopyranoside, isolated from the fruit of *Terminalia chebula*. *Arkivoc* 7(7): 83-105.
- Korhonen, R., Lahti, A., Kankaanranta, H. and Moilanen, E. (2005). Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Current Drug Targets-Inflammation and Allergy* 4(4): 471-479.
- Kim, S. H., Jun, C. D., Suk, K., Choi, B. J., Lim, H., Park, S. and Shin, T. Y. (2006). Gallic acid inhibits histamine release and pro-inflammatory cytokine production in mast cells. *Toxicological Sciences* 91(1): 123-131.
- Kumar, B. S., Lakshman, K., Jayaveera, K. N., Krishna, N. V., Manjunath, M., Suresh, M. V. and Naik, S. (2009). Estimation of rutin and quercetin in *Terminalia chebula* by HPLC. *Asian Journal of Research in Chemistry* 2(4): 388-389.
- Kalaiselvan, S. and Rasool, M. K. (2016). Triphala herbal extract suppresses inflammatory responses in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages and adjuvant-induced arthritic rats via inhibition of NF- κ B pathway. *Journal of immunotoxicology* 13(4): 509-525.
- Locatelli, C., Filippin-Monteiro, F. B., Centa, A. and Creczynsky-Pasa, T. B. (2013). Antioxidant, antitumoral and anti-inflammatory activities of gallic acid. *Handbook on Gallic Acid: Natural Occurrences, Antioxidant Properties and Health Implications*. (4th Ed.). Hauppaug: Nova science. pp. 1-23.
- Miliauskas, G., Venskutonis, P. R. and Van Beek, T. A. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food chemistry* 85(2): 231-237.
- Mahdi, E. S., Noor, A. M., Sakeena, M. H., Abdullah, G. Z., Abdulkarim, M. and Sattar, M. A. (2011). Identification of phenolic compounds and assessment of in vitro antioxidants activity of 30% ethanolic extracts derived from two *Phyllanthus* species indigenous to Malaysia. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 5(17): 1967-1978.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D. and Boyd, M. R. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute* 82(13): 1107-1112.

- Shahidi, F., Janitha, P. K. and Wanasundara, P. D. (1992). Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 32(1): 67-103.
- Sautebin, L. (2000). Prostaglandins and nitric oxide as molecular targets for anti-inflammatory therapy. *Fitoterapia* 71(1): 48-57.
- Sivalokanathan, S., Ilayaraja, M. and Balasubramanian, M. P. (2006). Antioxidant activity of *Terminalia arjuna* bark extract on N-nitrosodiethylamine induced hepatocellular carcinoma in rats. *Molecular and cellular biochemistry* 281(1): 87-93.
- Shackelford, L., Mentreddy, S. R. and Cedric, S. (2009). Determination of total phenolics, flavonoids and antioxidant and chemopreventive potential of basil (*Ocimum basilicum* L. and *Ocimum tenuiflorum* L.). *International Journal of Cancer Research* 5(4): 130-143.
- Saha, S. and Verma, R. J. (2016). Antioxidant activity of polyphenolic extract of *Terminalia chebula* Retzius fruits. *Journal of Taibah University for Science* 10(6): 805-812.
- Suksaeree, J. and Monton, C. (2021). Evaluation of the interaction of phenolic compounds contained in the Trisamo recipe using simplex lattice design. *Journal of Current Science and Technology* 11(1): 100-113.
- Tang, S. Y. and Halliwell, B. (2010). Medicinal plants and antioxidants: what do we learn from cell culture and *Caenorhabditis elegans* studies. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 394(1): 1-5.
- Turapra, B., Boonyarat, C., Chulikhit, Y. and Daodee, S. (2016). Determination of Active Constituents and Antioxidative Activity in *Citrus maxima* (Burm.) Merr. *Isan Journal of Pharmaceutical Sciences* 11(5): 80-91.
- Tungmunnithum, D., Thongboonyou, A., Pholboon, A. and Yangsabai, A. (2018). Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: An overview. *Medicines* 5(3): 93-108.
- Vane, J. R. and Botting, R. M. (1998). Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. *Inflammation Research* 47(2): 78-87.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M. and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39(1): 44-84.
- Wang, M., Yang, L., Ji, M., Zhao, P., Sun, P., Bai, R. and Li, C. (2015). Aqueous extract of *Terminalia chebula* induces apoptosis in lung cancer cells via a mechanism involving mitochondria-mediated pathways. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 58(2): 208-215.
- Zhu, H., Wang, Y., Liu, Y., Xia, Y. and Tang, T. (2010). Analysis of flavonoids in *Portulaca oleracea* L. by UV-vis spectrophotometry with comparative study on different extraction technologies. *Food Analytical Methods* 3(2): 90-97.
- Zhong, X., Shi, Y., Chen, J., Xu, J., Wang, L., Beier, R. C. and Liu, F. (2014). Polyphenol extracts from *Punica granatum* and *Terminalia chebula* are anti-inflammatory and increase the survival rate of chickens challenged with *Escherichia coli*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 37(10): 1575-1582.
- Zhang, H. and Tsao, R. (2016). Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Current Opinion in Food Science* 8(1): 33-42.

