

การพัฒนาสูตรตำรับนีโอโซมเพื่อบรรจุสารสกัดตรีผลา

ธนิสสา รามฤทธิ์¹, บัญชา ยิ่งงาม¹, วันดี รังสีวิจิตรประภา^{1*}

บทคัดย่อ

การพัฒนาสูตรตำรับนีโอโซมเพื่อบรรจุสารสกัดตรีผลา

ธนิสสา รามฤทธิ์¹, บัญชา ยิ่งงาม¹, วันดี รังสีวิจิตรประภา^{1*}

บทนำ: ตรีผลาประกอบด้วยผลไม้ 3 ชนิด คือ *Terminalia chebula*, *Terminalia bellirica* และ *Phyllanthus emblica* ในอัตราส่วน 1:1:1 ตรีผลาเป็นสูตรตำรับที่ได้รับความนิยมของตำรายาอายุรเวท ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการนำมาพัฒนาในทางเครื่องสำอาง การศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาสูตรตำรับนีโอโซมเพื่อใช้ในการนำส่งสารสกัดตรีผลา เนื่องจากสารสกัดที่ได้จากสมุนไพรส่วนใหญ่มีปริมาณจำกัด การพัฒนาสูตรตำรับนีโอโซมจึงมีความจำเป็น เพื่อนำส่งสารสกัดตรีผลาไปยังเป้าหมายในการออกฤทธิ์ เพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา และลดพิษที่อาจเกิดขึ้น **วิธีการดำเนินการวิจัย :** นำผลไม้ 3 ชนิด อบแห้ง สกัดด้วย 95 % ethyl alcohol โดยวิธีการ maceration 3 รอบ รอบละ 3 วัน ระเหยตัวทำละลายให้แห้งโดยใช้ Rotary evaporator ได้สารสกัดหยาบ กรณีที่ต้องการเตรียมสารสกัดตรีผลา นำสารสกัดหยาบทั้ง 3 ชนิดมาผสมกันในอัตราส่วน 1:1:1 โดยน้ำหนัก สกัดด้วย 95 % ethyl alcohol กรองด้วยกระดาษกรอง 0.22 mm ระเหยตัวทำละลายให้แห้งโดยใช้ Rotary evaporator นำสารสกัดที่ได้เตรียมเป็นตำรับนีโอโซม วัดขนาด วัดค่า polydispersity index (PDI) วัดค่า zeta potential ค่าอนุภาค % entrapment efficiency (%EE) **ผลการศึกษาวิจัย :** สูตรตำรับที่เหมาะสมในการเตรียมนีโอโซม ประกอบด้วย span20, total lipid 50 mM, cholesterol 15% และ plant extract 0.1% ได้ขนาดของนีโอโซมเท่ากับ 164.89 ± 0.47 nm และร้อยละการกักเก็บสารสกัดเท่ากับ 47.65 ± 1.56 และค่า zeta potential มากกว่า 30 mV, ค่า PDI น้อยกว่า 1 เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Response Surface Methodology (RSM) เพื่อหาปัจจัยที่เหมาะสมของสูตรตำรับ พบว่า สูตรตำรับนีโอโซมที่เหมาะสม ประกอบด้วย total lipid 50 mM, cholesterol 10 % และ plant extract 0.1% ได้ขนาดของนีโอโซมเท่ากับ 188.10 ± 16.34 nm และร้อยละการกักเก็บสารสกัดเท่ากับ 46.43 ± 4.20 % **สรุปผลการวิจัย :** ส่วนประกอบของสูตรตำรับนีโอโซมที่เหมาะสมเพื่อบรรจุสารสกัดตรีผลา ประกอบด้วย total lipid 50 mM, cholesterol 10% และ plant extract 0.1% ได้ขนาดของนีโอโซมที่เหมาะสม ร้อยละการกักเก็บสารสกัดสูงสุด และสูตรตำรับตรีผลาควรเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

คำสำคัญ: ตรีผลา การพัฒนาสูตรตำรับที่เหมาะสมของตรีผลา

Abstract

Development of Triphala Niosomes

Thanissa Ramrit¹, Bancha Yingngam¹, Wandee Rungseevijitprapa^{1*}

Introduction: Triphala is formulation of three dried fruits of *Terminalia chebula*, *Terminalia bellirica*, and *Phyllanthus emblica* in equal proportions. This formulation is the most popular Ayurvedic medicines. In present study, we want to developed niosomes formulation for loaded Triphala because plant extracts had less amount, the good delivery system for deliver plant extract to target action, increase therapeutic and decrease toxicity. **Materials and Method:**

¹กลุ่มวิชาเภสัชเคมีและเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

*Corresponding author: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี 34190 e-mail: wandeeim@yahoo.com

95% Ethyl alcohol extraction of Triphala, filtrated , filtered through 0.22 mm, get rid of 95% ethanol with rotary evaporator. Developed niosomes formulation for Triphala, determined size, PDI, zeta potential and %entrapment efficiency (%EE) **Results:** Factors for developed niosome's formulation for loaded Triphala component span20, total lipid 50 mM, cholesterol 15% and plant extract 0.1%, this formula had size 164.89 ± 0.47 nm and %entrapment efficiency 47.65 ± 1.56 , zeta potential more than 30 mV, PDI less than 1. Optimize formulation with Response Surface Methodology (RSM) had component total lipid 50 mM, cholesterol 10% and plant extract 0.1% had size 188.10 ± 16.34 nm and %entrapment efficiency 46.43 ± 4.20 % **Conclusion :** Optimize of formulation niosomes for loaded Triphala component total lipid, cholesterol and plant extract had size and maximum %entrapment efficiency and Triphala niosomes should storage at room temperature.

Keywords: Triphala, Optimize niosomes for loaded Triphala

บทนำ

ตรีผลา เป็นสูตรตำรับที่ได้รับความนิยมอย่างมากในตำรับยาอายุรเวทของอินเดีย ประกอบด้วยผลไม้แห้ง 3 ชนิด คือ *Terminalia chebula*, *Terminalia bellirica* และ *Phyllanthus emblica* ในอัตราส่วน 1:1:1 เป็นสมุนไพรที่เชื่อว่าเป็นยาอายุวัฒนะ ทำให้ชีวิตยืนยาว กระตุ้นระบบการทำงานของร่างกาย ระบบภูมิคุ้มกัน (Sandhyaa *et al.*, 2006) ตรีผลามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สามารถป้องกันและรักษาได้หลายโรค เช่น โรคติดเชื้อ โรคอ้วน โรคโลหิตจาง วัณโรค ปอดบวม เอ็ดส์ ท้องผูก ตรีผลาเป็นแหล่งของ Vitamin C, ellagic acid, gallic acid, chebulinic acid, bellericanin, β -sitosterol และ flavanoids (Jagetia *et al.*, 2002) รายงานการศึกษาฤทธิ์ของตรีผลา ได้แก่ anti-inflammatory, anti-mutagenic, antioxidant, cytoprotective, gastroprotective, myocardial necrosis, hepatoprotective, anti-bacterial และ anti-cancer activity (Mukherjee *et al.*, 2006) และยังมีรายงานการศึกษาฤทธิ์ *T. chebula*, *T. bellirica* และ *P. emblica* สามารถยับยั้ง 5 α -reductase II (Kumar *et al.*, 2011, 2012)

วัตถุประสงค์ของการศึกษา เพื่อพัฒนาสูตรตำรับที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการนำส่งสารสกัดตรีผลา

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. อุปกรณ์และสารเคมี

ethanol, span20, cholesterol, methanol,

gallic acid, follin-Ciocalteu's , Na_2CO_3 , Dimethylsulphoxide, particle size analysis, UV spectrophotometer, dialysis bag, syring

2. การเตรียมสารสกัดพืช

สารสกัดพืชแต่ละชนิดได้จากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ นำผลไม้ 3 ชนิด อบให้แห้ง จากนั้นสกัดด้วย 95 % ethyl alcohol โดยวิธีการ maceration 3 รอบ รอบละ 3 วัน ระเหยตัวทำละลายให้แห้งโดยใช้ Rotary evaporator ได้สารสกัดหยาบ กรณีที่ต้องการเตรียมสารสกัดตรีผลา นำสารสกัดหยาบทั้ง 3 ชนิดมาผสมกันในอัตราส่วน 1:1:1 โดยน้ำหนัก สกัดด้วย 95 % ethyl alcohol กรองด้วยกระดาษกรอง 0.22 mm ระเหยตัวทำละลายให้แห้งโดยใช้ Rotary evaporator

3. การพัฒนาสูตรตำรับนีโอโซม

3.1 การเตรียมตำรับนีโอโซม

การเตรียมตำรับนีโอโซม โดยชั่งสารสกัด cholesterol และ non-ionic surfactant ละลายด้วย ethanol จากนั้นฉีดสารละลายผ่านเข็มเบอร์ 21 ลงในน้ำร้อนปริมาตร 20 ml ที่อุณหภูมิ 60 องศา ความเร็วรอบ 500 rpm จากนั้นปล่อยให้หมุนเป็นเวลา 30 นาที ลดขนาดของนีโอโซมด้วยเครื่อง high pressure homogenizer

3.2 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเตรียมตำรับ

1) Non-ionic surfactant

เตรียมตำรับนีโอโซม โดยกำหนดให้ cholesterol และ plant extract คงที่ เลือกใช้ non-ionic surfactant ดังนี้ คือ span 20, 60, และ 80 เตรียมเสร็จ ลดขนาด วัดขนาด วัด PDI ค่า zeta potential และหาค่า %entrapment efficiency

2) Total lipid

เตรียมตำรับนีโอโซม โดยกำหนดให้ plant extract

คงที่ ค่าขนาดระบบ total lipid ที่ใช้ คือ cholesterol และ non-ionic surfactant เตรียมเสร็จ ลดขนาด วัดขนาด วัด PDI ค่า zeta potential และหาค่า %entrapment efficiency

3) Cholesterol

เตรียมตำรับนีโอโซม โดยกำหนดให้ plant extract และ non-ionic surfactant คงที่ ศึกษาร้อยละของ cholesterol ที่ใช้เตรียมตำรับ เตรียมเสร็จ ลดขนาด วัดขนาด วัด PDI ค่า zeta potential และหาค่า %entrapment efficiency

4) Plant extract

เตรียมตำรับนีโอโซม โดยกำหนดให้ cholesterol และ non-ionic surfactant คงที่ ศึกษาร้อยละของ plant extract ที่ใช้เตรียมตำรับ เตรียมเสร็จ ลดขนาด วัดขนาด วัด PDI ค่า zeta potential และหาค่า %entrapment efficiency

4. วิเคราะห์หาสูตรตำรับที่เหมาะสมโดยใช้ Response Surface Methodology (RSM)

เมื่อได้ปัจจัยที่เหมาะสมในการตั้งตำรับแล้ว ให้นำปัจจัยที่ศึกษาคือ total lipid, cholesterol และ plant extract เข้าสู่โปรแกรม Response Surface Methodology (RSM)

5. การวัดขนาดของนีโอโซม ค่า PDI ค่า zeta potential

ใช้นีโอโซม 100 μ l เติมน้ำกลั่น 900 μ l วัดขนาดของนีโอโซม วัดค่า PDI วัดค่า zeta potential โดยใช้เครื่อง particle size analysis วัดซ้ำ 3 ครั้ง

6. การวิเคราะห์หาลักษณะการกักเก็บสารสกัดพืชในนีโอโซม (% entapment efficiency, EE)

การวิเคราะห์ร้อยละการกักเก็บสารสกัดพืชในนีโอโซมใช้วิธี direct method ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนของสารสกัดที่ถูกกักเก็บในนีโอโซม โดยบีบเนโอโซม 1000 μ l ใส่ใน dialysis bag เติม release media ทิ้งไว้ 18 ชั่วโมง จากนั้นบีบเนโอโซม 100 μ l เติม dimethylsulphoxide 900 μ l เพื่อทำให้นีโอโซมแตก นำไปหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก โดยเทียบกับสารมาตรฐาน gallic acid ส่วนที่ 2 คือ การหาปริมาณของสารสกัดทั้งหมดที่ใช้ โดยบีบเนโอโซม 100 μ l เติม dimethylsulphoxide 900 μ l นำไปหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก โดยเทียบกับสารมาตรฐาน gallic acid คำนวณหาลักษณะการกักเก็บสารสกัดในนีโอโซม

$$\%EE = \frac{\text{ปริมาณของสารสกัดที่ถูกกักเก็บในนีโอโซม} \times 100}{\text{ปริมาณของสารสกัดทั้งหมดที่ใช้}}$$

7. การทดสอบความคงตัวของตำรับ

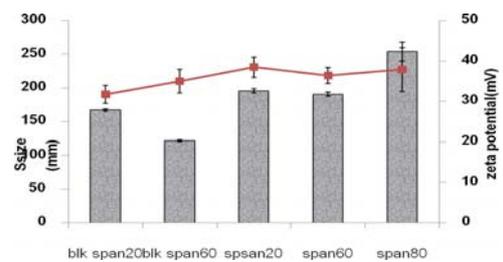
นำตำรับนีโอโซมที่เตรียมได้ ลดขนาด เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4, 25 and 45 $^{\circ}$ C วัดขนาด วัดค่า PDI วัดค่า zeta potential หาค่า % entrapment efficiency (EE) ในวันที่ 1, 7, 15, 30, 60 และที่ 90 วัน

การวิเคราะห์ทางสถิติ

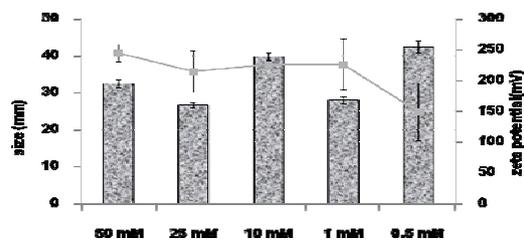
แสดงผลเป็นค่า mean \pm SD และโปรแกรมสำเร็จรูป Response Surface Methodology (RSM)

ผลการศึกษาวิจัย

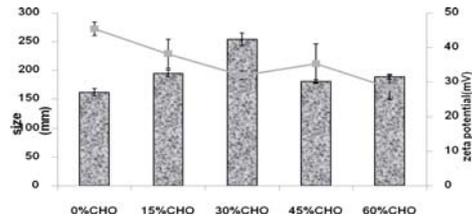
non - ionic surfactant ที่เหมาะสมในการเตรียมตำรับนีโอโซม คือ span 20, total lipid 50 mM, cholesterol 15% และ plant extract 0.1 % ได้ขนาดของนีโอโซมเท่ากับ 164.89 \pm 0.47 mm ค่า zeta potential มากกว่า 30 mV ค่า PDI น้อยกว่า 1 และร้อยละการกักเก็บสารสกัดเท่ากับ 47.65 \pm 1.56 (รูปที่ 1- 4) (ตารางที่ 2)



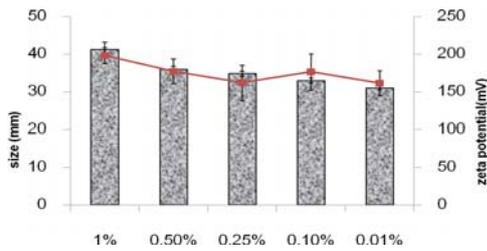
รูปที่ 1 size, zeta potential ของ non-ionic surfactant



รูปที่ 2 size, zeta potential ของ Total lipid



รูปที่ 3 size, zeta potential ของ % cholesterol



รูปที่ 4 size, zeta potential ของ % plant extract

ตารางที่ 1 ร้อยละการกักเก็บสารสกัดในนีโอโซมจากการศึกษาปัจจัยต่างๆ

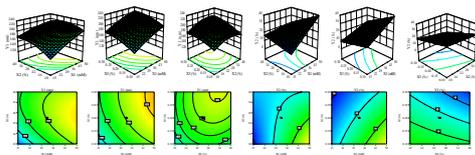
Factors		%Entrapment efficiency
non-surfactant	span 20	14.91 ± 1.14
	span 60	10.23 ± 0.22
	span 80	14.32 ± 0.56
Total lipid	50mM	17.22 ± 0.70
	30mM	14.91 ± 1.14
	25mM	10.21 ± 0.58
	10mM	9.56 ± 0.80
	1mM	10.15 ± 0.07
	0.5mM	9.55 ± 0.37
% Cholesterol	0	24.16 ± 0.13
	15	25.27 ± 2.043
	30	16.33 ± 0.79
	45	8.40 ± 0.47
	80	8.56 ± 0.67
% plant extract	1	10.34 ± 0.31
	0.5	14.60 ± 0.48
	0.25	27.91 ± 0.82
	0.1	47.65 ± 1.56
	0.01	37.43 ± 2.97

ตารางที่ 2 size, PDI zeta potential และ %EE

Factors	Size	PDI	Zeta potential	%EE
Non-ionic surfactant (span20)	195.56 ± 1.52	0.07 ± 0.03	38.47 ± 0.98	14.91 ± 1.14
Total lipid (50mM)	194.89 ± 1.70	0.08 ± 0.02	40.68 ± 0.25	17.22 ± 0.70
Cholesterol(15%)	194.33 ± 2.54	0.19 ± 0.03	38.13 ± 0.76	25.27 ± 2.04
Plant extract (0.1%)	164.89 ± 0.47	0.200 ± 0.01	36.68 ± 0.70	47.65 ± 1.56

ค่าร้อยละการกักเก็บสารสกัดในแต่ละปัจจัยที่ศึกษา พบว่า span 20 กักเก็บได้สูงสุดเท่ากับร้อยละ 14.91 ± 1.14 ปริมาณ Total lipid 50 mM กักเก็บสูงสุดเท่ากับร้อยละ 17.22 ± 0.70 ปริมาณ cholesterol 15% กักเก็บสูงสุดเท่ากับร้อยละ 25.27 ± 2.043 และปริมาณสารสกัด 0.1 % กักเก็บสูงสุดเท่ากับร้อยละ 47.65 ± 1.56 (ตารางที่ 1)

การวิเคราะห์หาสูตรตำรับที่เหมาะสม โดยใช้โปรแกรม RSM พบว่า Total lipid เท่ากับ 50 mM Cholesterol เท่ากับ 10%, Plant extract เท่ากับ 0.1 % มีขนาดของนีโอโซมเท่ากับ 188.10 ± 16.34 nm และร้อยละการกักเก็บเท่ากับ 46.43 ± 4.20 %



รูปที่ 5 ปัจจัยที่มีผลต่อตำรับนีโอโซมจากโปรแกรม RSM

การศึกษาความคงตัวของตำรับนีโอโซมที่บรรจุสารสกัดตรีผลา เมื่อเก็บไว้ 90 วัน พบว่า ตำรับที่เตรียมมีความคงตัวดี และคงตัวดีที่อุณหภูมิต่ำที่สุดเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศา (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ความคงตัวของตำรับนีโอโซม

Day	Physical stability	4 °C	25 °C	45 °C
1	size	166.22±2.84	166.22±2.84	166.22±2.84
	PDI	0.202±0.04	0.202±0.04	0.202±0.04
	zeta potential	34.41±0.26	34.41±0.26	34.41±0.26
7	size	170.07±2.15	174.41±2.07	168.85±3.43
	PDI	0.19±0.03	0.251±0.02	0.214±0.02
	zeta potential	36.6±1.64	36.51±0.91	36.25±1.16
15	size	173.48±3.86	178.19±2.06	164.11±2.58
	PDI	0.18±0.02	0.232±0.03	0.172±0.02
	zeta potential	35±0.97	35.2±1.64	35.97±0.99
30	size	172.89±3.42	168.07±2.41	161.52±2.90
	PDI	0.186±0.03	0.235±0.02	0.168±0.04
	zeta potential	37.36±1.10	36.07±1.36	32.21±1.75
60	size	178.63±2.81	168.37±2.84	158.37±2.87
	PDI	0.229±0.02	0.216±0.03	0.151±0.04
	zeta potential	35.11±2.32	37.62±1.310	33.8±1.45
90	size	200.93±6.21	170.19±3.36	166.78±2.73
	PDI	0.301±0.03	0.218±0.11	0.107±0.04
	zeta potential	36.18±2.56	37.71±0.79	35.24±1.54

สรุปผลการศึกษา

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเตรียมตำรับนีโอโซมเพื่อบรรจุสารสกัดตรีผลา และจากการวิเคราะห์สูตรตำรับที่มีความเหมาะสมจากการใช้โปรแกรม RSM ทำให้ได้สูตรตำรับที่มีความเหมาะสมคือ ใช้ span 20, total lipid 50 mM, cholesterol 10 % และ plant extract 0.1% ได้ขนาดของนีโอโซม 188.10±16.34 nm และร้อยละการกักเก็บสารสกัดเท่ากับ 46.43 ± 4.20 % ตำรับนีโอโซมที่เตรียมได้ควรเก็บที่อุณหภูมิห้อง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณทุนวิจัยมหาวิทยาลัย สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่สนับสนุนทุนการวิจัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือ สถานที่ ในการทำวิจัยในครั้งนี้

References

- Jagetia G, Baliga S, Malagi K, *et al.* The evaluation of the radioprotective effect of Triphala (an ayurvedic rejuvenating drug) in the mice exposed to γ -radiation. *Phytomedicine*. 2002; 9, 99–108.
- Kumar T, Rungseewijitprapa W, Chaiyarut C, *et al.* Screening of steroid 5 α -reductase inhibitory activity and total phenolic content of Thai plants. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2011. 5(7), pp. 1265-1271
- Kumar T, Rungseewijitprapa W, Chaiyarut C, *et al.* 5 α -reductase inhibition and hair growth promotion of some Thai plants traditionally used for hair treatment. *Journal of Ethnopharmacology*. 2012;139, 765–771
- Mukherjee P, Rai, Sujay, *et al.* Clinical study of Triphala-A well known phytomedicine from India. *Iranian J. Pharmacol. Ther.* 2006; 5, 51–54.
- Sandhyaa T, Lathikaa, K, Pandeyb, *et al.* Potential of traditional ayurvedic formulation, Triphala, as a novel anticancer drug. *Cancer Lett.* 2006; 231 (2), 206–214.