

ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิว ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและปริมาณสารสำคัญของตำรับจตุผลาธิกะที่สกัดด้วยวิธีที่แตกต่างกัน

จิตติภรณ์ ขาวไร่*, สุมาลี ปานทอง^{†,‡}, ศรีโสภา เรืองหนู[†], ธนกานต์ กิจนิธิประภา*,

กุลณัฐ ปุณณานวัฒน์*

*หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

[†]สถานการแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

[‡]ผู้รับผิดชอบบทความ: psumalee@tu.ac.th

บทคัดย่อ

บทนำและวัตถุประสงค์: เชื้อแบคทีเรียเป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อบริเวณผิวหนังและการเกิดสิว ส่งผลให้เกิดการอักเสบและกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสทำให้เกิดเป็นรอยดำหลังการเกิดสิว ตำรับยาจตุผลาธิกะเป็นตำรับยาสมุนไพรที่ประกอบไปด้วย สมอไทย สมอเทศ สมอพิเภกและมะขามป้อมในอัตราส่วนที่เท่ากัน สมุนไพรในตำรับประกอบด้วยสารกลุ่มฟีนอลิกและแทนนินซึ่งมีฤทธิ์ช่วยยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์และเอนไซม์ไทโรซิเนส แต่ยังไม่มียางานเกี่ยวกับฤทธิ์ดังกล่าวและการเปรียบเทียบวิธีสกัดสารจากตำรับจตุผลาธิกะมาก่อน การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดตำรับจตุผลาธิกะที่สกัดด้วยตัวทำละลายและสภาวะที่แตกต่างกัน

วิธีการศึกษา: สกัดสารจากตำรับจตุผลาธิกะด้วยการใช้เอทานอลและน้ำในการสกัด จากนั้นจึงนำไปศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค broth microdilution assay ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี L-DOPA Chromogenic methods และการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี

ผลการศึกษา: สารสกัดตำรับจตุผลาธิกะที่สกัดด้วยการแช่สกัดในเอทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *C. acnes*, *S. aureus* และ *S. epidermidis* ได้ดีที่สุด ในขณะที่สารสกัดจากการรีฟลักซ์มีฤทธิ์ที่ใกล้เคียงกัน นอกจากนี้สารสกัดที่ได้จากการแช่สกัดในเอทานอลยังมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและปริมาณสารสำคัญสูงที่สุด รองลงมาคือสารสกัดจากการรีฟลักซ์ และสารสกัดจากการต้มน้ำ

อภิปรายผล: สารสกัดจากตำรับจตุผลาธิกะที่แช่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ดีที่สุดและปริมาณสารสำคัญสูงสุด เนื่องมาจากการสกัดด้วยเอทานอลอาจจะมีผลช่วยเพิ่มความคงตัวของสารสำคัญ อีกทั้งวิธีการแช่สกัดไม่มีการใช้ความร้อนส่งผลให้สารสำคัญไม่ถูกทำลาย ในขณะที่การใช้รีฟลักซ์และการต้มน้ำมีการใช้ความร้อนในการสกัดซึ่งอาจส่งผลทำให้สารสำคัญบางส่วนสลายตัวจึงทำให้ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมีค่าลดลง

ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ: การแช่สกัดด้วยเอทานอลเป็นวิธีการสกัดสารจากตำรับจตุผลาธิกะที่เหมาะสมที่สุดที่จะทำให้ได้ปริมาณสารสำคัญ ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อสิวและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ดีและเหมาะสมที่จะนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: ตำรับจตุผลาธิกะ, โรคติดเชื้อ, สมุนไพร, แบคทีเรีย, สิว

Anti-Acne-Causing Bacterial and Anti-tyrosinase Activities and Chemical Content of *Chatuphalathika* Herbal Extracts Derived from Different Extraction Methods

Jittiporn Chaorai^{*}, Sumalee Panthong^{†,‡}, Srisopa Ruangnoo[†], Thanakan Kitnithiprapha^{*}, Koonlanat Punyanuwat^{*}

^{*}Master of Science Program in Applied Thai Traditional Medicine, Faculty of Medicine, Thammasat University, Khlong Nueng Subdistrict, Khlong Luang District, Pathum Thani 12120, Thailand.

[†]Department of Applied Thai Traditional Medicine, Faculty of Medicine, Thammasat University, Khlong Nueng Subdistrict, Khlong Luang District, Pathum Thani 12120, Thailand.

[‡]Corresponding author: psumalee@tu.ac.th

Abstract

Introduction and Objectives: Bacteria are an important cause of acne. After acne appears, inflammation is induced, leading to tyrosinase activity, and ultimately, dark spots occur. *Chatuphalathika* herbal formula contains four plant ingredients in equal proportions: *Terminalia chebula* Retz., *Terminalia arjuna* (Roxb. ex DC.) Wight & Arn., *Terminalia bellirica* (Gaertn.) Roxb. and *Phyllanthus emblica* L. The herbal ingredients of the formula include phenolics and tannins that have been reported to inhibit the growth of acne-causing bacteria and the production of tyrosinase enzyme. However, the herbal formula has not yet been reported as an antibacterial or anti-tyrosinase product. Therefore, this study compared the anti-bacterial and anti-tyrosinase activities of *Chatuphalathika* extracts derived from different extraction methods.

Methods: *Chatuphalathika* extracts obtained from ethanol and water extraction processes were tested for antibacterial activities by broth microdilution. Anti-tyrosinase activity was investigated using L-dopachrome and chemical analysis by high-performance liquid chromatography (HPLC).

Results: The macerated ethanolic *Chatuphalathika* extract showed the highest antibacterial activity against *C. acnes*, *S. aureus*, and *S. epidermidis*, while the reflux ethanolic *Chatuphalathika* extract had a similar effect. Moreover, the ethanolic maceration extract expressed the highest anti-tyrosinase activity and chemical content, followed by reflux ethanolic extract and aqueous extract.

Discussion: The *Chatuphalathika* extract obtained from ethanolic maceration had the best activities and highest chemical content. Ethanolic extraction apparently increased active compound stability as the maceration is extraction without heating. That was unlike reflux and decoction extraction methods with direct heating that resulted in some active compound degradation. In this way, the heating process may reduce antibacterial and anti-tyrosinase properties.

Conclusion and Recommendation: Ethanolic maceration or extraction is the most suitable method to obtain a *Chatuphalathika* extract that yields the highest chemical content with antibacterial and anti-tyrosinase activities. The extract is good for further development as herbal products in the future.

Key words: *Chatuphalathika* herbal formula, infectious diseases, herbal medicine, bacteria, acne

บทนำและวัตถุประสงค์

เชื้อแบคทีเรียในกลุ่มของ *Staphylococcus* sp. และ *Cutibacterium acnes* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดอาการติดเชื้อบริเวณผิวหนังและสามารถทำให้เกิดสิวได้^[1] การติดเชื้อแบคทีเรียจะกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้ผลิตสารในกระบวนการอักเสบเพื่อช่วยกำจัดเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว^[2] อย่างไรก็ตามกระบวนการอักเสบของผิวหนังจะกระตุ้นการทำงานของไทโรซิเนสให้มีการทำงานเพิ่มมากขึ้นส่งผลให้บริเวณดังกล่าวเกิดเป็นรอยดำหรือมีสีผิวเข้มกว่าปกติ^[3] ในปัจจุบันการรักษาสิวมุ่งทั้งการใช้ยาทาหรือยาสำหรับรับประทาน เช่น ยากลุ่มเรตินอยด์^[4] ที่ช่วยลดเคราตินที่อุดตันบริเวณรูขุมขน หรือยาปฏิชีวนะ เช่น คลินดามัยซิน อีริโทรมัซิน ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิว^[5] รวมถึงการใช้เลเซอร์เพื่อช่วยกำจัดรอยดำหลังจากเกิดสิว^[6] นอกจากนี้การใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของสมุนไพรหรือสารสกัดจากพืชก็เป็นที่ยอมรับมากในปัจจุบัน เช่น ผลิตภัณฑ์จากสารสกัดมังคุดที่พบว่ามียูบิควินอยด์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและมีประสิทธิภาพในการรักษาสิว^[7]

ตำรับจตุผลาธิกะเป็นตำรับยาสมุนไพรที่ประกอบด้วยสมุนไพร 4 ชนิด ได้แก่ สมอไทย (*Terminalia chebula* Retz.) สมอเทศ (*Terminalia arjuna* Roxb. ex DC. Wight & Arn.) สมอพิเภก (*Terminalia bellirica* (Gaertn.) Roxb.) และมะขามป้อม (*Phyllanthus emblica* L.) ในอัตราส่วนที่เท่ากัน โดยรสยาของตำรับมีรสฝาดเปรี้ยวขม ใช้สำหรับลดไข้และเสมหะ เป็นยาระบายและบำรุงร่างกาย^[8] จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าตำรับจตุผลาธิกะที่ถูกสกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและเมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีพบว่าตำรับยาดังกล่าว

ประกอบด้วยสารกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์^[9] ในส่วนของสมุนไพรเดี่ยวที่เป็นส่วนประกอบของตำรับพบว่าประกอบด้วยสารกลุ่มฟีนอลิกเช่นกัน โดยชนิดของสารกลุ่มฟีนอลิกที่มักพบในสมุนไพรทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ gallic acid นอกจากนั้นยังพบสารกลุ่มแทนนินเป็นองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของสมอไทย สมอเทศ สมอพิเภก และมะขามป้อมอีกด้วย^[10-13] จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสมุนไพรที่เป็นองค์ประกอบของตำรับจตุผลาธิกะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิด โดยพบว่าสารสกัดชั้นเอทานอลของสมอไทย สมอเทศ มะขามป้อมและสมอพิเภก มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย เช่น *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* และ *Cutibacterium acnes*^[14-17] นอกจากนี้สารสกัดจากสมอไทยที่สกัดด้วยไฮโดรโกลคอลมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส^[18] แต่ยังไม่พบรายงานการวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของตำรับจตุผลาธิกะมาก่อน อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาจากรสยาของตำรับที่มีรสฝาดและรายงานการวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรที่เป็นส่วนประกอบในตำรับ จึงเป็นไปได้ว่าตำรับยาดังกล่าวน่าจะมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้เป็นอย่างดีและอาจจะมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เมื่อพิจารณารูปแบบการใช้ยาตามตำราเป็นการนำสมุนไพรไปทำการต้มน้ำ แต่จากการทบทวนวรรณกรรมจะเห็นได้ว่าสมุนไพรเดี่ยวที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ดี ซึ่งการใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกันในการสกัดสารจากสมุนไพรจะส่งผลให้ได้สารสำคัญที่ออกฤทธิ์แตกต่างกัน^[19]

ดังนั้น การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์

ไทโรซินเนสของสารสกัดมารับจุลผลาธิกะที่สกัดด้วยตัวทำละลายและสภาวะที่แตกต่างกัน รวมถึงการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญของสารสกัดที่ได้เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานและเป็นแนวทางในการนำตัวรับยาจุลผลาธิกะไปใช้พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องกับการรักษาสิวต่อไปในอนาคต

ระเบียบวิธีศึกษา

1. วัสดุ

สมอไทย สมอพิเภกและมะขามป้อมถูกนำไปตรวจสอบเทียบสายพันธุ์และขอเลขอ้างอิงจากพิพิธภัณฑ์พืชสิรินธร กรมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยมีเลขอ้างอิงดังนี้ สมอไทย BK No. 085333, สมอพิเภก BK No. 085334 และมะขามป้อม BK No. 085336 ในส่วนของสมอเทศทำการเทียบเอกลักษณ์กับหนังสือ พิกัดยาไทย และตำราเภสัชกรรมแผนไทยประยุกต์

2. วิธีการศึกษา

2.1 การสกัดสาร

นำสมุนไพรมาล้างทำความสะอาดและนำอบแห้งที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำสมุนไพรมาดึงให้เป็นผงหยาบ โดยทำการบดสมุนไพรรวแต่ละชนิดแยกกัน แล้วจึงนำผงสมุนไพรรวที่ผ่านการบดมาผสมกันเป็นตำรับจุลผลาธิกะ ในส่วนของตำรับสมุนไพรรวทั้ง 4 ชนิดถูกนำมาผสมกันในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นแบ่งสมุนไพรรวออกเป็นสามส่วนสำหรับการสกัดด้วยวิธีการต้มน้ำ การแช่สกัดด้วย 95% เอทานอล และการสกัดด้วยวิธีการทำรีฟลักซ์ โดยขั้นตอนการสกัดด้วยวิธีการต้มน้ำเริ่มจากการนำสมุนไพรรวที่เป็นส่วนประกอบในตำรับอย่างละ 100 กรัมผสมรวมกันแล้วนำไปต้มกับน้ำ

ปริมาตร 800 มิลลิลิตร ให้เดือด 15 นาที กรองเอาแต่น้ำ ทำเช่นนี้ซ้ำอีกสองครั้ง จากนั้นนำน้ำที่กรองได้ทั้งสามครั้งมารวมกันและเคี่ยวให้เหลือหนึ่งส่วนแล้วนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ส่วนวิธีการสกัดโดยการแช่สกัดด้วย 95% เอทานอล เริ่มจากการนำสมุนไพรรวที่เป็นส่วนประกอบในตำรับอย่างละ 100 กรัมผสมรวมกันแล้วนำไปแช่ด้วย 95% เอทานอล ปริมาตร 400 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นทำการกรอง แล้วนำของเหลวที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสูญญากาศ ทำซ้ำอีกสองครั้ง แล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกจนแห้ง ในส่วนของการสกัดด้วยวิธีรีฟลักซ์ จะนำสมุนไพรรว 100 กรัม ใส่ขวดก้นกลม เติมตัวทำละลายเอทานอล 95% ปริมาตร 400 มิลลิลิตร แล้วนำไปรีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำการกรอง จากนั้นนำกากสมุนไพรรวมาทำการสกัดซ้ำอีกสองครั้ง นำของเหลวที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสูญญากาศ คำนวณร้อยละผลผลิตของสารสกัดที่ได้และนำสารสกัดทั้งหมดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำไปทดสอบ

2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ *C. acnes* DMST 14916, *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. epidermidis* ATCC 12228 โดยเชื้อ *C. acnes* ถูกเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร Brain heart infusion agar และบ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในขณะที่เชื้อ *S. aureus* และเชื้อ *S. epidermidis* ถูกเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร Nutrient Agar และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาทดสอบโดยใช้เทคนิค Broth microdilution assay^[20] โดยเริ่มต้นจากการเจือจางสารสกัดที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยวิธี

การเจือจางแบบสองเท่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว จากนั้นปรับความขุ่นเชื้อให้มีค่าเท่ากับ 0.5 McFarland แล้วจึงปิเปตสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงไปใน 96 well plate ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม และเติมเชื้อที่ถูกปรับความขุ่นแล้วลงไปปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C โดยทำการบ่มเชื้อ *C. acnes* ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในขณะที่เชื้อ *S. aureus* และเชื้อ *S. epidermidis* ถูกบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการเติม resazurin ลงไป 10 ไมโครลิตร และทำการบ่มต่อเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วอ่านผลโดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของ resazurin ซึ่งความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ยับยั้งเชื้อได้หรือค่า MIC คือความเข้มข้นที่ resazurin ไม่เปลี่ยนสี จากนั้นจึงนำของเหลวจากหลุมที่ resazurin ไม่มีการเปลี่ยนสีหลุมละ 3 ไมโครลิตรมาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งและบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อเชื้อแต่ละชนิด และทำการสังเกตผล โดยค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ฆ่าเชื้อได้หรือค่า MBC คือค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อ ในการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์จะใช้อาณานิคมเป็น positive control

2.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสารสกัดดำรับจตุผลลิกะโดยวิธี L-DOPA Chrome^[21] โดยทำการเตรียมสารสกัดให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรโดยละลายสารสกัดด้วยสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.1 M มีค่า pH เท่ากับ 6.8 จากนั้นเติมสารสกัดที่ต้องการทดสอบลงในเพลทปริมาตรหลุมละ 20 ไมโครลิตร แล้วจึงเติมสารละลายโซเดียม

ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.1 M มีค่า pH เท่ากับ 6.8 ลงไปหลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมเอนไซม์ไทโรซิเนสความเข้มข้น 300 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตรหลุมละ 40 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย L-DOPA ความเข้มข้น 8 mM ปริมาตรหลุมละ 40 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบเวลานำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ในการทดสอบครั้งนี้จะใช้กรดโคจิกเป็นกลุ่มควบคุมผลบวก (positive control) และนำค่าที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสต่อไป

2.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ในการวิเคราะห์ปริมาณ gallic acid และ chebulagic acid โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เริ่มจากเตรียมสารสกัดดำรับจตุผลลิกะที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ให้มีความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในเมทานอล กรองผ่านตัวกรองรูพรุนขนาด 0.45 ไมโครเมตร และนำไปวิเคราะห์โดยใช้คอลัมน์ Phenomenex Luna 5 μ C18(2) 100A analytical column 250 $\times$ 4.60 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาคของวัฏภาคคงที่เท่ากับ 5 ไมครอน วัฏภาคเคลื่อนที่ประกอบไปด้วย อะซิโตนไตรลและ 1% กรดอะซิติก โดยมีอัตราส่วนของวัฏภาคทั้งสองชนิดแตกต่างกันที่เวลาต่าง ๆ (Table 1) โดยกำหนดอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปทำการคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานของสาร gallic acid และ chebulagic acid ที่วิเคราะห์ด้วยระบบเดียวกัน รายงานผลการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญที่พบในสารสกัดดำรับจตุผลลิกะในหน่วยร้อยละน้ำหนักต่อน้ำหนัก (%w/w) โดยการสกัดทั้งหมดจะถูกทดสอบซ้ำ

3 ครั้งและผลการทดสอบจะถูกแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยก่อนการวิเคราะห์สารสำคัญที่พบในสารสกัด ระบบการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC (Table 1) ได้ถูกทดสอบความใช้ได้ของระบบ (HPLC validation) ซึ่งอ้างอิงวิธีการตรวจสอบตามข้อกำหนดของ ICH guidelines^[22] โดยเกณฑ์มาตรฐานได้กำหนดให้ทำการหาค่าความเป็นเส้นตรง (linearity) โดยการวิเคราะห์สารสำคัญอย่างน้อย 5 ความเข้มข้นแล้วนำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นซึ่งต้องมีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (R^2) ไม่ต่ำกว่า 0.999 จากนั้นจึงทำการคำนวณขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) และขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ) แล้วจึงทำการหาค่าความเที่ยง (accuracy) จากการวิเคราะห์ค่าร้อยละ

การคืนกลับของสารสำคัญ (%recovery) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยทำการ spike สาร gallic acid และ chebulagic acid ที่ทราบความเข้มข้นลงในสารสกัดตำรับยาจตุผลาลิกะ จากนั้นทำการวิเคราะห์คำนวณหาค่าร้อยละการคืนกลับของสารสำคัญทั้งสองชนิด โดยที่ค่าดังกล่าวต้องแปรผันไม่เกิน 20% จากความเข้มข้นที่เตรียมและต้องมีค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ไม่เกิน 2% นอกจากนี้ต้องมีการหาค่าความแม่นยำ (precision) จากการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญที่ทราบความเข้มข้นภายในวันเดียวกัน (intraday) และต่างวัน (interday) แล้วจึงคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารสำคัญ โดยที่ค่าดังกล่าวต้องแปรผันไม่เกิน 20% จากความเข้มข้นที่เตรียมและต้องมีค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ไม่เกิน 2%

Table 1 The mobile phase ratio of the validated HPLC method of Jatuphalathika remedy.

Time (Minutes)	Mobile phase ratio (%)	
	Acetonitrile	1% Acetic acid
0	5	95
12	15	85
32	25	75
37	100	0
42	100	0
42.1	5	95
47	5	95

ผลการศึกษา

1. การสกัดสารตำรับจตุผลาลิกะ

จากการนำสมุนไพรตำรับจตุผลาลิกะมาทำการสกัดด้วยการต้ม้ำ การแช่สกัดใน 95% เอทานอล และการสกัดด้วยวิธีการทำรีฟลักซ์ใน 95% เอทานอล

พบว่าได้สารสกัดทั้งสิ้น 3 ชนิด ได้แก่ สารสกัดตำรับจตุผลาลิกะจากการแช่สกัดในเอทานอล (JPE) สารสกัดตำรับจตุผลาลิกะจากการต้ม้ำ (JPW) สารสกัดตำรับจตุผลาลิกะจากการทำรีฟลักซ์ในเอทานอล (JPR) เมื่อทำการเปรียบเทียบค่าร้อยละของสารสกัด

แต่ละชนิด พบว่า JPE แสดงค่าร้อยละผลผลิตของสารสกัดสูงที่สุดคือร้อยละ 33.62 รองลงมาคือ JPW และ JPR แต่จะเห็นได้ว่าค่าร้อยละผลผลิตของ JPW

และ JPR จะมีค่าที่ใกล้เคียงกัน คือร้อยละ 29.61 และ 28.73 ตามลำดับ (Table 2)

Table 2 Percentage of the yield of Jatupalathika extracts

Sample	Extraction method	Code	Yield (%)
Jatupalathika remedy	Maceration with 95% ethanol	JPE	33.62
	Decoction with water	JPW	29.61
	Reflux with 95% ethanol	JPR	28.73

2.ฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดตำรับจตุพลาธิกะที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสามชนิดชนิดคือ *C. acnes*, *S. aureus* และ *S. epidermidis* ผลที่ได้พบว่า JPR มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งสามชนิดได้ดีที่สุดโดยมีค่า MIC ในการยับยั้งเชื้อเท่ากับ 312.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ JPE ที่มีค่าเท่ากับ 625 โดยมีค่า MIC ในการยับยั้ง *C. acnes* เท่ากับ 156.25

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ MIC ในการยับยั้ง *S. aureus* และ *S. epidermidis* เท่ากับ 625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ JPW มีค่า MIC ในการยับยั้ง *C. acnes* เท่ากับ 312.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ MIC ในการยับยั้ง *S. aureus* และ *S. epidermidis* เท่ากับ 1,250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดทั้งหมดยังคงมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทั้งสามชนิดได้น้อยกว่ากลุ่มควบคุมผลบวก คือคลินดามัยซิน (Table 3)

Table 3 Antimicrobial activity of Jatupalathika extract

Sample	<i>C. acnes</i>		<i>S. aureus</i>		<i>S. epidermidis</i>	
	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC ($\mu\text{g/mL}$)
JPE	156.2	312.5	625	1250	625	625
JPW	312.5	> 5000	1250	5000	1250	> 5000
JPR	312.5	1250	312.5	625	312.5	312.5
Clindamycin	19	19	70	2500	70	5000

3.ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดตำรับจตุพลาธิกะที่สกัดด้วยวิธีการต่าง ๆ พบว่าสารสกัดตำรับจตุพลาธิกะที่สกัดด้วยวิธีการที่ต่าง

กันแสดงค่าการยับยั้งที่แตกต่างกันโดยพบว่าสารสกัด JPE มีการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้สูงที่สุด โดยที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรหรือ 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโร-

ซินเนสได้ร้อยละ 49.74 และค่าการยับยั้งจะน้อยลงเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดลดลง รองลงมาคือสาร JPW ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ร้อยละ 44.30 เมื่อทดสอบกับ JPW ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในส่วนของ JPR มีการแสดงฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้น้อยที่สุด อย่างไรก็ตามสารสกัดทั้ง 3 ชนิดมีค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ทำการทดสอบไม่ถึง

ร้อยละ 50 จึงทำให้ค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ร้อยละ 50 (IC_{50}) มีค่ามากกว่า 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในส่วนของกรดโคจิกซึ่งเป็นสาร positive control พบว่ามีค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงกว่าสารสกัดจากตำรับจตุผลาภิชะ โดยกรดโคจิกมีค่า IC_{50} เท่ากับ 31.03 ± 13.41 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Figure 1)

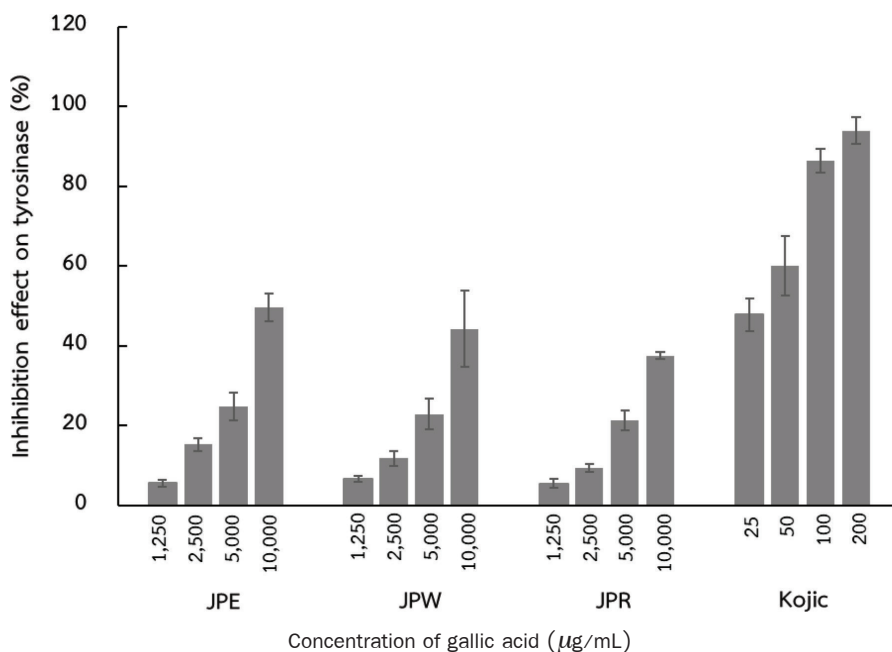


Figure 1 Inhibition effect of Jatupalathika extracts and kojic acid on tyrosinase activity

4. การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

จากผลการทดสอบความใช้ได้ของระบบการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC พบว่าเมื่อวิเคราะห์สาร gallic acid และ chebulagic acid ที่ความเข้มข้น 25,

50, 100, 200, 300, 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและนำไปสร้างกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้น (Figure 2) พบว่าค่าความเป็นเส้นตรงมีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (R^2) ผ่านเกณฑ์มาตรฐานคือมีค่าสูงกว่า 0.999

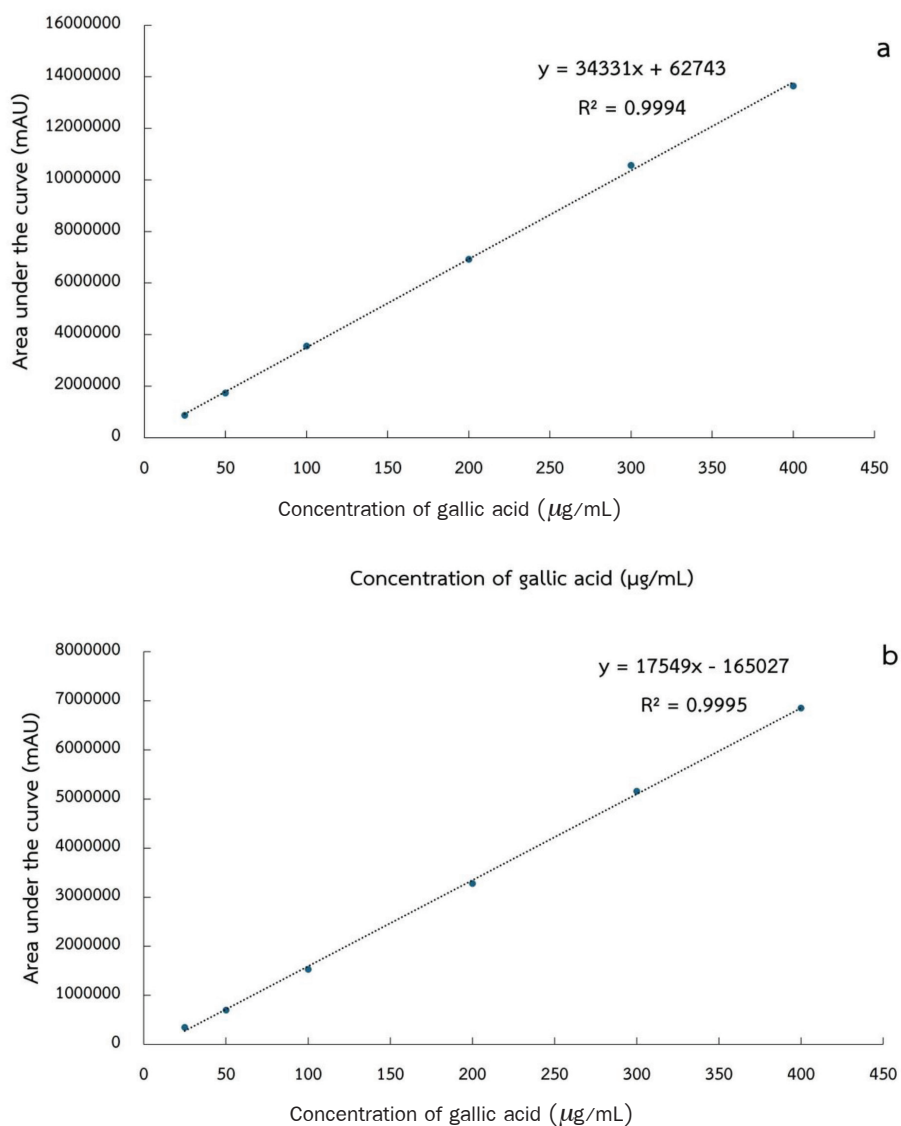


Figure 2 Calibration curves of (a) gallic acid and (b) chebulagic acid

โดยค่า LOD และ LOQ ของสาร gallic acid มีค่าเท่ากับ 6.84 และ 20.74 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ในขณะที่ค่า LOD และ LOQ ของสาร chebulagic acid มีค่าเท่ากับ 6.34 และ 19.21 ไมโครกรัมต่อ

มิลลิลิตรตามลำดับ สำหรับการวิเคราะห์ค่าความเที่ยงและความแม่นยำของระบบพบว่าค่าการวิเคราะห์ของสารทั้งสองชนิดมีค่าผ่านเกณฑ์มาตรฐาน (Table 4)

Table 4 Parameters of HPLC validation

Parameter		Gallic acid	Chebularic acid
Linearity ($\mu\text{g/mL}$)		25-400	25-400
Regression equation		$Y = 34331X + 62743$	$Y = 17549X - 165027$
Coefficient of determination (R^2)		0.9994	0.9995
Limit of detection (LOD, $\mu\text{g/mL}$)		6.84	6.34
Limit of quantitation (LOQ, $\mu\text{g/mL}$)		20.74	19.21
Precision (mean of concentration $\pm$ %RSD)			
Intra-day	100 $\mu\text{g/mL}$	100.51 ± 1.47	96.02 ± 0.70
	200 $\mu\text{g/mL}$	199.79 ± 1.82	190.65 ± 1.04
	400 $\mu\text{g/mL}$	390.94 ± 0.72	387.30 ± 1.67
Inter-day	100 $\mu\text{g/mL}$	102.44 ± 1.33	95.13 ± 1.60
	200 $\mu\text{g/mL}$	195.17 ± 1.78	193.11 ± 1.49
	400 $\mu\text{g/mL}$	398.66 ± 1.28	394.61 ± 1.89
Recovery (mean of recovery rate $\pm$ %RSD)			
50 $\mu\text{g/mL}$		90.25 ± 0.444	109.49 ± 1.71
100 $\mu\text{g/mL}$		101.81 ± 1.26	111.99 ± 1.42
200 $\mu\text{g/mL}$		99.11 ± 0.72	101.26 ± 0.12

ภายหลังการทดสอบความใช้ได้ของระบบ สารสกัดตำรับจตุผลาธิกะถูกนำมาวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ โดยผลจากการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ แสดงให้เห็นว่าตำรับจตุผลาธิกะที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ มีสาร gallic acid และ chebulagic acid เป็นองค์ประกอบในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยพบว่าสารสกัด JPE ที่ถูกสกัดด้วยวิธีการแช่ในเอทานอลมีปริมาณสารสำคัญทั้งสองชนิดสูงที่สุดโดยมีปริมาณสาร gallic acid ร้อยละ 4.75 น้ำหนักต่อน้ำหนัก และ chebu-

lagic acid ร้อยละ 7.99 น้ำหนักต่อน้ำหนัก รองลงมาคือ JPR ที่ถูกสกัดด้วยวิธีการรีฟลักซ์ในเอทานอล มีปริมาณสาร gallic acid ร้อยละ 3.77 น้ำหนักต่อน้ำหนัก และ chebulagic acid ร้อยละ 7.33 น้ำหนักต่อน้ำหนัก ในขณะที่ JPW ที่ถูกสกัดด้วยการต้มน้ำ มีปริมาณสาร gallic acid และ chebulagic acid น้อยที่สุดโดยมีค่าเท่ากับร้อยละ 3.38 และ 5.33 น้ำหนักต่อน้ำหนักตามลำดับ (Table 5 and Figure 3)

Table 5 HPLC analysis of Jatupalathika extract

Sample	Gallic acid %W/W (mean $\pm$ SEM)	Chebularic acid %W/W (mean $\pm$ SEM)
JPE	4.75 ± 0.16	7.99 ± 0.27
JPW	3.38 ± 0.26	5.33 ± 0.38
JPR	3.77 ± 0.15	7.33 ± 0.31

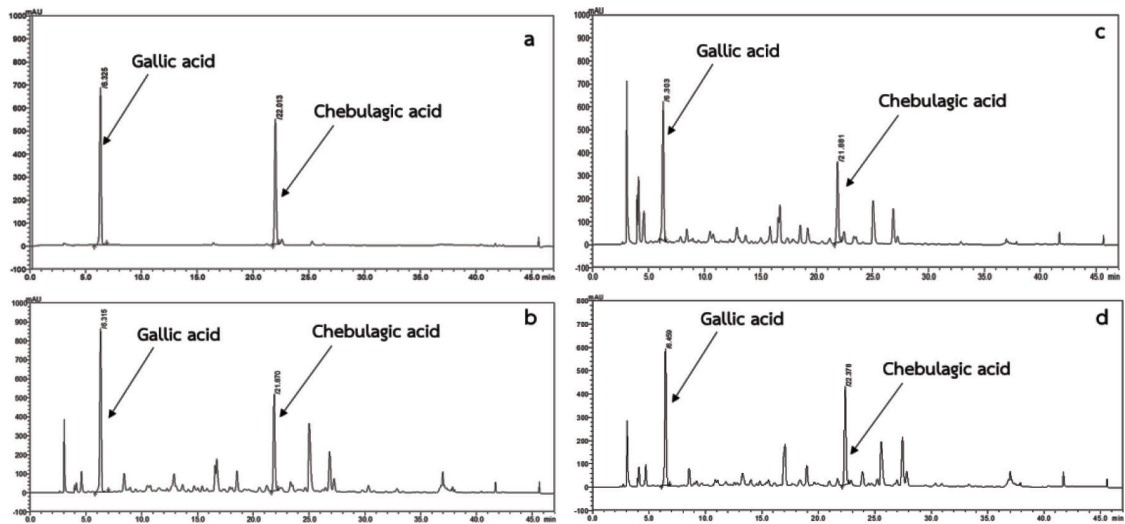


Figure 3 HPLC chromatogram of (a) pure compounds, including gallic acid and chebulagic acid, (b) JPE, (c) JPW, and (d) JPR

อภิปรายผล

ตำรับจตุผลาธิกะเป็นตำรับยาที่ประกอบด้วย สมอไทย สมอเทศ สมอพิเภกและมะขามป้อม โดยมีสรรพคุณเพื่อบำรุงและสมะหะ เป็นยาระบายและ บำรุงร่างกาย โดยรสยาของตำรับจะมีรสฝาดเปรี้ยว ขม^[8] จากการนำตำรับยาจตุผลาธิกะไปทำการสกัด ด้วยวิธีการแช่สกัดใน 95% เอทานอล การสกัดด้วย วิธีการทำรีฟลักซ์ใน 95% เอทานอล และการต้ม น้ำ จะเห็นได้ว่าเมื่อสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์คือ เอทานอลจะทำให้ปริมาณสารสำคัญสูงกว่าการสกัด ด้วยน้ำ อย่างไรก็ตามมีรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้ระบุว่าเมื่อสกัดสาร gallic acid จากพืชโดยเปรียบเทียบ ระหว่างการใช้น้ำและเอทานอลตัวทำละลายที่ใช้ใน

การสกัด ผลที่ได้พบว่า การสกัดด้วยน้ำจะให้ปริมาณ gallic acid สูงกว่าการใช้เอทานอลในการสกัด แต่ การสกัดดังกล่าวใช้อุณหภูมิในการสกัดเพียง 40 °C^[23] ดังนั้นการที่สารสกัดจตุผลาธิกะที่สกัดด้วยวิธีแช่ สกัดใน 95% เอทานอลมีปริมาณ gallic acid สูง กว่า การสกัดด้วยวิธีอื่น ๆ อาจจะเนื่องจากวิธีการ รีฟลักซ์และการต้ม นั้นมีการใช้ความร้อนในการสกัด ซึ่งความร้อนจะส่งผลให้สาร gallic acid มีการสลาย ตัวได้^[24] ในกรณีของ chebulagic acid ซึ่งเป็นสาร ประเภท hydrolysable tannin ที่พบได้ในพืชสกุล *Terminalia* sp.^[25] สารในกลุ่มนี้เมื่อละลายในน้ำจะ ไม่คงตัวเมื่อสัมผัสกับอุณหภูมิสูง แต่เมื่อละลายใน เอทานอลแม้จะใช้อุณหภูมิสูง สารดังกล่าวก็จะมี ความ คงตัว^[26] จากการทดลองจะเห็นได้ว่าตำรับจตุผลาธิกะ ที่สกัดด้วยการต้ม น้ำมีปริมาณสาร chebulagic acid ต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับวิธีอื่นซึ่งอาจเนื่องมาจากสาร ดังกล่าวสลายตัวเพราะละลายอยู่ในน้ำ

จากการทดสอบพบว่าสารสกัดจากตำรับ จตุผลลาภะมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียทั้งสามชนิดได้ดี ในส่วนของสมุนไพรวัวที่เป็นองค์ประกอบของตำรับ มีรายงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าสารสกัดขึ้นเอทานอล จากผลสมอไทยมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และ *S. epidermidis* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 960 และ 450 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร^[14] นอกจากนี้สารสกัด ขึ้นเอทานอลจากสมอเทศมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้เช่นเดียวกัน โดยมีค่า MIC อยู่ที่ 2,500 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร^[15] และยังพบว่าสารสกัดขึ้นเอทานอลจาก สมอพิเภกและมะขามป้อมมีฤทธิ์ยับยั้ง *C. acnes* ได้ โดยมีค่า MIC เท่ากับ 200 และ 800 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ^[16-17] เมื่อเปรียบเทียบผลของ รายงานวิจัยก่อนหน้านี้กับผลของตำรับจตุผลลาภะจะ เห็นได้ว่าสารสกัดตำรับจตุผลลาภะให้ค่า MIC ที่ต่ำ กว่าผลของสมุนไพรวัวเป็นส่วนประกอบในตำรับ ซึ่ง ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารสกัดตำรับจตุผลลาภะ มีฤทธิ์ต้านเชื้อก่อสิวได้ดีกว่าสมุนไพรวัวที่เป็น องค์ประกอบตำรับ อาจเป็นเพราะตำรับจตุผลลาภะ ซึ่งประกอบไปด้วยสมุนไพรมากหลายชนิดและสมุนไพรรวมแต่ละชนิดประกอบด้วยสารเคมีที่ต่างกัน^[27] จึงทำให้เกิดจากการเสริมฤทธิ์กันของสมุนไพรวัวที่เป็นองค์ ประกอบของตำรับและทำให้ฤทธิ์ของสารสกัดตำรับดีกว่าสารสกัดสมุนไพรวัวเดี่ยว เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้าน เชื้อแบคทีเรียของสารสกัดตำรับพบว่าตำรับที่สกัดด้วย วิธีการรพัลกซ์มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ดีที่สุดซึ่งใกล้เคียงกับสารสกัดที่สกัดด้วยวิธีการแช่ในเอทานอล ในขณะที่สารสกัดจากการต้มน้ำมีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ ต่ำที่สุด ในขณะที่ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่าสารสกัดตำรับจตุผลลาภะที่แช่สกัดใน 95% เอทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงที่สุด ซึ่ง การออกฤทธิ์ของตำรับน่าจะมาจากสารสำคัญที่พบคือ

gallic acid และ chebulagic acid มีรายงานพบว่า สาร gallic acid สามารถยับยั้ง *S. aureus* และ *C. acnes* ได้^[28-29] ในส่วนของสาร chebulagic acid พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *C. acnes*^[30] นอกจากนั้นยังพบว่า สารในกลุ่ม hydrolysable tannins มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus*^[31] ในส่วนของฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่าสาร gallic acid สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.79 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร^[32] และสาร chebulagic ที่ 500 ไมโครโมลสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ไทโรซิเนสได้ร้อยละ 28.8^[33] อย่างไรก็ตามสารสกัด ตำรับจตุผลลาภะมีปริมาณสารสำคัญที่แตกต่างกัน เมื่อสกัดด้วยวิธีต่าง ๆ ปริมาณสารสำคัญที่แตกต่างกันนี้อาจเป็นสาเหตุให้ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและฤทธิ์ ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ต่างกัน โดยเฉพาะฤทธิ์ ยับยั้งไทโรซิเนสที่พบว่าสารสกัดจากการสกัดด้วยวิธี แช่ในเอทานอลออกฤทธิ์ดีที่สุดที่สุดอาจจะเกิดจากการที่มีปริมาณสาร gallic acid สูงที่สุดนั่นเอง

ข้อสรุป

จากการศึกษาสามารถสรุปได้ว่าตำรับจตุผลลาภะ ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีการแช่สกัดใน 95% เอทานอล ให้ร้อยละผลผลิตของสารสกัดและปริมาณสารสำคัญ สูงที่สุด นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการยับยั้งการ เจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดสิวได้ดีและ มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีที่สุด ดังนั้นวิธีการ สกัดที่เหมาะสมคือการแช่สกัดในเอทานอลเพื่อให้ ได้สารสกัดที่มีประสิทธิภาพดีและเหมาะสำหรับนำไป พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องกับการรักษาสิว ต่อไป แต่อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาผลข้างเคียง ของสารสกัดดังกล่าวต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ทุนอุดหนุนการวิจัยจากคณะ
แพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ตามสัญญา
เลขที่ ทป.2-02/2567

References

1. Huang TY, Jiang YE, Scott DA. Culturable bacteria in the entire acne lesion and short-chain fatty acid metabolites of *Cutibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis* isolates. Biochemical and biophysical research communications [Internet]. 2022 [cited 2022 Sep 24]; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.06.068>
2. Levy O, Iyer S, Atoun E, Peter N, Hous N, Cash D, Musa F, Narvani A. *Propionibacterium acnes*: an underestimated etiology in the pathogenesis of osteoarthritis. Journal of Shoulder and Elbow Surgery. 2013;22(4): 505-11.
3. Elbuluk N, Grimes P, Chien A, Hamzavi I, Alexis A, Taylor S, Gonzalez N, Weiss J, Desai SR, Kang S. The pathogenesis and management of acne-induced post-inflammatory hyperpigmentation. American journal of clinical dermatology [Internet]. 2021 [cited 2022 Sep 24]; Available from: <https://doi.org/10.1007/s40257-021-00633-4>
4. Sitohang IBS, Fathan H, Effendi E, Wahid M. The susceptibility of pathogens associated with acne vulgaris to antibiotics. Medical Journal of Indones [Internet]. 2019 [cited 2023 Oct 10]; Available from: <https://mji.ui.ac.id/journal/index.php/mji/article/view/2735>
5. Leyden J, Stein-Gold L, Weiss J. Why topical retinoids are mainstay of therapy for acne. Dermatology and therapy. 2017;7(1):293-304.
6. Havelin A, Seukeran DC. Laser treatment of acne scarring in skin of colour. Clinical and experimental dermatology. 2023;48(5):443-7. <https://doi.org/10.1093/ced/llac024>
7. Lueangarun S, Sriviriyakul K, Tempark T, Managit C, Sithisarn P. Clinical efficacy of 0.5% topical mango-steen extract in nanoparticle loaded gel in treatment of mild-to-moderate acne vulgaris: A 12-week, split-face, double-blinded, randomized, controlled trial. Journal of cosmetic dermatology. 2019;18(5):1395-403. <https://doi.org/10.1111/jocd.12856>
8. Krupunyamat L. Thai traditional pharmacy textbook (2nd ed). Ayurveda school (Shewakakomarpap) Foundation for the Promotion of Thai Traditional and Alternative Medicine. 2016;1(2):114.
9. Wetchakul P, Goon JA, Adekoya E, Olatunji OJ, Ruangchuay S, Jaisamut P, Issuriya A, Kunworarath N, Limsuwan S, Chusri S. Traditional tonifying poly-herbal infusion, Jatu-Phala-Tiga and extends lifespan of *caenorhabditis elegans*. Prince of Songkla University. 2019;19:6-7.
10. Kim HJ, Song HK, Park SH, Jang S, Park KS, Song KH, Kim T. *Terminalia chebula* Retz. extract ameliorates the symptoms of atopic dermatitis by regulating anti-inflammatory factors in vivo and suppressing STAT1/3 and NF- κ B signaling in vitro. Phytomedicine. 2022;104:7-9.
11. Pompimon W, Wattananon S, Udomputtimekakul P, Baison W, Sombutsiri P, Chuajedton A, Wingwon B. HPLC determination of the gallic Acid and chebulinic acid contents of *Phyllanthus emblica* Linn., *Terminalia bellirica* Roxb., *Terminalia chebula* Retz. and *Triphala* products from Chae Son District, Lampang, Thailand. American Journal of Food Science and Technology. 2020;8(3):87-98. (in Thai)
12. Shengule SA, Mishra S, Bodhale S. Inhibitory effect of a standardized hydroethanolic extract of *Terminalia arjuna* bark on alpha-amylase enzyme. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. 2018;11(4):366-9.
13. Timudom T, Nakhapanchai D. Antioxidant activity of emblic toner. In Graduate School Conference. 2019;3(1):960-8. (in Thai)
14. Prompamorn P, Ratcharin N. Evaluation of antibacterial activity and gel formulation Development from *Terminalia chebula* Retz extract. SDU Research Journal Science and Technology. 2016;9(1):51-63. (in Thai)
15. Khan I, Ullah Z, Shad A, Fahim M, Öztürk M. *In vitro* antioxidant, anticholinesterase inhibitory, and antimicrobial activity studies of *Terminalia chebula* (Retz) and *Terminalia arjuna* (Roxb). South African Journal of Botany. 2022;146(1):395-400.
16. Dhale D, Mogle U. Phytochemical screening and antibacterial activity of *Phyllanthus emblica* (L.). Science Research Reporter. 2021;1(3):138-42.
17. Sriraj P, Jaiseri D, Chekdaengphanao P, Aukkanimart R, Prathumtet J. Effects of Pikat Trisamo extract on antioxidant and anti-inflammatory activities. KKU Science Journal. 2021;49(3):265-73.

18. Peng Z, Li Y, Tan L, Chen L, Shi Q, Zeng QH, Liu H. Anti-tyrosinase, antioxidant and antibacterial activities of gallic acid-benzylidenehydrazine hybrids and their application in preservation of fresh-cut apples and shrimps. Food chemistry [Internet]. 2022 [cited 2023 Oct 27]; Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814622000887>
19. Lezoul NE, Belkadi M, Habibi F, Guillén F. Extraction processes with several solvents on total bioactive compounds in different organs of three medicinal plants. Molecules (Basel, Switzerland). 2020;25(20):5-6.
20. Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. Methods (San Diego, Calif.). 2007;42(4):321-4.
21. Chang TS, Ding HY, Tai SS, Wu CY. Mushroom tyrosinase inhibitory effects of isoflavones isolated from soygerm koji fermented with *Aspergillus oryzae* BCRC 32288. Food chemistry. 2007;105(4):1430-8.
22. Borman P, Elder D. Q2(R1) validation of analytical procedures. In ICH quality guidelines. 1st ed. Teasdale A, Elder D, Nims RW, editors. New Jersey: John Wiley & Sons. 2018.
23. Awang MA, Benjamin MAZ, Anuar A, Ismail MF, Ramaiya SD, Mohd Hashim SNA. Dataset of gallic acid quantification and their antioxidant and anti-inflammatory activities of different solvent extractions from Kacip Fatimah (*Labisia pumila* Benth. & Hook. f.) leaves. Data Brief. 2023;1(51):4-5.
24. Varzaneh EA, Mobarakeh SS, Shekarchizadeh H. Enhancing hamburger shelf life and quality using gallic acid encapsulated in gelatin/tragacanth gum complex coacervate. Heliyon. 2024;10(2):7-10.
25. Chang Z, Zhang Q, Liang W, Zhou K, Jian P, She G, Zhang L. A Comprehensive review of the structure elucidation of tannins from *Terminalia* Linn. Evidence Based Complement Alternat Medicine. 2019;15:16-8
26. Wang CC, Chen HF, Wu JY, Chen LG. Stability of principal hydrolysable tannins from *Trapa taiwanensis* Hulls. Molecules. 2019;24(2):2-6.
27. Yang HY, Zulfiqar A, Ikhsal AK, Shabana IK. Anti-inflammatory activity of constituents isolated from *Terminalia chebula*. Natural product communicate. 2014;9(7):965-8.
28. Macêdo NS, Barbosa CR, Bezerra AH, Silveira ZS, Silva LD, Coutinho HD, Dashti S, Kim B, Cunha FA, Silva MV. Evaluation of ellagic acid and gallic acid as efflux pump inhibitors in strains of *Staphylococcus aureus*. Biol Open. 2022;11(10):2-4.
29. Park HH, Ko SC, Oh GW, Jang YM, Kim YM, Park WS, Choi IW, Jung WK. Characterization and biological activity of PVA hydrogel containing chitooligosaccharides conjugated with gallic acid. Carbohydr Polym. 2018;198:197-205.
30. Muddathir AM, Yamauchi K, Mitsunaga T. Anti-acne activity of tannin-related compounds isolated from *Terminalia laxiflora*. Journal of Wood Science. 2013;59:426-31.
31. Ekambaram SP, Perumal SS, Balakrishnan A. Scope of hydrolysable tannins as possible antimicrobial agent. Phytotherapy Research. 2016;30(7):1035-45.
32. Phan DT. Screening of antioxidant and tyrosinase inhibition activities of spicy vegetables in Vietnam and application of *Persicaria odorata* leaf extract to preservative white leg shrimp (*Litopenaus vannamei*). Anais da Academia Brasileira de Ciencias. 2021;93(3):3-4.
33. Manosroi A, Jantrawut P, Akazawa H, Akihisa T, Manosroi J. Biological activities of phenolic compounds isolated from galls of *Terminalia chebula* Retz. (Combretaceae). Natural product research. 2010;24(20):1915-26.