

นิพนธ์ต้นฉบับ

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารบ่งคุณภาพในตำรับยาฝิธนูธรวาด

สิริธร อำพันรุ้* สรรใจ แสงวิเชียร¹ และศุภะลักษณ์ พักคำ¹

¹การแพทย์แผนไทยประยุกต์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา

*ผู้นิพนธ์ที่ให้การติดต่อ E-mail: sireetorn.omed@gmail.com

Received date: October 7, 2021; Revised date: November 2, 2021; Accepted date: December 29, 2021

บทคัดย่อ

ตำรับยาฝิธนูธรวาดเป็นตำรับยาที่อยู่ในตำราศิลาจารึกวัดโพธิ์ประกอบไปด้วยสมุนไพร 7 ชนิด ซึ่งยังไม่มี การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารบ่งคุณภาพเพื่อการควบคุมคุณภาพ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ หาปริมาณสารบ่งคุณภาพของตำรับยาฝิธนูธรวาด ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เอชพีแอลซี ทำการศึกษาวิเคราะห์คุณภาพตำรับยาฝิธนูธรวาดพร้อมตรวจสอบความถูกต้องของวิธีด้วยการหาค่าความสัมพันธ์ เชิงเส้นตรง ค่าความแม่นยำ ค่าความถูกต้อง ค่าขีดจำกัดของการตรวจวัดและขีดจำกัดของการหาปริมาณ การศึกษา พบว่าสารบ่งคุณภาพที่เหมาะสม คือ 6-gingerol ซึ่งเป็นส่วนประกอบอยู่ในขิง ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์สารนี้โดย เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน กราฟมาตรฐานของสารบ่งคุณภาพ (6-gingerol) แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงที่ดี ในช่วงวิเคราะห์ ($r^2=0.9994$) ร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันเท่ากับ 1.21 และร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของการวิเคราะห์ระหว่างวันเท่ากับ 1.45 ค่าการกลับคืนของวิธี วิเคราะห์อยู่ในช่วงร้อยละ 99.61 ถึง 100.84 ขีดจำกัดในการตรวจพบและขีดจำกัดในการหาปริมาณคือ 0.13 และ 0.39 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ การวิเคราะห์ปริมาณสารบ่งคุณภาพในตำรับยาฝิธนูธรวาดด้วยวิธี เอชพี แอลซี นี้ พบปริมาณสาร 6-gingerol 86.38 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ สรุปได้ว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความเหมาะสมของการ วิเคราะห์หาสารบ่งคุณภาพในตำรับยาฝิธนูธรวาด

คำสำคัญ: ตำรับยาฝิธนูธรวาด สารบ่งคุณภาพ ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

Analytical Method Development of Chemical Markers in a Thai Traditional Preparation “Feethanuthorawat”

Sireetorn Umpanth^{1*}, Sanjai Sangvichien¹ and Supalak Fakkham¹

¹Applied Thai Traditional Medicine, Graduate School, Suan Sunandha Rajabhat University

*Corresponding Author E-mail: sireetorn.omed@gmail.com

Abstract

Feethanuthorawat preparation is remedy in the Wat Pho Inscriptions containing seven kinds of herbs. An analytical method for chemical marker determination was not developed. The Objective of this study was to quantify contents of marker in the Feethanuthorawat preparation by High Performance Liquid Chromatography HPLC. Qualitative analyses of the Feethanuthorawat preparation was determined using HPLC method. The method was validated on parameters including linearity, precision, accuracy, limit of detection and limit of quantitation. This study, 6-gingerol was simultaneously detected in HPLC chromatogram and identified by comparison with this of the standard compound. Marker (6-gingerol) presented good linearity within the test range ($r^2 = 0.9994$). The relative standard deviation of intraday precision was 1.21%. The relative standard deviation of intraday precision was 1.45%. The recovery of the method was in the range 99.61 to 100.84%. The contents of marker compound in Feethanuthorawat preparation was also quantified by this HPLC method. The limit of detection and the limit of quantitation was 0.13 and 0.39 $\mu\text{g/ml}$, respectively. The results showed that the content of 6-gingerol was 86.38 mg%. In conclusion, the method is suitable for qualitative analysis of marker in Feethanuthorawat.

Keywords: Feethanuthorawat, chemical markers, method validation

บทนำ

การควบคุมคุณภาพของยาสมุนไพรองค์การอนามัยโลกได้ส่งเสริมการใช้ยาสมุนไพรและได้กำหนดยุทธศาสตร์เกี่ยวกับการแพทย์ดั้งเดิม โดยส่งเสริมให้มีการใช้สมุนไพรพร้อมกับได้กำหนดแนวทางในการประเมินคุณภาพยาสมุนไพรใน 3 ด้าน คือการประเมินคุณภาพ การประเมินความปลอดภัย และการประเมินประสิทธิภาพ⁽¹⁾

ตำรับยาผีธนูธรวาด เป็นตำรับยาจากตำรายาศิลาจารย์กวดพระเชตุพนวิมลมังคลาราม ว่าด้วยลักษณะโรคที่เกิดภายใน เมื่อเป็นโรคจะมีอาการเจ็บหน้าอกถึงสันหลัง ปวดเมื่อยทั้งตัว วิงเวียนศีรษะ ชับถ่ายลำบาก ท้องอืด ชูบผอมลง เบื่ออาหาร นอนไม่หลับ⁽²⁾ ตำรับยาผีธนูธรวาดเป็นตำรับยาสมุนไพรไทย ที่ยังขาดรายงานการศึกษาวិเคราะห์ควบคุมคุณภาพของตำรับยา เพื่อให้เกิดการยอมรับในตำรับยาสมุนไพรไทยด้านคุณภาพ จึงควรจัดทำวิธีวิเคราะห์หาสารบ่งคุณภาพ เพื่อการควบคุมคุณภาพของตำรับยาตามหลักการประเมินคุณภาพยาสมุนไพรขององค์การอนามัยโลก

ในการควบคุมคุณภาพของยาจากสมุนไพรนั้นกระทำได้ยากกว่ายาแผนปัจจุบัน เนื่องจากมีส่วนประกอบเป็นสารประกอบทางพฤกษเคมีที่ซับซ้อนในส่วนประกอบตัวยาสมุนไพรแต่ละตัวอยู่เดิมแล้วและเมื่อประกอบเป็นตำรับยาทำให้เกิดความซับซ้อนมากยิ่งขึ้น⁽³⁾ ตำรับยาผีธนูธรวาด ประกอบด้วย โปบาย (*Balakata baccata* (Roxb.) Esser) รากชิงชี่ (*Capparis micracantha* DC.)⁽⁴⁾ รากัญชันขาว (*Clitorea ternatea* Linn.)⁽⁵⁾ พริกไทย (*Piper nigrum* Linn.)⁽⁶⁾ ชิงแห้ง (*Zingiber officinale* Roscoe.)⁽⁷⁾ ดีปลี (*Piper retrofractum* Vahl.)⁽⁸⁾ และกระเทียม (*Allium sativum* Linn.)⁽⁹⁾ สัดส่วนในตำรับใช้เสมอภาคกัน ซึ่งยากที่จะบ่งลักษณะของสารประกอบแต่ละตัวในตำรับได้อย่างสมบูรณ์และเป็นการยากที่จะทราบได้แน่นอนว่าสารประกอบทางเคมีตัวใดในสมุนไพรนั้นหรือในตำรับยานั้นเป็นสารออกฤทธิ์ เนื่องจากสารประกอบเหล่านั้นมักจะออกฤทธิ์เสริมกันในการรักษา การหาสารบ่งคุณภาพ (marker)⁽¹⁰⁾ จึงเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการควบคุมคุณภาพสมุนไพร โดยใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟี⁽¹¹⁾ ในการวิเคราะห์หาปริมาณจะใช้สารบ่งคุณภาพ ที่เลือกจากสารเคมีที่เป็นส่วนประกอบของสมุนไพรในตำรับยานั้น ๆ เป็นตัวบ่งชี้คุณภาพของตำรับยานั้น สำหรับการควบคุมคุณภาพประกอบด้วยการวิเคราะห์หาปริมาณของสารบ่งคุณภาพ⁽¹²⁾ และใช้สารนี้เป็นตัวเปรียบเทียบหลักกับส่วนประกอบอื่น ๆ ในตำรับยาด้วยการคำนวณอัตราส่วนของพื้นที่หรือความสูงของพีคอื่นในโครมาโทแกรมเปรียบเทียบกับสารบ่งคุณภาพ สำหรับคุณสมบัติที่ดีของสารบ่งคุณภาพคือ ทราบสูตรโครงสร้างทางเคมีที่แน่นอน อาจมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาด้วยก็ได้ หรือมีความสัมพันธ์กับสรรพคุณของตำรับยา⁽¹³⁾

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อหาสารบ่งคุณภาพ (chemical marker) ของตำรับยาผีธนูธรวาด ที่ประกอบด้วยตัวยาสมุนไพร 7 ชนิด
2. เพื่อพัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณสารบ่งคุณภาพของตำรับยาผีธนูธรวาด โดยใช้สารบ่งคุณภาพที่พบในตำรับยาด้วย เอชพีแอลซี และตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

ระเบียบวิธีศึกษา

1. วัตถุดิบและสารเคมี

วัตถุดิบ สมุนไพร 7 ชนิด คือ โปบาย รากชิงช้า รากอัญชันขาว พริกไทย ชিংแห้ง ดีปลี และกระเทียม จากบริษัท เจ้ากรมเปื้อ และเวชพงศ์ไอส กรุงเทพมหานคร

สารเคมี 6-gingerol (ChemFaces, CHINA) Methanol, Acetic acid (Merck, Germany) Acetonitrile (J.T.Baker, USA)

2. เครื่องมือและอุปกรณ์

High Performance Liquid Chromatography ประกอบด้วย Spectra System P42000 pump, Spectra System As3000 Autosample, Spectra System UV- visible detector, ChromQuest® Chromatography Workstation Column ชนิด VDSpher PUR 100 C18-SE (4.6x250 มิลลิเมตร, 5 ไมโครเมตร)

3. การเตรียมสารมาตรฐาน

ซึ่งสารมาตรฐาน 6-gingerol อย่างแม่นยำ ละลายด้วยเมทานอลให้ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางด้วยเมทานอลให้ความเข้มข้นต่าง ๆ กันเพื่อใช้เป็นสารมาตรฐานในการวิเคราะห์

4. การเตรียมตัวอย่างเพื่อใช้ในการวิเคราะห์

ซึ่งผงตำรับยาฝัchnerawat 500 มิลลิกรัม ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) 25 มิลลิลิตร เติมเมทานอล ลงไป 15 มิลลิลิตร นำไป sonicate เป็นเวลา 30 นาที แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอล ผสมให้เข้ากัน แล้วนำสารละลายที่ได้กรองผ่านหัวกรองชนิด nylon ขนาด 0.22 ไมโครเมตร จากนั้นนำสารละลายที่กรองได้ทำการเข้าเครื่องวิเคราะห์ โดยปริมาตรการฉีดสารของเครื่องเอชพีแอลซี คือ 20 ไมโครลิตร

5. การบ่งเอกลักษณ์ในตำรับยาฝัchnerawat

วิเคราะห์ตัวอย่างตำรับยาฝัchnerawat และสารมาตรฐานเปรียบเทียบเวลา (retention time) และลักษณะ UV-spectrum ของพีค (peak) ตัวอย่างกับสารมาตรฐาน โดยมีระบบโครมาโทกราฟีที่เหมาะสมแสดงในตารางที่ 1 ดังนี้ วัสดุภาคนิ่ง VDSpher PUR 100 C18-SE (4.6 x 250 มิลลิเมตร ID, 5 ไมโครเมตร) และวัสดุภาคเคลื่อนที่ทำการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนระหว่าง 2 ตัว คือ 2% (v/v) อะซิติกในน้ำ (A) และอะซิโตไนโตรล์ (B) โดยมีอัตราส่วนดังนี้ 0-20 นาที 100% A, 20-40 นาที 40% A, 40-50 นาที 20% A, 50-60 นาที 0% A ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที และความยาวคลื่นในการตรวจวัดคือ 280 นาโนเมตร

6. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation)

6.1 ค่าความเป็นเส้นตรง (linearity) และช่วงความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรง (range)

สร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) โดยวิเคราะห์สารละลายของสารบ่งคุณภาพ ความเข้มข้นต่าง ๆ กันอย่างน้อย 6 ความเข้มข้น นำผลที่ได้มาหาค่าความเป็นเส้นตรงระหว่าง peak area กับความเข้มข้นของสาร linear range ประเมินจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r^2) ของ calibration curve ซึ่ง r^2 ต้องมากกว่า 0.9950

6.2 ความแม่นยำ (precision)

ทำการเตรียมตัวอย่างตำรับยาฝัchnerawat จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาค่าความแม่นยำภายในวันเดียวกัน (intraday precision) และค่าความแม่นยำระหว่างวัน (interday precision) นำผลที่ได้ไปหาร้อยละส่วน

เบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%relative standard deviation, %RSD) ซึ่ง %RSD ของ intraday precision ตรงน้อยกว่า 6% และ %RSD ของ interday precision ต้องน้อยกว่า 11%

6.3 ความถูกต้อง (accuracy)

เติมสารบ่งคุณภาพที่ทราบความเข้มข้นลงไปในตัวอย่งตำรับยาผีธนูธรวาดที่วิเคราะห์หาปริมาณสารเทียบกับตัวอย่งตำรับยาผีธนูธรวาดที่ไม่ได้เติมสาร หาร้อยละของการกลับคืน (%recovery) โดยเกณฑ์ในการยอมรับอยู่ในช่วง 98-102%

6.4 ขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) และขีดจำกัดในการวิเคราะห์ (Limit of quantitation, LOQ)

ค่า LOD ตรวจสอบด้วยการหาความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีทดสอบนั้น ๆ สามารถตรวจพบได้ โดยคำนวณจากค่า signal to noise เท่ากับ 3:1 และค่า LOQ ได้จากความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีทดสอบนั้น ๆ สามารถวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้อง โดยคำนวณจากค่า signal to noise เท่ากับ 10:1 ขึ้นไป

7. การวิเคราะห์หาสารบ่งคุณภาพในตัวอย่งตำรับยาผีธนูธรวาด

ใช้วิธีที่ศึกษาไว้ วิเคราะห์หาปริมาณสารบ่งคุณภาพในตัวอย่งตำรับยาผีธนูธรวาดที่เตรียมในห้องปฏิบัติการ วิเคราะห์ตัวอย่งละ 3 ซ้ำ

8. สถิติที่ใช้

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลคือ การวิเคราะห์การถดถอย (linear regression), หาค่าเฉลี่ย (\bar{X}), ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.), ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD) และสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r)

ผลการศึกษา

1. การบ่งเอกลักษณ์ในตำรับยาผีธนูธรวาด

ผลการตรวจเอกลักษณ์ของตำรับยาผีธนูธรวาด พบว่าสารบ่งคุณภาพของตำรับที่สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์และระบุได้ คือ สาร 6-gingerol ที่เวลา 23.87 นาที ดังแสดงในภาพที่ 1 ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในเชิงเมื่อเปรียบเทียบกับโครมาโทแกรมของพืชสมุนไพรแต่ละชนิดในตำรับกับโครมาโทแกรมของตำรับยาผีธนูธรวาด พบพีคสูงสุดของสมุนไพรแต่ละชนิดในตำรับ 18 พีคที่ไม่ซ้อนกันนี้เป็นเอกลักษณ์ของตำรับยาผีธนูธรวาดดังภาพที่ 2 และตารางที่ 2 ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของตำรับยาที่พบได้โดยอาศัยเวลาในการเคลื่อนที่ของสาร และ UV spectrum จากภาพที่ 3 แสดงให้เห็นลักษณะ UV-spectrum ของ peak 6-gingerol ในตำรับมีลักษณะเหมือนกับของสารมาตรฐาน ทุกประการ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าในตัวอย่งมี 6-gingerol อยู่จริง

2. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

ความเป็นเส้นตรง และช่วงความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรง ได้กราฟสารมาตรฐานที่มีความเป็นเส้นตรงดังสมการ $y = 67094x - 13657$ ($r^2 = 0.9994$) โดยที่ x คือความเข้มข้นของ 6-gingerol ($\mu\text{g/ml}$) และ y คือ peak area ดังภาพที่ 4

ค่าความแม่นยำ เมื่อหาค่าความแม่นยำภายในวันเดียวกัน (Intraday precision) และค่าความแม่นยำระหว่างวัน (Interday precision) ได้ค่า %RSD เท่ากับ 1.21 และ 1.45 ตามลำดับ ดังตารางที่ 3

ค่าความถูกต้อง การหา %recovery จากการเติมสารมาตรฐาน 6-gingerol ที่ทราบความเข้มข้นลงในตัวอย่างซึ่งเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้เติมสาร แล้วคำนวณหา %recovery พบว่า %recovery ของ 6-gingerol อยู่ในช่วง 98-102% ดังแสดงในตารางที่ 4

ขีดจำกัดในการตรวจพบ และขีดจำกัดในการวิเคราะห์ ค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 0.13 และ 0.39 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

3. การวิเคราะห์หาปริมาณสาร 6-gingerol ในตำรับยาฝัองูธรวาด

การหาปริมาณสาร 6-gingerol ในตำรับยาฝัองูธรวาดพบว่าปริมาณสารดังกล่าวในตำรับยามีค่าเท่ากับ 86.38 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การเบี่ยงเบนเท่ากับ 1.10 เปอร์เซ็นต์

อภิปรายผล

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่สามารถตรวจหาปริมาณสารบ่งคุณภาพในตำรับยาฝัองูธรวาด จากการบ่งเอกลักษณ์ในตำรับยาโดยการเปรียบเทียบโครมาโตแกรมของตัวอย่างที่เป็นส่วนประกอบทั้งหมด คือ โปบาย ชิงซี อัญชันขาว พริกไทย ชิงแห้ง ดีปลี กระเทียม พบว่าสารบ่งคุณภาพที่เหมาะสม คือ สาร 6-gingerol⁽¹⁴⁾ ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในชิง สาร 6-gingerol เป็นสารที่ให้กลิ่นฉุนรสเผ็ดสามารถยับยั้งอาการปวดและป้องกันการอักเสบได้⁽¹⁵⁾ ซึ่งมีสรรพคุณสัมพันธ์กันกับตำรับยา วิธีวิเคราะห์นี้สามารถใช้พิสูจน์เอกลักษณ์เบื้องต้นของตำรับยาฝัองูธรวาดได้ และยังพบพืชอื่น ๆ อีกในโครมาโตแกรมของตำรับยาฝัองูธรวาด จึงควรทำการศึกษาต่อไปเพื่อจำแนกชนิดสารในตำรับยาฝัองูธรวาดให้ได้มากที่สุด ในการศึกษาที่ผ่านมาของสถานะที่ใช้ในการทดสอบหาปริมาณสาร 6-gingerol และสารที่เป็นองค์ประกอบในชิง พบว่าวิธีวิเคราะห์นี้สามารถปรับปรุงให้มีสถานะที่ง่ายต่อการทดสอบและการเตรียมสารวิภาคเคลื่อนที่มีความซับซ้อนลดลง⁽¹⁶⁾

สำหรับผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารบ่งคุณภาพ 6-gingerol พบว่าผลการทดสอบในด้านความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linearity) มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) ของค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.9994 โดยร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของความแม่นยำอยู่ในช่วง 1.21-1.45 ความถูกต้องมีค่าร้อยละของการกลับคืนเท่ากับ 100.84, 99.61 และ 100.12 ตามลำดับ ปริมาณความเข้มข้นต่ำที่สุดสามารถตรวจวัดได้ (LOD) มีค่า 0.13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOQ) มีค่า 0.39 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งผลการทดสอบเหล่านี้ผ่านเกณฑ์ตามข้อกำหนดของ ICH guideline⁽¹⁷⁾

ข้อสรุป

การวิเคราะห์คุณภาพของตำรับยาฝัองูธรวาดโดยโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูงที่ศึกษาวิจัยนี้สามารถใช้เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ตำรับยาฝัองูธรวาดได้วิธีที่เหมาะสมในการควบคุมคุณภาพตำรับยาที่มีส่วนประกอบของสมุนไพรจำนวน 7 ชนิด และพบพืชของสมุนไพรแต่ละชนิดในตำรับจำนวน 18 พืช ซึ่งหนึ่งในนั้นคือสาร 6-gingerol ของชิงใช้เป็นสารบ่งคุณภาพของตำรับ และได้สภาวะการทดลองที่เหมาะสมสำหรับการหาปริมาณสาร 6-gingerol ในตำรับยาฝัองูธรวาดซึ่งหาปริมาณได้เท่ากับ 86.38 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ของผงสมุนไพรตำรับ นอกจากนี้ได้ตรวจสอบวิธีวิเคราะห์ พบว่าวิธีที่ได้มีความถูกต้องและเที่ยงตรงสูง มีความน่าเชื่อถือ ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมคุณภาพสมุนไพรไทยที่มีส่วนประกอบในตำรับเป็นชิงได้ และนำไปปรับปรุงให้สภาวะการทดลองมี

ความเหมาะสมมากยิ่งขึ้นในการควบคุมคุณภาพสมุนไพรไทยที่มีส่วนประกอบในตำรับเป็น โปบาย ชิงชี อัญชันชาว
พริกไทย และดีปลีต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เนื่องจากผู้วิจัยได้รับความร่วมมือและช่วยเหลือในการปฏิบัติงานจากคณะ
อาจารย์ผู้ร่วมโครงการวิจัย ผู้วิจัยขอขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้ นอกจากนี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์
ดร.สุรพจน์ วงศ์ใหญ่ ที่กรุณาเป็นผู้เชี่ยวชาญให้คำแนะนำปรึกษาตลอดจนปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วย
ความเอาใจใส่อย่างดียิ่ง

ตาราง ภาพ และแผนภาพ

ตารางที่ 1 ระบบโครมาโทกราฟีที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ตำรับยาผีธนูธรวาด

วัสดุภาควัด	คอลัมน์ VDSpher® PUR 100 C18-SE, 4.6x250 มิลลิเมตร, 5 ไมโครเมตร		
วัสดุภาคเคลื่อนที่	A: 2% acetic acid in water B: acetonitrile		
การชะ	แบบเกรเดียน (gradient)		
	เวลา (นาที)	ร้อยละของ A	ร้อยละของ B
	0	100	0
	20	40	60
	40	20	80
	50	0	100
60	0	100	
อัตราการไหล	1 มิลลิเมตร / นาที		
ปริมาตรการฉีดสาร	20 ไมโครลิตร		
ความยาวคลื่นในการวัด	UV 280 นาโนเมตร		

ตารางที่ 2 แสดงพีคที่เป็นส่วนประกอบของสมุนไพรแต่ละตัวในตำรับยาผีธนูธรวาดทั้ง 18 พีค

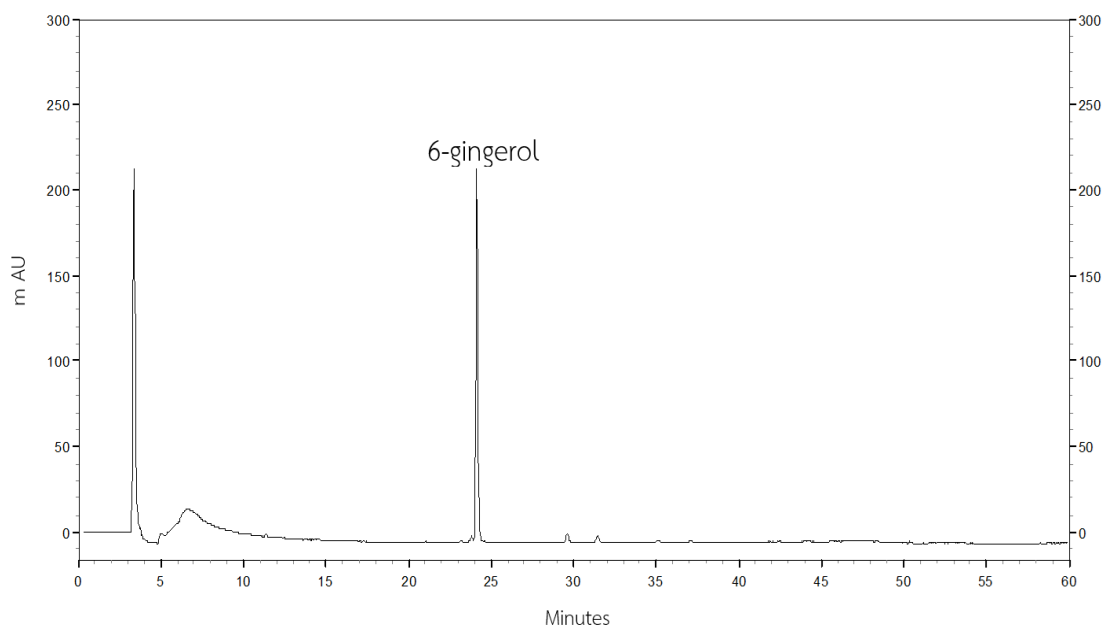
สมุนไพร	Retention time (peak no.)
โอบาย	5.73(1), 7.19(2), 13.26(7) และ 16.95(8)
พริกไทย	30.47(13), 31.81(15) และ 33.91(16)
ชิงชี่	12.35(5)
อัญชันขาว	12.11(4) และ 18.53(9)
ชิง	23.83(10) และ 31.31(14)
ดีป्ली	24.50(11), 27.80(12), 35.96(17) และ 55.55(18)
กระเทียม	10.98(3)

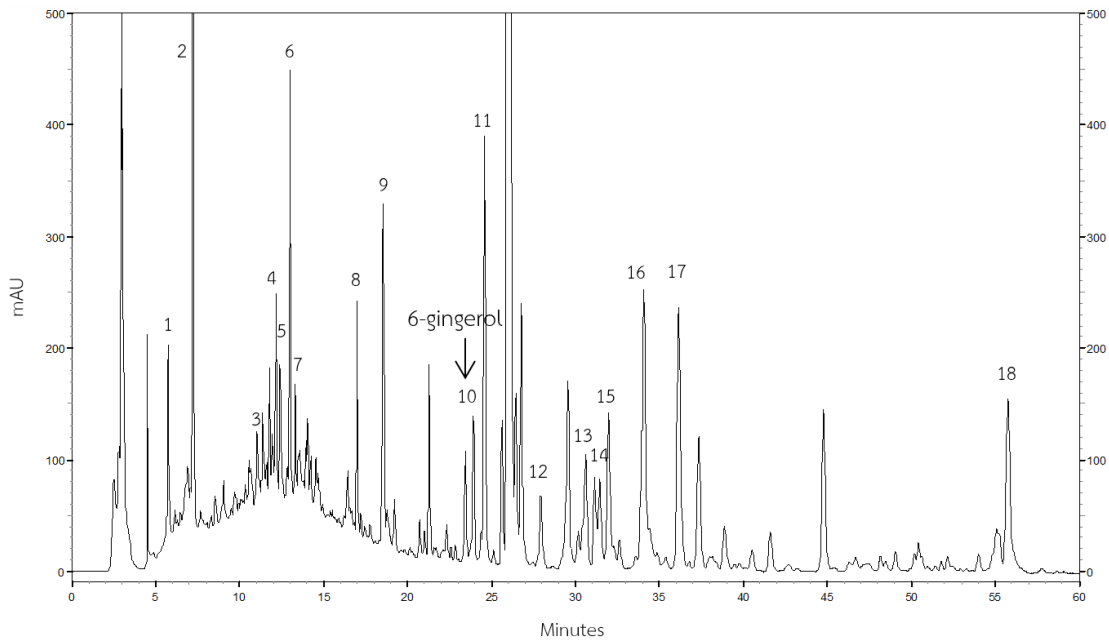
ตารางที่ 3 ผลการศึกษาการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

Parameters	Results
Linearity	$y = 67094x - 13657$
Correlation coefficient, r^2	0.9994
Intraday precision (%RSD)	1.21
Interday precision (%RSD)	1.45
Limit of detection ($\mu\text{g/ml}$)	0.13
Limit of quantitation ($\mu\text{g/ml}$)	0.39

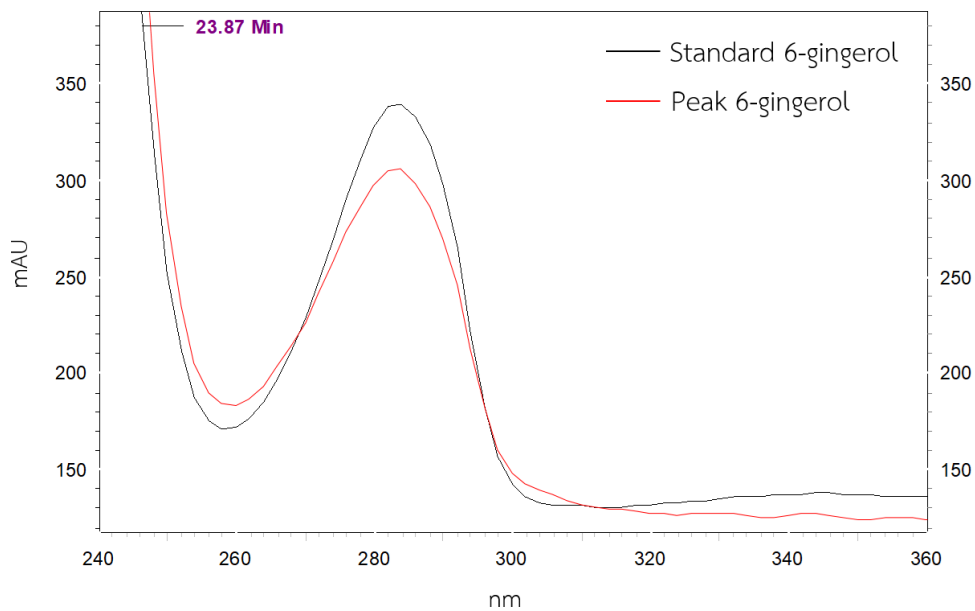
ตารางที่ 4 แสดงเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 3 ระดับ

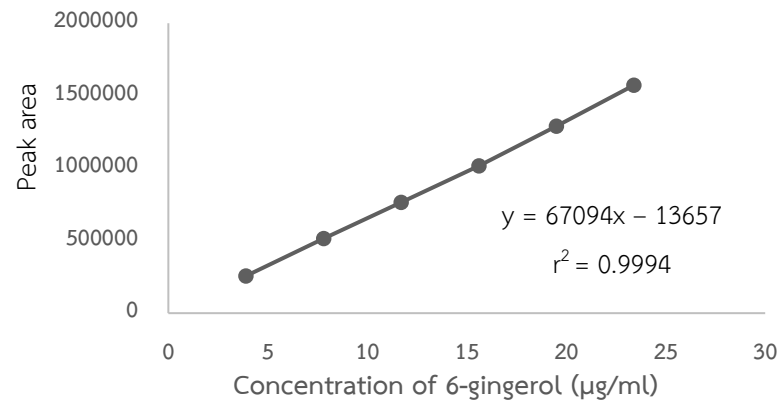
spiked sample	%Recovery	%RSD	เกณฑ์การยอมรับ
Low level (80%)	101.84	0.58	
Medium level (100%)	99.61	0.94	98-102%
High level (120%)	100.12	0.93	

ภาพที่ 1 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน 6-gingerol 23.40 $\mu\text{g/ml}$



ภาพที่ 2 โครมาโตแกรมของตำรับยาผีธนูธรวาด

ภาพที่ 3 เปรียบเทียบ UV-spectrum ของสารมาตรฐาน 6-gingerol และ peak 6-gingerol ของชิง
ในตำรับยาผีธนูธรวาด



ภาพที่ 4 กราฟมาตรฐานของสาร 6-gingerol

เอกสารอ้างอิง

1. สำนักงานคณะกรรมการสุขภาพแห่งชาติ. (2559). ยุทธศาสตร์การแพทย์ดั้งเดิมขององค์การอนามัยโลก พ.ศ. 2557-2566. กรุงเทพฯ: อุษาการพิมพ์.
2. วัดพระเชตุพนวิมลมังคลาราม ราชวรมหาวิหาร. (ม.ป.ป.). ตำรายาศิลาจารึกในวัดพระเชตุพนวิมลมังคลาราม (วัดโพธิ์) พระนครพระบาทสมเด็จพระนั่งเกล้าเจ้าอยู่หัวทรงพระกรุณาโปรดเกล้าให้จารึกไว้เมื่อ พ.ศ. 2375 ฉบับสมบูรณ์. ม.ป.ท.ปัญญา.
3. นพมาศ สุนทรจาริณนธ์ และนางลักษณธ์ เรื่องวิเศษ. (2551). วิเคราะห์วิจัยคุณภาพเครื่องยาไทย. กรุงเทพฯ: คอนเซ็ปท์ เมดิคัล.
4. Singharachai, C., Palanuvej, C., Kiyohara, H., Yamada, H., & Ruangrunsi, N. (2011). Pharmacognostic Specification of Five Root Species in Thai Traditional Medicine Remedy: Ben-Cha-Lo-KaWi-Chian. *Pharmacognosy Journal*, 3(21), 1–11.
5. Jain, R. A., & Shukla, S. H. (2011). Pharmacognostic Evaluation and Phytochemical Studies on Stem of *Clitoria ternatea* linn. *Pharmacognosy Journal*, 3(24), 62-66.
6. Ahmad, A., Husain, A., Mujeeb, M., Khan, S. A., Alhadrami, H. A. A., & Bhandari, A. (2015). Quantification of total phenol, flavonoid content and pharmacognostical evaluation including HPTLC fingerprinting for the standardization of *Piper nigrum* Linn fruits. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(2), 101-107.
7. Semwal, R. B., Semwal, D. K., Combrinck, S., & Viljoen, A. M. (2015). Gingerols and shogaols: Important nutraceutical principles from ginger. *Phytochemistry*, 117, 554-568.
8. Muharini, R., Liu, Z., Lin, W., & Proksch, P. (2015). New amides from the fruits of *Piper retrofractum*. *Tetrahedron Letters*, 56(19), 2521-2525.
9. วุฒิ วุฒิธรรมเวช. (2540). สารานุกรมสมุนไพรรวมหลักเภสัชกรรมไทย. กรุงเทพฯ: โอ.เอส.พรีนติ้งเฮ้าส์.
10. Bik-San Lau, C., Yue, G. G. L., Lau, K. M., Chan, Y. Y., Shaw, P. C., Kwok, H. F., & Wong, L. S. (2019). Method establishment for upgrading chemical markers in pharmacopoeia to bioactive markers for biological standardization of traditional Chinese medicine. *Journal of traditional and complementary medicine*, 9(3), 179-183.
11. Li, Y., Shen, Y., Yao, C. L., & Guo, D. A. (2020). Quality assessment of herbal medicines based on chemical fingerprints combined with chemometrics approach: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 185, 113215.

12. สิริพร สีนิลแท้, จักพงษ์ ขาวะหา, กุสุมา จิตแสง, ทรงพร จึงมั่นคง, ทวีศักดิ์ จึงวัฒนตระกูล, สุदारัตน์ หอมหวาน, และคนอื่นๆ. (2562). การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีของตำรับยาธาตุบดละเอียดด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง. *วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก*, 17(3), 418-427.
13. Li, S., Han, Q., Qiao, C., Song, J., Cheng, C. L., & Xu, H. (2008). Chemical markers for the quality control of herbal medicines: an overview. *Chinese medicine*, 3(1), 1-16.
14. Kumar, G., Karthik, L., & Rao, K.B. (2011). A review on pharmacological and phytochemical properties of *Zingiber officinale* Roscoe (Zingiberaceae). *Journal of Pharmacy Research*, 4(9), 2963-2966.
15. Wang, S., Zhang, C., Yang, G., & Yang, Y. (2014). Biological properties of 6-gingerol: a brief review. *Natural Product Communications*, 9(7), 1027-1030.
16. Liu, M., Xia, X., Chou, G., Liu, D., Zuberi, A., Ye, J., & Liu, Z. (2014). Variations in the contents of gingerols and chromatographic fingerprints of ginger root extracts prepared by different preparation methods. *Journal of AOAC International*, 97(1), 50-57.
17. ICH. (2005). Guidance for industry Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology. *International Conference on Harmonization*, Geneva: Switzerland.

