การศึกษาลักษณะโครมาโทแกรมและวิเคราะห์ปริมาณสารอะโลอินและสารพิเพอร์รีน ในตำรับยาสมุนไพรธรณีสัณฑะฆาต ที่มีการจำหน่ายในประเทศไทย โดยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Fingerprint Study and Analysis of Aloin and Piperine Contents From Thor-Ra-Nee-San-Ta-Kat (TRK) Formula in Thailand

ทัชชภัทร กุลสุวรรณ (Tachaphut Gunsuwan)* ดร.ธนิสร์ ปทุมานนท์ (Dr.Tanit Padumanonda)[1]**
ดร.ประธาน ฦๅชา (Dr.Prathan Luecha)**

(Received: *April 29, 2021*; Revised: *June 15, 2021*; Accepted: *June 17, 2021*)

บทคัดย่อ

ยาธรณีสัณฑะฆาตเป็นตำรับยาที่ใช้รักษาโรคมาตั้งแต่สมัยโบราณ สรรพคุณตามบัญชียาหลักแห่งชาติคือ แก้กษัยเส้น ปัจจุบันมีการผลิตเพื่อใช้ในโรงพยาบาล และคลินิกเวชกรรมไทยเพื่อรักษาอาการปวดกล้ามเนื้อเรื้อรังและรักษาอาการท้องผูกรวมทั้งผลิตเพื่อจำหน่ายในระบบโรงงานอุตสาหกรรม งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาลักษณะโครมาโทแกรมและวิเคราะห์ปริมาณของสารสารอะโลอินและสารสารพิเพอร์รีน ในตำรับยาธรณีสัณฑะฆาตที่มาจากการเตรียมขึ้นเองและเปรียบเทียบกับยาที่มีการผลิตในโรงพยาบาลและตำรับที่มีการวางจำหน่ายตามท้องตลาด โดยใช้เทคนิค HPLC ผลการศึกษาลายพิมพ์นิ้วมือพบว่า ลายพิมพ์นิ้วมือของตำรับยาธรณีสัณฑะฆาตมีพีคที่มีลักษณะเด่น ชัดเจน และพบใน TRK 1- TRK 11 มีหมด 6 พีค มีค่า retention time คือ 2.567, 3.421, 11.782, 12.985, 14.970 และ 49.752 และเมื่อเทียบกับสารมาตรฐานที่ทำการวิเคราะห์พบว่า มีพีคที่สามารถระบุชื่อสารได้ 3 พีค คือ retention time 12.985 และ14.970 คือสาร อะโลอิน A และสาร อะโลอิน B ตามลำดับ retention time 49.752 เป็นสาร พิเพอร์รีน และการวิเคราะห์หาปริมาณของสารพบว่า ค่าเฉลี่ยของปริมาณสารอะโลอินและสารพิเพอร์รีน ที่พบในตัวอย่างทั้ง 11 ตัวอย่าง เฉลี่ยคิดเป็นร้อยละ 16.524 ± 0.41 และ 25.590 ± 037 ของน้ำหนักแห้ง ผลการศึกษาที่ได้ นำไปสู่การจัดทำเป็นมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพของตำรับยาสัณฑะฆาตเพื่อเป็นการสร้างความเชื่อมั่นประสิทธิภาพและความปลอดภัยให้แก่ผู้บริโภคได้ต่อไปในอนาคต

ABSTRACT

Thor-Ra-Nee-San-Ta-Kat (TRK) is an ancient herbal formula used for the treatment of various diseases with the indication from the list of essential herbal medicinal products for the treatment of degenerative diseases. TRK is manufactured and distributed in hospitals and Thai traditional clinics for the treatment of chronic muscle pain and constipation as well as large-scale production in pharmaceutical

[1]*Corresponding author: tanpad@kku.ac.th*
**นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชกรรมแผนไทย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
***ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาเภสัชเวทและพิษวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*

factories. This research is the high-performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint study and analysis of aloin and piperine from an in-house TRK product compared with ten TRK products from hospitals and commercial sources. The results exhibited six distinct HPLC peaks from TRK1-TRK11 at the retention time of 2.567, 3.421, 11.782, 12.985, 14.970, and 49.752. The HPLC peaks at retention times 12.985 and 14.970 were identified as aloin A and aloin B, respectively whereas the peak at 49.752 was pinpointed as piperine. The marker analysis showed that the average aloin content and piperine content in TRK products were 16.524 ± 0.41 and 25.590 ± 037 % dry weight, respectively. The results from the study will be useful for the standardization and quality control together with the increment of confidence, the efficiency, and the safety of TRK products in the future.

คำสำคัญ: อะโลอิน พิเพอร์รีน ตำรับยาธรณีสัณฑะฆาต
Keywords: Aloin, Piperine, Thor-Ra-Nee-San-Ta-Kat Formula

บทนำ

ยาธรณีสัณฑะฆาตเป็นตำรับยาที่ใช้รักษาโรคมาตั้งแต่สมัยโบราณ พบมีการบันทึกไว้ในตำราเวชศึกษาของพระยาพิศณุ ประสาทเวช [1] ได้รับคัดเลือกเข้าเป็นตำรับยาสมุนไพรในบัญชียาหลักแห่งชาติตั้งแต่ปี พ.ศ. 2554 ถึงปัจจุบัน มีส่วนประกอบของสมุนไพรทั้งหมด 26 ชนิด ได้แก่ พริกไทยล่อน ยาดำ(สะตุ) เนื้อลูกสมอไทย มหาหิงคุ์ การบูร รงทอง (สะตุ) ผักแพวแดง (ทั้งต้น) เนื้อลูกมะขามป้อม ลูกจันทน์ ดอกจันทน์ ลูกกระวาน ดอกกานพลู เทียนดำ เทียนขาว หัวดองดึง หัวบุก หัวกลอย หัวกระดาดขาว หัวกระดาดแดง ลูกเร่ว เหง้าขิง รากชะเอมเทศ รากเจตมูลเพลิงแดง โกฐกระดูก โกฐเขมา และโกฐน้ำเต้า [1] ปัจจุบันมีการผลิตเพื่อใช้ในโรงพยาบาล และคลินิกเวชกรรมไทย เพื่อรักษาอาการปวดกล้ามเนื้อเรื้อรัง และรักษาอาการท้องผูก รวมทั้งผลิตเพื่อจำหน่ายในระบบโรงงานอุตสาหกรรม ผู้ป่วยสามารถซื้อได้ตามร้านขายยาทั่วไป มีการศึกษาความปลอดภัยของตำรับ โดยการทดสอบพิษเฉียบพลันและพิษเรื้อรังในหนูทดลอง พบว่ามีความปลอดภัย LD50 มากกว่า 10 กรัม/กิโลกรัม ซึ่งสูงกว่าขนาดใช้ในคน 1,600 เท่า [2]

การวิเคราะห์ตำรับยาธรณีสัณฑะฆาตตามโครงสร้างยาไทยพบว่า มียาหลักคือ พริกไทยล่อน คิดเป็นร้อยละ 60 ในตำรับ และยารองคือ ยาดำคิดเป็นร้อยละ12.5 ในตำรับ ซึ่งในพริกไทยมีสารสำคัญคือ Piperine มีฤทธิ์แก้ปวด มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ [3] สามารถลด oxidative stress ในเซลล์ของหนูที่ได้รับอาหารที่มีไขมันสูง [4] ยาดำมีสาร Aloin A และ Aloin B มีฤทธิ์ในการเพิ่มการเคลื่อนไหวของลำไส้ใหญ่ และยับยั้งการดูซึมกลับของน้ำ [5] สามารถป้องกันการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน ป้องกันการเกิดเบาหวาน และสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ [6]

ในการควบคุมคุณภาพของสมุนไพรนั้น จะต้องมีการควบคุมคุณภาพตั้งแต่เริ่มต้นการผลิตนั่นคือวัตถุดิบ ตลอดจนกระบวนการผลิต และสุดท้ายคือผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการผลิต การควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการผลิตถือเป็นสิ่งที่สำคัญมาก เพื่อเป็นการตรวจสอบคุณภาพของยา และความปลอดภัยก่อนส่งถึงผู้บริโภค ซึ่งการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การศึกษาลักษณะลายพิมพ์นิ้วมือเพื่อจัดทำเป็นมาตรฐานใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องของการผลิตครั้งต่อไป การวิเคราะห์หาปริมาณตัวบ่งชี้ทางเคมีของตำรับยาเพื่อเป็นการระบุปริมาณตัวบ่งชี้ทางเคมีของตำรับยารวมไป

ถึงสามารถระบุขนาดในการรับประทาน สิ่งเหล่านี้ล้วนเป็นสิ่งสำคัญในการผลิตยาสมุนไพรที่ผู้ผลิตยาสมุนไพรไทยส่วนมากยังขาดการควบคุมคุณภาพในลักษณะดังกล่าวเมื่อเทียบกับการผลิตยาแผนปัจจุบัน

จากการทบทวนวรรณกรรมที่ผ่านมา ผู้วิจัยเห็นความสำคัญในการควบคุมคุณภาพของตำรับยาสมุนไพร โดยเฉพาะตำรับยาธรณีสัณฑะฆาตซึ่งเป็นยาในมีการใช้อย่างแพร่หลายในทางการแพทย์แผนไทยแต่ยังขาดการควบคุมคุณภาพภาพทั้งในด้านกายภาพและทางเคมี ดังนั้นผู้วิจัยจึงศึกษาลายพิมพ์นิ้วมือของตำรับยาธรณีสัณฑะฆาตเพื่อระบุตัวบ่งชี้ทางเคมีและการวิเคราะห์หาปริมาณตัวบ่งชี้ทางเคมีของตำรับยาธรณีสัณฑะฆาต เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพของตำรับยาให้มีมาตรฐานและสร้างความเชื่อมั่นในการใช้ยาธรณีสัณฑะฆาตให้แก่ผู้บริโภค และเป็นข้อมูลสนับสนุนในการสั่งจ่ายยาของแพทย์แผนไทยและบุคคลากรทางด้านสาธารณสุข และยังเป็นการส่งเสริม สนับสนุน พัฒนาการแพทย์แผนไทยให้เป็นที่ยอมรับ เห็นผลเชิงประจักษ์ ตามนโยบายและแผนพัฒนาเศรษฐกิจแห่งชาติ นำการแพทย์แผนไทยให้เป็นการแพทย์ผสมผสานที่มีคุณภาพต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ศึกษาลายพิมพ์นิ้วมือและวิเคราะห์ปริมาณสารอะโลอินและสารพิเพอร์รีนในตำรับยาธรณีสัณฑะฆาตจากยาที่มีเตรียมขึ้นเอง และยาที่มีการวางจำหน่ายทั่วประเทศ โดย เทคนิค HPLC

วิธีการวิจัย

การเตรียมตัวอย่างและเก็บตัวอย่างตำรับยาธรณีสัณฑะฆาต

จัดเตรียมตำรับยาธรณีสัณฑะฆาตที่เตรียมขึ้นเอง โดยการจัดสมุนไพรที่เป็นส่วนผสมในตำรับทั้ง 26 ชนิด ช่วงเดือนสิงหาคม 2562 โดยทำการจัดซื้อสมุนไพรแห้งจากแหล่งการค้าสมุนไพรในจังหวัดนครปฐม 25 ชนิด เก็บตัวอย่างพริกไทยล่อนที่สวนพริกไทย ในจังหวัดจันทบุรี จากนั้นนำสมุนไพรมาตรวจสอบความถูกต้องโดยแพทย์แผนไทยที่มีความชำนาญ และทำความสะอาดคัดแยกสิ่งแปลกปลอม ในส่วนของสมุนไพรที่ต้องผ่านกระบวนการลดฤทธิ์ของยาสมุนไพรที่มีฤทธิ์แรงก่อนนำมาปรุงยา ได้แก่ ยาดำ รงทอง และมหาหิงคุ์ ที่ต้องนำมาผ่านกระบวนการ ซึ่งทางการแพทย์แผนไทยเรียกว่าการ สะตุ ซึ่งมีวิธีการดังนี้ การสะตุยาดำ วิธีการคือนำยาดำที่บดละเอียดใส่ในหม้อดิน เติมน้ำเล็กน้อย ยกขึ้นตั้งไฟเคี่ยวจนยาดำนั้นกรอบดีแล้วจึงนำไปใช้ปรุงยา [7] การสะตุมหาหิงคุ์ นำมหาหิงคุ์ที่บดละเอียดมาใส่ภาชนะไว้ เอาใบกะเพราแดงใส่น้ำต้มเดือดเทน้ำใบกะเพราแดง ลงละลายมหาหิงคุ์ แล้วนำมากรองให้สะอาด จากนั้นนำไปเทใส่ถาดแล้วตากให้แห้งเป็นแผ่น จึงนำไปปรุงยาได้ [7] การสะตุรงทอง เอารงทองมาบดให้ละเอียดแล้วห่อด้วยใบบัว หรือใบข่า 7 ชั้นนำไปปิ้งไฟจนสุกกรอบดี จึงนำไปใช้ปรุงยาได้ [7] เมื่อได้สมุนไพรที่ทำความสะอาด และสะตุเรียบร้อยแล้ว ทำสมุนไพร ทั้ง 26 ชนิดแล้ว นำสมุนไพรมาชั่งตรวจสัดส่วนในตำรับยาธรณีสัณฑะฆาต ได้แก่ พริกไทยล่อน 96 กรัม ยาดำสะตุ 20 กรัม เนื้อลูกสมอไทย มหาหิงคุ์ การบูร อย่างละ 6 กรัม รงทอง (สะตุ) 4 กรัม ผักแพวแดง(ทั้งต้น) เนื้อลูกมะขามป้อม อย่างละ 2 กรัม ลูกจันทน์ ดอกจันทน์ ลูกกระวาน ดอกกานพลู เทียนดำ เทียนขาว หัวดองดึง หัวบุก หัวกลอย หัวกระดาดขาว หัวกระดาดแดง ลูกเร่ว เหง้าขิง รากชะเอมเทศ รากเจตมูลเพลิงแดง โกฐกระดูก โกฐเขมา โกฐน้ำเต้า อย่างละ 1 กรัม จากนั้นนำสมุนไพรทั้งหมดยกเว้น การบูรและพิมเสน มาอบในเครื่องอบลมร้อนอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำเครื่องยามาบดย่อยขนาดให้ละเอียด จากนั้นนำผงยาที่ได้มาร่อนผ่าน

ตะแกรงเบอร์ 80 ทำการบรรจุแคปซูลยาธรณีสัณฑะฆาตโดยเครื่องอัดแคปซูลกึ่งอัตโนมัติ ขนาดบรรจุ 500 มิลลิกรัม แล้วทำการเก็บยาธรณีสัณฑะฆาตที่บรรจุแคปซูลแล้ว ลงในภาชนะที่ปิดฝาสนิท เก็บไว้ ณ. อุณหภูมิห้อง เพื่อทำการวิจัยต่อไป

เก็บตัวอย่างตำรับยาธรณีสัณฑะฆาตที่มีการจำหน่ายทั่วประเทศ ที่มีการผลิตในช่วงเดือน กรกฎาคม – กันยายน 2562 จำนวน 10 แหล่งการค้า โดยเก็บตัวอย่างจาก โรงพยาบาลและหน่วยงานของรัฐ ร้านขายยาแผนโบราณ และที่จำหน่ายผ่านเวปไซต์

การเตรียมสารสกัดตำรับยาธรณีสัณฑะฆาต

ตัวอย่างยาธรณีสัณฑะฆาต 100 มิลลิกรัม สกัดด้วย 95 % เมทานอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แช่ลงใน หลอดเซนติฟิว ตัวอย่างทั้งหมดจะทำการสกัดโดยใช้เครื่องคลื่นเสียงความถี่สูง (sonicator) นาน 30 นาที นำไปกรองด้วย ฟิลเตอร์ ขนาด 0.45 นาโนเมตร แล้วเก็บสารสกัดเพื่อทำการการศึกษาลายพิมพ์นิ้วมือและการวิเคราะห์หาปริมาณสารต่อไป

การเตรียมสารมาตรฐาน

สามาตรฐานอะโลอิน ความบริสุทธิ์มากกว่า 97 % ผลิตภัณฑ์ของ sigma (เยอรมนี) สามาตรฐานพิเพอร์รีน ความบริสุทธิ์มากกว่า 97 % ผลิตภัณฑ์ของ sigma (เยอรมนี) ทำการเตรียมโดยละลายใน 95 % เมทานอล ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

สภาวะของระบบโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ผลิตภัณฑ์ของ Agilent รุ่น 2000 คอลัมน์: ACE C18-AR (4.6 x 250 มิลลิเมตร) อัตราการไหล : 1 มิลลิลิตรต่อนาที สารละลายตัวพา : Acetonitrile (A) : water (B) ความเข้มข้นของวัฏภาคเคลื่อนที่ในแต่ละช่วงเวลา ดังนี้ 0 นาที 20 % A, 20 นาที 30 % A, 30 นาที 40 % A, 50 นาที 50 % A, 60 นาที 100 % A, 70 นาที 20 % A, 80 นาที 20 % A เครื่องตรวจวัด : UV 254 นาโนเมตร ปริมาตรที่ฉีด : 20 ไมโครลิตร

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

ความเฉพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์(specificity)

ฉีดสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างเข้าเครื่อง HPLC ภายใต้สภาวะที่กำหนดและดูความสัมพันธ์ของ retention time ของ อะโลอินและพิเพอร์รีน ในสารละลายตัวอย่างเทียบกับสารมาตรฐานอะโลอินและพิเพอร์รีน

การทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity)

เตรียมสารมาตรฐานอะโลอิน ความเข้มข้น คือ 10, 20, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารมาตรฐานพิเพอร์รีน ความเข้มข้น ความเข้มข้น คือ 25, 50, 100, 200 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC ทำ 7 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟ เส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟและความเข้มข้นของสารมาตรฐานอะโลอิน และสารมาตรฐาน พิเพอร์รีน โดยค่า R^2 ควร มากกว่า 0.995

ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ (intra-day precision and inter-day precision)

intra-day precision วิเคราะห์สารมาตรฐานอะโลอิน ความเข้มข้น 50, 100 และ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์สารมาตรฐานพิเพอร์รีน ความเข้มข้น 100, 200 และ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ และคำนวณค่า %RSD ค่าที่ ยอมรับได้คือ %RSD ควรน้อยกว่า 2%

inter-day precision วิเคราะห์สารมาตรฐานอะโลอิน ความเข้มข้น 50, 100 และ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์สารมาตรฐานพิเพอร์รีน ความเข้มข้น 100, 200 และ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ ทำติดต่อกัน 3 วัน และคำนวณค่า %RSD ค่าที่ ยอมรับได้คือ %RSD ควรน้อยกว่า 5%

ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (accuracy)

วิเคราะห์สารมาตรฐานอะโลอิน ความเข้มข้น 50, 100 และ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และวิเคราะห์สารมาตรฐานพิเพอร์รีน ความเข้มข้น 100, 200 และ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิเคราะห์ความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ และ คำนวณ % recovery โดยเกณฑ์มาตรฐานควรอยู่ในช่วง 90%- 110%

ปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (Limit of detection; LOD) และปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดของสารซึ่งเป็นที่ยอมรับได้ (LOQ)

คำนวณจากจุดตัดกราฟเส้นตรงที่ plot ระหว่างค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของ Spiked sample blank กับค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ทำการทดสอบโดย เติมสารละลายมาตรฐานอะโลอิน ลงใน sample blank 10, 20, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารมาตรฐานพิเพอร์รีน ความเข้มข้น ความเข้มข้น คือ 25, 50, 100, 200 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์ระดับละ 7 ซ้ำ คำนวณค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของแต่ละระดับ จากนั้น plot กราฟเส้นตรงระหว่างค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของแต่ละระดับ หาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) และความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง ลากเส้นกราฟตัดแกรน y จุดตัดคือ s_b (ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นศูนย์) คำนวณ

LOD จากสูตร LOD = 3 s_b LOQ จากสูตร LOQ = 10 s_b

การศึกษาลายพิมพ์นิ้วมือและวิเคราะห์ปริมาณสารอะโลอินและสารสารพิเพอร์รีนในตำรับยาสมุนไพรธรณีสัณฑะฆาต โดยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

วิเคราะห์สารมาตรฐานอะโลอินและการมาตรฐานพิเพอร์รีน ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และวิเคราะห์สารสกัดยาธรณีสัณฑะฆาตจากแหล่งการค้า 10 ตำรับ และที่เตรียมเอง 1 ตำรับ ทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ด้วย HPLC จากนั้นตรวจสอบสัญญาณที่เกิดขึ้นโดยเทียบสัญญาณของสารมาตรฐานและสารสกัดยาธรณีสัณฑะฆาต เพื่อทำการระบุตัวบ่งชี้ทางเคมีและลายพิมพ์นิ้วมือ และหาปริมาณของสารอะโลอินและสารพิเพอร์รีนจากตำรับยาธรณีสัณฑะฆาตโดยการแทนค่าพื้นที่ใต้กราฟในสมการเส้นตรงของสารแต่ละชนิด

ผลการวิจัย

การเตรียมตัวอย่างและเก็บตัวอย่างตำรับยาธรณีสัณฑะฆาต

ตำรับยาธรณีสัณฑะฆาตที่ทำการเตรียมขึ้นเองให้รหัสเป็น TRK 1 ตำรับยาธรณีสัณฑะฆาตที่ทำการเก็บตัวอย่างจากโรงพยาบาล/หน่วยงานของรัฐบาลและแหล่งการค้าที่มีการจำหน่ายในประเทศไทยทั้งหมด 10ตัวอย่าง ซึ่งผลิตโดยโรงพยาบาล/และหน่วยงานของรัฐบาล 6 ตัวอย่าง และผลิตโดยเอกชน 4 ตัวอย่าง รหัสที่ใช้คือ TRK 2 - TRK 10 ซึ่งมีรายละเอียดของตำรับยาธรณีสัณฑะฆาต ดังแสดงในตารางที่ 1

การทดสอบความจำเพาะ(specificity)

จากการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานอะโลอินและสารมาตรฐานพิเพอร์รีน โดย HPLC ภายใต้สภาวะที่กำหนด พบว่าสารมาตรฐานอะโลอินถูกแยกออกเป็น อะโลอิน A และ อะโลอิน B มีค่า retention time เท่ากับ 12.985 และ14.970

เมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลของสารมาตรฐานอะโลอิน ต้องนำค่าพื้นที่ใต้กราฟอะโลอิน A และ อะโลอิน B รวมกัน ส่วนสารมาตรฐานพิเพอร์รีน มีค่า retention time เท่ากับ 49.752 ดังแสดงในภาพที่ 1 และ 2

การทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity)

จากการวิเคราะห์สารมาตรฐานอะโลอิน ความเข้มข้น คือ 10, 20, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรภายใต้สภาวะที่กำหนด พบว่ามีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับพื้นที่ใต้กราฟที่ดี โดยมีสมการเส้นตรงคือ y = 14.926x + 37.785 มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, R^2) เท่ากับ 0.9998 และจากการวิเคราะห์สารมาตรฐาน Piperine ความเข้มข้น ความเข้มข้น คือ 25, 50, 100, 200 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ภายใต้สภาวะที่กำหนดพบว่ามีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับพื้นที่ใต้กราฟที่ดี โดยมีสมการเส้นตรงคือ y = 46.131x + 177.43 มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, R^2) เท่ากับ 1 ดังแสดงในตารางที่ 2 และ 3

ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ (intra-day precision and inter-day precision)

จากการวิเคราะห์สารมาตรฐานอะโลอินที่ความเข้มข้นความเข้มข้น 50, 100 และ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และวิเคราะห์สารมาตรฐานพิเพอร์รีน ความเข้มข้น 100, 200 และ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่า %RSD ของสารมาตรฐานอะโลอินและสารมาตรฐานพิเพอร์รีน มีintraday precision น้อยกว่า 2% และ inter-day precision น้อยกว่า 5% ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้แสดงว่าวิธีที่ใช้ในการศึกษามีความเที่ยงตรงในการวิเคราะห์ ดังแสดงในตารางที่ 2 และ 3

ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (accuracy)

จากวิเคราะห์สารมาตรฐานอะโลอิน ความเข้มข้น 50, 100 และ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์ความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ พบว่า % recovery โดยเกณฑ์มาตรฐานควรอยู่ในช่วง 90%- 110% และวิเคราะห์สารมาตรฐาน พิเพอร์รีน ความเข้มข้น 100, 200 และ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์ความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ พบว่า % recovery โดยเกณฑ์มาตรฐานควรอยู่ในช่วง 90%- 110% ดังแสดงในตารางที่ 2 และ 3

ปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (Limit of detection; LOD) และปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดของสารซึ่งเป็นที่ยอมรับได้ (LOQ)

จากการวิเคราะห์มาตรฐานอะโลอิน LOD และ LOQ มีค่าเท่ากับ 0.3156 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1.052 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และวิเคราะห์มาตรฐานพิเพอร์รีน LOD และ LOQ มีค่าเท่ากับ 0.4425ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1.475 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2 และ 3

การศึกษาลายพิมพ์นิ้วมือในตำรับยาสมุนไพรธรณีสัณฑะฆาตโดยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

จากการวิเคราะห์สารสกัด TRK 1- TRK 11 และวิเคราะห์สารมาตรฐานอะโลอินและสารมาตรฐานพิเพอร์รีน ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ด้วย HPLC แล้วนำโครมาโทแกรมทั้งหมดมาเปรียบเทียบสัญญาณที่เกิดขึ้นเพื่อหาลายพิมพ์นิ้วมือของตำรับยาพบว่า ลักษณะโครมาโทแกรมของ สารสกัด TRK 1- TRK 11 มีความเหมือนกันทั้งหมด ลายพิมพ์นิ้วคือของตำรับยาธรณีสัณฑะฆาตมีพีคที่มีลักษณะเด่น ชัดเจน และพบใน TRK 1- TRK 11 มีหมด 6 พีค มีค่า retention time คือ 2.567, 3.421, 11.782, 12.985, 14.970 และ 49.752 ดังแสดงในรูปที่ 4 และเมื่อเทียบกับสารมาตรฐานที่ทำการวิเคราะห์พบว่า มีพีคที่สามรถระบุชื่อสารได้ 3 พีค คือ ที่เวลา 12.985, 14.970 และ 49.752 คือสาร อะโลอิน A สาร อะโลอิน B และสารพิเพอร์รีน ตามลำดับ ดังแสดงภาพที่ 3

การวิเคราะห์ปริมาณสารอะโลอินและสารพิเพอร์รีนในตำรับยาสมุนไพรธรณีสัณฑะฆาตโดยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

เมื่อนำสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆไปวิเคราะห์และนำพื้นที่ใต้กราฟมาสร้างเป็นกราฟมาตรฐานสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐานของสารอะโลอินและสารพิเพอร์รีน คือ $y = 14.926x + 37.785$ $R^2 = 0.9998$ และ $y = 46.131x + 177.43$ $R^2 = 1$ ตามลำดับ จากนั้นทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญของตำรับ โดยนำพื้นที่ใต้กราฟของสารที่มี retention time ตรงกับสารมาตรฐาน ทั้ง 2 ชนิด มาวิเคราะห์เทียบกับสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐาน เพื่อหาปริมาณสารสำคัญทั้ง 2 ชนิด ในแต่ละตัวอย่าง โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานเทียบกับโครมาโทแกรมของสารสกัด TRK ดังแสดงภาพที่ 4

ค่าเฉลี่ยของปริมาณสารอะโลอิน ที่พบในตัวอย่างทั้ง 11 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 1.652 ± 0.41 และพบว่า TRK 5 ปริมาณสารอะโลอินน้อยที่สุดคือ ร้อยละ 0.735 ± 0.66 และ ค่าเฉลี่ยของปริมาณสารพิเพอร์รีน ที่พบในตัวอย่างทั้ง 11 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 2.559 ± 0.37 และพบว่า TRK 10 ปริมาณสารพิเพอร์รีนน้อยที่สุดคือ ร้อยละ 1.790 ± 0.06 รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 4

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

ตำรับยาธรณีสัณฑะฆาตเป็นตำรับยาที่ยังไม่มีเกณฑ์มาตรฐานในการควบคุมคุณภาพของตำรับอย่างชัดเจนดังนั้น การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ทำการเปรียบเทียบระหว่างตำรับยาที่เตรียมขึ้นเองซึ่งสมุนไพรที่เป็นส่วนประกอบของตำรับทั้ง 26 ชนิด ได้มีการชั่งน้ำหนักถูกต้องตามสัดส่วนของตำรับในบัญชียาหลักแห่งชาติ และตำรับยาที่มีการผลิตและจำหน่ายทั่วประเทศ ไม่ว่าจะเป็นโรงพยาบาล/หน่วยงานของรัฐบาล และบริษัทผลิตและจำหน่ายยาสมุนไพร เพื่อเป็นการรวบรวมและเปรียบเทียบเพื่อจัดมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพของตำรับยาธรณีสัณฑะฆาต

การศึกษาลายพิมพ์นิ้วมือของตำรับยาธรณีสัณฑะฆาต เป็นการตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมี โดยทำการเทียบเทียบกับสารมาตรฐานอะโลอิน ซึ่งพบใน ยาดำสะตุ และสารมาตรฐานพิเพอร์รีน พบใน พริกไทยล่อน ซึ่งการศึกษาลายพิมพ์นิ้วมือนั้นสามารถใช้จำแนกตัวอย่างที่มีความเหมือนและความแตกต่างของเอกลักษณ์ทางเคมีของตำรับได้ จากกการวิจัยพบว่าตัวอย่างตำรับยาธรณีสัณฑะฆาตทั้ง 11 ตัวอย่างมีลักษณะโครมาโทแกรมเหมือนกันทั้ง 11 ตัวอย่าง พบว่าในลายพิมพ์นิ้วมือของตำรับยาธรณีสัณฑะฆาตนั้น มีทั้งหมด 6 พีค และมี 3 พีคที่สามารถระบุชื่อของสารได้คือ ที่เวลา 12.985, 14.970 และ 49.752 คือสาร อะโลอิน A สาร อะโลอิน B และสารพิเพอร์รีน ตามลำดับ จากการวิจัยนี้สามารถกล่าวได้ว่า ตัวอย่างยาธรณีสัณฑะฆาตที่ทำการเก็บตัวอย่างจากแหล่งการค้าและโรงพยาบาล/หน่วยงานของรัฐ มีการเตรียมสมุนไพรในการผลิตเช่นเดียวกันกับตำรับที่เตรียมขึ้นเอง ซึ่งมีการเตรียมส่วนประกอบในตำรับถูกต้อง นอกจากนี้ลายพิมพ์นิ้วมือที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ ยังสามารถให้เป็นมาตรฐานในการตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีของตำรับยาธรณีสัณฑะฆาตที่ต้องการตรวจสอบในครั้งต่อไปได้

การหาปริมาณสารอะโลอิน พบว่ามีปริมาณของสารอะโลอินเฉลี่ย คิดเป็นร้อยละ 1.652 ± 0.45 ปริมาณสารอะโลอินน้อยที่สุดคือ ร้อยละ 0.735 ± 0.66 พบใน TRK 5 และยังพบว่าปริมาณของสารอะโลอินของทั้ง 11 ตัวอย่าง มีค่าที่แตกต่างกัน ซึ่งสาร อะโลอิน พบใน ยาดำสะตุ ที่เป็นส่วนประกอบในตำรับ ซึ่งในการขั้นตอนการสะตุยาดำนั้น ตามกรรมวิธีทางการแพทย์แผนไทยได้กล่าวเพียงว่า นำยาดำที่บดละเอียดใส่ในหม้อดิน เติมน้ำเล็กน้อย ยกขึ้นตั้งไฟเคี่ยวจนยาดำนั้นกรอบดีแล้วจึงนำไปใช้ปรุงยา ซึ่งไม่ได้มีการระบุปริมาณยาดำ ปริมาณน้ำ ความร้อน และระยะเวลาที่ใช้ในการสะตุอย่างชัดเจน จึงทำให้ใน

การสะตุยาดำ ที่นำมาเป็นส่วนประกอบของตำรับยา มีความแตกต่างกันของแต่ละแหล่งผลิต ซึ่งการมีปริมาณมากหรือน้อยของสารอะโลอินของแต่ละตำรับอาจมีสาเหตุมาจากขั้นตอนการสะตุยาดำ เนื่องจากมีการใช้ความร้อนและระยะเวลาในการสะตุที่ต่างกันซึ่งความร้อนนั้นมีผลทำให้สารเกิดการสลายตัวเหมือนกับชนิดไพรชนิดอื่น เช่น สารแกมโบจิกในรงทอง [8] สารแทนนินและทีโพลีฟีนอล ที่พบในใบชา [9] และ ฟลาโวนอลและอะไกลโคนของใบยอ [10] ส่วนการหาปริมาณของสารพิเพอร์รีน พบว่าค่าเฉลี่ยของปริมาณสารพิเพอร์รีน ที่พบในตัวอย่างทั้ง 11 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 2.559 ± 0.37 พบว่ามี TRK 10 ปริมาณสารพิเพอร์รีนน้อยที่สุดคือ ร้อยละ 1.790 ± 0.06 พบใน TRK 10 สารพิเพอร์รีน เป็นสารที่พบใน พริกไทยล่อน ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักในตำรับยาธรณีสัณฑะฆาต มีสัดส่วนคิดเป็นร้อยละ 60 ในตำรับ ซึ่งใน TRK 10 ที่พบปริมาณพิเพอร์รีนที่น้อยที่สุดนั้น อาจมาจากหลายสาเหตุ เช่น พริกไทยมีสิ่งปลอมปน พริกไทยที่ทำการเก็บก่อนระยะเวลากำหนด พริกไทย ที่ทำการปลูกในสภาพไม่เหมาะสม พริกไทยที่มีการเก็บไว้เป็นเวลานาน และการเตรียมยาไม่ถูกต้องตามสัดส่วนของตำรับ เป็นต้น จึงทำให้มีปริมาณของสารพิเพอร์รีนลดน้อยลง นอกจากนี้กระบวนการผลิตที่ได้มาตรฐานภายใต้กฎเกณฑ์การผลิตที่ดี (Good Manufacturing Practice, GMP) ก็จะทำให้ได้ยาที่มีคุณภาพและสร้างความน่าเชื่อถือให้กับผู้บริโภคได้เช่นกัน

การทดลองในครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่า ลักษณะลายพิมพ์นิ้วมือของตำรับยาธรณีสัณฑะฆาต มีทั้งหมด 6 พีค มีทั้งหมด 6 พีค และมี 3 พีคที่สามารถระบุชื่อของสารได้คือ ที่เวลา 12.985, 14.970 และ 49.752 คือสาร อะโลอิน A สาร อะโลอิน B และสารพิเพอร์รีน ตามลำดับ และการศึกษาปริมาณสารอะโลอินและสารพิเพอร์รีนในตำรับธรณีสัณฑะฆาตนั้นพบว่า สารอะโลอินเฉลี่ย คิดเป็นร้อยละ 1.652 ± 0.45 และค่าเฉลี่ยของปริมาณสารพิเพอร์รีน คิดเป็นร้อยละ 2.559 ± 0.37 จากการทดลองในครั้งนี้สามารถนำไปเป็นแนวทางเพื่อควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ยาธรณีสัณฑะฆาตได้ทั้งเชิงคุณภาพ โดยการพิสูจน์เอกลักษณ์ของตำรับยาธรณีสัณฑะฆาตจากการใช้ลายพิมพ์นิ้วมือที่ทำการศึกษาในครั้งนี้เปรียบเทียบตัวอย่างที่ต้องการพิสูจน์ และการควบคุมคุณภาพเชิงปริมาณ โดยการนำวิธีการจากการทดลองในครั้งนี้เป็นแนวทางในการหาปริมาณของสารสารอะโลอินและสารพิเพอร์รีนในผลิตภัณฑ์ยาธรณีสัณฑะฆาตที่ต้องการตรวจสอบปริมาณสาร เพื่อเป็นการสร้างความเชื่อมั่นประสิทธิ์ภาพและความปลอดภัยให้แก่ผู้บริโภคได้ต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. Prasatwech P. Vach-Suk-Sa-Sang-ka-pa 1. Bangkok: Thai publisher; 1908. Thai
2. Department of Medical Sciences Ministry of Public Health . Ya-Thor-Ra-Nee-San-Tha-Kat Raw materialquality and Safety. Nonthaburi: 1241 Miraculous, 2012. Thai
3. Tasleem F, Azhar I, Nawazish Ali, S, Perveen S, Alam Mahmood Z. Analgesic and anti-inflammatory activities of Piper nigrum L. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine 2014; 7(1): 461-468.
4. Kumar S, Gautam S, Sharma A. Antimutagenic and antioxidant properties of plumbagin and other naphthoquinones. Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 2013; 5(1): 30-41.
5. Ninad R, Jawade, Abhijeet R, Chavanb. Ultrasonic-Assisted extraction of aloin from Aloe vera gel. Procedia Engineering 2013; 51: 487-493.

6. Park M, Kwon H, Sung M. Intestinal absorption of aloin, aloeemodin, and aloesin; a comparative study using two in vitro absorption models. Nutr Res Pract 2009; 3(1): 9-14.
7. School of Traditional and Alternative Medicine. Textbook Thai traditional medicine branch Thai Traditional pharmacy. Chiang Rai: Chiang Rai Rajabhat University publisher; 2008. Thai
8. Poowunna, et al. Standardization of Thai Traditional Medicine Method for Treatment of *Garcinia hanburuyi* Hook.f Resins. IJPS. 2014 May-Aug; 10(2).
9. Pithayanukul P. Beautiful discerning: How to getthe health benefi ts of tea. *Chaladsue Magazine* 2010; 16(98): 56–57.
10. Deng S, West BJ, Jensen CJ. Thermal degradation of flavonol glycosides in noni leaves during roasting. *J Food Sci Techno* 2011; 3(2): 155–159.

ตารางที่ 1 แสดงรายละเอียดของตำรับยาธรณีสัณฑะฆาตที่ใช้ในการวิจัย ทั้งหมด 11 ตำรับ

รหัส	แหล่งที่มา	สถานที่ผลิต	วันที่ผลิต	รูปแบบของยา
TRK 1	เตรียมขึ้นเอง	ขอนแก่น	18-09-2562	แคปซูล
TRK 2	โรงพยาบาลรัฐบาล	สุราษฎร์ธานี	19-07-2562	แคปซูล
TRK 3	โรงพยาบาลรัฐบาล	ศรีสะเกษ	12-09-2562	แคปซูล
TRK 4	โรงพยาบาลรัฐบาล	สุรินทร์	29-09-2562	แคปซูล
TRK 5	บริษัทขายยาสมุนไพรเอกชน	กรุงเทพมหานคร	03-08-2562	แคปซูล
TRK 6	บริษัทขายยาสมุนไพรเอกชน	ฉะเชิงเทรา	10-08-2562	แคปซูล
TRK 7	บริษัทขายยาสมุนไพรเอกชน	นนทบุรี	10-09-2562	แคปซูล
TRK 8	โรงพยาบาลรัฐบาล	สุพรรณบุรี	29-08-2562	แคปซูล
TRK 9	โรงพยาบาลรัฐบาล	นครพนม	02-09-2562	แคปซูล
TRK 10	บริษัทขายยาสมุนไพรเอกชน	ปราจีนบุรี	23-09-2562	แคปซูล
TRK 11	โรงพยาบาลรัฐบาล	สกลนคร	10-07-2562	แคปซูล

ตารางที่ 2 แสดงพารามิเตอร์สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารอะโลอิน

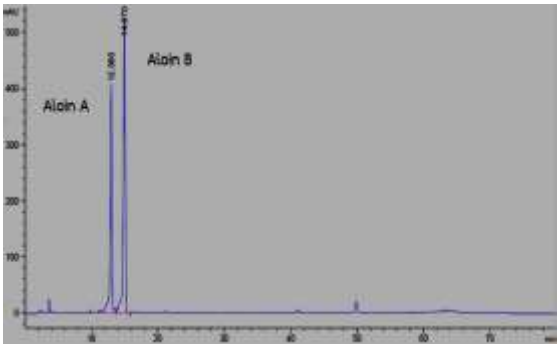
Validation parameter	Results of Aloin		
Linearity range (ug/ml)	10-200		
Correlation coefficient	0.9998		
Regression equation	y = 14.926x + 37.785		
Intermediate precision			
Concentration (ug/ml)	50	100	200
Intraday (%)	1.2284	0.4198	0.1037
Interday (%)	1.0143	0.9792	0.2139
Accuracy			
Concentration (ug/ml)	50	100	200
% Recovery	100.465±0.11	101.727±0.27	99.58±0.07
LOD	0.315		
LOQ	1.052		

ตารางที่ 3 แสดงพารามิเตอร์สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารพิเพอร์รีน

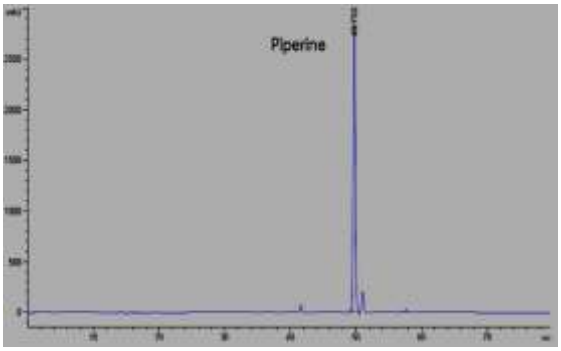
Validation parameter	Results of Aloin		
Linearity range (ug/ml)	25-400		
Correlation coefficient	1.0000		
Regression equation	y = 46.131x + 177.43		
Intermediate precision			
Concentration (ug/ml)	100	200	300
Intraday (%)	0.1253	0.1642	0.7768
Interday (%)	0.5314	0.4762	0.3729
Accuracy			
Concentration (ug/ml)	50	100	200
% Recovery	100.784±0.07	100.492±0.19	99.856±0.18
LOD	0.442		
LOQ	1.475		

ตารางที่ 4 แสดงปริมาณของสารอะโลอินและสารพิเพอร์รีนที่ทำการวิเคราะห์

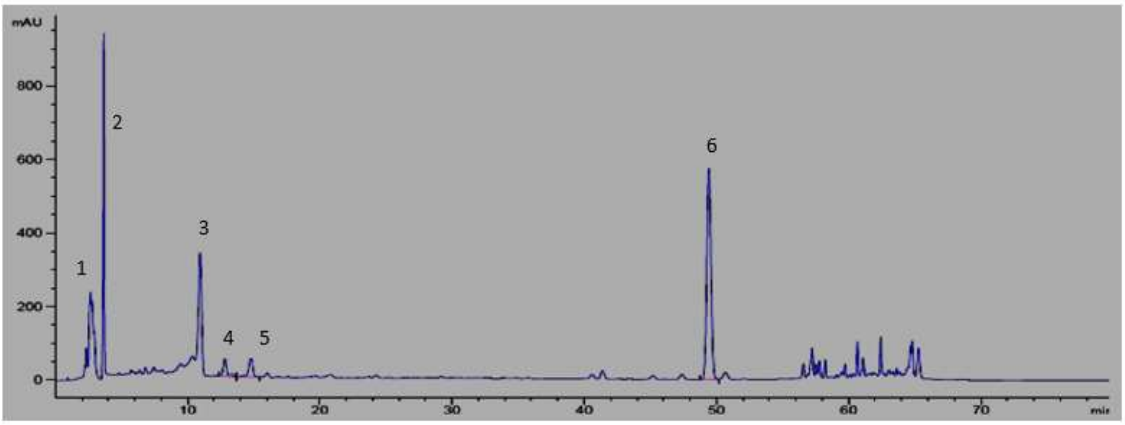
Sample	Amount of compound (Mean ± SD)	
	Aloin (% dry weight)	Piperine (% dry weight)
TRK 1	1.823 ± 0.23	2.880 ± 0.63
TRK 2	1.603 ± 0.77	2.799 ± 0.41
TRK 3	1.598 ± 0.16	2.642 ± 0.25
TRK 4	1.822 ± 0.15	2.634 ± 0.35
TRK 5	0.735 ± 0.66	2.531 ± 0.37
TRK 6	1.436 ± 0.37	2.460 ± 0.20
TRK 7	1.313 ± 0.24	2.671 ± 0.07
TRK 8	1.589 ± 0.39	2.577 ± 0.46
TRK 9	1.871 ± 0.76	2.482 ± 0.31
TRK 10	2.647 ± 0.57	1.790 ± 0.06
TRK 11	1.736 ± 0.26	2.679 ± 0.36
(Mean ± SD)	**1.652 ± 0.45**	**2.559 ± 0.28**



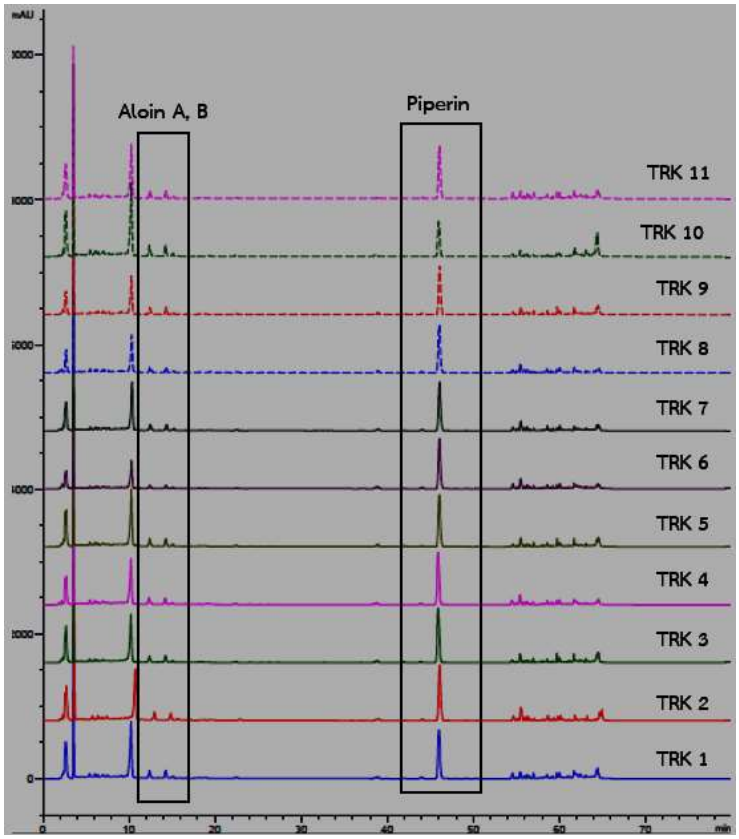
ภาพที่ 1 แสดงโครมาโทแกรมของสารมาตรฐานอะโลอิน



ภาพที่ 2 แสดงโครมาโทแกรมของสารมาตรฐานพิเพอร์รีน



ภาพที่ 3 แสดงลักษณะลายพิมพ์นิ้วมือของตำรับยาธรณีสัณฑะฆาต จากตัวอย่าง TRK 1 โดยพีคที่สามารถระบุชนิดของสารได้ คือ พีคที่ 4, 5 และ 6 เป็นพีคของสาร อะโลอิน A อะโลอิน B และพิเพอร์รีน ตามลำดับ



ภาพที่ 4 แสดงลักษณะโครมาโทแกรมของ TRK 1-11 ที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารอะโลอินและสารพิเพอร์รีน