

การศึกษาวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในตำรับยาหัตถารามีจำหน่ายในประเทศไทย ไทยด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Analysis of Active Compounds Contents from SAHATHARA Formula in Thailand

อังกินันท์ บวบนานา (Anginan Buabna)^{1*} ดร.ประธาน ฤาชา (Dr.Prathan Luecha)**

(Received: August 5, 2022; Revised: November 3, 2022; Accepted: November 7, 2022)

บทคัดย่อ

สหัตถารามีเป็นตำรับยาแผนโบราณในบัญชียาหลักแห่งชาติซึ่งมีพริกไทยล่อนเป็นตัวยาหลัก ใช้รักษากลุ่มอาการทางกล้ามเนื้อและกระดูก งานวิจัยนี้เป็นการวิเคราะห์ปริมาณของสารพิเพอรินซึ่งเป็นสารสำคัญในตำรับยาหัตถารามีด้วยวิธีวิเคราะห์โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารสำคัญของยาแคปซูลสหัตถารามีที่จำหน่ายในท้องตลาดกับยาแคปซูลสหัตถารามีที่เตรียมขึ้น ผลการศึกษาพบว่ายาแคปซูลสหัตถารามีที่เตรียมขึ้นมีปริมาณพิเพอรินเท่ากับร้อยละ 1.44±0.00 ของน้ำหนักแห้ง และยาแคปซูลสหัตถารามีที่จำหน่ายในท้องตลาดทั้ง 7 ตัวอย่าง มีปริมาณพิเพอรินมากที่สุดพบใน SAH06 เท่ากับร้อยละ 1.15±0.01 ของน้ำหนักแห้ง และปริมาณพิเพอรินน้อยที่สุดพบใน SAH02 เท่ากับร้อยละ 0.87±0.01 ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งมีปริมาณสารพิเพอรินแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value ≤ 0.05) ผลการศึกษาที่ได้นำไปสู่การควบคุมคุณภาพวัตถุดิบสมุนไพรให้มีมาตรฐานและคุณภาพที่ดี

ABSTRACT

Sahasthara is categorized as Thai traditional medicine containing white pepper as an active ingredient for the treatment of muscle and bone disorders under the National List of Essential Medicines. This research study aimed to analyze piperine as an active ingredient of Sahasthara capsules with High-Performance Liquid Chromatography to compare the amount of the active ingredient contained in Sahasthara capsules available in the market and in-house. The results showed that the amount of piperine contained in the prepared Sahasthara capsule was 1.44±0.00% dry weight. Moreover, according to the analysis of 7 samples of Sahasthara capsules available in the market, SAH06 contained the largest amount of piperine (1.15±0.01% dry weight), and SAH02 contained the least amount of Piperine (0.87±0.01% dry weight). This resulted in a statistical significance difference (p -value ≤ 0.05). The findings of the study can result in the quality control of raw materials to achieve standards and good quality.

คำสำคัญ: โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง พิเพอริน ตำรับยาหัตถารามี

Keywords: High performance liquid chromatography, Piperine, SAHATHARA formula

¹Corresponding author: anginan@kkumail.com

*นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา สาขาวิชาเภสัชกรรมแผนไทย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

**ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาเภสัชเวทและพิษวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

การเตรียมตำรับยาสัทธิสารา ได้เตรียมตามน้ำหนักสัดส่วนของวัตถุดิบจากสูตรตำรับยาสัทธิสาราในบัญชียาหลักแห่งชาติปี พ.ศ. 2561 ในผงยา 1 กิโลกรัมมีส่วนประกอบเครื่องยาสมุนไพรทั้งหมด 21 ชนิด ได้แก่ พริกไทยล่อน 240 กรัม เจตมูลเพลิงแดง 224 กรัม ดีปลี 96 กรัม หัสศุณเทศ 48 กรัม สมอไทย 104 กรัม ตองแตก 80 กรัม ว่านน้ำ 88 กรัม การบูร 14 กรัม ดอกจันทน์ 13 กรัม ลูกจันทน์ 12 กรัม เทียนแดง 11 กรัม เทียนตาคี้กแตน มหาหิงค์ อย่างละ 10 กรัม เทียนสัตตบุษย์ 9 กรัม เทียนขาว รากจิงจ้อ อย่างละ 8 กรัม เทียนดำ 7 กรัม โกฐกั๊กกรา 6 กรัม โกฐเขมา 5 กรัม โกฐก้านพร้าว 4 กรัม โกฐพุงปลา 3 กรัม นำไปบอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำเครื่องยาสมุนไพรบดย่อยให้ละเอียด จากนั้นนำผงยาาร้อนผ่านตะแกรงเบอร์ 80 แล้วนำไปบรรจุแคปซูลเบอร์ 0 (ขนาดปริมาณ 500 มิลลิกรัม) ด้วยเครื่องบรรจุแคปซูลและบรรจุใส่บรรจุภัณฑ์ เพื่อนำไปวิจัยต่อไป

การเตรียมสารมาตรฐาน ตัวอย่างพริกไทยล่อน และตัวอย่างสารสกัดตำรับยาสัทธิสารา

เตรียมสารมาตรฐานพิเพอรีนที่มีความบริสุทธิ์มากกว่า 97% (Sigma Aldrich) ให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยละลายใน 99.9% เมทานอล (Lab scan AR grade)

เตรียมตัวอย่างผงพริกไทยล่อนและตัวอย่างผงยาสัทธิสารา 1 กรัม ละลายสกัดด้วย 99.9% เมทานอล (Lab scan AR grade) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำไปสกัดด้วยโดยใช้เครื่องคลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonic bath) เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมารองผ่านไซริงค์ฟิลเตอร์เมมเบรนขนาด 0.45 ไมโครเมตร

สถานะของระบบโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Agilent LC1260) คอลัมน์ (VDSpher PUR 100) C18-E, 4.6 x 250 มิลลิเมตร อนุภาคขนาด 5 ไมโครเมตร วัสดุภาคเคลื่อนที่คือ acetonitrile (A) และ DI water (B) (0 นาที 30% A, 20 นาที 40%A, 30 นาที 50%A, 40 นาที 70%A, 45 นาที 100%A, 55 นาที 100%A, 60 นาที 30%A) อัตราการไหลของวัสดุภาคเคลื่อนที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจสอบความยาวคลื่นอัลตราไวโอเล็ต 210 นาโนเมตร ปริมาตรตัวอย่างฉีดครั้งละ 20 ไมโครลิตร

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

โดยการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ใช้ตามหลักเกณฑ์มาตรฐานของ International Conference on Harmonization (ICH) guidelines, Q2 (R1) [6]

การทดสอบความจำเพาะ (specificity)

นำสารมาตรฐานพิเพอรีน ตัวอย่างพริกไทยล่อนและตัวอย่างสารสกัดตำรับยาสัทธิสาราทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ภายใต้สภาวะที่กำหนดและดูความสัมพันธ์ของ retention time ของพิเพอรีนในตัวอย่างสารสกัดตำรับยาสัทธิสาราเทียบกับสารมาตรฐานพิเพอรีน

การทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity)

เตรียมสารมาตรฐานพิเพอรีนที่ระดับความเข้มข้น 25, 50, 125, 250, 500 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ นำค่าพื้นที่ใต้กราฟ (peak area) คำนวณหาค่าเฉลี่ยของแต่ละระดับความเข้มข้นของสารมาตรฐานพิเพอรีน จากนั้นสร้างกราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟและความเข้มข้นสารมาตรฐานพิเพอรีน โดยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ที่ยอมรับได้มีค่ามากกว่า 95%

ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ (precision)

เตรียมสารมาตรฐานพิเพอรีนที่ระดับความเข้มข้น 250, 500 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการวิเคราะห์ภายใน 1 วัน (within day) ทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ คำนวณหาค่า %RSD (เกณฑ์การยอมรับควรมีน้อยกว่า

2%) และวิเคราะห์ระหว่างวัน (between day) ทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ คำนวณหาค่า %RSD (เกณฑ์การยอมรับควรมีน้อยกว่า 5%)

ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (accuracy)

เตรียมตัวอย่างที่ไม่มีการเติมสารพิษเพอริน (sample blank) และทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษเพอรินในตัวอย่างสารสกัดตำรับยาสหศาสตร์ ทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ จากนั้นทำการเตรียมตัวอย่างที่มีการเติมสารพิษเพอริน (spiked sample) ให้มีความเข้มข้น 3 ระดับคือ 80%, 100% และ 120% ของความเข้มข้นพิเพอรินที่มีอยู่ใน sample blank โดยการเติมสารมาตรฐานพิเพอริน ที่ระดับความเข้มข้น 224, 265 และ 302 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในสารสกัดตัวอย่างตำรับยาสหศาสตร์ และปรับปริมาตรจนครบปริมาตร 1000 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของสารพิษเพอริน ทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ และคำนวณหาค่าความต่างของค่าที่วิเคราะห์ได้กับค่าที่แท้จริง คำนวณเป็น % recovery (เกณฑ์การยอมรับ 90% - 110%)

ปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (Limit of detection; LOD) และปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถยอมรับในการใช้ตรวจหาปริมาณได้ (Limit of quantitation; LOQ)

ทำการวิเคราะห์จากสารมาตรฐานพิเพอรินที่ระดับความเข้มข้น 25, 50, 125, 250 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ นำค่าพื้นที่ใต้กราฟ (peak area) คำนวณหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของแต่ละระดับ จากนั้น plot กราฟเส้นตรงระหว่างค่าเฉลี่ยกับค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของแต่ละระดับ หาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) และความสัมพันธ์ของเส้นตรง ลากเส้นกราฟตัดแกน y จุดตัดคือ S_0 (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้น) คำนวณ LOD จากสูตร $LOD = 3 S_0$ และ LOQ จากสูตร $LOQ = 10 S_0$

การวิเคราะห์ปริมาณสารพิษเพอรินในตัวอย่างพริกไทยล่อนและตัวอย่างตำรับยาสหศาสตร์

วิเคราะห์หาปริมาณพิเพอรินในตัวอย่างพริกไทยล่อน ตัวอย่างสารสกัดตำรับยาสหศาสตร์จากที่มีจำหน่ายในท้องตลาดในประเทศไทย และตำรับยาสหศาสตร์ที่เตรียมขึ้นจากการศึกษานี้ ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 5 ซ้ำ ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง และคำนวณจากการแทนค่าพื้นที่ใต้กราฟในสมการเส้นตรงของสารมาตรฐานพิเพอริน

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิธีวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ ค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณสารพิษเพอรินระหว่างตัวอย่างตำรับยาสหศาสตร์ที่เตรียมขึ้นกับตัวอย่างยาสหศาสตร์จากที่มีจำหน่ายในท้องตลาดด้วย One-way ANOVA (p -value ≤ 0.05) ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics version 20

ผลการวิจัย

การเตรียมตัวอย่างและเก็บตัวอย่างตำรับยาสหศาสตร์

ตำรับยาสหศาสตร์ที่เตรียมขึ้นจากการศึกษานี้กำหนดรหัสที่ใช้คือ SAH01 และตำรับยาสหศาสตร์ที่ทำการเก็บตัวอย่างที่มีจำหน่ายในท้องตลาดในประเทศไทยในช่วงระยะเวลาปี พ.ศ. 2562 - 2563 ซึ่งผลิตโดยโรงพยาบาลรัฐบาล 4 ตัวอย่าง และบริษัทขายยาสมุนไพรเอกชน 3 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 7 ตัวอย่าง รหัสที่ใช้คือ SAH02 - SAH08 แสดงในตารางที่ 1 และตัวอย่างพริกไทยล่อนจากแหล่งร้านค้าและแหล่งปลูกพริกไทยในประเทศไทย ช่วงปี พ.ศ. 2563 จากแหล่งการค้า 3 ตัวอย่าง และแหล่งปลูก 2 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 5 ตัวอย่าง แสดงในตารางที่ 3

การทดสอบความจำเพาะ (specificity)

จากการวิเคราะห์สารมาตรฐานพิเพอรินด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงภายใต้สภาวะที่กำหนดพบว่ามีความ retention time เท่ากับ 36.225 นาที แสดงในภาพที่ 1 และเมื่อเปรียบเทียบลักษณะโครมาโทแกรมของ

ตัวอย่างพริกไทยล่อน และตำรับยาสหัสศาราท พบว่า retention time ตรงกับสารมาตรฐานพิเพอริน แสดงในภาพที่ 2 และ 3 และเมื่อเปรียบเทียบลักษณะโครมาโทแกรมของตัวอย่างตำรับยาสหัสศาราทที่เตรียมขึ้นและตัวอย่างตำรับยา สหัสศาราทที่มีจำหน่ายในท้องตลาดในประเทศไทยตัวอย่างทั้งหมด พบว่าลักษณะโครมาโทแกรมมีความเหมือนกันทั้งหมด แสดงในภาพที่ 4

การทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity)

จากการวิเคราะห์สารมาตรฐานพิเพอรินที่ระดับความเข้มข้น 25, 50, 125, 250, 500 และ 1000 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร พบว่ามีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับพื้นที่ใต้กราฟ โดยมีสมการเส้นตรงคือ $y = 41.042x - 105.64$ และมีค่า Coefficient of Determination (r^2) เท่ากับ 0.9999

ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ (precision)

จากการวิเคราะห์สารมาตรฐานพิเพอรินที่ระดับความเข้มข้น 250, 500 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าการวิเคราะห์ในวันเดียว (within day) มี %RSD ของค่าพื้นที่ใต้กราฟน้อยกว่า 2% และการวิเคราะห์ในระหว่างวัน (between day) มี %RSD ของค่าพื้นที่ใต้กราฟ น้อยกว่า 5% ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้ แสดงในตารางที่ 2

ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (accuracy)

จากการวิเคราะห์สารมาตรฐานพิเพอรินที่ระดับความเข้มข้น 224, 265 และ 302 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำ ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ พบว่า %recovery อยู่ในเกณฑ์การยอมรับในช่วง 90% - 110% แสดงในตารางที่ 2

ปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (Limit of detection; LOD) และปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถยอมรับในการใช้ตรวจหาปริมาณได้ (Limit of quantitation; LOQ)

จากการวิเคราะห์สารมาตรฐานพิเพอรินมีค่า LOD เท่ากับ 1.13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า LOQ เท่ากับ 3.76 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงในตารางที่ 2

การวิเคราะห์ปริมาณสารพิเพอรินในตัวอย่างพริกไทยล่อนและตัวอย่างตำรับยาสหัสศาราท

จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารพิเพอรินในตัวอย่างพริกไทยล่อนทั้งหมด 5 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างพริกไทยล่อน 4 มีปริมาณพิเพอรินมากที่สุดเท่ากับร้อยละ 5.19 ± 0.03 ของน้ำหนักแห้ง จึงนำตัวอย่างพริกไทยล่อน 4 เพื่อใช้ผลิตตำรับ ยาสหัสศาราทที่เตรียมขึ้นในการศึกษาครั้งนี้ รายละเอียดแสดงในตารางที่ 3

จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารพิเพอรินในตัวอย่างตำรับยาสหัสศาราทที่มีจำหน่ายในท้องตลาดในประเทศไทย และตำรับยาสหัสศาราทที่เตรียมขึ้นจากการศึกษาครั้งนี้ โดยนำพื้นที่ใต้กราฟของสารที่ปรากฏใน retention time ที่ตรงกับสาร มาตรฐานมาคำนวณในสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน พบว่าปริมาณสารพิเพอรินที่พบในตำรับยาสหัสศาราทที่เตรียม ขึ้น (SAH01) มีปริมาณพิเพอรินเท่ากับร้อยละ 1.44 ± 0.00 ของน้ำหนักแห้ง และยาแคปซูลสหัสศาราทที่มีจำหน่ายใน ท้องตลาด (SAH02 – SAH08) ทั้ง 7 ตัวอย่าง พบปริมาณพิเพอรินเท่ากับร้อยละ 0.89 ± 0.01 , 1.09 ± 0.00 , 1.06 ± 0.00 , 1.03 ± 0.01 , 1.15 ± 0.01 , 1.04 ± 0.02 และ 0.92 ± 0.01 ของน้ำหนักแห้ง แสดงในตารางที่ 4 เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่าง ของปริมาณสารพิเพอรินระหว่างตัวอย่างตำรับยาสหัสศาราทที่เตรียมขึ้นกับตัวอย่างยาสหัสศาราทจากที่มีจำหน่ายใน ท้องตลาด พบว่ามีปริมาณสารพิเพอรินแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} \leq 0.05$) แสดงในตารางที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

ตำรับยาสหัสศาราทเป็นยาจากสมุนไพรจึงต้องมีกำหนดมาตรฐานและการควบคุมคุณภาพที่เหมาะสม ให้มี คุณภาพที่สม่ำเสมอในแต่ละครั้งที่ผลิต ซึ่งสะท้อนถึงประสิทธิภาพของยา ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการเปรียบเทียบปริมาณ สารสำคัญในตำรับยาสหัสศาราทระหว่างตำรับยาสหัสศาราทที่มีจำหน่ายในท้องตลาดในประเทศไทยจากที่ผลิตโดย

โรงพยาบาลรัฐบาลและบริษัทขายยาสมุนไพรเอกชน และตำรับยาสหัสธาราที่เตรียมขึ้นจากการศึกษานี้ โดยเตรียมตามสัดส่วนจากสูตรตำรับในบัญชียาหลักแห่งชาติปี พ.ศ. 2561 และทำการเก็บตัวอย่างพริกไทยล่อนทั้งหมด 5 ตัวอย่าง จากแหล่งการค้าและแหล่งปลูก เพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณพิเพอรินและเลือกตัวอย่างที่มีสารพิเพอรินมากที่สุด คือ พริกไทยล่อน 4 เท่ากับร้อยละ 5.19 ± 0.03 ของน้ำหนักแห้ง มาเป็นส่วนประกอบในตำรับ เนื่องจากตัวอย่างพริกไทยล่อน 4 อยู่ในเกณฑ์ตามข้อกำหนดมาตรฐาน Thai Herbal Pharmacopoeia โดยพริกไทยล่อนต้องมีปริมาณสารพิเพอรินไม่น้อยกว่า 5% [7]

การศึกษาปริมาณสารพิเพอรินในตัวอย่างตำรับยาสหัสธาราที่มีจำหน่ายในท้องตลาดในประเทศไทยและตำรับยาสหัสธาราที่เตรียมขึ้น พบว่าปริมาณสารพิเพอรินในตำรับยาสหัสธาราที่เตรียมขึ้นเท่ากับร้อยละ 1.44 ± 0.00 ของน้ำหนักแห้ง และยาแคปซูลสหัสธาราที่มีจำหน่ายในท้องตลาดทั้ง 7 ตัวอย่าง ปริมาณพิเพอรินน้อยที่สุดคือ SAH02 มีค่าเท่ากับร้อยละ 0.89 ± 0.01 ของน้ำหนักแห้ง และปริมาณพิเพอรินมากที่สุดคือ SAH06 มีค่าเท่ากับร้อยละ 1.15 ± 0.01 ของน้ำหนักแห้ง เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารพิเพอรินตัวอย่างตำรับยาสหัสธาราที่เตรียมขึ้นและตัวอย่างตำรับยาสหัสธาราจากที่มีจำหน่ายในท้องตลาด พบว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} \leq 0.05$) แม้ว่าปริมาณสารพิเพอรินระหว่างตัวอย่างตำรับยาสหัสธาราที่เตรียมขึ้นและตัวอย่างยาสหัสธาราจากที่มีจำหน่ายในท้องตลาดแตกต่างกัน มิได้หมายความว่าไม่สามารถให้ผลการรักษาที่ต้องการได้ นอกจากนี้วันที่ผลิตและวันที่ได้ทำการวิเคราะห์ในตัวอย่างตำรับยาสหัสธาราทั้งหมด 8 ตัวอย่างที่ระยะเวลาต่างกัน ไม่มีความเกี่ยวข้องกับปริมาณสารพิเพอรินที่พบในตัวอย่างแตกต่างกัน ซึ่งปริมาณสารพิเพอรินในแต่ละตัวอย่างที่แตกต่างกันนั้นอาจเกิดได้หลายสาเหตุ เช่น ร้านจำหน่ายวัตถุดิบสมุนไพรแต่ละแหล่งอาจเก็บพริกไทยไว้เป็นระยะเวลาอันยาวนานไปทำให้ปริมาณสารพิเพอรินลดลงได้ [8] หรือสายพันธุ์ของพริกไทยแต่ละสายพันธุ์ผลิตปริมาณสารพิเพอรินที่ต่างกัน โดยในประเทศไทยนิยมปลูกพันธุ์ศรีลังกาและพันธุ์ชาราวัด ซึ่งพริกไทยพันธุ์ศรีลังกาจะมีปริมาณพิเพอรินสูงกว่าพริกไทยพันธุ์ชาราวัด [9] หรือระยะเวลาเก็บเกี่ยวพริกไทยที่นำมาแปรรูปเป็นพริกไทยขาวหรือพริกไทยดำในช่วงอายุ 5-6 เดือนหลังดอกบานจะผลิตปริมาณสารพิเพอรินสูงที่สุด [10] โดยทั่วไปแล้วคุณภาพของวัตถุดิบสมุนไพรจะขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น แหล่งเพาะปลูกแต่ละพื้นที่อาจจะมีสภาพพื้นที่ดินที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืช และการใส่ปุ๋ยสามารถช่วยปรับปรุงบำรุงดินได้ ระยะเวลาเก็บเกี่ยวสมุนไพรควรเก็บในช่วงที่พืชให้ปริมาณสารสำคัญมาก ในส่วนอายุของยาหลังวันผลิตของตัวอย่างตำรับยาสหัสธาราในช่วงวันที่ผลิตที่ต่างกัน อาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของตัวยาสำคัญที่สลายตัวไปจากเดิมตามช่วงอายุการเก็บรักษาของยา นอกจากนี้มีงานวิจัยการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ของสารสกัดสหัสธาราเมื่อเก็บไว้ในสภาวะเร่ง พบว่าฤทธิ์ต้านการอักเสบน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับวันที่ 0 แต่ยังคงมีฤทธิ์ยับยั้งมากกว่าร้อยละ 80 และปริมาณสารพิเพอรินไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเก็บถึง 4 เดือน [11] ดังนั้นตำรับยาสหัสธาราเมื่อเก็บไว้ในอุณหภูมิปกติ ยังคงมีฤทธิ์การต้านอักเสบ ซึ่งสามารถเก็บได้นานถึง 2 ปี

อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาปริมาณสารสำคัญที่ใช้กำหนดช่วงของการรักษาไว้อย่างแน่ชัด ดังนั้นการศึกษาทางคลินิกเพื่อกำหนดช่วงของการรักษาและช่วยระบุปริมาณสารสำคัญในตำรับยาสหัสธารา เพื่อให้มีผลในการใช้รักษาอาการที่ต้องการ ทั้งนี้การควบคุมคุณภาพของยาสมุนไพรควรให้ความสำคัญตั้งแต่กระบวนการปลูกสมุนไพร การเก็บเกี่ยววัตถุดิบ กระบวนการผลิตยา ไปจนถึงจำหน่ายผลิตภัณฑ์ออกสู่ท้องตลาด ตามมาตรฐานภายใต้หลักเกณฑ์วิธีการที่ดีในการผลิต (Good Manufacturing Practice, GMP) ซึ่งจะทำให้ผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพรที่ได้มีปริมาณสารสำคัญที่มีคุณภาพและมีประสิทธิภาพเพียงพอ เหมาะสมสำหรับใช้รักษาโรคและอาการต่าง ๆ และมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

เอกสารอ้างอิง

1. National Drug Information. National List of Essential Medicines 2018 [Internet]. 2018 [cited 2019 May 14]. Available from: http://ndi.fda.moph.go.th/uploads/main_drug_file/20180529192247.pdf
2. Ministry of public health. Dispensing of herbal medicines by listing a fiscal year 2014 [Internet]. 2014 [cited 2018 Oct 5]. Available from: https://hdcservice.moph.go.th/hdc/reports/report.php?source=pfornated/format2.php&cat_id=30bc6364fc06a33a7802e16bc596ac3b&id=8d38925724b0bbb4b11844b18df088e4
3. Tasleem F, Azhar I, Ali SN, Perveen S, Mahmood ZA. Analgesic and anti-inflammatory activities of *Piper nigrum* L. Asian Pac J Trop Med. 2014; 7(1): S461-S468.
4. Bang JS, Oh DH, Choi HM, Sur BJ, Lim SJ, Kim JY, et al. Anti-inflammatory and antiarthritic effects of piperine in human interleukin 1beta-stimulated fibroblast-like synoviocytes and in rat arthritis models. Arthritis Res Ther. 2009; 11(2): 1-9.
5. Preecha N. A Comparative of efficacy between Sahasthara and Diclofenac tablet for muscle pain relief. [MSc thesis]. Bangkok: Silpakorn University; 2012. Thai.
6. ICH Harmonized Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures text and methodology Q2 (R1) [Internet]. 2005 [cited 2019 May 14]. Available from: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>
7. Department of Medical Sciences. Thai herbal phramacopoeia. Bangkok: The Agricultural Co-operative Federation of Thailand; 2016. 348 p.
8. Santi S, Phatsorn S, Pimolmart R, Saowanee J, Kamolwan S, Chalermkhwan R, et al. Standardization of *Piper nigrum* and *Zingiber officinale* from Traditional Thai Drug Store in Hatyai, Songkhla. Thaksin.J. 2010; 13(1): 10-19. Thai.
9. Luiza VV, Maria EMJ, Maiara K, Otávio AH, Juliano SR, Geisamanda PB, et al. The effects of drying methods and harvest season on piperine, essential oil composition, and multi-elemental composition of black pepper. Food Chemistry. 2022; 390(1): 1-7.
10. Sangmanee C. Development Postharvest Technology of Black Pepper for increase the quality and competition report. Bangkok: Department of Agriculture; 2012.
11. Kakatum N. Anti-inflammatory activity of Thai traditional remedy extract Sahasthara and its plant ingredients. [MSc thesis]. Pathumthani: Thammasat University; 2011. Thai.

ตารางที่ 1 แสดงรายละเอียดของตำรับยาสหัสธาราที่ใช้ในการวิจัยทั้งหมดจำนวน 8 ตัวอย่าง

รหัส	แหล่งที่มา	สถานที่ผลิต	วันที่ผลิต	วันที่วิเคราะห์
SAH01	เตรียมขึ้นจากการศึกษานี้	ขอนแก่น	12 มี.ค. 2564	7 ก.ค. 2564
SAH02	โรงพยาบาลรัฐบาล	พิษณุโลก	8 มิ.ย. 2563	27 พ.ย. 2563
SAH03	โรงพยาบาลรัฐบาล	ปราจีนบุรี	1 พ.ค. 2562	27 พ.ย. 2563
SAH04	โรงพยาบาลรัฐบาล	สุราษฎร์ธานี	22 พ.ค. 2563	27 พ.ย. 2563
SAH05	โรงพยาบาลรัฐบาล	ตรัง	19 ธ.ค. 2562	27 พ.ย. 2563
SAH06	บริษัทขายยาสมุนไพรเอกชน	นครปฐม	10 ก.ค. 2563	27 พ.ย. 2563
SAH07	บริษัทขายยาสมุนไพรเอกชน	นนทบุรี	16 ก.พ. 2562	27 พ.ย. 2563
SAH08	บริษัทขายยาสมุนไพรเอกชน	สมุทรปราการ	9 มี.ค. 2562	27 พ.ย. 2563

ตารางที่ 2 แสดงพารามิเตอร์สำหรับการวิเคราะห์และการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารไพเพอรีน

Validation parameter	Results of piperine		
Linearity range ($\mu\text{g/mL}$)	25-1000		
Correlation coefficient	0.9999		
Regression equation	$y = 41.042x - 105.64$		
Intermediate precision			
Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	250	500	1000
Intraday (%RSD)	0.16	0.28	0.14
Interday (%RSD)	0.25	0.65	0.16
Accuracy			
Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	224 (80%)	265 (100%)	302 (120%)
% Recovery	93.94 \pm 0.76	99.00 \pm 0.80	97.32 \pm 0.93
LOD ($\mu\text{g/mL}$)	1.13		
LOQ ($\mu\text{g/mL}$)	3.76		

ตารางที่ 3 แสดงข้อมูลพริกไทยล่อนที่ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อนำมาเป็นส่วนประกอบในตำรับยาสหัสธารา

ตัวอย่าง	แหล่งที่มา	ปริมาณ piperine (% dry weight)
พริกไทยล่อน 1	แหล่งการค้า กรุงเทพมหานคร	4.70 \pm 0.02
พริกไทยล่อน 2	แหล่งการค้า กรุงเทพมหานคร	4.51 \pm 0.01
พริกไทยล่อน 3	แหล่งการค้า จังหวัดขอนแก่น	4.46 \pm 0.08
พริกไทยล่อน 4	แหล่งปลูก จังหวัดจันทบุรี	5.19 \pm 0.03
พริกไทยล่อน 5	แหล่งปลูก จังหวัดพิษณุโลก	4.85 \pm 0.06

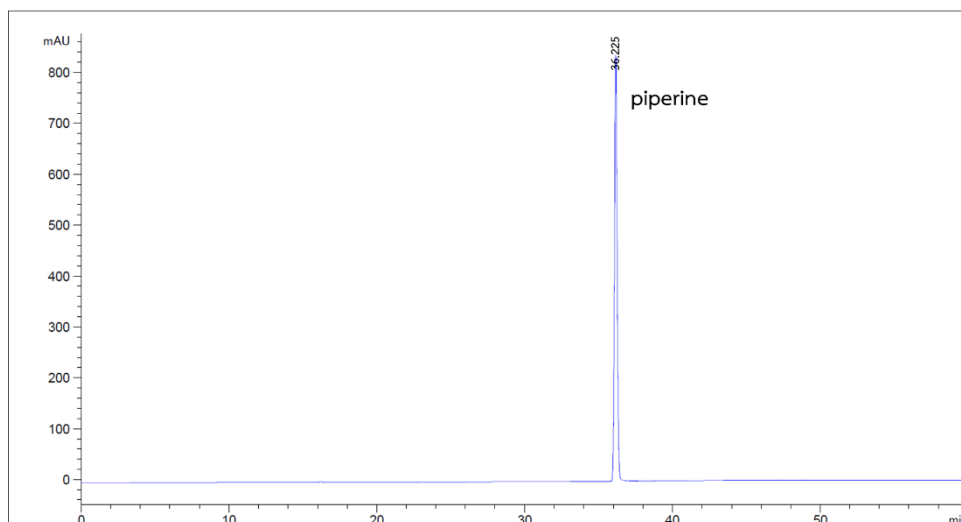
ตารางที่ 4 แสดงปริมาณสารพิเพอรินในตำรับยาสหัสธาราที่มีจำหน่ายในท้องตลาดในประเทศไทยและที่ผลิตเตรียมขึ้น

ตัวอย่าง	ปริมาณสารสำคัญ (Mean \pm SD)
	pipерine (% dry weight)
SAH01	1.44 \pm 0.00
SAH02	0.87 \pm 0.01
SAH03	1.09 \pm 0.00
SAH04	1.06 \pm 0.00
SAH05	1.03 \pm 0.01
SAH06	1.15 \pm 0.01
SAH07	1.04 \pm 0.02
SAH08	0.92 \pm 0.01

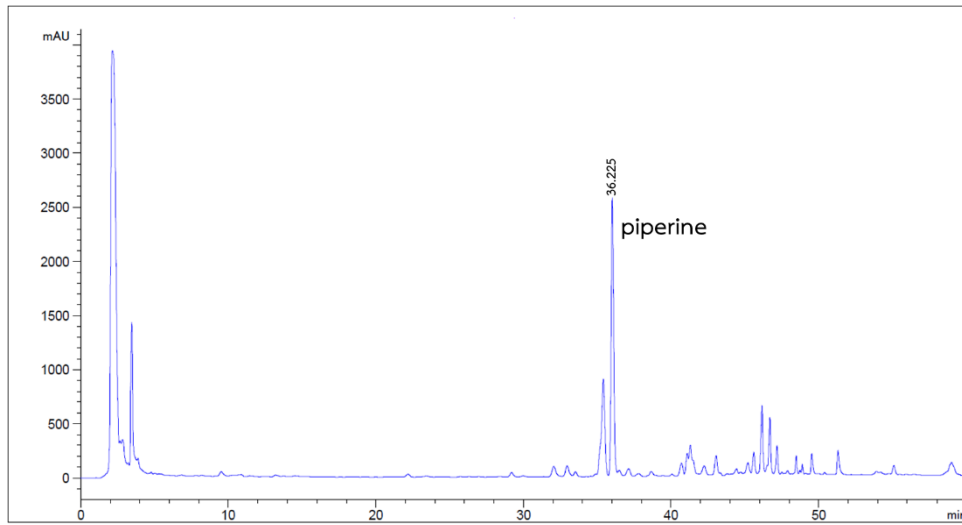
ตารางที่ 5 แสดงการวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างปริมาณสารพิเพอรินในตำรับยาสหัสธาราที่มีจำหน่ายในท้องตลาดในประเทศไทยและที่ผลิตเตรียมขึ้น

ปริมาณสารพิเพอริน	Sum of squares	df	Mean square	F	Sig
ระหว่างกลุ่ม	0.613	7	0.088	70021.367	0.000
ภายในกลุ่ม	0.000	16	0.000		
ผลรวม	0.613	23			

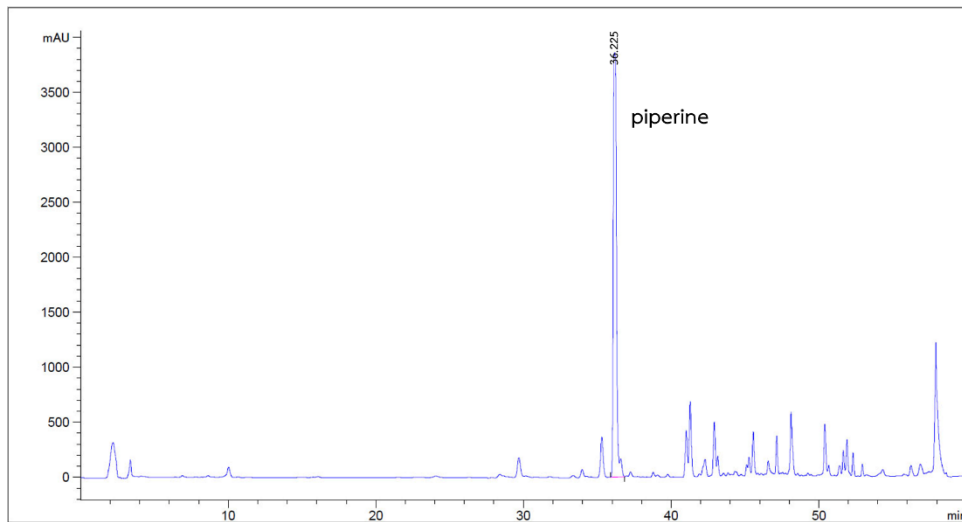
มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 (p -value \leq 0.05)



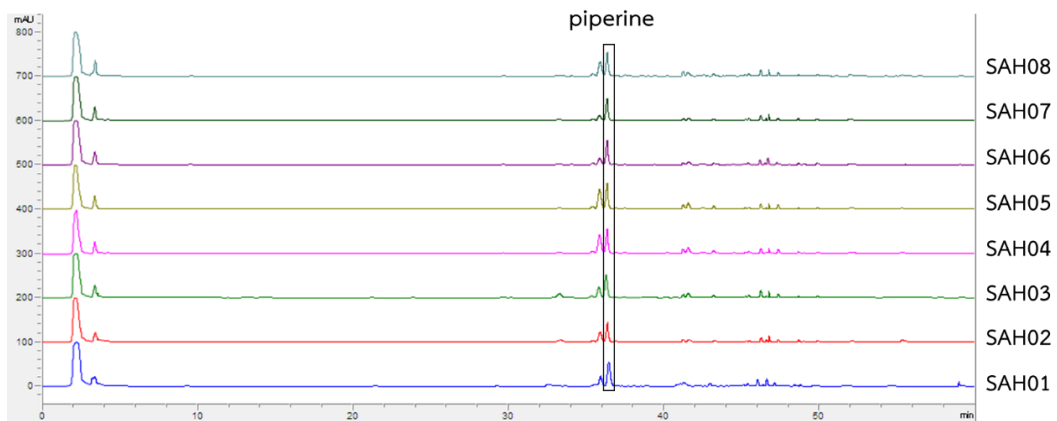
ภาพที่ 1 แสดงลักษณะโครมาโทแกรมของสารมาตรฐานพิเพอรินที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 2 แสดงลักษณะโครมาโทแกรมของตำรับยาสหัสธารา



ภาพที่ 3 แสดงลักษณะโครมาโทแกรมของพริกไทย



ภาพที่ 4 แสดงลักษณะโครมาโทแกรมของ SAH01-08 ที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารพิเพอริน