

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สารไฮดรอกซีชาวิคอลในสารสกัด
ตำรับยาแก้เรื้อนมูลนกสำหรับใช้รักษาโรคสะเก็ดเงิน โดยวิธีโครมาโทกราฟี
ของเหลวสมรรถนะสูง

Validation of HPLC Method for Determination of Hydroxychavicol in the
Extract from The Thai Traditional Remedy “Ruean-Mhoon-Nok”
to Treat Psoriasis Disease

กุลณัฐ ปุญญานววัฒน์ (Koonlanat Punyanuwat)* อัมณิกา เทียงธรรม (Atchanika Taingthum)**

ดร.ศรีโสภา เรืองหนู (Dr.Srisopa Ruangnoo)*** ดร.อินทัช ศักดิ์ภักดีเจริญ (Dr.Intouch Sakpakdeejaroen)^{1***}

(Received: December 16, 2024; Revised: March 26, 2025; Accepted: April 3, 2025)

บทคัดย่อ

ตำรับยาแก้เรื้อนมูลนก เป็นหนึ่งในตำรับยาที่บันทึกอยู่ในรายการตำรับยาแผนไทยแห่งชาติ ฉบับเฉลิมพระเกียรติฯ พ.ศ. 2562 ประกอบไปด้วยสมุนไพรทั้งหมด 9 ชนิด มีสรรพคุณแก้โรคสะเก็ดเงิน (ระยะที่มีแผลเป็นวงสีขาว มีขุย ขอบนูน มีอาการคัน และลามไปทั่วตัว) จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่า สารไฮดรอกซีชาวิคอลเป็นสารสำคัญของตำรับยาแก้เรื้อนมูลนก ซึ่งยังไม่มีการศึกษาตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สารไฮดรอกซีชาวิคอลในสารสกัดตำรับยาแก้เรื้อนมูลนก โดยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ผลการศึกษาพบว่า สารมาตรฐานไฮดรอกซีชาวิคอล มีค่า retention time เท่ากับ 33.927 นาที ในส่วนของสารสกัดตำรับยาแก้เรื้อนมูลนก พบสารที่ retention time เดียวกัน คือ 33.797 นาที ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับโครมาโทแกรม พบว่า มีลักษณะเหมือนกัน จึงสามารถยืนยันได้ว่า สารที่พบในสารสกัดตำรับยาแก้เรื้อนมูลนก คือ สารไฮดรอกซีชาวิคอล การวิเคราะห์ปริมาณสารไฮดรอกซีชาวิคอล ในช่วงความเข้มข้น 25 – 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงที่ดี ($R^2 = 0.9996$) โดยมีขีดจำกัดของการตรวจวัด (LOD) และขีดจำกัดในการหาปริมาณ (LOQ) เท่ากับ 4.31 และ 13.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์สารมาตรฐานไฮดรอกซีชาวิคอลที่ 50, 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ภายในวันเดียวกัน (intra-day) เท่ากับ 1.12-1.45 และระหว่างวัน (inter-day) เท่ากับ 1.25-1.42 ส่วนความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ รายงานด้วยค่าร้อยละของการคืนกลับ (%recovery) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 94.44 ± 0.58 , 98.30 ± 1.11 และ 100.79 ± 1.38 ตามลำดับ สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในสารสกัดตำรับยาแก้เรื้อนมูลนกที่เตรียมขึ้นทั้ง 3 ตัวอย่าง พบว่า มีปริมาณไฮดรอกซีชาวิคอลอยู่ในช่วงร้อยละ 1.97 ± 0.05 ถึง 2.28 ± 0.08 โดยน้ำหนักของสารสกัด จากผลการศึกษาที่สามารถนำไปสู่การจัดทำมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพของสารสกัดตำรับยาแก้เรื้อนมูลนก เพื่อประสิทธิผลในการนำไปใช้รักษาโรคและสร้างความปลอดภัยให้แก่ผู้บริโภคได้ต่อไปในอนาคต

¹Corresponding author: intouch.rx@hotmail.com

*นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
Student, Master of Science in Applied Thai Traditional Medicine, Faculty of Medicine, Thammasat University

**นักศึกษา หลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาการแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
Student, Doctor of Philosophy in Applied Thai Traditional Medicine, Faculty of Medicine, Thammasat University

***ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สถานการแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
Assistant Professor, Department of Applied Thai Traditional Medicine, Faculty of Medicine, Thammasat University

ABSTRACT

Ruean-Mhoon-Nok (RMN) remedy is listed in the National Thai Traditional Medicine Formulary in Honour of His Majesty the King B.E. 2562. The RMN remedy consists of 9 herbs used for the treatment of psoriasis disease (the stage characterized by white scars, scaly, raised edges, itching, and spreading all over the body). Previous research has shown that hydroxychavicol is an active compound of RMN remedy, but the analytical method was not validated. Therefore, this research aimed to develop and validate a method for analyzing the amount of hydroxychavicol in RMN remedy extract using high-performance liquid chromatography (HPLC). The results indicated that standard hydroxychavicol was eluted at a retention time of 33.927 min. Similar chromatogram was also found in the RMN remedy extract with the same retention time (33.797 min), confirming that it is hydroxychavicol. Moreover, the standard calibration curve of hydroxychavicol expressed a good linearity within the range of 25 – 400 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2 = 0.9996$). The LOD and LOQ values were 4.31 and 13.05 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Besides, the method demonstrated excellent intra-day and inter-day precisions of hydroxychavicol at 50, 100, and 200 $\mu\text{g/mL}$, with a relative standard deviation (%RSD) of 1.12-1.45% and 1.25-1.42%, respectively. In addition, the percentage recovery of hydroxychavicol was found to be 94.44 ± 0.58 , 98.30 ± 1.11 , and $100.79 \pm 1.38\%$, respectively, indicating a high degree of accuracy of the method. Additionally, the quantification of hydroxychavicol in three different batches of RMN remedy extract was found to be within the range of 21.24 ± 0.16 to 22.80 ± 0.80 %w/w of extract. This method, therefore, will be very useful for standardization and quality control of RMN remedy extract, ensuring its efficiency and safety for future applications.

คำสำคัญ: ไฮดรอกซีชาวิคอล ตำรับยาแก้โรคเรื้อนมูลนก การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

Keywords: Hydroxychavicol, Ruean-Mhoon-Nok Remedy, Method validation

บทนำ

โรคเรื้อนมูลนกในทางการแพทย์แผนไทยปรากฏอยู่ในคัมภีร์วิธีถิภูโรค โดยมีคำอธิบายว่า ผุดขึ้นมาเป็นแฉนเป็นวงขึ้นตามผิวหนัง เล็กก็มีใหญ่ก็มี มีสีขาวนูน ๆ ขอบนั้นนูนดูสัญญาณดังกล่าก กระทำให้คัน ถ้าแก้เข้าเป็นลามไปทั้งตัว พยาธินี้หายบ้างมีหายบ้าง แต่ไม่ตาย เป็นแต่ล่าบาก ซึ่งเทียบได้กับโรคสะเก็ดเงิน (Psoriasis) ในทางการแพทย์แผนปัจจุบัน [1] โดยโรคสะเก็ดเงินจัดเป็นโรคผิวหนังอักเสบเรื้อรังชนิดหนึ่ง ซึ่งมีการแสดงที่สำคัญ คือ มีผื่นแดงหนาขอบเขตชัดเจน และมีขุยหนาสีขาวหรือสีเงินปกคลุม [2] สำหรับกลไกการเกิดโรคสะเก็ดเงินจะเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายและพันธุกรรม รวมถึงปัจจัยกระตุ้นภายนอก ได้แก่ ความเครียด การบาดเจ็บของผิวหนัง การเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมน และยาบางชนิด สำหรับความชุกของโรคสะเก็ดเงินพบได้ประมาณร้อยละ 2-3 ของประชากรทั้งหมดทั่วโลก พบได้ทุกช่วงอายุ อัตราการเกิดโรคเท่ากันทั้งเพศหญิงและเพศชาย [3] ส่วนในประเทศไทย จากข้อมูลสถิติโรคผู้ป่วยนอก 10 อันดับของสถาบันโรคผิวหนังในปี พ.ศ. 2566 พบว่า โรคสะเก็ดเงินจัดเป็นโรคที่พบมากเป็นอันดับที่ 3 ที่มาเข้ารับการรักษา จำนวน 17,432 ราย และโรคสะเก็ดเงินที่พบมากที่สุดคือชนิด Psoriasis vulgaris [4] ปัจจุบันการรักษาโรคสะเก็ดเงินมีหลากหลายวิธี ซึ่งจะมีทั้งการให้ยาทาภายนอก ยารับประทาน การใช้แสงแดดเทียม การฉีดยากลุ่ม

ชีวภาพ การรักษาประคับประคองทั้งด้านร่างกายและจิตใจ แต่เนื่องจากโรคสะเก็ดเงินเป็นโรคผิวหนังอักเสบเรื้อรัง ไม่สามารถรักษาหายขาดได้ ผู้ป่วยจำเป็นต้องได้รับการรักษาต่อเนื่องซึ่งแต่ละวิธีมีประสิทธิภาพ ผลข้างเคียง และข้อควรระวังแตกต่างกัน โดยเฉพาะการใช้ยากุ่มสเตียรอยด์ซึ่งพบว่าให้ประสิทธิภาพการรักษาที่ดีในช่วง 2 สัปดาห์แรก แต่เมื่อใช้ต่อเนื่องเป็นเวลานานจะเกิดผลข้างเคียงตามมา คือ ทำให้ผิวหนังบางลง เกิดรอยแตกของผิว (striae) และหากยาถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดอาจทำให้ปกติการทำงานของต่อมหมวกไตได้ อีกทั้งถ้าใช้ยาสเตียรอยด์ติดต่อกันเป็นเวลานานจะทำให้ประสิทธิภาพของยาลดลง [3]

ในปัจจุบันสมุนไพรไทยยังคงได้รับความสนใจและใช้เป็นทางเลือกในการในการรักษาโรคเรื้อนมูลนกหรือโรคสะเก็ดเงิน โดยทางการแพทย์แผนไทยมีตำรับยาทาแก้เรื้อนมูลนก ซึ่งเป็นหนึ่งในตำรับยาที่บันทึกอยู่ในรายการตำรับยาแผนไทยแห่งชาติ ฉบับเฉลิมพระเกียรติฯ พ.ศ. 2562 โดยมีสรรพคุณแก้โรคสะเก็ดเงิน (ระยะที่มีแผลเป็นวงสีขาว มีขุยขอบนูน มีอาการคัน และลามไปทั้งตัว) ซึ่งในตำรับประกอบด้วยสมุนไพร 9 ชนิด อย่างละ 1 ส่วนเท่ากัน ได้แก่ ใบกรวยป่า (*Casearia grewifolia* Vent.) ใบกุ่มน้ำ (*Crateva religiosa* G. Forst.) ใบกุ่มบก (*Crateva adansonii* DC.) ขอบชะนางขาว (*Pouzolzia zeylanica* (L.) Benn.) ขอบชะนางแดง (*Gonostegia pentandra* (Roxb.) Miq.) ข่าหลวง (*Alpinia galanga* (L.) Willd.) ใบพลูแก (*Piper wallichii* (Moq.) Hand. -Mazz.) ใบลำโพง (*Datura metal* L.) และเอื้องเพ็ดม้า (*Persicaria chinensis* (L.) H. Gross) [5] จากรายงานก่อนหน้า พบว่า สมุนไพรที่เป็นส่วนประกอบของตำรับ เช่น กรวยป่า ใบกุ่มบก ใบขอบชะนางขาว และเอื้องเพ็ดม้า มีฤทธิ์ต้านการอักเสบที่ดี [6-9] ในขณะที่สารสกัดเหง้าข่าหลวงด้วยเอทานอล 95% รวมถึงสาร withanolides ซึ่งเป็นกลุ่มของสเตียรอยด์ที่แยกได้จากใบลำโพง มีฤทธิ์รักษาสะเก็ดเงินในสัตว์ทดลอง [10-11] ในส่วนงานวิจัยของกลุ่มผู้วิจัยเอง พบว่า สารสกัดด้วยเอทานอล 95% ของตำรับยาแก้เรื้อนมูลนก รวมถึงสมุนไพรเดี่ยวในตำรับโดยเฉพาะอย่างยิ่งพลูแก มีปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่สูง และมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงเช่นเดียวกัน [12] นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยการยับยั้งไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) ไซโตไคน์ IL-6 และ TNF- α ได้ดีอีกด้วย โดยพบว่า สารออกฤทธิ์ที่สำคัญของตำรับยาแก้เรื้อนมูลนก คือ สารไฮดรอกซีชาวิคอล (hydroxychavicol) ที่มาจากใบพลูแก [13] ทั้งนี้ เคยมีรายงานการค้นพบสารไฮดรอกซีชาวิคอลจากใบพลู (*Piper betle* L.) ซึ่งเป็นสารสำคัญหลักที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และเป็นพืชในวงศ์ Piperaceae เช่นเดียวกับพลูแก [14-15] โดยสารไฮดรอกซีชาวิคอลนั้น สามารถลดการอักเสบโดยการยับยั้งเอนไซม์ Phosphodiesterase 4 (PDE4) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคผื่นภูมิแพ้ผิวหนัง (atopic dermatitis) และสะเก็ดเงิน [16] ซึ่งสอดคล้องกับสรรพคุณตามตำรายาของตำรับยาแก้เรื้อนมูลนกอีกด้วย

จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากตำรับยาแก้เรื้อนมูลนกมีศักยภาพในการนำมาพัฒนาเป็นยาหรือผลิตภัณฑ์สำหรับใช้รักษาผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินได้ อย่างไรก็ตามปัญหาการนำตำรับยาสมุนไพรมาผลิตเป็นยาหรือผลิตภัณฑ์สมุนไพร มีประสิทธิภาพที่ไม่สม่ำเสมอในแต่ละครั้งที่ผลิต จึงควรมีวิธีการควบคุมคุณภาพสารสกัดและผลิตภัณฑ์จากตำรับยาสมุนไพรให้ได้มาตรฐาน เพื่อให้ได้รับผลิตภัณฑ์ยาที่มีคุณภาพที่ดีและปลอดภัย ทั้งนี้จากการทบทวนวรรณกรรม สารสกัดตำรับยาแก้เรื้อนมูลนกยังขาดรายงานการศึกษาวิธีการควบคุมคุณภาพของตำรับยา ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะพัฒนาวิเคราะห์ปริมาณสารไฮดรอกซีชาวิคอล ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ที่สำคัญของตำรับยาแก้เรื้อนมูลนก โดยใช้วิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง รวมถึงทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ เพื่อนำไปใช้ในการควบคุมคุณภาพสารสกัดและผลิตภัณฑ์ยาให้มีความถูกต้อง ได้มาตรฐาน และมีความน่าเชื่อถือมากขึ้น

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สารไฮดรอกซีซาวีคอลในสารสกัดตำรับยาแก้ร้อนมุลนก โดยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

วิธีการวิจัย

การเตรียมตัวอย่างและเตรียมสารสกัดตำรับยาแก้ร้อนมุลนก

ตำรับยาแก้ร้อนมุลนกที่จัดเตรียมขึ้นโดยผู้ดำเนินการวิจัย มีสมุนไพรที่เป็นส่วนประกอบในตำรับทั้งหมด 9 ชนิด ซึ่งทำการซื้อมาจากแหล่งการค้าสมุนไพรหลายจังหวัดในประเทศไทย แสดงในตารางที่ 1 จากนั้นนำมาตรวจสอบชนิดสมุนไพร เทียบเคียงตัวอย่าง พร้อมจัดทำตัวอย่างอ้างอิง (Herbarium Specimen) และถูกจัดเก็บ ณ พิพิธภัณฑ์สมุนไพร กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข

สำหรับการเตรียมสารสกัดตำรับยาแก้ร้อนมุลนกในการศึกษานี้ จะมีการเตรียมสารสกัดทั้งหมด 3 ตัวอย่าง (RMN-Batch 1-3) แต่ละตัวอย่างจะเป็นการเตรียมจากสมุนไพรที่ได้จากแหล่งเดียวกัน แต่เป็นคนละช่วงเวลา (ระหว่างปี พ.ศ. 2565-2566) โดยจะเริ่มจากการคัดเลือกวัตถุดิบสมุนไพรแต่ละชนิด แล้วนำมาล้างทำความสะอาด ย่อยขนาดให้เล็กลง และนำมามอบในเครื่องอบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนแห้ง จากนั้นนำสมุนไพรแต่ละชนิดมาแยกบดเป็นผงหยาบ แล้วจึงนำผงสมุนไพรทั้ง 9 ชนิดมาผสมกัน ในอัตราส่วนที่เท่ากัน นำไปสกัดโดยการหมัก (maceration) ในเอทานอล 95% เป็นเวลา 3 วัน กรองสารสกัดที่ได้ผ่านกระดาษกรอง แล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator) ส่วนกากที่เหลือนำมาหมักโดยวิธีเดิมอีก 2 ครั้ง รวมสารสกัดที่ได้เข้าด้วยกันแล้วจึงนำไปทำแห้งโดยใช้เครื่องอบแห้งแบบสุญญากาศ (Vacuum drying oven) สารสกัดทั้งหมดจะถูกบรรจุในภาชนะที่ปิดฝาสนิทและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

การเตรียมสารมาตรฐาน และตัวอย่างสารสกัดตำรับยาแก้ร้อนมุลนก

เตรียมสารมาตรฐานไฮดรอกซีซาวีคอล (Tokyo Chemical Industry) ให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยละลายในเมทานอล (HPLC grade; RCI Labscan)

เตรียมตัวอย่างสารสกัดตำรับยาแก้ร้อนมุลนก 10 มิลลิกรัม ละลายสารสกัดด้วยเมทานอล (HPLC grade; RCI Labscan) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำมารองผ่านไซริงค์ฟิลเตอร์เมมเบรนขนาด 0.45 ไมโครเมตร

สภาวะของระบบโครมากราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ต่อกับเครื่องตรวจจับสัญญาณชนิดไดโอดอาร์เรย์ (diode array detector) คอลัมน์ ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6 x 250 มิลลิเมตร อนุภาคขนาด 5 ไมโครเมตร) วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ น้ำ (water, A) และ อะซิโตนไนไตรล์ (acetonitrile, B) ใช้ระบบการชะแบบมีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ (gradient elution) โดยค่อย ๆ เปลี่ยนความเข้มข้นอย่างต่อเนื่อง ตามระยะเวลาในแต่ละช่วง ดังนี้ 0 นาที 90%A, 10 นาที 90%A, 30 นาที 70%A, 45 นาที 60%A, 53 นาที 95%A, 60 นาที 95%A, 60.1 นาที 90%A, 65 นาที 90%A อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่นอัลตราไวโอเล็ต 210 นาโนเมตร ปริมาตรตัวอย่างฉีดครั้งละ 10 ไมโครลิตร

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

โดยการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ใช้ตามหลักเกณฑ์มาตรฐานของ International Conference on Harmonization (ICH) guidelines, Q2 (R1) [17]

การทดสอบความจำเพาะ (specificity)

นำสารมาตรฐานไฮดรอกซีซาวีคอลและตัวอย่างสารสกัดตำรับยาแก้เรื้อนมูลนก ทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ภายใต้สภาวะที่กำหนด จากนั้นตรวจสอบความจำเพาะด้วยการเปรียบเทียบ retention time และ UV-spectrum ของสารไฮดรอกซีซาวีคอลที่พบในตัวอย่างสารสกัดตำรับยาแก้เรื้อนมูลนกกับสารมาตรฐานไฮดรอกซีซาวีคอล

การทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity)

เตรียมสารมาตรฐานไฮดรอกซีซาวีคอลจาก stock solution ให้ได้ความเข้มข้น 25, 50, 100, 200, 300 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย ทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำค่าพื้นที่ใต้กราฟ (area under the curve, AUC) มาคำนวณหาค่าเฉลี่ยของแต่ละระดับความเข้มข้น จากนั้นสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟและความเข้มข้นสารมาตรฐานไฮดรอกซีซาวีคอล เพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, R^2) โดยค่า R^2 ควรมากกว่า 0.995

ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ (precision)

เตรียมสารมาตรฐานไฮดรอกซีซาวีคอลที่ระดับความเข้มข้น 50, 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน (intra-day) และระหว่างวัน (inter-day) โดยฉีดความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ เป็นเวลา 3 วัน คำนวณค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) โดยเกณฑ์การยอมรับค่า %RSD ควรน้อยกว่า 2%

ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (accuracy)

การทดสอบใช้วิธีการเติมสารละลายมาตรฐานลงในตัวอย่าง (standard addition method or spiking) โดยเตรียมตัวอย่างสารสกัดตำรับยาแก้เรื้อนมูลนกตามวิธีการข้างต้น ผสมกับสารมาตรฐานไฮดรอกซีซาวีคอลให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50, 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ คำนวณค่าร้อยละของการคืนกลับ (%recovery) และค่า %RSD ของแต่ละความเข้มข้น โดยเกณฑ์การยอมรับ %recovery ควรอยู่ในช่วง 90% - 110% และค่า %RSD ควรน้อยกว่า 2%

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

ในการศึกษานี้เลือกใช้การคำนวณค่า LOD และ LOQ โดยการตรวจหาจากส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของสัญญาณและความชันของกราฟมาตรฐาน (Based on the standard deviation of the response on the slope) จากสูตร $LOD = 3.3\sigma/S$ และ $LOQ = 10\sigma/S$ เมื่อ σ คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของสัญญาณ (คำนวณจากค่าที่จุดตัดแกน y) ในขณะที่ S คือความชันของกราฟมาตรฐาน

การวิเคราะห์ปริมาณสารไฮดรอกซีซาวีคอลในตัวอย่างสารสกัดตำรับยาแก้เรื้อนมูลนก

วิเคราะห์หาปริมาณไฮดรอกซีซาวีคอลในตัวอย่างสารสกัดตำรับยาแก้เรื้อนมูลนกที่เตรียมขึ้นตามวิธีการข้างต้น จำนวน 3 ตัวอย่าง (RMN-Batch 1-3) ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง และคำนวณจากการแทนค่าพื้นที่ใต้กราฟของตัวอย่างในสมการเส้นตรงของสารมาตรฐานไฮดรอกซีซาวีคอล โดยรายงานเป็นปริมาณร้อยละของไฮดรอกซีซาวีคอลโดยน้ำหนักของสารสกัด (%w/w of extract)

ผลการวิจัย

การทดสอบความจำเพาะ (specificity)

จากการวิเคราะห์สารมาตรฐานไฮดรอกซีซาวีคอลด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงภายใต้สภาวะที่กำหนด พบว่ามีค่า retention time เท่ากับ 33.927 นาที แสดงในภาพที่ 1(A) และเมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะโครมาโทแกรมของ

สารสกัดตำรับยาแก้ร้อนมุลนก พบว่าค่า retention time เท่ากับ 33.797 นาที ซึ่งมีค่าตรงกับสารมาตรฐานไฮดรอกซีซาวีคอล แสดงในภาพที่ 1(B) และในการทดสอบความจำเพาะของสารสกัดตำรับยาแก้ร้อนมุลนก โดยอาศัยเวลาในการเคลื่อนที่ของสาร และ UV spectrum แสดงในภาพที่ 2 จะเห็นลักษณะ UV spectrum ของไฮดรอกซีซาวีคอลในสารสกัดตำรับยาแก้ร้อนมุลนก มีลักษณะเหมือนกับสารมาตรฐานทุกประการ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าในตัวอย่างมีไฮดรอกซีซาวีคอลอยู่จริง

การทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity)

จากการวิเคราะห์สารมาตรฐานไฮดรอกซีซาวีคอลที่ระดับความเข้มข้น 25, 50, 100, 200, 300 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรภายใต้สภาวะที่กำหนด พบว่ามีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับพื้นที่ใต้กราฟ โดยมีสมการเส้นตรง คือ $y = 49118x - 523177$ และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, R^2) เท่ากับ 0.9996 แสดงในภาพที่ 3

ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ (precision)

จากการวิเคราะห์สารมาตรฐานไฮดรอกซีซาวีคอลที่ระดับความเข้มข้น 50, 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า การวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน (intra-day) และระหว่างวัน (Inter-day) มีค่า %RSD น้อยกว่า 2% ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้ แสดงว่าวิธีที่ใช้ในการศึกษามีความเที่ยงตรงในการวิเคราะห์ แสดงในตารางที่ 2

ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (accuracy)

จากการวิเคราะห์สารมาตรฐานไฮดรอกซีซาวีคอล ความเข้มข้น 50, 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ พบว่า %recovery อยู่ในเกณฑ์การยอมรับในช่วง 90%-110% และค่า %RSD ของแต่ละความเข้มข้น น้อยกว่า 2% แสดงในตารางที่ 2

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

จากการวิเคราะห์สารมาตรฐานไฮดรอกซีซาวีคอลมีค่า LOD เท่ากับ 4.31 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า LOQ เท่ากับ 13.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงในตารางที่ 2

การวิเคราะห์ปริมาณสารไฮดรอกซีซาวีคอลในตัวอย่างสารสกัดตำรับยาแก้ร้อนมุลนก

จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารไฮดรอกซีซาวีคอลในตัวอย่างสารสกัดตำรับยาแก้ร้อนมุลนกที่เตรียมขึ้นจากการศึกษาครั้งนี้ จำนวน 3 ตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ พบว่าปริมาณสารไฮดรอกซีซาวีคอลที่พบในสารสกัดตำรับยาแก้ร้อนมุลนกที่เตรียมขึ้น (RMN-Batch 1 – RMN-Batch 3) ทั้ง 3 ตัวอย่าง มีปริมาณร้อยละของไฮดรอกซีซาวีคอลโดยน้ำหนักของสารสกัด (%w/w of extract) เท่ากับ 2.13 ± 0.02 , 2.28 ± 0.08 และ 1.97 ± 0.05 ตามลำดับ แสดงในตารางที่ 3

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

ตำรับยาแก้ร้อนมุลนกเป็นตำรับยาที่ยังไม่มีวิธีการในการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ ซึ่งได้แก่ สารไฮดรอกซีซาวีคอล เพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพของตำรับอย่างชัดเจน งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารไฮดรอกซีซาวีคอล ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ที่สำคัญของตำรับยาแก้ร้อนมุลนก โดยใช้วิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ผลการทดสอบความถูกต้อง พบว่าวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีความเฉพาะเจาะจงต่อสารไฮดรอกซีซาวีคอล เนื่องจากพีคของสารมีการแยกตัวที่ออกจากส่วนประกอบอื่น ๆ ในสารสกัดตำรับยาแก้ร้อนมุลนก นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบกับอาศัยค่า retention time และ UV spectrum จะเห็นได้ว่าค่า retention time รวมถึงลักษณะ UV spectrum ของไฮดรอกซีซาวีคอลในสารสกัดตำรับยาแก้ร้อนมุลนก มีลักษณะเหมือนกับสารมาตรฐานทุกประการ ซึ่งยืนยันความน่าเชื่อถือของวิธีนี้ ส่วนการสร้างกราฟมาตรฐานของสารไฮดรอกซีซาวีคอล พบว่า มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linearity) ในช่วงความเข้มข้น 25 ถึง 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, R^2) เท่ากับ 0.9996 ในขณะที่ปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัด

ได้ (LOD) มีค่าเท่ากับ 4.31 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOQ) มีค่า 13.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งบ่งชี้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความไวเพียงพอที่จะตรวจจับสารไฮดรอกซีซาวิคอลในความเข้มข้นต่ำ การวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน (intra-day) และระหว่างวัน (Inter-day) แสดงให้เห็นถึงความเที่ยงตรงและความสามารถในการทำซ้ำของวิธีวิเคราะห์ โดยดูจากค่า RSD ที่ต่ำกว่า 2% นอกจากนี้ร้อยละการกลับคืน (%recovery) ของสารไฮดรอกซีซาวิคอล ยังอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ 90-110% และค่า RSD ก็ต่ำกว่า 2% บ่งชี้ว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีความแม่นยำและเหมาะสมสำหรับการหาปริมาณไฮดรอกซีซาวิคอล ซึ่งผลการทดสอบเหล่านี้ผ่านเกณฑ์ตามข้อกำหนดของ ICH guideline [17] ทั้งนี้ เคยมีรายงานการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารไฮดรอกซีซาวิคอลและยูจินอลในใบพลูโดยใช้วิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง [18] อย่างไรก็ตาม วิธีการเหล่านี้อาจไม่สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์สารไฮดรอกซีซาวิคอลที่อยู่ในตำรับยาแก้ร้อนมุลนกได้ เนื่องจากความแตกต่างขององค์ประกอบทางเคมีในสมุนไพรแต่ละชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในรูปแบบตำรับยาซึ่งมีสมุนไพรหลายชนิดรวมกันอยู่ อาจรบกวนการแยกและการตรวจวัดสารที่ต้องการ [19] จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ที่มีความจำเพาะต่อตำรับยา และไม่มีผลกระทบของสารรบกวน เพื่อให้มั่นใจว่าสามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารที่ต้องการได้อย่างถูกต้อง และน่าเชื่อถือ [20]

เมื่อนำวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมาประยุกต์ใช้ในการหาปริมาณสารปริมาณไฮดรอกซีซาวิคอลในตัวอย่างสารสกัดตำรับยาแก้ร้อนมุลนกที่เตรียมขึ้น จำนวน 3 ตัวอย่าง (RMN-Batch 1 – RMN-Batch 3) ซึ่งเตรียมจากสมุนไพรที่ได้จากแหล่งเดียวกัน แต่เป็นคนละช่วงเวลา พบว่า ปริมาณสารไฮดรอกซีซาวิคอลในตัวอย่างที่เตรียมแต่ละครั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยอยู่ในช่วงร้อยละ 1.97 ± 0.05 ถึง 2.28 ± 0.08 โดยน้ำหนักสารสกัด ทั้งนี้ การที่ปริมาณสารไฮดรอกซีซาวิคอลในแต่ละตัวอย่างไม่เท่ากันอาจเกิดได้หลายสาเหตุ เช่น การเพาะปลูก การเก็บเกี่ยววัตถุดิบสมุนไพร การทำแห้งสมุนไพรหลังเก็บเกี่ยว รวมถึงการเก็บรักษาสมุนไพรแห้ง เพื่อให้สมุนไพรยังคงสภาพที่ดีและสูญเสียสารสำคัญน้อยที่สุด [21-22] อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาปริมาณสารสำคัญเพื่อกำหนดขนาดยาในการการรักษาโรคสะเก็ดเงิน ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาทางคลินิกเพื่อกำหนดช่วงของขนาดยาในการรักษาและระบุปริมาณสารสารไฮดรอกซีซาวิคอลในสารสกัดตำรับยาแก้ร้อนมุลนก เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการใช้รักษาโรคสะเก็ดเงิน

เท่าที่ผู้วิจัยทราบ การศึกษานี้เป็นงานวิจัยแรกที่ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์สารไฮดรอกซีซาวิคอล ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์สำคัญในตำรับยาแก้ร้อนมุลนก โดยใช้วิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ที่ผ่านการตรวจสอบความถูกต้องแล้ว ซึ่งอาจนำมาใช้เป็นแนวทางในการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์จากสารสกัดตำรับยาแก้ร้อนมุลนก ให้มีประสิทธิภาพที่ดี ในการรักษาโรค และมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Chinnaphat C. Principles of Using Medicinal Plants in Withikutdharok Scripture. J Thai Tradit Altern Med. 2020;18(1):165–147.
2. Rendon A, Schakel K. Psoriasis pathogenesis and treatment. Int J Mol Sci. 2019;20(6):1475.
3. Pattamadolok P. Psoriasis [Internet]. 2018 [updated 2018 Oct; cited 2024 Jul 24]. Available from: https://www.iod.go.th/wp-content/uploads/2020/10/news_29.pdf

4. Institute of Dermatology. Statistical Report 2023 [Internet]. 2023 [updated 2023 Oct 15; cited 2024 Jul 24]. Available from: <https://www.iod.go.th/wp-content/uploads/2023/11/%E0%B8%AA%E0%B8%96%E0%B8%B4%E0%B8%95%E0%B8%B4%E0%B8%9B%E0%B8%A3%E0%B8%B0%E0%B8%88%E0%B8%B3%E0%B8%9B%E0%B8%B5%E0%B8%87%E0%B8%9A%E0%B8%9B%E0%B8%A3%E0%B8%B0%E0%B8%A1%E0%B8%B2%E0%B8%93-2566.pdf>
5. Division for the Protection and Promotion of Thai Traditional Medicine Wisdom and Thai Folk Medicine, Department for Development of Thai Traditional and Alternative Medicine, Ministry of Public Health. National Thai Traditional Medicine Formulary Special Edition to Commemorate the Auspicious Occasion of the Coronation of H.M. King Rama X, B.E.2562. 1st ed. Bangkok: Samchareon Phanich Co., Ltd; 2019.
6. Nhoek P, Ahn S, Park IG, Pel P, Huh J, Kim HW, et al. Salicinoyl Quinic acids and their prostaglandin E2 production inhibitory activities from the fruits of *Casearia grewia* folia. *J Nat Prod*. 2021;84(9):2437–46.
7. Ahama-Esseh K, Bodet C, Quashie-Mensah-Atttoh A, Garcia M, Théry-Koné I, Dorat J, et al. Anti-inflammatory activity of *Crateva adansonii* DC on keratinocytes infected by *Staphylococcus aureus*: From traditional practice to scientific approach using HPTLC-densitometry. *J Ethnopharmacol*. 2017;204:26–35.
8. Chen ZH, Zhang H, Tao SH, Luo Z, Zhong CQ, Guo LB. Norlignans from *Pouzolzia zeylanica* var. *microphylla* and their nitric oxide inhibitory activity. *J Asian Nat Prod Res*. 2015;17(10):959–66.
9. Choi YH, Lee JY, Lee JE, Jung YW, Jeong W, Hong SS, et al. Skin-related properties and constituents from the aerial parts extract of *Persicaria senticosa*. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020:6627752.
10. Ramanunni AK, Wadhwa S, Singh SK, Kumar B, Gulati M, Kumar A, et al. Topical non-aqueous nanoemulsion of *Alpinia galanga* extract for effective treatment in psoriasis: In vitro and in vivo evaluation. *Int J Pharm*. 2022;624:121882.
11. Cheng Y, Liu Y, Tan J, Sun Y, Guan W, Jiang P, et al. Integrated serum metabolomics and network pharmacology approach to reveal the potential mechanisms of withanolides from the leaves of *Datura metel* L. on psoriasis. *J Pharm Biomed Anal*. 2020;186:113277.
12. Taingthum A, Sakpakdeejaroen I, Panthong S, Kanokkangsadal P. Assessment of in vitro antioxidant activities and quantification of total phenolic and flavonoid contents in extracts from the Thai traditional remedy “Ruean-Khi-Nok” and its plant constituents. *Asian Med J Altern Med*. 2024;24(1):9–18.
13. Taingthum A, Panthong S, Kanokkangsadal P, Sakpakdeejaroen I. Exploring biological activities of a Thai traditional remedy called “Ruean-Mhoon-Nok” and its plant ingredient extracts for the treatment of dermatitis. *Curr Tradit Med*. 2025;11:1–12.
14. Ali I, Khan FG, Suri KA, Gupta BD, Satti NK, Dutt P, et al. In vitro antifungal activity of hydroxychavicol isolated from *Piper betle* L. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2010;9:7.

15. Salehi B, Zakaria ZA, Gyawali R, Ibrahim SA, Rajkovic J, Shinwari ZK, et al. Piper species: A comprehensive review on their phytochemistry, biological activities and applications. *Molecules*. 2019;24(7):1364.
16. Ou J, Zhong F, Huang P, Zhang Y, Xie S, Wu P, et al. Hydroxychavicol derivatives from Piper betle Linn. as natural PDE4 inhibitors with anti-inflammatory effects. *Bioorg Chem*. 2025;157:108294.
17. ICH Harmonized Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures text and methodology Q2(R1) [Internet]. 2005 [cited 2024 Jul 24]. Available from: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>
18. Singtongratana N, Vadhanasin S, Singkhonrat J. Hydroxychavicol and eugenol profiling of betel leaves from Piper betle L. obtained by liquid-liquid extraction and supercritical fluid extraction. *Agric Nat Resour*. 2013;47(4):614–23.
19. Jaicharoensub J, Sakpakdeejaroen I, Panthong S. Validation of HPLC method for quantitative determination of active compounds in Thai traditional herbal medicine to treat gastrointestinal disease. *Talanta Open*. 2023;7:100227.
20. Mudge EM, Betz JM, Brown PN. The importance of method selection in determining product integrity for nutrition research. *Adv Nutr*. 2016;7(2):390–8.
21. Ghimire BK, Seo JW, Kim SH, Ghimire B, Lee JG, Yu CY, et al. Influence of harvesting time on phenolic and mineral profiles and their association with the antioxidant and cytotoxic effects of *Atractylodes japonica* Koidz. *Agronomy*. 2021;11(7):1327.
22. Saikia J, Sarkar A, Washmin N, Borah T, Das B, Konwar P, et al. Effect of postharvest drying on physicochemical properties, volatile yield, composition, and sensory attributes of *Alpinia zerumbet* (shell ginger) rhizome. *Ind Crops Prod*. 2023;198:116719.

ตารางที่ 1 รายละเอียดของสมุนไพรที่เป็นส่วนประกอบของตำรับยาแก้ร้อนมูลกทั้งหมด 9 ชนิด

ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	ชื่อวงศ์	เลขอ้างอิง ตัวอย่างพรรณไม้	แหล่งที่มา
<i>Casearia grewiifolia</i> Vent.	กรวยป่า	Salicaceae	TTM-c No. 1000658	ฉะเชิงเทรา
<i>Crateva religiosa</i> G. Forst.	กุ่มน้ำ	Capparaceae	TTM-c No. 1000659	สมุทรสาคร
<i>Crateva adansonii</i> DC.	กุ่มบก	Capparaceae	TTM-c No. 1000660	ชลบุรี
<i>Pouzolzia zeylanica</i> (L.) Benn.	ขอบชะนางขาว	Urticaceae	TTM-c No. 0005449	สมุทรสาคร
<i>Gonostegia pentandra</i> (Roxb.) Miq.	ขอบชะนางแดง	Urticaceae	TTM-c No. 1000662	สมุทรสาคร
<i>Alpinia galanga</i> (L.) Willd.	ข่าหลวง	Zingiberaceae	TTM-c No. 0005447	นครปฐม
<i>Piper wallichii</i> (Moq.) Hand. -Mazz.	พลูแก	Piperaceae	TTM-c No. 1000663	นครปฐม
<i>Datura metal</i> L.	ล้าโพง	Solanaceae	TTM-c No. 0005448	พระนครศรีอยุธยา
<i>Persicaria chinensis</i> (L.) H. Gross	เอื้องเพ็ดม้า	Polygonaceae	TTM-c No. 1000664	สมุทรสาคร

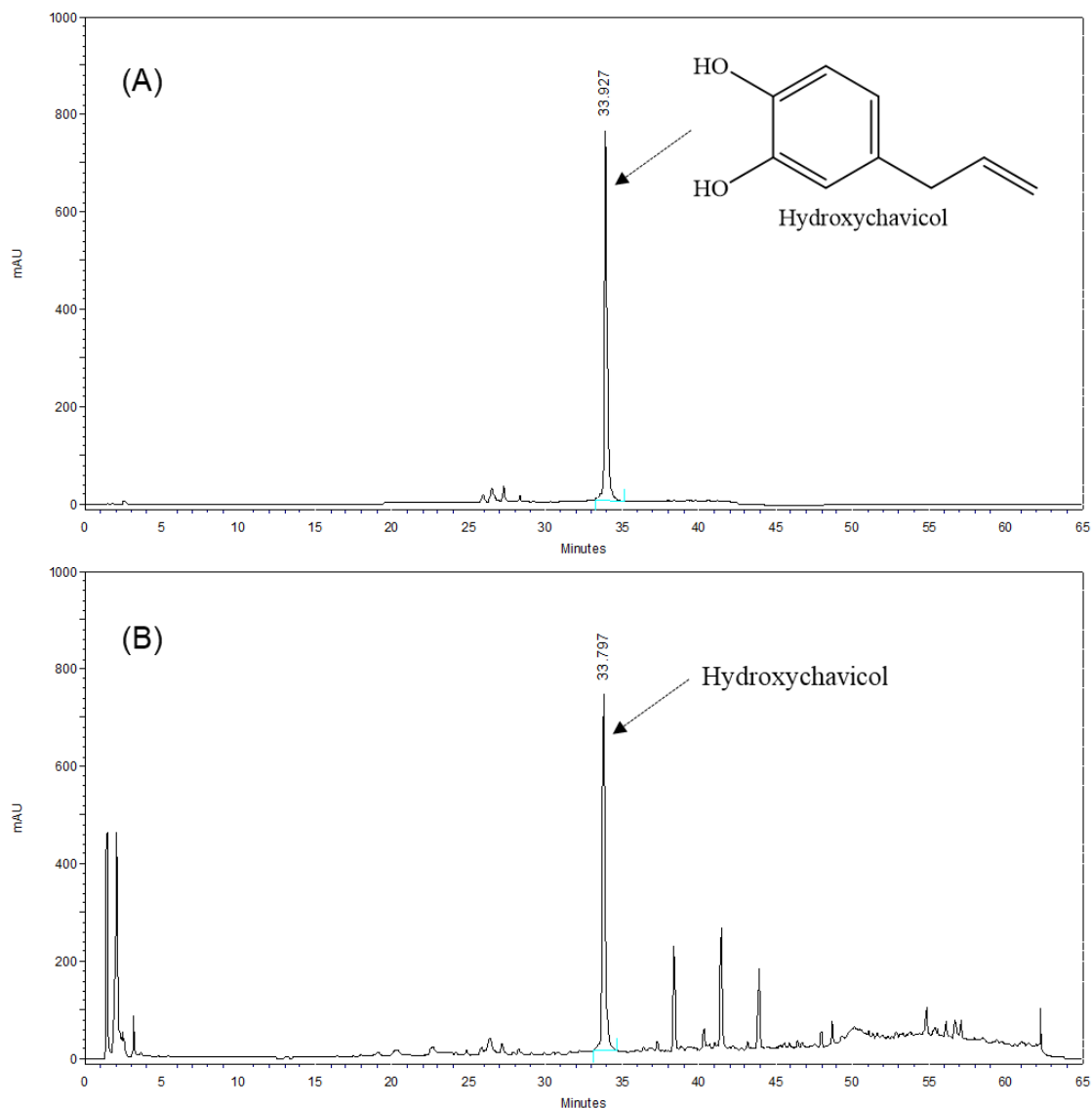
ตารางที่ 2 พารามิเตอร์สำหรับการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารไฮดรอกซีชาวิคอล

พารามิเตอร์ (Parameter)		สารไฮดรอกซีชาวิคอล (Hydroxychavicol)			
ช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity rang, µg/mL)		25-400			
ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, R ²)		0.9996			
สมการเส้นตรง (Linear regression equation)		y = 49118x – 523177			
ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ (Precision)					
ความเข้มข้นของสาร มาตรฐานตามทฤษฎี (µg/mL)	ภายในวันเดียวกัน (Intra-day, n = 3)		ระหว่างวัน (Inter-day, n = 9)		
	ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ (µg/mL)	RSD (%)	ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ (µg/mL)	RSD (%)	
50	50.53 ± 0.57	1.12	50.53 ± 0.69	1.37	
100	100.30 ± 1.28	1.27	101.14 ± 1.27	1.25	
200	201.16 ± 2.93	1.45	202.74 ± 2.87	1.42	
ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy)					
ความเข้มข้นของสาร มาตรฐานที่เติมลงไป (µg/mL)	การคืนกลับ (Recovery, %)			Mean (%)	RSD (%)
	N1	N2	N3		
50	93.93	94.31	95.07	94.44 ± 0.58	0.61
100	98.68	97.05	99.16	98.30 ± 1.11	1.12
200	100.22	102.36	99.79	100.79 ± 1.38	1.37
ปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD, µg/mL)		4.31			
ปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดของสารซึ่งเป็นที่ยอมรับได้ (LOQ, µg/mL)		13.05			

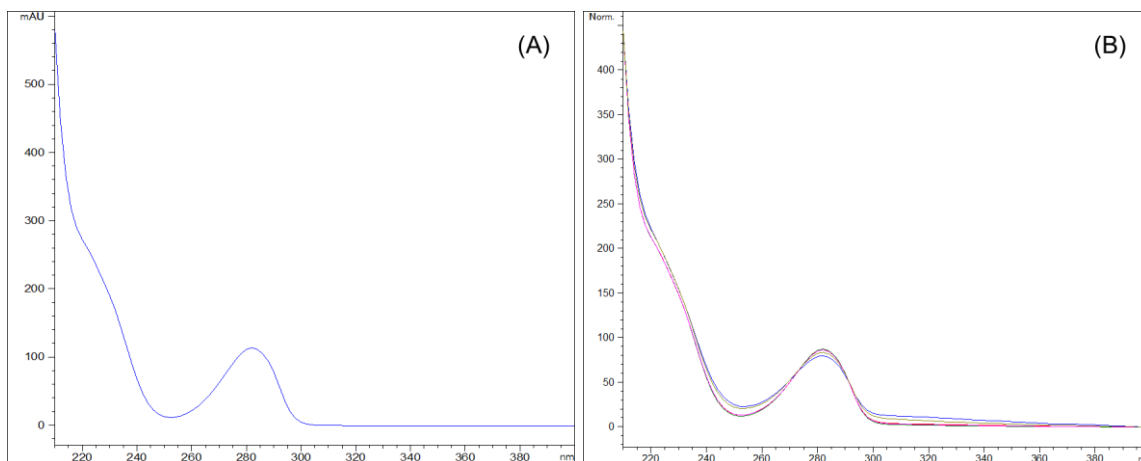
ตารางที่ 3 ปริมาณสารไฮดรอกซีชาวิคอลในสารสกัดตำรับยาแก้เรื้อนมูลนกที่เตรียมขึ้นจากการศึกษา

สารสกัด	ร้อยละของผลผลิต (% yield)	ปริมาณสารไฮดรอกซีชาวิคอล (%w/w of extract)			
		N1	N2	N3	Mean ± SD
RMN-Batch 1	5.41 ± 0.35	2.13	2.14	2.11	2.13 ± 0.02 ^a
RMN-Batch 2	6.39 ± 0.30	2.36	2.27	2.21	2.28 ± 0.08 ^b
RMN-Batch 3	6.81 ± 0.20	1.91	2.00	1.99	1.97 ± 0.05 ^c

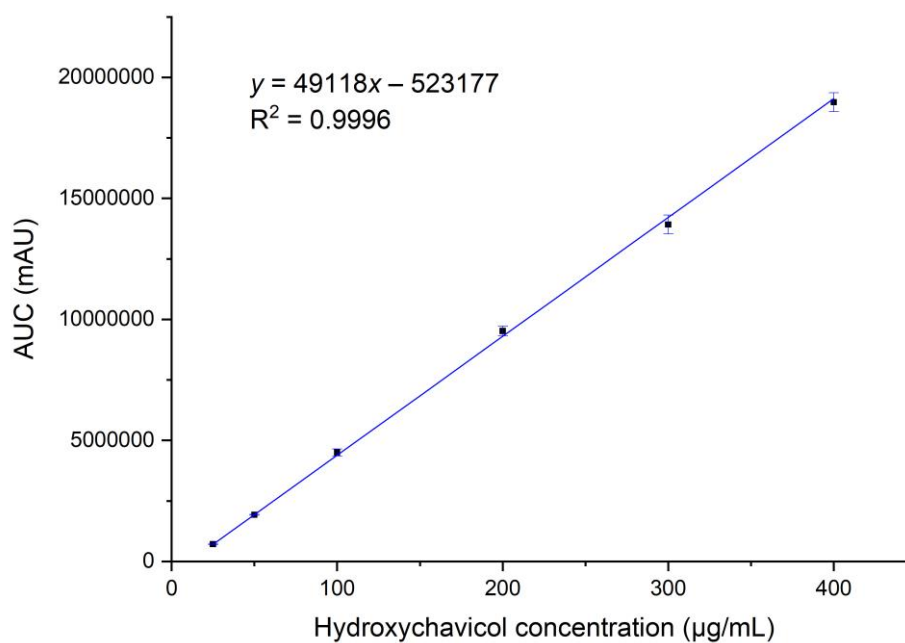
หมายเหตุ ตัวอักษร a-c แสดงค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยใช้ One-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 (p<0.05)



ภาพที่ 1 ลักษณะโครมาโทแกรมของสารมาตรฐานไฮดรอกซีชาวิคอล ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (A) และโครมาโทแกรมของสารสกัดตำรับยาแก้เรื้อนมูลนก ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (B) ที่ความยาวคลื่นอัลตราไวโอเลต 210 นาโนเมตร



ภาพที่ 2 ลักษณะ UV-spectrum ของสารมาตรฐานไฮดรอกซีชาวิคอล ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (A) เทียบกับพีคของไฮดรอกซีชาวิคอลในสารสกัดตำรับยาแก้ร้อนมุลนก ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (B)



ภาพที่ 3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานไฮดรอกซีชาวิคอล ที่ระดับความเข้มข้น 25, 50, 100, 200, 300 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรกับพื้นที่ใต้พีค