

การศึกษาปริมาณสารที่เกิดจากปฏิกิริยา ในตำรับยาประสะไพลซึ่งเตรียมในรูปแบบ ยาลูกกลอนเปรียบเทียบกับยาแคปซูล

สมนึก สุขชนาวนิช^{*,‡}, ประสาน ตั้งยืนยงวัฒนา[†]

บทคัดย่อ

การศึกษานี้เป็นการวิจัยสารที่เกิดจากปฏิกิริยา (artifacts) ในตำรับยาประสะไพลซึ่งเตรียมในรูปแบบยาลูกกลอนเปรียบเทียบกับยาแคปซูล โดยทำการเตรียมสารมาตรฐานของ สาร D (compound D), สาร 1 (Artifact 1), สาร 2 (Artifact 2) และ สาร 3 (Artifact 3) ด้วยวิธีทางเคมีสังเคราะห์ นำสารที่ได้มาพัฒนาวิธีวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ซึ่งได้วิธีวิเคราะห์ที่ดี มีความถูกต้อง และความแม่นยำสูง จากนั้นทำการเตรียมยาประสะไพล 3 รูปแบบคือ ยาแคปซูล ยาลูกกลอน น้ำผึ้งธรรมชาติ และ ยาลูกกลอนน้ำผึ้งเคี้ยว นำยาทั้งสามรูปแบบมาวิเคราะห์หาปริมาณของ สาร D สาร 1 สาร 2 และ สาร 3 ในช่วงเวลา 49 วัน พบว่ายาประสะไพลในรูปแบบยาลูกกลอนทั้งสองชนิดมีปริมาณสารที่เกิดจากปฏิกิริยาทั้ง 3 ชนิดน้อยกว่ายาแคปซูลอย่างชัดเจน โดยยาลูกกลอนน้ำผึ้งธรรมดามีปริมาณสารที่เกิดจากปฏิกิริยาน้อยกว่ายาแคปซูล 1.57 - 2.07 เท่า ยาลูกกลอนน้ำผึ้งเคี้ยวมีปริมาณสารที่เกิดจากปฏิกิริยาน้อยกว่ายาแคปซูล 1.86 - 2.60 เท่า ทั้งนี้เนื่องจากมีความชื้นในยาลูกกลอนทำให้ปฏิกิริยาเอสเทอร์ิฟิเคชัน (esterification) เกิดขึ้นได้น้อยกว่า ดังนั้นหากต้องการเลี้ยงยาประสะไพลที่มีสารที่เกิดจากปฏิกิริยาดังกล่าวในปริมาณที่สูง ซึ่งพบได้ในรูปแบบยาแคปซูล ก็ควรใช้ในรูปแบบยาลูกกลอน ซึ่งยาลูกกลอนน้ำผึ้งธรรมชาติหรือน้ำผึ้งเคี้ยวไม่มีความแตกต่างของสารที่เกิดจากปฏิกิริยาอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$)

คำสำคัญ : ประสะไพล, สารที่เกิดจากปฏิกิริยา, ยาลูกกลอน, ยาแคปซูล

ภูมิหลังและเหตุผล

ประสะไพลเป็นตำรับยาแผนโบราณที่ได้รับการบรรจุอยู่ในบัญชียาหลักแห่งชาติ โดยมีข้อบ่งใช้ เป็นยาปรับประจำเดือนในสตรีที่ประจำเดือนมาไม่

ปกติ และใช้ขับน้ำคาวปลาในสตรีหลังคลอดบุตร ในสูตรตำรับผงยา 162 กรัม ประกอบด้วยไพลหนัก 81 กรัม ผิวมะกูด วานน้ำ กระเทียม หัวหอม พริกไทย ดีปลี ขิง ขมิ้นอ้อย เทียนดำ เกลือสินเธาว์

* กองพัฒนายาแผนไทยและสมุนไพร กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดนนทบุรี 11000

† วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต จังหวัดปทุมธานี 12000

‡ ผู้รับผิดชอบบทความ: somnuekster@gmail.com

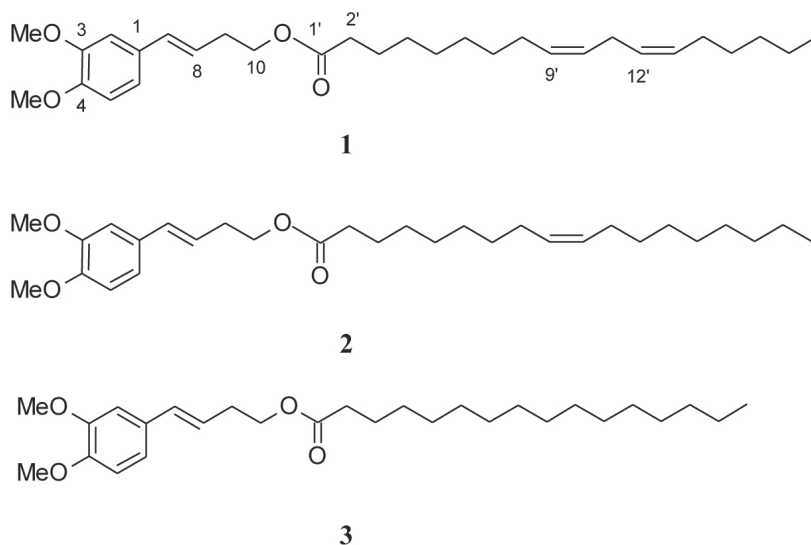
Received date 04/08/15 ■ Accepted date 23/09/15

หนักสิ่งละ 8 กรัม การบูรหนัก 1 กรัม ใช้รับประทานครั้งละ 1 กรัม วันละ 3 ครั้ง ก่อนอาหาร โดยละลายกับน้ำสุก นอกจากยาผงแล้วยังมียาในรูปแบบอื่น ๆ ได้แก่ ยาลูกกลอน ยาแคปซูล และยาเม็ด¹

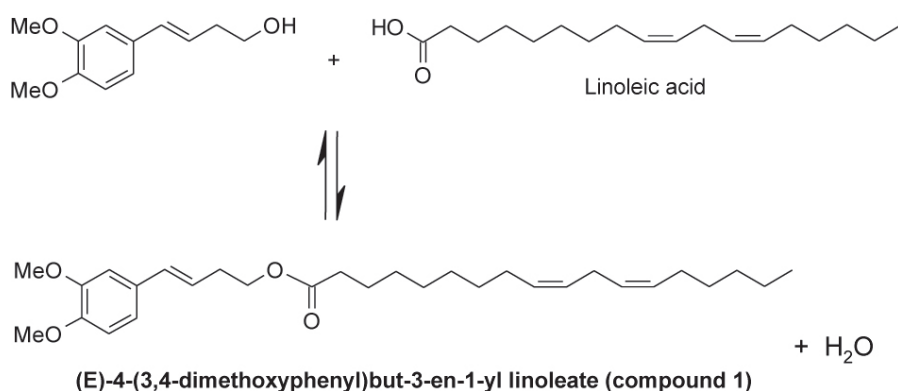
ในปี พ.ศ. 2547 Nualkaew และคณะ² ได้รายงานการค้นพบสารที่เกิดจากปฏิกิริยาในตำรับยาประสะไพล โดยพบว่ายาประสะไพลเมื่อเตรียมขึ้นและเก็บไว้เป็นระยะเวลาหนึ่ง จะพบสารที่เกิดจากปฏิกิริยาในตำรับยา 3 ชนิด สารเหล่านี้ไม่พบในสารสกัดของสมุนไพรวัดเดี่ยวใด ๆ ที่เป็นส่วนประกอบในตำรับยา โดยการใช้วิธีผสมสมุนไพรรองชนิดในตำรับยาประสะไพลเข้าด้วยกัน และทำการสกัดสารแล้วฉีดเข้าเครื่องโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) พบว่าสารทั้ง 3 ชนิดเกิดจากการผสมกันระหว่างไพลกับเทียนดำ สารทั้ง 3 ชนิดได้รับการแยกสกัดโดยวิธี semi-preparative HPLC และหาสูตรโครงสร้างทางเคมีโดยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้สูตรของสารทั้ง 3 ชนิดเป็น (E)-4-

(3,4-dimethoxyphenyl)but-3-en-1-yl linoleate [1], (E)-4-(3,4-dimethoxyphenyl)but-3-en-1-yl oleate [2] และ (E)-4-(3,4-dimethoxyphenyl)but-3-en-1-yl palmitate [3] ดังรูปที่ 1

จากการค้นพบว่าตำรับยาประสะไพลเมื่อเตรียมขึ้นและเก็บไว้เป็นระยะเวลาหนึ่ง จะปรากฏสารที่เกิดจากปฏิกิริยาในตำรับยา 3 ชนิด ในเบื้องต้นยังไม่ทราบกลไกการเกิดสารทั้งสามชนิด มีการสันนิษฐานว่าอาจจะมีเอนไซม์เป็นสารเร่ง Tangyuen-yongwatana และคณะ³ ได้ทำการทดลองพิสูจน์กลไกการเกิดสารที่เกิดจากปฏิกิริยาทั้ง 3 ชนิด โดยศึกษาปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน (esterification) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาหลักในการเกิดสารทั้ง 3 ชนิด มีน้ำเข้ามาเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา คณะผู้วิจัยได้ออกแบบการทดลองไว้ โดยการใช้น้ำเป็นสารยับยั้งการเกิดสารที่เกิดจากปฏิกิริยาดังกล่าวทั้ง 3 ชนิด ผลปรากฏว่าปริมาณน้ำที่มากกว่า 0.10 มิลลิลิตรสามารถยับยั้งการเกิดสารทั้ง 3 ชนิด ซึ่งปรากฏการณ์ดังกล่าวสามารถอธิบายได้จากปฏิกิริยาเอสเทอริฟิ-



รูปที่ 1 สาร 1 สาร 2 และ สาร 3 ที่เกิดจากปฏิกิริยาในตำรับยาประสะไพล



รูปที่ 2 ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันระหว่าง compound D กับ linoleic acid

เคชันโดยปกติจะเกิดน้ำขึ้นหนึ่งโมเลกุลดังปฏิกิริยาในรูปที่ 2 การที่จะทำให้ปฏิกิริยาเดินไปข้างหน้าในทิศทางที่จะทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ จำเป็นต้องผลักสมดุลของปฏิกิริยาโดยการดึงน้ำออกจากปฏิกิริยา หากมีการเติมน้ำในปริมาณที่มากเกินไปจนเข้าไปในระบบ จะเป็นผลทำให้ปฏิกิริยาหยุดหรือผันกลับได้ ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าน้ำในปริมาณที่มากกว่า 0.10 มิลลิลิตร สามารถหยุดปฏิกิริยาการเกิดสารทั้ง 3 ได้

Tangyuenyongwatana และคณะ⁴ ได้ทำการศึกษาปริมาณสารที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างโพลีกับเทียนดำเป็นระยะเวลา 1 ปีโดยใช้วิธี HPLC ติดตามผล การทดลองจะเก็บสารผสมระหว่างผงโพลี 1 ส่วนกับเทียนดำ 1 ส่วนไว้เป็นระยะเวลา 1 ปี โดยระหว่างนั้นได้ทำการสุ่มตัวอย่างเป็นระยะและนำมาวิเคราะห์หาปริมาณของสาร D กับสาร 1, 2 และ 3 ด้วยวิธี HPLC พบว่าในช่วง 30 วันแรกปริมาณของสาร 1, 2 และ 3 เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน และหลังจากเก็บไว้ 73 วันพบว่าปริมาณของสารทั้งสามชนิดเริ่มคงที่ หลังจากนั้นปริมาณของสารทั้งสามชนิดมีการแกว่งตัวในช่วงแคบ ๆ ซึ่งถือได้ว่าการเกิดสารทั้งสามชนิดเข้าสู่สภาวะอิ่มตัว (saturate) ผลการทดลองดังกล่าวได้สนับสนุนสมมุติฐานที่ว่าสารที่เกิด

จากปฏิกิริยาระหว่างโพลีกับเทียนดำสามารถเกิดขึ้นได้เอง โดยมีการดึงน้ำออกจากปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันโดยเนื้อเยื่อพืชที่เป็นส่วนประกอบในตำรับยา แต่เมื่อถึงจุดหนึ่งที่เกิดการอิมัตว์พวงยาไม่สามารถดูดน้ำได้อีก ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันก็จะหยุด ซึ่งจะพบได้จากปริมาณของสารทั้งสามชนิดแกว่งตัวในช่วงแคบ ๆ หลังจากระยะเวลา 73 วันจนถึง 1 ปี

อย่างไรก็ตามสารที่เกิดจากปฏิกิริยาในตำรับยาประสะโพลีทั้ง 3 ชนิด ยังไม่ทราบแน่ชัดถึงหน้าที่ของสารดังกล่าวในตำรับยา และผลต่อการรักษาโรคของสารที่เกิดขึ้นทั้งสามชนิด ซึ่งจากสูตรโครงสร้างทางเคมีดูเหมือนสารดังกล่าวมีคุณสมบัติเป็น โปรดรัก (prodrug) สามารถถูกเปลี่ยนแปลงได้เมื่อผ่านเข้าสู่ร่างกาย โดยเอนไซม์เอสเทอเรส (esterase) ที่มีส่วนใหญ่ในเลือด และที่ตับ⁵ งานวิจัยนี้ต้องการศึกษายาประสะโพลีที่เตรียมตามศาสตร์การแพทย์แผนไทยในรูปแบบยาลูกกลอนที่ใช้ผ้าฝ้ายเป็นน้ำกระสายยา โดยตั้งสมมุติฐานว่าน้ำผ้าฝ้ายสามารถยับยั้งการเกิดขึ้นของสารที่เกิดจากปฏิกิริยาทั้ง 3 ชนิดในตำรับยาประสะโพลี โดยเปรียบเทียบกับยาประสะโพลีที่อยู่ในรูปแบบยาแคปซูล

ระเบียบวิธีการศึกษา

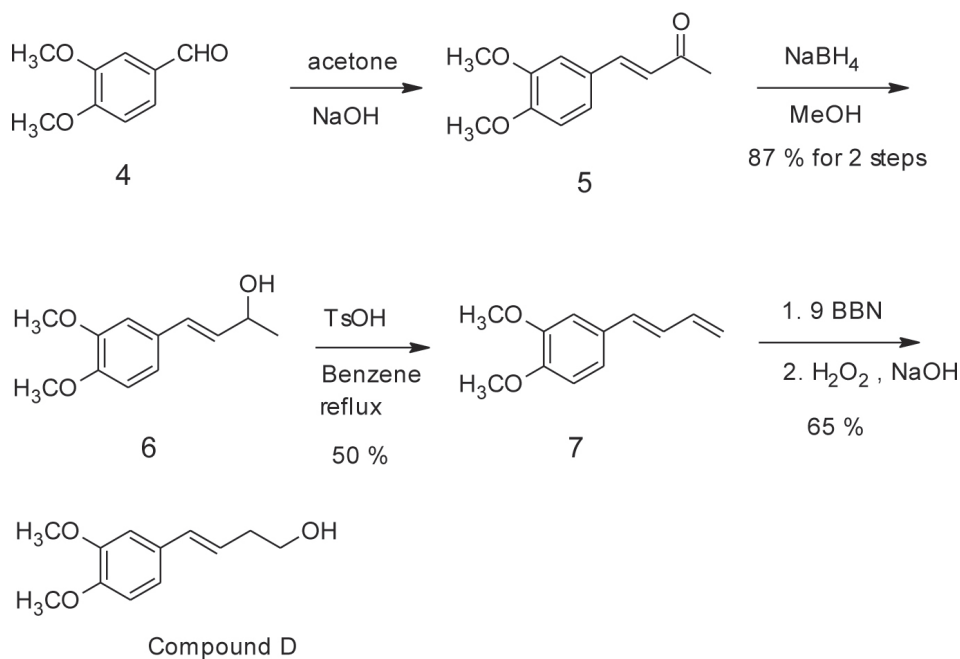
วิธีการเตรียมสาร D³

สาร D เป็นสารที่เป็นโครงสร้างหลักของสารที่เกิดจากปฏิกิริยาในตำรับยาประสะไพลทั้ง 3 ชนิด การสังเคราะห์จะใช้ 4 ขั้นตอน ดังนี้ ปฏิกิริยาแรกคือการทำปฏิกิริยา aldol condensation ระหว่าง 3,4-dimethoxybenzaldehyde กับ acetone ในต่างได้เป็นสาร enone [5] ซึ่งหมู่คีโตนจะถูกเปลี่ยนไปเป็นหมู่แอลกอฮอล์ โดย NaBH_4 ได้เป็นสาร alcohol [6] จากนั้นสาร alcohol [6] จะถูกเปลี่ยนไปเป็น diene [7] หรือสาร DMPBD โดยใช้ปฏิกิริยา dehydration ขั้นตอนสุดท้ายคือการเติมหมู่ไฮดรอกซิลลงตรงปลายของพันธะคู่ ซึ่งต้องอาศัยปฏิกิริยา hydroboration โดยใช้ 9-BBN และออกซิไดซ์ด้วย H_2O_2 ในต่าง จะทำให้ได้สาร D หรือ compound D สารละลายของ DMPBD 221 มิลลิกรัม ทำปฏิกิริยา

hydroboration-oxidation ได้สาร D 147 มิลลิกรัม (65%) ดังรูปที่ 3

วิธีการเตรียมสารที่เกิดจากปฏิกิริยาในตำรับยาประสะไพล 3 ชนิด

ในการศึกษาครั้งนี้ได้นำเอาปฏิกิริยา Steglich esterification⁶ มาใช้ในการเตรียมสารที่เกิดจากปฏิกิริยาในตำรับยาประสะไพลทั้ง 3 ชนิด โดยเป็นปฏิกิริยาที่ไม่ใช้ความร้อน ผลผลิตของปฏิกิริยามีความแน่นอนกว่าวิธี acid-catalyzed esterification โดยสาร D จะถูกนำมาทำปฏิกิริยากับ linoleic acid, oleic acid และ palmitic acid โดยมีสาร 4-dimethylaminopyridine (DMAP) (1 equivalent) และ N,N(-dicyclohexyl-carbodiimide (DCC) (1.2 equivalent) เป็นสารเร่งปฏิกิริยา และทำปฏิกิริยาใน dichloromethane เป็นเวลา 24 ชั่วโมงภายใต้บรรยากาศของก๊าซไนโตรเจนที่อุณหภูมิห้อง



รูปที่ 3 กระบวนการสังเคราะห์สาร D

การเตรียมยาประสะโพลชนิดลูกกลอน และยา ประสะโพลชนิดแคปซูล

ยาประสะโพลชนิดลูกกลอนจะถูกเตรียมขึ้น 2 แบบ คือแบบที่ใช้น้ำผึ้งธรรมชาติเป็นน้ำกระสายยา และแบบที่ใช้น้ำผึ้งที่เคี่ยวจนเหนียวเป็นน้ำกระสายยา ปั้นเป็นลูกกลอนแบบละ 100 เม็ด ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ส่วนยาประสะโพลชนิดแคปซูลได้ถูกเตรียมขึ้นจากเครื่องบรรจุแคปซูล โดยใช้แคปซูลเบอร์ 0 จำนวน 100 แคปซูล

การหาปริมาณน้ำในน้ำผึ้งที่นำมาทำยาลูก กลอน

การหาปริมาณน้ำในน้ำผึ้งจะใช้วิธีการวัดค่าดัชนีหักเห (refractive index)⁷ ที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้เครื่อง refractometer ATAGO PAL-3 โดยการอุ่นน้ำผึ้งให้เป็นของเหลวในตู้อบที่ 45 องศาเซลเซียส แล้วปล่อยให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง ทำการหยดน้ำผึ้งลงไปให้ทั่วผิวของเซลล์โดยเมื่อปิดเซลล์แล้วต้องไม่มีฟองอากาศ ปริมาณน้ำจะวัดและคำนวณอยู่ในหน่วยของร้อยละของมวล (mass percentage) การวัดจะทำซ้ำ 3 ครั้ง นำค่าทั้งหมดมาหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

สภาวะของระบบ HPLC ที่ใช้วิเคราะห์สารบ่ง ชี้ทั้ง 4 ชนิด

ในการศึกษาครั้งนี้ได้มีการใช้ HPLC conditions สำหรับทำการวิเคราะห์ปริมาณ สาร D กับสาร 1, 2 และ 3 ดังตารางที่ 1

Pump : Water 600 Controller

Column : Hypersil gold 5 ไมครอน C-18, (250 x 4.6 มิลลิเมตร)

Flow rate : 1.0 มิลลิลิตร/นาที

Detector : Water 2996 PDA ที่ 254 นาโนเมตร

Autosampler : Water 717 plus (10 ไมโครลิตร)

1. Linearity และ Range: จัดทำกราฟ มาตรฐานและกำหนดช่วงที่ใช้ในการวิเคราะห์

สมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานและค่า correlation coefficient (r^2) เป็นสมการคณิตศาสตร์ที่จะใช้ในการแปรผลการวิเคราะห์จากค่าข้อมูลพื้นที่ใต้กราฟของสารแต่ละชนิด ให้เป็นค่าความเข้มข้นของสารนั้น ๆ โดยเตรียมช่วงความเข้มข้นที่ใช้ในการจัดทำกราฟมาตรฐานของสาร D สาร 1, 2 และ 3

ตารางที่ 1 แสดง gradient elution condition

เวลา (นาที)	Flow rate (มล./นาที)	1% Acetic acid	Acetonitrile	Curve
0.01	0.80	85.00	15.00	6
8.00	1.00	70.00	30.00	6
25.00	1.00	55.00	45.00	6
30.00	1.00	50.00	50.00	6
55.00	1.00	30.00	70.00	6
80.00	1.00	15.00	85.00	6
100.00	1.00	0.00	100.00	6
105.00	1.00	85.00	15.00	6

เท่ากับ 4-470, 10-500, 4-450 และ 4-500 ppm. ตามลำดับ แล้วฉีดเข้าเครื่อง HPLC

2. Method Validation: วิเคราะห์ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

ในการทำ Method validation เป็นการทดสอบวิธีการเตรียมตัวอย่างและความถูกต้อง แม่นยำของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมา โดยมีการทำการวิเคราะห์หาค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ดังนี้

2.1 Accuracy หรือค่าความถูกต้องของการทำการวิเคราะห์ของยาตำรับประสะไพล โดยใช้การเติมสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณที่แน่นอนลงไป ในตัวอย่างสารสกัด แล้วทำการหา % recovery ของสารมาตรฐานที่เติมนั้น โดยมีรายละเอียดในขั้นตอนการวิเคราะห์ ดังต่อไปนี้

1). เตรียม Stock solution สารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิด ดังต่อไปนี้

สาร D: ชั่งสารมาตรฐาน สาร D จำนวน 24.31 มิลลิกรัม ใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร เติมเมทานอลปริมาตรพอเหมาะ นำไป sonicate ใน ultrasonic bath เป็นเวลา 15 นาที ก่อนปรับปริมาตรด้วยเมทานอลจนถึงขีดกำหนด จะได้สารละลายมาตรฐานของ สาร D ความเข้มข้น 2,431 ppm

สาร 1: ชั่งสารมาตรฐาน สาร 1 จำนวน 26.29 มิลลิกรัม ใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร เติมเมทานอลปริมาตรพอเหมาะ นำไป sonicate ใน ultrasonic bath เป็นเวลา 15 นาที ก่อนปรับปริมาตรด้วยเมทานอลจนถึงขีดกำหนด จะได้สารละลายมาตรฐาน ของสาร 1 ความเข้มข้น 2,629 ppm

สาร 2 และ 3: เตรียมในลักษณะเดียวกับ สาร 1 จะได้สารละลายมาตรฐานของ สาร 2 ความ

เข้มข้น 2,350 ppm และสารละลายมาตรฐานของสาร 3 ความเข้มข้น 2,573 ppm

2). เตรียม Stock solution ของยาประสะไพล ดังต่อไปนี้

1. ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของผงยาประสะไพล หรือยาลูกกลอนหนักเทียบเท่าผงยาประสะไพล 1.007 กรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร

2. แยกสกัดยาประสะไพลแต่ละชนิดด้วยเมทานอล จำนวน 15 มิลลิลิตร โดยนำไป sonicate ใน ultrasonic bath เป็นเวลา 15 นาที ก่อนปรับปริมาตรด้วยเมทานอลจนถึงขีดกำหนด

3). ทำการเตรียมสารเพื่อทำการวิเคราะห์ค่า accuracy ดังต่อไปนี้

3.1 ขวดที่ 1- Control reference standard: ปิเปตสารละลายมาตรฐานทั้ง 4 ชนิด ชนิดละ 1 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสารละลายให้ถึงขีดด้วยเมทานอล

3.2 ขวดที่ 2- Control sample: ปิเปต stock solution ของยาประสะไพลปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร พร้อมทั้งปิเปตเมทานอล 0.4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

3.3 ขวดที่ 3- Concentration 1: ปิเปตสารละลายมาตรฐานของ สาร D สาร 1, 2 และ 3 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร แล้วปิเปต stock solution ของยาประสะไพลปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร พร้อมทั้งปิเปตเมทานอล 0.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

3.4 ขวดที่ 4- Concentration 2: ปิเปตสารละลายมาตรฐานของ สาร D สาร 1, 2 และ 3 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร แล้วปิเปต stock solution ของยาประสะไพลปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร พร้อมทั้งปิเปต

เมทานอล 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

3.5 ขวดที่ 5- Concentration 3: ปิเปตสารละลายมาตรฐานของ สาร D สาร 1, 2 และ 3 ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร พร้อมทั้งปิเปต stock solution ของยาประสะไพลปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

กรองตัวอย่างของสารละลายที่จะทำการวิเคราะห์ด้วย nylon filter membrane ขนาด 0.45 ไมครอน ก่อนทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ค่าความเข้มข้นของสารที่ได้จากเครื่อง นำมาคำนวณค่า % recovery

2.2 Precision เป็นการตรวจสอบความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ เพื่อดูว่าผลการวิเคราะห์ที่ทำซ้ำในแต่ละครั้ง โดยการฉีดสารมาตรฐานแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นระดับกลางของ linearity จำนวน 6 ครั้งต่อเนื่องกัน เรียกว่า intra-day precision และนำสารมาตรฐานเดิมฉีดซ้ำอีก 6 ครั้งในวันต่อมา นำค่าทั้งสองวันมาคำนวณ เรียกว่า inter-day precision ค่า precision ของวิธีวิเคราะห์มักคำนวณ

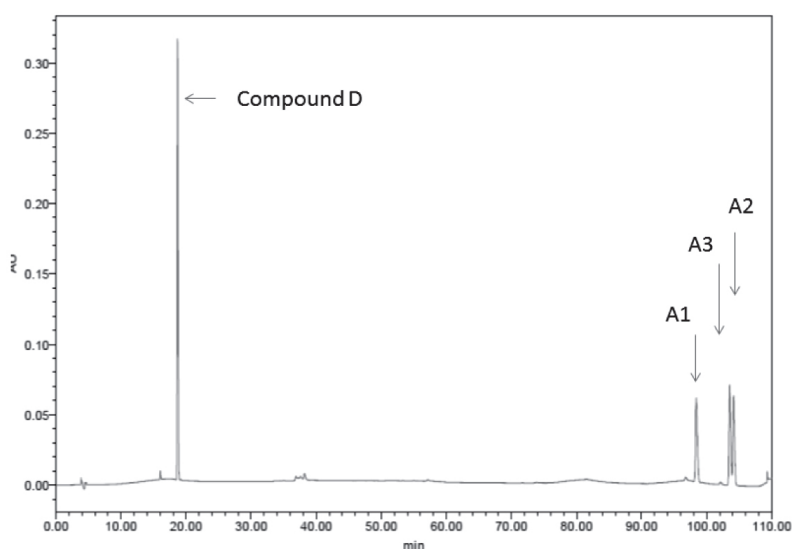
เป็นค่า relative standard deviation (RSD) ของการทำซ้ำทั้งหมด

2.3 Limit of Detection (LOD) เป็นการหาปริมาณที่ต่ำที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้จากเครื่องมือที่ใช้ ทำได้โดยเจือจางสารมาตรฐาน จนได้ค่า signal/noise ratio เท่ากับ 3: 1 Limit of Quantitation (LOQ) คือความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่วิธีวิเคราะห์สามารถตรวจวัดได้อย่างถูกต้อง ทำได้โดยเจือจางสารมาตรฐาน จนได้ค่า signal/noise ratio เท่ากับ 10 : 1

ผลการศึกษา

1. การเตรียมสารมาตรฐาน สาร D กับสาร 1, 2 และ 3

สารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ สาร D กับสาร 1, 2 และ 3 ได้จากวิธีเคมีสังเคราะห์ โดยได้ผลผลิตของสารแต่ละชนิดดังนี้ สาร D ได้ผลผลิตเท่ากับร้อยละ 28.27 โดยผ่านการสังเคราะห์ 4 ขั้นตอน สาร 1, 2 และ 3 เกิดจากปฏิกิริยา Steglich reaction



รูปที่ 4 HPLC โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน สาร D กับสาร 1(A1), 2(A2) และ 3(A3)

ได้ผลผลิตร้อยละ 62.38, 71.40 และ 65.65 ตามลำดับ โดยรายละเอียดของการทดลองและข้อมูลทางสเปกโตรสโกปีสอดคล้องกับผลการทดลองที่เคยรายงาน³

2. การหาปริมาณน้ำในน้ำผึ้งที่นำมาเตรียมยา ลูกกลอน

โดยการวัดดัชนีหักเหของน้ำผึ้ง แล้วคำนวณเป็นปริมาณของน้ำที่มีอยู่ในน้ำผึ้ง พบว่าน้ำผึ้งธรรมชาติ และน้ำผึ้งที่เคี่ยวมีปริมาณน้ำเท่ากับร้อยละ 20.67 ± 0.06 และ 19.33 ± 0.06 ตามลำดับ

3. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ สาร D กับ สาร 1, 2 และ 3 ได้ HPLC โครมาโทแกรมดังรูปที่ 4 และได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

3.1 Linearity และ Range: จัดทำกราฟมาตรฐานและกำหนดช่วงที่ใช้ในการวิเคราะห์

สมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานและค่า correlation coefficient (r^2) มีความสำคัญต่อการทำการวิเคราะห์ปริมาณ เนื่องจากเป็นสมการคณิตศาสตร์ที่จะใช้ในการแปลงผลการวิเคราะห์จากค่าข้อมูลพื้นที่

ใต้กราฟของสารแต่ละชนิด ให้เป็นค่าความเข้มข้นของสารนั้น ๆ จากสมการเส้นตรงของสารมาตรฐาน ทั้งสี่ชนิดพบว่า ค่า r^2 ของสารมาตรฐาน สาร D กับ สาร 1, 2 และ 3 มีค่าเท่ากับ 0.9999 ดังตารางที่ 2 ซึ่งถือว่าเป็นค่าที่ดี มีความแม่นยำสูงทั้งที่ความเข้มข้นต่ำและความเข้มข้นสูง

3.2 Accuracy ค่าความถูกต้องของการทำการวิเคราะห์ของยาตำรับประสะไพล โดยการใช้การเติมสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณที่แน่นอนลงไปในตัวอยางสารสกัด แล้วทำการหา % recovery ของสารมาตรฐานที่เติมนั้น ค่าความเข้มข้นของสารที่ได้จากเครื่อง นำมาคำนวณค่า % recovery โดยใช้สูตร

$$\% \text{ recovery} = (C_C - C_A) / C_A^* \times 100$$

โดยที่ C_C = ความเข้มข้นที่วัดได้ของตัวอย่าง ที่ผ่านการ spike แล้ว

C_A = ความเข้มข้นที่วัดได้ของตัวอย่าง ที่ไม่ได้ทำการ spike

C_A^* = ความเข้มข้นของสารที่เป็น spike

ตารางที่ 2 สรุปค่า linearity ของสาร D กับสาร 1, 2 และ 3

สาร	สมการเส้นตรง	สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2)	Range (ppm.)
สาร D	$y = 3E-05x - 0.2481$	0.9999	4 - 470
สาร 1	$y = 9E-05x + 1.2786$	0.9999	10 - 500
สาร 2	$y = 7E-05x - 0.0258$	0.9999	4 - 450
สาร 3	$y = 9E-05x + 0.1825$	0.9999	4 - 500

ตารางที่ 3 ค่า %recovery ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ (low)

สารมาตรฐาน	Control sample (ppm)	Add (ppm)	Found (ความเข้มข้นที่วัดได้) (ppm)	(%recovery)
สาร D	130.12	35.00	165.55	101.23
สาร 1	142.57	37.50	180.82	102.00
สาร 2	32.64	33.50	66.09	99.85
สาร 3	60.39	36.75	96.62	98.58

ตารางที่ 4 ค่า %recovery ที่ระดับความเข้มข้นปานกลาง (mid)

สารมาตรฐาน	Control sample (ppm)	Add (ppm)	Found (ความเข้มข้นที่วัดได้) (ppm)	(%recovery)
สาร D	130.12	70.00	199.74	99.46
สาร 1	142.57	75.00	216.35	98.37
สาร 2	32.64	67.00	99.43	99.69
สาร 3	60.39	73.5	133.81	99.89

ตารางที่ 5 ค่า %recovery ที่ระดับความเข้มข้นสูง (high)

สารมาตรฐาน	Control sample (ppm)	Add (ppm)	Found (ความเข้มข้น ที่วัดได้) (ppm)	(%recovery)
สาร D	130.12	140.00	268.33	98.72
สาร 1	142.57	150.00	290.39	98.55
สาร 2	32.64	134.00	165.89	99.44
สาร 3	60.39	147.00	205.98	99.04

จากผล % recovery ที่ได้ พบว่าสารทั้ง 4 ชนิด
มีค่าตามช่วงต่อไปนี้

สาร D มีค่า % recovery ในช่วง 98.72-
101.23%

สาร 1 มีค่า % recovery ในช่วง 98.37-
102%

สาร 2 มีค่า % recovery ในช่วง 99.44-
99.85%

และ สาร 3 มีค่า % recovery ในช่วง 98.58-
99.89%

3.3 Precision ผลการวิเคราะห์ค่า precision ของสารมาตรฐาน สาร D กับสาร 1, 2 และ 3 แสดงดังตารางที่ 6

3.4 Limit of Quantitation (LOQ) ค่าขีดจำกัดของการวิเคราะห์ และ Limit of Detection (LOD) ขีดจำกัดของการวัด หาได้จากช่วงความเข้ม

ตารางที่ 6 ค่า precision (%RSD)

สาร	Precisions (%RSD)	
	Intra-day	Inter-day
สาร D	0.121	0.173
สาร 1	0.245	0.369
สาร 2	0.195	0.332
สาร 3	0.160	0.252

ตารางที่ 7 ค่า LOQ และ LOD ของการวิเคราะห์

สาร	ขีดจำกัดของ การวิเคราะห์ (LOQ) (ppm.)	ขีดจำกัด ของการวัด (LOD) (ppm.)
สาร D	4	1.2
สาร 1	10	3.3
สาร 2	4	1.2
สาร 3	4	1.2

ชั้นของการวิเคราะห์ที่สอดคล้องกับค่า signal/noise ratio (3:1) และ (10:1) ตามลำดับ ดังตารางที่ 7

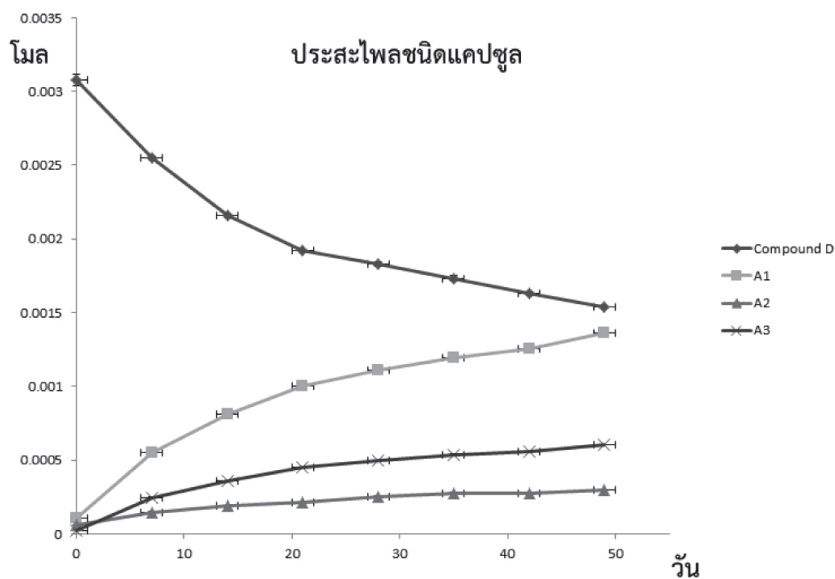
4. ผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร D กับสาร 1, 2 และ 3 ในยาตำรับประสะไพลชนิดแคปซูล และ ลูกกลอนเป็นระยะเวลา 49 วัน

จากผลการทดลองและภาพกราฟแสดงปริมาณสารทั้ง 4 ชนิด คือ สาร D กับสาร 1, 2 และ 3 การพลอตกราฟไม่ได้นำค่าน้ำหนักปริมาณของสารมาใช้ เนื่องจากอาจทำให้ขาดความชัดเจนของการเกิดสารที่เกิดจากปฏิกิริยา เนื่องจากน้ำหนักโมเลกุลของสารแต่ละชนิดแตกต่างกัน โดย สาร D มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 208 สาร 1, 2 และ 3 มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 470, 472 และ 446 ตามลำดับ ดังนั้นหากคำนวณในรูปโมลของสารแทนที่การใช้ น้ำหนัก จะทำให้ได้กราฟที่เห็นความแตกต่างได้ชัดเจนขึ้น ดังรูปที่ 5 - 7 จะพบว่ารูปแบบยาแคปซูลมีการลดลงของปริมาณสาร D อย่างรวดเร็ว แต่ปริมาณของสารที่เกิดจากปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นสวนทางกัน โดยเฉพาะ สาร

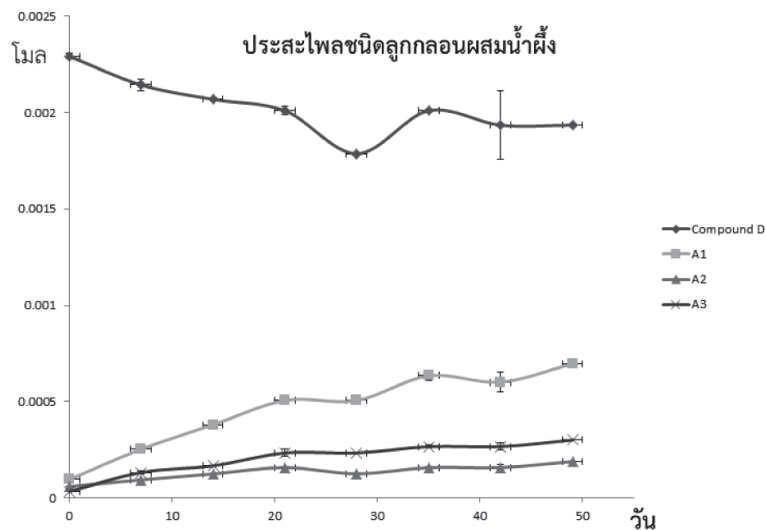
1 ในช่วง 3 สัปดาห์แรก ในขณะที่ยาประสะไพลชนิดลูกกลอนที่เตรียมโดยใช้น้ำผึ้งธรรมชาติเป็นน้ำกระสายยา และแบบผ่านกระบวนการเคี้ยวเอาน้ำ ออกบางส่วน มีการลดลงของสาร D น้อยกว่า และปริมาณสาร 1, 2 และ 3 เพิ่มขึ้นปริมาณไม่มาก

อภิปรายผล

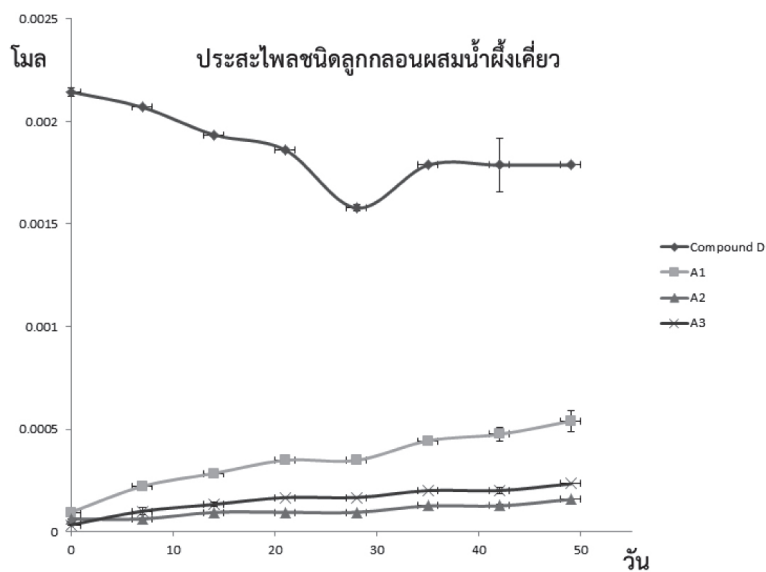
จะเห็นได้ว่าการลดลงของจำนวนโมลของสาร D สอดคล้องและใกล้เคียงกับการเกิดขึ้นของสารที่เกิดจากปฏิกิริยาทั้ง 3 ชนิด ในขณะที่ยาประสะไพลชนิดลูกกลอนที่เตรียมโดยใช้น้ำผึ้งธรรมชาติเป็นน้ำกระสายยาก็มีการลดลงของจำนวนโมลของสาร D และการเกิดของสารที่เกิดจากปฏิกิริยาทั้ง 3 ชนิด น้อยกว่าชนิดแคปซูลอย่างเห็นได้ชัด สำหรับยาประสะไพลชนิดลูกกลอนที่เตรียมโดยใช้น้ำผึ้งที่ผ่านกระบวนการเคี้ยวเอาน้ำออกบางส่วนเป็นน้ำกระสายยา ก็มีแนวโน้มการเกิดสารที่เกิดจากปฏิกิริยาทั้ง 3 ชนิดใกล้เคียงกับชนิดที่ใช้น้ำผึ้งธรรมชาติ โดยปกติ



รูปที่ 5 ปริมาณของสาร D สาร 1, 2 และ 3 ของยาประสะไพลชนิดแคปซูล



รูปที่ 6 ปริมาณของสาร D สาร 1, 2 และ 3 ของยาประสะไพลชนิดลูกกลอนน้ำผึ้งธรรมดา



รูปที่ 7 ปริมาณของสาร D สาร 1, 2 และ 3 ของยาประสะไพลชนิดลูกกลอนน้ำผึ้งเคี้ยว

น้ำผึ้งจะมีปริมาณน้ำไม่แน่นอน ขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำผึ้ง อุณหภูมิ น้ำที่มีอยู่เดิมในน้ำผึ้งและความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ โดยทั่วไปน้ำผึ้งจะมีน้ำอยู่ไม่เกิน 21% โดยน้ำหนัก⁸ น้ำผึ้งที่ใช้ในการทดลองนี้มีปริมาณน้ำที่ใกล้เคียงกันมาก โดยน้ำผึ้งที่ผ่านการเคี้ยวจะมี

ปริมาณน้ำต่ำกว่าเล็กน้อย การที่ยาประสะไพลในรูปแบบยาลูกกลอนยังเกิดสารที่เกิดจากปฏิกิริยาทั้ง 3 ชนิด น่าจะมาจากน้ำที่มีอยู่ในน้ำผึ้งอาจถูกน้ำตาลจับอยู่ทำให้น้ำไม่ได้อยู่ในรูปอิสระทั้งหมด จึงไม่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันได้สมบูรณ์

ตารางที่ 8 ปริมาณของสารที่เกิดจากปฏิกิริยาในยาลูกกลอน ณ วันที่ 49

ยาลูกกลอนประสะไพล	ปริมาณสาร 1	ปริมาณสาร 2	ปริมาณสาร 3
แบบน้ำผึ้งธรรมดา	น้อยกว่าแบบแคปซูล 2 เท่า	น้อยกว่าแบบแคปซูล 1.57 เท่า	น้อยกว่าแบบแคปซูล 2.07 เท่า
แบบน้ำผึ้งเคี้ยว	น้อยกว่าแบบแคปซูล 2.56 เท่า	น้อยกว่าแบบแคปซูล 1.89 เท่า	น้อยกว่าแบบแคปซูล 2.60 เท่า

ดังนั้น ยาประสะไพลชนิดลูกกลอนที่เตรียมโดยใช้น้ำผึ้งเป็นน้ำกระสายยาไม่ว่าจะเป็นแบบธรรมดา หรือแบบเคี้ยวเอาน้ำออกบางส่วน ต่างก็เกิดสารที่เกิดจากปฏิกิริยา โดยปริมาณสารที่เกิดจากปฏิกิริยาทั้ง 3 ชนิดน้อยกว่ายาประสะไพลชนิดแคปซูล เนื่องจากมีน้ำอยู่ในยาลูกกลอนทำให้ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันเกิดขึ้นได้น้อยกว่า ถ้าคิดเป็นจำนวนเท่าของโมลของสาร 1 ชนิดที่เกิดขึ้นในแบบน้ำผึ้งธรรมดามีปริมาณน้อยกว่าแบบแคปซูล 2 เท่า ณ วันที่ 49 ของการทดลอง ส่วนสาร 2 และสาร 3 นั้น ชนิดที่เกิดขึ้นในแบบน้ำผึ้งธรรมดามีปริมาณน้อยกว่าแบบแคปซูล 1.57 เท่า และ 2.07 เท่าตามลำดับ ณ วันที่ 49

สำหรับแบบน้ำผึ้งเคี้ยวเอาน้ำออกบางส่วน มีสาร 1 ปริมาณน้อยกว่าแบบแคปซูล 2.56 เท่า ณ วันที่ 49 สาร 2 และ สาร 3 มีปริมาณน้อยกว่าแบบแคปซูล 1.89 เท่า และ 2.60 เท่าตามลำดับ ณ วันที่ 49 ดังตารางที่ 8

เมื่อนำค่าการเกิดสาร 1, 2 และ 3 มาหาความแตกต่างระหว่างยาประสะไพลชนิดลูกกลอนแบบน้ำผึ้งธรรมดา กับแบบน้ำผึ้งเคี้ยวโดยใช้ Pearson's correlation พบว่าปริมาณของสารที่เกิดจากปฏิกิริยาทั้ง 3 ชนิดในช่วง 49 วันไม่มีความแตกต่างกัน โดยยาลูกกลอนประสะไพลแบบน้ำผึ้งธรรมดา กับแบบน้ำผึ้งเคี้ยวจะมีค่าสหสัมพันธ์อยู่ในเกณฑ์ที่ดีมาก คือ สาร 1 จะมีค่า Pearson's correlation coefficient (r) = 0.981 ($N = 8$, $p < 0.01$), สาร 2 จะมีค่า (r) = 0.820

($N = 8$, $p < 0.05$) และ สาร 3 จะมีค่า (r) = 0.998 ($N = 8$, $p < 0.01$)

ข้อสรุป

การศึกษาสารที่เกิดจากปฏิกิริยาในตำรับยาประสะไพลซึ่งเตรียมในรูปแบบยาลูกกลอนเปรียบเทียบกับยาแคปซูลในช่วงเวลา 49 วัน พบว่ายาลูกกลอนประสะไพลทั้งสองแบบมีปริมาณสารที่เกิดจากปฏิกิริยาทั้ง 3 ชนิดเกิดขึ้นน้อยกว่ายาแคปซูลอย่างชัดเจน โดยยาลูกกลอนน้ำผึ้งธรรมดามีสารที่เกิดจากปฏิกิริยาเกิดขึ้นน้อยกว่ายาแคปซูล 1.57 - 2.07 เท่า ยาลูกกลอนน้ำผึ้งเคี้ยวมีสารที่เกิดจากปฏิกิริยาเกิดขึ้นน้อยกว่ายาแคปซูล 1.86 - 2.60 เท่า ปัจจัยที่ทำให้เกิดปรากฏการณ์นี้น่าจะเกิดเนื่องจากมีน้ำอยู่ในยาลูกกลอนที่มีน้ำผึ้งผสมอยู่ ทำให้ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันเกิดขึ้นได้น้อยกว่า ดังนั้น การใช้ยาประสะไพลในรูปแบบยาลูกกลอนจะทำให้ได้รับสารที่เกิดจากปฏิกิริยาน้อยกว่ารูปแบบยาแคปซูล

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากกรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก

เอกสารอ้างอิง

1. บัญชียาหลักแห่งชาติ 2556. ประกาศคณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ เรื่อง บัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2556, ราชกิจจานุเบกษา ลงวันที่ 30 กันยายน 2556.

2. Nualkaew S, Gritsanapan W, Petereit F, Nahrstedt A. New fatty acid esters originate during storage by the interaction of components in Prasaplai, a Thai traditional medicine. *Planta Medica*. 2004;70:1243-6.
3. Tangyuenyongwatana P, Gritsanapan. Mechanism evaluation of artifacts formation in Prasaplai preparation, a Thai traditional medicine. *Planta Medica*. 2008;74:1403-5.
4. Tangyuenyongwatana P, Gritsanapan W. Quantitative analysis and toxicities determination of artifacts originated in a Thai traditional medicine Prasaplai. *Pharmaceutical Biology*. 2010;48(5):584-8.
5. Tangyuenyongwatana P, Gritsanapan W, Kowapradit J, Opanasopit P. Cellular transport of anti-inflammatory pro-drugs originated from a herbal formulation of *Zingiber cassumunar* and *Nigella sativa*. *Chinese Medicine*. 2009;4:19.
6. Neises B, Steglich W. Simple method for the esterification of carboxylic acids. *Angewandte Chemie International Edition*. 1978;17:522-4.
7. Abramovič H, Jamnik M, Burkan L, Kač M. Water activity and water content in Slovenian honeys. *Food Control*. 2008;19:1086-90.
8. Flamini C, Morlot M, Lheretier J, Borneck R, Marioleas P, Tsigouri A, et al. Honey quality, method of analysis and international regulatory standards: Review of the work of the international honey commission. *Swiss Bee Research Centre*. 2000;5:1-15.

Abstract

A Quantitative Study on Artifacts Occurring in Prasa-Plai Preparation in the Pill and Capsule Forms

Somnuek Suchaitanawanich^{*,‡}, Prasan Tangyuenyongwatana[†]

^{*}Herb and Thai Traditional Medicine Division, Department of Thai Traditional and Complementary Medicine, Ministry of Public Health, Nonthaburi 11000

[†]College of Oriental Medicine, Rangsit University, Pathumthani 12000

[‡]Corresponding author: somnuekster@gmail.com

This study aimed to compare the amounts of artifacts that occurred in two Prasa-Plai (Thai traditional medicine for dysmenorrhea) preparations: pill form and capsule form. Four reference standard compounds (Compound D, Artifact 1, Artifact 2, and Artifact 3) were synthesized using a chemical method. And, based on the four compounds, a quantitative analysis method with a high level of accuracy and precision was developed using high performance liquid chromatography (HPLC). Three dosage forms of Prasa-Plai were prepared: capsule form, pill with honey form and pill with simmered honey form. In 49 days, the drugs in all three forms were analyzed. It was found that the amounts of artifacts of Prasa-Plai in pill with honey and pill with simmered honey forms were 1.57-2.07 times and 1.86-2.60 times, respectively, less than that in the capsule form, because the humidity in the pill forms could slow down the esterification reaction. There was no significant difference in the amounts of artifacts in the pill with honey and the pill with simmered honey forms ($p < 0.01$). Thus, to avoid a higher amount of artifacts in Prasa-Plai with unknown activities, one should use the pill form either with honey or simmered honey.

Key words: Prasa-Plai, artifacts, pill, capsule