

ผลของระยะเวลาการเก็บรักษา ต่อปริมาณสารไซรินจินในยาต้มบอระเพ็ด

รณชัย ภูวนานา^{*,†}, ชาทิตย์ ศิริสวัสดิ์^{*}, สันฐ มิ่งแนม^{*}, วิวัฒน์ ศรีวิชา^{*}, จตุพร ประทุมเทศ^{*},
ทัศนิกา แก้วสูงเนิน^{*}, นฤวัตร รักดี^{*}

^{*}สาขาวิชาการแพทย์แผนไทย, คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร
จังหวัดสกลนคร 47160

[†]ผู้รับผิดชอบบทความ: Ronnachai_p1@outlook.com

บทคัดย่อ

ดำรับยารักษาเบาหวานของโรงพยาบาลการแพทย์แผนไทยสกลนคร หลวงปู่แป๊ะ สุภัทโท อยู่ในรูปแบบยาต้มบอระเพ็ดเป็นสมุนไพรที่เป็นส่วนประกอบหลัก โดยเถาบอระเพ็ดมีสารไซรินจินเป็นสารออกฤทธิ์สำคัญในการลดระดับน้ำตาลในเลือด แต่ในทางปฏิบัติผู้ป่วยต้องดื่มยาใหม่ทุกวัน ทำให้ไม่สะดวก และอาจมีผลต่อความร่วมมือในการรักษาของผู้ป่วย การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาความคงตัวของยาต้มบอระเพ็ดในรูปแบบยาต้มพร้อมดื่มโดยวัดปริมาณสารไซรินจิน วิธีดำเนินการ สกัดบอระเพ็ดด้วยการต้ม 15 นาที และหาปริมาณสารสำคัญด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง และโครมาโตกราฟีแบบสมรรถนะสูง หลังจากเก็บ ที่เวลา 0, 1, 24, 72 และ 120 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ผลการศึกษาพบว่า สารไซรินจินจากสารสกัดเถาบอระเพ็ด มีปริมาณไซรินจิน ในเถาบอระเพ็ด ที่ระยะการเก็บเวลา 0, 1, 24, 72 และ 120 ชั่วโมง 1.35 ± 0.01 , 1.35 ± 0.02 , 1.36 ± 0.02 , 1.27 ± 0.03 และ 1.24 ± 0.01 percent โดยการเก็บยาที่ 72 ชั่วโมงขึ้นไป มีแนวโน้มที่ปริมาณสารลดลง ข้อเสนอแนะการเก็บยาต้มบอระเพ็ดตั้งแต่ 3 วัน ขึ้นไป มีผลให้ปริมาณ ไซรินจินมีแนวโน้มลดลง

คำสำคัญ: บอระเพ็ด, ไซรินจิน, ยาต้มสมุนไพร

Effect of Storage Times on the Syringin Contents in *Tinospora crispa* (L.) Miers ex Hook.f. & Thomson Decoction.

Ronnachai Poowanna^{*,‡}, Chatit Sirisawat*, Sinthoo Mingnan*, Wiwat Sriwicha*, Jatuporn Prathumtet*, Thanthika Kaewsoongnern*, Naruwat Pakdee*

^{*}Faculty of Natural Resources, Rajamangala University of Technology ISAN Sakonnakorn Campus, Sakonnakorn 47160, Thailand

[‡]Corresponding author: Ronnachai_p1@outlook.com

Abstract

Antidiabetic herbal decoction with bora-phet vine or *Tinospora crispa* as a major component is used at Sakon Nakhon Thai Traditional Medicine (Luang Pu Fab Supatto) Hospital as bora-phet vine has syringin as an active ingredient for blood sugar reduction. In practice, boiling the preparation every day may cause inconvenience and will lead to noncompliance of the patients. This study's objective was to investigate the stability of *Tinospora crispa* extract in ready-to-drink formulation by measuring the amount of syringin. Methodology: *T. crispa* was boiled in water for 15 minutes and then the TLC and TLC densitometer were used to determine the amounts of syringin under 5 storage times of 0, 1, 24, 72 and 120 hours at 4°C. Results: The proportions of syringin under storage time at 0, 1, 24, 72 and 120 hr were 1.35 ± 0.01 , 1.35 ± 0.02 , 1.36 ± 0.02 , 1.27 ± 0.03 and 1.24 ± 0.01 percent, respectively. The amount of syringin bora-phet vine reduced significantly after 72 hours or more of storage. It is thus concluded that bora-phet concoction with storage time of 3 days or more results in a drop in syringin content.

Key words: *T. crispa* (L.) Miers ex Hook.f. & Thomson, syringin, herbal decoction

บทนำ

บอระเพ็ด (*Tinospora crispa* (L.) Miers ex Hook.f. & Thomson วงศ์ Menispermaceae เป็นสมุนไพรที่มีการใช้ทางการแพทย์แผนไทย และการแพทย์แบบพื้นบ้าน มีสรรพคุณ แก้ มีรสขมจัด เย็น แก้ไข้ทุกชนิด แก้พิษฝีดาษ เป็นยาขมเจริญอาหาร ต้มดื่มเพื่อให้เจริญอาหาร ช่วยย่อย บำรุงน้ำดี บำรุง ไฟธาตุ^[1] และจากการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา พบว่ามีฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*^[2] ต้านอนุมูลอิสระ^[3] ฤทธิ์ลดน้ำตาล ในเลือด^[4,5] โดยมีสาร Syringin ซึ่งเป็นสารกลุ่ม

ไกลโคไซด์ ที่สามารถป้องกันการเสียหายของเซลล์ ประสาท ด้านมะเร็ง ด้านเบาหวาน ด้านการอักเสบ รักษาโรคข้อเสื่อม และป้องกันอาการแพ้ได้^[6] นอกจากนี้ บอระเพ็ดยังเป็นสมุนไพรที่เป็นส่วน ประกอบในตำรับยาเบาหวานหลายตำรับ โดยวิธีการ ประยุกต์ส่วนใหญ่จะการใช้การต้มให้ผู้ป่วย^[7] แต่อาจจะ มีคำถามจากแพทย์ว่าผู้ป่วยได้รับปริมาณยาครบถ้วน หรือไม่ เนื่องจากการใช้ชีวิตประจำวันที่ได้รับแรงผู้ป่วย ส่วนใหญ่ไม่สะดวกในการต้มยาสมุนไพรทุกวัน จึง ทำการศึกษาผลของระยะเวลาในการเก็บต่อปริมาณ สารไซริงจิน (syringin, SG) เพื่อเปรียบเทียบปริมาณ SG

ที่เก็บที่ระยะเวลาแตกต่างกัน โดยทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) เพื่อตรวจสอบสารสำคัญเชิงคุณภาพ และวิธี Thin Layer Chromatography Densitometer (TLC Densitometer) เพื่อตรวจหาสารสำคัญเชิงปริมาณ เพื่อศึกษาผลของระยะเวลาในการเก็บยาต้มสมุนไพรต่อปริมาณ syringin และเป็นข้อมูลสำคัญในการพัฒนาตำรับพร้อมดื่มให้มีมาตรฐานต่อไปในอนาคต

ระเบียบวิธีศึกษา

วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

1. แผ่น TLC
2. TLC Densitometer CAMAG (TLC Scanner 3)
3. TLC scanner-CAMAG Linomat 5
4. Chloroform liquid chromatography grade (Pkc Instruments, ขอนแก่น)
5. Methanol liquid chromatography grade (Pkc Instruments, ขอนแก่น)
6. บอระเพ็ด
7. สารมาตรฐาน syringin (sigma)

วิธีการศึกษา เป็นการศึกษาเชิงทดลองมีขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียมสารสกัดสมุนไพรบอระเพ็ด โดยใช้บอระเพ็ดจากโรงพยาบาลการแพทย์แผนไทยหลวงปู่แฟ้ม สุภโท มาทำความสะอาด และนำเอามาสับเป็นชิ้นแบบหยาบขนาด 3 เซนติเมตร อบที่อุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียสใช้เวลา 3 วัน และบดให้เป็นผงละเอียด จากนั้นชั่งผงบอระเพ็ด 100 กรัม ใส่ผ้าขาวบางใส่หม้อยาต้มสมุนไพร ผสมกับน้ำ 1,000 มิลลิลิตร ตั้งอุณหภูมิที่ 100 องศาเซลเซียส 15 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนด ตั้งทิ้งไว้จนอุ่น แล้ว

กรองด้วยสำลี และเตรียมตัวอย่าง 4 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างที่ได้หลังจากการต้มแล้วเก็บไว้ 0, 1, 24, 72 และ 120 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ

2. การทำสารสกัดหยาบให้เข้มข้นโดยนำยาต้มมาระเหยเพื่อเอาตัวทำละลายออก โดยการใช้ความเย็น ด้วยการระเหิดแห้ง ด้วยเครื่อง freeze dryer รุ่น free zone ยี่ห้อ Labconco® ที่อุณหภูมิ -100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นซึ่งสารที่เหลือจากการระเหยเพื่อนำไปคำนวณหาปริมาณสารสกัดหยาบ และเก็บสารสกัดจากบอระเพ็ดที่ได้จากการระเหยแห้งไว้ที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3. การวิเคราะห์ลักษณะทางโครมาโตกราฟี

3.1 Thin Layer chromatography (TLC)

เตรียมแผ่น TLC (Siliga gel 60 F254 Aluminium Sheet) ขนาด 20x20 เซนติเมตร โดยตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ ได้แก่ คลอโรฟอร์ม และเมทานอล อัตราส่วน 8:2 จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ และสารมาตรฐาน คือ SG จุดลงบนแผ่น TLC รอให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วจุ่มลงใน TLC tank ที่เตรียมไว้ รอจนสารเคลื่อนที่ไปจนถึงจุดสิ้นสุดที่กำหนดไว้ แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องรังสีอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร แล้วคำนวณหาค่าระยะทางที่สารเคลื่อนที่ได้ หรือ retention factor (R_f) เพื่อตรวจสอบหาสาร SG ในสารสกัดบอระเพ็ด

3.2 Thin layer chromatography Densitometer (TLC Densitometer)

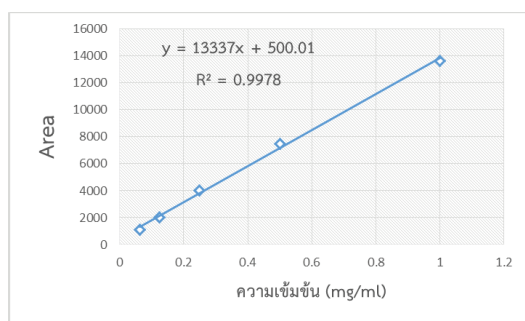
(1) เตรียมสารมาตรฐาน SG ที่ความเข้มข้น 1, 0.5, 0.25, 0.125 และ 0.0625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยละลายในน้ำปราศจากไอออน จากนั้น ฉีดสาร

ลงบนแผ่น TLC ด้วยเครื่อง Sample application-CAMAG Linomat 5 แล้วจุ่มลงใน TLC tank ที่เตรียมไว้ รอจนสารเคลื่อนที่ไปจนถึงจุดสิ้นสุด แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง TLC scanner-CAMAG Linomat 5 เพื่อหาพื้นที่ใต้กราฟ และสร้างกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 1)

(2) เตรียมสารสกัดสมุนไพรบอระเพ็ด ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน จากนั้น ฉีดลงบนแผ่น TLC นำไปจุ่มลงใน TLC Tank ที่เตรียมไว้ และตรวจหาปริมาณสารด้วยเครื่อง TLC scanner-CAMAG Linomat 5 ด้วยการนำพื้นที่ใต้กราฟแทนในสูตรของกราฟมาตรฐาน และเพื่อหาปริมาณ SG ที่พบในสารสกัดบอระเพ็ด และวิเคราะห์ทางสถิติด้วย ANOVA

ผลการศึกษา

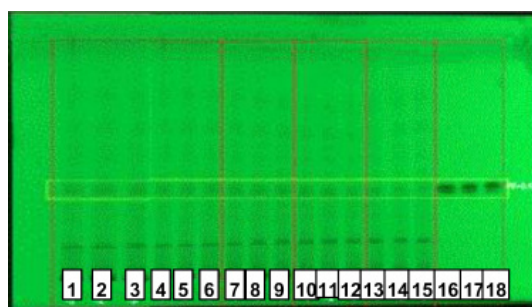
1. ปริมาณสารสกัดหยาบ จากการนำบอระเพ็ดมาสกัดด้วยน้ำ โดยวิธีการต้มใช้ผงบอระเพ็ด 100 กรัมต่อน้ำ 1,000 มิลลิลิตร ที่ อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 15 นาที และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาต่าง ๆ พบว่าที่ระยะเวลาในการเก็บ 120 ชั่วโมง มีปริมาณของสารสกัดหยาบ



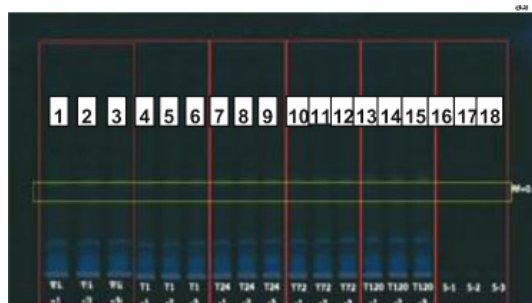
รูปที่ 1 กราฟมาตรฐาน Syringin

มากที่สุด คือ ร้อยละ 8.67 รองลงมา คือ การเก็บที่ 72, 24, 1 และ 0 ชั่วโมง ซึ่งมีปริมาณ SG ร้อยละ 8.45, 7.65, 7.23 และ 7.22 ตามลำดับ

2. ลักษณะทางโครมาโตกราฟี เมื่อวิเคราะห์ด้วย TLC ผลที่ได้จากการตรวจสอบของสารสกัดบอระเพ็ด เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน พบว่ามีจุดที่มีระยะทางการเคลื่อนที่ตรงกัน คือมีค่า R_f เท่ากับ



รูปที่ 2 ลักษณะของโครมาโตกราฟี จากวิธี TLC ที่สังเกตด้วย UV 254 นาโนเมตร ของสารสกัดบอระเพ็ด หมายเลข 1-3 เก็บนาน 0 ชั่วโมง หมายเลข 4-6 เก็บนาน 1 ชั่วโมง หมายเลข 7-9 เก็บนาน 24 ชั่วโมง หมายเลข 10-12 เก็บนาน 72 ชั่วโมง หมายเลข 13-15 เก็บนาน 120 ชั่วโมง หมายเลข 16-18 สารมาตรฐาน SG

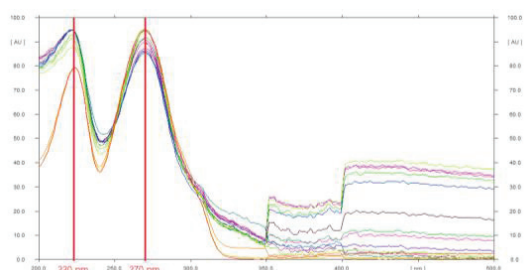


รูปที่ 3 ลักษณะของโครมาโตกราฟี จากวิธี TLC ที่สังเกตด้วย UV 366 นาโนเมตร ของสารสกัดบอระเพ็ด หมายเลข 1-3 เก็บนาน 0 ชั่วโมง หมายเลข 4-6 เก็บนาน 1 ชั่วโมง หมายเลข 7-9 เก็บนาน 24 ชั่วโมง หมายเลข 10-12 เก็บนาน 72 ชั่วโมง หมายเลข 13-15 เก็บนาน 120 ชั่วโมง หมายเลข 16-18 สารมาตรฐาน SG

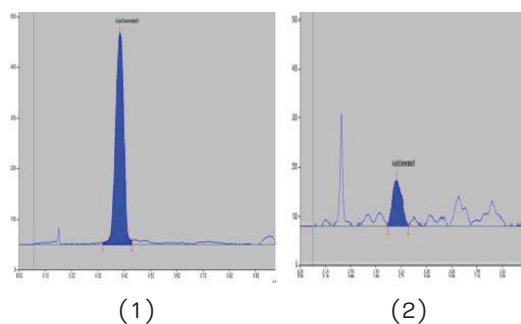
0.41 (รูปที่ 2 และ 3)

3. ลักษณะทางโครมาโตกราฟีเมื่อวิเคราะห์ด้วย TLC Densitometer ตรวจวัดปริมาณของสารที่อยู่บน TLC plate โดยใช้หลักการของการดูดกลืนแสงเรืองแสงของสาร พบว่าลักษณะของสเปกตรัม และโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน และสารสกัดบอระเพ็ดมีลักษณะเหมือนกัน (รูปที่ 4 และ 5)

4. ปริมาณ SG ในสารสกัดบอระเพ็ด หลังจากการต้มแล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาต่าง ๆ พบว่าปริมาณของ SG ในสารสกัดบอระเพ็ดที่เก็บไว้ที่ระยะเวลา 0, 1, 24, 72 และ 120 ชั่วโมงแล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณด้วยการคำนวณจากพื้นที่ใต้กราฟ ในสมการเส้นตรง $y = 13337x +$



รูปที่ 4 ลักษณะของสเปกตรัม ของสารมาตรฐาน SG และสารสกัดบอระเพ็ด ที่ค่าดูดกลืนแสง ระหว่าง 200 ถึง 600 นาโนเมตร



รูปที่ 5 ลักษณะของโครมาโตแกรม ของ SG (1) และสารสกัดบอระเพ็ด (2)

ตารางที่ 1 ปริมาณสาร Syringin ของสารสกัดบอระเพ็ด ที่ต้มด้วยน้ำ เก็บในระยะเวลาที่แตกต่างกัน

สารสกัดบอระเพ็ดที่ระยะ เวลาต่าง ๆ (ชั่วโมง)	ปริมาณสาร Syringin (ร้อยละ)	P-value (เปรียบเทียบที่ 0 กับชั่วโมงต่าง ๆ)
เก็บที่ 0	1.35 ± 0.01	-
เก็บที่ 1	1.35 ± 0.02	0.644
เก็บที่ 24	1.36 ± 0.02	0.363
เก็บที่ 72	$1.27 \pm 0.03^*$	< 0.005
เก็บที่ 120	$1.24 \pm 0.01^*$	< 0.005

500.01 ซึ่งค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ $R_f = 0.9978$ มีปริมาณ SG ร้อยละ 1.35, 1.35, 1.36, 1.27 และ 1.24 ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

อภิปรายผล

สารสกัดบอระเพ็ดที่เก็บรักษาในระยะเวลาที่แตกต่างกันมีปริมาณสาร SG ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p - value < 0.05$ โดยการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ใกล้เคียงกับการเก็บในตู้เย็นปกติที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมงพบปริมาณสาร SG มากที่สุด โดยเฉพาะการเก็บยาต้มบอระเพ็ดตั้งแต่ 3 วัน ขึ้นไป มีผลให้ปริมาณ SG แนวโน้มลดลง สอดคล้องกับการ สุนิรัตน์ เรื่องสมุนไพร และคณะ ที่ศึกษาวิธีการเก็บรักษาสารสกัดจาก *Phomidium angustissimum* เพื่อหาสภาวะและระยะเวลาการเก็บที่เหมาะสมในการเก็บสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพให้คงตัวอยู่ได้นานที่สุด พบว่าการเก็บรักษาสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มีมืด จะทำให้มีความคงตัวดีที่สุด โดยไม่ควรเก็บรักษา สารสกัดไว้นาน เพราะส่งผลให้สารสำคัญมีปริมาณลดลง^[8] จึง

สามารถกำหนดอายุของยาได้ 1-3 วัน นับจากวันผลิตและอาจจะเกิดการสลายตัวได้เมื่อเก็บไว้ที่ระยะเวลาสั้นขึ้นพิจารณาจากพันธะทางเคมีของ SG ที่ส่วนใหญ่ประกอบไปด้วยพันธะ Hydrogen ซึ่งมีความแข็งแรงอ่อนกว่าพันธะโคเวเลนต์ และพันธะไฮออนิก^[9] อาจทำให้มีการสลายตัวลงเมื่อระยะเวลาผ่านไป ซึ่งผลดังกล่าวเป็นข้อมูลสำคัญและสามารถใช้อ้างอิงการใช้ยาต้มบอระเพ็ดได้

ข้อสรุป

การเก็บยาต้มบอระเพ็ดตั้งแต่ 3 วัน ในตู้เย็นส่งผลให้ SG ลดลง ซึ่งผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าระยะเวลาในการเก็บยามีผลต่อปริมาณสารสำคัญในบอระเพ็ดที่อาจส่งผลต่อคุณสมบัติทางด้านเภสัชวิทยา จึงสามารถกำหนดอายุของยาต้มบอระเพ็ดได้ 3 วัน นับจากวันผลิตซึ่งผลดังกล่าวเป็นข้อมูลสำคัญและสามารถใช้อ้างอิงสำหรับการใช้ยาต้มบอระเพ็ดต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ทางคณะผู้วิจัยขอขอบขอบคุณผู้บริหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี วิทยาเขตสกลนคร และเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ให้คำแนะนำ และสนับสนุนอุปกรณ์ เครื่องมือในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. Faculty of Pharmacy, Mahidol University. Primary health Care. [Internet]. [Cited 2017 Jan 23]; Available from: <http://www.medplant.mahidol.ac.th/pubhealth/index.asp>. (in Thai)
2. Al-Alusi NT, Kadir FA, Ismail S, Abdullah MA. In vitro interaction of combined plants: *Tinospora crispa* and *Swietenia mahagoni* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *African Journal of Microbiology Research*. 2010;4(21):2309-12.
3. Ahmad W, Jantan I, Bukhari NA. *Tinospora crispa* (L.) Hook. f. & Thomson: a review of its ethnobotanical, phytochemical and pharmacological aspects. *Frontiers in Pharmacology*. 2016;7(59).
4. Noor H, Ashcroft SJ. Antidiabetic effects of *Tinospora crispa* in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 1989;27(1-2):149-61.
5. Noor H, Ashcroft SJ. Pharmacological characterisation of the antihyperglycaemic properties of *Tinospora crispa* extract. *Journal of Ethnopharmacology*. 1998;62(1):7-13.
6. Rao M, Zin T, Abdurrazak M, Bashir Ado Ahmad B. Chemistry and pharmacology of syringin, a novel bioglycoside: a review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2015;8(3):20-5.
7. Wutthamawe W. Rattanakosin pharmacy textbook. 2nd ed. Bangkok: Silpa Siam Packaging & Printing; 2004. (in Thai)
8. Ruangsomboon S, Choochote S, Aue-Umnuy D. Effect of preservation time, light and temperature of cyanobacterial extract, *Phormidium angustissimum*, on the inhibit seed germination ability of Chinese cabbage. *KKU Science Journal*. 2013;41(4):973-84. (in Thai)
9. Chutima K. General chemistry. Volume 1. 19th ed. Bangkok: Chulalongkorn University; 2013. 424 p. (in Thai)