

## การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีของตำรับยาธาตุดอบเชยด้วยโครมาโทกราฟี ของเหลวสมรรถนะสูง

สิริพร สีนิลแท้\*, จักรพงษ์ ขาวะหา\*, กุสุมา จิตแสง\*, ทรงพร จึงมันคง\*, ทวีศักดิ์ จึงวัฒนตระกูล\*,  
สุदारัตน์ หอมหวล\*, สุภัทรา รังสิมาการ†, ระวีวรรณ แก้วอมตวงศ์\*‡

\* คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี จังหวัดอุบลราชธานี 34190

† กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดนนทบุรี 11000

‡ ผู้รับผิดชอบบทความ: rawiwun.k@ubu.ac.th

### บทคัดย่อ

ตำรับยาธาตุดอบเชยเป็นยาจากสมุนไพรที่อยู่ในบัญชียาหลักแห่งชาติ ใช้เพื่อบรรเทาอาการท้องอืด ท้องเฟ้อ ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาวิธีควบคุมคุณภาพของตำรับ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเป็นการตรวจสอบชนิดสารและหาปริมาณสารเคมีบ่งชี้ของตำรับยาธาตุดอบเชยด้วยการใช้โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) ทำการศึกษาวิธีการวิเคราะห์คุณภาพและปริมาณตัวอย่างยาธาตุดอบเชยด้วย HPLC พร้อมตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีด้วยการหาค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง ค่าความถูกต้อง และค่าความแม่นยำ จากการศึกษาพบว่าตัวอย่างยาธาตุดอบเชยประกอบด้วยสาร gallic acid, สาร cinnamic acid, สาร glycyrrhizin, สาร cinnamaldehyde และ สาร eugenol ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์สารเหล่านี้โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน กราฟมาตรฐานของสารเคมีบ่งชี้ (cinnamic acid, glycyrrhizin, eugenol) แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงที่ดีในช่วงวิเคราะห์ ( $r^2 \geq 0.9950$ ) ชัดจำกัดในการตรวจพบและชัดเจนในการหาปริมาณพบว่าอยู่ในช่วง 0.08 ถึง 0.24 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 0.30 ถึง 2.24 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันอยู่ในช่วง 0.86 ถึง 3.51 และร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของการวิเคราะห์ระหว่างวันอยู่ในช่วง 0.94 ถึง 6.03 ค่าการกลับคืนของวิธีวิเคราะห์อยู่ในช่วงร้อยละ 85.27 ถึง 102.80 การวิเคราะห์ปริมาณสารเคมีบ่งชี้ในตัวอย่างยาธาตุดอบเชยด้วยวิธี HPLC นี้ พบปริมาณสาร cinnamic acid 0.04 ถึง 0.11 ร้อยละโดยน้ำหนัก ปริมาณสาร glycyrrhizin 0.70 ถึง 3.15 ร้อยละโดยน้ำหนัก และปริมาณสาร eugenol 0.19 ถึง 3.38 ร้อยละโดยน้ำหนัก ตามลำดับ สรุปได้ว่าวิธีวิเคราะห์ในการศึกษานี้จึงเป็นวิธีที่ง่ายและสะดวกในการวิเคราะห์คุณภาพและปริมาณสารในตำรับยาธาตุดอบเชย ทว่าตำรับยาธาตุดอบเชยยังมีองค์ประกอบส่วนหนึ่งเป็นสารกลุ่มโมโนเทอร์ปีนส์ซึ่งไม่มีคุณสมบัติดูดกลืนแสงยูวี-วิสิเบิล จึงควรต้องหาวิธีการอื่นร่วมวิเคราะห์ด้วย

**คำสำคัญ:** ยาธาตุดอบเชย, โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง, สารเคมีบ่งชี้

## Quality Control of *Ya Thatu Obchey* Preparation by High Performance Liquid Chromatography

Siriporn Siniltae<sup>\*</sup>, Chakkaphong Chawaha<sup>\*</sup>, Kusuma Jitsaeng<sup>\*</sup>, Zongporn Juengmunkong<sup>\*</sup>,  
Thaweesak Juengwatanatrakul<sup>\*</sup>, Sudarat Homhual<sup>\*</sup>, Supattra Rungsimakan<sup>†</sup>,  
Rawiwun Kaewamatawong<sup>\*‡</sup>

<sup>\*</sup>Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand

<sup>†</sup>Department of Thai Traditional and Alternative Medicine, Ministry of Public Health, Nonthaburi 11000, Thailand

<sup>‡</sup>Corresponding author: rawiwun.k@ubu.ac.th

### Abstract

*Ya thatu obchey* preparation is a herbal remedy in the Thai National List of Essential Medicines which is used for the treatment of indigestion. The quality control methods of the mixture have not been reported. The Objective of this study was to identify constituents in *Ya thatu obchey* preparation and to quantify contents of chemical markers in the preparation by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Qualitative and quantitative analyses of the samples were determined using HPLC method. The method was validated on parameters including linearity, accuracy, and precision. From this study, gallic acid, cinnamic acid, glycyrrhizin, cinnamaldehyde and eugenol, were simultaneously detected in HPLC chromatogram and identified by comparison with those of the standard compounds. Chemical markers (cinnamic acid, glycyrrhizin, eugenol) presented good linearity within the test range ( $r^2 \geq 0.9950$ ). The limit of detection and the limit of quantitation varied from 0.08 to 0.24  $\mu\text{g/ml}$  and 0.30 to 2.24  $\mu\text{g/ml}$ , respectively. The relative standard deviations of intraday precision were 0.86 to 3.51%. The relative standard deviations of intraday precision of compounds were 0.94 to 6.03%. The recovery of the method was in the range 85.27 to 102.80%. The contents of marker compounds in *Ya thatu obchey* preparation samples were also quantified by this HPLC method. The results showed that the contents of cinnamic acid, glycyrrhizin, and eugenol were 0.04 to 0.11, 0.70 to 3.15 and 0.19 to 3.38%w/w, respectively. In conclusion, the HPLC method is suitable for qualitative and quantitative analysis of chemical markers in *Ya thatu obchey* preparation. However, *Ya thatu obchey* preparation consists of various monoterpenes. This group of compounds generally lacks UV-Visible absorption chromophores. Therefore, other analytical techniques should be selected to determine these constituents.

**Key words:** *Ya thatu obchey* preparation, High Performance Liquid Chromatography, chemical markers

### บทนำ

ยาธาตุอบเชยเป็นยาจากสมุนไพรที่จัดอยู่ในบัญชียาหลักแห่งชาติ (บัญชียาจากสมุนไพร) เป็นยารักษากลุ่มอาการทางระบบทางเดินอาหาร มีสรรพคุณบรรเทาอาการท้องอืด ท้องเฟ้อ ยาธาตุอบเชยประกอบด้วยเครื่องยา 5 ชนิด ได้แก่ เปลือกอบเชยเทศ (*Cinnamomum zeylanica* Blume) ใช้ขับลม ขับเสมหะ

บำรุงธาตุ บำรุงกำลัง เปลือกสมุลแว้ง (*Cinnamomum bejolghota* (Buch.-Ham.) Sweet) ใช้ขับลม แก้อืดท้องเฟ้อ<sup>[1]</sup> ผลกระวาน (*Amomum testaceum* Ridl.) มีฤทธิ์ขับลม ขับเสมหะ บำรุงธาตุ ดอกกานพลู (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry.) ช่วยย่อยอาหาร ขับลมในกระเพาะลำไส้ ส่วนรากชะเอมเทศ (*Glycyrrhiza glabra* L.) ทำให้ชุ่มชื้น

แก้เจ็บคอ แก้ไอ<sup>[2]</sup> ธาตุวัตถุ ได้แก่ เกล็ดสระแห่น ทาบรเทาอาการจากแมลงกัดต่อย และการบูร ใช้แก้ เคล็ดบวม ช้ำบวม กระตุ้นหัวใจอย่างอ่อน<sup>[3]</sup> โดยมีสูตร ตำรับดังนี้ ยาน้ำ 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย เปลือก อบเชยเทศ เปลือกสมุลแว้ง ลูกกระวาน ดอกกานพลู และรากชะเอมเทศ อย่างละ 800 มิลลิกรัม ส่วนเกล็ด สระแห่น และการบูร อย่างละ 50 มิลลิกรัม

จากการศึกษาประสิทธิผลและความปลอดภัย ของยาธาตุดอบเชยของโรงพยาบาลชุมชน 6 แห่งเพื่อ รักษาอาการจุกแน่นหลังมื้ออาหาร เรอบ่อย และเสบ ร้อนที่ลิ้นปี่ในผู้ป่วย functional dyspepsia ซึ่งเป็นภาวะผิดปกติของทางเดินอาหารส่วนบนระหว่าง กระเพาะอาหารและลำไส้เล็กส่วนต้นโดยไม่ทราบ สาเหตุ ทดลองแบบสุ่มในผู้ป่วย 318 ราย เป็นเวลา 14 วัน โดยกลุ่มหนึ่งได้รับยาธาตุดอบเชย 30 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 ครั้งต่อวันเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ simethicone 105 มิลลิกรัม เป็นเวลา 3 ครั้งต่อ วัน พบว่าได้ผลการรักษาและความปลอดภัยไม่แตก ต่างกัน แต่การใช้ยาธาตุดอบเชยมีราคาถูกลงกว่าการใช้ simethicone<sup>[4]</sup> ดังนั้นการใช้ยาธาตุดอบเชยจึงเป็นทางเลือกของการรักษาผู้ป่วย functional dyspepsia ซึ่งเป็นอาการเรื้อรัง ไม่ทราบสาเหตุและต้องใช้ยาติดต่อกันนาน ทำให้เสียค่าใช้จ่ายสูง ปัจจุบันยาธาตุดอบเชย มีจำหน่ายเป็นผลิตภัณฑ์ตามท้องตลาดและเป็นยาที่ โรงพยาบาลชุมชนหลายแห่งผลิตได้และจ่ายให้ผู้ป่วย ของตนเอง

องค์ประกอบทางเคมีของพืชสมุนไพรในตำรับ นี้มีหลายกลุ่ม ได้แก่ สารกลุ่ม phenylpropanoids และอนุพันธ์ เช่น จากเปลือกอบเชยเทศ พบสาร cinnamaldehyde, สาร cinnamic acid เป็นต้น<sup>[5]</sup> จากดอกกานพลู พบสาร eugenol, สาร eugenyl acetate, สาร gallic acid, สาร caffeic acid สารกลุ่ม

flavonoids และอนุพันธ์ เช่น จากดอกกานพลู พบ สาร kaempferol, สาร quercetin<sup>[6]</sup> จากรากชะเอมเทศ พบสาร isoliquiritigenin, สาร isoliquiritin, สาร liquiritigenin, สาร liquiritin<sup>[7]</sup> สารกลุ่ม terpe noids และอนุพันธ์ เช่น จากเปลือกสมุลแว้ง พบสาร *a*-terpineol, สาร linalool<sup>[8]</sup> ผลกระวาน พบสาร *b*- pinene, สาร 1,8-cineole<sup>[9]</sup> และในรากชะเอมเทศพบ สาร glycyrrhizin, สาร glycyrrhetic acid<sup>[7]</sup> เป็นต้น

ตำรับยาธาตุดอบเชยก็เช่นเดียวกับตำรับยาแผน- ไทยส่วนใหญ่ นั่นคือยังขาดวิธีควบคุมคุณภาพ ทำให้ ยาที่ผลิตแต่ละครั้งมีปริมาณสารสำคัญแตกต่างกัน ส่งผลถึงการออกฤทธิ์ของยา ดังนั้นเพื่อสร้างเชื่อมั่น และความปลอดภัยในการใช้ตำรับยาไทยให้แก่ผู้ บริโภค การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์ คุณภาพทางเคมีของตำรับยาธาตุดอบเชย ได้แก่ การตรวจสอบชนิดสารที่เป็นองค์ประกอบและการ หาปริมาณสารเคมีบ่งชี้ (chemical markers) โดย การใช้โครมาโทกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

## ระเบียบวิธีศึกษา

### วัสดุและเครื่องมือ

สารมาตรฐาน cinnamic acid, cinnamaldehyde, gallic acid, glycyrrhizin และ eugenol จาก บริษัท Sigma-Aldrich สหภาพยุโรป เครื่องยาจากร้านขายยาแผนโบราณในจังหวัดขอนแก่น จังหวัด อุบลราชธานี และจังหวัดกรุงเทพมหานครอย่างละ 1 แห่ง (พิสูจน์เอกลักษณ์เครื่องยาโดย ผศ. สุदारัตน์ หอมหวล คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี) ผลิตภัณฑ์ยาธาตุดอบเชยจากโรงพยาบาล 5 แห่ง ตัวทำ ละลายเกรด HPLC เช่น methanol, acetonitrile

และน้ำจากบริษัท RCI Labscan ประเทศไทย ตัวทำละลายเกรด AR เช่น dichloromethane จากบริษัท Q Rec ประเทศ New Zealand

เครื่องมือ HPLC ชนิด Dionex Ultimate 3000 HPLC system, LPG 3400 pump, auto sampler (WPS-3000), column oven และ UV/VIS detector จากบริษัท Dionex สหภาพยุโรป โดยมีสภาวะของการวิเคราะห์ดังนี้

วัฏภาคหนึ่ง (stationary phase): C-18 column อนุภาค 5 ไมโครเมตร ( $\mu\text{m}$ ) ขนาด 4.6 X 250 มิลลิเมตร (mm) จากบริษัท Phenomenex ประเทศสหรัฐอเมริกา

วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase): 1% acetic acid ในน้ำ (A) และ 1% acetic acid ใน acetonitrile (B) โดยมีอัตราส่วนดังนี้ 0-5 นาที 95% A, 5-10 นาที 85% A, 10-15 นาที 78% A, 15-20 นาที 75% A, 20-32 นาที 30% A, 32-40 นาที 0% A, 40-55 นาที 95% A

อัตราการไหล: 0.7 มิลลิลิตร/นาที (ml/min)

เวลาในการวิเคราะห์: 55 นาที

ความยาวคลื่นช่วงอัลตราไวโอเล็ต (ultraviolet, UV) ในการวัด: 270 นาโนเมตร (nm)

## วิธีการศึกษา

### 1. การเตรียมตำรับยาธาตุดอบเชยก่อนการวิเคราะห์

เตรียมตัวอย่างตำรับยาธาตุดอบเชยในห้องปฏิบัติการ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี โดยนำเครื่องยามาทำความสะอาด จากนั้นบดเป็นผงผ่านร่อนเบอร์ 40 ซึ่งน้ำหนักอบเชยเทศ สมุลแว้ง กานพลู กระวาน ชะเอมเทศอย่างละ 8 กรัม (g) ต้มกับน้ำสะอาด 1,000 มิลลิลิตร (ml) เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่

อุณหภูมิ 90 °C หลังจากต้มแล้วทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลงเหลือ 60 °C เติมการบุงและเกล็ดตะระแหงนอย่างละ 0.50 g ผสมให้เข้ากัน กรองแล้วทิ้งให้เย็น นำตำรับยาธาตุดอบเชยที่ได้ไปทำให้แห้งด้วยการแช่เยือกแข็ง (freeze drying)

นำผลิตภัณฑ์ตำรับยาธาตุดอบเชยจากโรงพยาบาล 5 แห่ง ปริมาณ 360-480 ml (ขึ้นกับขนาดบรรจุของผลิตภัณฑ์) ไปทำให้แห้งด้วย freeze drying เช่นกัน

### 2. การเตรียมสารมาตรฐาน

ซึ่งสารมาตรฐานอย่างแม่นยำ ละลายด้วย methanol ให้มีความเข้มข้น 0.3-1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (mg/ml) จากนั้นนำมาเจือจางด้วย methanol ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เพื่อใช้เป็นสารมาตรฐานในการวิเคราะห์

### 3. การเตรียมตัวอย่างเพื่อใช้ในการวิเคราะห์

ซึ่งผงตำรับยาธาตุดอบเชย 50 mg สกัดด้วย methanol 3 ml นำไป sonicate ที่ 25 °C 10 นาที จากนั้น centrifuge ที่ 2500 rpm 25 °C 10 นาที ดูดเอาเฉพาะส่วนน้ำใส ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง รวมสารสกัด methanol ไว้ด้วยกัน สกัดผงตำรับยาธาตุดอบเชยต่อให้หมดจดด้วย dichloromethane โดยสกัดเช่นเดียวกับการสกัดด้วย methanol นำส่วนที่สกัดด้วย dichloromethane ทั้งหมดไประเหยแห้งด้วย rotary evaporator แล้วละลายกลับด้วยสารสกัด methanol ทำการปรับปริมาตรด้วย methanol ใน volumetric flask จนครบ 10 ml นำสารละลายตำรับยาธาตุดอบเชยกรองผ่านหัวกรองชนิด nylon ขนาด 0.45  $\mu\text{m}$  ดูดสารละลายที่กรองแล้ว 0.5 ml ผสมกับ methanol 0.5 ml จากนั้นนำไปวิเคราะห์ ตัวอย่างละ 3  $\mu\text{l}$  ปริมาตรที่ฉีดครั้งละ 10 ไมโครลิตร ( $\mu\text{l}$ )

#### 4. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารในตำรับยาธาตุออบเชย

วิเคราะห์ตัวอย่างตำรับยาธาตุออบเชยและสารมาตรฐาน เปรียบเทียบเวลารีเทนชัน (retention time) ของพีค (peak) ของสารในยาธาตุออบเชยกับของสารมาตรฐานแต่ละชนิด

#### 5. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (method validation)<sup>[10]</sup>

##### 5.1 ความจำเพาะเจาะจง (selectivity)

นำสารมาตรฐานและตัวอย่างตำรับยาธาตุออบเชยที่เติมสารมาตรฐานวิเคราะห์ด้วย HPLC โดย retention time ของ peak ของสารชนิดเดียวกันจะมีค่าเท่ากัน และพื้นที่ใต้พีค (peak area) ของตัวอย่างยาธาตุออบเชยที่เติมสารมาตรฐานจะต้องเพิ่มขึ้น

5.2 ค่าความเป็นเส้นตรง (linearity) และช่วงความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรง (range)

สร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) โดยวิเคราะห์สารละลายของสารเคมีบ่งชี้ cinnamic acid, glycyrrhizin และ eugenol ความเข้มข้นต่าง ๆ กันอย่างน้อย 6 ความเข้มข้น นำผลที่ได้มาหาค่าความเป็นเส้นตรงระหว่าง peak area กับความเข้มข้นของสาร linear range ประเมินจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient,  $r^2$ ) ของ calibration curve ซึ่ง  $r^2$  ต้องมากกว่า 0.9950

##### 5.3 ความถูกต้อง (accuracy)

เติมสารเคมีบ่งชี้ที่ทราบความเข้มข้นลงในตัวอย่างตำรับยาธาตุออบเชยที่เตรียมจากเครื่องยาจังหวัดอุบลราชธานี วิเคราะห์หาปริมาณสารเทียบกับตัวอย่างตำรับยาธาตุที่ไม่ได้เติมสาร หার้อยละของการกลับคืน (%recovery) โดยเกณฑ์ในการยอมรับอยู่ในช่วง 85-110%

##### 5.4 ความแม่นยำ (precision)

ทำการสกัดตัวอย่างตำรับยาธาตุออบเชยที่เตรียมจากเครื่องยาจังหวัดอุบลราชธานี 18 ตัวอย่าง จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาค่าความแม่นยำภายในวันเดียวกัน (intraday precision) และค่าความแม่นยำระหว่างวัน (interday precision) นำผลที่ได้ไปหาร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%relative standard deviation, %RSD) ซึ่ง %RSD ของ intraday precision ต้องน้อยกว่า 6% และ %RSD ของ interday precision ต้องน้อยกว่า 11%

5.5 ขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) และขีดจำกัดในการวิเคราะห์ (Limit of quantitation, LOQ)

ตรวจสอบด้วยการเติมสารเคมีบ่งชี้ที่ค่าความเข้มข้นที่อยู่ในช่วงกลางลงในตัวอย่างเปล่า (sample blank) วิเคราะห์ 5-7 ซ้ำ ค่า LOD วัดได้จากความเข้มข้นของสารที่ให้สัญญาณเป็น 3 เท่าของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ของ sample blank เหนือค่าเฉลี่ยสัญญาณของ sample blank และค่า LOQ วัดได้จากความเข้มข้นของสารที่ให้สัญญาณเป็น 10 เท่า ของ SD ของ sample blank เหนือค่าเฉลี่ยสัญญาณของ sample blank

#### 6. การวิเคราะห์สารเคมีบ่งชี้ในตัวอย่างตำรับยาธาตุออบเชย

ใช้วิธีวิเคราะห์ที่ศึกษา วิเคราะห์ปริมาณสารเคมีบ่งชี้ทั้ง 3 ชนิดในตัวอย่างตำรับยาธาตุออบเชยที่เตรียมในห้องปฏิบัติการและผลิตภัณฑ์ของโรงพยาบาลทั้งหมด 8 ตัวอย่าง วิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

### ผลการศึกษา

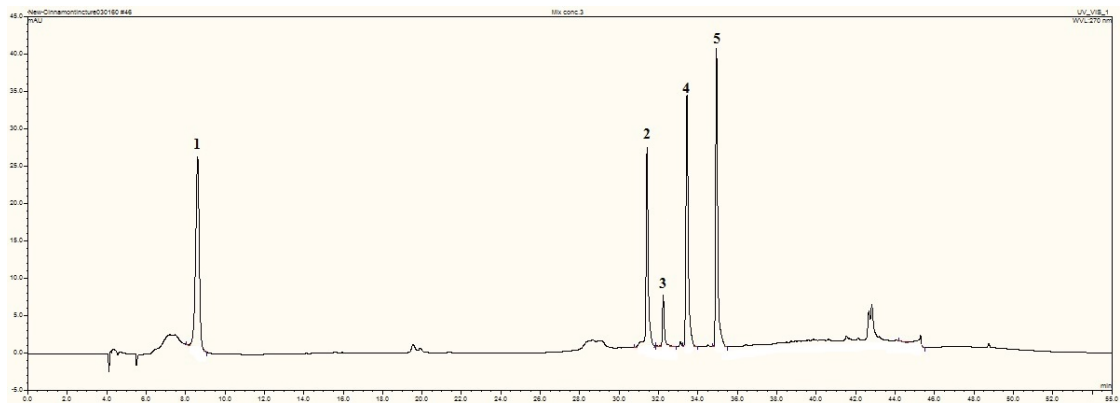
#### 1. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารสกัดตำรับยาธาตุออบเชย

จากภาพที่ 1 วิธีวิเคราะห์นี้สามารถจำแนกสาร

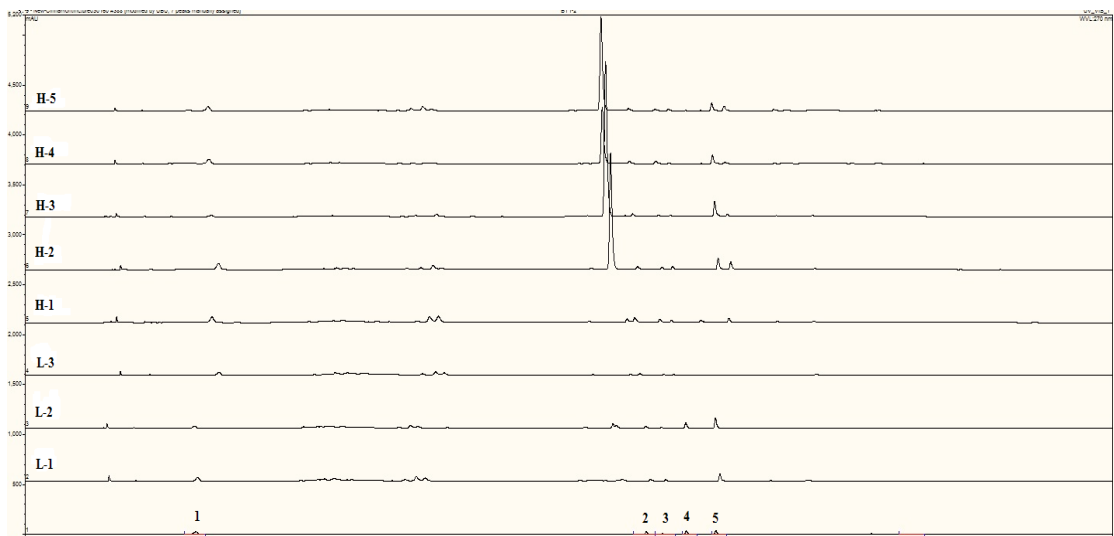
มาตรฐาน gallic acid (8.50 นาที), cinnamic acid (31.37 นาที), glycyrrhizin (32.21 นาที), cinnamaldehyde (33.11 นาที) และ eugenol (34.89 นาที) ออกจากกันได้ เมื่อนำตัวอย่างตำรับยาธาตุอบเชยทั้ง 8 ตัวอย่างมาวิเคราะห์พบ peak ที่มีค่า retention time ตรงกับ peak ของสารมาตรฐานทั้ง 5 ชนิด ดังภาพที่ 2

## 2. ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

กราฟมาตรฐานของสารเคมีทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ cinnamic acid, glycyrrhizin และ eugenol แสดงความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงระหว่าง peak area กับการเข้มข้นของสาร โดยมี  $r^2 \geq 0.9950$  และค่า



ภาพที่ 1 แสดง peak ของ 1 gallic acid, 2 cinnamic acid, 3 glycyrrhizin, 4 cinnamaldehyde และ 5 eugenol



ภาพที่ 2 แสดง chromatogram ของตำรับยาธาตุอบเชยเทียบกับสารมาตรฐาน 5 ชนิด โดย L1 = เตรียมจากเครื่องยาจังหวัดขอนแก่น L2 = เตรียมจากเครื่องยาจังหวัดอุบลราชธานี L3 = เตรียมจากเครื่องยาจังหวัดกรุงเทพมหานคร H-1 = ผลิตภัณฑจากจังหวัดอุบลราชธานี H-2 = ผลิตภัณฑจากจังหวัดอำนาจเจริญ H-3 = ผลิตภัณฑจากจังหวัดขอนแก่น H-4 = ผลิตภัณฑจากจังหวัดอุทธรณ์ และ H-5 = ผลิตภัณฑจากจังหวัดพิษณุโลก

LOD และ LOQ อยู่ในช่วง 0.08 ถึง 0.24 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ( $\mu\text{g/ml}$ ) และ 0.30 ถึง 2.24  $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โดยการหา %recovery จากการเติมสารเคมีบ่งชี้ทั้ง 3 ชนิดที่ทราบความเข้มข้นลงในตัวอย่างตำรับยาธาตุบดเซยที่เตรียมจากเครื่องยาจังหวัดอุบลราชธานี เปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้เติมสาร แล้วคำนวณหา %recovery พบว่า %recovery ของ cinnamic acid, glycyrrhizin และ eugenol อยู่ในช่วง 85-110% ส่วน %RSD ของ intraday precision และ %RSD ของ interday precision ของสารทั้ง 3 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2

### 3. การวิเคราะห์ปริมาณสารเคมีบ่งชี้ในตัวอย่างตำรับยาธาตุบดเซย

นำวิธีวิเคราะห์ที่ศึกษานี้มาหาปริมาณสารเคมี

บ่งชี้ทั้ง 3 ชนิดในตำรับยาธาตุบดเซยที่เตรียมขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ 3 ตัวอย่าง ได้แก่ L1 ถึง L3 และผลิตภัณฑ์ตำรับยาธาตุบดเซยของโรงพยาบาล 5 แห่ง ได้แก่ H1 ถึง H5 พบว่าตำรับยาธาตุบดเซยทั้ง 8 ตัวอย่างมีปริมาณ cinnamic acid 0.04 ถึง 0.11% w/w ปริมาณ glycyrrhizin 0.70 ถึง 3.15% w/w และปริมาณ eugenol 0.19 ถึง 3.38% w/w ปริมาณสารเคมีบ่งชี้ที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างตำรับยาธาตุบดเซยแหล่งต่าง ๆ ดังตารางที่ 3 และภาพที่ 3

## อภิปรายผล

จากการศึกษาการวิเคราะห์เชิงคุณภาพของตำรับยาธาตุบดเซยด้วยวิธี HPLC นี้ พบว่า chromatogram ที่ได้ประกอบด้วย peak ของสาร gallic acid, สาร cinnamic acid, สาร glycyrrhizin, สาร cinnamaldehyde และ สาร eugenol พิสูจน์

ตารางที่ 1 แสดง calibration curve, linear range, LOD และ LOQ ของสารเคมีบ่งชี้

| สารเคมีบ่งชี้ | Calibration curve      | $r^2$  | Linear range<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | LOD<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | LOQ<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) |
|---------------|------------------------|--------|--------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| cinnamic acid | $y = 2.5612x - 0.4471$ | 0.9964 | 0.1-3.6                              | 0.08                        | 2.24                        |
| glycyrrhizin  | $y = 0.0432x + 0.0306$ | 0.9998 | 10-150                               | 0.24                        | 0.71                        |
| eugenol       | $y = 0.1466x - 0.0713$ | 0.9995 | 0.25-120                             | 0.10                        | 0.30                        |

ตารางที่ 2 แสดง accuracy และ precision ของการวิเคราะห์

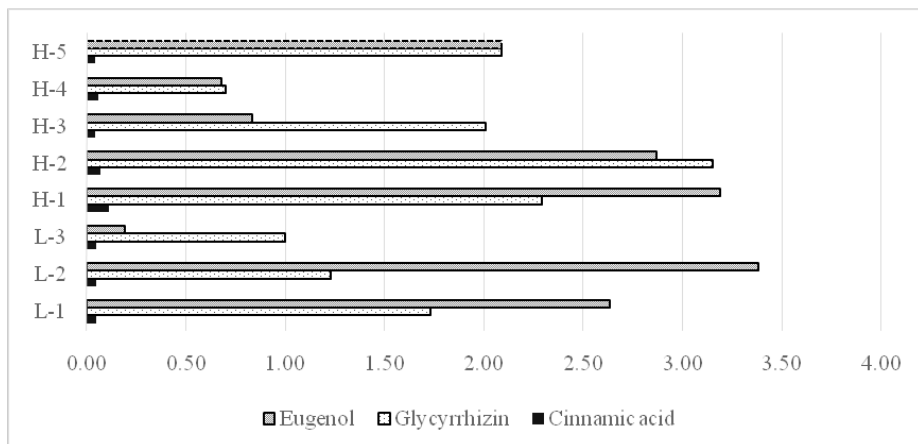
| สารเคมีบ่งชี้ | Accuracy (n = 3) | Intraday day (n = 6)     |            | Interday day (n = 12)    |            |
|---------------|------------------|--------------------------|------------|--------------------------|------------|
|               | %Recovery        | Mean $\pm$ SD<br>(% w/w) | RSD<br>(%) | Mean $\pm$ SD<br>(% w/w) | RSD<br>(%) |
| cinnamic acid | 85.27            | 0.02 $\pm$ 0.00          | 1.26       | 0.02 $\pm$ 0.00          | 4.10       |
| glycyrrhizin  | 98.71            | 1.02 $\pm$ 0.04          | 3.51       | 1.07 $\pm$ 0.06          | 6.03       |
| eugenol       | 102.80           | 0.54 $\pm$ 0.00          | 0.86       | 0.54 $\pm$ 0.01          | 0.94       |

ตารางที่ 3 การวิเคราะห์ปริมาณสารเคมีบ่งชี้ในตัวอย่างตำรับยาธาตุออบเชย

| สารเคมีบ่งชี้ | ปริมาณสาร (% w/w) |              |             |
|---------------|-------------------|--------------|-------------|
|               | cinnamic acid     | glycyrrhizin | eugenol     |
| L-1           | 0.05 ± 0.00       | 1.73 ± 0.15  | 2.63 ± 0.03 |
| L-2           | 0.05 ± 0.00       | 1.23 ± 0.04  | 3.38 ± 0.09 |
| L-3           | 0.05 ± 0.00       | 1.0 ± 0.02   | 0.19 ± 0.02 |
| H-1           | 0.11 ± 0.00       | 2.29 ± 0.17  | 3.19 ± 0.05 |
| H-2           | 0.07 ± 0.00       | 3.1 ± 0.42   | 2.87 ± 0.10 |
| H-3           | 0.04 ± 0.00       | 2.0 ± 0.07   | 0.83 ± 0.04 |
| H-4           | 0.06 ± 0.01       | 0.7 ± 0.05   | 0.68 ± 0.01 |
| H-5           | 0.04 ± 0.00       | 2.0 ± 0.19   | 2.09 ± 0.30 |

หมายเหตุ L1 = เตรียมจากเครื่องยาจังหวัดขอนแก่น L2 = เตรียมจากเครื่องยาจังหวัดอุบลราชธานี L3 = เตรียมจากเครื่องยาจังหวัดกรุงเทพมหานคร

H-1 = ผลิตภัณฑจากจังหวัดอุบลราชธานี H-2 = ผลิตภัณฑจากจังหวัดอำนาจเจริญ H-3 = ผลิตภัณฑจากจังหวัดขอนแก่น H-4 = ผลิตภัณฑจากจังหวัดอุทุม H-5 = ผลิตภัณฑจากจังหวัดพิษณุโลก



ภาพที่ 3 แสดงกราฟเปรียบเทียบปริมาณสารเคมีบ่งชี้ทั้ง 3 ชนิดที่วิเคราะห์ได้ในยาธาตุออบเชยจากแหล่งต่าง ๆ

เอกลักษณ์โดยเปรียบเทียบกับ retention time ของ peak สารมาตรฐานทั้ง 5 ชนิด ดังนั้นวิธีวิเคราะห์นี้สามารถใช้เป็นวิธีที่ใช้พิสูจน์เอกลักษณ์เบื้องต้นของตำรับยาธาตุออบเชยได้ แต่ยังคงพบว่ามี peak อื่น ๆ อีกใน chromatogram ของตัวอย่างยาธาตุ จึงควรทำการศึกษาต่อไปเพื่อจำแนกชนิดสารทั้งหมดและสร้างเป็นลายพิมพ์เอกลักษณ์ทางเคมีของยาธาตุออบเชย

สารเคมีบ่งชี้ที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณครั้งนี้ ได้แก่ สาร cinnamic acid, สาร glycyrrhizin และสาร eugenol จากรายงานการศึกษาฤทธิ์ต่อระบบทางเดินอาหารพบว่าสาร cinnamic acid สามารถยับยั้งการทำงานของ  $H^+/K^+$ -ATPase ซึ่งเกี่ยวข้องกับการหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร และยับยั้งการเจริญของ *Helicobacter pylori* ที่เป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิด



แผลในกระเพาะอาหาร<sup>[11]</sup> สาร glycyrrhizin มีฤทธิ์ต้านการอักเสบใช้รักษาแผลในระบบทางเดินอาหาร<sup>[7]</sup> ส่วนสาร eugenol มีฤทธิ์ปกป้องเยื่อกระเพาะอาหาร<sup>[12]</sup> การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์อ้างอิงตามหลักเกณฑ์ของ ICH guide line<sup>[10]</sup> จากผลการวิเคราะห์พบว่า linearity และ range ของสาร cinnamic acid, สาร glycyrrhizin และสาร eugenol มี correlation coefficient ( $r^2$ ) เท่ากับ 0.9964, 0.9998 และ 0.9995 ตามลำดับ ซึ่ง  $r^2 \geq 0.9950$  แสดงถึงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงที่ดี และมี range อยู่ในช่วง 0.1-3.6, 10-150 และ 0.25-120  $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์พบว่า %recovery ของสาร cinnamic acid, สาร glycyrrhizin และสาร eugenol เท่ากับ 85.27, 98.71 และ 102.80% ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในช่วงการยอมรับได้ที่ 85-110 % เมื่อพิจารณาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ พบว่า intraday precision ของสาร cinnamic acid, สาร glycyrrhizin และสาร eugenol เท่ากับ 1.26, 3.51 และ 0.86% RSD ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่า 6% และ interday precision เท่ากับ 4.10, 6.03 และ 0.94% RSD ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่า 11% ดังนั้นความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ limit of detection และ limit of quantitation ของสาร cinnamic acid, สาร glycyrrhizin, สาร eugenol อยู่ที่ 0.08 และ 2.24, 0.24 และ 0.71, 0.10 และ 0.30  $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ในการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นวิธีที่ง่ายและสะดวกในการนำไปวิเคราะห์คุณภาพและปริมาณสารในตำรับยาธาตุบด แต่ตำรับยาธาตุบดยังมีองค์ประกอบส่วนหนึ่งเป็นสารกลุ่ม monoterpenoids ซึ่งไม่มีคุณสมบัติดูดกลืนแสง UV จึงอาจต้องหาวิธีการอื่นร่วมวิเคราะห์

เมื่อนำวิธีวิเคราะห์ด้วย HPLC ในการศึกษานี้

ไปหาปริมาณสาร cinnamic acid, สาร glycyrrhizin และสาร eugenol ในตัวอย่างตำรับยาธาตุบดจำนวน 8 ตัวอย่าง แบ่งเป็นตัวอย่างตำรับยาธาตุบดเซยที่เตรียมขึ้นมาในห้องปฏิบัติการตามวิธีในบัญชียาหลักแห่งชาติ ซึ่ง L-1 เตรียมจากเครื่องยาจังหวัดขอนแก่น L-2 เตรียมจากเครื่องยาจังหวัดอุบลราชธานี และ L-3 เตรียมจากเครื่องยาจังหวัดกรุงเทพมหานคร ส่วนตัวอย่าง H-1 ถึง H-5 เป็นผลิตภัณฑ์ตำรับยาธาตุบดเซยของโรงพยาบาล โดย H-1 เป็นผลิตภัณฑ์ของโรงพยาบาลในจังหวัดอุบลราชธานี H-2 เป็นผลิตภัณฑ์ของโรงพยาบาลในจังหวัดอำนาจเจริญ H-3 เป็นผลิตภัณฑ์ของโรงพยาบาลในจังหวัดขอนแก่น H-4 เป็นผลิตภัณฑ์ของโรงพยาบาลในจังหวัดอุทธรณ์ และ H-5 เป็นผลิตภัณฑ์ของโรงพยาบาลในจังหวัดพิษณุโลก พบว่าตัวอย่างยาธาตุบดเซยที่นำมาวิเคราะห์มีปริมาณสาร cinnamic acid 0.04 ถึง 0.11% w/w ปริมาณสาร glycyrrhizin  $0.70 \pm 0.05$  ถึง  $3.15 \pm 0.42\%$  w/w และพบสาร eugenol  $0.19 \pm 0.02$  ถึง  $3.38 \pm 0.09\%$  w/w จากผลการศึกษาพบว่าปริมาณสารบ่งชี้ในตำรับยาธาตุบดเซยจะมีความแตกต่างกันโดยเฉพาะปริมาณของสาร eugenol เนื่องจากความแตกต่างของคุณภาพเครื่องยาแต่ละแหล่ง วิธีการเตรียมยาซึ่งตำรับยาธาตุบดเซยเป็นยาต้ม ดังนั้นอุณหภูมิและเวลาในการต้มเป็นปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณสารสำคัญโดยเฉพาะสารที่ระเหยได้ของตำรับ เมื่อพิจารณา HPLC chromatogram ของตำรับยาธาตุบดเซยที่เตรียมขึ้นเองทั้ง 3 ตัวอย่าง (L1 ถึง L3) และของผลิตภัณฑ์ของโรงพยาบาลในจังหวัดอุบลราชธานี (H-1) จะไม่มี peak ที่ retention time 30.25 นาที ดังปรากฏใน chromatogram ของผลิตภัณฑ์ของโรงพยาบาลตัวอย่างที่ H-2 ถึง H-5 ซึ่งอาจเกิดจากการใส่สารถนอม (preservative) ลงใน

ผลิตภัณฑ์เพื่อวัยชราอายุผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้การเก็บรักษา ก่อนจำหน่ายก็มีผลต่อคุณภาพผลิตภัณฑ์เช่นกัน<sup>[13]</sup>

## ข้อสรุป

การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีของตำรับยาธาตุอุบเชยโดยโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูงที่ศึกษา นี้ สามารถใช้เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ตำรับยาธาตุอุบเชยโดยผลในเบื้องต้นพบว่าตำรับมีสาร gallic acid, สาร cinnamic acid, สาร glycyrrhizin, สาร cinnamaldehyde และสาร eugenol เป็นองค์ประกอบ และยังสามารถใช้วิเคราะห์หาปริมาณสารเคมีทั้ง 3 ชนิด cinnamic acid, glycyrrhizin และ eugenol ในตำรับยาธาตุอุบเชยได้

ทั้งนี้ ตำรับยาธาตุอุบเชยยังมีองค์ประกอบส่วนหนึ่งเป็นสารกลุ่มโมโนเทอร์ปีนส์ซึ่งไม่มีคุณสมบัติดูดกลืนแสงยูวี-วิสิเบิล จึงควรต้องหาวิธีการอื่นร่วมวิเคราะห์ด้วย

## References

- Boonyaprapat N, Chokchaicharoenporn O. Medicinal plants indigenous to Thailand 5. Bangkok: Prachachon Co. Ltd; 2000. 508 p. (in Thai)
- Boonyaprapat, N. Chokchaicharoenporn O. Medicinal plants indigenous to Thailand 1. Bangkok: Prachachon Co. Ltd; 1996. 895 p. (in Thai)
- Ayurveda college (Komarapat). Textbook of Thai traditional pharmacy. Bangkok: Usa printing; 2016. 264 p. (in Thai)
- Jindarat S, Muangnoi C, Changsiriporn D, Platong A, Thanamontra B, Chiewchanwit D, Vongvanvatana V, Rongrungsri N, Krittasilp K, Kaewkong N, Kantawan S, Virasombat N, Mongkolporn V, Prakobkij W, Wanleepong K, Maneekul C, Benchakhanta S, Boonpok P, Kunasat W, Tongkleaw L, Vatthanasak A, Mookkhan J, Jatuporn C, Tuntiprawan K, Teerawongseer S, Ussawasrisuwan S, Thamcharoen P, Keawsontaya T, Chuthaputti A, Termviset P, Thamlikitkul V. Efficacy and safety of cinnamon stomachic mixture for patients with functional dyspepsia. *Siriraj Medical Journal*. 2006;58(11):1103-6.
- Gursale A, Dighe V, Parekh G. Simultaneous quantitative determination of cinnamaldehyde and methyl eugenol from stem bark of *Cinnamomum zeylanicum* Blume using RP-HPLC. *Journal of Chromatographic Science*. 2010;48(1):59-62.
- Cortês-Rojas DF, de Souza CRF, Oliveira WP. Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2014;4(2):90-6.
- Wang Z, Kurosaki Y, Nakayama T, Kimura T. Mechanism of gastrointestinal absorption of glycyrrhizin in rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 1994;17(10):1399-403.
- Baruah A, Nath SC. Panicle and bark oils of a variant of *Cinnamomum bejolghota* (Buch-Ham) Sweet. from North East India. *Journal of Spices and Aromatic Crops*. 2002;11(2):135-7.
- Sirat HM, Lim FH, Khaw SH. Chemical compositions of the essential oil of the fruits of *Amomum testaceum* Ridl. *Journal of Essential Oil Research*. 2001;13:86-7.
- ICH. Guidance for industry Q2B Validation of analytical procedures: methodology. International Conference on Harmonization; Geneva. Switzerland: 1996.
- Nanjundaiah SM, Annaiah HN, Dharmesh SM. Gastro-protective effect of ginger rhizome (*Zingiber officinale*) extract: role of gallic acid and cinnamic acid in H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase/*H. pylori* inhibition and anti-oxidative mechanism. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011;2011:249487. doi: 10.1093/ecam/nep060. PubMed PMID: PMC3136331
- Santin JR, Lemos M, Klein-Júnior LC, Machado ID, Costa P, de Oliveira AP, Tilia C, de Souza JP, de Sousa JPB, Bastos JK, de Andrade SF. Gastroprotective activity of essential oil of the *Syzygium aromaticum* and its major component eugenol in different animal models. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2011;383(2):149-58.
- Yang DZ, An YQ, Jiang XL, Tang DQ, Gao YY, Zhao HT, Wu XW. Development of a novel method combining HPLC fingerprint and multi-ingredients quantitative analysis for quality evaluation of traditional Chinese medicine preparation. *Talanta*. 2011;85(2):885-90.