

การศึกษาลายพิมพ์องค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของ quercetin, isoquercetin
และ quercitrin จากเพชรสังฆาต



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาการเภสัชภัณฑ์

ธันวาคม 2560

การศึกษาลายพิมพ์องค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของ quercetin, isoquercetin
และ quercitrin จากเพชรสังฆาต



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาการเภสัชภัณฑ์

ธันวาคม 2560

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การศึกษาลายพิมพ์องค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของ quercetin isoquercetin
และ quercitrin จากเพชรสังฆาต



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาการเภสัชภัณฑ์
ธันวาคม 2560

การณินนา เพ็ญ. (2560). การศึกษาลายพิมพ์องค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของ quercetin, isoquercetin และ quercitrin จากเพชรสังฆาต. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (วิทยาการเภสัชภัณฑ์). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : อาจารย์ ดร.วิภาพร เสรีเด่นชัย และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วัฒนพร พัฒนภักดี

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์: เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ลายพิมพ์องค์ประกอบทางเคมี และวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในกลุ่ม flavonoids จากเถาเพชรสังฆาต ด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC) และ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) วิธีการศึกษา: เก็บตัวอย่างเพชรสังฆาตจาก 4 ภูมิภาคของประเทศไทย จำนวน 18 ตัวอย่าง เถาเพชรสังฆาตทำความสะอาด และอบแห้ง ทำการสกัดเพชรสังฆาตด้วยเมทานอล ระเหยตัวทำละลายให้แห้ง นำสารสกัดมาวิเคราะห์จัดทำลายพิมพ์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค TLC และเทคนิค HPLC โดยเทียบกับสารมาตรฐานกลุ่มฟลาโวนอยด์ 3 ชนิด คือ quercetin isoquercetin และ quercitrin ตามวิธีการวิเคราะห์ของ International Conference on Harmonization (ICH guideline) ผลการทดลอง: ลายพิมพ์องค์ประกอบทางเคมีจากเทคนิค TLC และเทคนิค HPLC มีลักษณะลายพิมพ์องค์ประกอบทางเคมีคล้ายคลึงกันทั้ง 18 ตัวอย่าง พบ quercitrin ที่มีรายงานว่าเป็นองค์ประกอบทางเคมีของ *Cissus quadrangularis* L. ในปริมาณสูงที่สุดในทุกตัวอย่างที่ศึกษา สรุป: วิธี HPLC ที่พัฒนาเพื่อวิเคราะห์ฟลาโวนอยด์ quercetin isoquercetin และ quercitrin ในเพชรสังฆาตมีความถูกต้องแม่นยำ เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานของ USP37 และตัวอย่างเพชรสังฆาตทุกแหล่งที่นำมาศึกษาพบปริมาณสาร quercitrin สูงสุด ซึ่งเหมาะสำหรับการนำมาประยุกต์เป็นสารเทียบ (marker) ในการควบคุมคุณภาพเชิงเอกลักษณ์และปริมาณสารสำคัญของสมุนไพรเพชรสังฆาตทั้งในรูปแบบวัตถุดิบ สารสกัด และผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่มีเพชรสังฆาตเป็นองค์ประกอบหลัก ตลอดจนสมุนไพรที่มีสาร quercitrin เป็นองค์ประกอบสำคัญ

DEVELOPMENT OF THE CHROMATOGRAPHIC FINGERPRINT ANALYSIS OF QUERCETIN
ISOQUERCETIN AND QUERCITRIN FROM *CISSUS QUADRAGULARIS* L.



Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Master of Science in Pharmaceutical Product Development
at Srinakharinwirot University

December 2017

Kannapa Puekhu. (2017). Development of the Chromatographic Fingerprints Analysis of Quercetin, Isoquercetin and Quercitrin from *Cissus quadrangularis* L. Master thesis, M.Sc. (Pharmaceutical Product Development). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Dr. Vipaporn Sareedenchai, Asst. Prof. Dr. Wattanaporn Phattanaphakdee.

This research aims to study chemical fingerprints and to develop on analytical method of *C. quadrangularis* L. using flavonoids as a marker with TLC and HPLC. The methodology used in this study was as follows: *C. quadrangularis* L. were collected from region of Thailand. Eighteen samples of *C. quadrangularis* were cleaned, dried and ground. The *C. quadrangularis* were extracted by methanol for study chemical fingerprints using TLC and HPLC. Quercetin, isoquercetin and quercitrin are markers used in the analytical method. The validation method is based an international conference on harmonization (ICH guideline). The results of the study were as follows: The chemical fingerprints of eighteen samples were similar in terms of the study of TLC and HPLC. Quercitrin presented higher amounts in all samples. The analytical method using HPLC were in compliance with USP37. This method was found to be suitable for use in the analysis of flavonoids, quercetin, isoquercetin and quercitrin, in the form of raw materials, extracted and a product of *C. quadrangularis*. Quercitrin was found and presented a higher amount than quercetin and isoquercetin in all sample. As a result, quercitrin was found to be suitable for a marker for raw materials, crude extracted or a product of *C. quadrangularis* L.

สัญลักษณ์และคำย่อ

%	=	ร้อยละ (เปอร์เซ็นต์)
%yield	=	ร้อยละปริมาณสารสกัด
HPLC	=	High Performance Liquid Chromatography
Min	=	Minute
N	=	Number of theoretical plates
R_f	=	Relative front
R_t	=	Retention time
R_s	=	Resolution
T	=	Tailing factor
TLC	=	Thin Layer Chromatography
UV	=	Ultraviolet
hR_f	=	$R_f \times 100$ (ค่า R_f จะเป็นค่าเฉพาะของสารนั้นๆ ในสภาวะหนึ่งๆ)
g/mL	=	กรัมต่อมิลลิลิตร
mg/mL	=	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
$\mu\text{g/mL}$	=	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
ppm	=	Parts per million

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ล่วงได้ด้วยดีนั้น เนื่องจากผู้วิจัยได้รับความกรุณาช่วยเหลือ พร้อมทั้ง ข้อเสนอแนะ แนวทางแก้ไขปัญหา ปรับปรุงให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์ และถูกต้อง ตลอดจนดูแลเอาใจใส่การดำเนินงานวิจัยทุกขั้นตอนอย่างดียิ่งจาก อาจารย์ ดร.วิภาพร เสรีเด่นชัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วัฒนพร พัฒนภักดี และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ชญานิศ ศรชัยธวัชวงศ์ พร้อมทั้งเป็นผู้ให้ความรู้ที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยนี้อย่างดียิ่ง ให้คำปรึกษาเพื่อนำไปพัฒนางานวิจัย ให้มีความสมบูรณ์และทรงคุณค่า สามารถนำไปใช้ประโยชน์ให้แก่สังคมและประเทศชาติได้ ทั้งนี้ผู้วิจัย ขอ กราบพระคุณเป็นอย่างสูงในความกรุณาของอาจารย์ที่ปรึกษา ที่ได้เสียสละเวลาที่มีค่าทุ่มเทให้กับ งานด้านการวิจัยและพัฒนาอย่างไม่เหน็ดเหนื่อย ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งและขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่าง สูง ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.นริศ คำแก่น ที่ให้ความกรุณาเป็นประธานการ สอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วีระศักดิ์ สามิ ที่ให้ความกรุณาเป็นกรรมการสอบ ปากเปล่าปริญญานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒทุกท่านที่ ประสิทธิ์ประสาทความรู้ และทำให้ผู้วิจัยสามารถนำความรู้ที่ได้นั้นมาใช้เพื่อให้เกิดประโยชน์ตลอดจน ทำให้งานวิจัยสำเร็จล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ในกองปฏิบัติการคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ทุกท่านที่คอยช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการเบิกจ่ายอุปกรณ์ และสารเคมีมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒที่เอื้ออำนวยความสะดวกในการ ทำงานวิจัยให้สำเร็จล่วงไปด้วยดี

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และทุกคนในครอบครัวที่ให้โอกาส ให้การ สนับสนุน ตลอดจนเป็นกำลังใจในการศึกษากับผู้วิจัยเป็นอย่างดีเยี่ยมเสมอมา

การณันภา เผือกหนู

สารบัญ

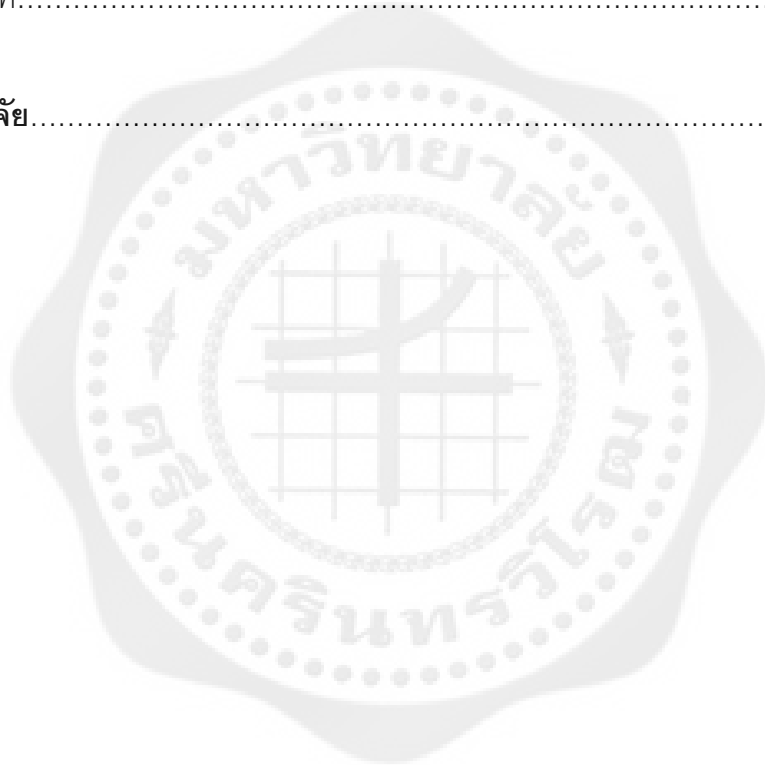
บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
ขอบเขตของโครงการวิจัย.....	3
นิยามศัพท์.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
การควบคุมคุณภาพ และกำหนดมาตรฐานสมุนไพร.....	5
สมุนไพรเพชรสังฆาต	
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของเพชรสังฆาต.....	7
การใช้ประโยชน์จากเพชรสังฆาต.....	8
องค์ประกอบทางเคมีของเพชรสังฆาต.....	12
การตรวจสอบเอกลักษณ์ของเพชรสังฆาต.....	16
ข้อกำหนดมาตรฐานคุณภาพของเพชรสังฆาต.....	17
ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของเพชรสังฆาต.....	17
ยาสมุนไพรเพชรสังฆาตกับการรักษาโรคหลอดเลือดหัวใจ.....	18
การศึกษาความเป็นพิษของเพชรสังฆาต.....	21
ฟลาโวนอยด์ (flavonoids).....	21
ประโยชน์ของสารฟลาโวนอยด์.....	24
การตรวจสอบและพิสูจน์เอกลักษณ์ของฟลาโวนอยด์.....	25
สารสำคัญหรือสารเทียบของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบในต้นเพชรสังฆาต..	26
การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ quercetin isoquercetin และ quercitrin	28
Chromatographic fingerprints.....	29
Thin Layer Chromatography (TLC).....	30
High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	32
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	36

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
3	วิธีดำเนินการวิจัย..... 38
	อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย..... 38
	วิธีการทดลอง..... 40
	ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสมุนไพรสังฆาต..... 40
	ขั้นตอนการสกัด..... 41
	การตรวจสอบ chromatographic fingerprint ของพืชสังฆาต ด้วยเทคนิค TLC..... 42
	การตรวจสอบ chromatographic fingerprint ของพืชสังฆาต ด้วยเทคนิค HPLC..... 43
	การศึกษา system suitability..... 44
	การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์..... 44
	การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญจากสารสกัดเถาพืชสังฆาต..... 46
4	ผลการทดลอง และอภิปรายผลการทดลอง..... 48
	ลักษณะตัวอย่างของพืชสังฆาต..... 48
	การเตรียมตัวอย่าง..... 48
	ค่าร้อยละปริมาณสารสกัด (%yield) ของเถาพืชสังฆาต..... 50
	สภาวะที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่ในการวิเคราะห์ปริมาณสาร quercetin, isoquercetin และ quercitrin ด้วยเทคนิค TLC..... 52
	สภาวะที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่ในการวิเคราะห์ปริมาณสาร quercetin isoquercetin และ quercitrin ด้วยเทคนิค HPLC..... 60
	ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์..... 63
	ผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร quercetin isoquercetin และ quercitrin ใน ตัวอย่างเถาพืชสังฆาต..... 69
5	สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ..... 74

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
บรรณานุกรม.....	79
ภาคผนวก.....	86
ภาคผนวก ก.....	87
ภาคผนวก ข.....	90
ภาคผนวก ค.....	99
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	101



บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 แสดงกลุ่มสารสำคัญที่พบในเพชรสังฆาต.....	12
2 แสดงข้อกำหนดมาตรฐานคุณภาพของเพชรสังฆาต ตามมาตรฐาน Thai Herbal Pharmacopoeia.....	17
3 แสดงคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของสาร quercetin.....	26
4 แสดงคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของสาร isoquercetin.....	27
5 แสดงคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของสาร quercitrin.....	28
6 แสดงเกณฑ์การพิจารณาการทดสอบความเหมาะสมของระบบ HPLC.....	34
7 แสดงอัตราส่วนและอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase).....	44
8 แสดงผลการสรุปน้ำหนักเกาเพชรสังฆาตสด และเพชรสังฆาตแห้ง.....	50
9 แสดงร้อยละของสารสกัดเกาเพชรสังฆาตจาก 18 ตัวอย่างที่สกัดด้วย methanol...	51
10 แสดงค่า hR_f และผลการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดเพชรสังฆาต ภูมิภาคเคลื่อนที่ 1.....	57
11 แสดงค่า hR_f และผลการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดเพชรสังฆาต ภูมิภาคเคลื่อนที่ 2.....	57
12 แสดงค่า hR_f และผลการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดเพชรสังฆาต ภูมิภาคเคลื่อนที่ 3.....	58
13 แสดงการเปรียบเทียบค่า hR_f จำนวน 3 ภูมิภาคเคลื่อนที่ โดยเรียงจากความมีขั้วน้อยไปขั้วมากในตัวอย่างเกาเพชรสังฆาต 18 แหล่ง.....	59
14 แสดงอัตราส่วนและอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase).....	61
15 แสดงสรุปผลพารามิเตอร์การทดสอบความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ของสาร isoquercetin, quercitrin และ quercetin (n=6).....	62
16 แสดงค่า retention time ของสาร isoquercetin, quercitrin และ quercetin ของสารมาตรฐาน และตัวอย่างเพชรสังฆาต จำนวน 18 ตัวอย่าง	64
17 แสดงสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานและ coefficient of determination (R^2) ของสาร quercetin ปริมาตรที่วิเคราะห์ 40 ไมโครลิตร และสาร isoquercetin และ quercitrin ปริมาตรที่วิเคราะห์ 20 ไมโครลิตร.....	65

บัญชีตาราง (ต่อ)

ตาราง	หน้า
18 ผลการทดสอบความถูกต้อง (Accuracy) และความแม่นยำ (Intra day precision) ของวิธีวิเคราะห์ quercetin, quercitrin และ isoquercetin	67
19 แสดงผลการทดสอบความแม่นยำ (inter-day precision) ของวิธีวิเคราะห์ quercetin, isoquercetin และ quercitrin.....	68
20 แสดงความเข้มข้นต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (Limit of detection, LOD) และความเข้มข้นต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ)...	69
21 แสดงปริมาณของสาร quercetin, isoquercetin และ quercitrin (mg $\pm$ SD) ในตัวอย่างผงเพชรสังฆาตบดหยาบ จำนวน 18 ตัวอย่าง ของการทดลอง 3 ซ้ำ.....	70
22 แสดงผลการทดสอบหาความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ isoquercetin ที่ความเข้มข้น 8 μ g/ml.....	88
23 แสดงผลการทดสอบหาความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ quercitrin ที่ความเข้มข้น 40 μ g/ml.....	88
24 แสดงผลการทดสอบหาความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ quercetin ที่ความเข้มข้น 4.88 μ g/ml.....	89
25 แสดงค่าดูดกลืนแสงของสาร quercetin isoquercetin และ quercitrin (0.02 mg/ml)....	100

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 แสดงลักษณะต้นพืชสังฆาต (<i>Cissus quadrangularis</i> L.).....	9
2 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่ม flavonoids ในพืชสังฆาต.....	14
3 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่ม steroid ในพืชสังฆาต.....	15
4 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่ม triterpenoids บางชนิดในพืชสังฆาต.....	15
5 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่ม stilbene บางชนิดในพืชสังฆาต.....	16
6 แสดงโครงสร้างแกนแบบ C ₆ -C ₃ -C ₆	21
7 แสดงโครงสร้างแกนแบบ C ₆ -C ₃ -C ₆ และตัวอย่างสารฟลาโวนอยด์บางกลุ่ม.....	22
8 แสดงตัวอย่างเถาพืชสังฆาตสด จำนวน 18 ตัวอย่าง.....	49
9 Chromatographic fingerprints ของสารสกัดเถาพืชสังฆาตและสารเทียบ	
วัฏภาคเคลื่อนที่ 1. toluene: ethyl acetate: formic acid	54
10 Chromatographic fingerprints ของสารสกัดเถาพืชสังฆาตและสารเทียบ	
วัฏภาคเคลื่อนที่ 2. toluene: ethyl acetate: formic acid: methanol.....	55
11 Chromatographic fingerprints ของสารสกัดเถาพืชสังฆาตและสารเทียบ	
วัฏภาคเคลื่อนที่ 3. toluene: ethyl acetate: formic acid: methanol.....	56
12 แสดง Chromatographic fingerprints ของสารมาตรฐาน isoquercetin, quercitrin และ quercetin ตามลำดับ ที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตร.....	61
13 แสดงลักษณะ Chromatographic fingerprint ของ (-) สารมาตรฐาน isoquercetin quercitrin และ quercetin (-) ตัวอย่างพืชสังฆาต จากเชียงใหม่ 1.....	63
14 แสดงช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน ที่ความเข้มข้นของ quercetin ช่วง 1.22-12.19 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม.....	65
15 แสดงช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน ที่ความเข้มข้นของ isoquercetin ช่วง 1-16 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม.....	66
16 แสดงช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (n=3) ที่ความเข้มข้นของ quercitrin ช่วง 2.5-80 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม.....	66

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
17 แสดงกราฟแสดงการเปรียบเทียบปริมาณสาร quercetin, isoquercetin และ quercitrin (mg $\pm$ SD) ในตัวอย่างผงเพชรสังฆาตบดหยาบจำนวน 18 ตัวอย่าง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (*) ไม่อยู่ในช่วงของการวิเคราะห์.....	71
18 กราฟแสดงการเปรียบเทียบปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (total flavonoids) ใน ตัวอย่างผงเพชรสังฆาตบดหยาบ จำนวน 18 ตัวอย่าง.....	71
19 Chromatographic fingerprint ของตัวทำละลาย methanol ที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตร.....	91
20 Chromatographic fingerprint ของสารมาตรฐาน isoquercetin, quercitrin และ quercetin ตามลำดับ ที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตร.....	91
21 แสดงลักษณะ Chromatographic fingerprint ของสารมาตรฐาน (-) isoquercetin, quercitrin และ quercetin ตามลำดับ และ (-) ตัวอย่างเพชรสังฆาตจาก จังหวัดเชียงใหม่ 1.....	91
22 แสดงลักษณะ Chromatographic fingerprint ของ (A) เพชรสังฆาตจากเชียงใหม่ 1 ที่ความเข้มข้น 5 mg/ml (B) สารมาตรฐานผสม isoquercetin , quercitrin และ quercetin ที่ความเข้มข้น 0.02 mg/ml และ (C) ตัวอย่างเพชรสังฆาต (5mg/ml) ที่เติมสารละลายมาตรฐานผสม (0.02 mg/ml)	92
23 Chromatographic fingerprint ของเพชรสังฆาตจากภาคเหนือ.....	93
24 Chromatographic fingerprint ของเพชรสังฆาตจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ.....	94
25 Chromatographic fingerprint ของเพชรสังฆาตจากภาคกลาง.....	95
26 Chromatographic fingerprint ของเพชรสังฆาตจากภาคใต้.....	97
27 อัลตราไวโอเลตวิสิเบิลสเปกตรัมของ quercetin isoquercetin และ quercitrin ในตัวทำละลาย methanol.....	100

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

โรคริดสีดวงทวาร (hemorrhoid) เป็นโรคที่เกิดจากหลอดเลือดดำที่ใต้เยื่อเมือกและผิวหนังในบริเวณทวารหนักมีการโป่งพอง และมีการอักเสบ เนื่องจากมีภาวะความดันในหลอดเลือดดำสูงจากสาเหตุต่างๆ เช่น การเบ่งถ่ายอุจจาระ ท้องผูก การตั้งครรภ์ การรับประทานอาหารที่มีกากใยน้อย เป็นต้น ผู้ที่เป็นโรคริดสีดวง ทำให้เกิดอาการเจ็บปวด คันบริเวณทวารหนัก และมีการปริแตกของผนังหลอดเลือดขณะเบ่งถ่ายอุจจาระ ทำให้มีเลือดออกเป็นครั้งคราว ริดสีดวงทวารแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ ริดสีดวงทวารภายนอก (external hemorrhoid) และริดสีดวงทวารภายใน (internal hemorrhoid) สำหรับริดสีดวงภายในหลอดเลือดดำจะโป่งพองภายในไส้ตรงและเจ็บปวดน้อยกว่าริดสีดวงภายนอก ขณะที่ริดสีดวงภายนอกเกิดจากหลอดเลือดดำที่อยู่ใต้ผิวหนังตรงปากทวารหนัก¹ การรักษาโรคริดสีดวงมีหลายวิธี และการรักษาด้วยการใช้ยาสมุนไพรเป็นอีกวิธีหนึ่ง สมุนไพรที่ใช้ในการรักษาโรคริดสีดวงทวารต้องมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ มีฤทธิ์ในการบำรุงหลอดเลือดดำ และมีฤทธิ์ในการบรรเทาปวด ฉะนั้นการรักษาด้วยยาสมุนไพรจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับผู้ป่วยในปัจจุบัน² สมุนไพรเพชรสังฆาต (*Cissus quadrangularis* L.) เป็นสมุนไพรที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการรักษาโรคริดสีดวงทวารหนัก ในตำรายาไทยใช้เถาสด รักษาโรคริดสีดวงทวารหนัก โดยการหั่นเป็นแว่นบางๆ แล้วใช้เนื้อมะขามเปียกหรือเนื้อกล้วยสุกหุ้มก่อนรับประทาน³ ในบัญชียาจากสมุนไพร ฉบับที่ 4 พ.ศ. 2554 ระบุว่า เพชรสังฆาตเป็นองค์ประกอบหลักของตำรับยาผสมเพชรสังฆาต ใช้เป็นยาบรรเทาโรคริดสีดวงทวารหนัก มี 2 สูตร (สูตรที่ 1 ประกอบด้วย เพชรสังฆาต 70 กรัม รากอัคคีทวาร 20 กรัม และโกฐน้ำเต้า 10 กรัม รับประทานครั้งละ 1.2 กรัม และสูตรที่ 2 ประกอบด้วย เพชรสังฆาต 50 กรัม กะเม็ง 15 กรัม โกฐน้ำเต้า และ กระชายอย่างละ 10 กรัม รับประทานครั้งละ 0.5-1 กรัม) โดยใช้รูปแบบรับประทาน ยาผงสมุนไพรแห้ง หรือผงยาสมุนไพรบรรจุแคปซูล รับประทานวันละ 3 ครั้ง หลังอาหารทันที รายงานวิจัยการใช้ผงสมุนไพรเพชรสังฆาตบรรจุแคปซูลในการรักษาโรคริดสีดวงทวาร เปรียบเทียบกับยาแผนปัจจุบัน (Daflon[®]) ซึ่งสารสำคัญคือ diosmin 450 มิลลิกรัม และ hesperidin 50 มิลลิกรัม ซึ่งเป็นสารกลุ่ม flavonoids พบว่าสมุนไพรเพชรสังฆาตมีฤทธิ์การรักษาไม่แตกต่างจากการใช้ยา Daflon⁴⁻⁵ สารสกัดเพชรสังฆาตมีประสิทธิภาพในการรักษาภาวะเลือดออก อาการปวดทวาร หลอดเลือดขอดที่ยื่นออกมาจากทวารหนัก และความพึงพอใจหลังการรักษาไม่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าสารสกัดเพชรสังฆาตให้ผลการรักษาเทียบเท่ากับยา Cyclo 3 Fort ซึ่งมีส่วนประกอบสำคัญคือ hesperidin methyl chalcone 150 มิลลิกรัม ซึ่งเป็นสารกลุ่ม flavonoid⁶

ปัจจุบันมาตรฐานการผลิตยาสมุนไพรตามหลักเกณฑ์และวิธีผลิตยาแผนโบราณตามกฎหมายว่าด้วยยา พ.ศ.2557 (GMP/PICs) ระบุให้มีการตรวจสอบคุณภาพสมุนไพรทั้งเชิงปริมาณและคุณภาพของส่วนประกอบด้วยสำคัญ หากไม่ทราบว่าเป็นสารออกฤทธิ์ให้กำหนดสารมาตรฐานในรูปของสารเทียบเพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพของสมุนไพร ฉะนั้นสมุนไพรที่จะพัฒนาสู่ผลิตภัณฑ์จึงจำเป็นต้องมีการควบคุมคุณภาพวัตถุดิบ กระบวนการผลิต ตลอดจนไปถึงผลิตภัณฑ์

ในการควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบสมุนไพรเพชรสังฆาต เพื่อให้มีคุณภาพและประสิทธิผลในการรักษาตรงตามที่ระบุ จำเป็นต้องมีการตรวจสอบข้อมูลตั้งแต่ ชื่อสมุนไพร ส่วนที่ใช้ ลักษณะของตัวอย่าง เอกลักษณะทางเคมี ปริมาณสารสำคัญ สิ่งแปลกปลอม และข้อมูลทางเภสัชวิทยา เทคนิคการทดสอบสารสำคัญได้หลายชนิดในเวลาเดียวกัน ที่นิยมใช้คือ chromatographic fingerprints ซึ่งเป็นการทดสอบที่อาศัยเทคนิค chromatographic fingerprints การแยกสารผสมให้แยกออกจากกันจะแสดงผล chromatogram ต่อจากนั้นจึงนำผล chromatogram ของสารสกัดจากเพชรสังฆาตมาเปรียบเทียบกับ chromatogram ของสารมาตรฐาน เทคนิคการทดสอบที่นิยมใช้ในการทำ chromatographic fingerprints เช่น High Performance Thin Layer Chromatography; HPTLC, gas chromatography; GC , High Performance Liquid Chromatography; HPLC ⁷ ซึ่งงานวิจัยชิ้นนี้ได้นำเทคนิค chromatographic fingerprints มาใช้ในการควบคุมคุณภาพวัตถุดิบสมุนไพรเพชรสังฆาตด้วยเทคนิค TLC และเทคนิค HPLC โดยการตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยลายพิมพ์ของสารกลุ่ม flavonoid จำนวน 3 ชนิด คือ quercetin, isoquercetin และ quercitrin มาใช้ในการควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบสมุนไพรเพชรสังฆาต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ลายพิมพ์องค์ประกอบทางเคมีของสมุนไพรเพชรสังฆาตโดยเทคนิค TLC และเทคนิค HPLC
2. เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญกลุ่ม flavonoids ในเพชรสังฆาตโดยใช้เทคนิค HPLC
3. เพื่อเปรียบเทียบลายพิมพ์องค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของสารกลุ่ม flavonoids ในสมุนไพรเพชรสังฆาตจากแหล่งต่างๆ

ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยเชิงทดลองมุ่งศึกษาลักษณะลายพิมพ์องค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของสมุนไพรเพชรสังฆาต โดยใช้เทคนิค TLC และเทคนิค HPLC พัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณกลุ่ม

flavonoids จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ quercetin, isoquercetin และ quercitrin วิธีที่พัฒนาขึ้นต้องสามารถแยกสารทั้ง 3 ชนิด ตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมาตาม ICH guideline และเปรียบเทียบลักษณะลายพิมพ์องค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของสมุนไพรเพชรสังฆาต อย่างน้อย 12 แหล่ง จากทุกภาคของประเทศไทย

ตัวแปรที่ศึกษา

1. สภาวะในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC ได้แก่ stationary phase, mobile phase, relative front (R_f) และสภาวะในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC เช่น column, mobile phase, flow rate, injected, detector และ retention time
2. ลักษณะลายพิมพ์องค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของสมุนไพรเพชรสังฆาตจากแหล่งต่างๆ
3. ปริมาณของสารสำคัญกลุ่ม flavonoids ได้แก่ quercetin, isoquercetin และ quercitrin ในสมุนไพรเพชรสังฆาตจำนวน 18 แหล่ง

นิยามศัพท์

1. การควบคุมคุณภาพ (quality control) ยาจากสมุนไพร หมายถึง กระบวนการที่จัดทำขึ้นอย่างเป็นระบบ เพื่อให้ได้คุณภาพของยาจากสมุนไพรตามมาตรฐานที่กำหนด ตั้งแต่การควบคุมคุณภาพของสมุนไพรที่เป็นวัตถุดิบสมุนไพรที่อยู่ระหว่างการผลิต และยาจากสมุนไพรสำเร็จรูป ให้ได้มาตรฐานตามเภสัชตำรับ
2. วิธีโครมาโทกราฟี (chromatography) หมายถึง วิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ลายพิมพ์องค์ประกอบทางเคมี และวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญโดยใช้สารเทียบ (marker) โดยเทคนิค TLC และเทคนิค HPLC ซึ่งวิธีนี้สามารถวิเคราะห์สารได้หลายชนิดในครั้งเดียวกัน
3. ลายพิมพ์องค์ประกอบทางเคมี (Chromatographic fingerprints) หมายถึง ลายพิมพ์องค์ประกอบทางเคมีที่มีลักษณะเฉพาะของสมุนไพรเพชรสังฆาต
4. สารเทียบ (marker) หมายถึง สารกลุ่ม flavonoids จำนวน 3 ชนิด ประกอบด้วย quercetin isoquercitrin และ quercitrin ที่นำมาใช้เป็นสารเทียบในการศึกษาลายพิมพ์องค์ประกอบทางเคมี และประยุกต์ใช้ในการควบคุมคุณภาพวัตถุดิบของสมุนไพรเพชรสังฆาต
5. สารหลัก (major compound) หมายถึง แอบสารที่พบในทุกแหล่งของเพชรสังฆาต และพบที่ค่า R_f เดียวกัน เช่น เพชรสังฆาตทุกแหล่งที่นำมาศึกษาพบสาร quercitrin ซึ่งแอบสารสีเข้มและที่มีค่า R_f เท่ากับ 8 ในสภาวะการศึกษาวงภาคที่ 2 เป็นต้น

สมมติฐานการวิจัย

1. วิธีวิเคราะห์ลายพิมพ์องค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของสมุนไพรสังฆาตที่พัฒนาขึ้นเป็นไปตามเกณฑ์ ICH guideline
2. วิธีวิเคราะห์หาปริมาณสาร quercetin, isoquercetin และ quercitrin ที่พัฒนาเป็นไปตามเกณฑ์ AOAC
3. สมุนไพรสังฆาตจากแหล่งต่างๆ มีสารสำคัญกลุ่ม flavonoids ในปริมาณที่ไม่แตกต่างกัน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ข้อมูลลายพิมพ์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของสมุนไพรสังฆาต
2. ได้วิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญกลุ่ม flavonoids ของพืชสังฆาตด้วยเทคนิค HPLC
3. ได้วิธีการควบคุมคุณภาพปริมาณสารสำคัญของสมุนไพรสังฆาต

สถานที่ทำการวิจัย

1. ห้องปฏิบัติการเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
2. ห้องปฏิบัติการเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และได้นำเสนอตามหัวข้อต่อไปนี้

- 1.การควบคุมคุณภาพ และกำหนดมาตรฐานสมุนไพร
- 2.สมุนไพรเพชรสังฆาต (*Cissus quadrangularis* L.)
- 3.ฟลาโวนอยด์ (flavonoids)
- 4.Chromatographic fingerprints
- 5.โครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (Thin Layer Chromatography; TLC)
- 6.โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatographic; HPLC)
- 7.การทดสอบความเหมาะสมของระบบในวิธีทางโครมาโทกราฟี
- 8.การตรวจสอบความถูกต้องของวิธี (method validation)
- 9.งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. การควบคุมคุณภาพ และกำหนดมาตรฐานสมุนไพร⁸

ปัจจุบันมีการนำสมุนไพรอันเป็นทรัพยากรที่มีค่าของประเทศ มาใช้ประโยชน์ทางสาธารณสุขกันอย่างแพร่หลาย ทั้งที่ใช้เป็นอาหาร ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร เครื่องสำอางและใช้เป็นยา เนื่องจากพบอาการไม่พึงประสงค์ร้ายแรงจากการใช้ยาแผนปัจจุบัน ประกอบกับความเชื่อที่ว่าสารจากสมุนไพรเป็นสารธรรมชาติจึงมีความปลอดภัยสูงกว่าสารจากการสังเคราะห์ ทำให้แนวโน้มการใช้สมุนไพรมากขึ้น สมุนไพรที่นำมาใช้อาจเป็นสมุนไพรสด (fresh plant) สมุนไพรแห้ง (crude drug) สารสกัดจากพืช (plant extract) หรือผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป (finished product) อย่างไรก็ตามการนำสมุนไพรมาใช้รักษาโรคนั้นมักประสบปัญหาความไม่แน่นอนของประสิทธิภาพในการรักษา การที่สมุนไพรมีคุณภาพแตกต่างกันมีสาเหตุปัจจัยดังนี้

1. การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี (biochemical variation): เป็นความแตกต่างของสารประกอบทางเคมีในพืช ซึ่งอาจเกิดจากสายพันธุ์ แหล่งปลูก ระยะเวลาในการเก็บเกี่ยว เป็นต้น
2. การปนเปื้อน (contamination): การที่มีส่วนของพืชชนิดอื่นปะปนมา หรือการปนเปื้อนของดินทรายจากการทำความสะอาดไม่ดี เป็นต้น

3. การเสื่อมสภาพ (deterioration): การที่สมุนไพรเสื่อมสภาพจากการเก็บเป็นเวลานาน การเก็บรักษาสมุนไพรไม่ถูกวิธี หรือการเน่าเสีย ล้วนส่งผลให้สมุนไพรมีคุณภาพต่ำลง

4. การทดแทน (substitution) และการปนปลอม (adulteration): เป็นการนำสมุนไพรอื่นที่มีลักษณะคล้ายคลึงกันแต่ราคาถูกลงกว่า มาใช้ปนปลอม หรือใช้ทดแทนทั้งหมด

5. ความรู้และประสบการณ์ (experience) ผู้นำสมุนไพรมาใช้ควรมีความรู้และประสบการณ์มากพอ เพราะสมุนไพรแต่ละชนิดมีชื่อเรียกแตกต่างกันในแต่ละท้องถิ่น หรือบางชนิดมีชื่อเรียกพ้องกัน อีกทั้งบางชนิดจะมีลักษณะคล้ายคลึงกันมาก ก่อให้เกิดความสับสนในการเลือกใช้สมุนไพร และอาจนำสมุนไพรมาใช้ผิดชนิด นอกจากนี้การเก็บสมุนไพรมาใช้ควรเก็บสมุนไพรด้วยวิธีการที่ถูกต้อง และในฤดูกาลที่เหมาะสม เพื่อให้ได้สมุนไพรที่มีประสิทธิภาพในการรักษาโรค

ดังนั้นการนำสมุนไพรไปใช้ในการรักษาและป้องกันโรค ต้องมั่นใจว่าเป็นสมุนไพรที่ต้องการ มีสารสำคัญสามารถควบคุมปริมาณได้ และมีประสิทธิภาพในการรักษา ซึ่งจะนำไปสู่การผลิตผลิตภัณฑ์สมุนไพร เพื่อใช้ประโยชน์ทางการแพทย์และเภสัชกรรมอย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด ดังนั้นการควบคุมคุณภาพของสมุนไพรและผลิตภัณฑ์สมุนไพรจึงมีความสำคัญ เพราะจะทำให้คุณภาพของผลิตภัณฑ์สมุนไพรในแต่ละครั้งการผลิตมีความสม่ำเสมอ ส่งผลถึงประสิทธิภาพและประสิทธิผลในการรักษาที่แน่นอน เชื่อถือได้ การจัดทำข้อกำหนดมาตรฐานเพื่อใช้เป็นหลักในการควบคุมคุณภาพสมุนไพรและผลิตภัณฑ์สมุนไพร จึงเป็นงานอย่างหนึ่งในการควบคุมคุณภาพสมุนไพรและผลิตภัณฑ์สมุนไพรให้มีมาตรฐานระดับสากล

การควบคุมคุณภาพสมุนไพรเพื่อจัดตั้งเกณฑ์มาตรฐานต้องคำนึงถึง

1. ชื่อวิทยาศาสตร์ (scientific name)
2. แหล่งตัวอย่าง (source of material)
3. ฤดูการเก็บเกี่ยวและอายุพืช (harvesting time and plant-age)
4. ส่วนของพืชที่ใช้เป็นยา (part used)
5. ตัวอย่างพืชที่ถูกต้อง (authentic sample)
6. ข้อบ่งใช้ (indication)
7. สารสำคัญหรือสารออกฤทธิ์ (active constituent)

การกำหนดมาตรฐานสมุนไพร

ในการจัดทำข้อกำหนดมาตรฐานสมุนไพร จะต้องมีการตรวจวิเคราะห์ในหัวข้อต่างๆ และจัดทำมาตรฐานดังนี้

1. การตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเภสัชเวท (pharmacognostic identification)

1.1 การตรวจลักษณะเซลล์และเนื้อเยื่อ

1.2 การตรวจวัดขนาดเนื้อเยื่อ และตรวจหาค่าคงที่บางชนิด

2. การตรวจเอกลักษณ์ทางเคมี (chemical identification)

2.1 การตรวจสอบเบื้องต้น (preliminary test) เป็นการตรวจสอบสารสำคัญโดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสี การตกตะกอน หรือปฏิกิริยาอื่นๆ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการตรวจหาองค์ประกอบทางเคมีโดยละเอียดต่อไป

2.2 การตรวจสอบเพื่อยืนยันผล (confirmatory test) เป็นการตรวจหาองค์ประกอบทางเคมีของกลุ่มสารสำคัญที่ตรวจพบในเบื้องต้น สามารถนำเทคนิคโครมาโตกราฟีมาใช้ แต่ที่นิยมคือใช้วิธีโครมาโตกราฟีชนิดชั้นบาง (thin layer chromatography) เนื่องจากสามารถบอกองค์ประกอบทางเคมีได้รวดเร็ว ชัดเจน และประหยัดกว่าวิธีอื่นๆ

3. การประเมินคุณภาพของสมุนไพร (crude drug evaluation)

3.1 สิ่งแปลกปลอม (foreign matter)

3.2 ปริมาณเถ้า (ash content)

3.3 ปริมาณความชื้น (moisture content)

3.4 ปริมาณสิ่งสกัดตัวทำละลาย (solvent extractive content)

3.5 การหาปริมาณสารสำคัญหรือสารออกฤทธิ์ (determination of active constituent)

3.6 การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ (microbial limit)

3.7 ปริมาณสารตกค้าง (pesticide residues limit)

การควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์สมุนไพร สามารถทำได้หลายระดับตั้งแต่ระดับง่ายถึงระดับที่ยุงยาก ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์แตกต่างกันออกไป เช่น

1. การใช้ chromatographic fingerprint ในการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ว่ามีสารออกฤทธิ์กลุ่มที่ต้องการหรือไม่ โดยไม่วิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ (เป็น qualitative analysis) ได้เป็นผลิตภัณฑ์ที่เรียกว่า fingerprinted products)

2. การผลิตหรือการควบคุมคุณภาพโดยควบคุมปริมาณสารสำคัญให้มีปริมาณไม่ต่ำกว่าที่กำหนด

3. การผลิตเป็น standardized products ที่มีการควบคุมปริมาณสารสำคัญในผลิตภัณฑ์ให้มีปริมาณที่แน่นอนทุกครั้งที่ผลิต

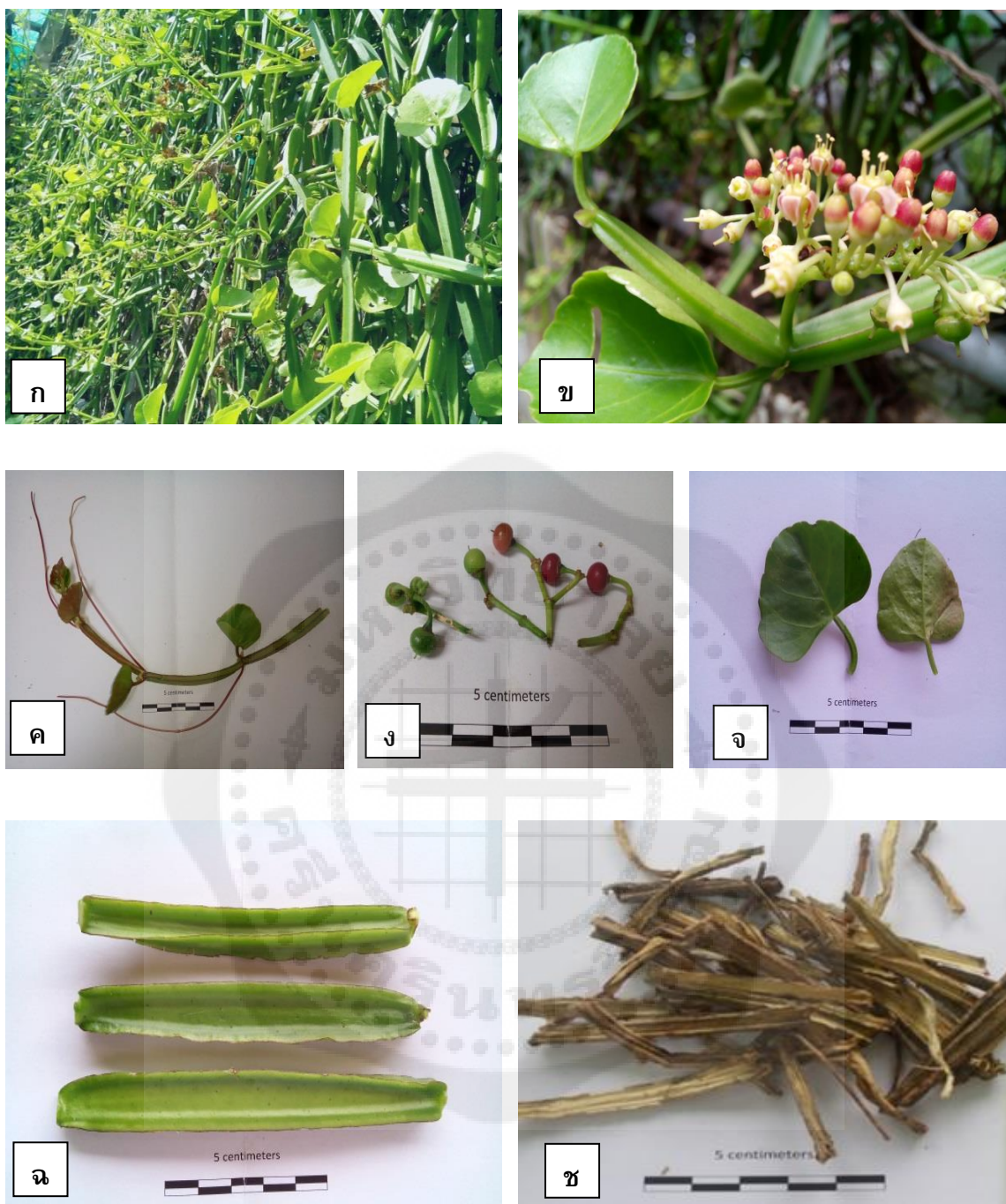
2. สมุนไพรเพชรสังฆาต (*Cissus quadrangularis* L.)

2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของเพชรสังฆาต

เพชรสังฆาต (Phet sang khat) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cissus quadrangularis* L. ชื่ออื่นๆ เช่น ชันช้อ (Khan kho), ตำลึงทอง (Tamleung tong) (ราชบุรี); สันชะควด (san cha khuat) (กรุงเทพฯ); สามร้อยต่อ (Sam roi to), สามร้อยช้อ (Sam roi kho) (ประจวบคีรีขันธ์) อยู่ในวงศ์ VITACEAE⁹⁻¹³ เพชรสังฆาตจัดเป็นไม้เลื้อยเถาอ่อนสีเขียว ลำต้นเป็นรูปสี่เหลี่ยมเป็นครีบก้อน ข้างรอบน้ำ ผิวเรียบ มีรอยคอดบริเวณข้อ แต่ละข้อยาวประมาณ 10–15 เซนติเมตร มีมือสำหรับยึดเกาะ ออกตรงข้อต่อตรงข้ามใบ ใบเดี่ยวออกเรียงสลับตามข้อต้น ข้อละ 1 ใบบริเวณปลายเถา รูปสามเหลี่ยมหรือรูปไข่ ปลายใบมน โคนใบเว้า ขอบใบหยักห่างๆ เนื้อใบค่อนข้างหนา แผ่นใบเรียบสีเขียวเป็นมัน ก้านใบยาว 2-3 เซนติเมตร ใบยาว 4-7 เซนติเมตร กว้าง 2.5–7 เซนติเมตร ตรงข้ามใบมีมือเกาะ ดอกออกเป็นช่อตามข้อตรงข้ามกับใบ ดอกย่อยขนาดเล็ก กลีบดอกมี 4 กลีบ กลีบดอกด้านนอกสีเขียวอ่อน โคนด้านนอกมีสีแดงด้านในสีเขียวอ่อน เมื่อบานเต็มทีดอกจะหุบลงด้านล่าง เกสรเพศผู้มี 4 อัน ไข่เหนียวมี 2 ช่อ แต่ละช่อมีอวุล 2 เม็ด ก้านยอดเกสรเพศเมียเรียวยาวประมาณ 2 มิลลิเมตร ยอดเกสรเพศเมียเป็นตุ่มเล็ก ผลแบบผลมีเนื้อ 1 เมล็ด รูปทรงค่อนข้างกลมหรือรูปรี กว้าง 5-8 มิลลิเมตร ผิวเรียบเป็นมัน ผลอ่อนสีเขียว เมื่อแก่เปลี่ยนเป็นสีเหลือง สีแดง และสีม่วงคล้ำ ตามลำดับ เมล็ดกลมสีน้ำตาล มี 1-2 เมล็ด⁹⁻¹³ เพชรสังฆาตเป็นไม้ปลูกง่าย อาจเจริญได้โดยการปลูกในกระเช้า คล้ายปลูกกล้วยไม้ หรือเพาะพันธุ์ไว้ตามไม้ฝุ อื่นๆ ปลูกง่ายก็เจริญงอกงามได้ดี เป็นไม้ที่นิยมปลูกกันทั้งคนจีนและคนไทย¹³ แสดงในภาพประกอบ 1

2.2 การใช้ประโยชน์จากเพชรสังฆาต

เถาเพชรสังฆาต มีรสร้อนขมคั้น คั้นเอาน้ำดื่ม แก้โรคลักปิดลักเปิด แก้ประจำเดือนไม่ปกติ แก้กระดูกแตกหักชั้น ขับลมในลำไส้ แก้ริดสีดวงทวารหนัก ทั้งชนิดกลีบมะไฟและเดือยไก่ ตามภูมิปัญญาใช้เถาสด แก้กระดูกหักชั้น ขับลมในลำไส้ รับประทานแก้ริดสีดวงทวาร¹¹⁻¹⁵



ภาพประกอบ 1 แสดงลักษณะ (ก.) ต้นเฟรซังฆาต (*Cissus quadrangularis* L.) (ข.) ช่อดอกและผลอ่อนของเฟรซังฆาต (ค.) มือเกาะของเฟรซังฆาต (ง.) ผลของเฟรซังฆาต (จ.) ใบของเฟรซังฆาต (ฉ.) เถาเฟรซังฆาตสด (ช.) เถาเฟรซังฆาตอบแห้ง

2.2.1 ตำรับยาผสมเพชรสังฆาตในบัญชียาจากสมุนไพร พ.ศ.2554¹⁶

เถาเพชรสังฆาตเป็นองค์ประกอบหลักในตำรับยาผสมเพชรสังฆาต กลุ่มบรรเทาอาการริดสีดวงทวารหนัก และจัดอยู่ในบัญชียาจากสมุนไพร พ.ศ. 2554 ประกอบด้วย 2 สูตร คือ

สูตรที่ 1 ในผงยา 100 กรัม ประกอบด้วย เถาเพชรสังฆาต หนัก 70 กรัม รากอัคคีทวาร หนัก 20 กรัม และโกฐน้ำเต้า หนัก 10 กรัม รับประทานครั้งละ 1.2 กรัม วันละ 3 ครั้ง หลังอาหารทันที ข้อควรระวังในการใช้ยา คือ ควรระวังในการใช้ยาในหญิงตั้งครรภ์ และหญิงให้นมบุตร ผู้ป่วยอาจมีอาการไม่พึงประสงค์ คือ ท้องเสีย มวนท้อง¹⁶

สูตรที่ 2 ในผงยา 85 กรัม ประกอบด้วย เถาเพชรสังฆาต หนัก 50 กรัม กะเม็ง (ทั้งต้น) หนัก 15 กรัม โกฐน้ำเต้า หนัก 10 กรัม และหัวกระชาย หนัก 10 กรัม ขนาดและวิธีใช้ รับประทานครั้งละ 0.5- 1 กรัม วันละ 3 ครั้ง หลังอาหารทันที ข้อควรระวังในการใช้ยา คือ ควรระวังในการใช้ยาในหญิงตั้งครรภ์ และหญิงให้นมบุตร ผู้ป่วยอาจมีอาการไม่พึงประสงค์ คือ ท้องเสีย มวนท้อง¹⁶

2.2.2 ตำรับยาตามภูมิปัญญาไทย

1. ยาริดสีดวงทวาร ขนาดที่ 1

โดยใช้เถาเพชรสังฆาตสดกินแกัริดสีดวงทวาร วันละ 1 ปล้อง จนครบ 3 วัน โดยหันบางๆ ใช้เนื้อมะขามเปียกหรือเนื้อกล้วยสุกหุ้ม กลืนทั้งหมด เพราะเถาสดอาจทำให้คันคอ¹²⁻¹³

2. ยาริดสีดวงทวาร ขนาดที่ 2

เพชรสังฆาตหันตากแห้งบดให้เป็นผงละเอียด นำมาคลุกกับน้ำมะขามเปียก ทำเป็นลูกกลอนขนาดเท่าปลายนิ้วก้อย รับประทานประมาณครั้งละ 5 เม็ด วันละ 3 ครั้ง ประมาณ 10-15 วัน จึงจะเห็นผล ต้องระวังอย่าให้สัมผัสเพชรสังฆาตโดยตรง¹⁷

3. ยาริดสีดวงทวาร ขนาดที่ 3

ใช้เพชรสังฆาตครั้งละ 2-3 องคุลี (หนึ่งข้อนิ้วกลาง) เป็นเวลา 10-14 วัน ติดต่อกัน โดยหันบางๆ ใช้เนื้อมะขามเปียกหรือเนื้อกล้วยสุกหุ้ม กลืนทั้งหมด¹⁷

4. ยาริดสีดวงทวาร ขนาดที่ 4

นำกล้วยดิบมาตัดหัวตัดท้าย เอาไม่เจาะกล้วย เอาเพชรสังฆาตผ่าซีก เอา 1 ซีก และเอาร่วงซีกมดลูก 1 เสี้ยวลงไปด้วย เอาไปนึ่งแล้วแกะเปลือกออก นำกล้วยไปตากแดดจนแห้ง เอาเชือกร้อยเก็บไว้ เวลาร้อยให้ลูกกล้วยห่างกัน ถ้าชิดกันจะอบขึ้นขึ้นราได้ วิธีกินคือ กินทั้งลูก ครั้งละ 2 ลูก วันละ 2 ครั้ง กินทั้งหมด 3 หวี “พ่อบอกหายทุกคน”¹⁷

2.2.3 ตำรับอาหาร¹⁷

1. แกงเพชรสังฆาต

ส่วนประกอบ: เพชรสังฆาต น้ำมะขามเปียก น้ำปลา น้ำปลาร้า น้ำตาลปี๊บ ใบมะกรูด เครื่องแกง ข่า ตะไคร้ กระชาย พริกแห้ง หอมแดง กระเทียม ปลาลาย่าง เกลือ

วิธีทำ: เลือกเอาเพชรสังฆาตเฉพาะปล้องที่อ่อนๆ นำมาลอกเปลือกออก เคี้ยวในน้ำเดือดจนนิ่ม ใส่กระชอนพักไว้ ทำพริกแกงโดยโขลกข่า ตะไคร้ กระชาย พริกแห้ง หอมแดง กระเทียมกับเกลือให้ละเอียด แล้วนำปลาลาย่างไปโขลกรวมกับน้ำพริกแกง ตั้งน้ำให้เดือดใส่น้ำพริกแกงลงไปละลาย ปรงรสด้วยน้ำมะขามเปียก น้ำปลา น้ำปลาร้า น้ำตาล เกลือ จากนั้นใส่เพชรสังฆาตที่สะอาดแล้วลงไป เคี้ยวไฟอ่อนไปเรื่อยๆ จนเพชรสังฆาตเปื่อยนิ่ม จากนั้นใส่ใบมะกรูดฉีกลงไป ปิดไฟแล้วยกลง

2. น้ำสมุนไพรวเพชรสังฆาต

ส่วนประกอบ: เพชรสังฆาตยาว 1 วา น้ำ 3 ลิตร น้ำตาลกรวด

วิธีทำ: นำเพชรสังฆาตมาล้างให้สะอาด ขุดเป็นวงลงใส่หม้อ เติมน้ำต้มจากน้ำ 3 ลิตร ให้เหลือ 1 ลิตร น้ำจะสือออกเหลือง ให้ตักเพชรสังฆาตออก กรองให้สะอาด นำตั้งไฟ ใส่น้ำตาลกรวด ชิมรสตามชอบ

2.3 องค์ประกอบทางเคมีของเพชรสังฆาต

Cissus quadrangularis L. หรือเพชรสังฆาต มีองค์ประกอบทางเคมี ของสารสำคัญหลายกลุ่ม เช่น flavonoids, triterpenoids, steroids, stilbenes, iridoids, Lipid, vitamin, tannins, calcium oxalate crystal, potassium และ phosphorus แสดงดังตาราง 1

2.4 การตรวจสอบเอกลักษณ์ (identification) ของเพชรสังฆาต⁹

ในการตรวจสอบเอกลักษณ์ของเพชรสังฆาต ตามมาตรฐาน Thai Herbal Pharmacopoeia สามารถทำได้ ดังนี้

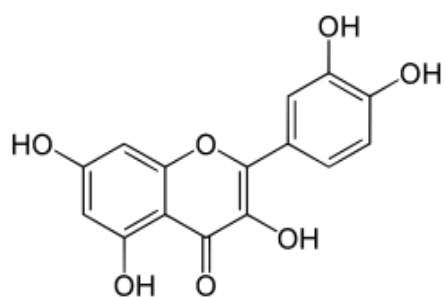
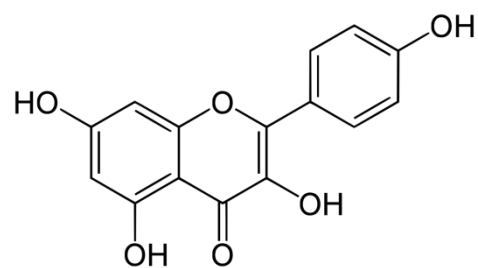
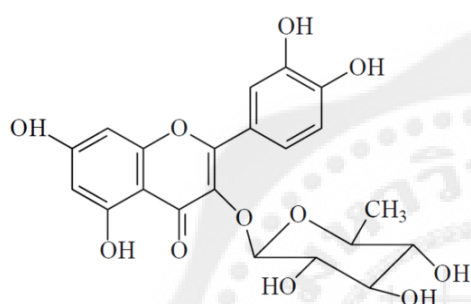
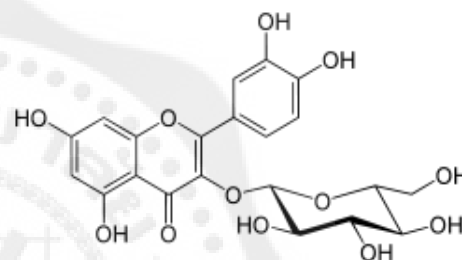
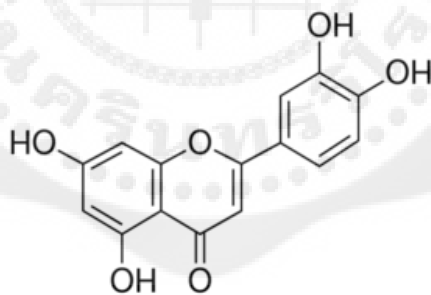
วิธีที่ 1 : โดยการเตรียมตัวอย่างผงเพชรสังฆาต 5 กรัม จากนั้นเติม ethanol 20 มิลลิลิตร เขย่า นาน 1 ชั่วโมง และกรอง นำสารละลาย มา 2 มิลลิลิตร ใส่แผ่นแมกนีเซียม (magnesium ribbon) จำนวน 4 – 5 ชิ้น ลงในสารละลาย จากนั้นเติมกรดเกลือเข้มข้น (hydrochloric acid) เขย่าให้เข้ากัน สารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู

ตาราง 1 แสดงกลุ่มสารสำคัญที่พบในเพชรสังฆาต

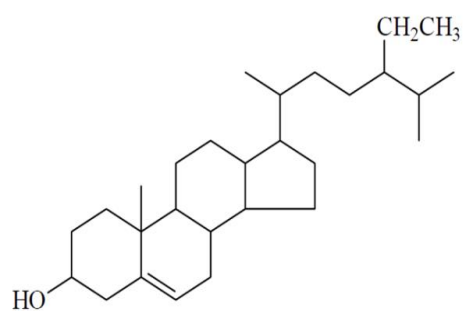
กลุ่มของสาร	ชื่อสาร	ส่วน	เอกสารอ้างอิง
Flavonoids	quercetin	stem	9,18-22
(flavonol)	quercitrin	stem	19,23
	isoquercetin	stem	19,23
	kaempferol	stem	22
	luteolin	stem	24
Triterpenoids	α -amyrin	whole plant	25-27
	α -amyrone	whole plant	25-27
	7-oxo-onocer-8-ene-3 β , 21 α -diol	whole plant	28
	Onocer-7-ene-3 α , 21 β -diol	aerial parts	28
	Onocer-7-ene-3 β , 21 α -diol	aerial parts	26
	lupeol	whole plant	9
	taraxeryl acetate	aerial parts	28
	friedelan-3-one	aerial parts	28
	taraxerol	aerial parts	28
	iso-pentacosanoic	aerial parts	28
	lophenone	stem	29
	epifriedlinol	stem	29
	isoarbornenol	stem	29
Steroid	β -sitosterol	stem	19,29
(Phytosterol)	β -sitosterol glycoside	whole plant	19
Iridoids	6-O-(2,3-dimethoxy)-trans-cinnamoyl catalpol	aerial parts	19
	6-O-meta-methoxybenzoyl catalpol	aerial parts	19

ตาราง 1 (ต่อ)

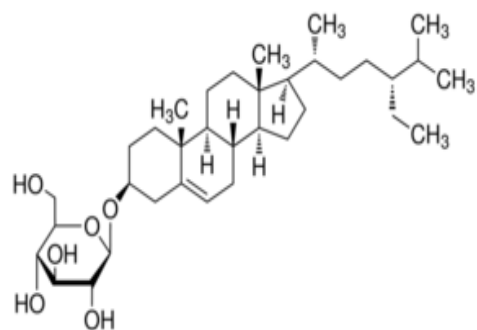
กลุ่มของสาร	ชื่อสาร	ส่วน	เอกสารอ้างอิง
Stilbene	resveratrol	stem	21
	piceatannol	stem	19,30
	pallidol	stem	19,30
	parthenocissine A	stem	30
	quadrangularins A	stem	30
	quadrangularins B	stem	30
	quadrangularins C	stem	30
Lipid	4-hydroxy-2-methyl-tricos-2-en-22-one	aerial parts	28
	9-methyl-octadec-9-ene	aerial parts	28
	heptadecyl octadecanoate	aerial parts	28
	icosanyl icosanoate	aerial parts	28
	31-methyl-tritriacontan-1-ol	aerial parts	28
	7-hydroxy-20-oxo-docosanyl	aerial parts	28
	cyclohexane		
Vitamin	31-methyltritriacontanoic acid	aerial parts	28
	vitamin C	stem	31,32
	vitamin E	Stem	32
Tannins		whole plant	9
calcium oxalate		stem	9
potassium		stem	9
phosphorus		stem	9

Quercetin ($C_{15}H_{10}O_7$)Kaempferol ($C_{15}H_{10}O_6$)Quercitrin ($C_{21}H_{20}O_{11}$)Isoquercetin ($C_{21}H_{20}O_{12}$)Luteolin ($C_{15}H_{10}O_6$)

ภาพประกอบ 2 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่ม flavonoids ในเพชรสังฆาต

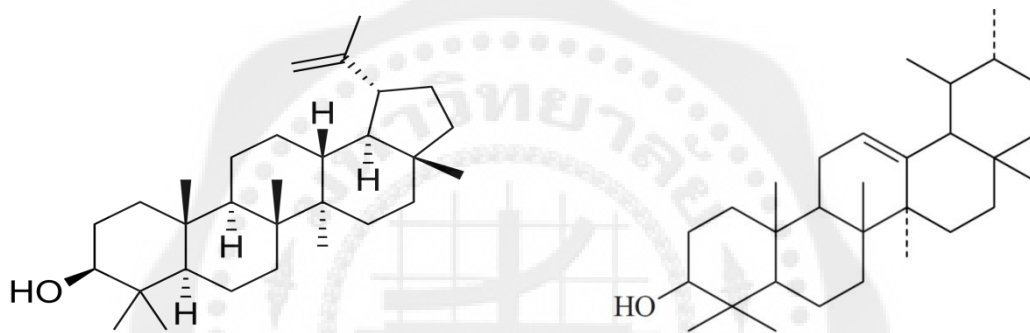


β -sitosterol ($C_{31}H_{52}O_2$)



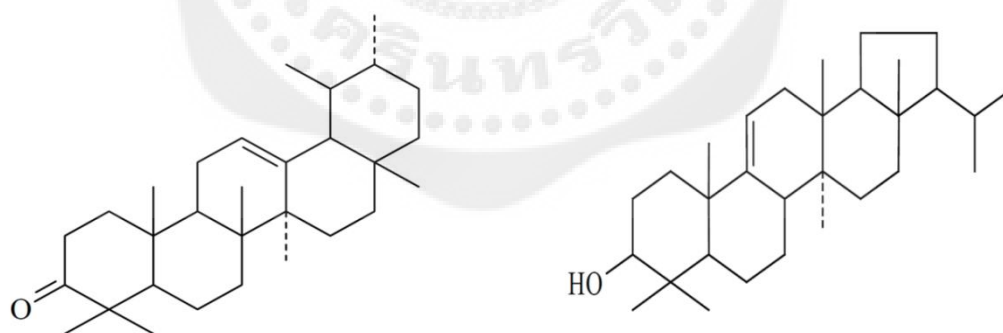
β -sitosterol glycoside ($C_{35}H_{60}O_6$)

ภาพประกอบ 3 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่ม steroid ในพืชล้มลุก



Lupeol ($C_{30}H_{50}O$)

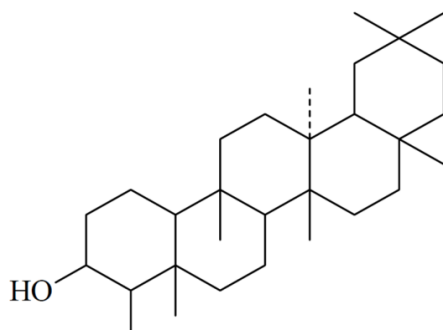
α -amyrin ($C_{30}H_{50}O$)



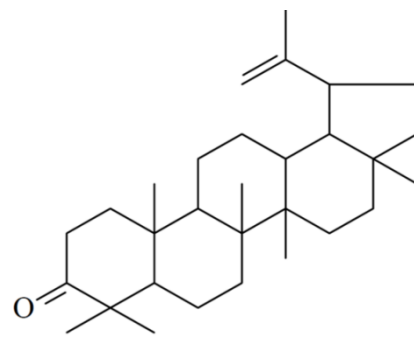
α -amyrone ($C_{30}H_{48}O$)

Isoaborenol ($C_{30}H_{49}O$)

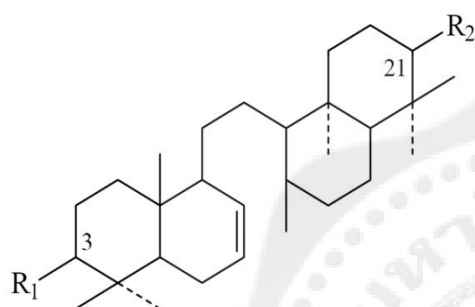
ภาพประกอบ 4 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่ม triterpenoids บางชนิดในพืชล้มลุก



Epifriedlinol ($C_{30}H_{49}O$)

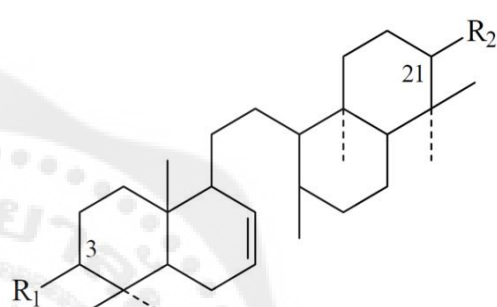


Lupenone ($C_{30}H_{48}O$)



$R_1 = \alpha\text{-OH}$, $R_2 = \beta\text{-OH}$

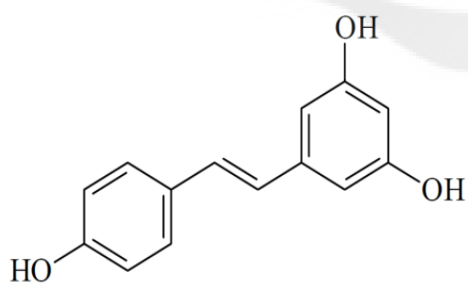
Onocer-7-ene-3 α , 21 β -diol ($C_{30}H_{52}O$)



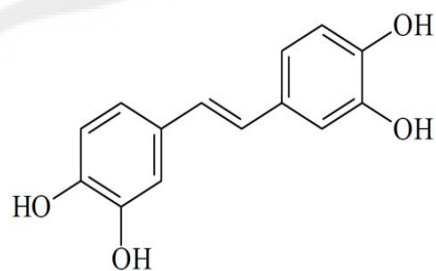
$R_1 = \beta\text{-OH}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$

Onocer-7-ene-3 β , 21 α -diol ($C_{30}H_{52}O_2$)

ภาพประกอบ 4 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่ม triterpenoids บางชนิดในเพชรสังฆาต (ต่อ)



Resveratrol ($C_{14}H_{12}O_3$)



Piceatannol ($C_{14}H_{12}O_4$)

ภาพประกอบ 5 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่ม stilbene บางชนิดในเพชรสังฆาต

วิธีที่ 2 : การตรวจสอบเอกลักษณ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีชนิดชั้นบาง (Thin-layer Chromatography; TLC) โดยใช้ silica gel GF254 เป็นวัฏภาคคงที่ และใช้ hexane: ethyl acetate (80:10) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ โดยใช้สารมาตรฐาน lupeol ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสมุนไพรเพชรสังฆาต เตรียมตัวอย่างโดยวิธีการหมัก โดยนำผงเพชรสังฆาต 500 มิลลิกรัมต่อ chloroform 5 มิลลิลิตร และเตรียมสารมาตรฐาน lupeol 1 มิลลิกรัมต่อ chloroform 1 มิลลิลิตร

2.5 ข้อกำหนดมาตรฐานคุณภาพของเพชรสังฆาต⁹

ตามมาตรฐาน Thai Herbal Pharmacopoeia การทดสอบทำโดยการวิเคราะห์หาปริมาณความชื้น (loss on drying) สิ่งแปลกปลอม (foreign matter) ปริมาณเถ้ารวม (total ash) ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (acid-insoluble ash) ปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 80 (80% ethanol-soluble extractive) ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ (water-soluble extractive) และขนาดรับประทานต่อวัน (dose) ได้ค่าต่างๆคิดเป็นร้อยละ ดังรายละเอียดในตารางที่ 2

ตาราง 2 แสดงข้อกำหนดมาตรฐานคุณภาพของเพชรสังฆาต ตามมาตรฐาน Thai Herbal Pharmacopoeia ⁹

การทดสอบ (หน่วย)	ข้อกำหนด
ปริมาณความชื้น (%w/w)	ไม่เกินร้อยละ 9
สิ่งแปลกปลอม (%w/w)	ไม่เกินร้อยละ 5
ปริมาณเถ้ารวม (%w/w)	ไม่เกินร้อยละ 1.5
ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (%w/w)	ไม่เกินร้อยละ 20
ปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 80 (%w/w)	ไม่น้อยกว่าร้อยละ 2.5
ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ (%w/w)	ไม่น้อยกว่าร้อยละ 5
ขนาดรับประทานต่อวัน (Dose)	3 – 6 กรัม

2.6 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสมุนไพรเพชรสังฆาต

จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรเพชรสังฆาตด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ พบว่า สารสกัดเพชรสังฆาตด้วยเฮกเซน อะซิโตน เอทิลอะซิเตท เมทานอล และเอทานอล ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซโคลออกซีจีเนส (cyclooxygenase) เอนไซม์ 5-ไลพอกซีจีเนส (5-lipoxygenase) และสารที่ก่อให้เกิดการอักเสบ (proinflammatory mediators) พบว่าสารสกัด

เพชรสังฆาตด้วย อะซีไตนีมีฤทธิ์ด้านการอักเสบได้ดี³³ จากรายงานการวิจัยของ ดวงเดือนและคณะ 2011 พบว่าสารสกัดเพชรสังฆาตที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ลดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ECV304 ที่ชักนำให้อยู่ภายใต้ความเครียดออกซิเดชันด้วย H_2O_2 นั้นทำให้ปริมาณอนุมูลอิสระภายในเซลล์ที่ได้รับ H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ กลับเข้าสู่ภาวะปกติ สอดคล้องกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับ quercetin และ resveratrol ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ โดยเพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระและ endothelial nitric oxide synthase (eNOS) และมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้าน H_2O_2 ที่ทดสอบในหลอดทดลอง มีฤทธิ์ปกป้องเซลล์บุผิวหลอดเลือดจากการรบกวนของสารสกัดเพชรสังฆาต อันเป็นผลจากสารสำคัญในเพชรสังฆาต quercetin และ resveratrol³⁴ สอดคล้องกับการศึกษาของ Srisook และคณะ 2011 ได้ทำการสกัดเพชรสังฆาตด้วยเอทิลอะซิเตทที่ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเกิดไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย lipopolysaccharide (LPS) โดยไปลดการแสดงออกของยีน iNOS ที่ถูกควบคุมโดยโปรตีนนิวเคลียร์แฟกเตอร์ แคปปา บี (nuclear factor-kappa B) ขณะเดียวกันไปเพิ่มขนาดของ heme oxygenase-1 (HO-1) เป็นผลให้สารสกัดเพชรสังฆาตไปลดการอักเสบได้³⁵

จากการทบทวนวรรณกรรมฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของเพชรสังฆาตในสัตว์ทดลอง โดยทำการศึกษากการออกฤทธิ์ผองของต้นเพชรสังฆาต โดยทำการสกัดด้วย 80% alcohol ในขนาด 100, 200 และ 400 มิลลิกรัม ให้แก่หนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบที่ฝ่าเท้าด้วย 1% carrageenan มาแล้ว 2 ชั่วโมง พบว่ามีฤทธิ์ลดการอักเสบในหนูทดลอง³⁶ สอดคล้องกับการศึกษาของ Panthong และคณะ 2007 โดยทำการศึกษาสารสกัดเพชรสังฆาตที่สกัดด้วยเมทานอลในการลดอาการในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการปวดด้วย acetic acid ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดเพชรสังฆาตด้วยเมทานอลสามารถบรรเทาอาการปวดได้ และศึกษาฤทธิ์ลดการอักเสบในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบจากสาร carrageenan และ arachidonic acid ผลการทดลองพบว่า สารสกัดเพชรสังฆาตด้วยเมทานอลสามารถลดภาวะการอักเสบโดยการยับยั้งเมแทบอลิซึมของกรด arachidonic ดังนั้นสารสกัดเพชรสังฆาตด้วยเมทานอลสามารถบรรเทาอาการปวด มีฤทธิ์ด้านการอักเสบในหนูทดลอง และมีฤทธิ์ในการบำรุงหลอดเลือดดำ³⁷ เช่นเดียวกับ การศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของ อังคณา 2008 ได้ศึกษาสารสกัดเอทิลอะซิเตทด้วย 95% เอทานอล จากนั้นแยกสารตามลำดับความมีขั้วของสารได้เป็นสารสกัดย่อยสองสารสกัดคือสารสกัด เฮกเซนและสารสกัดเอทานอล แล้วนำสารสกัดทั้ง 3 ชนิด มีความเข้มข้นร้อยละ 0.1, 1 และ 5 ในสารละลาย ethylphenyl propiolate ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอาการบวมของใบหูหนู เปรียบเทียบกับอาการบวมของใบหูหนูที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยสาร ethylphenyl propiolate พบว่า สารสกัดเฮกเซนที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1 สามารถลดอาการบวมของใบหูหนูได้อย่าง

มีนัยสำคัญทางสถิติ ได้ที่เวลา 30, 60 และ 120 นาที ส่วนสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 สามารถลดอาการบวมได้ที่เวลา 30 นาที ในขณะที่สารสกัดเอทานอลไม่แสดงฤทธิ์การยับยั้งอาการบวมของไบหนู และเมื่อนำสารสกัดเฮกเซนมาแยกสารสำคัญ และตรวจสอบสูตรโครงสร้าง พบว่าเป็น Lupeol³⁸

การศึกษาใช้ผงบดละเอียดของเถาเพชรสังฆาตที่แขวนลอยอยู่ในน้ำมันถั่วเหลือง กรอกในหนูทดลองที่ถูกเหนียวน้ำให้เกิดการอักเสบด้วย 1% carrageenan ขนาดที่ใช้คือ 500, 1000, 2000 และ 3000 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัม พบว่าเถาเพชรสังฆาตขนาด 500 และ 1000 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ไม่มีฤทธิ์ ในขณะที่เถาเพชรสังฆาตขนาด 2000 และ 3000 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม แสดงฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบได้เพียงเล็กน้อยที่ 1 และ 2 ชั่วโมงตามลำดับ จากรายงานดังกล่าวสรุปได้ว่า เถาเพชรสังฆาตไม่สามารถยับยั้งการอักเสบเฉียบพลันในหนูทดลองได้³⁹

นอกจากนี้มีการศึกษามีฤทธิ์ป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะอาหารของเพชรสังฆาต พบว่าสารสกัดเอทานอลจากเพชรสังฆาต สามารถลดการเกิดแผลในกระเพาะอาหารหนูขาวที่ถูกเหนียวน้ำให้เป็นแผลด้วยแอสไฟรีน เมื่อให้สารสกัดขนาด 500 มก./กก. ให้หนูกินนาน 7 วัน ลดการเกิดแผลได้ 71.2 % และเมื่อเปรียบเทียบกับยา ranitidine ขนาด 30 มก./กก. ลดการเกิดแผล 71.9% พบว่าสารสกัดขนาด 500 มก./กก. ออกฤทธิ์ใกล้เคียงกับ ranitidine สามารถลดการทำลายเนื้อเยื่อในกระเพาะอาหาร⁴⁰

2.7 ยาสมุนไพรเพชรสังฆาตกับการรักษาโรคริดสีดวงทวาร

โรคริดสีดวง (hemorrhoids) เป็นโรคที่พบได้บ่อย และพบเป็นสาเหตุอันดับแรกๆ ของอาการถ่ายอุจจาระเป็นเลือดสด เป็นโรคที่แสดงถึงความอ่อนแอของหลอดเลือดดำบริเวณทวารหนัก เกิดจากหลอดเลือดดำที่ได้เยื่อเมือกและผิวหนังในบริเวณทวารหนักมีการโป่งพอง และมีการอักเสบเนื่องจากมีภาวะความดันในหลอดเลือดดำสูงจากสาเหตุต่างๆ เช่น การเบ่งถ่ายอุจจาระ ท้องผูก การนั่งนานๆ ภาวะตั้งครรภ์ การกินอาหารที่มีกากใยน้อย ไอเรื้อรัง เป็นต้น ทำให้เกิดอาการเจ็บปวด คัน และมีการปริแตกของผนังหลอดเลือดขณะเบ่งถ่ายอุจจาระ ทำให้มีเลือดออกเป็นครั้งคราว ริดสีดวงทวารแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ ริดสีดวงทวารภายนอก (external hemorrhoid) และริดสีดวงทวารภายใน (internal hemorrhoid) สำหรับริดสีดวงภายในหลอดเลือดดำจะโป่งพองภายในไส้ตรงและเจ็บปวดน้อยกว่าริดสีดวงภายนอก ขณะที่ริดสีดวงภายนอกเกิดจากหลอดเลือดดำที่อยู่ใต้ผิวหนังตรงปากทวารหนัก¹ สมุนไพรที่ใช้ในการรักษาโรคริดสีดวงทวารต้องมีฤทธิ์ด้านการอักเสบ มีฤทธิ์ในการบำรุงหลอดเลือดดำ และมีฤทธิ์ในการบรรเทาปวด ฉะนั้นการรักษาด้วยยาสมุนไพรจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับผู้ป่วยในปัจจุบัน² ในการรักษาโรคริดสีดวงทวารในทางการแพทย์แผนไทยมีการนำสมุนไพรเดี่ยวมา

รักษาโรคริดสีดวงทวาร โดยการนำเพชรสังฆาต บดเป็นผงบรรจุแคปซูลๆ ละ 250 มิลลิกรัม ขนาดและวิธีใช้ในผู้ใหญ่ รับประทานครั้งละ 4-6 แคปซูล วันละ 3 ครั้ง ก่อนอาหาร⁴¹ เถาเพชรสังฆาตเป็นองค์ประกอบหลักในตำรับยาผสมเพชรสังฆาต กลุ่มบรรเทาอาการริดสีดวงทวารหนัก และจัดอยู่ในบัญชียาจากสมุนไพร (ฉบับที่ 4) พ.ศ. 2554¹⁶ และตามตำรามาตรฐาน Thai Herbal Pharmacopoeia ระบุว่าเพชรสังฆาตมีสรรพคุณในการรักษาโรคริดสีดวงทวาร⁹

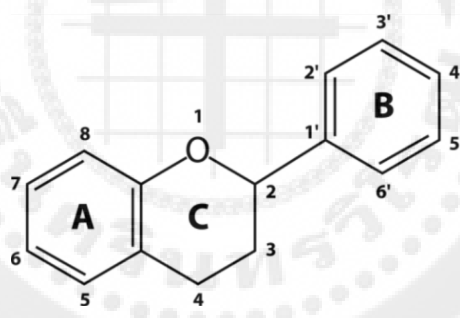
จากการทบทวนวรรณกรรมถึงประสิทธิภาพในการรักษาโรคริดสีดวงทวารด้วยสมุนไพรเพชรสังฆาต พบว่ามีรายงานการวิจัยทางคลินิกของ สุรติ และภัทรา 2010 ได้ทำการศึกษาระบบ double blind randomized controlled trial เพื่อศึกษาผลการรักษาโรคริดสีดวงทวารด้วยสารสกัดเพชรสังฆาต โดยทำการเปรียบเทียบภาวะเลือดออก อาการปวดทวาร หลุดเลือดซอดที่ยื่นออกมาจากทวาร และความพึงพอใจต่อผลการรักษาที่ได้รับระหว่างกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยสารสกัดเพชรสังฆาต และยา Cyclo 3 Fort ระหว่างวันที่ 1 มีนาคม 2553 – 28 กุมภาพันธ์ 2554 จำนวน 80 คน แบ่งผู้ป่วยออกเป็น 2 กลุ่มๆ 40 คน ผลการวิจัยหลังการรักษาพบว่า ภาวะเลือดออก อาการปวดทวาร และภาวะหลุดเลือดซอดที่ยื่นออกมาจากทวารหนัก และความพึงพอใจในการรักษาไม่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าสารสกัดเพชรสังฆาตให้ผลเทียบเท่ากับยา Cyclo 3 Fort ที่มีส่วนประกอบของ *Ruscus aculeatus* 150 มิลลิกรัม hesperidin methyl chalcone 150 มิลลิกรัม และ vitamin C 100 มิลลิกรัม ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในการรักษาอาการผิดปกติของระบบไหลเวียนของหลอดเลือด รักษาอาการเลือดออก และใช้สำหรับรักษาอาการของโรคริดสีดวงชนิดเฉียบพลัน ซึ่งเป็นยาแผนปัจจุบันที่นำเข้าจากต่างประเทศ⁶ นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยของ สุกิจ และคณะ 2010 ได้ทำการศึกษาประสิทธิผลและผลข้างเคียงของการใช้สมุนไพรเพชรสังฆาต และยา Daflon[®] ที่มีส่วนผสมของ flavonoids คือ diosmin 450 มิลลิกรัม และ hesperidin 50 มิลลิกรัมในการรักษาโรคริดสีดวงทวารที่มีอาการเฉียบพลันจาก 3 โรงพยาบาล โรงพยาบาลละ 240 คน ในแต่ละโรงพยาบาล แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มๆ 80 คน คือ จะได้รับสมุนไพรเพชรสังฆาต, Daflon[®] และยาหลอก (Placebo) ในการรักษาผู้ป่วยโรคริดสีดวงทวารแบบ double blind randomized study จากผลการศึกษาในผู้ป่วยทั้งหมด 570 คน (หญิง 299 คน และชาย 271 คน) จากโรงพยาบาลทั้ง 3 แห่ง ผู้ป่วยจะได้รับการประเมินอาการต่างๆ คือ เลือดออกทางทวารหนัก เมื่ออก อาการคัน รอยแดง หรืออักเสบรอบทวารหนัก พบว่าอาการเลือดออกเฉียบพลันจะหยุดในวันที่ 2 ของการให้ยา ผู้ป่วยทุกกลุ่มอาการดีขึ้นหลังจากให้ยาครบ 7 วัน และผลทางสถิติพบว่าประสิทธิผลของการรักษาไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในผู้ป่วยทุกกลุ่ม และไม่พบผลข้างเคียงในการรักษา⁴ เช่นเดียวกับการวิจัยทางคลินิก ของ Kanket และคณะ 2012 ได้เปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างกลุ่มผู้ป่วยริดสีดวงทวารที่ได้รับยาเพชรสังฆาตสกัดในรูปแบบแคปซูลกับยา Daflon[®] ในผู้ป่วยโรคริดสีดวงทวารเฉียบพลันระยะที่ 1 และ 2 จำนวน 30 คน

โดยแบ่งผู้ป่วยออกเป็น 3 กลุ่ม คือ ได้รับสารสกัดเพชรสังฆาตแคปซูล 90, 180 มิลลิกรัมต่อวัน และยา Daflon[®] เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ผู้ป่วยจะได้รับการประเมินในด้าน เลือดออกทางทวารหนัก และภาวะ หลอดเลือดขอดที่ยื่นออกมาจากทวารหนัก ผลการศึกษาพบว่าประสิทธิภาพในการรักษาภาวะ เลือดออกของสมุนไพรเพชรสังฆาตและ Daflon[®] ไม่แตกต่างกันในทางสถิติ และไม่พบผลข้างเคียงใน การรักษา^[5]

2.8 การศึกษาความเป็นพิษของเพชรสังฆาต

จากรายงานการศึกษาความเป็นพิษกึ่งเรื้อรัง (3 เดือน) ของเพชรสังฆาตในหนูขาวพันธุ์วิสตาร์ โดยศึกษาเปรียบเทียบอาการหลังการหยดยา 2 สัปดาห์ ขนาดยาที่ให้เทียบเท่า 1, 10, 100 และ 100 เท่าของขนาดที่ใช้ในคนตามลำดับผลการศึกษาพบว่า การเจริญเติบโตของกลุ่มได้รับผงยาและ กลุ่มควบคุมไม่แตกต่างกัน ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของค่าทางโลหิตวิทยาและค่าทางเคมีคลินิก หรือ จุลพยาธิสภาพของอวัยวะภายใน จึงกล่าวได้ว่าเพชรสังฆาตไม่มีพิษต่อหนูขาว ⁴²

3. ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ^[43]



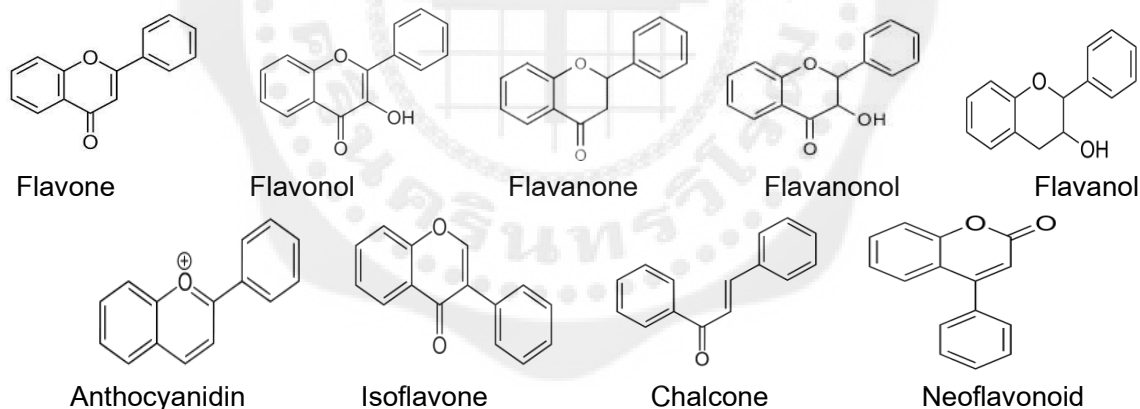
ภาพประกอบ 6 แสดงโครงสร้างแกนแบบ C₆-C₃-C₆

ฟลาโวนอยด์เป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่พบได้ทั่วไปในส่วนต่างๆของพืช โดยเฉพาะส่วนที่มีสี เช่น กลีบดอก เปลือกผล ส่วนใหญ่สีของฟลาโวนอยด์จะออกไปทางโทนเหลือง แดง ม่วง น้ำเงิน มีส่วน ช่วยหล่อเลี้ยงในการผสมเกสรของพืช นอกจากนี้ ยังอาจช่วยป้องกันเนื้อเยื่อของพืชไม่ได้รับ อันตรายจากรังสีอัลตราไวโอเลต สารกลุ่มฟลาโวนอยด์หลายชนิดมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่น่าสนใจ เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งเซลล์ (cell proliferation) ฤทธิ์ลดการเกาะกลุ่ม ของเกร็ดเลือด (platelet aggregation) ในธรรมชาติอาจพบฟลาโวนอยด์ในรูปอิสระหรือ glycoside โดยอาจเป็นชนิด O-glycoside ที่ส่วนของน้ำตาลกับ aglycone เชื่อมต่อกันด้วยพันธะคาร์บอน-

ออกซิเจน (carbon-oxygen bonding) โดยมักเกิดที่ตำแหน่งของ anomeric carbon ของหมู่น้ำตาลกับหมู่ไฮดรอกซิลของฟลาโวนอยด์ หรือเป็นชนิด C-glycoside ที่มีการเชื่อมต่อกันผ่านพันธะคาร์บอน-คาร์บอน (carbon - carbon bonding) ซึ่งพันธะของ C-glycoside จะทนต่อการถูกย่อยด้วยกรดมากกว่าชนิด O-glycoside

ฟลาโวนอยด์จัดเป็นสารกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenol) มีโครงสร้างแกนเป็นคาร์บอนที่เรียงต่อกันแบบ $C_6-C_3-C_6$ โดย C_6 เป็นวงแหวนเบนซีน ส่วน C_3 อาจเป็นสายโซ่คาร์บอนหรือเชื่อมต่อไปเป็นวงปิดไพแรน มีการกำหนดตำแหน่งและชื่อเรียกแต่ละวงเอ บี ซี ฟลาโวนอยด์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันที่หมู่แทนที่ในตำแหน่งที่ 2, 3 หรือ 4 ทำให้แบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้หลายกลุ่ม นอกจากนี้ การมีหมู่ไฮดรอกซิล หมู่น้ำตาล หรือหมู่อื่นๆ เช่น หมู่ acyl มาเกาะที่ตำแหน่งต่างๆ มีผลทำให้โครงสร้างของฟลาโวนอยด์ที่มีความหลากหลาย และมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่แตกต่างกัน

การแบ่งกลุ่มของฟลาโวนอยด์อาจแบ่งตามวงปิดไพแรนที่ต่อกับวงบี โดยอาจต่อกันตรงตำแหน่งคาร์บอนที่ 2, 3 หรือ 4 กลุ่มฟลาโวนอยด์ที่มีการเชื่อมต่อของวงปิดไพแรนกับวงบีตรงตำแหน่งคาร์บอนที่ 2 ได้แก่ กลุ่มฟลาโวน (flavones) ฟลาโวนอล (flavonols) ฟลาวาโนน (flavanones) ฟลาวาโนนอล (flavanonols) และแอนโทไซยานิดิน (anthocyanidins)



ภาพประกอบ 7 แสดงโครงสร้างแกนแบบ $C_6-C_3-C_6$ และตัวอย่างสารฟลาโวนอยด์บางกลุ่ม

1. กลุ่มฟลาโวน (flavones) เป็นฟลาโวนอยด์กลุ่มหนึ่งที่พบในพืชจำนวนมาก โดยโครงสร้างประกอบด้วยวงเอและซีที่มีลักษณะเป็นเบนโซไพแรน (benzopyrone) โดยมีพันธะคู่ที่ตำแหน่ง 2 และ 3 และมีหมู่ ketone ที่ตำแหน่ง 4 ฟลาโวนที่พบในพืชส่วนใหญ่มักมีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง C-5 และอาจพบที่ตำแหน่ง C-7, C-3' หรือ C-4' ได้เช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังมีหมู่แทนที่อื่นๆ เช่น หมู่ฟีนิล

หมู่อัลดีไฮด์ หมู่เมทิลีนไดออกซิล หรือหมู่ฟิวแรนที่พบมากในพืชวงศ์ถั่ว เป็นต้น ตัวอย่างสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในกลุ่ม flavone เช่น apigenin, luteolin, tangeretin และ nobiletin เป็นต้น

2. กลุ่มฟลาโวนอล (Flavonols) โครงสร้างสารกลุ่ม flavonols คล้ายกับกลุ่ม flavone ต่างกันเพียง flavonols มีหมู่ hydroxyl แทนที่ตำแหน่ง C-3 ดังนั้นอาจเรียกชื่อว่า 3-hydroxyflavone หมู่ hydroxyl พบการแทนที่ตำแหน่งอื่นๆได้เช่นเดียวกันสารกลุ่ม flavones นอกจากนี้ยังพบการแทนที่ของหมู่อื่นๆ เช่น methoxy, prenyl, benzyl มีผลทำให้เกิดความหลากหลายทางโครงสร้าง glycoside ของสารกลุ่มนี้พบทั้งแบบ C-glycoside และ O-glycoside แต่จะพบกลุ่ม O-glycoside มากกว่า และมักแทนที่หมู่ ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง C-3 อาจพบได้บ้างเช่นกันในตำแหน่งอื่นๆ น้ำตาลที่พบมากคือ glucose และ rhamnose ตัวอย่างสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในกลุ่ม flavonols เช่น quercetin, rutin, morin และ kaempferol เป็นต้น

3. กลุ่มฟลาวาโนน (flavanones) โครงสร้างหลักสารกลุ่ม flavanone คล้ายกับกลุ่ม flavone แต่ไม่ปรากฏพันธะคู่ที่ตำแหน่ง C-2 และ C-3 บางครั้งจึงเรียกลักษณะนี้ว่า dihydroflavones จากโครงสร้างทำให้ C-2 เกิดเป็น chiral carbon center ดังนั้น stereochemistry จึงมีได้ 2 แบบ คือ 2S หรือ 2R ในธรรมชาติมักพบชนิด levorotatory (-) หรือ (2S)-flavone มากกว่า สารกลุ่ม flavanones ส่วนใหญ่ไม่มีสี หรืออาจมีสีเหลืองอ่อนๆ ตัวอย่างสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในกลุ่ม flavanones เช่น narigenin, naringin, hesperetin และ hesperidin เป็นต้น

4. กลุ่มฟลาวาโนนอล (flavanonols) สารกลุ่มนี้มีโครงสร้างแกนคล้ายกับกลุ่ม flavonol แต่ไม่ปรากฏพันธะคู่ที่ตำแหน่ง C-2 และ C-3 บางครั้งจึงเรียกลักษณะนี้ว่า dihydroflavonols ตำแหน่ง C-2 และ C-3 เกิด chiral carbon center ดังนั้น stereochemistry ของสารกลุ่มนี้ที่พบในธรรมชาติ จึงมีได้ 4 แบบ คือ (2R, 3R), (2R, 3S), (2S, 3R) และ (2S, 3S) แต่พบชนิด (2R, 3R) มากที่สุด สารกลุ่มฟลาวาโนนอลนั้นพบในธรรมชาติได้น้อย แต่โครงสร้างค่อนข้างมีความหลากหลาย ตัวอย่างสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในกลุ่ม flavanonols เช่น taxifolin

5. กลุ่มฟลาแวน (flavans) ฟลาวานอล (flavanols) ลิวโคแอนโทไซยานิน (leucoanthocyanins) และโปรไซยานิดิน (procyanidins) สารกลุ่มนี้เป็นฟลาโวนอยด์ที่ไม่มีหมู่คาร์บอนิลที่ตำแหน่ง C-4 สำหรับโครงสร้างแกนหลักของกลุ่มฟลาแวนมีลักษณะเป็นวงเบนโซไพโรน ไม่ปรากฏพันธะคู่ตำแหน่ง C-2 และ C-3 ส่วนฟลาวานอล โดยทั่วไปมักจะหมายถึงฟลาแวนที่มีหมู่ไฮดรอกซิลแทนที่ตำแหน่ง C-3 หรือเรียกว่า ฟลาแวน-3-อล (flavan-3-ol) ฟลาแวนและฟลาวานอลจะมี absolute configuration ที่ตำแหน่ง C-2 และ C-3 เป็นทั้งแบบ (2S, 3S), (2R, 3S) และ (2R, 3S) ชื่อเรียกทั่วไปจะมีคำนำหน้าขึ้นกับแบบ configuration หากเป็น 2R,3R ชื่อที่เรียกมักมีคำนำหน้าเป็น "epi" เช่น epicatechin แต่ถ้าเป็น 2S, 3S จะมีคำว่า "ent" เช่น entepicatechin

สำหรับสารกลุ่มฟลาโวนอลนั้นบางตำราจะหมายถึงสารกลุ่ม catechins ซึ่งจะแบ่งเป็น 2 epimer ได้แก่ (+)-catechin และ (-)-epicatechin ขึ้นกับ configuration ของพันธะระหว่างวงบีกับ C-2 และหมู่ไฮดรอกซิลที่ C-3

6. กลุ่มแอนโทไซยานิดิน (anthocyanidins) มีโครงสร้างแกนเป็น 2-phenylbenzopyrylium หรือ 2-phenylchromenylium สารกลุ่มนี้เป็นสารที่ทำให้เกิดสีส้มของดอกไม้และผลไม้บางชนิด พบได้ในกลีบดอกไม้ และส่วนอื่นๆ เช่น กลีบเลี้ยง ใบ และเปลือกผล ช่วยลดแมลงในการผสมเกสรของพืชบางชนิด

โดยทั่วไปมักพบสารแอนโทไซยานิดินในรูป glycoside เรียกสารกลุ่มนี้ว่า anthocyanins น้ำตาลที่มาเกาะอาจเป็นน้ำตาล monosaccharide ซึ่งส่วนใหญ่เป็น glucoside มักพบในตำแหน่ง C-3 หรือ C-5 หรือทั้ง 2 ตำแหน่ง ตัวอย่างสาร anthocyanins เช่น delphinidin-3-glucoside พบในกลีบดอกอัญชัน หรือ malvidin-3-glucoside พบในเปลือกองุ่นแดง

3.1 ประโยชน์ของสารฟลาโวนอยด์⁴³

3.1.1 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ประโยชน์ที่สำคัญและเด่นชัดของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ คือ ฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชัน โดยกลไกการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ พบได้หลายรูปแบบ โครงสร้างสำคัญในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของฟลาโวนอยด์อยู่ที่การแทนที่หมู่ -OH ที่ตำแหน่ง 3' และ 4' นอกจากนี้ การมี conjugated double bond ที่ตำแหน่ง 2, 3 และมีกลุ่มคาร์บอนิล ที่ตำแหน่ง C-4 ก็มีผลช่วยทำให้ปฏิกิริยาถูกใช้ของออกซิเดชันหยุดได้ นอกจากนี้สารกลุ่ม flavonol ซึ่งมี -OH อยู่ที่ตำแหน่ง C-3 ทำให้มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้แรงกว่า flavones

3.1.2 ฤทธิ์ต้านการอักเสบ สารกลุ่มฟลาโวนอยด์มีฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยมีกลไกการออกฤทธิ์ได้หลายแบบ เช่น ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ฟอสโฟไลเปส A-2 (PLA2) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างและหลั่ง arachidonic acid ออกจากเซลล์ ตัวอย่างฟลาโวนอยด์ที่ออกฤทธิ์ดังกล่าวได้แก่ quercetin, kaempferol และ myricetin หรือออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ cyclooxygenase (Cox-1 และ Cox-2) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง prostaglandin ตัวอย่างฟลาโวนอยด์ที่ออกฤทธิ์แบบนี้ได้แก่ apigenin, luteolin, kaempferol, quercetin และ myricetin

3.1.3 ฤทธิ์ป้องกันโรคกระดูกพรุน โรคกระดูกพรุนเกิดจากมวลกระดูกลดลง ทำให้กระดูกบางและหักง่าย พบมากในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือน การรักษาโรคกระดูกพรุนวิธีหนึ่งทำได้โดยการให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทน เนื่องจากฮอร์โมนดังกล่าวมีผลต่อการสร้างกระดูก จึงมีการใช้พืชที่มี

สาร phytoestrogen ซึ่งเป็นสารฟลาโวนอยด์กลุ่มไอโซฟลาโวน เช่น genistein, daidzein เพื่อป้องกันกระดูกพรุน ไอโซฟลาโวนพบได้มากในถั่วเหลือง, กวาวเครือ, red clover

3.1.4 ฤทธิ์ป้องกันอาการหลังหมดประจำเดือน อาการที่พบในหญิงวัยทองหลังหมดประจำเดือน เช่น อาการร้อนวูบวาบ ผิวแห้ง โกรธง่าย และความจำลดลง มีรายงานว่า การรับประทานพืชที่มีไอโซฟลาโวนในปริมาณสูง เช่น ถั่วเหลือง, red clover ช่วยลดอาการดังกล่าว

3.1.5 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เอนไซม์ไทโรซิเนสเกี่ยวข้องในกระบวนการสร้างเม็ดสีผิวที่ผิวหนัง ทำให้ผิวคล้ำ สารฟลาโวนอยด์ กลุ่มไอโซฟลาโวน ฟลาโวน ไดไฮโดรฟลาโวนอล และฟลาวาโนน จะออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ จึงช่วยป้องกันผิวคล้ำได้

3.1.6 ฤทธิ์ป้องกันโรคหลอดเลือดและหัวใจ กลไกการออกฤทธิ์ของฟลาโวนอยด์ในการป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือด เกิดเนื่องจากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ด้านการอักเสบของกลุ่มฟลาโวนอยด์ มีรายงานว่า คนที่บริโภคอาหารที่มีฟลาโวนอยด์มาก เช่น ชา หอมใหญ่ แอปเปิล จะช่วยลดอัตราการเสียชีวิตด้วยโรคหัวใจและหลอดเลือดได้ ฟลาโวนอยด์จากถั่วเหลืองและชาเขียวมีผลช่วยลดระดับ LDL cholesterol ได้เช่นกัน

3.2 การตรวจสอบและพิสูจน์เอกลักษณ์ของฟลาโวนอยด์

3.2.1 การตรวจสอบกลุ่มฟลาโวนอยด์อย่างง่ายด้วยปฏิกิริยาการเกิดสี

1) วิธีชินโนดะ (Shinoda test)

นำฟลาโวนอยด์มาเติมแผ่นแมกนีเซียมและกรดเกลือเข้มข้น จะทำให้เกิดปฏิกิริยารีดักชัน ได้ผลิตภัณฑ์จำพวกไซยานิดิน ฟลาโวนอยด์กลุ่มฟลาโวนอล ฟลาวาโนน ไดไฮโดรฟลาโวนอล และแซนโทนจะให้ผลิตภัณฑ์สีแดงถึงม่วงแดง ส่วนกลุ่มฟลาโวน ซาลิโคน และออโรนให้สีส้ม หากใช้ผงสังกะสีแทนแผ่นแมกนีเซียม จากนั้นเติมกรดเกลือเข้มข้น เขย่าให้เข้ากันประมาณ 1 นาที กลุ่มไดไฮโดรฟลาโวนอลจะเกิดสีแดงเข้ม หรือม่วง ส่วนกลุ่มฟลาวาโนนและฟลาโวนอลจะเกิดสีชมพู หรือม่วง หรือไม่เกิดสี

2) การตรวจสอบด้วยแอมโมเนีย

นำฟลาโวนอยด์ที่ต้องการตรวจสอบมาเติมแอมโมเนียลงที่ละลาย สังกะสีที่ เกิดขึ้น กลุ่มฟลาโวน ฟลาโวนอล และแซนโทนจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง กลุ่มฟลาวาโนนจากที่ไม่มีสีจะเปลี่ยนเป็นสีชมพู หรือส้ม กลุ่มซาลิโคน และออโรนจะกลายเป็นสีม่วงแดงทันที ส่วนสารกลุ่มไดไฮโดรฟลาโวนอลจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล หรือส้ม

3) การตรวจสอบด้วยกรดกำมะถัน

เติมกรดกำมะถันเข้มข้นลงในฟลาโวนอยด์ที่ต้องการตรวจสอบที่ละลาย จากนั้นสังเกตสีที่เกิดขึ้น กลุ่มฟลาโวนและฟลาโวนอลจะให้สีเหลือง กลุ่มไดไฮโดรฟลาโวนอลจะเปลี่ยนเป็นสีส้ม หรือแดง ส่วนกลุ่มซาลิโคนและออโรนจะเกิดเป็นสีแดง หรือม่วงแดง หรือน้ำเงิน

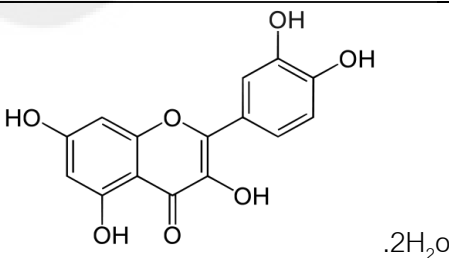
4) การตรวจสอบสารกลุ่มแอนโทไซยานินด้วยความเป็นกรด – ด่าง

นำฟลาโวนอยด์ที่ต้องการตรวจสอบเติมกรดเกลือลงไปจะได้สีแดงเกิดขึ้น จากนั้นค่อยๆ เติมแอมโมเนียทีละหยด สังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงของสีจากสีแดง สีส้ม น้ำเงิน สีเขียว หรือไม่มีสี ซึ่งเปลี่ยนแปลงไปตามคุณสมบัติการแตกตัวเป็นประจุ และความคงตัวของแอนโทไซยานิน

3.3 สารสำคัญหรือสารเทียบ (marker) ของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบในต้นเพชรสังฆาต

เป็นข้อกำหนดของเครื่องยาที่สำคัญอีกอย่างหนึ่ง เพราะว่า สารสำคัญเป็นตัวบ่งชี้คุณภาพของเครื่องยาที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการรักษาโรค ซึ่งสารสำคัญ คือ สารประกอบทางเคมีในสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ และ/หรือมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ส่วนสารเทียบ คือ สารประกอบทางเคมีที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะซึ่งพบในสมุนไพรชนิดนั้น แต่อาจยังไม่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งสารที่นำมาเปรียบเทียบนี้อาจเป็นสารหลักหรือสารรองก็ได้ แต่จะเป็นสารที่รู้สูตรโครงสร้างทางเคมีแล้ว วิธีที่นิยมในการหาปริมาณสารสำคัญ และสารเปรียบเทียบคือ วิธีโครมาโทกราฟี (chromatography) และวิธีทางสเปกโทรสโกปี (spectroscopy)

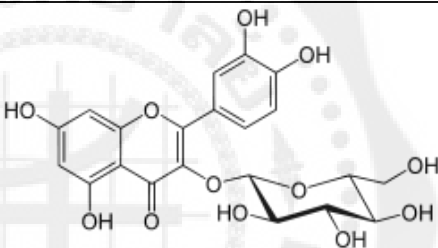
ตาราง 3 แสดงคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของสาร quercetin ⁴⁴

Name	Quercetin
Structure	
Synonyms	3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone, dikvertin, quercetin
IUPAC name	2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-1-benzopyran-4-one
Molecular formula	C ₁₅ H ₁₀ O ₇

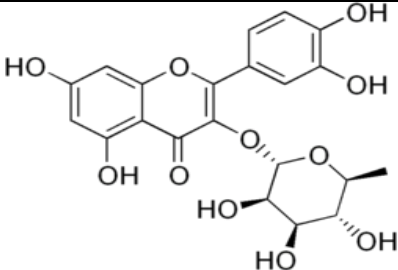
ตาราง 3 (ต่อ)

Name	Quercetin
Molar mass	302.24 g/mol
Physical state	Yellow powder
Spectral data	UV/Vis absorption maxima at 255 nm and 371 nm, The absorptivity at the maximum at 371 nm.

ตาราง 4 แสดงคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของสาร isoquercetin ⁴⁵

Name	Isoquercetin
Structure	
Synonyms	quercetin-3-glucoside, quercetin-3-O-glucoside, quercetin 3-O-b-D-glucopyranoside, isoquercitroside, isoquercitin, hirsutrin, 3-glucosylquercetin, glucosyl 3-quercetin, isotrifolin, isohyperoside, and isotrifoliin
IUPAC name	2-(3, 4-Dihydroxyphenyl)-5, 7-dihydroxy-3-[(2S, 3R, 4S, 5S, 6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxychromen-4-one
Molecular formula	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂
Molar mass	464.38 g/mol
Physical state	Yellow powder
Spectral data	UV/Vis absorption maxima at 257 and 352 or 353 nm
Solubility in water	95 mg/l

ตาราง 5 แสดงคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของสาร quercitrin

Name	Quercitrin
Structure	
Synonyms	quercetin 3-O-rhamnoside, quercetin-3-L-rhamnoside, quercetrin, quercitrin
IUPAC name	2-(3, 4-dihydroxyphenyl)-5, 7-dihydroxy-3-[(2S, 3R, 4R, 5R, 6S)-3, 4, 5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxychromen-4-one
Molecular formula	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁
Molar mass	448.3769 g/mol
Physical state	Yellow powder

3.4 การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ quercetin, isoquercetin และ quercitrin

จากการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาพบว่าสารฟลาโวนอยด์ที่อยู่ในรูป glycoside จะถูกดูดซึมที่ลำไส้เล็กได้ไม่ดีเท่า quercetin จึงต้องอาศัยแบคทีเรียในลำไส้เพื่อสลายให้อยู่ในรูปของ aglycone ก่อนเพื่อให้ดูดซึมต่อไป⁴⁶⁻⁴⁷ isoquercetin และ quercitrin สามารถกำจัดอนุมูล Superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$) แต่อย่างน้อยกว่า quercetin⁴⁸ isoquercetin และ quercitrin สามารถกำจัดอนุมูลอิสระ Hydroxyl radical ($OH^{\cdot}$) ได้เช่นเดียวกับ quercetin⁴⁹ กลุ่มเซลล์ ECV304 ที่ได้รับ quercetin ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ โดยเพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ copper/zinc superoxide dismutase, manganese superoxide dismutase, glutathione peroxidase และ endothelial nitric oxide synthase (eNOS) และมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้าน H_2O_2 ที่ทดสอบในหลอดทดลอง มีฤทธิ์ปกป้องเซลล์บุผิวหลอดเลือดจากกร³⁴ และสาร quercetin ทำให้หลอดเลือดแดงใหญ่ของหนูขาวกลับเข้าสู่ภาวะปกติหลังจากถูกชักนำด้วย phenylephrine เพื่อให้หลอดเลือดหดตัวผ่านทางปฏิกิริยา phosphorylation ของ endothelial nitric oxide synthase (eNOS) เพิ่มการดูดซึมของ nitric oxide (NO) ในเยื่อผนังหลอดเลือด⁵⁰

4. Chromatographic fingerprints

การควบคุมคุณภาพ (quality control) ยาจากสมุนไพร หมายถึง กระบวนการที่จัดทำขึ้นอย่างเป็นระบบ เพื่อให้ได้คุณภาพของยาจากสมุนไพรตามมาตรฐานที่กำหนด ตั้งแต่การควบคุมคุณภาพของสมุนไพรที่เป็นวัตถุดิบสมุนไพรที่อยู่ระหว่างการผลิต และยาจากสมุนไพรสำเร็จรูป ให้ได้มาตรฐานตามเภสัชตำรับ สอดคล้องกับ ความต้องการของผู้ป่วย และในทางปฏิบัตินั้นการควบคุมคุณภาพเป็นส่วนหนึ่งของระบบประกันคุณภาพ เพื่อให้ยาจากสมุนไพรมีคุณภาพตรงตามเป้าหมายขององค์กรด้วย⁵¹

ในการควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์สมุนไพร ต้องการวิธีที่สามารถตรวจสอบสารสำคัญได้หลายชนิดในเวลาเดียวกัน ซึ่งในปัจจุบันที่นิยมใช้คือ chromatographic fingerprints ซึ่งเป็นการอาศัยเทคนิคการแยกสารที่ผสมกันอยู่ให้แยกออกจากกันเป็นส่วนๆ ผลของการแยกสารที่เรียกว่า chromatogram ต่อจากนั้นจึงนำผล chromatogram ของสารสกัดหยาบที่ได้จากสมุนไพรตัวอย่างมาเปรียบเทียบกับ chromatogram ของสารมาตรฐานเทคนิคการตรวจสอบที่นิยมใช้ในการทำ chromatographic fingerprints มีดังนี้⁷

1. High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) เป็นเทคนิคที่มีการพัฒนาเครื่องมือจาก TLC เพื่อให้ระบบการวิเคราะห์มีความเที่ยงในการวิเคราะห์ซ้ำ (reproducibility) แต่การวิเคราะห์ก็ยังไม่สามารถแยกสารสำคัญออกจากกันได้อย่างชัดเจนจึงทำให้มีข้อจำกัดในการนำเทคนิคนี้มาใช้งาน

2. Gas Chromatography (GC) เป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์สารในสถานะแก๊ส จึงสามารถใช้ได้เฉพาะกับสมุนไพรที่มีสารสำคัญที่สามารถระเหย (volatile compounds) ได้เท่านั้น

3. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์สารในสถานะของเหลว และได้รับความนิยมอย่างยิ่งสำหรับการตรวจสอบสมุนไพร เนื่องจากสารสำคัญในสมุนไพรส่วนใหญ่มักมีมวลโมเลกุลขนาดใหญ่ จึงสามารถแยกออกจากกันได้ ในสถานะของเหลว ข้อดีของเทคนิคนี้คือมีคอลัมน์ที่ใช้ในการแยกสารสำคัญในสมุนไพร และมีเครื่องตรวจหา (detector) ที่หลากหลาย สามารถพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ได้ง่าย อีกทั้งยังมีความเฉพาะเจาะจง (selectivity) และมีความเที่ยงในการวิเคราะห์ซ้ำสูง

การใช้ chromatographic fingerprints ในการตรวจสอบสมุนไพรนั้น มีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการควบคุมคุณภาพของสมุนไพรและการตรวจเอกลักษณ์ของวัตถุดิบสมุนไพร เนื่องจากเป็นวิธีทดสอบเชิงปริมาณที่สามารถวิเคราะห์สารหลายชนิดได้ในครั้งเดียวกัน อีกทั้งมีความถูกต้อง (accuracy) มีความแม่นยำ (precision) มีสภาพไว (sensitivity) และมีความเที่ยงในการวิเคราะห์ซ้ำ นอกจากนี้ยังนำไปใช้ในการวิจัยเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ของสารสำคัญในสมุนไพร การหา

ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยว พื้นที่ที่เหมาะสมในการเพาะปลูก วิธีการสกัดและการเก็บรักษาที่ดีได้อีกด้วย

4.1 Thin Layer Chromatography (TLC) ⁵²⁻⁵³

โครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (thin-layer chromatography; TLC) เป็นเทคนิคแยกสารแบบของแข็ง - ของเหลว โดยใช้ alumina หรือ silica gel เป็นวัฏภาคคงที่ (stationary phase) เคลือบเป็นแผ่นบางๆ หนาประมาณ 0.25 mm บนแผ่น aluminum และใช้ตัวทำละลายเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ซึ่งมีคุณสมบัติต่างกัน และคุณสมบัติที่สำคัญคือ ความมีขั้ว (polarity) สารใดในสารผสมมีขั้วคล้ายกับวัฏภาคคงที่ก็จะอยู่กับวัฏภาคคงที่ได้มากกว่า ส่วนสารใดมีขั้วต่างจากวัฏภาคคงที่ก็จะเคลื่อนที่ไปตามวัฏภาคเคลื่อนที่ได้มากกว่า ฉะนั้นสารใดจะเคลื่อนที่ไปได้มากน้อยเพียงใดจะขึ้นกับการดูดซับที่ผิวของวัฏภาคคงที่ (stationary phase) โครมาโทกราฟีแบบชั้นบางนี้มีประโยชน์อย่างมากในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพแบบง่ายและใช้สารในการวิเคราะห์ปริมาณน้อย เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง และตรวจเอกลักษณ์สารจากสมุนไพรทั้งในรูปแบบสารเดี่ยว สารสกัด ยาสำเร็จรูป วัตถุดิบ และผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ

4.1.1 เทคนิค thin-layer chromatography (TLC) มีส่วนประกอบที่สำคัญ 2 ส่วน ได้แก่

1) วัฏภาคคงที่ (stationary phase) หรือเรียกว่า adsorbent ของทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีจะแผ่นบนแผ่นระนาบ ซึ่งทำหน้าที่รองรับ โดยแผ่นระนาบทำด้วยแก้ว (glass) อลูมิเนียม (aluminium) หรือพอลิเอทิลีน (polyethylene) วัฏภาคคงที่มีให้เลือกหลายชนิด เช่น ซิลิกาเจล อะลูมินา หรือเซลลูโลส

2) วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ทำหน้าที่ในการเคลื่อนที่ของสารไปบนวัฏภาคคงที่ จะเป็นระยะทางมากน้อยแตกต่างกันขึ้นกับคุณสมบัติทางเคมีของสาร ตำแหน่งที่ปรากฏแสดงด้วยค่า R_f สารที่มีความแรงในการดูดซับบนวัฏภาคคงที่สูงจะเคลื่อนที่ไปได้ระยะทางน้อยกว่าสารที่เกิดการดูดซับได้น้อย ในการเลือกตัวทำละลายอินทรีย์เพื่อใช้ในการพัฒนาแผ่นที่แอลซีต้องคำนึงถึงความแรง และความจำเพาะของตัวทำละลาย

4.1.2 การเตรียมสารตัวอย่าง โดยการเตรียมสารในรูปของเหลวหรือสารละลายในความเข้มข้นที่เหมาะสม ตัวทำละลายที่ใช้ควรเป็นเกรดที่มีความบริสุทธิ์เพื่อไม่ให้เกิดการปนเปื้อนของสารอื่นใดจากตัวทำละลายไปมีผลรบกวนการวิเคราะห์ ตัวทำละลายต้องไม่ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่าง และแผ่นทิน เลเยอร์โครมาโทกราฟี

4.1.3 การพัฒนาแผ่นที่แอลซี (development) เมื่อหยดสารละลายตัวอย่างซึ่งเป็นสารผสม และสารมาตรฐานบนวัสดุภาควัสดุที่เรียบร้อยแล้วจึงนำแผ่นฟิล์มเออร์โครมาโทกราฟีใส่ในแท่งซึ่งบรรจุ วัสดุภาควัสดุเคลื่อนที่หรือระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม ก่อนการพัฒนาแผ่นที่แอลซีต้องทำให้บรรยากาศในแท่งคืบตัว และระหว่างการพัฒนาห้ามเคลื่อนย้ายและไม่เปิดฝาแท่งจนกว่าจะพัฒนาเสร็จ เพื่อให้เกิดกระบวนการที่วัสดุภาควัสดุเคลื่อนที่ เคลื่อนที่ไปบนวัสดุภาควัสดุที่เกิดการแยกสารประกอบต่างๆออกจากกัน

4.1.4 การตรวจสอบสาร หลังจากการพัฒนาแผ่นที่แอลซี หากเป็นสารที่มีสีจะเห็นและรู้ตำแหน่งของสารที่แยกได้ทันที แต่สารส่วนใหญ่ไม่มีสี ซึ่งต้องมีวิธีตรวจสอบโดยบอกตำแหน่งของสารที่แยกได้ หรือสารที่แยกได้เป็นสารกลุ่มใดโดยการใช้ แสงอัลตราไวโอเลตที่มีความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร และการใช้น้ำยาตรวจสอบ สารใดที่สามารถดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตที่มีความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ก็จะเห็นเป็นจุดหรือแถบสีดำนบนพื้นสีเหลือง เรียกว่าปรากฏการณ์นี้ว่า quenching และสารที่ดูดกลืนแสงได้บางชนิดจะมีคุณสมบัติเรืองแสงที่มีความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร ขึ้นกับชนิดของกลุ่มสารโดยพื้นของ แผ่นที่แอลซีจะมี

4.1.5 การประเมินผลที่แอลซีโครมาโทแกรม ทำได้ดังนี้

1) ค่า Retardation factor หรือ relative front (R_f) ตำแหน่งของจุดหรือแถบของสารบนที่แอลซีโครมาโทแกรม จะประเมินจากค่า R_f ซึ่งเป็นค่าที่ได้จากระยะทางเคลื่อนที่ของสาร (วัดจากจุดกึ่งกลางของแถบสาร)หารด้วยระยะทางเคลื่อนที่ของวัสดุภาควัสดุเคลื่อนที่

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ไป}}{\text{ระยะทางที่วัสดุภาควัสดุเคลื่อนที่เคลื่อนที่ไป}}$$

2) จำนวนแถบสาร บ่งบอกถึงจำนวนของชนิดแถบสาร

3) ความเข้มของแถบสาร จะบ่งบอกถึงปริมาณสารว่ามากน้อยเพียงใด และแถบสารใดเป็นแถบสารหลักในที่แอลซีโครมาโทแกรม

4) สีของแถบสารก่อนการทำปฏิกิริยากับน้ำยาฟ้น ซึ่งตรวจสอบภายใต้แสงขาว แสงอัลตราไวโอเลตทั้งความยาวคลื่นสั้น 254 นาโนเมตร และความยาวคลื่นยาว 366 นาโนเมตร และหลังจากฟ้นด้วยน้ำยาเฉพาะเจาะจง

4.2 โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatographic; HPLC) ⁵⁴⁻⁵⁵

4.2.1 โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

เป็นเทคนิคแยกสารประกอบ ที่ผสมอยู่ในตัวอย่าง โดยกระบวนการแยกเกิดขึ้นระหว่าง 2 วัฏภาค คือ วัฏภาคคงที่ (stationary phase) หรือคอลัมน์ (column) กับวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ซึ่งจะถูกแยกออกมาในเวลาที่แตกต่างกัน สารผสมที่อยู่ในตัวอย่าง สามารถถูกแยกออกจากกันได้นั้นจะขึ้นอยู่กับความสามารถในการเข้ากันได้ดีของสารนั้นกับวัฏภาคเคลื่อนที่ โดยสารประกอบที่สามารถเข้ากันได้ดีกับวัฏภาคเคลื่อนที่จะถูกแยกออกมาก่อน ส่วนสารที่เข้ากันได้ไม่ดีกับวัฏภาคเคลื่อนที่หรือเข้ากันได้ดีกับวัฏภาคคงที่จะถูกแยกออกมาทีหลัง โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) เป็นเทคนิคที่พัฒนามาจากความรู้ทางทฤษฎีของเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี และได้รับการพัฒนาต่อเนื่องอย่างรวดเร็ว ทั้งในส่วนของวัฏภาคคงที่และเทคโนโลยีการควบคุมการทำงานด้วยคอมพิวเตอร์ จนปัจจุบันเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงมีข้อเด่นกว่าเทคนิคอื่นคือให้ความรวดเร็ว มีความไว (sensitivity) สูง และให้รีโซลูชัน (resolution) ในการแยกและวิเคราะห์สารสูงกว่า จึงนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เครื่องมือโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) มีส่วนประกอบที่สำคัญ 6 ส่วน ได้แก่

- 1) ภาชนะบรรจุวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase reservoir) ใช้เป็นที่เก็บวัฏภาคเคลื่อนที่ เพื่อใช้เป็นตัวพาสารตัวอย่างผ่านคอลัมน์ ภาชนะทำด้วยแก้วหรือเหล็กกล้าไร้สนิม
- 2) ปั๊ม (pump) เป็นตัวช่วยดันให้วัฏภาคเคลื่อนที่ไหลจากภาชนะบรรจุวัฏภาคเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ ซึ่งภายในบรรจุวัฏภาคคงที่ไปยังเครื่องตรวจวัดด้วยอัตราเร็วคงที่สม่ำเสมอตามที่ตั้งไว้
- 3) ระบบฉีดสาร (sample injection system) เป็นการนำตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์ด้วยเข็ม ฉีดเข้าส่วนที่ฉีดสาร (injector) ซึ่งทำด้วยเหล็กกล้าไร้สนิม ระบบสำหรับนำสารเข้าสู่คอลัมน์
- 4) คอลัมน์ (column) จัดเป็นส่วนสำคัญของระบบ มีลักษณะเป็นท่อกลวง ผิวภายในเรียบสม่ำเสมอ ทำจากเหล็กกล้าไร้สนิม ภายในบรรจุสารที่ใช้เป็นวัฏภาคคงที่ ส่วนปลายทั้ง 2 ข้างของคอลัมน์จะปิดด้วยแผ่นกรองที่มีรูพรุน ทำหน้าที่กรองอนุภาคเล็กๆ
- 5) เครื่องตรวจวัดสาร (detector) ใช้ในการตรวจวัดปริมาณสารที่ออกจากคอลัมน์ และไม่ทำลายสารตัวอย่าง นิยมใช้ อัลตราไวโอเลต-วิสิเบิลดีเทคเตอร์
- 6) เครื่องบันทึก-ประมวลผล เครื่องประมวลผลจะทำการตรวจวัดสัญญาณ (detector) และแปลผลออกมาเป็นโครมาโทแกรม (chromatogram) ซึ่งสารเชิงเดี่ยวแต่ละสารจะมีระยะเวลาที่

อยู่ในคอลัมน์ (retention time) เฉพาะตัว ในการวิเคราะห์ผลจะนำพื้นที่ใต้พีค (peak) ของแต่ละสาร มาคำนวณผลเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (calibration curve)

4.2.2 การทดสอบความเหมาะสมของระบบในวิธีทางโครมาโทกราฟี (system suitability test in chromatographic methods)

การทดสอบความเหมาะสมของระบบ (system suitability test) มีความสำคัญ เนื่องจากเป็นส่วนหนึ่งของวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography; HPLC) การทดสอบความเหมาะสมของระบบจำเป็นต้องทำก่อนการเริ่มต้นวิเคราะห์ เพื่อพิสูจน์ว่าระบบโครมาโทกราฟีที่ใช้มีความสามารถในการแยก (resolution) ประสิทธิภาพของคอลัมน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ (column efficiency) รูปร่างของพีค (Peak sharpness) และการวิเคราะห์ให้ผลเหมือนเดิมทุกครั้ง (reproducibility) เพียงพอสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่าง การทดสอบนี้อยู่บนหลักการของเครื่องมือ ระบบอิเล็กทรอนิกส์ การปฏิบัติงานวิเคราะห์ ซึ่งทั้งหมดเป็นการประเมินแบบองค์รวม

การทดสอบความเหมาะสมของระบบ ตามเกณฑ์ตำราของประเทศไทยสหรัฐอเมริกา ฉบับปี ค.ศ. 2014 (USP 37) กำหนดให้ทำหัวข้อ resolution (Rs) relative standard deviation (RSD) tailing factor (T) และ number of theoretical plates (N) การทดสอบทำโดยการเก็บข้อมูล ของการฉีดซ้ำของสารละลายมาตรฐาน หรือสารละลายอื่นที่กำหนดในโมโนกราฟ (monograph) โดยใช้สภาวะการปฏิบัติงานที่ระบุในตำรับยา

คู่มือ CDER “Reviewer Guidance: Validation of Chromatography Method” ฉบับปี ค.ศ. 1994 ได้กำหนดการประเมินพารามิเตอร์ต่างๆ สำหรับการตรวจสอบความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์โดยยกตัวอย่างการตรวจสอบความเหมาะสมของวิธี reversed-phase HPLC ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้มาก ในคู่มือนี้ นอกจากมีหัวข้อ R, RSD, T และ N ยังมีการอธิบายถึงหัวข้อ capacity factor (k') และ relative retention (α) เกณฑ์ในข้อมูลนี้ นอกจากใช้กับ HPLC แล้ว ยังใช้กับวิธีโครมาโทกราฟีอื่นๆ ได้

4.2.3 พารามิเตอร์สำหรับการทดสอบ system suitability test ^{44, 56} มีดังนี้

1) Resolution (การแยกชัด) เป็นการตรวจสอบความสามารถหรือประสิทธิภาพการแยกของคอลัมน์ในการแยกสารผสม โดยพิจารณาพีค 2 พีค ที่ติดกันว่าแยกออกจากกันได้ดีเพียงใด ค่า resolution ตัดสินจากค่า RS factor (RS) การแยกชัดที่ดีต้องมีค่ามากกว่า 1.5

2) Tailing factor (T) และ Asymmetry factor (As) แสดงถึงความสมมาตรของพีค ในการวิเคราะห์ยา tailing factor ไม่ควรมีค่ามากกว่า 2 ถ้า T เท่ากับ 1 แสดงว่าพีคสมมาตร

3) จำนวนเพลท (Plate number, column efficiency, N) เป็นพารามิเตอร์ที่สำคัญในการวัดประสิทธิภาพของคอลัมน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ ควรมีค่ามากกว่า 2,000

4) Relative standard deviation (RSD) เป็นการวัดความแม่นยำของระบบ ตรวจสอบโดยการฉีดสารละลายเดียวกันซ้ำๆ แล้วประเมินความคงที่ของระบบ โดยปกติจะทำการฉีดซ้ำ 6 ครั้ง โดยมีค่า %RSD ไม่เกิน 2

5) Relative retention การแยกสารสองตัวในของผสมในสภาวะที่เหมาะสม

4.2.4 เกณฑ์การพิจารณาทั่วไปของการทดสอบความเหมาะสมของระบบ

เกณฑ์การพิจารณาทั่วไปของการทดสอบความเหมาะสมของระบบของ USP 37 และคู่มือ CDER “Reviewer Guidance: Validation of Chromatography Method” แสดงในตาราง 6 กรณีที่ไม่โนกราฟในตำราการทดสอบความเหมาะสมของระบบไว้ ต้องทำการทดสอบตามที่ระบุในโนโนกราฟนั้น

4.2.5 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation) ตามหลักเกณฑ์ของ ICH (International Conference on Harmonization) ^[56] ตรวจสอบผลการวิเคราะห์ตามเกณฑ์ AOAC Guidelines ^[57]

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ เป็นกระบวนการที่ถูกสร้างขึ้นโดยการศึกษาทางห้องปฏิบัติการ เพื่อแสดงให้เห็นว่า วิธีการนั้นมีความเหมาะสมและสามารถวิเคราะห์ตัวอย่าง และสารมาตรฐานได้ถูกต้อง แม่นยำ และเชื่อถือได้ ในช่วงความเข้มข้นของตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์

ตาราง 6 แสดงเกณฑ์การพิจารณาการทดสอบความเหมาะสมของระบบ HPLC

Topic	USP 37 ⁴⁴	CDER 1994* ⁵⁶
Resolution (R) R_s between the peak of interest and closest potential	>1.5	>1.5
Tailing factor (T)	≤ 2	≤ 2
Number of theoretical plates (N)	>2000	>2000
Repeatability	$\leq 2\%$ (n = 5) > 2 % (n = 6)	$\leq 1\%$ (n=5)

ตาราง 6 (ต่อ)

Topic	USP 37 ⁴⁴	CDER 1994* ⁵⁶
Capacity factor (K')	-	>2
Relative retention	-	This is not an essential parameter as long as the resolution (R_s) is stated.

*CDER “Reviewer Guidance: Validation of Chromatography Method”

Parameters สำคัญที่ใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ได้แก่

1) ความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ (Specificity) เป็นความเฉพาะเจาะจงของวิธีการวิเคราะห์ที่วัดเฉพาะสารที่ต้องการ การหา specificity ทำโดยเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์สารตัวอย่างเดี่ยวๆ เทียบกับสารตัวอย่างที่มีสิ่งอื่นเจือปน

2) ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (accuracy) ค่าที่ได้จากการวัดมีค่าใกล้เคียงกับค่าจริงมากน้อยเพียงใด โดยการวิเคราะห์สารมาตรฐานจำนวน 3 ความเข้มข้น (ค่าต่ำสุด ค่ากลาง ค่าสูงสุด) แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC จำนวน 3 ซ้ำ นำค่าพื้นที่ใต้กราฟที่ได้คำนวณหา %recovery เกณฑ์การยอมรับของ %recovery คือ มีค่าอยู่ในช่วง 90-108

3) ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (precision) เป็นการแสดงความใกล้เคียงของผลการวัดตัวอย่างเดียวกันซ้ำ ภายใต้สภาวะการทดสอบที่กำหนด ภายในวันเดียวกัน (intra day) และระหว่างวัน (inter day) นำผลที่ได้มาคำนวณค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative Standard Deviation, RSD) เกณฑ์การยอมรับของ %RSD สำหรับการวิเคราะห์ intra day-precision คือ มีค่าไม่เกิน 3% และ inter day-precision คือ มีค่าไม่เกิน 6%

4) การตรวจสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (linearity and range) เป็นคุณสมบัติของวิธีแสดงความสัมพันธ์ที่เป็นสัดส่วนโดยตรงระหว่างปริมาณที่ทราบค่ากับปริมาณจากการวัด การทดสอบช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ความเข้มข้นของสารและอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของสารที่ต้องการตรวจวัดกับสารมาตรฐานภายใน (area ratio) โดยความเข้มข้นที่ใช้เป็นจุดมาตรฐาน ต้องไม่ต่ำกว่า 6 จุดความเข้มข้น เกณฑ์การยอมรับจะแสดงค่าเป็น coefficient of determination (R^2) เพื่อศึกษาความเป็นเส้นตรง ซึ่งมีค่าไม่ต่ำกว่า 0.995

5) สภาพความไว (sensitivity) เป็นคุณสมบัติของวิธีที่แสดงถึงความสามารถในการตรวจวัดสารที่วิเคราะห์ใน 2 ลักษณะ คือ ปริมาณต่ำสุดที่วัดได้ ได้แก่ ความเข้มข้นต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (Limit of Detection, LOD) และความเข้มข้นต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ)

ก.) ความเข้มข้นต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (Limit of Detection, LOD) ประมาณค่า LOD โดยคำนวณจากสูตร $LOD = 3.3\sigma / S$ โดย σ คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสัญญาณ และ S คือ slope ของกราฟมาตรฐาน

ข.) ความเข้มข้นต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ) ประมาณค่า LOQ โดยคำนวณจากสูตร $LOQ = 10\sigma / S$ โดย σ คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสัญญาณ และ S คือ slope ของกราฟมาตรฐาน

5. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Xie และคณะ 2006 ได้ศึกษาลายพิมพ์ทางโครมาโทแกรมด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC fingerprint) ของสารสกัดเมธานอลจากใบแปะก๊วย (*Ginkgo biloba* extracts) จำนวน 19 ตัวอย่าง ที่มีการออกวางจำหน่าย แยกสารประกอบโดยระบบการชะสารตัวอย่างแบบเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของโมบายเฟส ความยาวคลื่น 250 นาโนเมตร พบว่าลักษณะลายพิมพ์ทางโครมาโทแกรมของใบแปะก๊วยมีความคล้ายคลึงกัน มีพีคของสาร quercetin-3-rutinoside (rutin) เป็นสารหลัก สามารถแยกสารฟลาโวนอยด์ (quercetin-3-rutinoside, quercetin cinnamoyl glycoside, kaempferol cinnamoyl glycoside) และกลุ่มสารอื่นได้ จากการตรวจสอบและประเมินคุณภาพยาใบแปะก๊วยด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงเป็นวิธีที่ ถูกต้อง แม่นยำ และมีประสิทธิภาพสำหรับการนำไปใช้ตรวจสอบคุณภาพยาจากสมุนไพร

อนุศักดิ์ ศิริคติธรรม และคณะ 2007 ได้ทำการศึกษา chromatographic fingerprints ของสารสกัดขึ้นเอทานอลของหัวข้าวเย็น (*Dioscorea membranacea* Pierre) โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบรีเวอร์เฟส ที่มีตัวตรวจวัดสารชนิด photodiode array โดยอาศัยลายพิมพ์ทางโครมาโทกราฟีและปริมาณของสารเทียบองค์ประกอบหลัก ได้แก่ ซึ่ง dioscorealide A, dioscorealide B และ dioscoreanone สำหรับการควบคุมคุณภาพของสารสกัดจากหัวข้าวเย็น แยกสารประกอบโดยการชะสารตัวอย่างแบบเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของโมบายเฟส ตรวจวัดการดูดกลืนของสาร dioscoreanone ที่ความยาวคลื่น 245 นาโนเมตร และวัดการดูดกลืนแสงของสาร dioscorealide A และ dioscorealide B ที่ความยาวคลื่น 270 นาโนเมตร พบว่าการวิเคราะห์โดยใช้ลายพิมพ์ทางโคร

มาโครราฟี่ได้พิสูจน์ว่ามีประโยชน์สำหรับการพิสูจน์เอกลักษณ์ และนำมาใช้ควบคุมคุณภาพของสารสกัดจากหัวข้าวเย็นได้

อุทัย ไสธนะพันธุ์ และคณะ 2013 ได้ทำการพิสูจน์ชนิดทางพฤกษศาสตร์ของโสมจุฬาภรณ์ที่ใช้ในปัจจุบันด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดแผ่นบาง (TLC) โดยการสุ่มซื้อตัวอย่างจากร้านขายยาแผนโบราณแหล่งต่างๆ จำนวน 17 ตัวอย่าง จัดทำลายพิมพ์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัด methanol เปรียบเทียบกับตัวอย่างอ้างอิง พบว่าตัวอย่างส่วนมาก (15 ตัวอย่าง) มีที่แอลซีโครมาโทแกรมเหมือนกับ *Artemisia pallens* และพบสาร cirsimaritin และ davana acid ที่มีรายงานว่าเป็นองค์ประกอบของ *A. pallens* และอีก 2 ตัวอย่างมีที่แอลซีโครมาโทแกรมเหมือนกับ *A. argyi* จึงสรุปได้ว่าโสมจุฬาภรณ์ที่ใช้ในปัจจุบัน คือส่วนเหนือดินของพืชที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *A. pallens*

สุนันtha ศรีโสภณ และคณะ 2016 ได้ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเครื่องยาจันทน์ชะมดด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (TLC) จากการสุ่มซื้อตัวอย่างจากร้านขายยาไทยแหล่งต่างๆ จำนวน 17 ตัวอย่าง มาเปรียบเทียบกับตัวอย่างอ้างอิง พบว่าเครื่องยาทุกตัวอย่างมีลายพิมพ์องค์ประกอบทางเคมีเหมือนพืชที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Mansonia gagei* และพบสาร mansonone G ที่มีรายงานว่าเป็นองค์ประกอบทางเคมีของพืชชนิดนี้ จึงสรุปได้ว่าเครื่องยาจันทน์ชะมดที่มีจำหน่ายในปัจจุบันคือ แก่นของพืชที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *M. Gagei*

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ดำเนินการตามขั้นตอนดังนี้

- 1.อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย
- 2.การเตรียมตัวอย่างสมุนไพรพืชสังฆาต
- 3.ขั้นตอนการสกัด ด้วยวิธีการหมัก (maceration)
- 4.ขั้นตอนการตรวจสอบ chromatographic fingerprints พืชสังฆาตด้วยเทคนิค TLC
- 5.ขั้นตอนการตรวจสอบ chromatographic fingerprints พืชสังฆาตด้วยเทคนิค

HPLC

- 6.ขั้นตอนการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation)
- 7.การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในสารสกัดจากเถาพืชสังฆาต

1.อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- | | |
|-----------------------------------|--|
| 1.เครื่องบดสมุนไพร | F.Kurt Retsch GmbH&Co.KG 42781
Haan, Germany |
| 2.ตู้อบสมุนไพร | Contherm digital series, 270 M oven,
Thailand |
| 3.เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง | Mettler Toledo, MS -1602TS,
Switzerland |
| 4.เครื่องชั่ง 5 ตำแหน่ง | Mettler Toledo, MS Semi-Micro
Models, Switzerland |
| 5. Rotary evaporator | BUCHI, R-114 A29, B-480,
Switzerland |
| 6. Ultrasonic bath | Labtech, sonic 405 LUC, Korea |
| 7. เครื่อง HPLC (TSP Autosampler) | SpectraSYSTEM® P1500, Thermo
Separation Product, USA |
| 8. Detector | SpectraSYSTEM® UV1000, Thermo
Separation Product, USA |

9. Column C18 (250 x 4.6 mm, 5µm)	ACE [®] generix, USA
10. Guard HPLC	Phenomenex [®]
11. ชุดกรอง HPLC	Favorit [®] , England
12. Syringe filter 0.45 micron	Vertical [®] , Thailand
13. TLC plate (silica gel GF254)	Merck KGaA 64271 Darmstadt, Germany
14. Capillary tube 5 µL	CAMAG [®] , Switzerland
15. TLC tank	

1.2 สารเคมี

1. Quercetin	Sigma [®] , India
2. Quercitrin	Sigma [®] , India
3. Iso-quercitrin	Sigma [®] , India
4. Acetonitrile HPLC grade	RCI labscan [®] , Thailand
5. Methanol HPLC grade	RCI labscan [®] , Thailand
6. Ethyl acetate, AR grade	Baker analyzed [®] , USA
7. Methanol, AR grade	RCI labscan [®] , Thailand
8. Toluene, AR grade	lab-scan [®] , Ireland
9. Formic acid AR grade	Fisher Scientific, UK
10. Ultra Pure Water	Power sonic 410 [®] , Korea

1.3 ตัวอย่างสมุนไพรสี่เหลี่ยม (Cissus quadrangularis L)

สำรวจและเก็บตัวอย่างสมุนไพรสี่เหลี่ยมจากแหล่งธรรมชาติต่างๆ และร้านขายยาไทยในประเทศไทย จำนวน 18 แห่ง ในระหว่างในช่วงเดือน มีนาคม-กรกฎาคม ของปีพ.ศ. 2558 และ พ.ศ.2559 โดยแบ่งตามภาค ได้แก่ ภาคเหนือ 3 แห่ง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 3 แห่ง ภาคกลางจำนวน 6 แห่ง และภาคใต้ จำนวน 6 แห่ง ดังนี้

1.3.1 ภาคเหนือ จำนวน 3 แห่ง

1. ต.ตลาดใหญ่ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่
2. ต.ลวงเหนือ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่
3. ลำปางรักษัสมุนไพรร ต.บ่อแฮ้ว อ.เมือง จ.ลำปาง

1.3.2 ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 3 แห่ง

1. อ.เมือง จ.ขอนแก่น
2. ต.สวายจิก อ.เมือง จ.บุรีรัมย์
3. ต.ในเมือง อ.เมือง จ.อุบลราชธานี

1.3.3 ภาคกลางและกรุงเทพมหานคร จำนวน 6 แห่ง

1. เครือข่ายศูนย์วัดฤทธิสมุนไพร อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี
2. ร้านยาไทย แขวงจักรวรรดิ เขตสัมพันธวงศ์ กรุงเทพมหานคร
3. เรือนเพาะชำ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ จ.นครนายก
4. ต.คลองหนึ่ง อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี
5. ต.วังไคร้ อ.ท่ายาง จ.เพชรบุรี
6. รพ.สต.บางกระบือ ต.บางกระบือ อ.เมือง จ.สิงห์บุรี

1.3.4 ภาคใต้ จำนวน 6 แห่ง

1. ต.โคกสะบ้า อ.นาโยง จ.ตรัง
2. ต.บางโกระ อ.โคกโพธิ์ จ.ปัตตานี
3. ต.โคกลัก อ.บางแก้ว จ.พัทลุง
4. รพ.สต.บ้านเขาตอก ต.เขาตอก อ.เคียนซา จ.สุราษฎร์ธานี
5. รพ.สต.บ้านทับใหม่ ต.บ้านเสด็จ อ.เคียนซา จ.สุราษฎร์ธานี
6. ต.คูหา อ.ชะบ้าย้อย จ.สงขลา

2. วิธีการทดลอง

2.1 การเตรียมตัวอย่างสมุนไพรสังฆาต

2.1.1 การเตรียมเถาเพชรสังฆาตแบบสด

- 1) นำเพชรสังฆาตสดมาคัดส่วนที่มีตำหนิทั้ง จากนั้นแยกใบ และรากออกจากเถา
- 2) ทำความสะอาดเถาเพชรสังฆาตโดยน้ำให้สะอาด ผึ่งให้แห้ง แล้วหั่นให้มีความหนาประมาณ 0.2 เซนติเมตร
- 3) นำเถาเพชรสังฆาตที่ย่อยขนาด ผึ่งลมจนแห้ง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 4) เมื่อเถาเพชรสังฆาตแห้งแล้วบดให้เป็นผงด้วยเครื่องบด บรรจุในถุงพลาสติก ปิดปากถุงให้สนิทเพื่อป้องกันความชื้น และชั่งน้ำหนัก

5) ปิดฉลากระบุชื่อ แหล่งที่มาของเพชรสังฆาต เก็บไว้ในตู้เก็บของที่แห้ง และพ้นจากแสง

2.1.2 การเตรียมเถาเพชรสังฆาตแบบแห้ง

- 1) นำเพชรสังฆาตแห้งมาคัสด่วนที่มีตำหนิตั้ง จากนั้นแยกรากออกจากเถา
- 2) นำเถาเพชรสังฆาตแห้งย่อยขนาดแล้วไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
- 3) บดให้เป็นผงด้วยเครื่องบด บรรจุในถุงพลาสติก ปิดปากถุงให้สนิทเพื่อป้องกันความชื้น และชั่งน้ำหนัก
- 4) ปิดฉลากระบุชื่อ แหล่งที่มาของเพชรสังฆาต เก็บไว้ในตู้เก็บของที่แห้ง และพ้นจากแสง

2.2 ขั้นตอนการสกัดด้วยวิธีการหมัก (maceration)

- 2.2.1 นำสมุนไพรเพชรสังฆาตบดหยาบจากแหล่งต่างๆ ชั่งน้ำหนักสมุนไพร ตัวอย่างละ 50 กรัมใส่ลงใน erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร
- 2.2.2 เติมตัวทำละลายเมทานอล 100 มิลลิลิตร
- 2.2.3 นำไป sonicate นาน 10 นาที
- 2.2.4 กรองด้วยกระดาษกรองจะได้สารละลาย และส่วนที่เป็นกากสมุนไพรนำไปสกัดซ้ำด้วย เมทานอล 100 มิลลิลิตร ทำซ้ำทั้งหมด 6 รอบ
- 2.2.5 นำส่วนสารละลายมารวมกันแล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator
- 2.2.6 คำนวณ % Yield จากสูตร

$$\% \text{ Yield} = \frac{\text{น้ำหนักสารสกัดของสมุนไพร}}{\text{น้ำหนักแห้งของสมุนไพร}} \times 100$$

2.3 การตรวจสอบ chromatographic fingerprints ของเพชรสังฆาตจากแหล่งต่างๆ ด้วยเทคนิค TLC

2.3.1 เตรียมวัสดุภาคคงที่ คือแผ่นที่แอลซีสำเร็จรูป (silica gel GF₂₅₄) ขนาด 20 x 10 เซนติเมตร

2.3.2 เตรียมสารตัวอย่างเพชรสังฆาตจากแหล่งต่างๆ และสารมาตรฐาน quercetin, quercitrin และ isoquercetin

1.) เตรียมสารตัวอย่างเพชรสังฆาต

โดยชั่งสารสกัด 50 มิลลิกรัม ลงใน volumetric flask แล้วปรับปริมาตรด้วย เมทานอล จนครบ 10 มิลลิลิตร (5 mg/ml) นำไป sonicate นาน 5 นาที

2.) เตรียมสารมาตรฐาน quercetin, quercitrin และ isoquercetin

โดยชั่งสารมาตรฐาน 5 มิลลิกรัม ลงใน volumetric flask 25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอล จนครบ 25 มิลลิลิตร (0.2 mg/ml)

2.3.3 หยดสารสกัดสมุนไพรเพชรสังฆาตและสารมาตรฐานลงบนแผ่น TLC ด้วย capillary tube ขนาด 5 ไมโครลิตร ทำซ้ำ 3 รอบ รวมเป็นปริมาตร 15 μ L/spot

2.3.4 วิเคราะห์ด้วย TLC โดยใช้ mobile phase ต่างๆ เพื่อหาสภาวะที่ดีที่สุดที่ทำให้เกิดการแยกของสารตัวอย่าง คัดแปลงสภาวะการทดลองจาก นพมาศ และคณะ (2551)

วัสดุภาคเคลื่อนที่: 1. toluene: ethyl acetate: formic acid (60:40:10)

2. toluene: ethyl acetate: methanol: formic acid (60:40:10:10)

3. toluene: ethyl acetate: methanol: formic acid (40:80:10:10)

2.3.5 ตรวจสอบ chromatographic fingerprints

- แสงขาว (white light)

- การเรืองแสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และ 365 นาโนเมตร

- น้ำยาฟ้น 7% ferric chloride โดยถ้าพบสารที่ต้องการวิเคราะห์จะเห็นเป็นจุดสี

เทา

2.3.6 ประเมินผลของ TLC โดยคำนวณจากค่า R_f จำนวนแถบสาร ความเข้มของแถบสาร และสีของแถบสาร

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ไป}}{\text{ระยะทางที่วัสดุภาคเคลื่อนที่เคลื่อนที่ไป}}$$

(ค่า R_f คือ $R_f \times 100$ ค่า R_f จะเป็นค่าเฉพาะของสารนั้นๆ ในสภาวะหนึ่งๆ)

2.4 การตรวจสอบ chromatographic fingerprints เพชรสังฆาตจากแหล่งต่างๆ ด้วยเทคนิค HPLC

2.4.1 การเตรียม stock standard solution (quercetin, isoquercetin และ quercitrin)

โดยชั่งสารมาตรฐาน 5 มิลลิกรัม ลงใน volumetric flask แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอลจนครบ 25 มิลลิลิตร (0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

2.4.2 การเตรียม working standard solution

ปิเปต stock quercetin และ isoquercetin มาอย่างละ 5 มิลลิลิตร และ quercitrin 25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอลจนครบ 50 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นของ quercetin และ isoquercetin ที่ความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและ quercitrin ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.4.3 วิธีเตรียม mobile phase (acetonitrile และ 0.3% formic acid)

ตวง formic acid 3 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย น้ำ (ultra-pure) จนครบ 1,000 มิลลิลิตร (0.3% formic acid) แล้ว กรอง 0.3% formic acid และ acetonitrile ผ่าน nylon membrane 0.45 μm แล้วนำไป sonicate นาน 60 นาที

2.4.4 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของ mobile phase

ศึกษาผลการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของ mobile phase โดยเลือกสภาวะที่สามารถแยกสารมาตรฐานได้แก่ quercetin, quercitrin และ isoquercetin ออกจากกัน

สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ quercetin, isoquercetin และ quercitrin ด้วยเครื่อง HPLC วิธีการทดลองดัดแปลงมาจากของ รัชต์ และคณะ (2555)

Stationary phase : ACE[®] generix C18 column (250 mm x 4.6 mm); 5 μm

Mobile phase : (A) acetonitrile: (B) 0.3% formic acid

(Gradient)

Flow rate : 1.0 mL/min

Injection volume : 20 μL (quercitrin and isoquercetin), 40 μL (quercetin)

Detector : 370 nm

Run time : 15 min

ตาราง 7 แสดงอัตราส่วนและอัตราการใช้ของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase)

Time (min)	(A) %acetonitrile	(B) %0.3 formic acid	Flow (ml/min)
0	25	75	1
10	50	50	1
12	25	75	1
15	25	75	1

2.5 การศึกษาความเหมาะสมของระบบที่ใช้ในการวิเคราะห์ (system suitability)

ปิเปต working standard solution ในข้อ 2.4.2 ที่ จำนวน 4 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย mobile phase (acetonitrile : 0.3% formic acid, 25:75) จะได้ความเข้มข้นของ quercetin และ isoquercetin เท่ากับ 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ quercitrin เท่ากับ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กรองผ่าน nylon membrane 0.45 μm แล้ววิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC 20 μl จำนวน 6 ครั้ง บันทึกค่า column efficiency (N), tailing factor (T) และ resolution (Rs) นำค่าที่ได้ไปหาค่าเฉลี่ย โดยค่าที่ยอมรับได้ของ column efficiency (N) ควรมีค่ามากกว่า 2000, tailing factor (T) ควรมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 2 และ resolution (Rs) ควรมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 1.5 โดยใช้เกณฑ์จาก USP37

2.6 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation)

2.6.1 ความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ (specificity)

ปิเปต working standard solution ในข้อ 2.4.2 จำนวน 4 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย mobile phase (acetonitrile : 0.3% formic acid, 25:75) จะได้ความเข้มข้นของ quercetin และ isoquercetin เท่ากับ 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร quercitrin เท่ากับ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กรองผ่าน nylon membrane 0.45 μm แล้วฉีดเข้าเครื่อง HPLC 20 μl ดูค่า retention time ของสารมาตรฐานแต่ละตัวว่าออกมาในเวลาใด โดยวิธีวิเคราะห์ต้องสามารถแยกสารมาตรฐานแต่ละตัวออกจากกันได้ โดยไม่มี peak ซ้อนทับกัน และ resolution (Rs) ควรมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 1.5

2.6.2 การตรวจสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (linearity and range)

เตรียมสารละลายมาตรฐาน quercitrin และ isoquercetin จำนวน 10 ความเข้มข้น โดยปิเปต working standard solution ในข้อ 2.4.2 ปริมาตร 0.25- 8 มิลลิลิตร ลงใน volumetric

flask 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย mobile phase จนครบ 10 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นของ isoquercetin เท่ากับ 0.5- 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และจะได้ความเข้มข้นของ quercitrin เท่ากับ 2.5- 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กรองผ่าน nylon membrane 0.45 μm แล้ววิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC 20 μl และเตรียมสารละลายมาตรฐาน quercetin จำนวน 6 ความเข้มข้น คือ 1- 12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กรองด้วย nylon membrane 0.45 μm แล้ววิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC 40 ไมโครลิตร โดยสารมาตรฐานแต่ละชนิดวิเคราะห์ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำค่า peak area ของแต่ละความเข้มข้น มาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับ peak area และคำนวณค่า coefficient of determination (R^2) ค่าที่ยอมรับได้ต้องไม่ต่ำกว่า 0.995

2.6.3 ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (accuracy)

เตรียมสารละลายมาตรฐาน quercitrin และ isoquercetin จำนวน 3 ความเข้มข้น (ความเข้มข้นต่ำ กลาง สูง) ปิเปต working standard solution ในข้อ 2.4.2 ปริมาตร 1, 4 และ 7 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask 10 มิลลิลิตร มาปรับปริมาตรด้วย mobile phase จะได้ความเข้มข้นของ quercitrin เท่ากับ 10, 40 และ 70 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ isoquercetin เท่ากับ 2, 8 และ 14 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ กรองผ่าน nylon membrane 0.45 μm แล้ววิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC 20 ไมโครลิตร

สาร quercetin ปิเปต stock standard solution ปริมาตร 2, 5 และ 10 มิลลิลิตร เท่ากับ 2.44, 6.10 และ 12.19 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ กรองผ่าน nylon membrane 0.45 μm แล้ววิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC 40 ไมโครลิตร โดยสารมาตรฐานแต่ละชนิดวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง นำค่า peak area ที่ได้มาคำนวณความเข้มข้น แล้วนำค่าความเข้มข้นที่ได้มาคำนวณ %recovery ค่าที่ยอมรับได้อยู่ในช่วง 90-108%

2.6.4 ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (precision)

1). Intra day precision

เตรียมสารละลายมาตรฐาน quercitrin และ isoquercetin จำนวน 3 ความเข้มข้น (ความเข้มข้นต่ำ กลาง สูง) ปิเปต working standard solution ในข้อ 2.4.2 ปริมาตร 1, 4 และ 7 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask 10 มิลลิลิตร มาปรับปริมาตรด้วย mobile phase จะได้ความเข้มข้นของ quercitrin เท่ากับ 10, 40 และ 70 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ isoquercetin เท่ากับ 2, 8 และ 14 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ กรองผ่าน nylon membrane 0.45 μm แล้ววิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC 20 ไมโครลิตร

สาร quercetin ปิเปต stock standard solution ปริมาตร 2, 5 และ 10 มิลลิลิตร เท่ากับ 2.44, 6.10 และ 12.19 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ กรองด้วย nylon membrane 0.45

μm แล้ววิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC 40 ไมโครลิตร โดยสารมาตรฐานแต่ละชนิดวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง นำค่า peak area มาคำนวณ %RSD ค่าที่ยอมรับได้ควรน้อยกว่า 3%

2). Inter day precision

เตรียมสารละลายมาตรฐาน quercitrin และ isoquercetin จำนวน 3 ความเข้มข้น (ความเข้มข้นต่ำ กลาง สูง) ปิเปต working standard solution ในข้อ 2.4.2 ปริมาตร 1, 4 และ 7 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask 10 มิลลิลิตร มาปรับปริมาตรด้วย mobile phase จะได้ความเข้มข้นของ quercitrin เท่ากับ 10, 40 และ 70 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ isoquercetin เท่ากับ 2, 8 และ 14 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ กรองผ่าน nylon membrane 0.45 μm แล้ววิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC 20 ไมโครลิตร

สาร quercetin ปิเปต stock standard solution ปริมาตร 2, 5 และ 10 มิลลิลิตร เท่ากับ 2.44, 6.10 และ 12.19 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ กรองผ่าน nylon membrane 0.45 μm แล้ววิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC 40 ไมโครลิตร โดยสารมาตรฐานแต่ละชนิดวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้งเป็นเวลา 3 วัน นำค่า peak area มาคำนวณ %RSD ค่าที่ยอมรับได้ควรน้อยกว่า 6%

2.6.5 ความเข้มข้นต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (limit of Detection, LOD)

ค่า LOD โดยคำนวณจากสูตร $\text{LOD} = 3.3\sigma/S$ โดยค่า σ คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสัญญาณ และ S คือ slope ของกราฟมาตรฐาน โดยแจ้งจากความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน quercetin, quercitrin และ isoquercetin จากความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้

2.6.6 ความเข้มข้นต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (limit of Quantitation, LOQ)

ค่า LOQ โดยคำนวณจากสูตร $\text{LOQ} = 10\sigma/S$ โดยค่า σ คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสัญญาณ และ S คือ slope ของกราฟมาตรฐาน

2.7 การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในสารสกัดจากเถาเพชรสังฆาต

2.7.1 เตรียมสารตัวอย่างเพชรสังฆาตสำหรับการวิเคราะห์เชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ

1.) เตรียมสารสกัดเพชรสังฆาตให้มีความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรโดยชั่งสารสกัด 250 มิลลิกรัม ลงใน volumetric flask 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอล จนครบ 10 มิลลิลิตร นำไป sonicate นาน 5 นาที สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสาร quercetin

2.) เตรียมสารสกัดเพชรสังฆาตให้มีความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตสารละลายเพชรสังฆาตในข้อ 1 มา 2 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอล จนครบ 10 มิลลิลิตร สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสาร isoquercetin และ quercitrin

2.7.2 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (Qualitative Analysis)

ตรวจสอบค่า retention time ของสาร quercetin, quercitrin และ isoquercetin ในสมุนไพรซึ่งมาจากแหล่งต่างๆ กับค่า retention time ของสารมาตรฐาน quercetin, quercitrin และ isoquercetin

2.7.3 การวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Quantitative analysis)

วิเคราะห์หาปริมาณสาร quercetin, quercitrin และ isoquercetin ในสารสกัดสมุนไพรซึ่งมาด้วยเทคนิค HPLC แล้วคำนวณหาปริมาณสารสำคัญ quercetin, quercitrin และ isoquercetin ในสมุนไพรซึ่งมาจากแหล่งต่างๆ โดยการแทนพื้นที่ใต้พีค (peak area) ลงในสมการของกราฟมาตรฐาน



บทที่ 4

ผลการทดลอง และอภิปรายผลการทดลอง

1. ลักษณะตัวอย่าง การสกัดสาร และ %yield ของเถาเพชรสังฆาต

1.1 ลักษณะตัวอย่างเถาเพชรสังฆาตที่นำมาศึกษา

ตัวอย่างสมุนไพรเพชรสังฆาตจากภาคต่างๆ ในประเทศไทยในระหว่างปี พ.ศ. 2558-2559 จำนวน 18 ตัวอย่างแหล่งเก็บวัตถุดิบ โดยเก็บตัวอย่างเพชรสังฆาตจากช่วงเวลาต่างๆ เดือนมิถุนายน พ.ศ.2558 จากสุราษฎร์ธานี 1 สุราษฎร์ธานี 2 สงขลา รันยาไทย จากกรุงเทพมหานคร และในปีพ.ศ.2559 เก็บตัวอย่างเถาเพชรสังฆาตดังนี้ เดือนมีนาคม 2559 เก็บตัวอย่างเพชรสังฆาตจากนครนายก เดือนเมษายน 2559 เก็บตัวอย่างจาก เชียงใหม่ 1 เดือนพฤษภาคม 2559 เก็บตัวอย่างจากลำปาง บุรีรัมย์ อุบลราชธานี กาญจนบุรี ปทุมธานี เพชรบุรี ปัตตานี พัทลุง เดือนมิถุนายน 2559 เก็บตัวอย่างเพชรสังฆาตจาก เชียงใหม่ 2 และเดือนกรกฎาคม 2559 เก็บตัวอย่างเพชรสังฆาตจากขอนแก่น สิงห์บุรี และตรัง โดยแบ่งลักษณะของเถาเพชรสังฆาต ออกเป็น 2 กลุ่มตามลักษณะภายนอก (macroscopic character) คือ กลุ่มที่ 1 มีลักษณะภายนอกคล้ายกันคือ เถาสดสีเขียว ลำต้นเป็นรูปสี่เหลี่ยมเป็นครีบก้น ผิวเรียบ มีรอยคอดบริเวณข้อต่อ แต่ละข้อยาวประมาณ 10-15 เซนติเมตร จำนวน 15 ตัวอย่าง ประกอบด้วยตัวอย่างจากเชียงใหม่ 1 เชียงใหม่ 2 บุรีรัมย์ อุบลราชธานี กาญจนบุรี นครนายก ปทุมธานี เพชรบุรี สิงห์บุรี ตรัง ปัตตานี พัทลุง สุราษฎร์ธานี 1 สุราษฎร์ธานี 2 และสงขลา กลุ่มที่ 2 มีลักษณะเป็นเถาสีน้ำตาลแห้ง ขนาดยาวประมาณ 10-15 เซนติเมตร และลักษณะเป็นชิ้นขนาด 1-1.5 เซนติเมตร จำนวน 3 ตัวอย่าง ประกอบด้วยตัวอย่างจากลำปาง ขอนแก่น และกรุงเทพมหานคร ดังภาพประกอบ 8

1.2 การเตรียมตัวอย่างเพชรสังฆาต

โดยการนำเถาเพชรสังฆาตสดจำนวน 15 ตัวอย่าง มาล้างทำความสะอาด ผึ่งลมให้แห้ง แล้วหั่นให้มีความหนาประมาณ 0.2 เซนติเมตร นำเถาเพชรสังฆาตที่หั่นแล้ว ผึ่งลมให้แห้งอีกครั้ง จากนั้นนำเถาเพชรสังฆาตเข้าอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเพชรสังฆาตแห้งดีแล้วนำไปบดให้เป็นผงด้วยเครื่องบด และชั่งน้ำหนัก ส่วนตัวอย่างเถาเพชรสังฆาตแห้ง 3 ตัวอย่าง นำอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไปบดให้เป็นผงด้วยเครื่องบด และชั่งน้ำหนัก ปิดฉลาก ระบุชื่อ และแหล่งที่มา จากนั้นคำนวณร้อยละของน้ำหนักแห้งของตัวอย่างเพชรสังฆาต ดังแสดงในตาราง 8 และเก็บตัวอย่างเพชรสังฆาตไว้ในตู้เก็บของที่แห้งสนิทให้พ้นจากแสงแดด



ภาพประกอบ 8 แสดงตัวอย่างเถาพืชสังฆาตสด จำนวน 18 ตัวอย่าง ประกอบด้วย (1) เชียงใหม่ 1, (2) เชียงใหม่ 2, (3) ลำปาง, (4) ขอนแก่น, (5) บุรีรัมย์, (6) อุบลราชธานี, (7) กรุงเทพมหานคร, (8) กาญจนบุรี, (9) นครนายก, (10) ปทุมธานี, (11) เพชรบุรี, (12) สิงห์บุรี, (13) ตรัง, (14) ปัตตานี, (15) พัทลุง, (16) สุราษฎร์ธานี 1, (17) สุราษฎร์ธานี 2, และ (18) สงขลา

1.3 ค่าร้อยละปริมาณสารสกัด (%yield) ของเถาเพชรสังฆาต

ผลการสกัดเถาเพชรสังฆาต 18 ตัวอย่าง โดยวิธีการหมักด้วย methanol พบว่า เพชรสังฆาตจาก จังหวัดเชียงใหม่ 1 มี %yield มากที่สุด เท่ากับร้อยละ 12.56 และตัวอย่างเพชรสังฆาตจากร้านยาไทย จังหวัดกรุงเทพมหานคร มี %yield น้อยที่สุด เท่ากับร้อยละ 5.06 ดังแสดงตาราง 9

ตาราง 8 แสดงผลการสรุบน้ำหนักเถาเพชรสังฆาตสด และเพชรสังฆาตแห้งในระหว่างปี

พ.ศ. 2558-2559

ภาค	ว/ด/ป	แหล่งที่มา	น้ำหนักสด (กรัม)	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	ร้อยละ น้ำหนักแห้ง
เหนือ	เมษายน 59	เชียงใหม่ 1	1,137.11	106.97	9.40
	มิถุนายน 59	เชียงใหม่ 2	993.32	110.97	11.17
	พฤษภาคม 59	ลำปาง	-	968.34	DH
ตะวันออก	กรกฎาคม 59	ขอนแก่น	-	500	DH
เฉียงเหนือ	พฤษภาคม 59	บุรีรัมย์	257.90	60.07	23.29
	พฤษภาคม 59	อุบลราชธานี	1,075.30	127.68	11.87
กลาง	มิถุนายน 58	กรุงเทพมหานคร	-	1.000	DH
	พฤษภาคม 59	กาญจนบุรี	1,075.42	228.13	21.21
	มีนาคม 59	นครนายก	4,999.91	601.74	12.03
	พฤษภาคม 59	ปทุมธานี	324.56	60.42	18.16
	พฤษภาคม 59	เพชรบุรี	1,332.96	217.11	16.28
	กรกฎาคม 59	สิงห์บุรี	610.36	73.94	12.11
ใต้	กรกฎาคม 59	ตรัง	1,150.04	88.93	7.73
	พฤษภาคม 59	ปัตตานี	113.84	28.18	24.75
	พฤษภาคม 59	พัทลุง	986.23	99.03	10.04
	มิถุนายน 58	สุราษฎร์ธานี 1	2,218.54	348.28	15.69
	มิถุนายน 58	สุราษฎร์ธานี 2	834.47	131.02	15.70
	มิถุนายน 58	สงขลา	509.95	82.65	16.20

หมายเหตุ DH (Dried Herbs) หมายถึง วัตถุดิบเพชรสังฆาตที่ได้รับเป็นเถาเพชรสังฆาตแห้งมาแล้ว

ตาราง 9 แสดงร้อยละของสารสกัดเอทเธอร์สังเคราะห์จาก 18 ตัวอย่างที่สกัดด้วย methanol

ภาค	แหล่งที่มา	น้ำหนักสมุนไพร (กรัม)	น้ำหนักสาร (กรัม)	% yield
เหนือ	เชียงใหม่ 1	50.00	6.28	12.56
	เชียงใหม่ 2	50.00	6.10	12.20
	ลำปาง	50.00	4.67	9.34
ตะวันออกเฉียงเหนือ	ขอนแก่น	50.00	4.90	9.80
	บุรีรัมย์	45.20	3.51	7.76
	อุบลราชธานี	50.00	5.09	10.18
กลาง	กรุงเทพมหานคร	50.00	2.53	5.06
	กาญจนบุรี	50.00	3.10	6.20
	นครนายก	50.00	4.43	8.86
	ปทุมธานี	45.34	3.34	7.37
	เพชรบุรี	50.00	4.26	8.52
	สิงห์บุรี	50.00	3.50	7.00
ใต้	ตรัง	50.00	3.24	6.48
	ปัตตานี	16.21	1.79	11.04
	พัทลุง	50.00	4.60	9.20
	สงขลา	50.00	3.07	6.14
	สุราษฎร์ธานี 1	50.00	2.71	5.42
	สุราษฎร์ธานี 2	50.00	3.17	6.34

2. สภาวะที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่ในการวิเคราะห์สาร quercetin, quercitrin และ isoquercetin ด้วยเทคนิค TLC

เมื่อนำตัวอย่างเถาเพชรสังฆาตมาสกัดด้วย methanol จำนวน 18 ตัวอย่าง มาศึกษาลายพิมพ์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดชั้นบาง (Thin Layer Chromatography; TLC) โดยทำการศึกษาเทียบกับสารมาตรฐานกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) จำนวน 3 ชนิด คือ quercetin, isoquercetin และ quercitrin มาศึกษาตามสภาวะดังนี้

สภาวะของการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC

วัสดุภาควงที่	: Silica gel GF ₂₅₄		
ขนาดแผ่น TLC	: 20 x 10 เซนติเมตร		
วัสดุภาควงเคลื่อนที่	: 1. toluene: ethyl acetate: formic acid (60:40:10) 2. toluene: ethyl acetate: formic acid: methanol (60:40:10:10) 3. toluene: ethyl acetate: formic acid: methanol (40:80:10:10)		
ระยะทางที่พัฒนา	: 8 เซนติเมตร		
ปริมาตรที่หยด	: 15 ไมโครลิตร		
สารละลายมาตรฐาน	: แถบที่ 10= isoquercetin แถบที่ 11= quercitrin แถบที่ 12= quercetin		
สารละลายตัวอย่าง	: สารสกัดของเถาเพชรสังฆาต 18 แหล่ง		
	แถบที่ 1=เซียงใหม่ 1	แถบที่ 2=เซียงใหม่ 2	แถบที่ 3=ลำปาง
	แถบที่ 4=อุบลราชธานี	แถบที่ 5=บุรีรัมย์	แถบที่ 6=ขอนแก่น
	แถบที่ 7=กาญจนบุรี	แถบที่ 8=เพชรบุรี	แถบที่ 9=นครนายก
	แถบที่ 13=ปทุมธานี	แถบที่ 14= สิงห์บุรี	แถบที่ 15=กรุงเทพฯ
	แถบที่ 16=สุราษฎร์ธานี 1	แถบที่ 17=สุราษฎร์ธานี 2	แถบที่ 18=พัทลุง
	แถบที่ 19=ตรัง	แถบที่ 20=ปัตตานี	แถบที่ 21=สงขลา
น้ำยาพ่น	: 7% ferric chloride		

การตรวจสอบลักษณะลายพิมพ์องค์ประกอบทางเคมีของสารตัวอย่างเพชรสังฆาตบนแผ่น TLC ภายหลังจากที่ได้พัฒนาแผ่นแล้ว วิธีหลักในการตรวจสอบมี 2 วิธี คือทางกายภาพและทางเคมี โดยวิธีทางกายภาพได้แก่ การตรวจสอบภายใต้แสงธรรมชาติ ภายใต้อัลตราไวโอเลตทั้งที่ความยาวคลื่นสั้น 254 นาโนเมตร และความยาวคลื่นยาว 366 นาโนเมตร และใช้เครื่องมือช่วยในการ

ตรวจสอบ คือ เดนสิโตมิเตอร์ (densitometer) ในการบันทึกรูปภาพ ส่วนวิธีทางเคมีนั้นเป็นการตรวจสอบโดยการฉีดพ่นสารเคมี เพื่อตรวจสอบชนิดของกลุ่มสารแบบเฉพาะเจาะจงโดยใช้น้ำยาพ่น 7% ferric chloride

วัฏภาคเคลื่อนที่ 1 ประกอบด้วย toluene: ethyl acetate: formic acid (60:40:10)

ตัวอย่างเพชรสังฆาตประกอบด้วยแถบสารทั้งหมด 11 แถบ ($hR_f = 4, 8, 41, 43, 51, 57, 61, 77, 83, 89, 94$) ซึ่งมีแถบสารหลัก 9 แถบ ($hR_f = 4, 8, 41, 43, 61, 77, 83, 89, 94$) แถบสารที่มีค่า $hR_f = 4, 8, 43, 57, 61, 89, 94$ จะให้ผล ทึบแสง (quenching) เมื่อตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร แถบสารที่มีค่า $hR_f = 41, 43, 61, 83$ เรืองแสงสีฟ้า เมื่อตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร และสารเทียบ isoquercetin ($hR_f = 4$), quercitrin ($hR_f = 8$) และ quercetin ($hR_f = 57$) ตามลำดับ

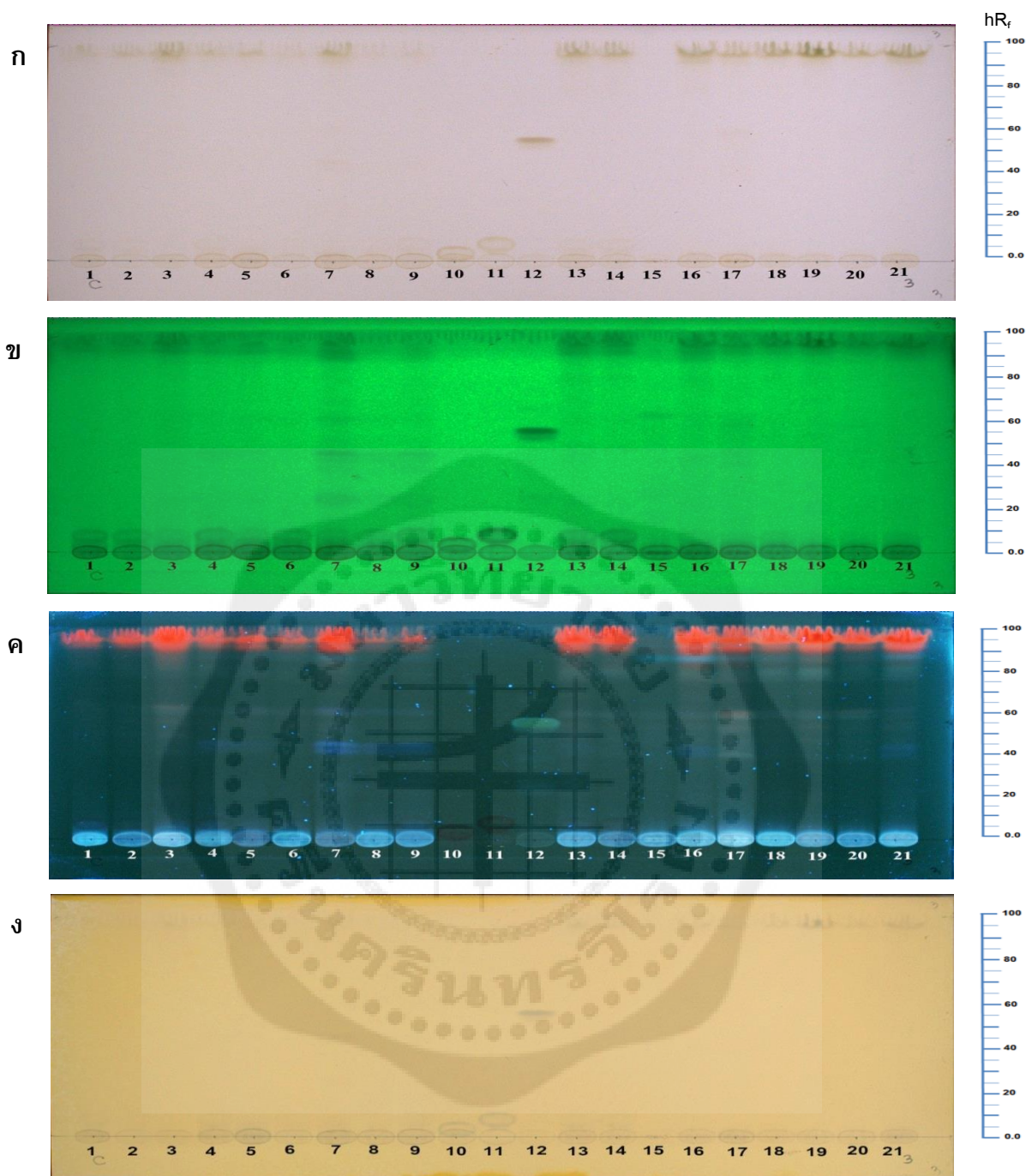
วัฏภาคเคลื่อนที่ 2 ประกอบด้วย toluene: ethyl acetate: methanol: formic acid (60:40:10:10)

ที่แอลซีโครมาโทแกรมนี้จะคล้ายกับที่แอลซีโครมาโทแกรมของวัฏภาคเคลื่อนที่ 1. toluene: ethyl acetate: formic acid (60:40:10) แต่วัฏภาคเคลื่อนที่นี้มีหัวมากกว่า เพราะว่าสารเทียบ isoquercetin, quercitrin และ quercetin มีค่า hR_f มากกว่า ($hR_f = 16, 28$ และ 69)

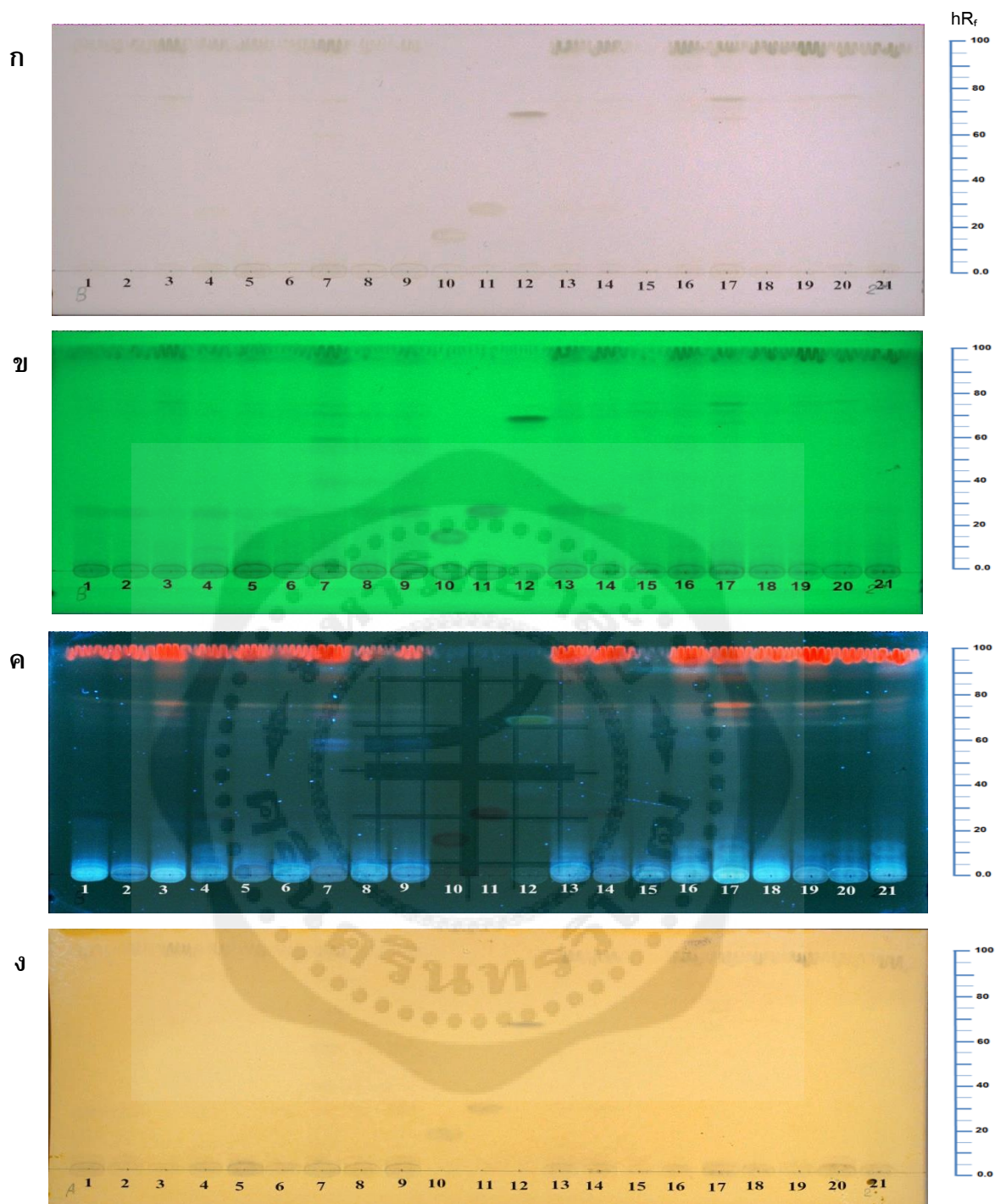
ตัวอย่างเพชรสังฆาตพบแถบสารทั้งหมด 13 แถบ ($hR_f = 12, 16, 28, 38, 55, 59, 66, 69, 71, 76, 88, 92, 97$) ซึ่งมีแถบสารหลัก 9 แถบ ($hR_f = 12, 16, 28, 38, 55, 71, 76, 88, 97$) แถบสารที่มีค่า $hR_f = 12, 16, 28, 38, 55, 66, 69, 71, 76, 92, 97$ จะให้ผลทึบแสง (quenching) เมื่อตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร แถบสารที่มีค่า $hR_f = 12, 55, 59, 92$ จะเรืองแสงสีฟ้า เมื่อตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร พบว่าสาร quercetin ($hR_f = 69$) มีการเรืองแสงสีเขียวฟ้า

วัฏภาคเคลื่อนที่ 3 ประกอบด้วย toluene: ethyl acetate: methanol: formic acid (40:80:10:10)

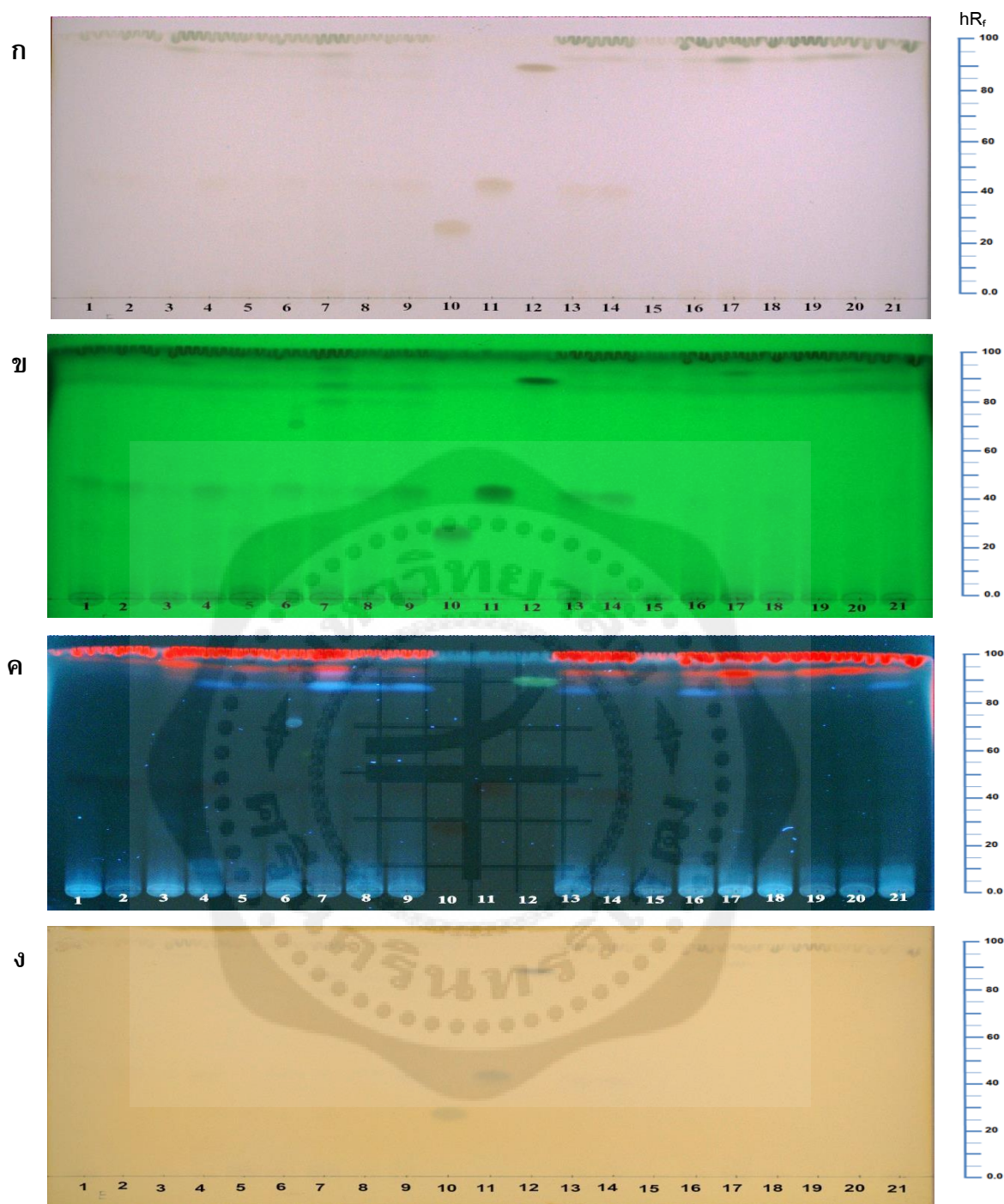
วัฏภาคเคลื่อนที่นี้มีหัวมากกว่าวัฏภาคเคลื่อนที่อื่นๆ เพราะว่าสารเทียบ isoquercetin, quercitrin และ quercetin มีค่า hR_f มากกว่า ($hR_f = 27, 42$ และ 88)



ภาพประกอบ 9 Chromatographic fingerprints ของสารสกัดเถาเพชรสังฆาตและสารเทียบ
 ภูมิภาคเคลื่อนที่ 1. toluene: ethyl acetate: formic acid (60:40:10) (ก) ภายใต้แสงธรรมชาติ
 (ข) แสงอัลตราไวโอเล็ต 254 นาโนเมตร (ค) แสงอัลตราไวโอเล็ต 366 นาโนเมตร และ (ง) น้ำยา
 ฟ่น 7% ferric chloride



ภาพประกอบ 10 Chromatographic fingerprints ของสารสกัดเถาเพชรสังฆาตและสารเทียบ
 วิทยาศาสตร์เคลื่อนที่ 2. toluene: ethyl acetate: methanol: formic acid (60:40:10:10) (ก) ภายใต้
 แสงธรรมชาติ (ข) แสงอัลตราไวโอเล็ต 254 นาโนเมตร (ค) แสงอัลตราไวโอเล็ต 366 นาโนเมตร
 และ (ง) น้ำยาพ่น 7% ferric chloride



ภาพประกอบ 11 Chromatographic fingerprints ของสารสกัดเถาเพชรสังฆาตและสารเทียบ
 วัฏภาคเคลื่อนที่ 3. toluene: ethyl acetate: methanol: formic acid (40:80:10:10) (ก) ภายใต้
 แสงธรรมชาติ (ข) แสงอัลตราไวโอเล็ต 254 นาโนเมตร (ค) แสงอัลตราไวโอเล็ต 366 นาโนเมตร
 และ (ง) น้ำยาฟ่น 7% ferric chloride

ตาราง 10 แสดงค่า hR_f และผลการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดเพชรสังฆาต
 วัฏภาคเคลื่อนที่ 1. toluene: ethyl acetate: formic acid (60:40:10)

จุดที่	ค่า hR_f	การตรวจสอบ		
		UV 254 nm	UV 366 nm	7% ferric chloride
1	4	ทึบแสง	ดำ	เทา
2	8	ทึบแสง	ดำ	เทา
3	41	-	ฟ้าสว่าง	-
4	43	ทึบแสง	ฟ้าสว่าง	-
5	51	-	ฟ้าสว่าง	-
6	57	ทึบแสง	เขียวสว่าง	เทา
7	61	ทึบแสง	ฟ้าสว่าง	-
8	77	-	แดง	-
9	83	-	ฟ้าสว่าง	-
10	89	ทึบแสง	แดง	-
11	94	ทึบแสง	แดง	-

ตาราง 11 แสดงค่า hR_f และผลการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดเพชรสังฆาต
 วัฏภาคเคลื่อนที่ 2. toluene: ethyl acetate: formic acid: methanol (60:40:10:10)

จุดที่	ค่า hR_f	การตรวจสอบ		
		UV 254 nm	UV 366 nm	7% ferric chloride
1	12	-	ฟ้าสว่าง	-
2	16	ทึบแสง	ดำ	เทา
3	28	ทึบแสง	ดำ	เทา
4	38	ทึบแสง	-	-
5	55	ทึบแสง	ฟ้าสว่าง	-
6	59	ทึบแสง	ฟ้าสว่าง	-

ตาราง 11 (ต่อ)

จุดที่	ค่า hR_f	การตรวจสอบ		
		UV 254 nm	UV 366 nm	7% ferric chloride
7	66	ทึบแสง	เขียว	-
8	69	ทึบแสง	เขียวสว่าง	เทา
9	71	ทึบแสง	ฟ้า/แดง	-
10	76	ทึบแสง	แดง	-
11	88	-	แดง	-
12	92	ทึบแสง	ฟ้าสว่าง	-
13	97	ทึบแสง	แดง	-

ตาราง 12 แสดงค่า hR_f และผลการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดเพชรสังฆาต
 วัฏภาคเคลื่อนที่ 3. toluene: ethyl acetate: formic acid: methanol (40:80:10:10)

จุดที่	ค่า hR_f	การตรวจสอบ		
		UV 254 nm	UV 366 nm	7% ferric chloride
1	16	ทึบแสง	ฟ้าสว่าง	-
2	27	ทึบแสง	ดำ	เทา
3	42	ทึบแสง	ดำ	เทา
4	74	ทึบแสง	-	-
5	85	ทึบแสง	ฟ้าสว่าง	-
6	88	ทึบแสง	เขียวสว่าง	เทา
7	91	ทึบแสง	ฟ้าสว่าง	-
8	94	ทึบแสง	แดง	-
9	98	ทึบแสง	แดง	-

ตาราง 13 แสดงการเปรียบเทียบค่า hR_f จำนวน 3 วัฏภาคเคลื่อนที่ โดยเรียงจากความเข้มข้นไปซ้
 มากในตัวอย่างเถาเพชรสังฆาต 18 แหล่ง

วัฏภาคเคลื่อนที่	อัตราส่วน	สารเทียบ กลุ่ม flavonoids			
		แถบ สาร ทั้งหมด	Isoquercetin (hR _f)	Quercitrin (hR _f)	Quercetin (hR _f)
1. toluene: ethyl acetate: formic acid	60:40:10	11	4	8	57
2. toluene: ethyl acetate: formic acid: methanol	60:40:10:10	13	16	28	69
3. toluene: ethyl acetate: formic acid: methanol	40:80:10:10	9	27	42	88

ตัวอย่างเพชรสังฆาตพบแถบสารทั้งหมด 9 แถบ (hR_f = 16, 27, 42, 74, 85, 88, 91, 94, 98) ซึ่งมีแถบสารหลัก 7 แถบ (hR_f = 16, 27, 42, 74, 85, 94, 98) แถบสารที่มีค่า hR_f = 16, 27, 42, 74, 85, 94, 98 จะให้ผล ทึบแสง (quenching) เมื่อตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร แถบสารที่มีค่า hR_f = 16, 85, 91 เรืองแสงสีฟ้า เมื่อตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร พบว่าสาร quercetin (hR_f = 88) มีการเรืองแสงสีเขียว

จากตาราง 13 ผลการทดลองทั้ง 3 วัฏภาคเคลื่อนที่ โดยการศึกษาสภาวะตามความมีขั้วจากขั้วน้อยไปขั้วมาก ในตัวอย่างเพชรสังฆาต 18 แหล่ง และใช้สารเทียบกลุ่ม flavonoids จำนวน 3 ชนิด คือ isoquercetin, quercitrin และ quercetin พบว่า วัฏภาคที่ 1 แยกสารได้ 11 แถบ วัฏภาคที่ 2 แยกสารได้ 13 แถบ และวัฏภาคที่ 3 แยกสารได้ 9 แถบ สารเทียบ isoquercetin มีค่า hR_f เท่ากับ 4, 16 และ 27 ตามลำดับ quercitrin มีค่า hR_f เท่ากับ 8, 28 และ 42 ตามลำดับ และ quercetin มีค่า hR_f เท่ากับ 57, 69 และ 88 ตามลำดับ วัฏภาคเคลื่อนที่ ที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารกลุ่ม flavonoids จำนวน 3 ชนิด คือ วัฏภาคที่ 2 ประกอบด้วย toluene: ethyl acetate: formic acid: methanol ในอัตราส่วน 60:40:10:10 และสามารถแยกสารในตัวอย่างเพชรสังฆาตได้มากที่สุด คือ 13 แถบ

ตัวอย่างเพชรสังฆาตที่นำมาสกัดด้วยเมทานอลทั้ง 18 แหล่ง และสารเทียบกลุ่ม flavonoids จำนวน 3 ชนิด คือ isoquercetin quercitrin และ quercetin โดยการศึกษา 3 วัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่า ตัวอย่างเพชรสังฆาตทั้ง 18 แหล่ง มีลักษณะลายพิมพ์องค์ประกอบทางเคมีคล้ายคลึงกันทั้ง 3 วัฏภาคเคลื่อนที่ โดยสารเทียบ isoquercetin, quercitrin และ quercetin ให้ผล

quenching เมื่อตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร สารเทียบ quercetin เรืองแสงสีเขียวเมื่อตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร และให้แถบสารสีเทากับน้ำยาฟ้น 7% ferric chloride ทุกตัวอย่างเพชรสังฆาตพบสาร quercitrin ซึ่งให้แถบสารสีเข้มชัดกว่าตัวอย่างอื่นๆ ในตัวอย่างเพชรสังฆาตจากเชียงใหม่ 1 เชียงใหม่ 2 ขอนแก่น อุบลราชธานี เพชรบุรี นครนายก ปทุมธานี และสิงห์บุรี สาร isoquercetin ซึ่งให้แถบสารสีเข้มรองลงมา พบในตัวอย่างเพชรสังฆาตจากเชียงใหม่ 1 บุรีรัมย์ และสิงห์บุรี แต่ไม่พบสาร quercetin ในตัวอย่างเพชรสังฆาตที่นำมาศึกษาบนที่แอลซีโครมาโทแกรม ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ นพมาศ และคณะ (2551) ไม่พบสาร quercetin ในตัวอย่างเพชรสังฆาต แต่พบสารกลุ่ม flavonoids ตัวอื่นที่มีค่า hR_f น้อยกว่าสาร quercetin แถบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์จะเรืองแสงสีส้ม เมื่อตรวจสอบด้วยน้ำยาฟ้น natural product และตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร

สาร quercetin, quercitrin และ isoquercitrin สามารถตรวจสอบได้ง่ายภายใต้แสงธรรมชาติ เนื่องจากเป็นสารในกลุ่ม ortho-naphthquinones ซึ่งมีสีเหลือง และมีคุณสมบัติดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตได้ จึงสามารถสังเกตเห็นเป็นแถบสีดำนบนที่แอลซีโครมาโทแกรมภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และใช้น้ำยาเคมีฟ้นไปบนแผ่นที่แอลซีโครมาโทแกรมเพื่อทำปฏิกิริยากับสารประกอบในตัวอย่าง น้ำยาฟ้น 7% ferric chloride แถบสาร quercetin, quercitrin และ isoquercitrin จะเปลี่ยนเป็นแถบสีเทา

3. สภาวะที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่ในการวิเคราะห์ปริมาณ quercetin, isoquercetin และ quercitrin ด้วยเทคนิค HPLC

3.1 ชนิดของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

ในการวิเคราะห์ปริมาณ quercetin, isoquercetin และ quercitrin จำเป็นต้องเลือกใช้ชนิดของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ เนื่องจากเฟสเคลื่อนที่เป็นปัจจัยหนึ่งที่สามารถพาสารที่ต้องการวิเคราะห์ออกจากคอลัมน์เพื่อทำให้เกิดการแยกได้ ดังนั้นจึงได้ศึกษาอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม โดยชนิดของเฟสเคลื่อนที่ที่นำมาใช้ศึกษา คือ เฟสเคลื่อนที่ที่เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ คือ acetonitrile ผสมกับเฟสเคลื่อนที่ที่มีขั้ว คือ 0.3 % formic acid โดยใช้สภาวะการทดลองดัดแปลงมาจากสภาวะการทดลองของ ธีรชาติ และคณะ (2555) อัตราส่วนและอัตราไหลของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) แสดงในตาราง 14

3.2 สภาวะที่ใช้ในการทดลองดัดแปลงมาจากสภาวะการทดลองของ ธีรัชต์ และคณะ (2555)

Stationary phase	: ACE [®] generix C18 column (250 mm x 4.6 mm); 5µm
Mobile phase (Gradient)	: (A) acetonitrile: (B) 0.3%formic acid in water
Flow rate	: 1.0 mL/min
Injection volume	: 20 µL (quercitrin and isoquercetin), 40 µL (quercetin)
Detector	: 370 nm
Run time	: 15 min

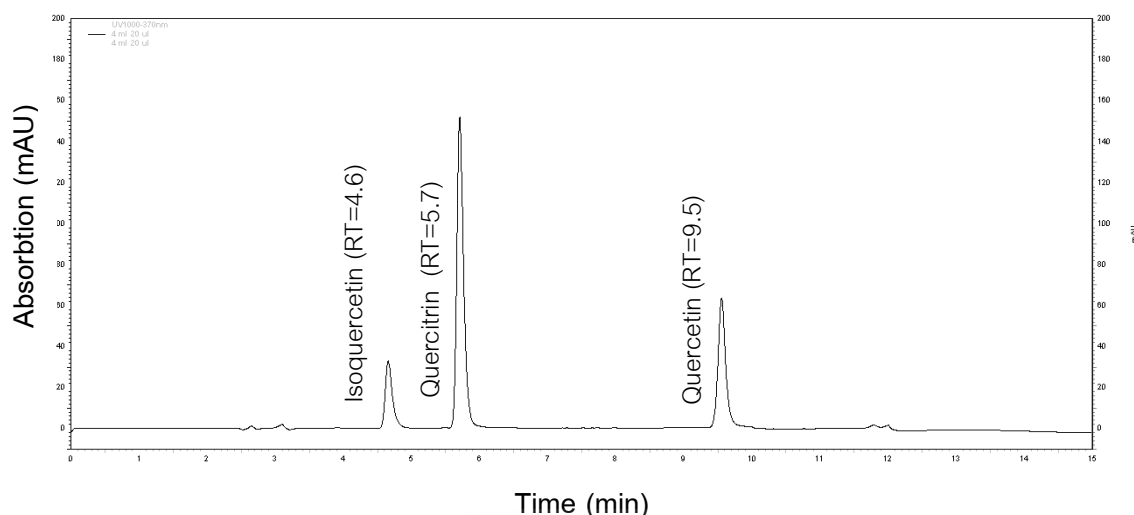
ตาราง 14 แสดงอัตราส่วนและอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase)

Time (min)	(A) %acetonitrile	(B) % 0.3 formic acid	Flow (ml/min)
0	25	75	1
10	50	50	1
12	25	75	1
15	25	75	1

จากการวิเคราะห์สารละลายเพื่อตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ พบว่าสามารถแยกสาร isoquercetin, quercitrin และ quercetin ออกจากกันได้ ดังภาพประกอบ 12 โดยมี retention time ประมาณ 4.6, 5.7 และ 9.5 นาที ตามลำดับ และมีค่า resolution เท่ากับ 5.5 และ 17.9 ตามลำดับ โดยไม่มีผลรบกวนจากสารละลาย methanol ดังภาพประกอบ 12

ความเหมาะสมของระบบที่ใช้ในการวิเคราะห์ (System suitability)

ความเหมาะสมของระบบที่ใช้ในการวิเคราะห์ (System suitability) ในการคัดเลือกความเหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่ในการแยกสารพิจารณาจากค่าพารามิเตอร์ตามเกณฑ์มาตรฐานการยอมรับของ USP 37 NF 32 ได้แก่ Theoretical Plates (N)>2000, Tailing factor (T)≤2, Resolution (Rs)>1.5^[44] และเวลาในการวิเคราะห์น้อย เพื่อหาความเหมาะสมของเครื่องมือและวิธีวิเคราะห์ โดยวิเคราะห์จากผลการฉีดสารละลายมาตรฐานซ้ำๆกัน 6 ครั้ง จากสารมาตรฐานตัวอย่างเดียวกัน แสดงพารามิเตอร์ต่างๆ ของสาร isoquercetin, quercitrin และ quercetin แสดงในตาราง 15



ภาพประกอบ 12 แสดง Chromatographic fingerprints ของสารมาตรฐาน isoquercetin, quercitrin และ quercetin ตามลำดับ ที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตร

ตาราง 15 แสดงสรุปผลพารามิเตอร์การทดสอบความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ของสาร isoquercetin, quercitrin และ quercetin (n=6)

Parameter	Isoquercetin ($\pm\%$ RSD)	Quercitrin ($\pm\%$ RSD)	Quercetin ($\pm\%$ RSD)
Retention Time (RT)	4.657 $\pm$ 0.73	5.714 $\pm$ 0.74	9.540 $\pm$ 0.63
Theoretical plates (N)	9790 $\pm$ 1.03	14447 $\pm$ 0.74	26362 $\pm$ 1.10
Resolution (Rs)	-	5.590 $\pm$ 0.41	17.994 $\pm$ 0.48
Tailing factor (T)	1.429 $\pm$ 0.61	1.278 $\pm$ 0.80	1.085 $\pm$ 0.30
Peak Area	240317 $\pm$ 0.24	1050453 $\pm$ 0.30	532632 $\pm$ 0.41

จะเห็นว่าค่าต่างๆ ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC มีค่าดังตาราง 15 เวลาที่สาร isoquercetin, quercitrin และ quercetin ถูกแยกออกมาที่เวลา (Retention Time) 4.657, 5.714 และ 9.540 นาที ตามลำดับ ซึ่งไม่นานเกินไปและดูจากค่าการแยก (Resolution) ของสาร isoquercetin, quercitrin และ quercetin มีค่าเท่ากับ 5.590 และ 17.994 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าที่เหมาะสมเนื่องจากมีค่า resolution มากกว่า 1.5 ค่าความสมมาตร (Asymmetry หรือ Tailing factor) ของพีค isoquercetin, quercitrin และ quercetin เท่ากับ 1.429, 1.278 และ 1.088 ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้ คือ ไม่เกิน 2 รวมทั้งประสิทธิภาพการแยกของคอลัมน์ (Theoretical plates) มีค่าเฉลี่ย

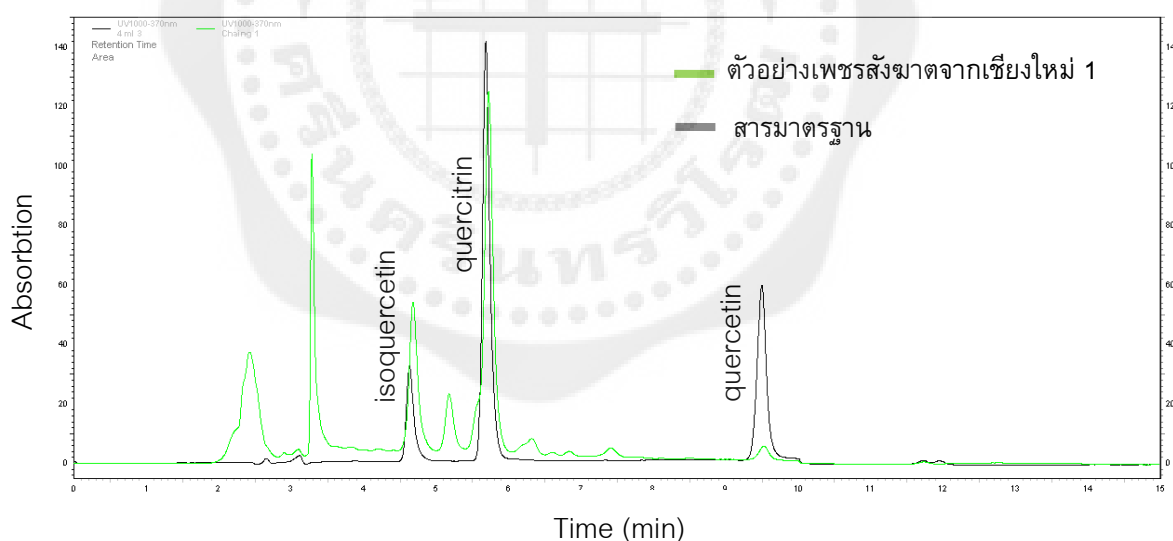
เท่ากับ 9790, 14447 และ 26362 ตามลำดับ โดยทั่วไปค่าที่ยอมรับที่ N มีค่ามากกว่า 2000 ค่าความแม่นยำของการวิเคราะห์ซ้ำ (Peak area) มีค่า %RSD ซึ่งไม่เกิน 2 แสดงให้เห็นว่าระบบเครื่องมือมีความเหมาะสมในการวิเคราะห์สาร isoquercetin, quercitrin และ quercetin

ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

จากวิธีวิเคราะห์ข้างต้น พบว่าสามารถแยกสาร isoquercetin, quercitrin และ quercetin ออกจากกันได้ จึงนำสารมาตรฐานดังกล่าวมาทำการตรวจสอบความถูกต้อง แม่นยำและความเชื่อถือได้ของวิธีการวิเคราะห์ ตามหัวข้อดังนี้

1. ความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ (Specificity)

ความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์เป็นความเฉพาะเจาะจงของวิธีการวิเคราะห์ที่วัดเฉพาะสารที่ต้องการหา specificity ของการวิเคราะห์ ทำโดยเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์สารมาตรฐาน เทียบกับสารตัวอย่างในเพชรสังฆาตที่มีสารอื่นเจือปน โดยพิจารณาจากค่า retention time ของสารมาตรฐาน แต่ละตัวว่าออกมาในเวลาใด โดยวิธีวิเคราะห์ต้องสามารถแยกสารมาตรฐานแต่ละตัวออกจากกันได้ โดยไม่มีพีค (peak) ซ้อนทับกัน และ resolution (R_s) มีค่ามากกว่า 1.5 แสดงในภาพประกอบ 13



ภาพประกอบ 13 แสดงลักษณะ Chromatographic fingerprint ของ (-) สารมาตรฐาน isoquercetin, quercitrin และ quercetin ตามลำดับ, (-) ตัวอย่างเพชรสังฆาตจากเชียงใหม่ 1

จะเห็นว่าสาร isoquercetin, quercitrin และ quercetin ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ถูกแยกออกมาที่เวลา (retention time) 4.6, 5.7 และ 9.5 นาที ตามลำดับ มีค่าดังตาราง 16

ตาราง 16 แสดงค่า retention time ของสาร isoquercetin, quercitrin และ quercetin ของสารมาตรฐาน และตัวอย่างพืชสังฆาต จำนวน 18 ตัวอย่าง

ภาค	ตัวอย่าง	Retention time (นาที)		
		isoquercitrin	quercitrin	quercetin
สารมาตรฐาน		4.657	5.714	9.525
เหนือ	เชียงใหม่ 1	4.673	5.713	9.514
	เชียงใหม่ 2	4.687	5.728	9.523
	ลำปาง	4.678	5.721	9.518
ตะวันออกเฉียงเหนือ	ขอนแก่น	4.694	5.738	9.582
	บุรีรัมย์	4.690	5.737	9.586
	อุบลราชธานี	4.690	5.731	9.564
กลาง	กรุงเทพมหานคร	4.605	5.637	N/A
	กาญจนบุรี	4.668	5.712	9.548
	นครนายก	4.644	5.685	9.495
	ปทุมธานี	4.663	6.867	9.538
	เพชรบุรี	4.656	5.706	9.528
	สิงห์บุรี	4.655	5.695	9.518
ใต้	ตรัง	4.578	5.622	9.503
	ปัตตานี	4.667	5.711	9.506
	พัทลุง	4.560	5.631	9.490
	สงขลา	4.646	5.703	9.504
	สุราษฎร์ธานี 1	4.651	5.697	9.478
	สุราษฎร์ธานี 2	4.601	5.652	9.425

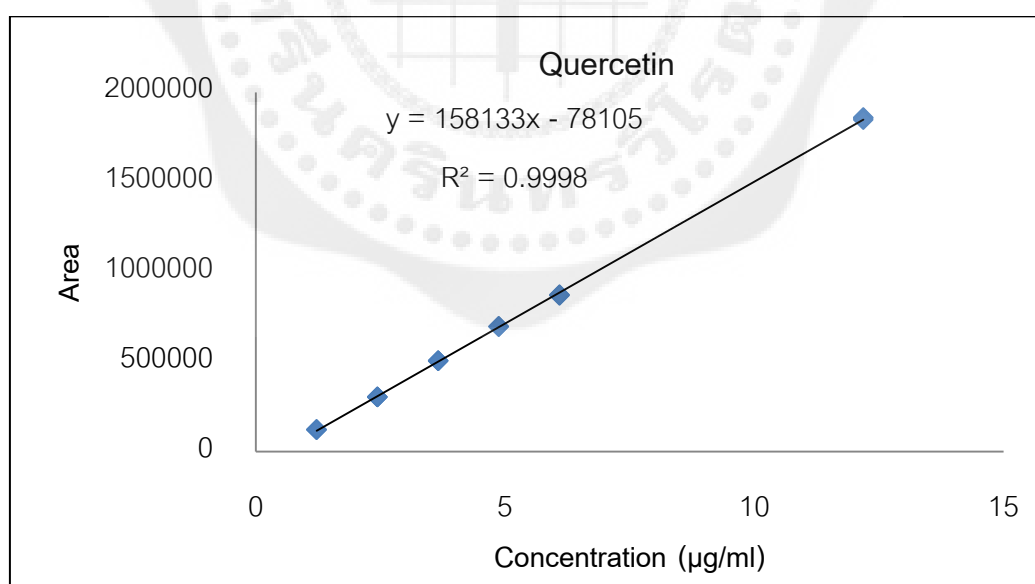
หมายเหตุ (not available; N/A) หมายถึง ไม่พบสารสำคัญ

2. การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and Range)

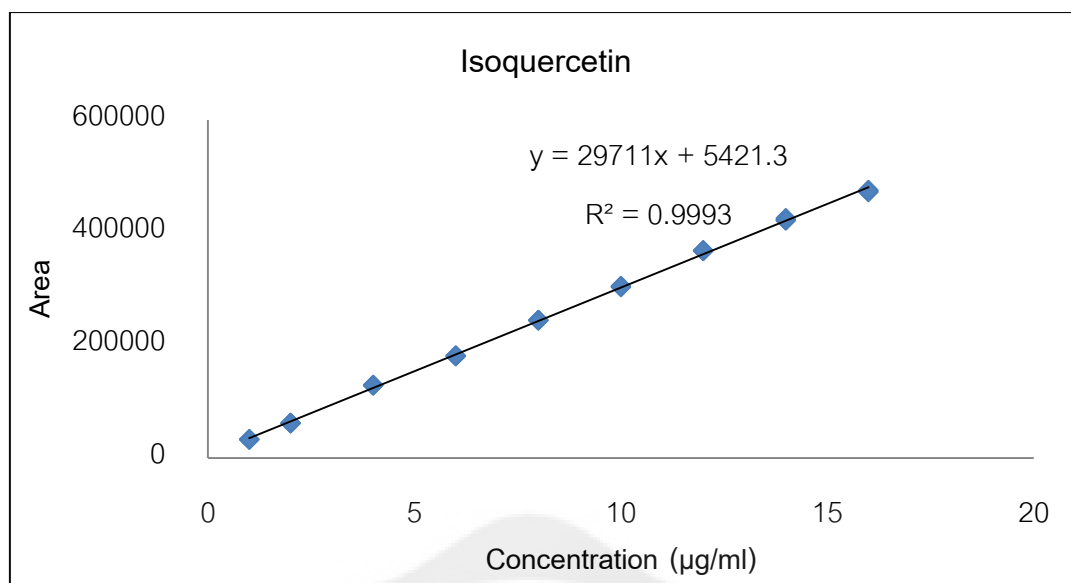
ผลจากการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานสาร quercetin, isoquercetin และ quercitrin พบความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีค (peak area) เป็นเส้นตรงตลอดช่วงที่ทดสอบ โดยมี coefficient of determination (R^2) เท่ากับ 0.9998, 0.9993 และ 0.9999 ดังแสดงในตาราง 17 และแสดงกราฟมาตรฐานใน ภาพประกอบ 14, 15 และ 16 ตามลำดับ

ตาราง 17 แสดงสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานและ coefficient of determination (R^2) ของสาร quercetin ปริมาตรที่วิเคราะห์ 40 ไมโครลิตร และสาร isoquercetin และ quercitrin ปริมาตรที่วิเคราะห์ 20 ไมโครลิตร

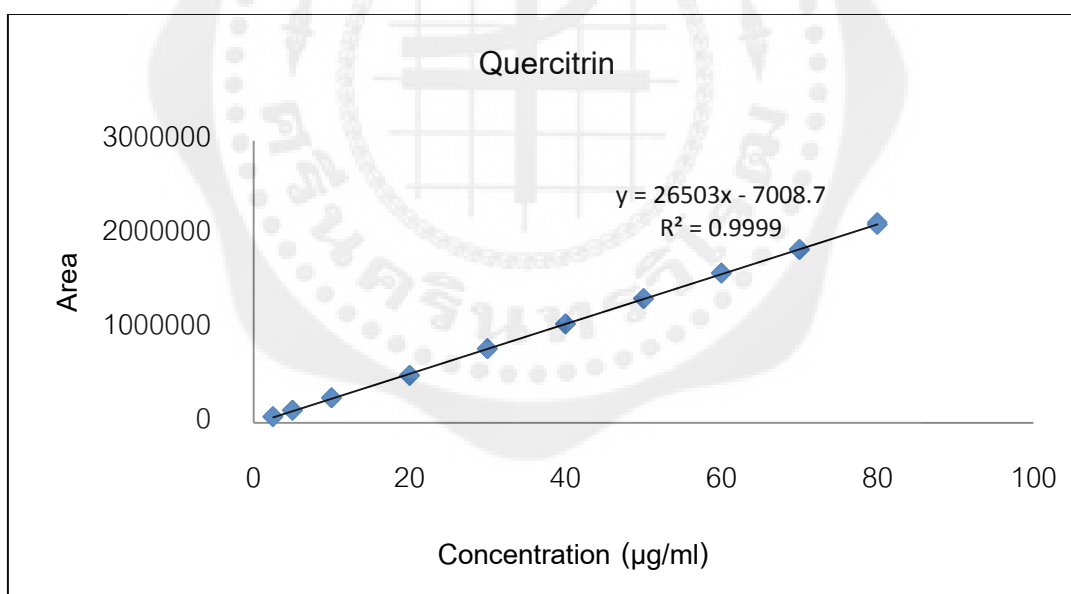
Standard flavonoids	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Linear equation	R^2
Quercetin	1-12	$Y = 158133x - 78105$	0.9998
Isoquercetin	1-16	$Y = 29711x + 5421.3$	0.9993
Quercitrin	2.5-80	$Y = 26503x - 7008.7$	0.9999



ภาพประกอบ 14 แสดงช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน ที่ความเข้มข้นของ quercetin ช่วง 1.22-12.19 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม



ภาพประกอบ 15 แสดงช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน ที่ความเข้มข้นของ isoquercetin ช่วง 1-16 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม



ภาพประกอบ 16 แสดงช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน ที่ความเข้มข้นของ quercitrin ช่วง 2.5-80 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม

3. การทดสอบความถูกต้อง (Accuracy) และความแม่นยำ (Intra day precision)

ผลการทดสอบความถูกต้อง (Accuracy) และความแม่นยำ (Precision) ของวิธีวิเคราะห์ quercetin, quercitrin และ isoquercetin

การทดสอบความถูกต้องและความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานให้มีความเข้มข้น 3 ระดับ โดยวิเคราะห์ความเข้มข้น ระดับละ 3 ซ้ำ คือ quercetin ที่ความเข้มข้น 2.44, 6.10 และ 12.19 ไมโครกรัม quercitrin ที่ความเข้มข้น 10, 40 และ 70 ไมโครกรัม และ isoquercetin ที่ความเข้มข้น 2, 8 และ 14 ไมโครกรัม ได้ค่า %recovery อยู่ในช่วง 94.61- 102.23 โดย quercetin มีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 98.93-100.34 quercitrin มีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 99.69-102.23 และ isoquercetin มีค่าเฉลี่ยช่วง 94.61-100.45 ซึ่งมีค่า %recovery อยู่ในช่วง 90-108 ผ่านเกณฑ์ยอมรับของ AOAC ถือว่ามีความถูกต้อง

%RSD ของ quercetin อยู่ในช่วง 0.01-0.31 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร quercitrin อยู่ในช่วง 0.10-0.27 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ isoquercetin อยู่ในช่วง 0.12-0.52 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีค่า %RSD < 3% ผ่านเกณฑ์ยอมรับของ AOAC ถือว่ามีความแม่นยำ แสดงในตาราง 18

ตาราง 18 ผลการทดสอบความถูกต้อง (Accuracy) และความแม่นยำ (Intra day precision) ของวิธีวิเคราะห์ quercetin, quercitrin และ isoquercetin

ชนิดสาร	ความเข้มข้น (µg/mL)	ร้อยละการคืนกลับ (%recovery)				
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย (±SD)	%RSD
quercetin	2.44	98.89	98.98	98.91	98.93 ± 0.05	0.05
	6.10	100.39	100.36	100.37	100.34 ± 0.01	0.01
	12.19	100.53	100.39	99.93	100.28 ± 0.32	0.31
quercitrin	10	102.52	102.07	102.09	102.23 ± 0.28	0.27
	40	99.92	99.62	99.80	99.78 ± 0.15	0.15
	70	99.57	99.75	99.73	99.69 ± 0.10	0.10
isoquercetin	2	94.70	94.48	94.66	94.61 ± 0.12	0.12
	8	98.98	98.81	98.59	98.80 ± 0.20	0.20
	14	101.02	100.32	100.00	100.45 ± 0.52	0.52

4. ผลการทดสอบความแม่นยำ (Inter day precision)

การทดสอบความความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานให้มีความเข้มข้น 3 ระดับ โดยวิเคราะห์ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ คือ quercetin ที่ความเข้มข้น 2.44, 6.10 และ 12.19 ไมโครกรัม quercitrin ที่ความเข้มข้น 10, 40 และ 70 ไมโครกรัม และ isoquercetin ที่ความเข้มข้น 2, 8 และ 14 ไมโครกรัม %RSD ของ quercetin อยู่ในช่วง 0.64-2.74 quercitrin อยู่ในช่วง 0.17-0.64 และ isoquercetin อยู่ในช่วง 0.05-1.01 ตามลำดับ ซึ่งมีค่า %RSD<6% ผ่านเกณฑ์ยอมรับของ AOAC ถือว่ามีความแม่นยำ แสดงในตาราง 19

ตาราง 19 แสดงผลการทดสอบความแม่นยำ (inter-day precision) ของวิธีวิเคราะห์ quercetin, isoquercetin และ quercitrin

ชนิดสาร	ความเข้มข้น (µg/mL)	ร้อยละการคืนกลับ (%recovery)				
		Day 1	Day 2	Day 3	ค่าเฉลี่ย (±SD)	%RSD
quercetin	2.44	98.92	97.28	96.85	97.51 ± 0.79	0.81
	6.10	100.28	102.03	96.67	99.66 ± 2.73	2.74
	12.19	100.28	101.50	100.54	100.77 ± 0.64	0.64
quercitrin	10	102.23	96.55	98.99	99.26 ± 0.17	0.17
	40	99.78	99.87	99.54	99.73 ± 0.64	0.64
	70	99.69	99.98	98.75	99.47 ± 0.64	0.64
isoquercetin	2	94.61	94.61	95.70	94.97 ± 1.01	1.01
	8	100.45	100.45	98.70	99.87 ± 0.05	0.05
	14	100.45	100.45	100.54	100.48 ± 0.05	0.05

5.7 ความเข้มข้นต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (Limit of detection, LOD) และความเข้มข้นต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ)

ความเข้มข้นต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (Limit of detection, LOD) ทำโดยการประมาณค่าจากสูตรประมาณค่า LOD โดยคำนวณจากสูตร $LOD = 3.3\sigma / S$ โดย σ คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสัญญาณ และ S คือ slope ของกราฟมาตรฐาน ได้ค่า LOD สำหรับ quercetin, isoquercetin และ quercitrin เท่ากับ 0.05, 0.06 และ 0.39 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ความเข้มข้นต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ) ประมาณค่า LOQ โดยคำนวณจากสูตร $LOQ = 10\sigma / S$ โดย σ คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสัญญาณ และ S คือ slope ของกราฟมาตรฐาน ได้ค่า LOQ สำหรับ quercetin, isoquercetin และ quercitrin เท่ากับ 0.14, 0.20 และ 1.18 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ตาราง 20 แสดงความเข้มข้นต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (Limit of detection, LOD) และความเข้มข้นต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ)

Standard	Slope (S)	σ	LOD=3.3 σ /S ($\mu\text{g/ml}$)	LOQ=10 σ /S ($\mu\text{g/ml}$)
quercetin	158133	2197.74	0.05	0.14
isoquercetin	29711	582.97	0.06	0.20
quercitrin	26503	3127.94	0.39	1.18

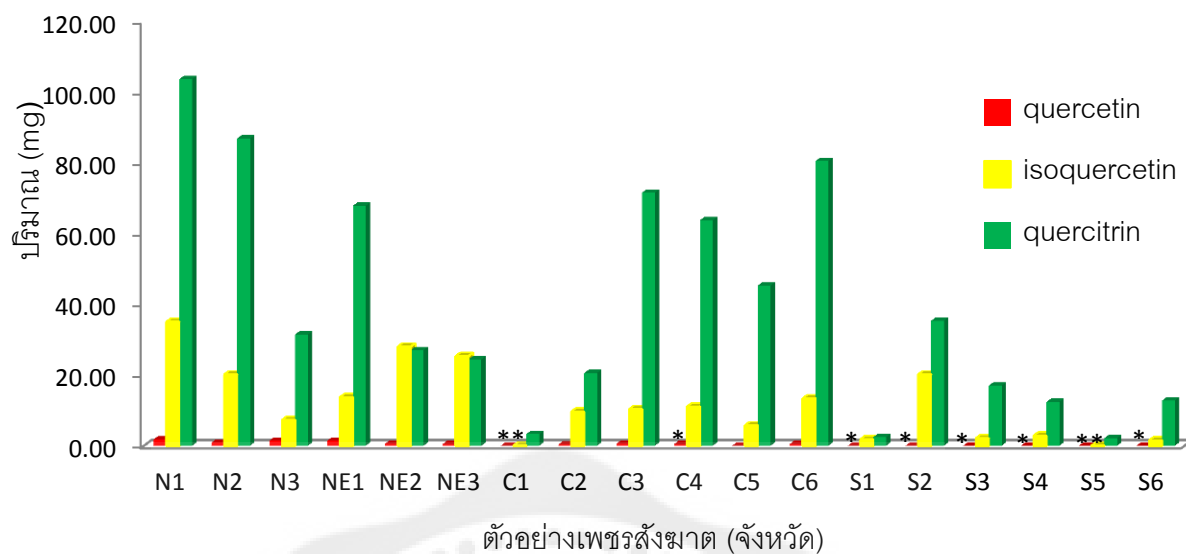
ผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร quercetin, isoquercetin และ quercitrin ในตัวอย่างเถาเพชรสังฆาต จำนวน 18 แห่ง

วิเคราะห์ตัวอย่างสาร quercetin, isoquercetin และ quercitrin ในสารสกัดเถาเพชรสังฆาต จำนวน 18 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค HPLC คำนวณหาปริมาณสาร quercetin วิเคราะห์ที่ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ส่วน isoquercetin และ quercitrin วิเคราะห์ที่ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ในการวิเคราะห์ปริมาณสาร quercetin, isoquercetin และ quercitrin ทำโดยการแทนพื้นที่ใต้พีค (peak area) ลงในสมการ $y=158133x-78105$, $y=29711x+5421.3$ และ $y=26503x-70008.7$ ตามลำดับ สามารถตรวจพบปริมาณสาร quercetin, isoquercetin และ quercitrin ดังแสดงในตาราง 21 และภาพประกอบ 17

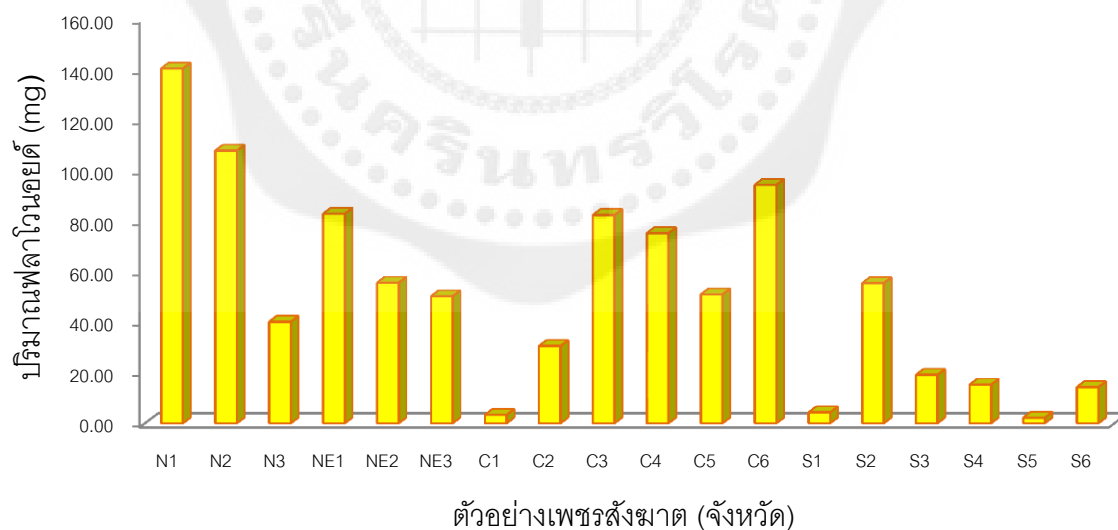
ตาราง 21 แสดงปริมาณของสาร quercetin, isoquercetin และ quercitrin (mg±SD) ในตัวอย่างผง เพชรสังฆาตบดหยาบจำนวน 18 ตัวอย่าง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (n=3)

ที่	แหล่ง	ตัวอย่าง	ปริมาณสารกลุ่ม flavonoids			
			Quercetin (mg±SD)	Isoquercetin (mg±SD)	Quercitrin (mg±SD)	total flavonoids (mg±SD)
1	เชียงใหม่ 1	N1	1.79±0.00	35.03±0.19	103.73±0.40	140.56±0.58
2	เชียงใหม่ 2	N2	0.88±0.01	20.14±0.13	86.94±0.35	107.96±0.47
3	ลำปาง	N3	1.44±0.00	7.28±0.04	31.48±0.05	40.20±0.03
4	ขอนแก่น	NE1	1.39±0.00	13.69±0.06	67.89±0.07	82.97±0.12
5	บุรีรัมย์	NE2	0.56±0.01	28.02±0.17	27.04±0.02	55.65±0.18
6	อุบลราชธานี	NE3	0.50±0.01	25.33±0.11	24.45±0.33	50.28±0.42
7	กรุงเทพฯ	C1	N/A	trace	3.31±0.02	3.31±0.02
8	กาญจนบุรี	C2	0.38±0.00	9.63±0.02	20.58±0.10	30.58±0.12
9	นครนายก	C3	0.55±0.00	10.31±0.02	71.61±0.10	82.47±0.11
10	ปทุมธานี	C4	0.47±0.00	11.03±0.10	63.79±0.18	75.29±0.28
11	เพชรบุรี	C5	trace	5.71±0.11	45.30±0.09	51.01±0.18
12	สิงห์บุรี	C6	0.51±0.00	13.36±0.13	80.55±0.14	94.42±0.26
13	ตรัง	S1	trace	1.82±0.01	2.46±0.01	4.27±0.01
14	ปัตตานี	S2	trace	20.14±0.01	35.35±0.20	55.50±0.19
15	พัทลุง	S3	trace	2.11±0.01	17.02±0.20	19.13±0.20
16	สุราษฎร์ธานี 1	S4	trace	2.82±0.00	12.41±0.08	15.23±0.08
17	สุราษฎร์ธานี 2	S5	trace	trace	2.13±0.01	2.91±0.02
18	สงขลา	S6	trace	1.49±0.03	12.79±0.17	14.28±0.16

หมายเหตุ (not available; N/A) ไม่พบสารสำคัญ (trace) พบปริมาณสารสำคัญต่ำกว่าช่วงวิเคราะห์



ภาพประกอบ 17 กราฟแสดงการเปรียบเทียบปริมาณของสาร quercetin, isoquercetin และ quercitrin (mg $\pm$ SD) ในตัวอย่างผงเพชรสังฆาตบดหยาบจำนวน 18 ตัวอย่าง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (n=3) (*) ไม่อยู่ในช่วงของการวิเคราะห์



ภาพประกอบ 18 กราฟแสดงการเปรียบเทียบปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (total flavonoids) ในตัวอย่างผงเพชรสังฆาตบดหยาบจำนวน 18 ตัวอย่าง

จากตาราง 21 จะเห็นได้ว่าการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร flavonoids จำนวน 3 ชนิด คือ quercetin, isoquercetin และ quercitrin ของการทดลอง 3 ซ้ำ (n=3) ในตัวอย่างสารสกัดเถาเพชรสังฆาตจำนวน 18 ตัวอย่าง พบว่า quercitrin มีปริมาณสูงสุดในเพชรสังฆาตเกือบทุกตัวอย่าง รองลงมาคือ isoquercetin และ quercetin ตามลำดับ ทุกตัวอย่างที่เป็นตัวแทนในแต่ละภาคของประเทศไทย สามารถพบสาร quercitrin และ isoquercetin ในปริมาณสูง และ quercetin สามารถพบได้ในตัวอย่างเพชรสังฆาตจากภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้เท่านั้น แต่พบได้ในปริมาณน้อย โดยไม่พบสาร quercetin ในตัวอย่างเพชรสังฆาตจากร้านยาไทยจากจังหวัดกรุงเทพมหานคร

ในผงยาเถาเพชรสังฆาตบดหยาบ 100 กรัม ที่สกัดด้วย methanol พบว่าปริมาณสาร quercetin, isoquercetin และ quercitrin (มิลลิกรัม) ผลดังนี้ ปริมาณของสาร quercetin อยู่ในช่วง 0.38-1.79 มิลลิกรัม isoquercetin อยู่ในช่วง 1.49-35.03 มิลลิกรัม quercitrin อยู่ในช่วง 2.13-103.73 มิลลิกรัม เมื่อพิจารณาจากกลุ่มตัวอย่างเพชรสังฆาตจาก 18 ตัวอย่าง ทั้ง 4 ภาคของประเทศไทย พบว่าสารสกัดจากตัวอย่างเถาเพชรสังฆาต 18 ตัวอย่างมีสาร quercetin, isoquercetin และสาร quercitrin ในปริมาณที่แตกต่างกัน ดังภาพประกอบ 17

เมื่อพิจารณาสารเทียบในตัวอย่างเพชรสังฆาต สาร quercitrin พบในทุกตัวอย่าง และพบมากที่สุดตัวอย่างจากเชียงใหม่ 1 มีปริมาณ 103.73 มิลลิกรัม และพบได้น้อยในตัวอย่างจากร้านยาไทย กรุงเทพฯ และ สุราษฎร์ธานี 1 โดยมีปริมาณสาร 3.31 มิลลิกรัม และ 2.13 มิลลิกรัม ตามลำดับ สาร isoquercetin สามารถพบในปริมาณที่รองลงมา โดยเชียงใหม่ 1 มีปริมาณ 35.03 มิลลิกรัม และพบต่ำกว่าช่วงวิเคราะห์ที่ตัวอย่างจากร้านยาไทย กรุงเทพฯ และ สุราษฎร์ธานี 2 และ quercetin พบได้น้อยที่สุด โดยตัวอย่างจากเชียงใหม่ 1 มีปริมาณสูงสุดที่ 1.79 มิลลิกรัม โดยมีจำนวน 7 ตัวอย่างที่พบ quercetin ได้น้อยกว่าช่วงวิเคราะห์ คือ เพชรบุรี, ตรัง, ปัตตานี, พัทลุง, สุราษฎร์ธานี 1, สุราษฎร์ธานี 2 และ สงขลา และไม่พบ quercetin เลยในตัวอย่างร้านยาไทย กรุงเทพฯ

จากการวิเคราะห์ปริมาณ total flavonoids ในตัวอย่างเพชรสังฆาตที่นำมาศึกษา พบว่าตัวอย่างจากภาคเหนือ มีปริมาณ total flavonoids สูงสุดอยู่ในช่วง 40.20-140.56 มิลลิกรัม รองลงมาคือ ตัวอย่างจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีปริมาณ total flavonoids ในช่วง 50.28-82.97 มิลลิกรัม ภาคกลาง มีปริมาณ total flavonoids อยู่ในช่วง 3.31-94.42 มิลลิกรัม และตัวอย่างจากภาคใต้ มีปริมาณ total flavonoids น้อยที่สุด คืออยู่ในช่วง 4.27-55.50 มิลลิกรัม

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร quercetin isoquercetin และ quercitrin ในตัวอย่างเพชรสังฆาต 18 ตัวอย่าง นั้นพบว่าปริมาณสารสำคัญแตกต่างกัน ซึ่งอาจมาจากปัจจัยต่างๆ เช่น แหล่งปลูก ระยะเวลาเก็บเกี่ยววัตถุดิบ การเสื่อมสภาพจากการเก็บเวลานาน⁸ และปัจจัยด้าน

สภาพแวดล้อมเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาการของพืช⁶¹ เช่น ปริมาณแสงสว่าง อุณหภูมิ ดิน แร่ธาตุอาหาร อากาศ ปริมาณน้ำและความชื้น เป็นต้น ซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโต และปริมาณสารสำคัญ ในแต่ละภูมิภาคมีสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันอาจส่งผลต่อปริมาณสาร quercetin isoquercetin และ quercitrin ที่พบในแต่ละภูมิภาคได้ สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Hossain และคณะ 2005 ได้ทำการศึกษากี่ยวการเจริญเติบโต ผลผลิตและคุณภาพของขมิ้น (*Curcuma long* L.) คือการปลูกขมิ้นในดินสีแดงเข้ม ดินสีเทา และดินสีแดง ในเมือง Okinawa ประเทศญี่ปุ่น พบว่า ขมิ้นที่ปลูกในดินสีแดงเข้มมีผลผลิตสูงสุด และมีสาร curcumin สูง ปัจจัยทางดินสารอาหาร หรือค่า pH ในดิน ที่เหมาะสมอาจเป็นสิ่งจำเป็นต่อคุณภาพ และผลผลิตของขมิ้น และจากรายงานการวิจัยของ จรัญ ดิษฐไชวงศ์ และคณะ 2558 ได้ศึกษาวิจัยและพัฒนาการผลิตฟ้าทะลายโจร เพื่อเพิ่มผลผลิตและคุณภาพ พบว่า ระยะปลูก การให้น้ำ ช่วงเวลาเก็บเกี่ยวที่แตกต่างกัน ส่งผลต่อปริมาณผลผลิตและสารแอนโดรกราไดรอลต่างกัน การปลูกแบบพรางแสงให้ผลผลิตลดลง 50% แตกต่างกับการปลูกแบบไม่พรางแสง ผลผลิตมีความสัมพันธ์ด้านบวกกับปริมาณน้ำ ความยาวนานแสง และอุณหภูมิกลางวัน และปริมาณสารสำคัญมีความผันแปรไปตามสภาพแวดล้อม นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยของ เสริมสกุล และคณะ 2551 ได้ศึกษาอิทธิพลของระดับความสูงของพื้นที่ปลูกที่มีผลต่อการเจริญเติบโต การให้ผลผลิตและคุณภาพผลผลิตเหง้ากระชายดำ จากการศึกษาพบว่า ปัจจัยระดับความสูงของพื้นที่แสดงอิทธิพลต่อองค์ประกอบทางเคมีของเหง้ากระชายดำ คือ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระดับความสูงของพื้นที่ที่เพิ่มขึ้น จะเห็นว่าสิ่งแวดล้อมในการเพาะปลูกมีผลต่อปริมาณสารสำคัญในสมุนไพร

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ลายพิมพ์องค์ประกอบทางเคมีของสมุนไพรพืชสมุนไพรโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (thin layer chromatography; TLC) และเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบรีเวอร์สเฟส (reversed phased high performance liquid chromatographic; RP-HPLC) จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) จำนวน 3 ชนิด คือ quercetin, isoquercetin และ quercitrin ด้วยเทคนิค HPLC และเพื่อเปรียบเทียบลายพิมพ์องค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธีโครมาโทกราฟีจากตัวอย่างพืชสมุนไพร 18 ตัวอย่าง ตามหลักเกณฑ์ของ ICH guideline และผลการวิเคราะห์ตามเกณฑ์ของ AOAC guideline

จากการสกัดเถาพืชสมุนไพร 18 ตัวอย่างที่สกัดด้วย methanol พบว่าสารสกัดเถาพืชสมุนไพร 18 ตัวอย่างมีร้อยละปริมาณสารสกัด (%yield) อยู่ในช่วง 5.06-12.56 เรียงลำดับจากมากไปน้อย ดังนี้ จังหวัดเชียงใหม่ 1 เชียงใหม่ 2 ปัตตานี อุบลราชธานี ขอนแก่น ลำปาง พัทลุง นครนายก เพชรบุรี บุรีรัมย์ ปทุมธานี สิงห์บุรี ตรัง สุราษฎร์ธานี 2 กาญจนบุรี สงขลา สุราษฎร์ธานี 1 และร้านยาไทย ในจังหวัดกรุงเทพมหานคร พบว่า เชียงใหม่มี %yield มากที่สุด คือร้อยละ 12.56 และร้านยาไทย จากกรุงเทพมหานคร มี %yield น้อยที่สุด คือร้อยละ 5.06

การตรวจสอบลักษณะลายพิมพ์องค์ประกอบทางเคมีในการทดลองครั้งนี้ใช้เทคนิค TLC และเทคนิค HPLC โดยการใช้สารกลุ่ม flavonoids จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ สาร quercetin, isoquercetin และ quercitrin เป็นสารเทียบ (Marker) เนื่องจากสารกลุ่ม flavonoids มีรายงานฤทธิ์ด้านการอักเสบ และมีรายงานว่าตรวจพบสาร quercetin quercitrin และ isoquercetin เป็นองค์ประกอบทางเคมี ซึ่งสารทั้ง 3 ชนิดนี้มีรายงานพบในเถาพืชสมุนไพร

จากการศึกษาวิจัยลายพิมพ์องค์ประกอบทางเคมีของพืชสมุนไพรของ นพมาศ และคณะ (2551) โดยใช้ quercetin เป็นสารเทียบ ซึ่งมีวัฏภาคเคลื่อนที่ คือ toluene: ethyl acetate: formic acid (50:45:10) เมื่อนำมาปรับใช้ทำให้สาร isoquercetin และ quercitrin ไม่สามารถแยกได้ จึงมีการปรับ วัฏภาคเคลื่อนที่ให้มีขั้วมากขึ้น และวัฏภาคที่เหมาะสมในการตรวจสอบลักษณะลายพิมพ์องค์ประกอบทางเคมีของเถาพืชสมุนไพร คือ วัฏภาคเคลื่อนที่ 2 ประกอบด้วย toluene: ethyl acetate: formic acid: methanol (60:40:10:10) สามารถแยกองค์ประกอบทางเคมี ได้ 13 แถบ และแถบสารที่มีค่า $R_f = 16$ คือ isoquercitrin $R_f = 28$ คือ quercitrin และแถบสารที่มีค่า $R_f = 69$ คือ quercetin ซึ่งแถบสารดังกล่าวเป็นสารกลุ่ม flavonoids

สำหรับการศึกษาด้วยเทคนิค HPLC สภาวะการทดลองที่เหมาะสมที่ใช้ในการวิเคราะห์ โดยใช้เกณฑ์จาก USP37 (System suitability) ของเทคนิค HPLC การวิเคราะห์ปริมาณ quercetin, isoquercetin และ quercitrin ซึ่งดัดแปลงมาจากสภาวะการศึกษาวิจัยของ รัชต์ และคณะ (2555) โดยใช้เฟสเคลื่อนที่แบบเปลี่ยนแปลงสัดส่วน (gradient) โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ ที่เป็นตัวทำละลาย อินทรีย์ คือ acetonitrile ต่อ 0.3 %formic acid โดยใช้อัตราส่วนของ acetonitrile ร้อยละ 25-50 ที่ เวลา 0-10 นาที เปลี่ยนเป็นร้อยละ 50-25 ที่เวลา 10-12 นาที คงที่ ที่ร้อยละ 25 ที่เวลา 12-15 นาที โดยใช้อัตราไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรที่วิเคราะห์สารละลายผสม 20 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตร เวลาที่สาร isoquercetin, quercitrin และ quercetin ถูกแยกออกมาที่เวลา (retention time) 4.657, 5.714 และ 9.540 นาที ตามลำดับ โดยมีค่าการแยก (resolution) ของสาร isoquercetin quercitrin และ quercetin มีค่า เท่ากับ 5.590 และ 17.994 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าที่เหมาะสมเพราะมีค่า resolution มากกว่า 1.5 ค่า ความสมมาตร (Tailing factor) ของพีค isoquercetin, quercitrin และ quercetin เท่ากับ 1.429, 1.278 และ 1.088 ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้ คือ ไม่เกิน 2 รวมทั้งประสิทธิภาพการแยกของ คอลัมน์ (Theoretical plates) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 9790, 14447 และ 26362 ตามลำดับ โดยทั่วไปค่าที่ ยอมรับที่ N มีค่ามากกว่า 2000 ค่าความแม่นยำของการวิเคราะห์ซ้ำ (Peak area) มีค่า %RSD ซึ่งไม่ เกิน 2 แสดงให้เห็นว่าระบบเครื่องมือมีความเหมาะสมในการวิเคราะห์สาร isoquercetin, quercitrin และ quercetin

จากการศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ สาร quercetin, quercitrin และ isoquercetin โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนสูงแบบรีเวอร์สเฟส สัดส่วนและอัตราการไหลใช้ระบบ gradient ปริมาตรการฉีดสารละลายผสม 20 ไมโครลิตร และปริมาตรในการฉีดสาร quercetin 40 ไมโครลิตร เนื่องจากสาร quercetin ในเพชรสังฆาตที่นำมาวิเคราะห์มีปริมาณน้อยจึงทำการวิเคราะห์ แยกสารจากตัวอื่น ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตร ตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (validation) พบว่ากราฟมาตรฐานของสาร isoquercetin อยู่ในช่วงความเป็น เส้นตรงที่ความเข้มข้น 1-16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสาร ให้ค่า coefficient of determination (R^2) เท่ากับ 0.9993 quercitrin อยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้น 2.5-80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า R^2 เท่ากับ 0.9999 และสาร quercetin อยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้น 1.22-12.19 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า R^2 เท่ากับ 0.9998 ตามลำดับ

ค่าความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (precision) ซึ่งวิเคราะห์ความแม่นยำของเครื่องมือ (repeatability) สารทั้ง 3 ชนิด ที่ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของ intra-day precision อยู่ ในช่วงร้อยละ 0.01-0.52 ซึ่งมีค่าน้อยกว่าร้อยละ 3 และ inter-day precision อยู่ในช่วงร้อยละ 0.05-

2.74 ซึ่งมีค่าน้อยกว่าร้อยละ 6 ถือเป็นค่าที่ยอมรับได้ ผ่านตามเกณฑ์ AOAC สำหรับค่าความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (accuracy) ซึ่งรายงานค่าเป็น %recovery ของสาร isoquercetin, quercitrin และ quercetin ได้ค่า %recovery อยู่ในช่วง 90-108 ผ่านตามเกณฑ์ AOAC ความเข้มข้นต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (LOD) สำหรับ quercetin, isoquercetin และ quercitrin มีค่า 0.05, 0.06 และ 0.39 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ความเข้มข้นต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (LOQ) สำหรับ quercetin, isoquercetin และ quercitrin มีค่า 0.14, 0.20 และ 1.18 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

เมื่อนำสารสกัดเพชรสังฆาตไปวิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC สามารถนำไปใช้ตรวจชนิดและปริมาณสารกลุ่ม flavonoids ทั้ง 3 ชนิด คือ quercetin, isoquercetin และ quercitrin ในตัวอย่างเถาเพชรสังฆาต วิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถวิเคราะห์สารทั้ง 3 ชนิดได้ในคราวเดียวกันและให้ค่าที่ถูกต้องแม่นยำ และพบว่าตัวอย่างมีลายพิมพ์องค์ประกอบทางเคมีมีลักษณะคล้ายคลึงกัน และตรวจพบสาร quercetin, quercitrin และ isoquercetin ซึ่งสารนี้มีรายงานพบในเถาเพชรสังฆาต แต่ไม่พบสาร quercetin ในตัวอย่างเพชรสังฆาตจากร้านยาไทยในจังหวัดกรุงเทพมหานคร

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่ม flavonoids ในผงเถาเพชรสังฆาตบดหยาบ 100 กรัม ที่สกัดด้วย methanol จากผลการศึกษาสาร quercetin, isoquercetin และ quercitrin ได้ดังนี้ quercitrin พบทุกตัวอย่างในปริมาณมากที่สุดอยู่ในช่วง 2.13-103.73 มิลลิกรัม รองมาคือ isoquercetin พบทุกตัวอย่างอยู่ในช่วง 1.49-35.03 มิลลิกรัม และสาร quercetin พบเพียงบางตัวอย่าง อยู่ในช่วง 0.38-1.79 มิลลิกรัม โดยตัวอย่างเพชรสังฆาตจากเชียงใหม่ 1 มีปริมาณสารทั้ง 3 ชนิด quercitrin (103.73 มิลลิกรัม) isoquercetin (35.03 มิลลิกรัม) และ quercetin (1.79 มิลลิกรัม) สูงที่สุด

จากการวิเคราะห์ปริมาณ total flavonoids ในตัวอย่างเพชรสังฆาตที่นำมาศึกษา พบว่าตัวอย่างจากภาคเหนือ มีปริมาณ total flavonoids สูงสุดอยู่ในช่วง 40.20-140.56 มิลลิกรัม รองลงมาคือ ตัวอย่างจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีปริมาณ total flavonoids ในช่วง 50.28-82.97 มิลลิกรัม ภาคกลาง มีปริมาณ total flavonoids อยู่ในช่วง 3.31-94.42 มิลลิกรัม และตัวอย่างจากภาคใต้ มีปริมาณ total flavonoids น้อยที่สุด คืออยู่ในช่วง 4.27-55.50 มิลลิกรัม

จากการวิเคราะห์ลักษณะลายพิมพ์องค์ประกอบทางเคมี และวิเคราะห์ปริมาณสาร quercetin, isoquercetin และสาร quercitrin ในตัวอย่างเถาเพชรสังฆาตด้วยเทคนิค HPLC พบว่ามีความสอดคล้องกับการวิเคราะห์ลักษณะลายพิมพ์ทางเคมีด้วยเทคนิค TLC พบปริมาณสาร quercitrin ในเพชรสังฆาตซึ่งมีแถบสารสีเข้มมากที่สุด และสามารถพบได้ทุกแหล่งในประเทศไทย รองลงมาคือสาร isoquercetin และไม่สามารถตรวจพบสาร quercetin ในตัวอย่างเพชรสังฆาต จาก

ผลการทดลอง quercitrin สามารถนำมาเป็นสารเทียบ ในการควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบ และผลิตภัณฑ์จากเพชรสังฆาต เนื่องจากพบปริมาณสาร quercitrin พบมากที่สุด

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร quercetin isoquercetin และ quercitrin ในตัวอย่าง เพชรสังฆาต 18 ตัวอย่าง นั้นพบว่าปริมาณสารสำคัญแตกต่างกัน อาจมาจากปัจจัยต่างๆ เช่น แหล่งเก็บและระยะเวลาเก็บเกี่ยววัตถุดิบที่ต่างกันร่วมกับอิทธิพลของสิ่งแวดล้อม ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการผลิตสารสำคัญในพืช เช่น ปริมาณแสงแดด อุณหภูมิ ปริมาณน้ำฝน ซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโต และปริมาณสารสำคัญโดยไปชะล้างสารสำคัญออกจากพืชได้ และปัจจัยทางเคมี-ฟิสิกส์ของดิน เช่น แร่ธาตุ และสารอาหารต่างๆที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช ในแต่ละภูมิภาคมีสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกันอาจส่งผลต่อปริมาณและชนิดของสารสำคัญในพืช นอกจากนี้การเก็บรักษาที่แตกต่างกัน อาจส่งผลต่อปริมาณสาร quercetin isoquercetin และ quercitrin ที่พบในแต่ละภูมิภาคได้

ดังนั้นขั้นตอนการควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบสมุนไพรจึงเป็นสิ่งสำคัญ ทำให้สามารถเก็บและซื้อสมุนไพรได้อย่างถูกต้อง ถูกต้น ได้สมุนไพรที่ปราศจากการปนเปื้อนและปนปลอมจากสมุนไพรชนิดอื่น และจะทำให้ได้สมุนไพรที่มีคุณภาพดี การนำเทคนิค TLC และเทคนิค HPLC มาใช้ในการควบคุมคุณภาพของสมุนไพรที่มีข้อดีหลายประการ เช่น โครมาโทแกรมที่ได้มาจากสมุนไพรด้วยเทคนิค TLC และเทคนิค HPLC สามารถใช้เป็นลายพิมพ์องค์ประกอบทางเคมีหรือ chromatographic fingerprint ในการควบคุมคุณภาพของสมุนไพรที่มีความซับซ้อนขององค์ประกอบทางเคมี โดยเทคนิค TLC ใช้เวลาในการวิเคราะห์ไม่นาน ซึ่งเหมาะกับการคัดกรองชนิดของสมุนไพร ตรวจสอบวัตถุดิบที่มีความซับซ้อนขององค์ประกอบทางเคมี สามารถทำการวิเคราะห์ในหลายๆระบบของวัฏภาคเคลื่อนที่ และสามารถวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีกลุ่มต่างๆ เช่น flavonoids, triterpenoids, alkaloids ได้ในคราวเดียวกันโดยการใช้ยาเคมีพ่นร่วม และเทคนิค HPLC เป็นวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารที่เป็นที่นิยมและยอมรับในปัจจุบัน เนื่องจากสามารถตรวจวิเคราะห์สารปริมาณต่ำ ได้อย่างเที่ยงตรง และแม่นยำ ฉะนั้นการควบคุมคุณภาพวัตถุดิบสมุนไพร ปริมาณสารสำคัญ หรือสารเทียบจึงมีความสำคัญในการส่งเสริมการใช้สมุนไพร และสามารถใช้สมุนไพรได้อย่างมีประสิทธิภาพ

จากการศึกษาหาปริมาณสาร flavonoids ในครั้งนี้ พบว่า สาร quercitrin เหมาะที่จะเป็นสารเทียบ (marker) สำหรับเพชรสังฆาตเนื่องจากพบเป็นสารหลัก และพบได้ในตัวอย่างเพชรสังฆาตทุกแหล่งที่นำมาศึกษา สามารถนำลายพิมพ์องค์ประกอบทางเคมีที่ได้จากเทคนิค TLC และเทคนิค HPLC มาประยุกต์ใช้สำหรับการควบคุมคุณภาพเชิงเอกลักษณ์และปริมาณสารสำคัญของสมุนไพรเพชรสังฆาตทั้งในรูปแบบวัตถุดิบ สารสกัด และผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปที่มีเพชรสังฆาตเป็นองค์ประกอบหลัก

ข้อเสนอแนะ

1. จากการศึกษาลักษณะลายพิมพ์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค TLC และเทคนิค HPLC ของเพชรสังฆาต 18 ตัวอย่าง พบว่ามีปริมาณของสาร quercetin, isoquercetin และ quercitrin ในตัวอย่างเพชรสังฆาตแตกต่างกันในแต่ละภูมิภาค จึงควรศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่างๆที่ส่งผลต่อปริมาณของสารสำคัญ เช่น สภาวะแวดล้อมการปลูก ช่วงเวลาการเก็บเกี่ยว ระยะเวลาในการเก็บรักษา เป็นต้น

2. จากผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร quercetin, isoquercetin และ quercitrin พบว่าในภูมิภาคเดียวกัน หรือในจังหวัดเดียวกันมีปริมาณสาร quercetin, quercitrin และ isoquercetin แตกต่างกัน จึงควรเพิ่มจำนวนตัวอย่างในการทดลองให้มากขึ้น เช่น เพิ่มตัวอย่างเพชรสังฆาตในภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เป็นต้น

3. นำวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ด้วย HPLC ในการศึกษาครั้งนี้ไปประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์เพชรสังฆาตที่มีอยู่ในท้องตลาด



บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

1. สุรเกียรติ์ อาชานุกาพ. ตำราการตรวจโรคทั่วไป 2: 350 โรคกับการดูแลรักษาและการป้องกัน. กรุงเทพฯ: โฮลิสติก พับลิชชิ่ง; 2551.
2. สิริกานต์ มุกข์ดา, สนั่น ศุภธีรสกุล. ยาสมุนไพรและโรคริดสีดวงทวาร. วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก 2014; 12 (2): 122-32.
3. สมพร ภูติยานันต์. ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับการแพทย์แผนไทย: ว่าด้วยสมุนไพรกับการแพทย์แผนไทย. เชียงใหม่; สายวิชาการวิทยาศาสตร์เภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2546
4. Panpimanmas S, Sithipongsri S, Sukdanon C, Manmee C. Experimental Comparative Study of the Efficacy and Side effects of *Cissus quadrangularis* L. (Vitaceae) to Daflon (Servier) and Placebo in the Treatment of Acute Hemorrhoids. J Med Assoc Thai 2010; 93: 1360-7.
5. Kanket S, Chaiyorch N, Lamsombuth S, Nualkaew S. Formulation and efficacy of *Cissus Quadrangularis* extract capsules for treatment of stage 1 and 2 acute internal hemorrhoid patients. The 4th Annual Northeast Pharmacy Research Conference of 2012 "Pharmacy Profession in Harmony" Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Thailand. 2012.
6. สุรติ เล็กอุทัย และภัทรา อะหมะดี พีระชนะ. ผลการรักษาโรคริดสีดวงทวารด้วยสารสกัดเพชรสังฆาต. วารสารวิชาการสาธารณสุข 2554; 20 (5): 848-56.
7. ธีรดา สุขธรรม. การควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์สมุนไพรไทยด้วย chromatographic fingerprints. วารสารกรมวิทยาศาสตร์ 2557; 62: 194.
8. ปราณี ขวลิตอำรง, ธิติรัตน์ บุญรอด, ประไพ วงศ์สินคงมั่น, จารีย์ บันสิทธิ์, ทวีผล เดชาติวงศ์ ณ อุทยาน, เย็นจิตร เตชะดำรงสิน และคณะ. คุณภาพทางเคมีของสมุนไพร. เล่ม 1. นนทบุรี: สำนักงานพระพุทธศาสนาแห่งชาติ; 2550.
9. Thai herbal pharmacopoeia Volume IV. Phet sangkhat: Department of medical sciences, Ministry of public health nonthaburi 11000, Thailand. 2014; 66-67.
10. เต็ม สมิตินันท์. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ. 2557. กรุงเทพฯ: สำนักงานหอพรรณไม้ สำนักงานวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม; 2557:136.

11. พร้อมจิต ศรลัมพ์, บรรณานิการ. สารานุกรมสมุนไพร. เล่ม 1. กรุงเทพฯ: อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง; 2543.
12. สมพร ภูติยานันต์. ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับการแพทย์แผนไทย: ว่าด้วยสมุนไพรกับการแพทย์แผนไทย. เชียงใหม่: สายวิชาวิทยาศาสตร์เภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2546.
13. เสี่ยงม พงษ์บุญรอด. ไม้เทศเมืองไทย สรรพคุณของยาเทศและยาไทย. กรุงเทพฯ: เกษมบรรณกิจ; 2519: 383.
14. วุฒิ วุฒิธรรมเวช. สารานุกรมสมุนไพร รวมหลักเภสัชกรรมไทย. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์; 2540.
15. วุฒิ วุฒิธรรมเวช. คัมภีร์เภสัชรัตนโกสินทร์. กรุงเทพฯ: ศิลป์สยามบรรจภัณฑ์และการพิมพ์; 2554.
16. บัญชีจากยาสมุนไพร พ.ศ. 2544. ตามประกาศคณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ เรื่อง บัญชียาหลักแห่งชาติ (ฉบับที่ 4) พ.ศ. 2544 คณะกรรมการพัฒนายาแห่งชาติ. สำนักงานกิจการโรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึกในพระบรมราชูปถัมภ์ 2544
17. สุภาภรณ์ ปิติพร. บันทึกของแผ่นดิน 6 สมุนไพรทองใต้ ในวิถี ASEAN. มูลนิธิโรงพยาบาลเจ้าพระยาอภัยภูเบศร ในพระอุปถัมภ์สมเด็จพระภคินีเธอ เจ้าฟ้าเพชรรัตนราชสุดา สิริโสภาพัณณวดี. ปราจีนบุรี: ประมัตต์การพิมพ์; 2556.
18. Thiangtham J. Determination of antioxidant constituents in the medicinal plant *Cissus quadrangularis* Linn. Chulalongkorn University 2003.
19. Singh G, Rawat P, Maurya R. Constituents of *Cissus quadrangularis*. Nat Prod Res 2007; 21 (6): 522-28.
20. Thakur A, Jain V, Hingorani L, Latdha KS. Phytochemical studies on *Cissus quadrangularis* Linn. Nat Prod Res 2009; 1 (4): 213-15.
21. Sapsrithong T, et al. *Cissus quadrangularis* ethanol extract up regulates superoxide dismutase, glutathione peroxidase and endothelial nitricoxide synthase expression in hydrogen peroxide-injured human ECV304 cells. J Ethnopharmacol 2012; 143: 664–72.
22. Kumar R, Gupta YK, Singh S. *Cissus quadrangularis* attenuates the adjuvant induced arthritis by down regulating pro-inflammatory cytokine and inhibiting angiogenesis. J Ethnopharmacol 2015; 175: 346–55.

23. Jakikasem S, Limsiriwong P, Kajsong T, Soontornanasart T. Phytochemical study of *Cissus quadrangularis* Linn. Thai J Pharm Sci 2000; 17 (24): 25.
24. สมศักดิ์ เหลียวไชยพันธุ์. การตรวจสอบหาฟลาโวนอยด์ในต้นเพชรสังฆาต. รายงานการวิจัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 1995.
25. Bhutani KK, Kapoor R, Atal CK. Two unsymmetric tetracyclic triterpenoids from *Cissus quadrangularis*. Phytochemistry 1984; 23 (2): 407-10.
26. Metha M, Kaur N, Butani KK. Determination of marker constituents from *Cissus quadrangularis* Linn. And their quantitation by HPTLC and HPLC. Phytocheml Anal 2001; 12 (2): 91-95.
27. Gupta M.M. and Verma R.K. Lipid constituents of *cissus quadrangularis*. Phytochem 1991; 30 (3): 875-75.
28. ธีรรัตน์ ปลื้มใจ. การศึกษาทางพฤกษศาสตร์ของต้นเพชรสังฆาต [วิทยานิพนธ์ปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต]. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 1984.
29. Adesanya SA, Nia R, Martin MT, Boukamcha N, Montagnac A, Pais M. Stilbene Derivatives from *Cissus quadrangularis*. J Nat Prod 1999; 62 (12): 1694-95.
30. Jainu M and Mohan KV. Protective role of ascorbic acid isolated from *Cissus quadrangularis* on NSAID induced toxicity immunomodulating response and growth factors expression. Int Immunopharmacol 2008; 8: 1721-27.
31. Chidambaram J and Venkatraman AC. *Cissus quadrangularis* stem alleviates insulin resistance, oxidative injury and fatty liver disease in rats fed high fat plus fructose diet. Food Cheml Toxicol 2010; 48 (8-9): 2012-29.
32. Bhujade AM, Talmale S, Kumar N, Gupta G, Reddanna P, Das SK, Patil M.B. Evaluation of *cissus quadrangularis* extracts as an inhibitor of COX, 5-LOX, and proinflammatory mediators. J Ethnopharmacol 2012; 141: 989-96.
33. ดวงเดือน เมฆสุริเยนทร์, พรรณี หนูชื้อตรง และธวัชต์ ทรัพย์ศรีทอง. การพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพสำหรับผู้สูงอายุจากสารสกัดสมุนไพรมาตรฐาน: เพชรสังฆาต. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2555.
34. Srisook K, Palachot M, Mongkol N, Srisook E, Sarapusit S. Anti-inflammatory effect of ethyl acetate extract from *Cissus quadrangularis* Linn. may be involved with induction

- of heme oxygenase-1 and suppression of NF-KB activation. J Ethnopharmacol 2011; 133: 1008-14.
35. สุมาลิน ทรัพย์นภาพร, อภิญา เฝ้าจินดา. ฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดเพชรสังฆาต. กรุงเทพฯ: โครงการพิเศษปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล; 1999.
 36. Panthong A, Supraditaporn W, Kanjanapothi D, Taesotikul T, Reutrakul V. Analgesic, anti-inflammatory and venotonic effects of *Cissus quadrangularis* Linn. J Ethnopharmacol 2007; 110: 264-70.
 37. อังคณา หิรัญสาดี, สุพรรณ ภัทรวรรณชัยวัฒน์, รัตติมา จีนาพงษ์, ณัฐฉา จันทร์สุนิชนัย, ศรัณยา ธาราแสง. ยารักษาโรคติดเชื้อจากเพชรสังฆาต. วารสารวิชาการสาธารณสุข 2008; 17 (6): 1578-1588.
 38. Thisayakorn K, Thisayakorn C, Suntornantasart T. Preliminary anti-inflammatory study of *cissus quadrangularis* L. in rats. วารสารไทยเภสัชสาร 2000; 17 (24): 26.
 39. Jainu M, Mohan VK, Shyamala Devi CS. Protective effect of *cissus quadrangularis* on neutrophil mediated tissue injury induced by aspirin in rats. J Ethnopharmacol 2006; 104: 302-305.
 40. สมศักดิ์ นวลแก้ว. แนวทางการตรวจวินิจฉัย และการรักษาโรคด้วยวิธีการทางการแพทย์แผนไทยประยุกต์. กรุงเทพฯ: ดี.เอ.พรินต์; 2555.
 41. ปราณีย์ ขวลิตอำรง, ทองพล ชีวพัฒน์, อัญชลี จุฑะพุทธิ, สดุดี รัตนจรัสโรจน์, สมเกียรติ ปัญญา มัง. พิษกึ่งเรื้อรังของเพชรสังฆาต (*Cissus quadrangularis* Linn.). การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์แห่งชาติ: พันธมิตรร่วมใจกระบวนการทรรศน์ใหม่เพื่อการวิจัยและพัฒนา 2001.
 42. วิธนา จิรัจฉริยากุล, บรรณานิการ. สารฟลาโวนอยด์และสมุนไพร (Flavonoids and Medicinal Plants). นนทบุรี: พีเอส. พรินท์; 2556.
 43. The United States Pharmacopeia. System suitability in <621> Chromatography. USP 37 NF 32. By Authority of the United States Pharmacopeial Convention, Inc. 2014; 1: 301-307.
 44. Valentova K, Vrba J, Bancirova M, Ulrichova J, Kren V. Isoquercitrin: Pharmacology, toxicology, and metabolism. Food Chem Toxicol 2014; 68: 267-282.

45. Manach C, Morand C, Texier O, Favier ML, Agullo G, Demigne C, Regeat F, Remesy C. Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. J Nutr 1995; 125 (7): 1911-22.
46. Manach C, Morand C, Demigné C, Texier O, Regeat F, Remesy C. Bioavailability of rutin and quercetin in rats. FEBS Letters 1997; 409 (1):12–16.
47. Lu Y and Foo LY. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. Food Chem 2000; 68 (1): 81–85.
48. Lee MH, Lin RD, Shen LY, Yang LL, Yen KY, Hou WC. Monoamine oxidase B and free radical scavenging activities of natural flavonoids in *Melastoma candidum* D. Don. J Agric Food Chem 2001; 49 (11): 5551-5555.
49. Khoo NK, White CR, Pozzo-Miller L, Zhou F, Constance C, Inoue T, Patel RP, Parks DA. Dietary flavonoid quercetin stimulates vasorelaxation in aortic vessels. Free Radic Biol Med 2010; 49 (3): 339-47.
50. คู่มือการผลิตและประกันคุณภาพเภสัชตำรับโรงพยาบาลจากสมุนไพร ในบัญชียาหลักแห่งชาติ พุทธศักราช 2555. นนทบุรี: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย 2555.
51. นพมาศ สุนทรเจริญนนท์, อุทัย ไสธนะพันธุ์, ประไพ วงศ์สินคงม่น. ทีแอลซี: วิธีอย่างง่ายในการวิเคราะห์คุณภาพเครื่องยาไทย. กรุงเทพฯ: สถาบันการแพทย์แผนไทย กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก 2551.
52. หลักการวิเคราะห์พฤษเคมีในสมุนไพรด้วยเทคนิคทีแอลซี และทีแอลซีสมรรถนะสูง. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล 2556.
53. แม้น อมรสิทธิ์ และคณะ. หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ. กรุงเทพฯ: ชวนพิมพ์ 50. 2558.
54. Reviewer guidance. Validation of chromatographic method. Center for drug evaluation and research (CDER), US food and drug administration 1994.
55. ICH harmonised tripartite guideline. Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2 (R1) 2006.
56. AOAC guidelines for single laboratory. Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals 2002.

57. Xie P, Chen S, Liang YZ, Wang X, Tian R, Upton R. Chromatographic fingerprint analysis-a rational approach for quality assessment of traditional Chinese herbal medicine. J Chromatogr A 2006; 1112 (1-20): 171–180.
58. Sirikatitham A, Chuchom T, Itharat A. Development of the chromatographic fingerprint analysis of dioscorealides and dioscoreanone from *Dioscorea membranacea* Pierre Songklanakarin J. Sci. Technol 2007; 29 (1): 101-107.
59. Sotanaphun U, Phattanawasin P, Burana-osot J, Srisopon S, Kumar AP, Huang B. Botanical Identification of Kot-chula-lampha in Current Use by Thin-layer Chromtography. Thai Pharm Health Sci J 2013; 8 (1): 1-6.
60. Srisopon S, Burana-osot J, Sotanaphun U. Identification Chan-chamot by Thin-layer Chromtography. Thai Bull Pharm Sci 2016; 11 (1): 47-57.
61. สังคม เตชะวงศ์เสถียร. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาการของพืช. สาขาพืชสวน ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
62. Hossain A and Ishimine. Growth, yield and quality of turmeric (*Curcuma long* L.) cultivated on dark-red soil, gray soil and red soil in Okinawa, Japan. Plant Prod Sci 2005; 8 (4): 482-86.
63. จรรย์ ดิษฐโชติวงศ์, เสี่ยงม แจ่มจำริญ, มัลลิกา แสงเพชร, สัจจะ ประสงค์ทรัพย์, จิตาภา สุภาพล แสงมณี ชิงดวง และคณะ. วิจัยและพัฒนาการผลิตฟ้าทะลายโจรเพื่อเพิ่มผลผลิตและคุณภาพ. ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิจิตร, สถาบันวิจัยพืชสวน, กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์ทางสถิติ งานวิจัยเกษตร กองแผนงานและวิชาการ และสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2553: 180
64. เสริมสกุล พจนการุณ, มัลลิการ์ แสงเพชร, สุกัญญา วงศ์พรชัย. อิทธิพลของระดับความสูงของพื้นที่ปลูกที่มีต่อการเจริญเติบโต การให้ผลผลิตและคุณภาพผลผลิตเหง้ากระชายดำ. รายงานผลงานวิจัยและพัฒนาด้านพืชและเทคโนโลยีการเกษตร. 2551: 249.



ภาคผนวก



ภาคผนวก ก

ตาราง 22 แสดงผลการทดสอบหาความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ isoquercitrin ที่ความเข้มข้น 8 $\mu\text{g/ml}$

injection no.	R T (min)	Peak area	N>2000	Rs>1.5	T $\leq$ 2
1	4.610	240278	9714	-	1.415
2	4.632	239767	9704	-	1.437
3	4.645	240649	9753	-	1.436
4	4.668	240665	9913	-	1.423
5	4.690	241033	9732	-	1.426
6	4.697	239510	9923	-	1.434
Average	4.657	240317	9790	-	1.429
SD	0.03	582.97	100.72	-	0.01
%RSD	0.73	0.24	1.03	-	0.61

ตาราง 23 แสดงผลการทดสอบหาความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ quercitrin ที่ความเข้มข้น 40 $\mu\text{g/ml}$

injection no.	R T (min)	Peak area	N > 2000	Rs > 1.5	T $\leq$ 2
1	5.655	1049066	14430	5.5674	1.282
2	5.685	1044812	14250	5.5816	1.292
3	5.702	1050984	14450	5.5928	1.287
4	5.723	1052511	14473	5.5844	1.270
5	5.753	1052040	14536	5.5811	1.268
6	5.767	1053306	14543	5.63347	1.271
Average	5.71	1050453	14447	5.590	1.278
SD	0.04	3127.94	106.70	0.02	0.01
%RSD	0.74	0.30	0.74	0.41	0.79

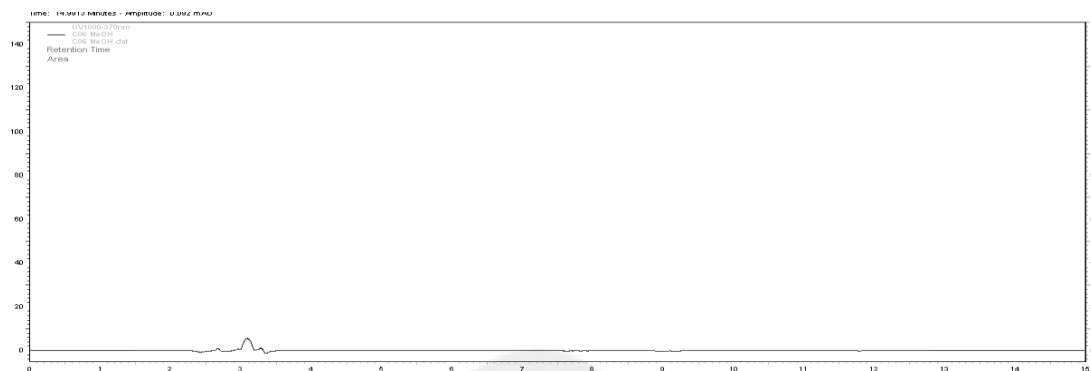
ตาราง 24 แสดงผลการทดสอบหาความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ quercetin ที่ความเข้มข้น 8 µg/ml

injection no.	R T (min)	Peak area	N > 2000	Rs > 1.5	T ≤ 2
1	9.445	532960	25850	17.908	1.091
2	9.495	529900	26115	17.909	1.086
3	9.533	532528	26391	18.054	1.085
4	9.577	530951	26450	18.098	1.083
5	9.59	535662	26565	18.003	1.084
6	9.597	533790	26802	17.992	1.083
Average	9.540	532632	26362	17.99	1.09
SD	0.06	2197.74	289.14	0.09	0.0
%RSD	0.63	0.41	1.10	0.48	0.30

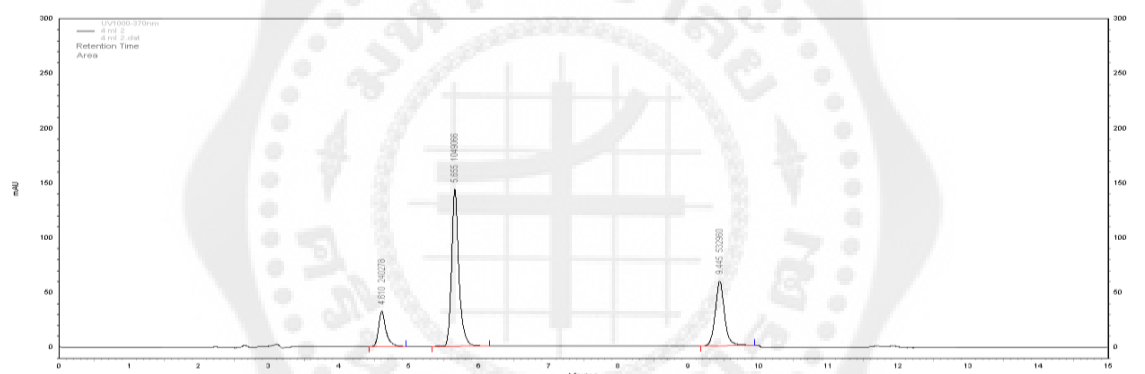


ภาคผนวก ข

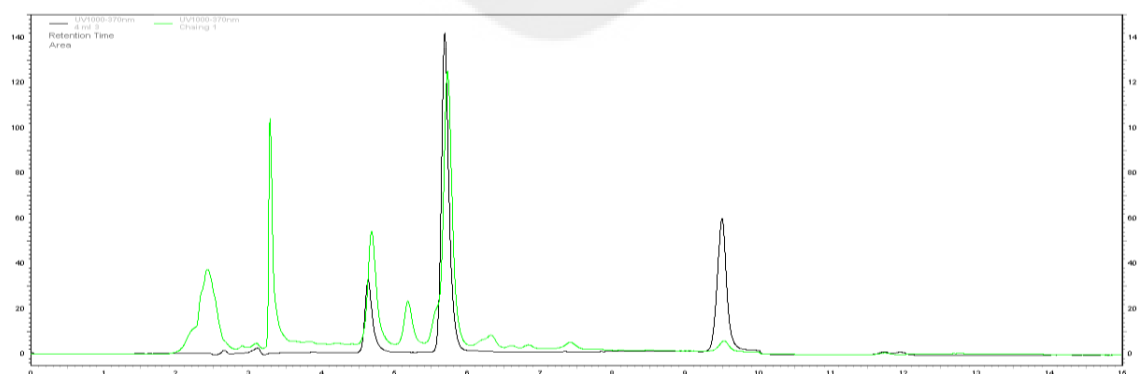
ผลการศึกษาลักษณะทางโครมาโทแกรมในตัวอย่างสมุนไพรสังฆาต 18 ตัวอย่าง และศึกษาปริมาณสาร quercetin isoquercitrin และ quercitrin ด้วยเทคนิค HPLC



ภาพประกอบ 19 Chromatographic fingerprint ของตัวทำละลาย methanol ที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตร

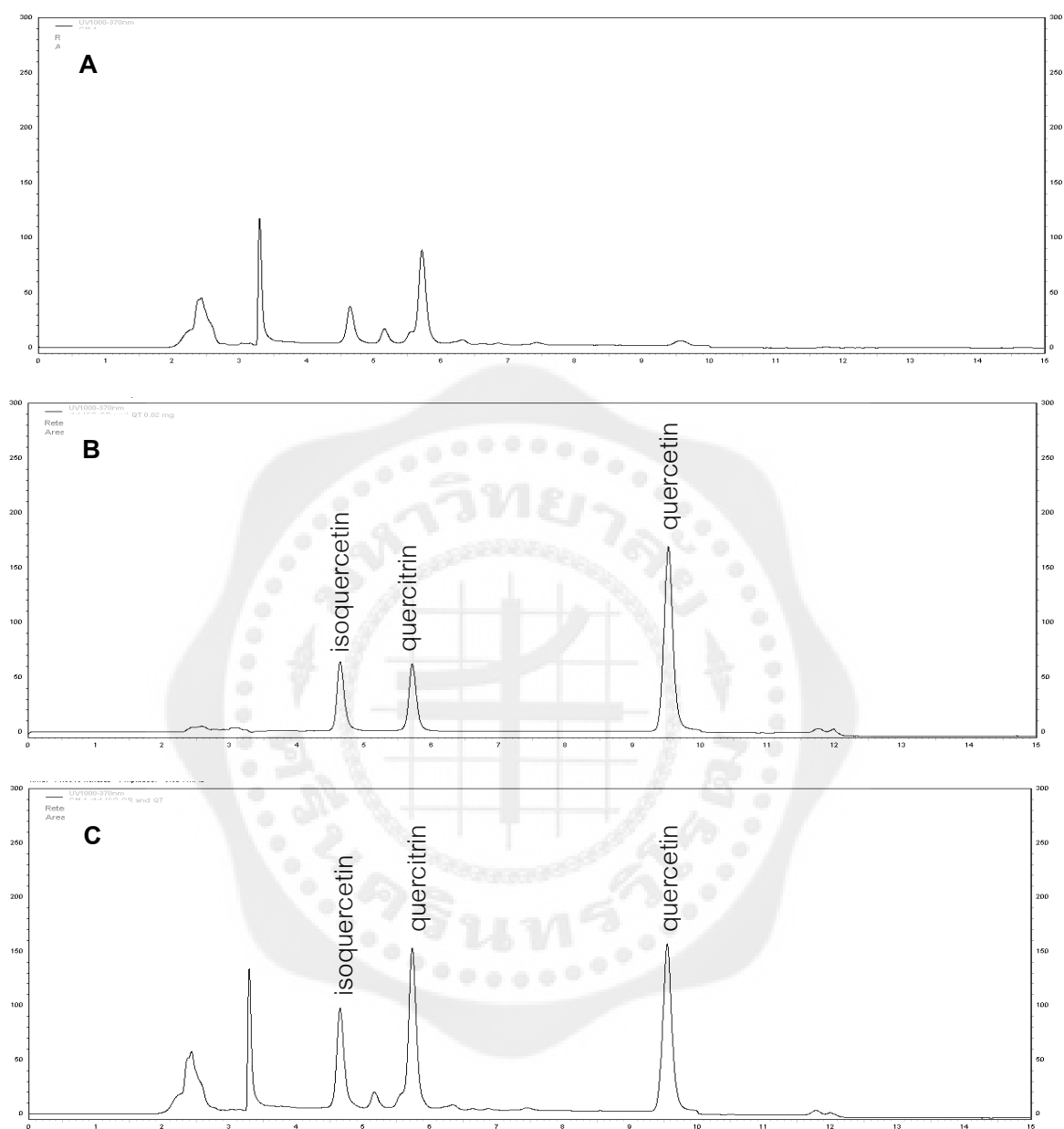


ภาพประกอบ 20 Chromatographic fingerprint ของสารมาตรฐาน isoquercetin, quercitrin และ quercetin ตามลำดับ ที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตร

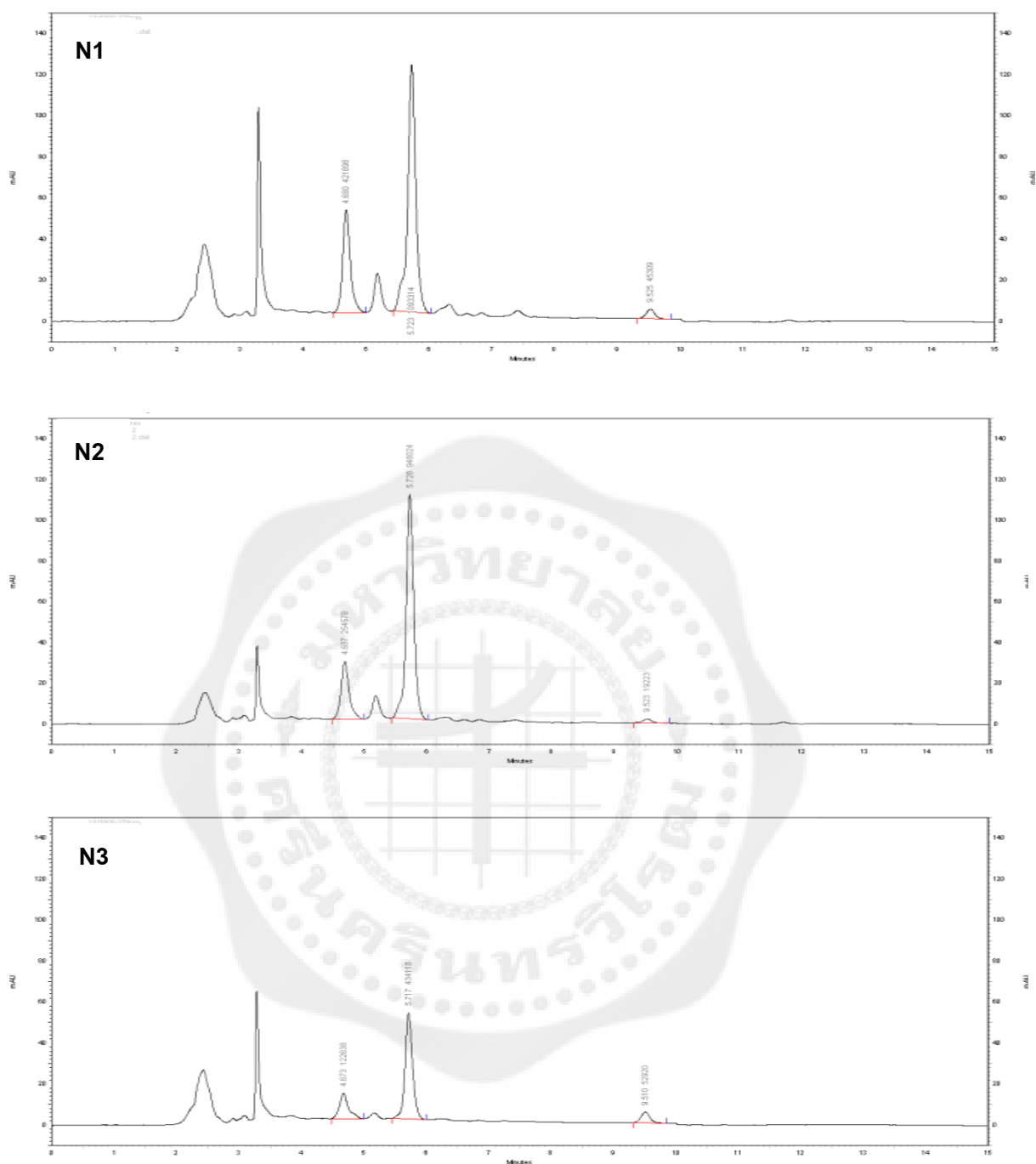


ภาพประกอบ 21 แสดงลักษณะ Chromatographic fingerprint ของสารมาตรฐาน (-) isoquercetin, quercitrin และ quercetin ตามลำดับ และ (-) ตัวอย่างพืชสังฆาตจากจังหวัดเชียงใหม่ 1

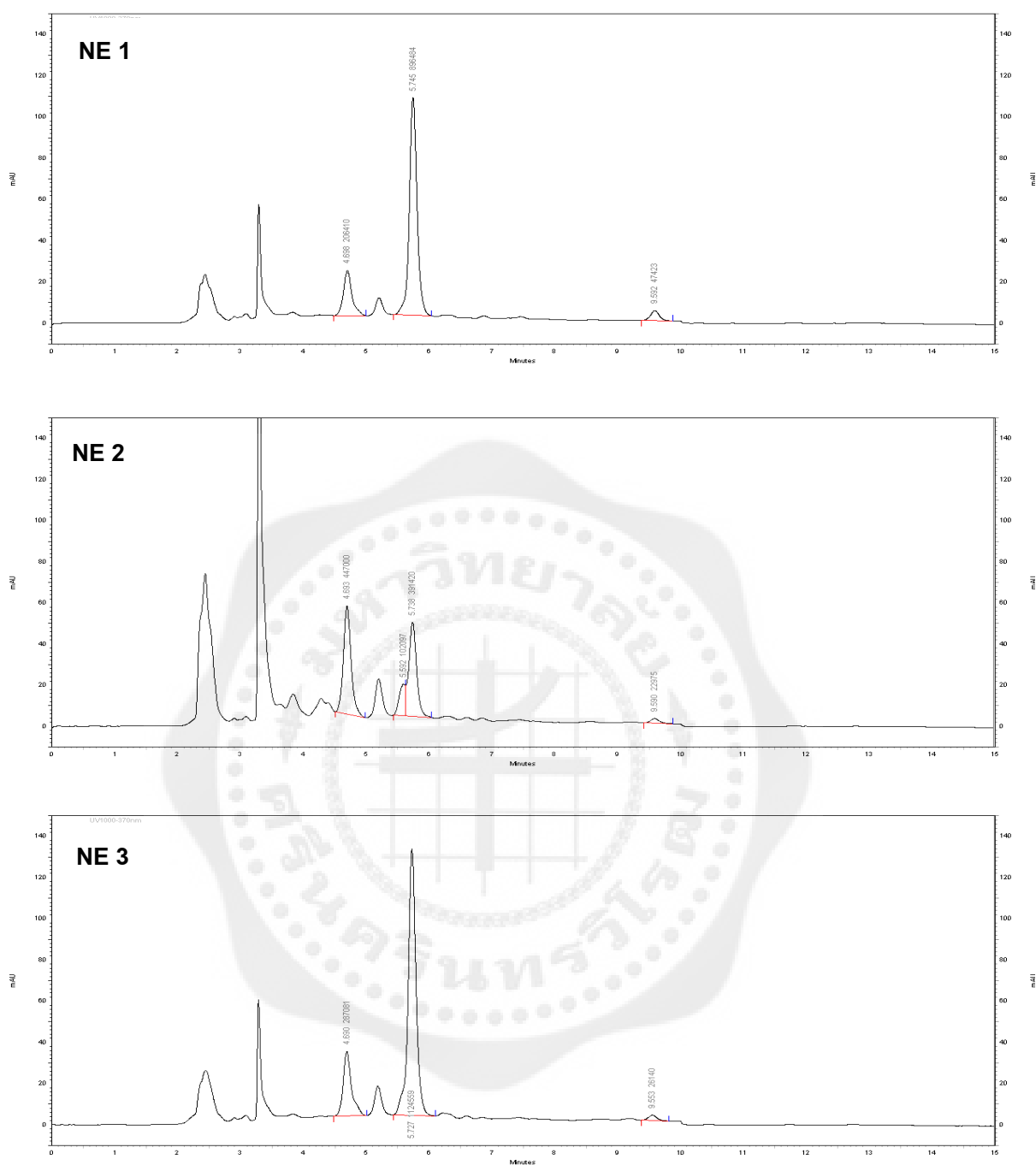
ผลการตรวจสอบความถูกต้องด้วยวิธีการเติมสารมาตรฐาน (Spike) ลงในตัวอย่างสารละลาย เพชรสังฆาตที่ดองกาวิเคราะห์



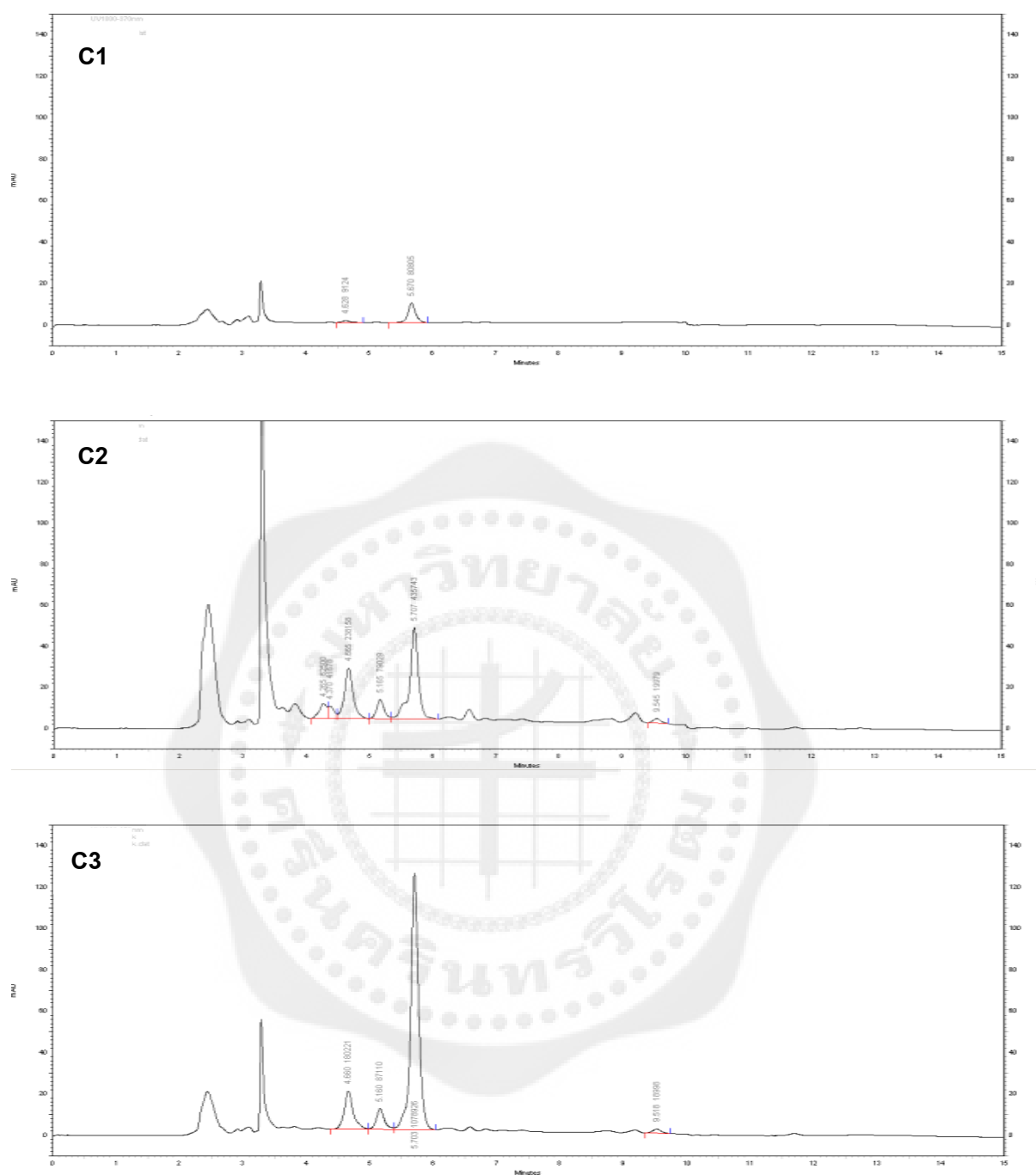
ภาพประกอบ 22 แสดงลักษณะ Chromatographic fingerprint ของ (A) ตัวอย่างเพชรสังฆาตจาก เชียงใหม่ 1 ที่ความเข้มข้น 5 mg/ml (B) สารมาตรฐานผสม isoquercetin, quercitrin และ quercetin ที่ความเข้มข้น 0.02 mg/ml และ (C) ตัวอย่างเพชรสังฆาต (5mg/ml) ที่เติม สารละลายมาตรฐานผสม (0.02 mg/ml)



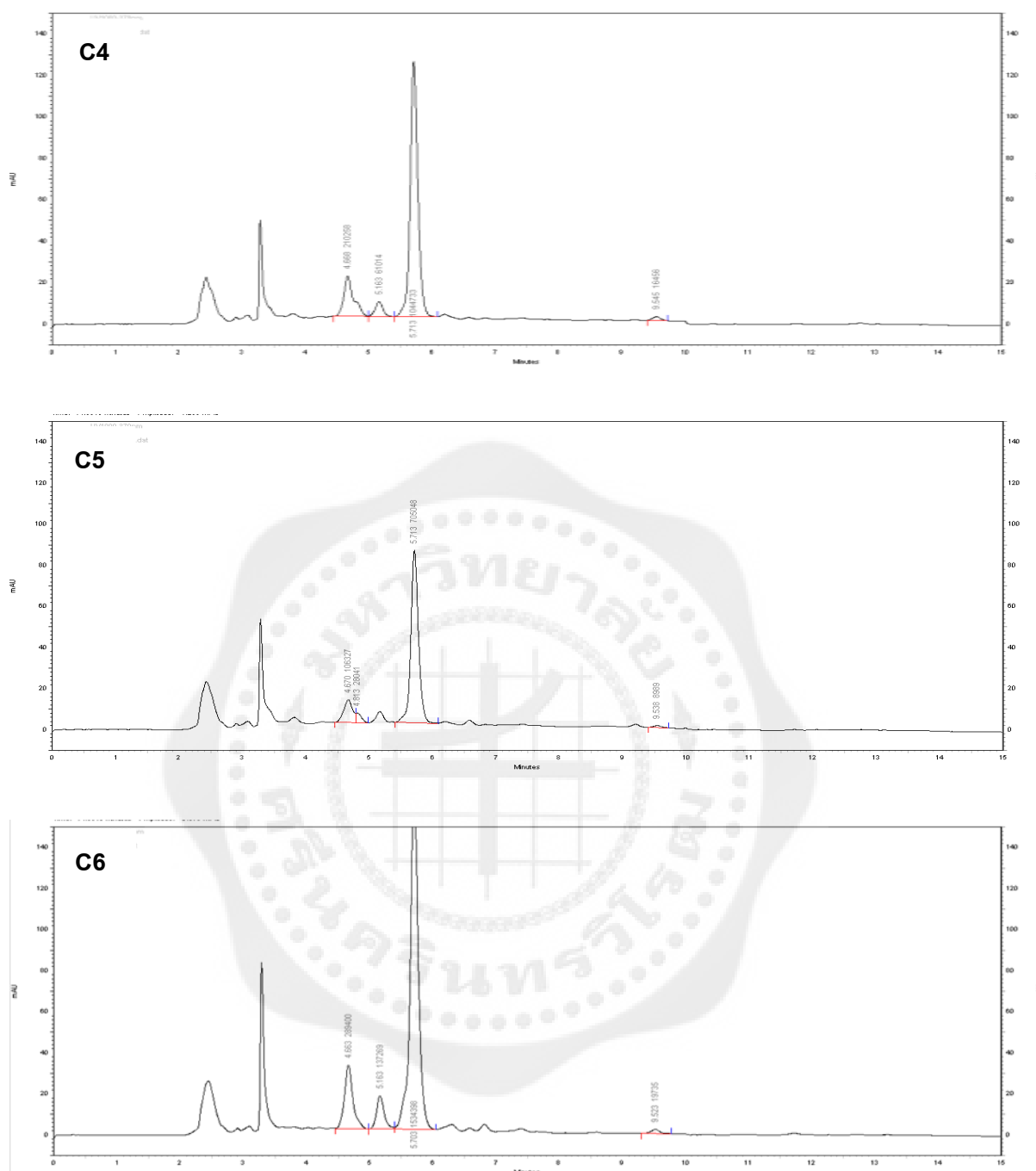
ภาพประกอบ 23 Chromatographic fingerprint ของตัวอย่างเพชรสังฆาตจากภาคเหนือ (N1) เชียงใหม่ 1 (N2) เชียงใหม่ 2 และ (N3) ลำปาง



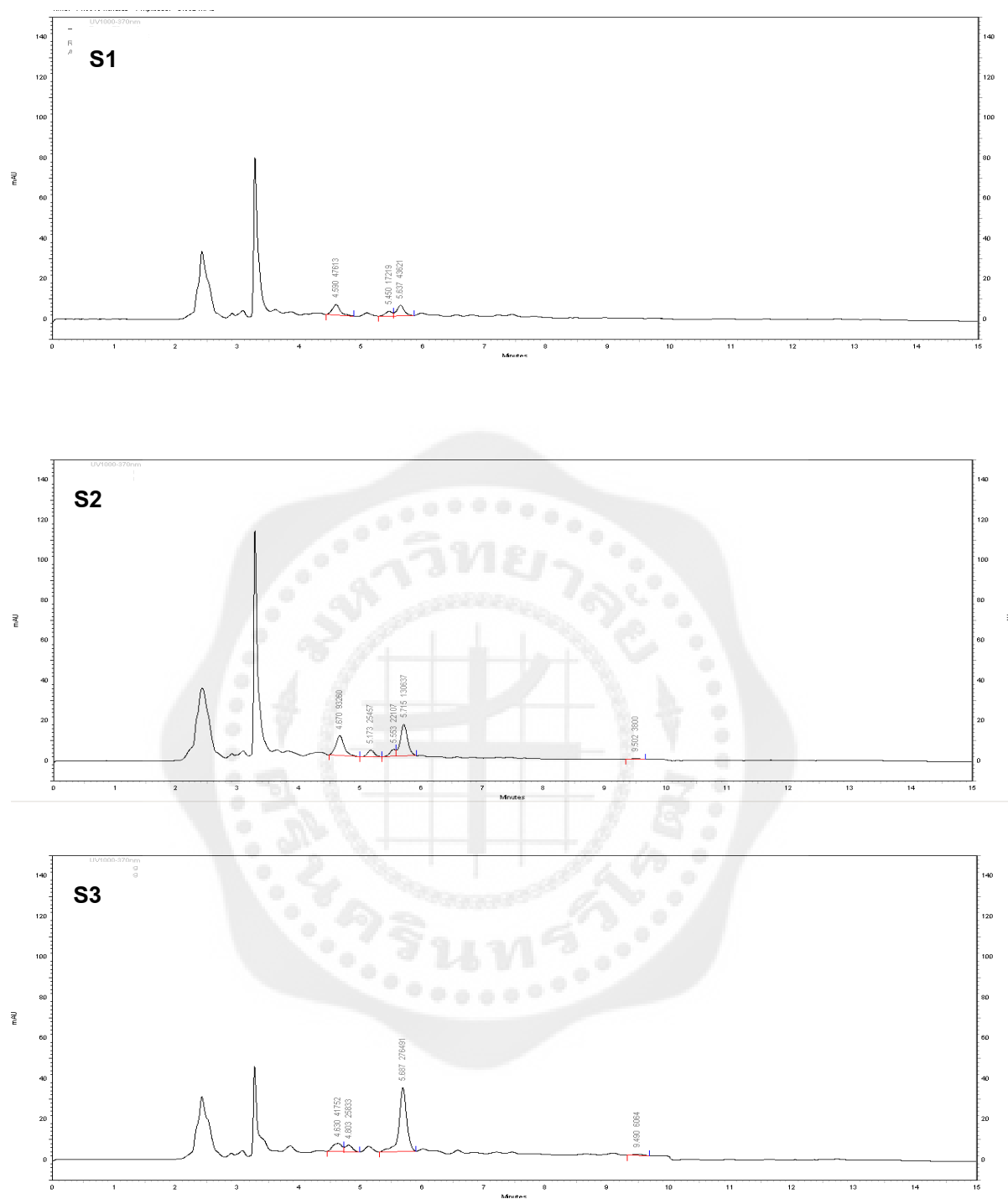
ภาพประกอบ 24 Chromatographic fingerprint ของตัวอย่างเพชรสังฆาตจากภาค ตะวันออกเฉียงเหนือ (NE1) ขอนแก่น (NE2) บุรีรัมย์ และ (NE3) อุบลราชธานี



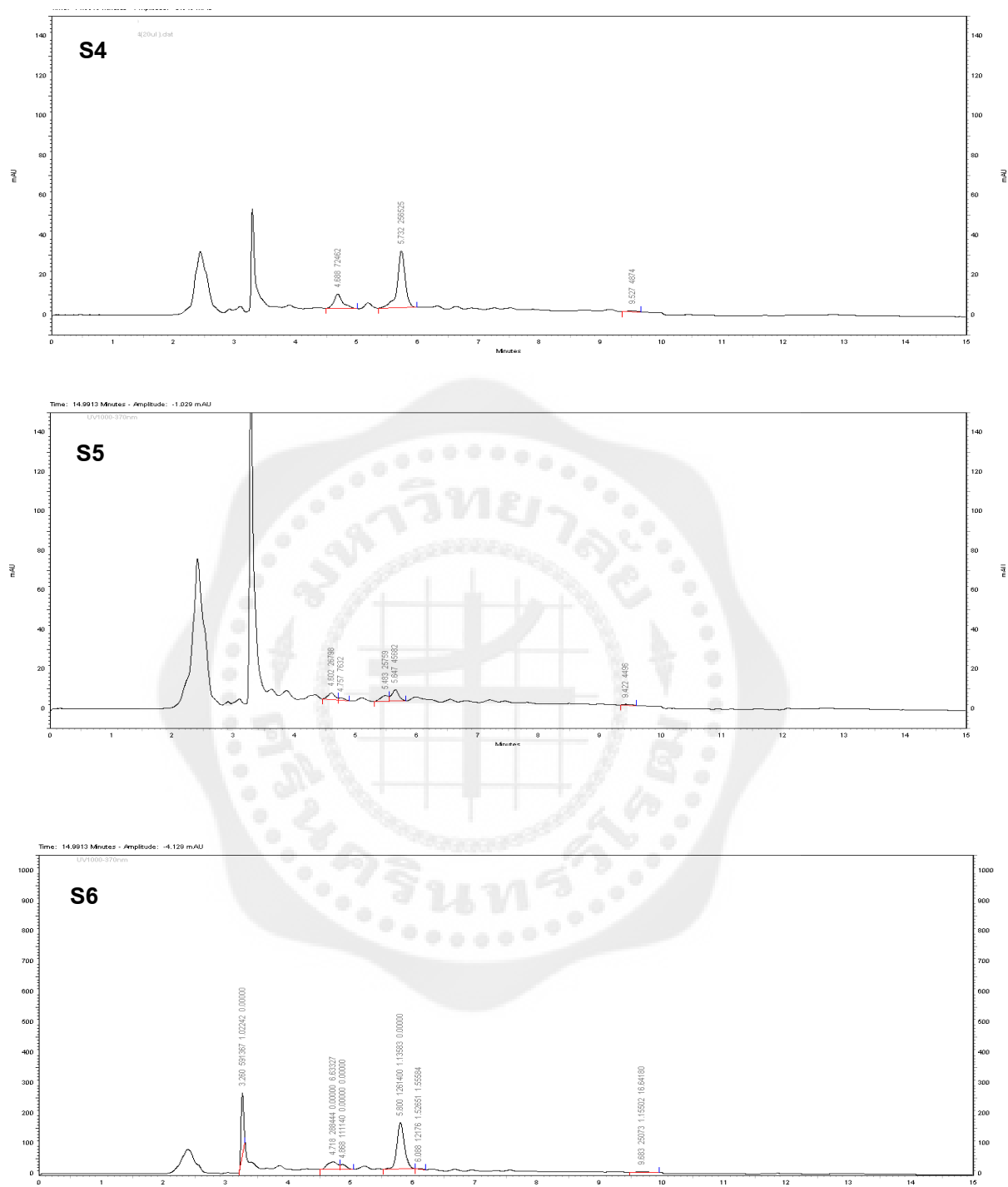
ภาพประกอบ 25 Chromatographic fingerprint ของตัวอย่างเพชรสังฆาตจากภาคกลาง (C1) กรุงเทพมหานคร (C2) กาญจนบุรี และ (C3) นครนายก



ภาพประกอบ 25 Chromatographic fingerprint ของตัวอย่างเพชรสังฆาตจากภาคกลาง (C4) ปทุมธานี (C5) เพชรบุรี และ (C6) สิงห์บุรี (ต่อ)



ภาพประกอบ 26 Chromatographic fingerprint ของตัวอย่างเพชรสังฆาตจากภาคใต้ (S1) ตรัง (S2) ปัตตานี และ (S3) พัทลุง



ภาพประกอบ 26 แสดงลักษณะ Chromatographic fingerprint ของตัวอย่างเพชรสังฆาตจากภาคใต้

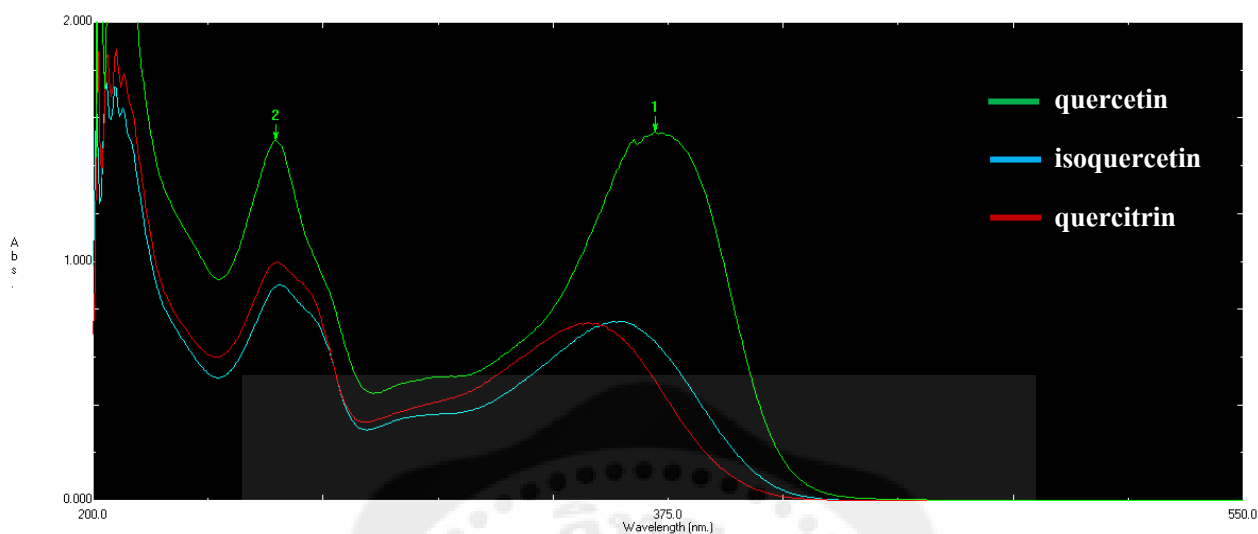
(S4) สุราษฎร์ธานี 1 (S5) สุราษฎร์ธานี 2 และ (S6) สงขลา (ต่อ)



ภาคผนวก ค

การวัดค่าการดูดกลืนแสง ของ quercetin isoquercetin และ quercitrin ด้วยเครื่อง UV - visible spectrophotometer

Model: UV-1601



ภาพประกอบ 27 อัลตราไวโอเลตวิสิเบิลสเปกตรัมของ quercetin isoquercetin และ quercitrin ในตัวทำละลาย methanol

ตาราง 25 แสดงค่าดูดกลืนแสงของสาร quercetin isoquercetin และ quercitrin (0.02 mg/ml)

ชื่อสาร	$\lambda_{\max}$	Abs
Quercetin	371.00	1.5383
	255.50	1.5043
Isoquercetin	358.50	0.7402
	256.50	0.9008
Quercitrin	350.50	0.7424
	256.00	0.9967



ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ สกุล	นางสาวกรรณิกา เพือกหนู
วัน เดือน ปี ที่เกิด	26 เมษายน 2532
สถานที่เกิด	อำเภอชะบ้าย้อย จังหวัดสงขลา
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	14/1 หมู่ 1 ตำบลคูหา อำเภอชะบ้าย้อย จังหวัดสงขลา
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2550	ชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6 จากโรงเรียนชะบ้าย้อยวิทยา จังหวัดสงขลา
พ.ศ. 2555	ปริญญาตรี การแพทย์แผนไทยประยุกต์บัณฑิต (การแพทย์แผนไทยประยุกต์). จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี
พ.ศ. 2560	ปริญญาโท วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วท.ม.) วิทยาการเภสัชภัณฑ์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ