

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ Piperine ในตำรับยาสมุนไพรไทยรักษาโรคเกาต์โดย เอชพีแอลซี

Analytical Method Development of Piperine in Thai Herbal Remedy for Gout Treatment by HPLC

เสาวภาคัย วชิรวงศ์กวิน ^{1*} สุชาดา จรุงเรืองโชค ¹ ลักษณา เจริญใจ ¹ ยุพาภรณ์ ลำเกาพันธ์ ² และ สุรพจน์ วงศ์ใหญ่ ²

¹ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ถนนพหลโยธิน ตำบลหลักหก อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี 12000

² คณะแพทยแผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต ถนนพหลโยธิน ตำบลหลักหก อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี 12000

E-mail: svchirawkw@gmail.com

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้พัฒนาวิธีวิเคราะห์โดยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิกวิด โครมาโทกราฟี (เอช พี แอล ซี) เพื่อควบคุมคุณภาพตำรับยาสมุนไพรไทยรักษาโรคเกาต์ ที่ประกอบด้วยสมุนไพร 12 ชนิด และพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณสารไพเพอรีน ในตำรับยาสมุนไพรไทยรักษาโรคเกาต์ เฟสเคลื่อนที่สำหรับการหาปริมาณสารไพเพอรีนประกอบด้วยร้อยละ 0.1 โดยปริมาตรต่อปริมาตรของกรดไตรฟลูออโรอะซิติกในน้ำ (A) และอะซิโตนไนล์ (B) ใช้ระบบ gradient โดยมี 100%A ในเวลา 0-20 นาที 90%A ในเวลา 21-30 นาที 70%A ในเวลา 31-70 นาที 60%A ในเวลา 71-100 นาที 40%A ในเวลา 101-110 0%A ในเวลา 111-125 นาที และตรวจวัดด้วย UV 280 nm พบปริมาณสาร piperine 0.54 มิลลิกรัมต่อกรัมของผงยาสมุนไพร กราฟมาตรฐานมีความเป็นเส้นตรงดังสมการคือ $y = 36876263.84x - 484899.34$ ค่าสัมประสิทธิ์ของการหาปริมาณสาร (r^2) เท่ากับ 0.9932 เมื่อ x คือปริมาณไพเพอรีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และ y คือพื้นที่พีค โดยค่าความเที่ยงตรงอยู่ในช่วงร้อยละ 2.04-2.79 การศึกษาความถูกต้องที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 80, 100 และ 120 ของสารมาตรฐานไพเพอรีนที่เติมลงในตำรับยา ได้ร้อยละของการกลับคืนอยู่ในช่วงร้อยละ 100.01-102.04 แสดงว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความถูกต้องและความเที่ยงตรง ค่าขีดจำกัดของการตรวจวัดและขีดจำกัดของการหาปริมาณเป็น 0.02 และ 0.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

คำสำคัญ: ไพเพอรีน สารบ่งคุณภาพ ตำรับยาสมุนไพรไทยรักษาโรคเกาต์

Abstract

This research developed high performance liquid chromatography (HPLC) analytical method for quality control of Thai herbal remedy for gout treatment containing 12 kinds of herbs and analytical method for the determination of piperine in Thai herbal remedy for gout treatment. The mobile phase for the determination of piperine consisted of 0.1% v/v of trifluoroacetic acid in water (A) and acetonitrile (B) with the gradient system of 100%(A) in 0-20 min, 90%(A) in 21-30 min, 70%(A) in 31-70 min, 60%(A) in 71-100 min, 40%(A) in 101-110 min

and 0%(A) in 111-125 min. Piperine was detected using the UV detector at 280 nm. Piperine was found with the amount of 0.54 mg/g of dry powder. The calibration graph was linear with an equation, $y = 36876263.84x - 484899.34$ with the coefficient of determination (r^2) of 0.9932, when x is concentration of piperine (mg/ml) and y is peak area. The percentage of relative standard deviation was in the range of 2.04-2.79. Accuracy of 80, 100 and 120% of spiked standard piperine in the herbal remedy were determined. The percentage of recovery was in the range of 100.01-102.04. The developed method was validated for accuracy and precision. Limit of detection and limit of quantification was 0.02 and 0.13 mg/ml, respectively.

Keywords: piperine, marker, Thai herbal remedy for gout treatment

1. บทนำ

โรคเกาต์เป็นโรคข้ออักเสบชนิดหนึ่ง สาเหตุของโรคเกาต์เกิดจากกระบวนการใช้และขับถ่ายสารพวกพิวรีนของร่างกายผิดปกติ อาการของโรคเกาต์ คือ มีอาการปวด บวม แดง ร้อนตามข้อ และเจ็บ อาจรุนแรงจนถึงกับเดินไม่ได้ (Jordan, 2007) นอกจากอาการปวดตามข้อแล้วอาจมีอาการของนิ่วในทางเดินปัสสาวะร่วมด้วย (อุทิศ ศิสมโชค และ ประภัทร โสคติโสภาก, 2554)

การใช้สมุนไพรในการรักษาโรคมีมานาน ไม่ว่าจะเป็นการใช้สมุนไพรเดี่ยวหรือในรูปตำรับยา โรคเกาต์เป็นอีกโรคหนึ่งซึ่งคนนิยมรักษาโดยใช้ยาสมุนไพร แม้ว่าจะมีการใช้ในปัจจุบันแต่ยังขาดการยอมรับเชิงวิชาการ สาเหตุเกิดจาก ขาดข้อมูลการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ที่สนับสนุนยาสมุนไพรไทยให้ได้รับการยอมรับในคุณภาพ จึงเป็นเหตุผลสำคัญว่าเหตุใดจึงต้องมีการควบคุมคุณภาพสมุนไพรตามหลักการประเมินคุณภาพยาสมุนไพรขององค์การอนามัยโลก โดยองค์การอนามัยโลกได้กำหนดแนวทางในการประเมินยาสมุนไพรอยู่ 3 ด้าน คือ การประเมินคุณภาพ การประเมินความปลอดภัย และการประเมินประสิทธิผล (WHO, 1998 และ WHO, 2000)

ตำรับยาสมุนไพรไทยประกอบด้วยพืชหลายชนิดและองค์ประกอบทางเคมีมากมาย เช่น ตำรับยาสมุนไพรไทยรักษาโรคเกาต์มีส่วนประกอบของพืช 12 ชนิด คือ เทียนดำ พริกไท มะตูม ชุมเห็ดเทศ สิริยะยัง กระเทียม ทองพันชั่ง ขันทองพยาบาท ส้มกุ้งน้อย ส้มกุ้งใหญ่ ข้าวเย็นเหนือ และข้าวเย็นใต้ (หลักศิลาจารึกวัดโพธิ์, 2375) พืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาใช้แก้ อาการปวดเมื่อย เช่น ชุมเห็ดเทศ เทียนดำ และพริกไท เป็นต้น (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข, 2556) ดังนั้น การควบคุมคุณภาพยาจากสมุนไพร การพิสูจน์เอกลักษณ์ และหาปริมาณตัวยาสำคัญในตำรับยาสมุนไพรไทยจึงทำได้ยากและใช้เวลานาน

การหาสารบ่งคุณภาพ (marker) (European Medicines Agency, 2008) โดยวิธีวิเคราะห์ทางโครมาโทกราฟีในตำรับยาสมุนไพรเป็นสิ่งจำเป็นในการควบคุมคุณภาพตำรับยาสมุนไพร การวิเคราะห์เชิงปริมาณจะใช้สารบ่งคุณภาพที่เลือกจากสารเคมีที่เป็นส่วนประกอบของสมุนไพรในตำรับยานั้น ๆ เป็นตัวบ่งชี้คุณภาพของตำรับยา สำหรับการควบคุมคุณภาพประกอบด้วยการวิเคราะห์หาปริมาณของสารบ่ง

คุณภาพและใช้สารนี้เป็นตัวหลักในการเปรียบเทียบกับส่วนประกอบอื่น ๆ ในตำรับยา สำหรับคุณสมบัติที่ดีของสารบ่งคุณภาพ คือ ต้องทราบสูตรโครงสร้างทางเคมีที่แน่นอนซึ่งอาจมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหรือไม่ก็ได้ หรือมีความสัมพันธ์กับสรรพคุณของตำรับยา เป็นเอกลักษณ์ของตำรับยานั้น ๆ และสามารถหาสารมาตรฐานได้ง่าย มีการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารบ่งคุณภาพในตำรับยาสมุนไพรร (ยพารณีย์ ลำเกาพันธ์ และคณะ, 2554) โดยใช้เทคนิคต่างๆ ทางโครมาโทกราฟี อาทิ chromatographic profiles (Li et al, 2008) เช่น UV spectrophotometry และ high performance liquid chromatography (HPLC) (Wood et al, 1988), high performance thin layer chromatography (HPTLC) (Hamrapurkar et al, 2011), liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) (Wang et al, 2012) เป็นต้น

2. วัตถุประสงค์

1. หาสารบ่งคุณภาพของตำรับยาสมุนไพรร (ยพารณีย์ ลำเกาพันธ์ และคณะ, 2554) ที่มีส่วนประกอบของพืช 12 ชนิด คือ เทียนดำ พริกไทย มะตูม ชุมเห็ดเทศ ศิรชะยั้ง กระเทียม ทองพันชั่ง ขันทองพยาบาท ส้มกุ่มน้อย ส้มกุ่มใหญ่ ข้าวเย็นเหนือ และข้าวเย็นใต้
2. ทำลายพิมพ์โครมาโทแกรมของพืชในตำรับยาสมุนไพรร (ยพารณีย์ ลำเกาพันธ์ และคณะ, 2554) เพื่อการควบคุมคุณภาพ
3. พัฒนาวิธีการวิเคราะห์เชิงปริมาณสาร piperine ในตำรับยาสมุนไพรร (ยพารณีย์ ลำเกาพันธ์ และคณะ, 2554) โดยวิธี HPLC และทำ method validation

3. อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 ตัวอย่าง

สารตัวอย่างประกอบด้วยตำรับยาสมุนไพรร (ยพารณีย์ ลำเกาพันธ์ และคณะ, 2554) 12 ชนิด คือ เทียนดำ (*Nigella sativa*) พริกไทย (*Piper nigrum*) มะตูม (*Siphonodon celastrineus*) ชุมเห็ดเทศ (*Cassia alata*) ศิรชะยั้ง (*Smilax peguana*) กระเทียม (*Allium sativum* L.) ทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus*) ขันทองพยาบาท (*Gelonium multiflorum*) ส้มกุ่มน้อย (*Embelia ribes*) ส้มกุ่มใหญ่ (*Begonia inflata*) ข้าวเย็นเหนือ (*Smilax corbularia*) และข้าวเย็นใต้ (*Smilax glabra*) จากร้านยาสมุนไพรร (ยพารณีย์ ลำเกาพันธ์ และคณะ, 2554)

3.2 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ประกอบด้วย สารมาตรฐาน piperine (Sigma, USA), methanol (liquid chromatography grade, Merck, Germany), acetonitrile (HPLC grade, J.T. Baker, USA), trifluoroacetic acid (Sigma-Aldrich, USA), น้ำ (HPLC grade, B&J chemicals, Australia) และ acetic acid (analytical grade, Sigma, USA)

3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ high performance liquid chromatography ร่วมกับ UV system ประกอบด้วย Spectra System P2000 Pump, Spectra System AS3000 Autosample, Spectra System UV1000 Detector, ChromQuest[®] Chromatography

Workstation (Thermo Separation, USA) และอุปกรณ์ที่ใช้คือ HPLC column ชนิด BDS Hypersil C18 (100 Å, 5 µm particle size, 4.6 × 150 mm) ของบริษัท Thermo Scientific, USA และแผ่นกรอง cellulose acetate ของ Sartorius, Germany

3.4 การทำลายพื้โครมาโตแกรม

เตรียมตัวอย่างโดยชั่งผงยาจากตำรับ 25 กรัม ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml เติม 50% methanol ลงไป 60 ml นำไป sonicate เป็นเวลา 90 นาที แล้วปรับปริมาตรด้วย 50% methanol ผสมให้เข้ากัน จากนั้นกรองผ่านกระดาษกรอง เบอร์ 1 แล้วจึงนำสารละลายที่ได้ กรองผ่านแผ่นกรอง 0.2 µm นำสารละลายที่กรองได้มาทำการฉีด 20 µl เข้าเครื่อง HPLC ทำการปรับสภาวะการทดลองเพื่อให้เหมาะสมกับการแยกสารในตำรับยาสมุนไพรไทยรักษาโรคเกาต์ และพืชสมุนไพรแต่ละชนิดในตำรับซึ่งมีทั้งหมด 12 ชนิด โดยใช้ mobile phase คือ water และ acetonitrile

3.5 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารไพเพอรินในตำรับยาสมุนไพรโดยวิธี LC-MS

ระบบ LC (Dionex, USA) ใช้ column เป็น Acclaim[®] 120 C18 (3µm, 120Å, 2.1 x 150 mm.), Dionex Bonded Silica Products Lot.No. 018-01-128 ระบบ gradient ระหว่าง 0.1% formic acid (A) และ acetonitrile (B) โดย 0-60 นาที ร้อยละของ (B) เป็น 40-65 และ 60.1-65.1 นาที ร้อยละของ (B) เป็น 98-40 มีอัตราการไหลเป็น 0.3 ml/min การตรวจวัดโดยวิธี mass spectrometry (Quadrupole Ion Trap Mass

spectrometry; Bruker, Germany) รุ่น amazon SL แบบ positive ion mode อัตราการไหลของ dry gas เป็น 7 l/min และ nebulizer gas เป็น 5 l/min ที่อุณหภูมิ dry temperature 200°C

3.6 การหาปริมาณสารไพเพอรินในตำรับยาสมุนไพร

นำสารละลายตัวอย่างมาทำการฉีด 20 µl ใช้ mobile phase เป็น 0.1% trifluoroacetic acid ใน water (A) และ acetonitrile (B) (ระบบ gradient system เป็น 100%A ในเวลา 0-20 นาที 90%A ในเวลา 21-30 นาที 70%A ในเวลา 31-70 นาที 60%A ในเวลา 71-100 นาที 40%A ในเวลา 101-110 และ 0%A ในเวลา 111-125 นาที) อัตราการไหล 1 ml/min ตรวจวัดการดูดกลืนแสง ที่ 280 nm

3.7 การทำ method validation

3.7.1 การศึกษาความเป็นเส้นตรงโดยทำกราฟมาตรฐาน (calibration graph)

เตรียมสารละลายมาตรฐาน piperine ให้ได้ความเข้มข้น 0.8 0.4 0.2 0.1 0.05 และ 0.025 mg/ml ตามลำดับและทำการฉีด 20 µl นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟเส้นตรงโดยให้แกน x เป็นค่าความเข้มข้น และแกน y เป็นค่า peak area

3.7.2 การศึกษาความเที่ยงตรง (precision)

ความเที่ยงตรงภายในวันเดียวกัน (intraday precision) เตรียมสารละลายตัวอย่างตามวิธีจำนวน 6 ตัวอย่าง และนำสารละลายตัวอย่างมาฉีด 20 µl เข้าเครื่อง HPLC ตัวอย่างละ 3 ครั้ง ความเที่ยงประเมินโดยคำนวณจากค่าเปอร์เซ็นต์ relative standard deviation (%RSD) นำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณหาค่า %RSD

ความเที่ยงตรงต่างวันกัน (interday precision) เปรียบตัวอย่างของตำรับยาเช่นเดียวกับ intraday precision โดยทำการวิเคราะห์วันละ 1 ตัวอย่าง ติดต่อกัน 6 วัน นำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณหาค่า % RSD

3.7.3 การศึกษาความถูกต้อง (accuracy)

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน piperine เติมน้ำให้ได้ความเข้มข้น 0.22, 0.28 และ 0.33 mg/ml

การ spiked นำสารละลายมาตรฐานในแต่ละความเข้มข้นมา 500 μ l ผสมกับสารละลายตัวอย่าง 500 μ l ผสมให้เข้ากันและทำการฉีดความเข้มข้นละ 20 μ l จำนวน 3 ครั้ง

การคำนวณ % recovery

$$= \frac{(\text{Found Amount} - \text{Original Amount}) \times 100}{\text{Spiked Amount}}$$

3.7.4 การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection; LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation; LOQ) (Shabir, 2003 และ Emea, 2006)

จากสมการเส้นตรง ที่ได้จากการสร้างกราฟมาตรฐาน คำนวณหาค่า LOD และ LOQ ตามสูตรดังนี้

$$LOD = \frac{3.3SD}{S}, LOQ = \frac{10SD}{S}$$

โดย SD คือ จุดตัดบนแกน y (y-intercept)

S คือ slope ของ calibration curve

4. ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การทำลายพิกโครมาโตแกรม

ทำการปรับสภาวะการทดลองให้เหมาะสมกับตำรับยาสมุนไพรไทยรักษาโรคเกาต์และพืชสมุนไพรแต่ละชนิดในตำรับซึ่งมีทั้งหมด 12 ชนิด ได้สภาวะที่เหมาะสมในการทำลายพิกโครมาโตแกรมของตำรับยาสมุนไพรไทยรักษาโรคเกาต์และพืชสมุนไพร ที่เป็น

ส่วนประกอบของตำรับ 10 ชนิด ดังนี้ mobile phase คือ water(A):acetonitrile(B) ใช้ระบบ gradient โดย 0-10 นาที เป็น 100%(A) 20-30 นาที เป็น 80-60%(A) 40-50 นาที เป็น 40-20%(A) และ 60-70 นาที เป็น 0%(A) อัตราการไหล 1 ml/min และตรวจวัดโดย UV 254 nm เพราะสารหลายชนิดสามารถดูดกลืนแสงได้ดี เมื่อได้ลายพิมพ์โครมาโตแกรมของพืชสมุนไพรแต่ละชนิดในตำรับ ให้ความสนใจเฉพาะพีคที่มีความสูงมากที่สุดดังแสดงในตารางที่ 1 เพื่อใช้เป็นสารบ่งคุณภาพของตำรับ

ตารางที่ 1 เวลาที่พบพีคสูงสุดของพืชแต่ละชนิดในตำรับยาสมุนไพรไทยรักษาโรคเกาต์

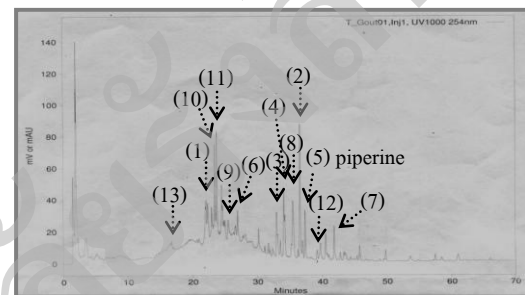
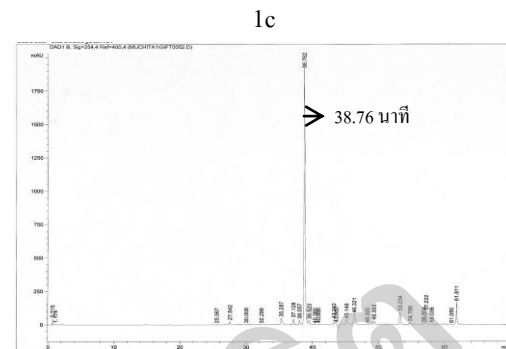
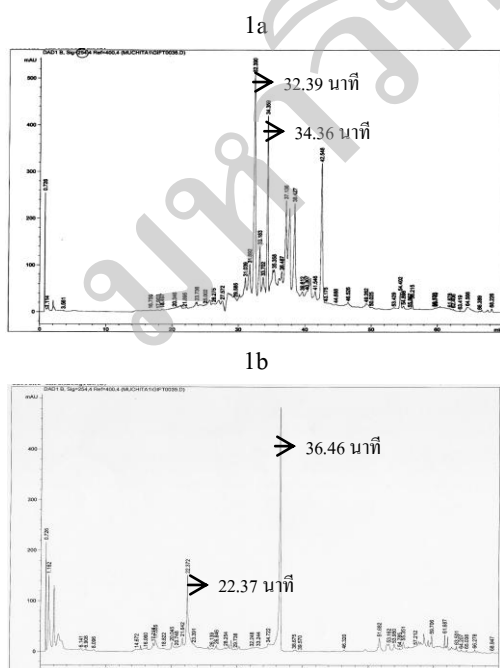
สมุนไพร	เวลาที่พบพีคสูงสุด (นาที)
เทียนคำ	(1) 22.37 และ (2) 36.46
ชุมเห็ดเทศ	(3) 32.39 และ (4) 34.36
พริกไทย (piperine)	(5) 38.76
ทองพันชั่ง	(6) 27.45 และ (7) 42.82
ศิระชัย	(8) 35.14
กระเทียม	(9) 25.97
ข้าวเย็นเหนือ	(10) 24.22
ข้าวเย็นใต้	(11) 24.40
ชันทองพญาบาท	(12) 39.16
มะดูก	(13) 16.74
ส้มกุ้งน้อย	ไม่พบ*
ส้มกุ้งใหญ่	ไม่พบ*

หมายเหตุ * เนื่องจากสภาวะในการแยกไม่เหมาะสม

จากผลการศึกษาลายพิมพ์โครมาโตแกรมของตำรับสมุนไพรไทยรักษาโรคเกาต์ พบว่าสารบ่งคุณภาพของตำรับที่สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์และระบุได้ คือ สาร piperine ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในพริกไทย มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในการแก้ปวดลดการอักเสบ (Salam et al, 2007) และรักษาอาการไขข้ออักเสบ (Bang et al, 2009)

เมื่อเปรียบเทียบโครมาโตแกรมของพืชสมุนไพรแต่ละชนิดในตำรับกับโครมาโตแกรมของ

ตำรับสมุนไพรรักษาโรคเกาต์ พบพิกสูงสุดของพืชสมุนไพรแต่ละชนิดในตำรับ ดังนี้ พิก (1) และ (2) เป็นของเทียนคำ ที่เวลา 22.37 และ 36.48 นาที ตามลำดับ พิก (3) และ (4) เป็นของขุมเห็ดเทศ ที่เวลา 32.39 และ 34.36 นาที ตามลำดับ พิก (5) เป็นสาร piperine ในพริกไทยที่เวลา 38.76 นาที พิก (6) และ (7) เป็นของทองพันชั่งที่เวลา 27.45 และ 42.82 นาที ตามลำดับ พิก (8) ที่เวลา 35.14 นาที เป็นของสัระยะยัง พิก (9) เป็นของกระเทียม ที่เวลา 25.97 นาที พิก (10) และ (11) ที่เวลา 24.22 และ 24.40 นาทีเป็นของข้าวเย็นเหนือและข้าวเย็นใต้ ตามลำดับ พิก (12) เป็นของชันทองพญาบาท ที่เวลา 39.16 นาที และพิก (13) ที่เวลา 16.74 นาที เป็นของมะดุก ดังนั้นจึงใช้พิกทั้ง 13 พิกนี้เป็น characteristic peaks ของตำรับสมุนไพรรักษาโรคเกาต์ ดังรูปที่ 1 ซึ่งแสดงตัวอย่างลายพิมพ์โครมาโตแกรมของขุมเห็ดเทศ (รูป 1a) เทียนคำ (รูป 1b) พริกไทย (รูป 1c) และลายพิมพ์โครมาโตแกรมของตำรับสมุนไพรรักษาโรคเกาต์ (รูป 1d) แสดง characteristic peaks จำนวน 13 พิก

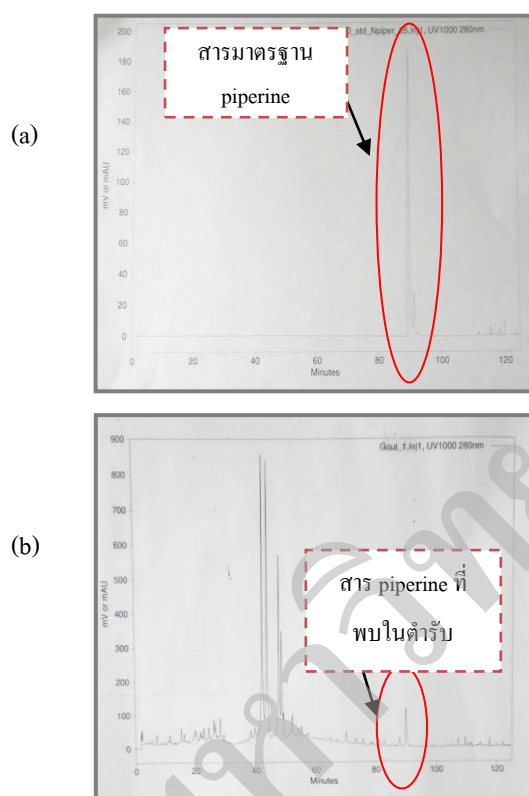


รูปที่ 1 ลายพิมพ์โครมาโตแกรมของขุมเห็ดเทศ (1a) เทียนคำ (1b) พริกไทย (1c) และลายพิมพ์โครมาโตแกรมของตำรับสมุนไพรรักษาโรคเกาต์ (1d) แสดง characteristic peaks จำนวน 13 พิก

เนื่องจาก characteristic peaks ที่พบบางส่วนยังแยกกันไม่สมบูรณ์จึงไม่สามารถหาเป็นอัตราส่วนของ characteristic peaks กับพิกที่เป็น marker ได้ แต่สามารถเป็นตัวแทนในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของตำรับยาสมุนไพรรักษาโรคเกาต์ที่พบได้โดยอาศัยเวลาในการเคลื่อนที่ของสาร และ UV spectrum

การพิสูจน์พิก (5) ในรูป 1d ว่าเป็นสาร piperine ทำได้โดยนำโครมาโตแกรมของตำรับยาสมุนไพรรักษาโรคเกาต์มาเทียบกับสารมาตรฐาน piperine ในสถานะการทดลองสำหรับการหาปริมาณสาร piperine ดังรูปที่ 2 พบพิกของ piperine ในตำรับยาสมุนไพรรักษาโรคเกาต์ดังรูปที่ 2(a) ตรงกับพิกของสารมาตรฐาน piperine ดังรูปที่ 2(b) ที่เวลา 89 นาที และตรวจวัดโดย UV ที่ความยาวคลื่น 280 nm พบว่ามี UV spectrum ที่เหมือนกันกับสารมาตรฐาน นอกจากนี้ เมื่อ

ตรวจวัดโดยใช้วิธีวิเคราะห์ LC-MS พบว่าสารละลายมาตรฐาน piperine ปรากฏพีคที่เวลา 13.6 นาที มี protonated peak ที่ m/z 286.2 เป็น base peak ส่วนสารสกัดสมุนไพรตำรับยาโรคเกาต์ก็พบพีคที่เวลา 13.8 นาที มี protonated peak ที่ m/z 286.1 เป็น base peak เช่นเดียวกัน



รูปที่ 2 โครมาโตแกรมแสดงสาร piperine ที่พบใน standard piperine (a) และตำรับยาสมุนไพรโรคเกาต์ (b)

4.2 การหาปริมาณสารไพเพอรีนในตำรับยาสมุนไพร

การหาปริมาณสาร piperine ต้องมีการปรับสภาวะการทดลองเพื่อให้พีคของสาร piperine แยกออกจากสารอื่น ๆ อย่างสมบูรณ์ และเมื่อสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อนำมาใช้ในการคำนวณหาปริมาณ piperine ในตำรับยาสมุนไพรโรคเกาต์ พบว่า

ปริมาณ piperine เท่ากับ 0.54 mg/g ของผงสมุนไพรตำรับ

4.3 Method validation

ได้กราฟมาตรฐานที่มีความเป็นเส้นตรง ดังสมการ $y = 36876263.84x - 484899.34$ ($r^2 = 0.9932$) โดยที่ x คือ ความเข้มข้นของ piperine (mg/ml) และ y คือ peak area

ค่าความเที่ยงตรง (precision) ของ intraday precision เท่ากับร้อยละ 2.79 ($n=6$) interday precision เท่ากับร้อยละ 2.04 ($n=6$) ดังตารางที่ 2 และค่าขีดจำกัดของการตรวจวัด (LOD) มีค่าเท่ากับ 0.02 mg/ml ค่าขีดจำกัดของการหาปริมาณสาร (LOQ) มีค่าเท่ากับ 0.13 mg/ml

ตารางที่ 2 ผลการศึกษา method validation

Linearity	$y = 36876263.84x - 484899.34$
Correlation of determination (r^2)	0.9932
Intraday precision (%RSD)	2.79 ($n=6$)
Interday precision (%RSD)	2.04 ($n=18$)
LOD (mg/ml)	0.02
LOQ (mg/ml)	0.13

ตารางที่ 3 ผลการศึกษา accuracy

	Amount found (mg/ml)	% Recovery
Spiked 80%	0.182 ± 0.00087	102.04 ± 0.79
Spiked 100%	0.210 ± 0.00061	100.01 ± 0.44
Spiked 120%	0.236 ± 0.00104	100.68 ± 0.63

การศึกษาความถูกต้องที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 80, 100 และ 120 ของสารมาตรฐานไพเพอรีนที่พบในตำรับยา ได้ร้อยละของการกลับคืน (% recovery)

เท่ากับ 102.04, 100.01 และ 100.68 ดังตารางที่ 3 แสดงว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความถูกต้องและแม่นยำ

5. บทสรุป

ได้ศึกษาการทดลองสำหรับการควบคุมคุณภาพตำรับยาสมุนไพรไทยรักษาโรคเกาต์และพืชแต่ละชนิดที่เป็นส่วนประกอบจำนวน 10 ชนิด จากทั้งหมด 12 ชนิด และสามารถใช้ในการหา characteristic peaks ของสมุนไพรที่เป็นส่วนประกอบในตำรับยาสมุนไพรไทยรักษาโรคเกาต์จำนวน 13 พืช ซึ่งหนึ่งในนั้นคือสาร piperine ของพริกไท ใช้เป็นสารบ่งคุณภาพของตำรับ และได้ศึกษาการทดลองที่เหมาะสมสำหรับการหาปริมาณสาร piperine ในตำรับยาสมุนไพรไทยรักษาโรคเกาต์ ซึ่งหาปริมาณได้เท่ากับ 0.54 mg/g ของผงสมุนไพรตำรับ นอกจากนี้ได้ตรวจสอบวิธีวิเคราะห์ พบว่าวิธีที่ได้มีความถูกต้องและเที่ยงตรงสูง มีความน่าเชื่อถือ ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมคุณภาพสมุนไพรไทยที่มีส่วนประกอบในตำรับสมุนไพรเป็นพริกไท และนำไปปรับปรุงให้การศึกษาการทดลองมีความเหมาะสมมากยิ่งขึ้นในการควบคุมคุณภาพสมุนไพรไทยที่มีส่วนประกอบในตำรับสมุนไพรเป็นเทียนดำ หุมเห็ดเทศ ทองพันชั่ง ศิริษะยัง กระเทียม ข้าวเย็นเหนือ ข้าวเย็นใต้ ขันทองพยาบาทและมะดุกต่อไป

6. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ศ.ดร.กฤษณา ไกรสินธุ์ คณะผู้ทำงานวิจัยทุกท่าน บุคลากรที่มีส่วนเกี่ยวข้อง คณะเภสัชศาสตร์ และคณะกรรมการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต และขอขอบคุณสถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย เลขที่ 57/53 ประจำปีการศึกษา 1/2554

7. เอกสารอ้างอิง

- ตำรายาในหลักศิลาจารึกวัดโพธิ์ พ.ศ. 2375
ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่องยาสามัญประจำบ้านแผนโบราณ พ.ศ. 2556.
ยุพกรณ์ สำเภาพันธ์ เสาวภาคย์ วชิรวงศ์กวิน และสุรพจน์ วงศ์ใหญ่. (2554). การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารบ่งคุณภาพในตำรับยาไทยรักษาโรคเบาหวานและความดันโลหิตสูง ด้วยวิธีรีเวิร์สเฟส เอช พี เอล ซี. การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 23, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน ระหว่างวันที่ 23-24 ธันวาคม 2554, หน้า 355-361.
อุทิศ ศิสมโชค และ ประภักษ์ โสคติโสภ. (2554). เส้นทางการสุขภาพ; [2 screen]. Available: URL:<http://www.yourhealthyguide.com/article/aj-gout-4.html>. Accessed December 26, 2011.
Bang, J.S., Oh, D.H., Choi, H.M., Sur, B.-J., Lim, S.-J., Kim, J.Y., Yang, H.-I., Yoo, M.C., Hahm, D.-H., and Kim, K.S. (2009) Anti-inflammatory and antiarthritic effects of piperine in human interleukin 1 β -stimulated fibroblast-like synoviocytes and in rat arthritis models. Arthritis research&therapy; Available: <http://arthritis-research.com/content/11/2/R49> Accessed February 18th, 2013.
Emea [Internet]. (2006) London: European Medicines Agency; Validation of Analytical Procedures:Text and Methodology; [update 2006]. Available: <http://www.chemblink.com/products/478-43-3.htm> Accessed September 3rd, 2012.

- European Medicines Agency. (2008) Reflection paper on markers used for quantitative and qualitative analysis of herbal medicinal products and traditional herbal medicinal products. London.
- Hamrapurkar, P.D., Jadhav, K. and Zine, S. (2011) Quantitative Estimation of Piperine in *Piper nigrum* and *Piper longum* Using High Performance Thin Layer Chromatography. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 01(03): 117-120.
- Jordan, K.M., Cameron, J.S., Snaith, M., Zhang, W., Doherty, M., Seckl, J., Hingorani, A., Jaques, R. and Nuki, G. (2007) British Society for Rheumatology and British Health Professionals in Rheumatology Guideline for the Management of Gout. *Rheumatology*. 46: 1372-1374.
- Li, S., Han, Q., Qiao, C., Song, J., Cheng, C.L. and Xu, H. (2008) Chemical markers for the quality control of herbal medicines: an overview. *Chinese Medicine*. 3: 7.
- Salam, O.M.E.A., EL-Shenawy, S., Nofal, S.M., and Gy, M. (2007) Piperine Inhibits Visceral Pain Caused by Acetic Acid in Mice. *Journal of Pharmacology and Toxicology*. 2 (5): 456-464.
- Shabir, G.A. (2003) Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A*; 987:57-66.
- Wang, X-M., Zhang, Q-Z., Yang, J., Zhu R-H., Zhang, J., Cai, L-J. and Peng W-X. (2012) Validated HPLC-MS/MS Method for Simultaneous Determination of Curcumin and Piperine in Human Plasma. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 11(4): 621-629.
- Wood, A.B., Barrow, M.L. and James, D.J. (1988) Piperine Determination in Pepper (*Piper nigrum* L.) and its Oleoresis-A Reversed-phase High-performance Liquid Chromatographic Method. *Flavour and Fragrance Journal*. 3: 55-64.
- World Health Organization. (1998) Quality control methods for medicinal plant materials. Geneva, World Health Organization.
- World Health Organization. (2000) General guidelines for methodology on research and evaluation of traditional medicine. Geneva, World Health Organization.