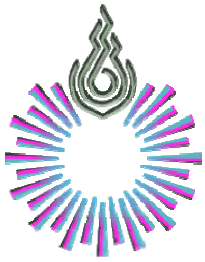


รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

การวิเคราะห์เชิงปริมาณ และการทำ Fingerprint ของตำรับสมุนไพรไทยสูตรยาลดความดัน

Quantitative analysis and the Fingerprint of Traditional Thai Antihypertensive Drug

โดย

ดร.ทศธน จรูญรัตน์

สนับสนุนโดย

สถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต

2555

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ชื่อเรื่อง : การวิเคราะห์เชิงปริมาณ และการทำ Fingerprint ของตำรับสมุนไพรไทยสูตรยาลดความดัน

ผู้วิจัย : นายทศธน จรูญรัตน์ สถาบัน : มหาวิทยาลัยรังสิต

ปีที่พิมพ์ : พ.ศ. 2555 สถานที่พิมพ์ : โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยรังสิต

แหล่งที่เก็บรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ : มหาวิทยาลัยรังสิต จำนวนหน้างานวิจัย : 69 หน้า

คำสำคัญ : ตำรับยาสมุนไพรไทย, Fingerprint, LC-MS ลิขสิทธิ์ : มหาวิทยาลัยรังสิต

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันผู้คนให้ความสนใจในเรื่องของการดูแลสุขภาพ และการรักษาโดยใช้สมุนไพรอย่างแพร่หลาย ทั้งนี้การใช้ยาสมุนไพรควบคู่ไปกับการศึกษาประสิทธิภาพ และความปลอดภัยของยาสมุนไพรยังได้รับการสนับสนุนจากองค์การอนามัยโลกหรือ WHO เพื่อประโยชน์ในการนำยาสมุนไพรมาใช้รักษาผู้ป่วยในเบื้องต้น หรือนำมาใช้ในงานสาธารณสุขมูลฐาน ในประเทศไทยมีตำรับยาสมุนไพรที่มีข้อบ่งใช้ในการรักษาโรคมากมายหลายชนิด แต่ตำรับที่จะหยิบยกมาศึกษาในที่นี้คือ ตำรับยาสมุนไพรสูตรยาลดความดันโลหิต โดยตามหลักเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลกแล้วจะต้องมีการศึกษาระบุถึงสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบในตำรับที่คาดว่ามีส่วนในการออกฤทธิ์ และการสร้าง fingerprint ซึ่งเปรียบเสมือนแม่พิมพ์ลายนิ้วมือของตำรับยาสมุนไพรชนิดนั้นๆ ก่อนที่จะนำตำรับยาสมุนไพรดังกล่าวไปศึกษาประสิทธิภาพ และความปลอดภัยในมนุษย์ ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ใช้เทคนิคที่เรียกว่าโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงเชื่อมต่อกับเครื่องแมสสเปกโตรเมทรีหรือ LC-MS ในการค้นหาและระบุชนิดของสารสำคัญที่พบ และยังใช้สร้าง fingerprint ของตำรับยานี้ ผลการศึกษาคือ สามารถสร้าง fingerprint ของตำรับยานี้ได้ 8 รูปแบบโดยขึ้นอยู่กับชนิดของตัวทำละลาย นอกจากนี้จากตำรับยายังสามารถระบุชนิดของสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาได้อีก 10 ชนิดซึ่งผู้วิจัยคัดเลือกสาร 3 ชนิดจากที่ระบุได้คือ piperine imperatorin และ pinostrobin เพื่อนำมาใช้เป็นสารเครื่องหมายหรือ marker เพื่อนำมาใช้ในการควบคุมคุณภาพของตำรับยาโดยใช้การวิเคราะห์ที่ผ่านการตรวจรับรอง (method validation) นอกจากนั้นผู้วิจัยได้ทำการสุ่มตัวอย่างยา 10 ชุดการผลิตมาวัดปริมาณสารทั้ง 3 ชนิดและกำหนดเป็นค่ามาตรฐานที่พึงมีของสารดังกล่าวในตำรับยาสมุนไพรชนิดนี้ โดยมีการตั้งค่ามาตรฐานของสารทั้งสามตัวว่าควรมีปริมาณ piperine 1.43±0.06 %w/w ปริมาณ imperatorin 0.05±0.002 %w/w และปริมาณ pinostrobin 0.3±0.03 %w/w ตามลำดับ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Title : Quantitative analysis and the Fingerprint of Traditional Thai Antihypertensive Drug

Researcher : Tossaton Charoonratana Institution : Rangsit University

Year of Publication : 2013 Publisher : Rangsit University Press

Sources : Rangsit University No. of page : 69 pages

Keywords : Traditional Thai medicine, Fingerprint, LC-MS Copyright : Rangsit University

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Abstract

There is rising attention being paid to the wellness care benefits of herbs and their products in Southeast Asia. The World Health Organization (WHO) has been supporting countries to promote traditional medicine utilization so that this valuable resource is utilized safely and effectively. In Thailand, many traditional herbal recipes have been established since ancient times and later have been carefully modified based on the wisdom of traditional Thai medicine (TTM). In this article a traditional Thai antihypertensive herbal recipe (TTAH) is selected and studied in detail. According to WHO guidelines, analysis of a sizeable chemical constituent and fingerprint establishment of a product are a requirement to support a clinical trial for an herbal recipe. High-performance liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) is an excellent tool to investigate the chemical fingerprint, chemical constituents, and also putative active ingredients. Eight chemical fingerprints were established while metabolic profiling of ten possible compounds was identified from the TTAH and all of them are active pharmaceutical compounds. Three markers including piperine, imperatorin, and pinostrobin were selected to be selective markers in a quality control process. Quantitative analysis by LC-MS was established and validated and the results showed that the method was specific and accurate. Ten batches of TTAH were collected over a year and analyzed according to an attempt to establish the standard values of piperine, imperatorin, and pinostrobin amount in TTAH. The standard values of markers in TTAH were set for piperine as 1.43±0.06 %w/w, imperatorin as 0.05±0.002 %w/w, and pinostrobin as 0.3±0.03 %w/w, respectively.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านผู้ประสิทธ์ประสาทวิชาความรู้ให้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง รศ. ดร. จุไรทิพย์ หวังสินทวีกุล และต่อมาคือ รศ.ดร. ภาคภูมิ พาณิชยูปการนันท์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ นอกจากนี้ผู้เขียนยังขอขอบคุณโอกาสดีๆที่ได้รับจาก ศ. (พิเศษ) ดร. กฤษณา ไกรสินธุ์ และ ผศ.ดร. ธนภัทร ทรงศักดิ์ ที่ได้ให้โอกาสเข้ามาร่วมงานที่คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิตแห่งนี้ นอกจากนี้งานชิ้นนี้จะสำเร็จลุล่วงไปไม่ได้เลยถ้าขาดการสนับสนุนจากเพื่อนร่วมงานที่ศูนย์วิจัย บุคลากรที่คณะ รวมไปจนถึงบุคลากรของสถาบันวิจัยของมหาวิทยาลัยรังสิต ทั้งนี้ ผู้เขียนได้รับทุนลำดับที่ 71/2555 จากมหาวิทยาลัยรังสิต

จึงขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

ทศธน จรูญรัตน์

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		ข
กิตติกรรมประกาศ		ค
สารบัญ		ง
สารบัญตาราง		ฉ
สารบัญรูปภาพ		ช
บทที่ 1	บทนำ	1
	ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
	วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
	ขอบเขตของการวิจัย	2
	กรอบแนวคิดในงานวิจัย	2
	นิยามศัพท์เฉพาะ	3
	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
บทที่ 3	ระเบียบวิธีวิจัย	19
	ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง	19
	เครื่องมือและวัสดุที่ใช้ในงานวิจัย	19
	วิธีการวิจัย	20
บทที่ 4	ผลการวิจัย	24

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญ (ต่อ)

		หน้า
บทที่ 5	สรุป อภิปราย และข้อเสนอแนะ	49
	สรุปผลการวิจัย	49
	อภิปรายผลการวิจัย	49
	ข้อเสนอแนะ	50
บรรณานุกรม		51
ประวัติผู้วิจัย		58

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 สารสำคัญที่มีรายงานว่าพบในสมุนไพรที่เป็นองค์ประกอบของตำรับยาลดความดัน 7

2 สารสำคัญที่ตรวจพบใน fingerprint ของตำรับยาลดความดัน 36

3 Repeatability Reproducibility และ Recovery ของ selective markers จากตำรับยา 48

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ หน้า

1 พริกไทย (*Piper nigrum*) 16

2 บอระเพ็ด (*Tinospora crispa*) 16

3 มะตูม (*Aegle marmelos*) 17

4 กระชาย (*Boesenbergia pandurata*) 17

5 เหงือกปลาหมอ (*Acanthus ebracteatus*) 18

6 แห้วหมู (*Cyperus rotusdus*) 18

7 chromatogram ของสารมาตรฐาน higenamine adenosine salsolinol และ piperine 25

8 chromatogram และ mass spectrum ของ higenamine 26

9 แสดง chromatogram และ mass spectrum ของ adenosine 27

10 แสดง chromatogram และ mass spectrum ของ salsolinol 28

11 แสดง chromatogram และ mass spectrum ของ piperine 29

12 สัญญาณ noise จากการวิเคราะห์ extracted ion mass spectrum 30

13 สัญญาณ noise จากการวิเคราะห์ extracted ion mass spectrum 31

14 สัญญาณของ higenamine, adenosine และ salsolinol ในสารสกัด n-butanol ของบอระเพ็ดตามลำดับจากบนลงล่าง 32

15 สัญญาณของ chromatographic fingerprint ของสารสกัดชั้นน้ำ hexane dichloromethane และ ethyl acetate ใน ESI positive mode ตามลำดับจากบนลงล่าง 34

16 สัญญาณของ chromatographic fingerprint ของสารสกัดชั้นน้ำ hexane dichloromethane และ ethyl acetate ใน ESI negative mode ตามลำดับจากบนลงล่าง 35

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่ หน้า

17 chromatogram ของสารสกัดตำรับยาชั้น dichloromethane ESI positive mode, borapetoside-C ในสารสกัดตำรับยาและ borapetoside-C ในสารสกัดบอระเพ็ดตามลำดับจากบนลงล่าง 37

18 chromatogram ของสารสกัดตำรับยาชั้น hexane ESI positive mode, imperatorin และ pinostrobin ในสารสกัดตำรับยา pinostrobin ในสารสกัดกระชายและ imperatorin ในสารสกัดมะตูมตามลำดับจากบนลงล่าง 38

19 chromatogram ของสารสกัดตำรับยาชั้น hexane ESI negative mode, pinocembrin ในสารสกัดตำรับยาและ pinocembrin ในสารสกัดกระชายตามลำดับจากบนลงล่าง 39

20 chromatogram ของสารสกัดตำรับยาชั้น ethyl acetate ESI negative mode, verbascoside ในสารสกัดตำรับยาและ verbascoside ในสารสกัดเหงือกปลาหมอตามลำดับจากบนลงล่าง 40

21 chromatogram ของสารสกัดตำรับยาชั้น hexane ESI negative mode, 7,8-dihydroxy-5,6-methylenedioxyflavone ในสารสกัดตำรับยาและ 7,8-dihydroxy-5,6-methylene-dioxyflavone ในสารสกัดแห้วหมูตามลำดับจากบนลงล่าง 41

22 โครงสร้าง chromatogram และ ms/ms fragmentation ของ imperatorin 43

23 โครงสร้าง chromatogram และ ms/ms fragmentation ของ pinostrobin 44

24 โครงสร้าง chromatogram และ ms/ms fragmentation ของ piperine 45

25 chromatogram ของสารสกัดตำรับยาและ extracted ion ของสาร piperine imperatorin และ pinostrobin ที่พบในตำรับยา 46

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
26	กราฟมาตรฐานของ piperine	47
27	กราฟมาตรฐานของ imperatorin	47
28	กราฟมาตรฐานของ pinostrobin	48

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ท่ามกลางความก้าวหน้าของการพัฒนายาแผนปัจจุบัน เบื้องหลังความสำเร็จดังกล่าวส่วนหนึ่งนั้นเกิดมาจากการพัฒนาองค์ความรู้ทางด้านพฤกษเคมี ซึ่งสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ในยาแผนปัจจุบันนั้นโดยมากถูกพัฒนามาจากสารที่พบในธรรมชาติ เช่น พืช หรือ microorganism โดยทั้งสิ้น ประเทศไทยของเราล้วนอุดมไปด้วยป่าไม้ที่มีความหลากหลายทางชีวภาพจึงเป็นแหล่งสำคัญของตัวยาจากสมุนไพรไทย ดังจะเห็นได้ว่าบรรพบุรุษของไทยแต่โบราณได้นำสมุนไพรมาใช้เพื่อรักษาโรคกันมาอย่างยาวนาน ตลอดจนได้มีการลองผิดลองถูกและสะสมองค์ความรู้ จนกระทั่งคิดค้นได้เป็นตำรับยาสมุนไพรไทยที่มีประสิทธิภาพในการรักษาและใช้กันอย่างแพร่หลาย

แม้ว่าตำรับยาสมุนไพรไทยจะมีประสิทธิภาพ แต่ก็ยังขาดข้อมูลในเรื่องของการควบคุมคุณภาพในเชิงวิทยาศาสตร์ ยกตัวอย่างเช่น การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญที่ออกฤทธิ์และสารอื่นๆที่พบในตำรับยาสมุนไพร การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของตำรับยาสมุนไพร การศึกษาความเป็นพิษของตำรับยาสมุนไพร เป็นต้น ทำให้ผู้ใช้เกิดความไม่มั่นใจในความปลอดภัย ซึ่งนี่ก็เป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทางการแพทย์ไม่ค่อยยอมรับการรักษาผู้ป่วยด้วยการใช้สมุนไพรตำรับ จึงเป็นเรื่องน่าเสียดายเป็นอย่างยิ่ง

ถึงแม้ว่าการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารสำคัญและสารอื่นๆในตำรับยาสมุนไพรไทยซึ่งประกอบไปด้วยสมุนไพรหลายตัวนั้นกระทำได้ยาก แต่ด้วยเทคโนโลยีทางด้านเคมีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมาอย่างต่อเนื่องทำให้ผู้วิจัยมองเห็นถึงความเป็นไปได้ในการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์เพื่อนำมาใช้ในการควบคุมมาตรฐานของตำรับยาสมุนไพรไทย ในปัจจุบันนักวิจัยที่สนใจทางด้านนี้โดยส่วนใหญ่จะมุ่งเน้นไปในการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญของสมุนไพรตัวแทนของตำรับหนึ่งๆหรือไม่ก็วิเคราะห์ในสมุนไพรแยกเป็นตัวๆไป ซึ่งก็เป็นกระบวนการคิดทางวิทยาศาสตร์ที่ดีในการลดความซับซ้อนของปัญหาทางการวิจัย ซึ่งในจุดนี้ผู้วิจัยก็ได้เล็งเห็นถึงความสำคัญ นอกเหนือไปจากนี้ถ้าพิจารณาถึงสภาพของความเป็นตำรับยาสมุนไพร กล่าวคือ มีสารสำคัญและสารอื่นๆจากต้นไม้หลายต้นมารวมกันอยู่ในตำรับเดียวนั้น สารบางตัวอาจเป็นสารที่ออกฤทธิ์ สารบางตัวอาจเป็นสารที่ช่วยเสริมฤทธิ์ สารบางตัวอาจเป็นสารที่ช่วยลดพิษ เป็นต้น ดังนั้นการที่จะตีความแยกไปว่าเฉพาะสารสำคัญที่ออกฤทธิ์นั้นเป็นสารที่จำเป็นในการวิเคราะห์ก็ถือว่าเป็นสิ่งที่ไม่ถูกต้องทั้งหมด ดังนั้นการทำ fingerprint ของตำรับยาสมุนไพรจึงมีความจำเป็นอย่างมาก ทั้งนี้เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการควบคุมคุณภาพและศึกษาวิจัย

มหาวิทยาลัยราชภัฏ Rajabhat University

ในขั้นต่อๆไป ดังนั้นสำหรับการศึกษานี้จะแบ่งการวิจัยออกเป็นสองส่วน คือ ส่วนของการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ของสมุนไพรตัวแทนของตำรับยาลดความดันและส่วนของการทำ fingerprint ของตำรับโดยเทคนิค HPLC-DAD-MS เพื่อใช้เป็นตัวอย่างของการทำมาตรฐานในเชิงวิเคราะห์ของตำรับยาสมุนไพรไทยเพื่อรองรับการผลิตของโรงงานยา Sun-Herb Thai Chinese Manufacturing หรือแหล่งอื่นที่สนใจให้ได้ผลิตภัณฑ์ประสิทธิภาพที่ผ่านการควบคุมมาตรฐาน ส่งผลให้เกิดการใช้ยาสมุนไพรไทยอย่างแพร่หลายและยังเป็นการส่งเสริมการเพาะปลูกพันธุ์พืชสมุนไพรไทยเพื่อนำมาใช้เป็นยาได้อีกด้วย นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้ยังสามารถนำไปสนับสนุนในส่วนของการควบคุมมาตรฐานตำรับยาสมุนไพรก่อนนำไปใช้ในการทดลองทางคลินิกต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อสร้าง fingerprint และฐานข้อมูลของสารสำคัญที่พบในตำรับยาลดความดัน
2. เพื่อวิเคราะห์ปริมาณของสารสำคัญที่พบในตำรับยาลดความดัน
3. เพื่อสร้างข้อกำหนดของปริมาณสารสำคัญที่พึงมีในตำรับยาลดความดัน

ขอบเขตของการวิจัย

ทำการสร้าง chromatographic fingerprint ของตำรับยาลดความดันและระบุชนิดของสารสำคัญโดยใช้เทคนิค mass spectrometry จากนั้นทำการสร้างข้อกำหนดมาตรฐานของปริมาณของสารสำคัญที่พึงมีในตำรับยาโดยวิเคราะห์ปริมาณของสารสำคัญจากวัตถุดิบสมุนไพรที่นำมาใช้ผลิตยาเป็นจำนวน 10 ชุดการผลิต ตั้งแต่เดือนธันวาคม ปี พ.ศ. 2555 จนถึงเดือนพฤศจิกายน ปี พ.ศ. 2556 โดยใช้เทคนิค liquid chromatography-mass spectrometry โดยมีระยะเวลาการดำเนินการวิจัยตั้งแต่วันที่ 23 เมษายน พ.ศ. 2556 จนถึงวันที่ 23 ธันวาคม พ.ศ. 2556

กรอบแนวคิดในงานวิจัย

ตำรับยาแผนไทยมีการใช้ในประเทศไทยมาเป็นระยะเวลายาวนานแต่ยังขาดข้อมูลการศึกษาถึงประสิทธิภาพและความปลอดภัยในมนุษย์ ซึ่งก่อนที่จะมีการศึกษาในมนุษย์ได้นั้นต้องมีข้อมูลการศึกษาทางด้านอื่นมาสนับสนุนด้วย เช่นการศึกษาและควบคุมคุณภาพของตำรับยาสมุนไพร ข้อมูลที่ได้จะทำให้ทราบว่าตำรับยาสมุนไพรนี้มีสารสำคัญชนิดใดประกอบอยู่ อีกทั้งทราบวิธีที่จะใช้ในการหาปริมาณ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารสำคัญดังกล่าว ซึ่งสามารถนำวิธีที่ได้มาใช้ควบคุมคุณภาพทำให้ผลิตยาที่มีปริมาณสารสำคัญใกล้เคียงกันในแต่ละชุดการผลิต ทำให้ผู้ป่วยได้รับปริมาณตัวยาเท่าๆกัน อีกทั้งยังช่วยเพิ่มความน่าเชื่อถือของการทดลองทางคลินิกต่อไป

นิยามศัพท์เฉพาะ

LC-MS หรือ liquid chromatography-mass spectrometry คือ เทคนิคที่ใช้ในการแยกสารสำคัญบริสุทธิ์ที่ผสมอยู่ในตัวอย่างพร้อมกับวิเคราะห์เพื่อระบุชนิดของสารสำคัญดังกล่าว ซึ่งเทคนิคนี้จะประกอบด้วย 2 ส่วนคือ ส่วน liquid chromatography เป็นส่วนที่ใช้ในการแยกสารสำคัญโดยอาศัยหลักการความแตกต่างกันของสภาพขั้วของสารสำคัญแต่ละชนิด โดยจะแสดงผลเป็นโครมาโทแกรม และส่วนที่สองคือ mass spectrometry เป็นส่วนที่ใช้ระบุชนิดของสารสำคัญโดยใช้น้ำหนักโมเลกุลเป็นตัวชี้วัดโดยดูจาก mass spectrum อีกทั้งยังสามารถใช้วิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญโดยดูจากพื้นที่ใต้กราฟเทียบกับสารมาตรฐาน

Fingerprint คือ การทำแม่พิมพ์ลายนิ้วมือเพื่อจำแนกชนิดของสิ่งต่างๆ ในที่นี้คือการทำแม่พิมพ์โครมาโทแกรมของตำรับยาสมุนไพรสูตรยาลดความดันโดยใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ทำให้ได้แม่พิมพ์โครมาโทแกรมที่แตกต่างกัน ซึ่งจะเป็นเอกลักษณ์เฉพาะของสูตรยานี้ว่าต้องมีลักษณะโครมาโทแกรมเป็นแบบนี้ จึงนำมาใช้ในการควบคุมคุณภาพได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ฐานข้อมูลและทราบปริมาณของสารมาตรฐานที่พบในตำรับยาลดความดัน
2. ใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนในส่วนของการควบคุมมาตรฐานตำรับยาสมุนไพรก่อนนำไปใช้ในการทดลองทางคลินิก
3. ส่งผลให้เกิดการใช้ตำรับยาสมุนไพรไทยอย่างแพร่หลาย อีกทั้งยังเป็นการส่งเสริมการเพาะปลูกพันธุ์พืชสมุนไพรไทยเพื่อนำมาใช้เป็นยา

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคความดันโลหิตสูง คือ โรคเรื้อรังชนิดหนึ่งที่พบว่าผู้ป่วยมีความดันในหลอดเลือดแดงสูงกว่าปกติ ซึ่งในผู้ใหญ่กำหนดค่าปกติของความดันโลหิตช่วงหัวใจบีบและคลายเท่ากับ 139 มิลลิเมตรปรอท และ 89 มิลลิเมตรปรอทตามลำดับ (Chobanian *et al*., 2003) ความดันโลหิตสูงแบ่งได้ 2 ชนิดคือ แบบปฐมภูมิ (ไม่ทราบสาเหตุชัดเจน) และแบบทุติยภูมิ (ทราบสาเหตุ) ซึ่งผู้ป่วยส่วนมากประมาณร้อยละ 90 จะพบว่าเป็นโรคความดันโลหิตสูงแบบปฐมภูมิ (Carretero *et al*., 2000) โดยจะพบว่าความดันโลหิตเพิ่มขึ้นตามอายุขัยที่เพิ่มขึ้น (Vasan *et al*., 2002) นอกจากนี้ยังมีความสัมพันธ์ระหว่างความดันโลหิตสูงกับปัจจัยทางด้านพันธุกรรม และปัจจัยที่เกิดขึ้นขณะอยู่ในครรภ์มารดา แต่ทั้งนี้ทั้งนั้นกลไกเชื่อมโยงยังคงคลุมเครือ (Lowlor *et al*., 2005) ซึ่งจะแตกต่างจากความดันโลหิตสูงแบบทุติยภูมิซึ่งจะมีสาเหตุที่ระบุได้ โดยโรคไตจะเป็นสาเหตุส่วนใหญ่ที่ทำให้เกิดความดันโลหิตสูงชนิดนี้ นอกจากนี้ยังอาจเกิดจากพยาธิสภาพของต่อมไทรอยด์, โรคอ้วน, ยา หรือยาเสพย์ติดบางชนิด เป็นต้น (O'Brien *et al*., 2007) ผู้ป่วยความดันโลหิตสูงแบบปฐมภูมิจะมีความต้านทานการไหลของโลหิตในร่างกาย (Total Peripheral Resistance) สูงขึ้นทำให้ความดันโลหิตสูงขึ้น (Conway *et al*., 1984) ซึ่งกลไกอาจเกิดขึ้นได้จากการตีบลงของหลอดเลือดแดงขนาดเล็ก และหลอดเลือดเลือดแดงฝอย (Folkow *et al*., 1982) นอกจากนี้ยังอาจเกิดจากความผิดปกติของระบบประสาท sympathetic (Esler *et al*., 2010) หรือเกิดจากการรบกวนระบบการควบคุมเกลือและน้ำของไต โดยเฉพาะในระบบ renin-angiotensin (Navar *et al*., 2010) ซึ่งมีเอนไซม์ที่สำคัญ คือ angiotensin converting enzyme (ACE) ที่มีหน้าที่เปลี่ยน angiotensin I ให้เป็น angiotensin II ซึ่งจะมีผลเพิ่มความดันโลหิต โดยในผู้ป่วยที่มีความดันโลหิตสูงจากสาเหตุนี้จะสามารถรักษาได้ผลดีโดยใช้ยาในกลุ่ม ACE inhibitors

ความดันโลหิตสูงเป็นปัจจัยเสี่ยงสำคัญของโรคหลอดเลือดในสมอง โรคหลอดเลือดโป่งพอง หัวใจวาย โรคของหลอดเลือดส่วนปลาย และโรคไตเรื้อรัง (Insull *et al*., 2009; Gaddam *et al*., 2009; Tylicky *et al*., 2003; Aronow *et al*., 2008) ซึ่งการปรับเปลี่ยนวิถีชีวิต และพฤติกรรมการกินอาหารก็สามารถช่วยลดภาวะโรคความดันโลหิต และภาวะแทรกซ้อนต่างๆได้ แต่สำหรับผู้ป่วยที่ใช้วิธีนี้แล้วไม่ได้ผล หรือไม่เพียงพอ ก็มีความจำเป็นต้องรักษาด้วยยาร่วมด้วย ซึ่งยาแผนปัจจุบันที่ใช้มีอยู่หลายกลุ่มขึ้นอยู่กับอาการของผู้ป่วย เช่น ยากลุ่ม β-blocker เพื่อลดอัตราการเต้นของหัวใจ, ให้ยาขับปัสสาวะเพื่อลดปริมาณเลือดที่สูบฉีด หรือให้ยาขยายหลอดเลือดแดงเพื่อลด total peripheral resistance เป็นต้น

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

(Chobanian *et al*., 2003) นอกจากนี้ในส่วนของยาสมุนไพรที่ใช้ลดความดันโลหิตก็มีอยู่มากมายหลายชนิดทั้งแบบที่เป็นสมุนไพรเดี่ยว และเป็นตำรับยาซึ่งมีสมุนไพรผสมกันอยู่หลายชนิด

ในปัจจุบันมีการศึกษาตัวยาสมุนไพรเดี่ยวกันอย่างกว้างขวางทั้งในเชิงของการแยกสารมาตรฐานบริสุทธิ์ทางเคมี, การใช้เทคนิควิธีวิเคราะห์หาโครงสร้างของสารบริสุทธิ์, การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์จากสมุนไพร, การเตรียมสารสกัดสมุนไพรที่มีตัวยาสำคัญในปริมาณสูง และอื่นๆ (Farnsworth *et al*., 1985) ทำให้เกิดองค์ความรู้ทางพฤกษเคมีอันเป็นประโยชน์มากมายในการพัฒนายาเพื่อใช้ในวงการแพทย์แผนปัจจุบัน แต่ในขณะเดียวกันกลับมีผู้สนใจศึกษาด้านการระบุและการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารสำคัญต่างๆที่ประกอบอยู่ในตำรับยาสมุนไพรอย่างจริงจังกันในวงแคบจะมีมากก็เป็นการศึกษาตำรับยาสมุนไพรของประเทศจีนเท่านั้น (Tian-Ye *et al*., 2011) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะความยากลำบากในการศึกษาวิเคราะห์สมุนไพรหลายตัวในเวลาเดียวกันและการตั้งข้อกำหนดในการควบคุมคุณภาพ นอกจากนั้นก็ยังมีปัจจัยของการหวงแหนภูมิปัญญา ไม่อยากถ่ายทอดให้ผู้อื่นได้รับรู้ ซึ่งถือว่าเป็นคอขวดของการพัฒนางานในศาสตร์นี้

ในโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยมีความประสงค์จะพัฒนาการวิเคราะห์ตำรับยาลดความดันที่มีองค์ประกอบตัวยาสำคัญจากสมุนไพรทั้งหมด 6 ชนิดในตำรับ ซึ่งสมุนไพรทุกชนิดเป็นสมุนไพรที่มีการแนะนำให้ใช้ในงานสาธารณสุขมูลฐาน คือ พริกไทย เถาบอระเพ็ด ผลมะตูม เหง้ากระชาย ใบเหงือกปลาหมอและหัวแห้วหมู (รูปที่ 1-6) ซึ่งจากความรู้เท่าที่มียังไม่มีใครศึกษาวิจัยยาตำรับนี้ โดยสูตรยาได้รับมาจากคลินิกวิโรจน์แผนไทย อำเภอพรหมคีรี จังหวัดนครศรีธรรมราช ซึ่งมีที่มาของสูตรยาปรับปรุงมาจากตำรายาแพทย์น้ำเอก ตัวยาได้มีการทดลองใช้ในผู้ป่วยจริงและติดตามอาการในผู้ป่วยหลายรายที่เป็นโรคความดันโลหิตสูงพบว่าหลังจากทานยาไป 1-2 เดือนความดันกลับมาสู่ระดับปกติ

จากการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสมุนไพรต่างๆที่ประกอบอยู่ในตำรับพบว่า ในพริกไทยหรือ *Piper nigrum* มีรายงานว่าพบสาร piperine ซึ่งมีฤทธิ์ลดความดันโดยมีกลไกเป็น Calcium channel blocker (Taqvi *et al*., 2008., Hlayackova *et al*., 2010; Kumar *et al*., 2010) อีกทั้งยังมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ปกป้องตับ (Pathak and Khandlewal, 2006; Pathak and Khandlewal, 2007; Kumar *et al*., 2007; Matsuda *et al*., 2008; Matsuda *et al*., 2009; Morikawa, 2010) นอกจากนี้ยังมีสารอื่นๆ เช่น piperanine, piperettine, piperoleines, piperyline, chavicine และน้ำมันหอมระเหยต่างๆ (Parma *et al*., 1997) เนื่องจากพริกไทยถูกใช้ในการประกอบอาหารจึงใช้ได้อย่างปลอดภัยในมนุษย์ นอกจากนั้นก็ยังมีการศึกษาในหนูและพบว่าพริกไทยมีความเป็นพิษต่ำ (Chunlaratthanaphorn *et al*., 2007; Bassey *et al*., 2011) ในส่วนของเถาบอระเพ็ดหรือ *Tinospora crispa* มีรายงานว่าพบสาร adenosine, salsolinol และ higenamine ที่มีฤทธิ์ลดความดัน โดยมีกลไกผ่าน adrenoreceptors and the purinergic adenosine A_2 and P_2 receptors ตามลำดับ (Praman *et al*., 2012) อีกทั้งยังพบว่าสารสกัดชั้น

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

น้ำสามารถลดน้ำตาลในเลือดได้ (Noor and Ashcroft, 1989) สารสกัดน้ำและเมทานอลของเถาบอระเพ็ดยังมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Kamarazaman *et al*., 2012) นอกเหนือจากนั้นก็ยังมีสารอื่นๆ เช่น borapetosides, picoretin, columbin, secoisolariciresinol, cyloeucalenol เป็นต้น (Praman *et al*., 2011) แต่มีงานวิจัยพบว่าผู้บริโภคบอระเพ็ดมีความเสี่ยงต่อการเกิดพิษที่ตับ (Chavalittumrong *et al*. 1997; Chantong *et al*. 2008; Kadir *et al*. 2011) แต่หลักฐานที่มียังไม่แน่ชัดเพียงพอซึ่งต้องมีการศึกษาในเรื่องนี้เพิ่มเติม นอกจากนั้นยังต้องมีการศึกษาพิษของการบริโภคตำรับยาที่มีบอระเพ็ดเป็นองค์ประกอบด้วย สมุนไพรตัวต่อไปคือ มะตูมหรือ *Aegle marmelos* พบว่าในส่วนของผลและใบมีฤทธิ์รักษาเบาหวาน (Sachdewa *et al*., 2001; Kamalakkannan and Prince, 2003; Upadhya *et al*., 2004; Sunderam *et al*., 2009) และมีฤทธิ์ปกป้องตับ (Singanan *et al*., 2007; Singh and Rao, 2008) สารสกัดชั้นน้ำมีฤทธิ์ต้านอักเสบ (Arul *et al*., 2005; Ghangale *et al*., 2008; Vidya *et al*., 2011) มีการสกัดสารบริสุทธิ์จากมะตูม พบว่าในใบมีสาร aegeline และ lupeol ซึ่งสารทั้งสองตัวนี้มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลและไขมันในเลือด (Narender *et al*., 2007; Papi Reddy *et al*., 2009) ส่วนในผลมีสาร imperatorin ซึ่งมีฤทธิ์ลดความดัน (Bertin *et al*., 2013; Cao *et al*., 2013) นอกจากนั้นยังพบว่า imperatorin มีฤทธิ์ต้านอักเสบและปกป้องตับด้วยเช่นกัน (Oh *et al*., 2002; Guo *et al*., 2012; Huang *et al*., 2012) เนื่องจากมะตูมถูกใช้ในการประกอบอาหารจึงใช้ได้อย่างปลอดภัยในมนุษย์ นอกจากนั้นก็ยังมีการศึกษาในหนูและพบว่ามะตูมมีความเป็นพิษต่ำ (Veerappan *et al*., 2007) สมุนไพรตัวที่สี่คือ กระชายหรือ *Boesenbergia pandurata* ในเหง้ากระชายมีสารสำคัญคือ pinostrobin ซึ่งสารตัวนี้เป็นสารพวก flavonoid มีฤทธิ์ปกป้องตับ (Fahey and Stephenson, 2002; Charoensin *et al*., 2008) ส่วนในสารสกัดชั้นคลอโรฟอร์มของเหง้ากระชายพบว่ามีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Tuchinda *et al*., 2002; Yun *et al*., 2003; Tewtrakul *et al*., 2009) และในสารสกัดคลอโรฟอร์ม-เมทานอลซึ่งมีสาร panduratin-A มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Sohn *et al*., 2005; Shindo *et al*., 2006) นอกจากนี้พบว่าสารสกัดชั้นเอทานอลมีฤทธิ์ลดความอ้วน (Kim *et al*., 2012) อีกทั้งยังมีรายงานความปลอดภัยในการใช้สารสกัดกระชายอีกด้วย (Charoensin *et al*., 2010; Saraithong *et al*., 2010) สมุนไพรตัวที่ห้าคือ เหงือกปลาหมอหรือ *Acanthus ebracteatus* พบว่าสารสกัดชั้นน้ำและเอทานอลของใบเหงือกปลาหมอมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Laupattarakasem *et al*., 2003; Somchaichana *et al*., 2012) ทั้งนี้มีการค้นพบสาร spilanthol จากใบเหงือกปลาหมอซึ่งสารตัวนี้มีฤทธิ์ต้านอักเสบและขับปัสสาวะ (Sharma, 2010) จากการศึกษาความเป็นพิษพบว่าสารสกัดเหงือกปลาหมอมีความเป็นพิษต่ำ (Siripong *et al*., 2001) สมุนไพรตัวสุดท้ายที่เป็นองค์ประกอบในตำรับยานี้คือ แห้วหมูหรือ *Cyperus rotundus* ซึ่งมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Gupta *et al*., 1970; Gupta *et al*., 1971; Saxena *et al*., 1971; Seo *et al*., 2001) ทั้งยังมีฤทธิ์ลดคลอเลสเตอรอลและน้ำตาลในเลือด มีการศึกษาพบว่าทำให้น้ำหนักของผู้ป่วยลดลงจึงอาจนำมาใช้รักษาโรคอ้วนได้ (Karnick *et al*., 1992; Raut *et al*., 2006; Lemaure *et al*., 2007) มี

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

การศึกษาความเป็นพิษในหนูและพบว่าการใช้สารสกัดเอทานอลของแห้วหมูมีความปลอดภัย (Thanabhorn *et al*., 2005)

ดังจะเห็นได้ว่าข้อมูลของสารสำคัญที่ประกอบอยู่ในสมุนไพรแต่ละตัวเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญมากในการศึกษาวิจัยงานทางด้านนี้ (ตารางที่ 1) แต่เนื่องมาจากในความเป็นจริงเราไม่สามารถระบุและวิเคราะห์สารได้ทุกชนิดในสมุนไพรหนึ่งๆ ดังนั้นการใช้ fingerprint จึงเป็นทางออกที่ดีที่สามารถนำมาใช้ประกอบในการควบคุมคุณภาพของสมุนไพรตลอดจนตำรับยาจากสมุนไพร นอกจากนั้นการระบุสารสำคัญตัวแทนจากตำรับยาสมุนไพรก็กำลังเป็นที่นิยมใช้ในประเทศไทย แต่โดยมากจะเป็นการระบุและวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญเพียงตัวเดียวซึ่งผู้วิจัยคิดว่าไม่เพียงพอ ดังนั้นในการศึกษานี้จะเป็นการศึกษาตั้งแต่การสร้าง fingerprint ที่เหมาะสม สามารถระบุสารสำคัญจาก fingerprint และสามารถเลือกสารสำคัญตัวแทนมากกว่า 1 ตัว มาวิเคราะห์ปริมาณโดยใช้เทคนิค LC-MS จากนั้นเมื่อได้วิธีวิเคราะห์แล้วก็จะทำการสุ่มตัวอย่างวัตถุดิบสมุนไพรยาลดความดันจากคลินิกแผนไทยดังกล่าวเป็นจำนวน 10 ชุดการผลิต เพื่อนำมาวิเคราะห์และกำหนดเป็นค่ามาตรฐานที่พึงมีของสารสำคัญในตำรับนี้ โดยการระบุสารสำคัญในตำรับจะใช้การเปรียบเทียบ mass spectra mass-fragmentation ions และ retention time จาก fingerprint ของสมุนไพรเดี่ยวเทียบกับ fingerprint ของตำรับยา ซึ่งข้อมูลนี้จะถูกเก็บไว้ในฐานข้อมูลของศูนย์วิจัยเพื่อเป็นประโยชน์ในการศึกษาขั้นต่อไปทั้งในกลุ่มของผู้วิจัยเอง และกลุ่มวิจัยอื่นๆที่สนใจอยากร่วมใช้ฐานข้อมูล ซึ่งรายละเอียดจะกล่าวในระเบียบวิธีวิจัยต่อไป

ตารางที่ 1 สารสำคัญที่มีรายงานว่าพบในสมุนไพรที่เป็นองค์ประกอบของตำรับยาลดความดัน

สมุนไพร	สารสำคัญที่พบ	มวลโมเลกุล
พริกไทย	Piperine	285.1
	Piperettine	311.4
	Chavicine	285.3
	Piperoleine A	315.4
	Piperoleine B	343.5
	Piperamine	287.3
	Pipercide	353.4
	Guineensine	383.5
	Dehydropipernonaline	339.4
	Piperolactam D	295.3
	Piplartine	317.3

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สมุนไพร	สารสำคัญที่พบ	มวลโมเลกุล
พริกไทย (ต่อ)	Brachyamide B	327.4
	(2,4)-N-Dodecadienoyl pyrrolidine	249.4
	N-trans-feruloyltyramine	313.4
	N-Formylpiperidine	113.2
	Pellitorine	223.4
	Coumaperine	257.0
	Acetyl coumaperine	299.0
	Trans-feruloyl piperidine	261.0
	Feruperine	287.0
	N-5-4 hydroxy-3-methoxy phenyl-2E pentenoyl piperidine	289.0
	Piperic acid	218.0
	Methyl piperate	232.0
	Piperamide (C7:1)	301.4
	Piperamide (C9:1)	329.4
	Piperamide (C5:1)	273.3
	Piperamide (C7:2)	299.4
	Piperamide (C9:2)	327.4
	Piperamide (C5:3)	325.4
	Piperamine	280.4
	Retrofractamide A	327.4
	Sarmentine	221.3
	Sarmentosin	275.3
	Trichostachine	271.3
	Myristicine	192.2
	myristicin	192.2
	Eugenol	164.2
	Cubebin	356.4
	Safrole	162.2
	3,4 dimethoxy-demethylenedioxy cubebin	373.4
	Piperenone	388.5

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สมุนไพร	สารสำคัญที่พบ	มวลโมเลกุล
พริกไทย (ต่อ)	Bergamotene	204.4
	Cadinene	204.4
	α-cadinol	222.4
	Calamenene	202.2
	Camphene	136.2
	Carvone	150.2
	Caryophyllene	204.4
	Cineol	154.3
	Citronellol	156.3
	Isoquercetin	464.4
	Isorhamnetin-3-o-rutinuside	624.6
	Kaemferol 3-o-glucoside	449.1
	Quercetin 3-o-β-galactoside	550.4
	Caffeic acid	180.2
	Capric acid	172.3
	Coumaric acid	164.0
	Dihydroxyphenylethanol	154.2
	Hentriacontane	436.9
	Lauric acid	200.3
	Linoleic acid	280.4
	piperonal	150.1
บอระเพ็ด	Borapetoside A	538.5
	Borapetoside B	552.6
	Borapetoside C	536.6
	Borapetoside D	698.7
	Borapetoside E	536.6
	Borapetoside F	534.6
	Salsolinol	179.1
	Higenamine	271.0
	Adenosine	167.0

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สมุนไพร	สารสำคัญที่พบ	มวลโมเลกุล
บอระเพ็ด (ต่อ)	Rumphiol E	471.2
	20-hydroxyecdysone	480.6
	Cordioside	539.0
	Columbin	358.4
	Tinosporaside	492.0
	Cycloeucalenol	426.7
	Cycloeucalenone	424.7
	Bergenin	328.3
	N-trans-feruloyltyramine	313.4
	Secoisolariciresinol	362.4
	Apegenin	270.1
	Magnoflorine	342.4
	Berberine	371.8
	Palmatine	352.4
	Syringin	372.4
	Tinoscorside A	642.2
	Paprazine	283.3
	N-demethyl-N-formyldehydronuciferine	308.0
	N-formylnornuciferine	310.0
มะตูม	Imperatorin	270.3
	Luvangetin	258.3
	Auraptene	298.4
	Periplogenin	390.5
	Psolaren	186.2
	β-sitosterol	414.7
	Umbelliferone	162.1
	Aegeline	297.4
	Marmesin	246.3
	Skimmin	324.3
	Xanthotoxol	202.2

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สมุนไพร	สารสำคัญที่พบ	มวลโมเลกุล
มะตูม (ต่อ)	Alloimperatorin	270.3
	Quercetin	302.2\
	Limonene	136.2
	p-cymene	134.2
	Lupeol	426.8
	Eugenol	164.2
	Cuminaldehyde	148.2
	Marmeline	351.4
	Marmesiline	367.4
	Acetoxy methyl lutenyl hydroxycoumarin	288.0
	Isophellodenol C	246.0
	Hydroxyl-hydroxy methyl coumarin	273.0
	Marmelonine	270.0
	8-hydroxysmyrindiol	278.0
	Valencic acid	206.0
	Isogosferol	286.0
	Scoparone	206.0
	Decursinol	246.3
	Demethylsuberosin	230.1
	Isofraxidin	222.0
	Formylumbilliferone	190.0
	Xanthoarnol	262.3
เหงือกปลาหมอ	Spilanthol	221.0
	Magnolenin C	596.0
	3-o-methylgalactoside	194.0
	Ebractetoside A	519.2
	Ebractetoside B	583.3
	Ebractetoside C	467.2
	Ebractetoside D	437.2
	Isofucosterol	412.0

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สมุนไพร	สารสำคัญที่พบ	มวลโมเลกุล
เหงือกปลาหมอ (ต่อ)	Campsterol	400.1
	β-sitosterol	414.7
	Apigenin 7-o- β-D-methylglucuronate	460.0
	Apigenin 7-o- β-D-methylglucuronate	446.0
	Amyrin	466.7
	Verbascoside	625.6
	Plucheoside B	388.5
	Zizybeoside I	432.2
	Leucosceptoside	639.6
	Martynoside	652.6
	Vicenin	594.5
	B-hydroxy acteoside	640.6
	Schaftoside	564.5
กระชาย	Boesenbergin A	404.5
	Boesenbergin B	404.5
	Pinostrobin	270.3
	Pinocembrin	256.3
	Panduratin A	406.5
	Sakuranetin	286.3
	Cardamonin	270.3
	Hydroxypanduratin A	392.5
	Helichrysetin	286.3
	Trihydroxydihydrochalcone	258.3
	Avangoletin	272.3
	Dihydro 5,6 dehydrokawain	230.0
	Alpinetin	270.3
	Rotepoxide	362.3
	Zeylenol	384.4
	Boesenboxide	424.4
	Isopimaric acid	302.5

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สมุนไพร	สารสำคัญที่พบ	มวลโมเลกุล
กระชาย (ต่อ)	2-hydroxy-4-4'-6'-trimethoxychalcone	314.3
	Chrysin	254.2
	Panduratin D	430.0
	Panduratin E	472.0
	Panduratin F	540.0
	Panduratin G	540.0
	Panduratin H	298.0
	Panduratin I	298.0
	Panduratin C	422.5
	Nicolaioidesin B	406.2
แห้วหมู	Valencene	204.4
	Nootkatone	218.3
	Caryophyllene α-oxide	220.4
	Cyperolone	236.0
	10,12-peroxycalamenene	232.0
	4,7-dimethyl-tetralone	160.0
	1,2,3,4-tetrahydronaphthalin	286.0
	Cyperotundol	272.1
	Salicylic acid	138.1
	Caffeic acid	180.2
	Protocatechuic acid	182.2
	p-coumaric acid	164.2
	Pongamone A	366.3
	Biochanin A	284.3
	7,8-dihydroxy-5,6-methylenedioxyflavone	298.0
	Quercetin	302.0
	Kaempferol	286.0
	Luteolin	286.0
	Ginkgetin	566.0
	Isoginkgetin	566.5

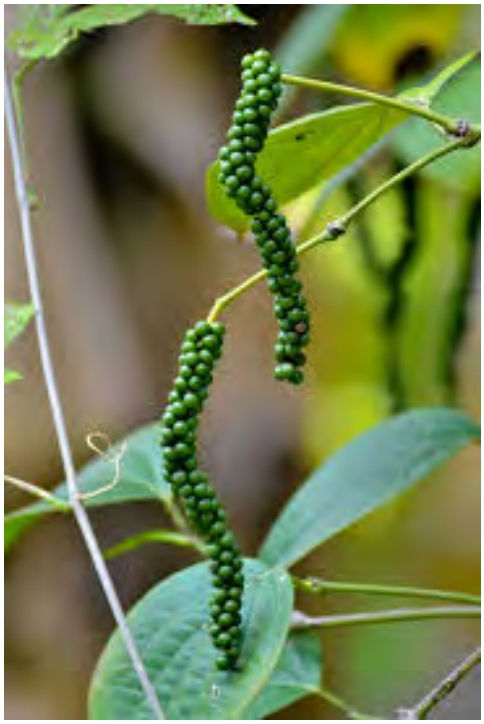
มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สมุนไพร	สารสำคัญที่พบ	มวลโมเลกุล
แห้วหมู (ต่อ)	Norcyperone	222.0
	Clovane-2, 9-diol	238.0
	Rosenonolactone	316.0
	Rotundine A	231.0
	Rotundine B	233.3
	Rotundine C	233.3
	Cyperene	204.4
	β-silinene	204.4
	α-cyperone	218.3
	Sugetriol triacetate	378.5
	Cyprotene	192.3
	Cypera-2 4 diene	202.3
	α-copaene	204.4
	Uselinene	204.3
	Rotundene	204.4
	Ylanga-2,4-diene	202.3
	g-gurjunene	204.3
	trans-calamenene	202.3
	d-calacorene	204.3
	g-calacorene	200.3
	epi-a-selinene	204.3
	Muarolene	204.4
	Cadalene	198.0
	Cyperotundone	216.4
	Mustakone	218.3
	Cyperol	220.4
	Isocyperol	220.4
	Khellin	260.2
	Visnagin	230.2
	Sitosteryl-β-galactopiranoside	1,024.0

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สมุนไพร	สารสำคัญที่พบ	มวลโมเลกุล
แห้วหมู (ต่อ)	Ammiol	276.2
	Tricin	330.3
	Isorahamnetin	316.3
	4,5-secoeudesmane	210.4
	γ-cymene	134.2
	Isokobusone	222.3
	Kobusone	222.3

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University



รูปที่ 1 พริกไทย (*Piper nigrum*)

รูปที่ 2 บอระเพ็ด (*Tinospora crispa*)

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

รูปที่ 3 มะตูม (*Aegle marmelos*)

รูปที่ 4 กระชาย (*Boesenbergia pandurata*)

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

รูปที่ 5 เหงือกปลาหมอ (*Acanthus ebracteatus*)

รูปที่ 6 แห้วหมู (*Cyperus rotusdus*)

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

วัตถุดิบสมุนไพรทั้ง 6 ชนิดได้แก่ พริกไทย บอระเพ็ด มะตูม กระชาย เหงือกปลาหมอและแห้วหมู ได้รับมาจากคลินิกวิโรจน์แผนไทย อ.พรหมคีรี จ.นครศรีธรรมราช ในลักษณะทั้งที่เป็นสมุนไพรที่ยังไม่บดและสมุนไพรที่บดเรียบร้อยแล้ว โดยสมุนไพรที่ยังไม่บดนำมาใช้ในการตรวจสอบเอกลักษณ์โดยดูจากลักษณะภายนอกโดยอาจารย์นิรันดร์ วิพันธุ์เงิน ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ส่วนสมุนไพรที่บดแล้วทำการสั่งซื้อมา 10 ชุดการผลิตในช่วงระหว่างเดือนธันวาคม พ.ศ. 2555 ถึงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2556 เพื่อนำมาใช้ในการสร้าง fingerprint ระบุสารสำคัญและวิเคราะห์เชิงปริมาณเพื่อควบคุมคุณภาพต่อไป

เครื่องมือและวัสดุที่ใช้ในงานวิจัย

1. LC-MS (Ultimate 3000)
2. Dionex LC-MS column
3. Rotary evaporator (Buchi)
4. เครื่องชั่งชนิดอ่านค่าได้ละเอียด 4 ตำแหน่ง (Analytical balance, Ohaus)
5. pH meter (Mettler)
6. Sonicated bath
7. Vortex mixer
8. Freeze drier
9. Magnetic stirrer/ Hot plate
10. HPLC vials
11. Pipetman micropipette ขนาด 1-10 µl, 10-100 µl และ 100-1,000 µl
12. Pipette tip
13. Eppendorf tube ขนาด 1.5 ml
14. Acetonitrile (HPLC grade)
15. Water (DI and HPLC grade)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

16. Formic acid (AR grade)
17. *n*-hexane (AR grade)
18. Dichloromethane (AR grade)
19. Ethyl acetate (AR grade)
20. สารมาตรฐาน piperine
21. สารมาตรฐาน adenosine
22. สารมาตรฐาน salsolinol
23. สารมาตรฐาน higenamine
24. สารมาตรฐาน imperatorin
25. สารมาตรฐาน pinostrobin
26. สารมาตรฐาน pinocembrin
27. สารมาตรฐาน verbascoside

วิธีการวิจัย

การสกัดสารจากวัตถุดิบสมุนไพร

เนื่องจากผู้ป่วยรับประทานยาตำรับนี้ในรูปแบบยาลูกกลอน ไม่ใช่แค่ต้มด้วยน้ำ หรือเหล้าแล้วรับประทาน ซึ่งทำให้ผู้ป่วยได้รับสารทั้งหมดที่มีอยู่ในตำรับ ดังนั้นการสกัดสารเพื่อนำมาศึกษาวิเคราะห์จึงต้องเป็นวิธีที่สกัดสารเกือบทั้งหมดออกมาจากตำรับได้ ในที่นี้ผู้วิจัยจะทำการเปรียบเทียบวิธีการสกัดแบบไล่ขั้ว (เปลี่ยนตัวทำละลาย) กับวิธีการสกัดแบบซ้ำ (ใช้ตัวทำละลายเดิม)

โดยวิธีการไล่ขั้วจะเริ่มโดยใช้ตัวทำละลาย 400 ml โดยเริ่มจาก *n*-hexane และสกัดผงตำรับสมุนไพร 50 g โดยการ sonicate (เพื่อช่วยสกัดสารจากสมุนไพรที่มีผนังเซลล์หนา) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเทสารละลายเก็บไว้ เติม *n*-hexane ลงในผงสมุนไพรอันเก่าและทำการ sonicate เช่นเดิม ทำเช่นนี้จนครบสามรอบจากนั้นนำผงสมุนไพรที่ผ่านการสกัดด้วย *n*-hexane มาสกัดต่อด้วย dichloromethane โดยใช้วิธีการสกัดเดียวกันกับการสกัดด้วย *n*-hexane จากนั้นนำผงสมุนไพรที่ผ่านการสกัดด้วย dichloromethane มาสกัดต่อด้วย ethyl acetate โดยใช้วิธีการสกัดแบบเดิม หลังจากนั้นนำผงสมุนไพรที่ผ่านการสกัดด้วย ethyl acetate มาสกัดต่อด้วยน้ำโดยใช้วิธีการสกัดแบบเดิม นำสารสกัดทั้งหมดที่ได้ในแต่ละส่วนไปทำให้แห้งโดยเครื่อง evaporator แต่ในส่วนของสารสกัดชั้นน้ำจะนำไป partition ต่อด้วย n-butanol แล้วจึงนำมาระเหยแห้ง ส่วนวิธีการสกัดแบบซ้ำทำโดยใช้ระบบตัวทำละลายที่สามารถละลายสารออกมาได้มากชนิด โดยในที่นี้ใช้ methanol:water ในอัตราส่วน 1:1 ซึ่งมีรายงานการใช้ระบบตัวทำละลายนี้ในการศึกษาทาง Metabolomics (Kim *et al*., 2010) โดยจะใช้วิธีการ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

sonication เป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง และทำซ้ำสามรอบโดยเปลี่ยนตัวทำละลายที่ใช้สกัดใหม่ทุกรอบ จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปทำให้แห้งโดยเครื่อง freeze drier นำสารสกัดไปเก็บในภาชนะปิดป้องกันแสงและความชื้น ที่ 4 °C ในส่วนของการสกัดเพื่อนำไปวิเคราะห์เชิงปริมาณจะทำการสกัดผงตำรับยาสมุนไพร 50 g ด้วย *n*-hexane 400 ml โดยการ sonicate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที สกัดซ้ำ 5 รอบ จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปทำให้แห้งโดยเครื่อง freeze drier นำสารสกัดไปเก็บในภาชนะปิดป้องกันแสงและความชื้น ที่ 4 °C แต่ละตัวอย่างทำ triplicate

การทำ fingerprint ของตำรับยาลดความดันและการระบุชนิดของสารโดยใช้เทคนิค LC-MS

นำสารสกัดที่ได้ในชั้นต่างๆไปวิเคราะห์ด้วย LC-MS ทำให้ได้ข้อมูล chromatogram ของสารสกัดตำรับยาลดความดัน ซึ่งในที่นี้จะเรียกว่า fingerprint โดยระบบที่ใช้คือ

LC instrument; Dionex Ultimate TM^{3000}, LC condition; stationary phase คือ Acclaim® 120, C18 ขนาด 2.1*150 mm pore size 3 µm; mobile phase เป็น 0.2% formic acid in water : acetonitrile ใช้ gradient mode ในเวลา 65 นาที เริ่มจาก 95% aq. สู่ 60% aq. ในเวลา 0-30 นาที คงที่ๆ 60% aq. เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นปรับ 60% aq. สู่ 20% aq. ในเวลา 35-50 นาที คงที่ๆ 20% aq. เป็นเวลา 9 นาที จากนั้นปรับกลับสู่ 95% aq. และรอระบบให้สมดุลอีก 5 นาที; injection volume 10 µl

MS instrument; Bruker Amazon SL, MS condition; ESI, capillary ± 4,500 volt nebulizer 2.00 bar, dry gas 7.0 L/min, dry temp. 200 °C, range of MW 70-2,000 in full scan ใช้ MRM ในการตรวจสอบ fragmentation ions โดยปรับ amplitude แตกต่างกันขึ้นกับชนิดของ precursor

แต่ละพีคที่ปรากฏคือสารสำคัญที่ประกอบอยู่ในตำรับซึ่งสามารถระบุชนิดของสารดังกล่าวได้โดยใช้ mass spectrum และ mass fragmentation ions ของ peak ที่ปรากฏใน fingerprint ของตำรับเทียบกับ fingerprint ของสมุนไพรเดี่ยวซึ่งมีข้อมูลทางพฤกษเคมีระบุถึงชนิดของสารสำคัญ และข้อมูล mass spectrum ของสารนั้นๆ ในกรณีที่ไม่มีข้อมูล mass spectrum ของสารดังกล่าว ก็ต้องทำการสั่งซื้อสารมาตรฐาน หรือแยกสารมาตรฐานในกรณีที่ไม่มีขาย แล้วมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS เพื่อสร้างเป็นฐานข้อมูลเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบต่อไป ซึ่งในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยตั้งเป้าหมายว่าจะสามารถระบุชนิดของสารต่างๆที่มีอยู่ในตำรับได้ไม่น้อยกว่า 10 ชนิด

การวิเคราะห์เชิงปริมาณและการทำ validation วิธีวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ด้วยเทคนิค LC-MS (ดัดแปลงมาจาก Association of Official Analytical Chemists, 2002)

หลังจากที่ระบุชนิดของสารสำคัญในตำรับยาสมุนไพรได้ตามที่กำหนดแล้วก็จะทำการคัดเลือกสารสำคัญตัวแทน (selective markers) เพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณโดย LC-MS ซึ่งจะทำการหาระบบการวิเคราะห์ที่เหมาะสมอีกครั้งโดยการปรับอัตราส่วนของ mobile phase โดยใช้ stationary

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

phase เช่นเดิมโดยระบบที่ได้เป็น gradient mode ในเวลา 25 นาที เริ่มจาก 60% aq. สู่ 20% aq. ในเวลา 0-15 นาที คงที่ๆ 20% aq. เป็นเวลา 4 นาที จากนั้นปรับกลับสู่ 60% aq. และรอระบบให้สมดุลอีก 5 นาที ในส่วนของ MS จะใช้เพียงแค่ ESI-positive mode และปรับ range of MW 100-500 เท่านั้น

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

สารมาตรฐาน piperine imperatorin และ pinostrobin ได้มาจากการสั่งซื้อจากบริษัท Sigma โดยทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานที่เป็น stock solution โดยชั่งสารอย่างละ 1 mg ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 1 ml ละลายและปรับปริมาตรด้วย acetonitrile 80% ต่อ 0.2% formic acid (in aq.) 20% แล้วนำไปกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 µm จากนั้นทำการเตรียมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ piperine 0.25, 0.5, 2.5, 5 และ 10 µg/ml; imperatorin 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1 µg/ml; pinostrobin 0.04, 0.2, 0.4, 2.0 และ 4 µg/ml

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

นำสารสกัดตำรับยาสมุนไพรด้วย hexane มา 10 mg ใส่ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 5 ml ละลายและปรับปริมาตรด้วย acetonitrile 80% ต่อ 0.2% formic acid (in aq.) 20% แล้วนำไปกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 µm ก่อนทำการวิเคราะห์

การประเมิน Linearity

ทำการประเมิน Linearity เพื่อดูความสัมพันธ์ของสัญญาณการวิเคราะห์กับความเข้มข้นว่าเป็นสมการเส้นตรงตาม Beer's law หรือไม่ โดยการสร้าง calibration curve ของสารมาตรฐานในช่วงความเข้มข้นที่เตรียมไว้ แล้วหาความสัมพันธ์ในรูปสมการเส้นตรงจากนั้นให้ทำการพิจารณา Linearity จากค่า r^2 ที่ได้จากสมการนั้น ค่า r^2 ที่ยอมรับได้ควรจะมีค่ามากกว่า 0.999 โดยจะทำการแบ่งตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์เป็น 3 ซ้ำ (triplicate)

การประเมินความเที่ยงของการวิเคราะห์ (Precision)

การประเมินความเที่ยงนั้นมีจุดประสงค์เพื่อที่จะตรวจสอบว่าในการวิเคราะห์แต่ละครั้ง หรือแต่ละวันนั้นวิธีดังกล่าวสามารถที่จะวิเคราะห์ให้ค่าที่เหมือนกันหรือได้ค่าที่ใกล้เคียงกันได้หรือไม่ การประเมินความเที่ยงทำได้ 2 วิธีคือการทำ Repeatability และ Reproducibility

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Repeatability (Intra-day analysis)

ทำการประเมินโดยวิเคราะห์ปริมาณสารมาตรฐาน piperine imperatorin และ pinostrobin ในตำรับยาสมุนไพร โดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่างสารสกัด 6 ครั้ง คำนวณหาปริมาณสารมาตรฐานที่วิเคราะห์ในแต่ละครั้ง และคำนวณค่า Relative Standard Deviation (%RSD) ของการวิเคราะห์ทั้ง 6 ครั้ง โดยค่า % RSD ที่ยอมรับได้ว่าวิธีการวิเคราะห์มี Repeatability ดีต้องไม่เกิน 5% โดยจะทำการแบ่งตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์เป็น 3 ซ้ำ (triplicate)

Reproducibility (Inter-day analysis)

ทำการประเมินโดยเตรียมสารสกัดโดยวิธีเดียวกัน 3 ครั้งโดยทำการสกัดคนละวันกันแล้วนำมาวิเคราะห์ปริมาณ piperine imperatorin และ pinostrobin ในสารสกัด คำนวณหาค่าความเข้มข้น และ %RSD ของสารสกัดที่วิเคราะห์ทั้ง 3 ครั้ง ค่า %RSD ที่ยอมรับได้ว่าวิธีการวิเคราะห์มี Reproducibility ดีต้องไม่เกิน 5% โดยจะทำการแบ่งตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์เป็น 3 ซ้ำ (triplicate)

การประเมินความแม่นยำหรือถูกต้องของการวิเคราะห์ (Accuracy)

เพื่อตรวจสอบว่าวิธีวิเคราะห์นั้นมีความถูกต้องในการวิเคราะห์สาร หรือให้ค่าความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ใกล้เคียงกับค่าความเข้มข้นที่แท้จริง ในการประเมินจะใช้หลักการ Standard Addition (Spiking Technique) โดยการปิเปตสารละลายมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนมา 1 ml เติมลงในสารสกัด (ที่ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิดแล้ว) 1 ml ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณ piperine imperatorin และ pinostrobin จากนั้นคำนวณหาค่า % recovery ของสารมาตรฐานทั้งสี่ตัว ที่เติมลงไปในสารสกัด โดยจะทำการแบ่งตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์เป็น 3 ซ้ำ (triplicate)

การประเมิน Specificity

การทำ Specificity เพื่อพิสูจน์ว่า peak ที่แยกและปรากฏใน chromatograms นั้นเป็นสารเดียวตลอดทั้ง peak หรือไม่ หรือมีสารอื่นปนออกมากับสารที่ต้องการวิเคราะห์ โดยการตรวจสอบ mass spectrum และ mass fragmentation ions ของ peak สารมาตรฐาน

การสุ่มวิเคราะห์ตัวอย่างตำรับยาลดความดัน

โดยจะทำการเก็บตัวอย่างวัตถุดิบจากคลินิกวิโรจน์แผนไทยในจังหวัดนครศรีธรรมราชเป็นจำนวน 10 ชุดการผลิต เพื่อเฉลี่ยผลจากวัตถุดิบที่เก็บมาต่างครั้งกัน จากนั้นนำมาสกัดด้วยวิธีการสกัดที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์เชิงปริมาณ แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธีวิเคราะห์ที่ผ่านการทำ validation ตามหัวข้อนี้และกำหนดปริมาณจากค่าเฉลี่ยให้เป็นค่ามาตรฐานที่พึงมีของสารสำคัญทั้ง 3 ตัวในตำรับนี้

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 4

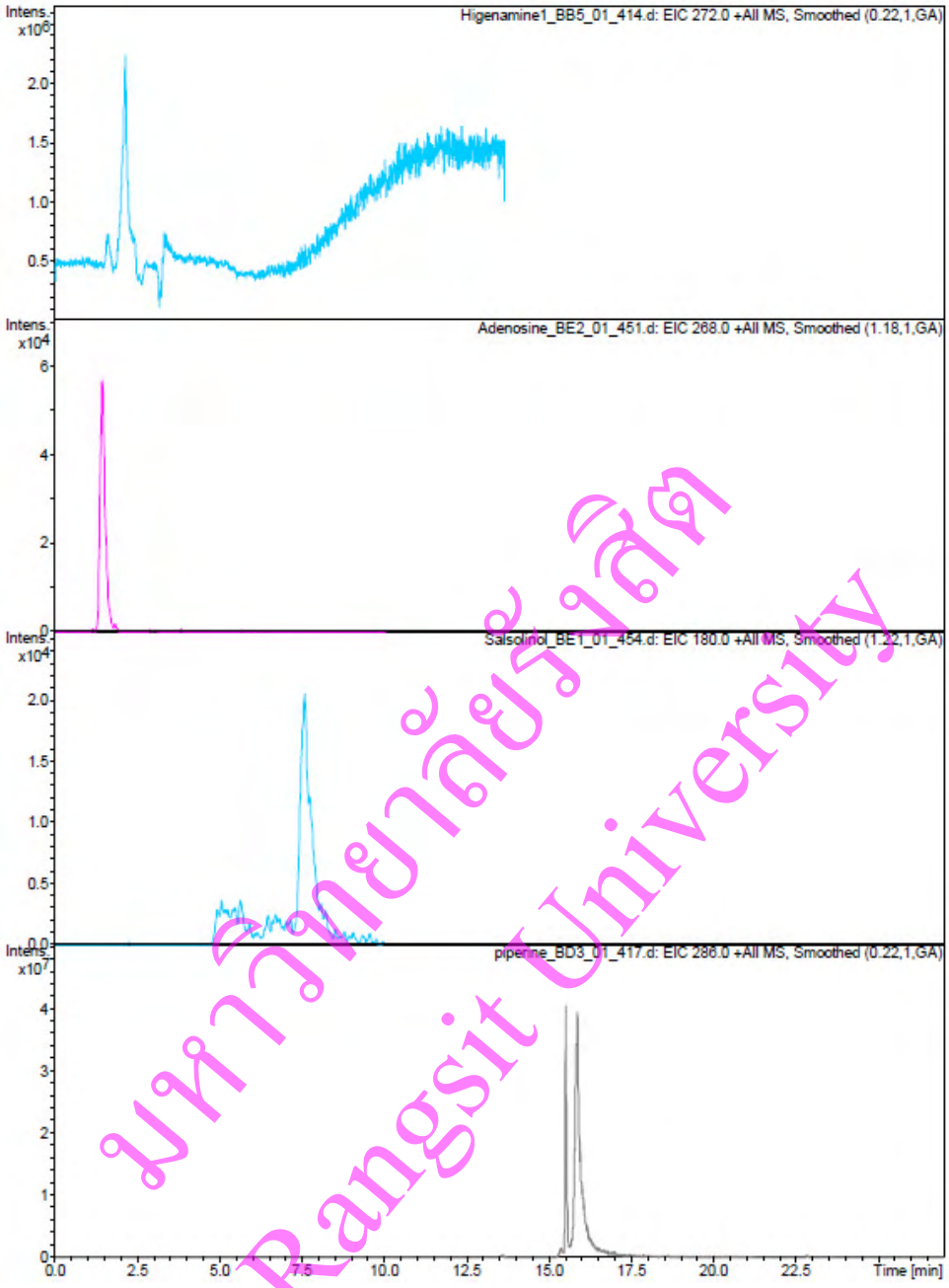
ผลการวิจัย

ผู้วิจัยได้ศึกษาข้อมูลชนิดและปริมาณของสารสำคัญที่มีอยู่ในสมุนไพรที่ประกอบอยู่ในตำรับยาลดความดันสูตรที่สนใจ ซึ่งจะต้องเป็นการวัดทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ โดยการวัดในเชิงคุณภาพคือการทำ fingerprint โดยใช้เทคนิคทาง liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) และต้องทำการระบุให้ได้ว่าสารที่อยู่ใน fingerprint คือสารชนิดไหนเพื่อที่จะได้เป็นข้อมูลเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการใช้เป็น marker เพื่อติดตามวิเคราะห์สารต่อไป ส่วนการวัดในเชิงปริมาณก็จะใช้เทคนิคเดียวกัน แต่ต้องมีการทดลองรับรองคุณภาพว่าวิธีการทดลองที่ใช้มีความถูกต้องแม่นยำ ซึ่งเราจะเรียกว่าการทำ method validation ซึ่งการวิเคราะห์หาปริมาณจะนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านการควบคุมคุณภาพตำรับยา เป็นต้น

พัฒนาวิธีการสกัดสารจากสมุนไพรและจากตำรับยา

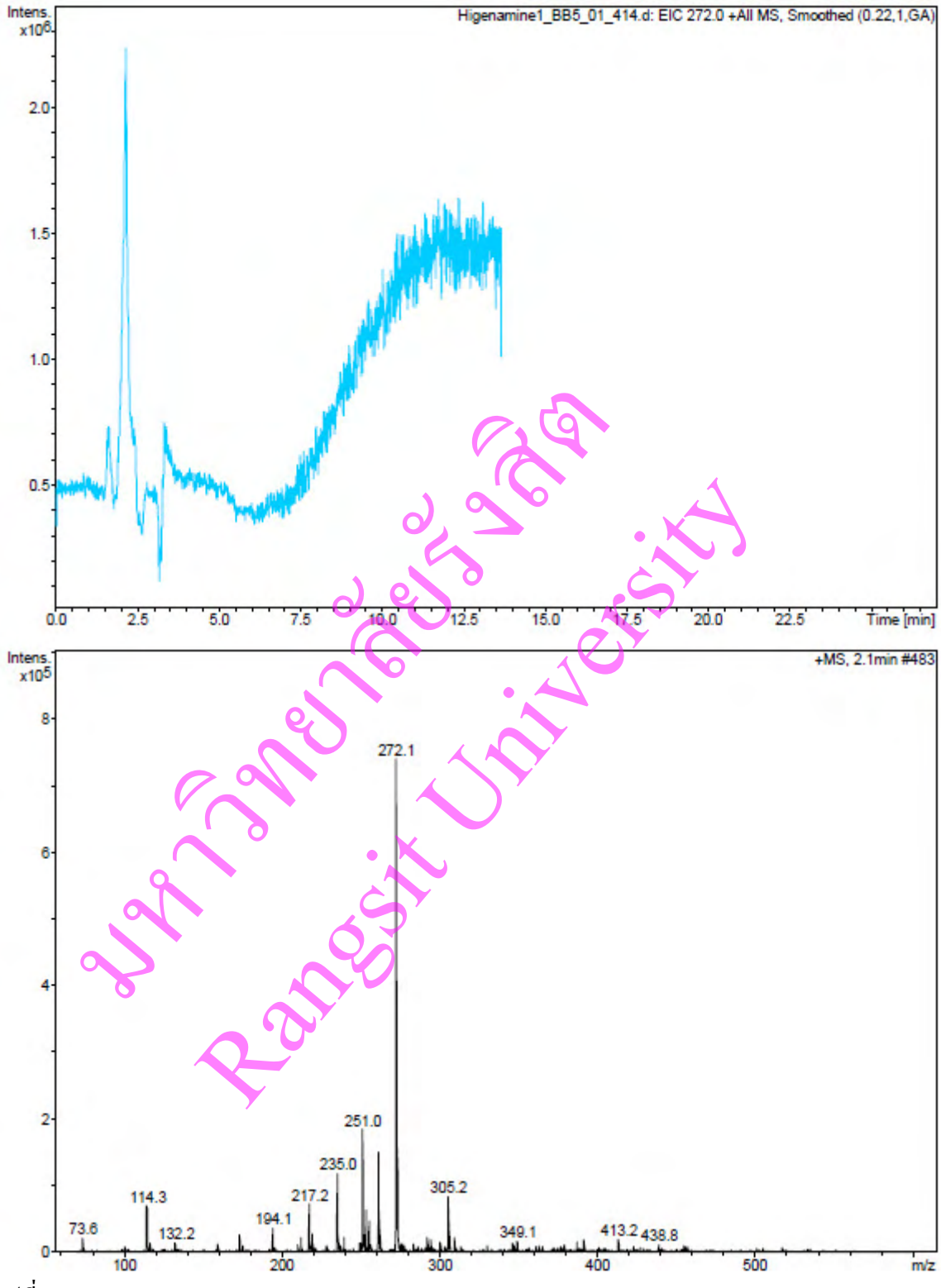
เนื่องจากผู้ป่วยรับประทานยาตำรับนี้ในรูปแบบยาลูกกลอน ไม่ใช่แค่ต้มด้วยน้ำหรือเหล้าแล้วรับประทาน ซึ่งทำให้ผู้ป่วยได้รับสารทั้งหมดที่มีอยู่ในตำรับ ดังนั้นการสกัดสารเพื่อนำมาศึกษาวิเคราะห์จึงต้องเป็นวิธีที่สกัดสารทั้งหมดออกมาจากตำรับได้ และต้องทำการสกัดสารมาตรฐานตัวที่สนใจ คือ piperine adenosine salsolinol และ higenamine ออกมาได้ในปริมาณมากด้วยเช่นกัน (โดยสารมาตรฐานทั้ง 4 ตัวทำการสั่งซื้อจากบริษัทต่างๆ และนำมาทดสอบยืนยันโดย ESI positive mode mass spectrum ดังแสดงในรูปที่ 7-11) ที่สนใจสาร 4 ตัวนี้ มีเหตุผลสืบเนื่องมาจากก่อนทำการวิจัยผู้วิจัยมีข้อมูลเฉพาะสารเหล่านี้ว่าพบในสมุนไพรที่ประกอบอยู่ในตำรับยานี้และสารเหล่านี้มีฤทธิ์ช่วยลดความดันจึงคิดจะใช้สารทั้ง 4 ตัวเป็น selective markers ในการวิเคราะห์ปริมาณเพื่อควบคุมคุณภาพตำรับยา ส่วน fingerprint จะใช้ประกอบในการสร้างข้อกำหนดมาตรฐานเชิงคุณภาพเท่านั้น ในที่นี้ผู้วิจัยจะทำการเปรียบเทียบวิธีการสกัดแบบไล่ขั้ว (เปลี่ยนตัวทำละลาย) กับวิธีการสกัดแบบซ้ำ (ใช้ตัวทำละลายเดิม)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University



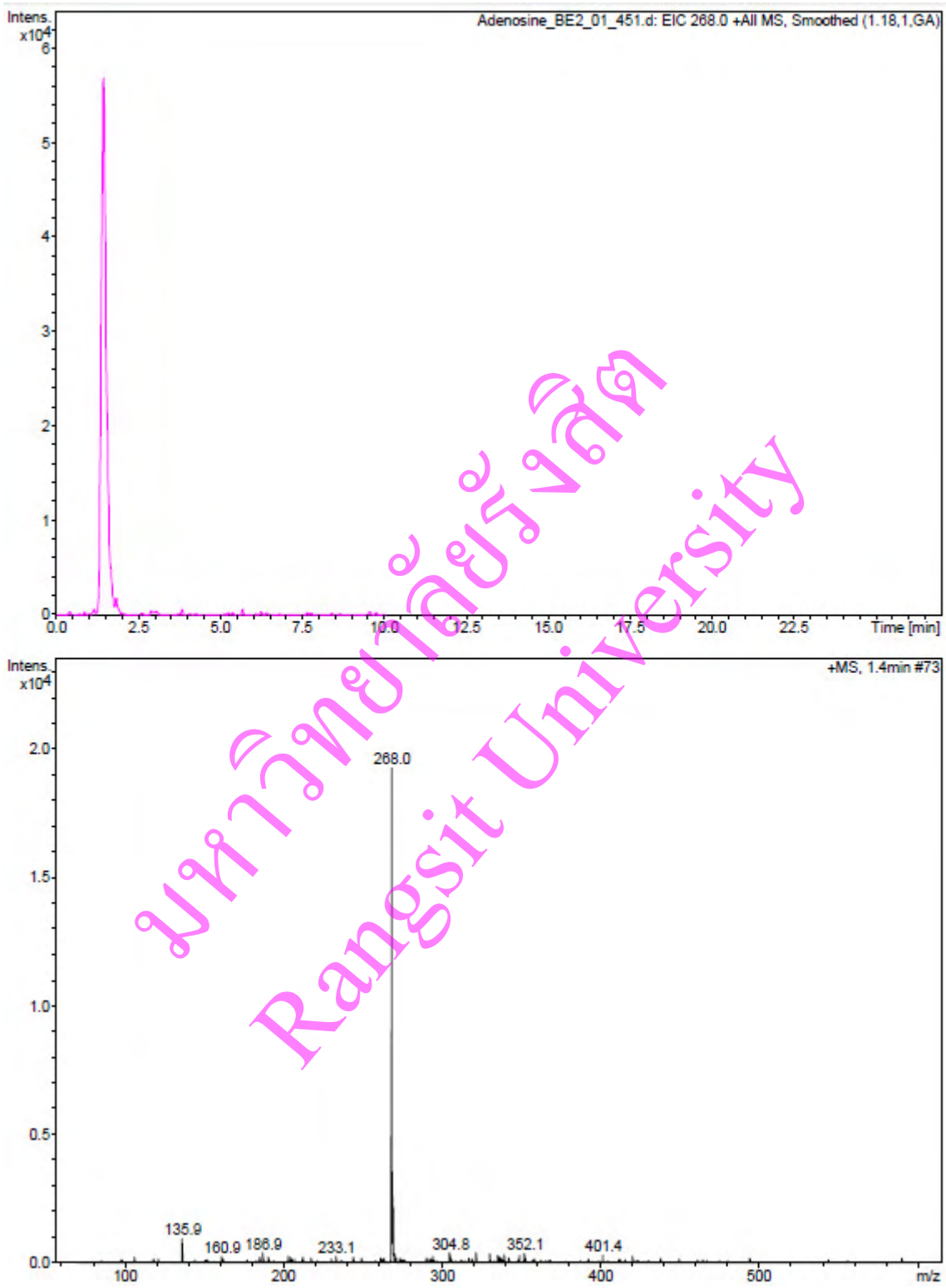
รูปที่ 7 chromatogram ของสารมาตรฐาน higenamine adenosine salsolinol และ piperine

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University



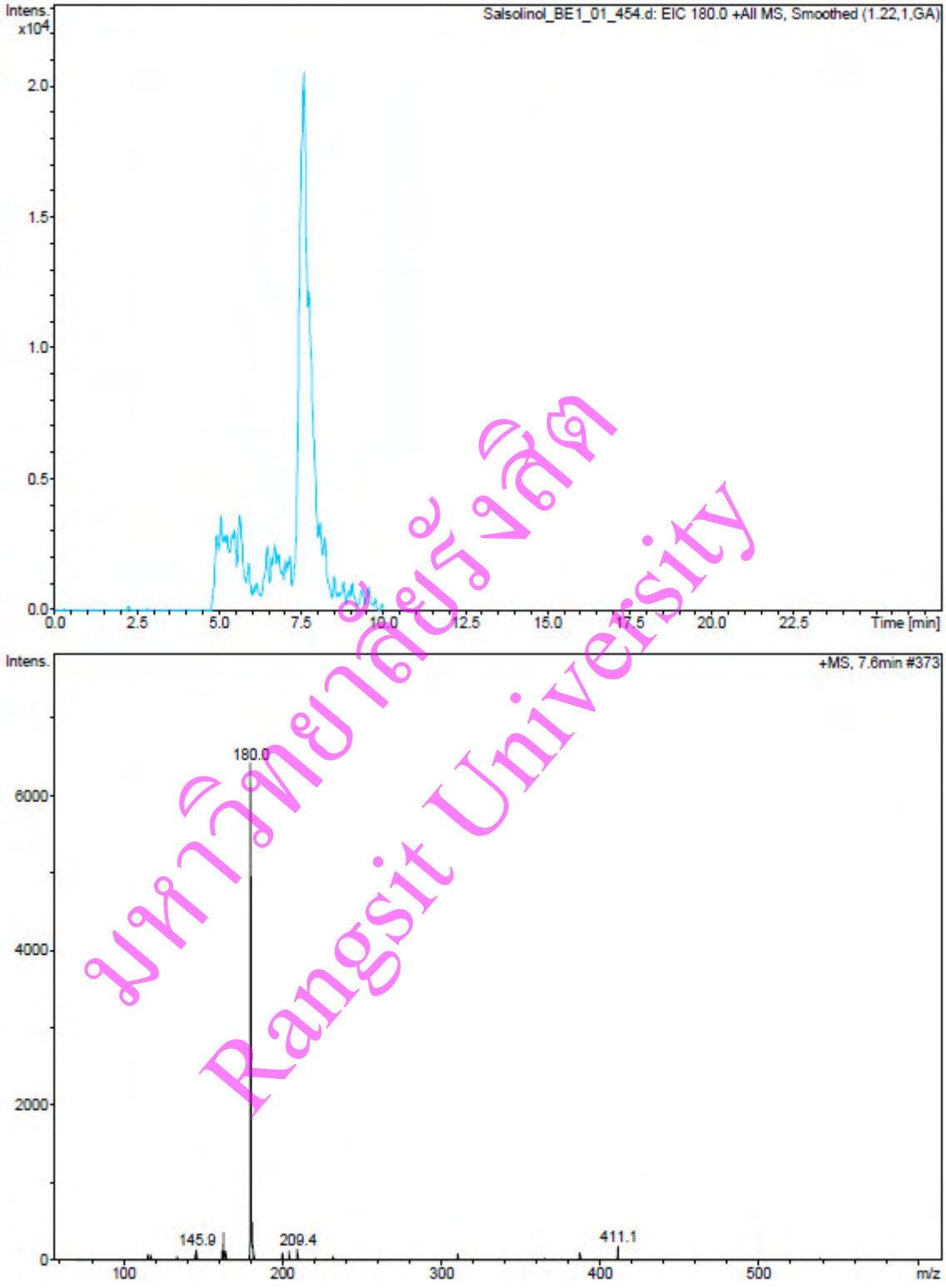
รูปที่ 8 chromatogram และ mass spectrum ของ higenamine

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University



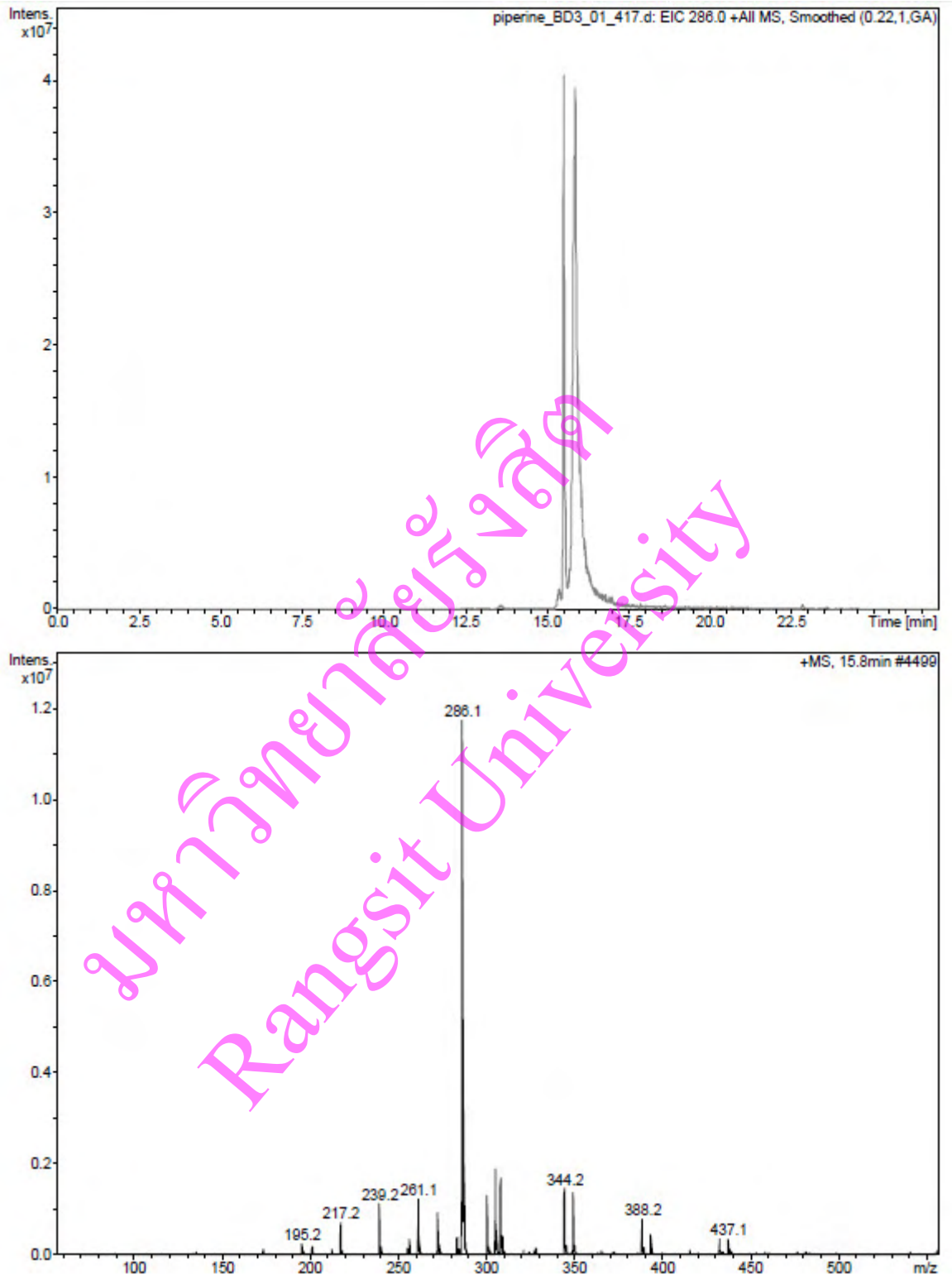
รูปที่ 9 แสดง chromatogram และ mass spectrum ของ adenosine

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University



รูปที่ 10 แสดง chromatogram และ mass spectrum ของ salsolinol

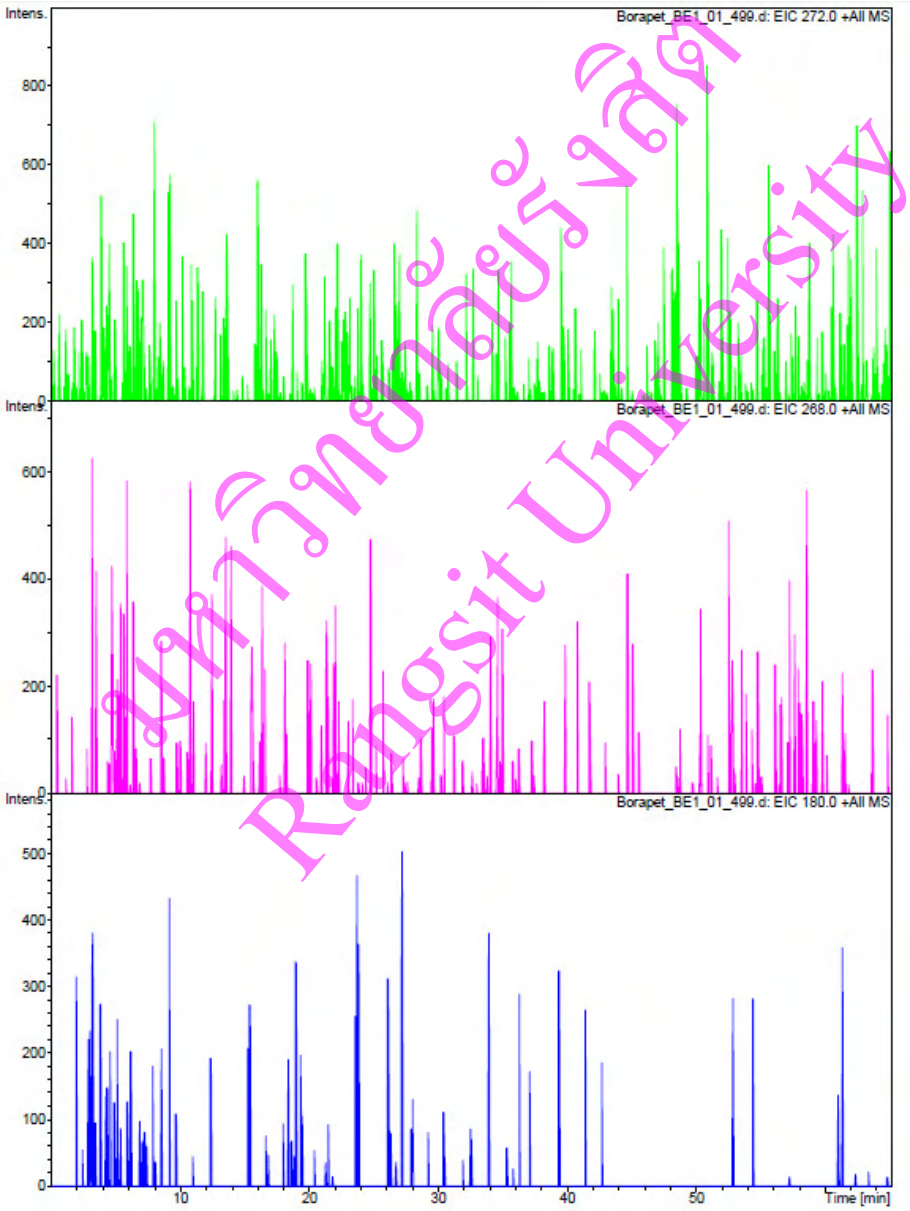
มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University



รูปที่ 11 แสดง chromatogram และ mass spectrum ของ piperine

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

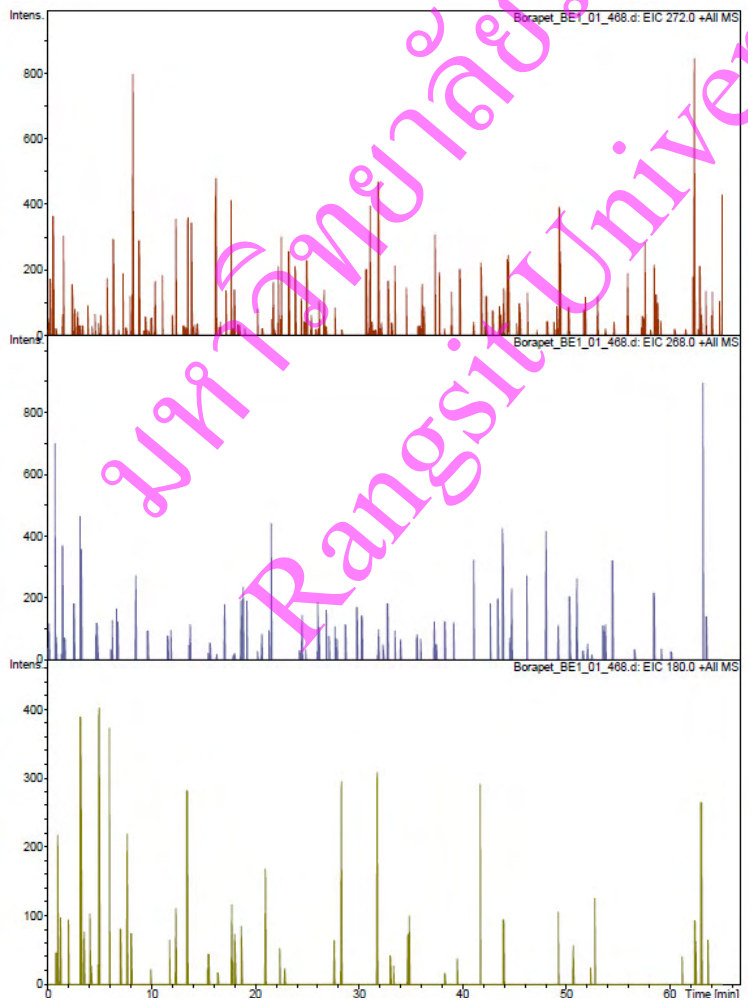
เนื่องจากทราบว่า higenamine, adenosine และ salsolinol พบในปริมาณที่น้อยมากในบอระเพ็ด และในตำรับยาก็มีบอระเพ็ดประกอบอยู่เพียงแค่ร้อยละ 10 ผู้วิจัยจึงลองใช้วิธีการสกัดที่จะใช้ในงานวิจัยนี้สกัดบอระเพ็ดและติดตามปริมาณสารที่สนใจก่อน เริ่มจากวิธีการสกัดแบบซ้ำทำโดยใช้ระบบตัวทำละลายที่สามารถละลายสารออกมาได้มากชนิด โดยในที่นี้ใช้ methanol:water ในอัตราส่วน 1:1 สกัดบอระเพ็ดโดยจะใช้วิธีการ sonication เป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง และทำซ้ำสามรอบโดยเปลี่ยนตัวทำละลายที่ใช้สกัดใหม่ทุกรอบ จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปทำให้แห้งโดยเครื่อง freeze drier และนำไปวิเคราะห์ด้วย LC-MS ผลคือไม่สามารถตรวจวัดเจอ higenamine, adenosine และ salsolinol ดังรูปที่ 12



รูปที่ 12 สัญญาณ noise จากการวิเคราะห์ extracted ion mass spectrum; บนลงล่าง คือ higenamine adenosine และ salsolinol ตามลำดับ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

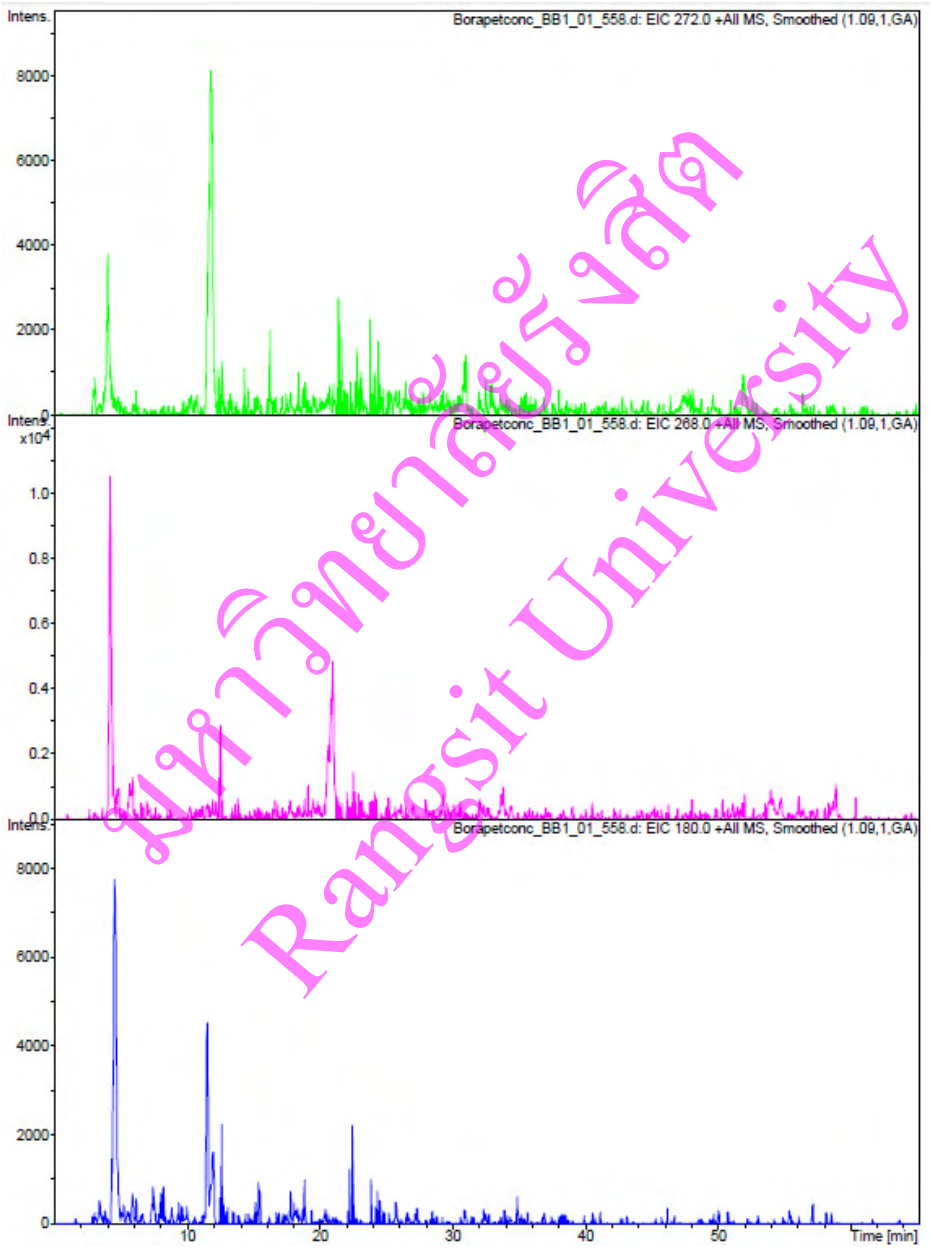
วิธีการสกัดแบบที่สองคือ การสกัดแบบไล่ขั้วจะเริ่มโดยใช้ *n*-hexane และสกัดสารโดยการ sonicate (เพื่อช่วยสกัดสารจากสมุนไพรที่มีผนังเซลล์หนา) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเทสารละลายเก็บไว้ เติม *n*-hexane ลงในผงสมุนไพรอันเก่าและทำการ sonicate เช่นเดิม ทำเช่นนี้จนครบสามรอบจากนั้นนำผงสมุนไพรที่ผ่านการสกัดด้วย *n*-hexane มาสกัดต่อด้วย acetone โดยใช้วิธีการสกัดเดียวกันกับการสกัดด้วย *n*-hexane จากนั้นนำผงสมุนไพรที่ผ่านการสกัดด้วย acetone มาสกัดต่อด้วยน้ำ โดยใช้วิธีการสกัดแบบเดิม นำสารสกัดทั้งหมดที่ได้ในแต่ละส่วนไปทำให้แห้งโดยเครื่อง evaporator หรือเครื่อง freeze drier (วิธีการสกัดนี้ทำตาม proposal) เนื่องจากการวิเคราะห์สนใจปริมาณ higenamine, adenosine, salsolinol จากบอระเพ็ดและ piperine จากพริกไทย ดังนั้นการสกัดสารจึงต้องสามารถสกัดสารดังกล่าวออกมาจากบอระเพ็ด และพริกไทยได้ โดย higenamine, adenosine, salsolinol จะละลายได้ดีในน้ำ และไม่ละลายใน hexane และ acetone ผู้วิจัยจึงนำสารสกัดชั้นน้ำที่ได้มาวิเคราะห์แต่ปรากฏว่าไม่พบสารทั้ง 3 ตัวดังกล่าวดังรูปที่ 13



รูปที่ 13 สัญญาณ noise จากการวิเคราะห์ extracted ion mass spectrum; บนลงล่าง คือ higenamine adenosine และ salsolinol ตามลำดับ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ดังนั้นผู้วิจัยจึงต้องเปลี่ยนวิธีการสกัดใหม่โดยทำการทดลอง sonicate ผงบอระเพ็ดในน้ำ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาทีทำซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นกรองและนำชั้นน้ำมา partition ด้วย n-butanol 4 ครั้ง นำสารละลายชั้น n-butanol มาระเหยแห้ง และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS เช่นเดิม ผลปรากฏว่าสามารถตรวจวัดสารทั้งสามตัวได้ ดังแสดงในรูปที่ 14 ส่วน piperine นั้นสามารถวิเคราะห์เจอได้ในทุกๆแบบของการสกัดจึงไม่เป็นปัญหาแต่อย่างใด



รูปที่ 14 สัญญาณของ higenamine, adenosine และ salsolinol ในสารสกัด n-butanol ของบอระเพ็ดตามลำดับจากบนลงล่าง

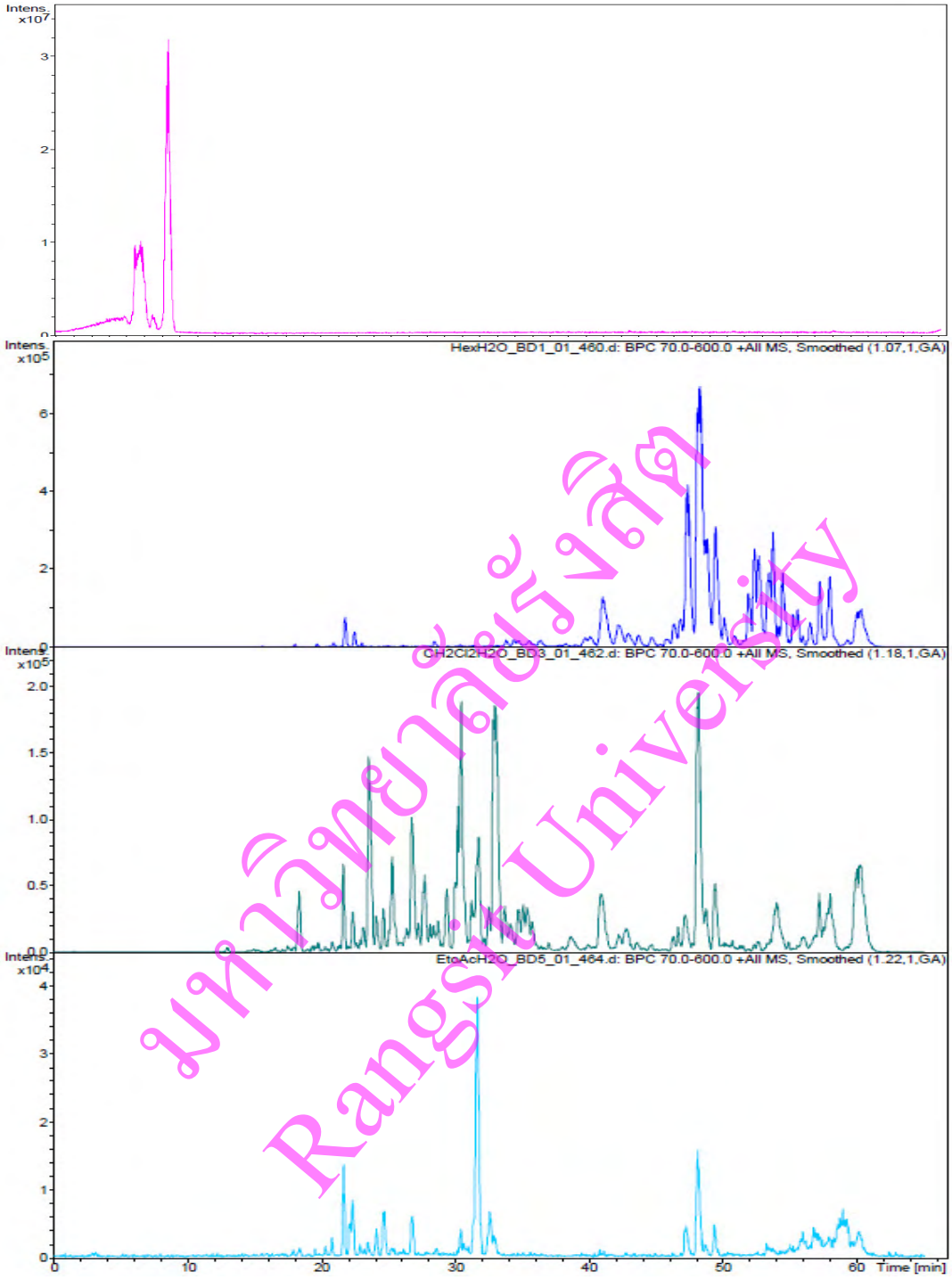
มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

จากผลการทดลองที่ได้ในการหาวิธีการสกัด ผู้วิจัยจึงเลือกที่จะใช้การสกัดแบบไล่ขั้ว (เปลี่ยนตัวทำละลาย) และจากข้อมูลที่เพิ่มขึ้นทำให้พบว่าการใช้ตัวทำละลายเพียงแค่ 3 ชนิดอาจไม่เพียงพอต่อการสกัดและจำแนกสารสำคัญดังนั้นผู้วิจัยจึงเปลี่ยนลักษณะของการสกัดแบบไล่ขั้วเป็นดังนี้คือ ใช้ตัวทำละลาย 400 ml โดยเริ่มจาก *n*-hexane และสกัดผงตำรับสมุนไพร 50 g โดยการ sonicate (เพื่อช่วยสกัดสารจากสมุนไพรที่มีผนังเซลล์หนา) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเทสารละลายเก็บไว้ เติม *n*-hexane ลงในผงสมุนไพรอันเก่าและทำการ sonicate เช่นเดิม ทำเช่นนี้จนครบสามรอบจากนั้นนำผงสมุนไพรที่ผ่านการสกัดด้วย *n*-hexane มาสกัดต่อด้วย dichloromethane โดยใช้วิธีการสกัดเดียวกันกับการสกัดด้วย *n*-hexane จากนั้นนำผงสมุนไพรที่ผ่านการสกัดด้วย dichloromethane มาสกัดต่อด้วย ethyl acetate โดยใช้วิธีการสกัดแบบเดิม หลังจากนั้นนำผงสมุนไพรที่ผ่านการสกัดด้วย ethyl acetate มาสกัดต่อด้วยน้ำโดยใช้วิธีการสกัดแบบเดิม นำสารสกัดทั้งหมดที่ได้ในแต่ละส่วนไปทำให้แห้งโดยเครื่อง evaporator แต่ในส่วนของสารสกัดชั้นน้ำจะนำไป partition ต่อด้วย n-butanol แล้วจึงนำมาระเหยแห้ง

การสร้าง fingerprint และระบุสารสำคัญของตำรับยาลดความดัน

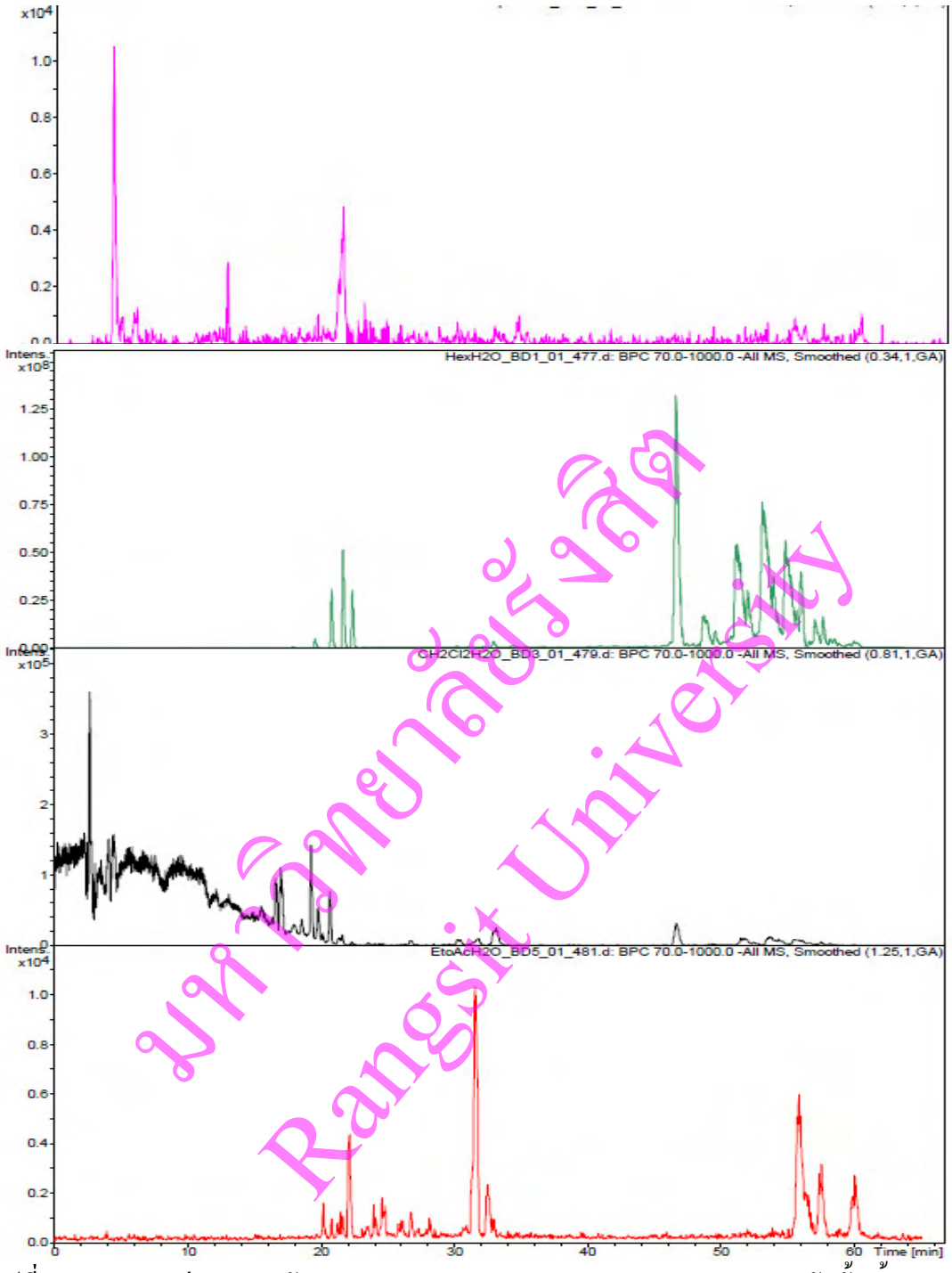
จากวิธีการสกัดแบบไล่ขั้วจะทำให้ได้สารสกัดตำรับยา 4 แบบคือ สารสกัดชั้น hexane สารสกัดชั้น dichloromethane สารสกัดชั้น ethyl acetate และสารสกัดชั้นน้ำที่ผ่านการ partition ด้วย n-butanol แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ fingerprint ต่อด้วยเครื่องมือ LC-MS ซึ่งมี ion source เป็น electrospray ionization (ESI) เพื่อทำให้ได้ chromatographic fingerprint ของสารสกัดชั้นต่างๆตามชนิดของกลุ่มสารสำคัญที่แตกต่างกันในสภาพขั้วและมวลโมเลกุล โดยการใช้ ESI จะทำให้เกิดมวลของสารสองแบบคือ มวลที่เป็นประจุบวก (positive charge ion) และมวลที่เป็นประจุลบ (negative charge ion) ดังนั้นจะทำให้ได้ chromatographic fingerprint 8 แบบคือ fingerprint ของสารสกัดชั้น hexane ใน ESI positive mode, fingerprint ของสารสกัดชั้น hexane ใน ESI negative mode, fingerprint ของสารสกัดชั้น dichloromethane ใน ESI positive mode, fingerprint ของสารสกัดชั้น dichloromethane ใน ESI negative mode, fingerprint ของสารสกัดชั้น ethyl acetate ใน ESI positive mode, fingerprint ของสารสกัดชั้น ethyl acetate ใน ESI negative mode, fingerprint ของสารสกัดชั้นน้ำใน ESI positive mode และ fingerprint ของสารสกัดชั้นน้ำใน ESI negative mode (รูปที่ 15 และรูปที่ 16)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University



รูปที่ 15 สัญญาณของ chromatographic fingerprint ของสารสกัดชั้นน้ำ hexane dichloromethane และ ethyl acetate ใน ESI positive mode ตามลำดับจากบนลงล่าง

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University



รูปที่ 16 จากบนลงล่าง แสดงสัญญาณของ chromatographic fingerprint ของสารสกัดชั้นน้ำ hexane dichloromethane และ ethyl acetate ใน ESI negative mode ตามลำดับ

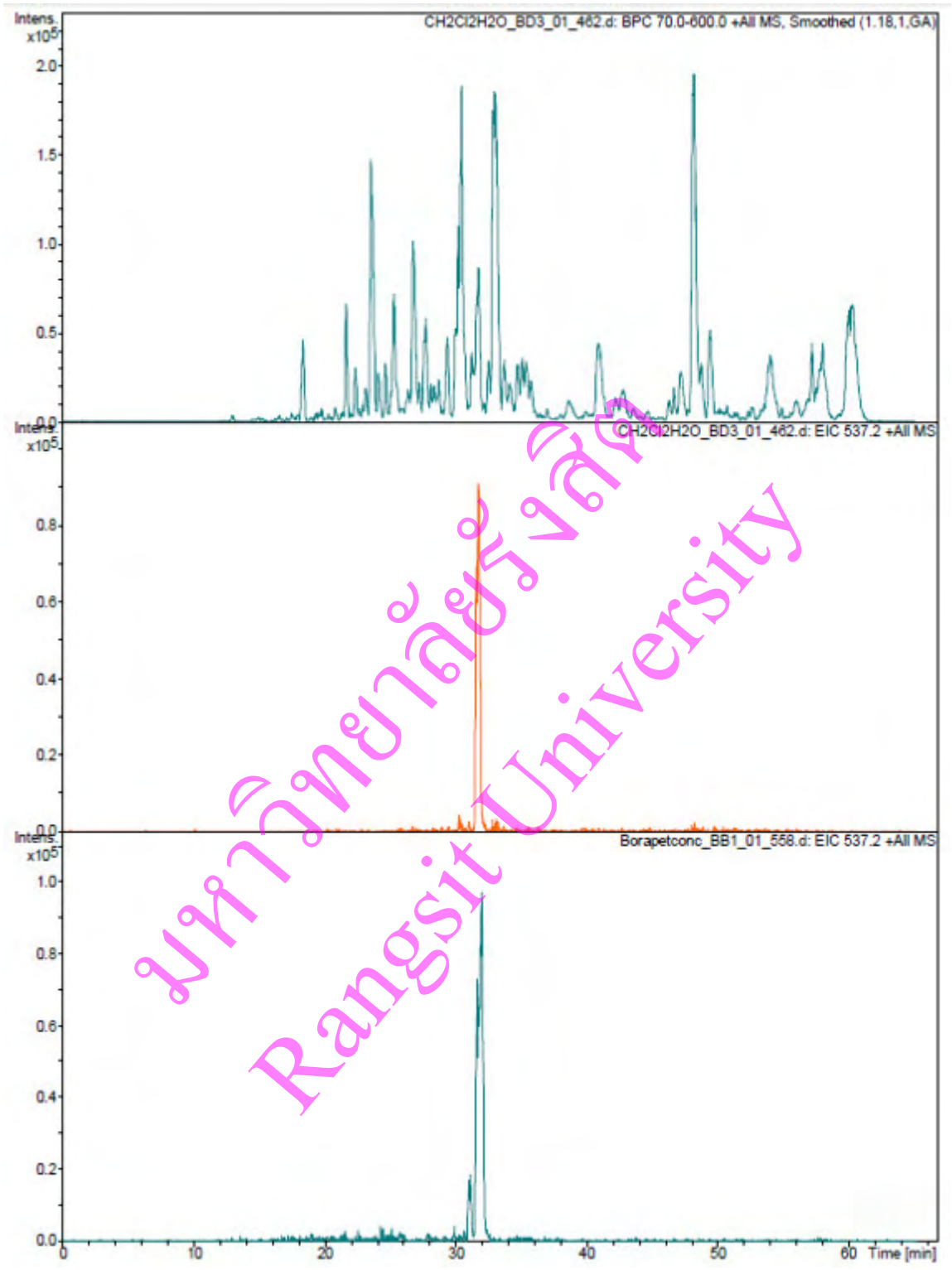
มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

จากนั้นจึงทำการระบุชนิดของสารสำคัญจาก chromatographic fingerprint ทั้งแปดโดยพบสารสำคัญทั้งหมด 10 ตัวที่แตกต่างกันโดยดูจากค่า retention time (Rt), mass spectrum และ ms/ms fragmentation pattern ของสารสกัดตำรับยาเทียบกับสารสกัดสมุนไพรเดี่ยว (ตารางที่ 2) โดยสารที่ระบุได้ก่อนหน้ามีดังนี้ คือ piperine เป็นสารสำคัญจากพริกไทย ส่วน higenamine salsolinol และ adenosine เป็นสารสำคัญในบอระเพ็ด สารสำคัญอื่นๆที่ระบุได้เพิ่มเติมคือ borapetoside-C (รูปที่ 17) เป็นสารสำคัญจากบอระเพ็ด imperatorin (รูปที่ 18) เป็นสารสำคัญจากมะตูม ส่วน pinostrobin (รูปที่ 18) และ pinocembrin (รูปที่ 19) เป็นสารสำคัญจากกระชาย verbascoside (รูปที่ 20) ซึ่งเป็นสารสำคัญจากเหงือกปลาหมอและท้ายสุดคือ 7,8-dihydroxy-5,6-methylenedioxyflavone เป็นสารสำคัญจากแห้วหมู (รูปที่ 21)

ตารางที่ 2 สารสำคัญที่ตรวจพบใน fingerprint ของตำรับยาลดความดัน

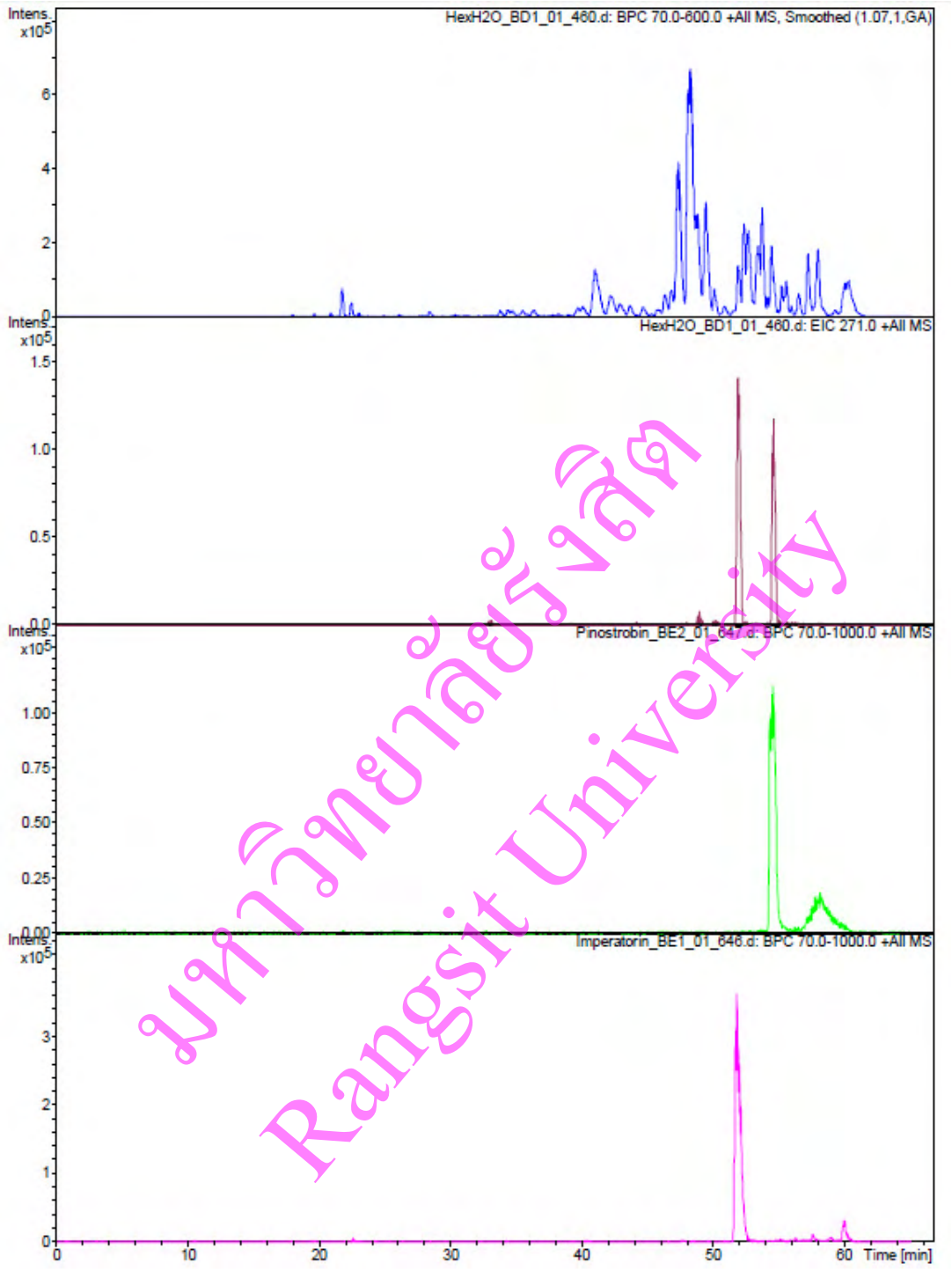
Compounds	Rt (min)	Molecular ion (*m/z*)
Adenosine	1.5	267.0
Higenamine	2.0	271.0
Salsolinol	5.2	179.1
Verbascoside	20.1	624.6
Borapetoside-C	32.0	536.2
Pinocembrin	46.6	256.1
7,8-dihydroxy-5,6-methylenedioxyflavone	48.7	298.0
Piperine	49.0	285.1
Imperatorin	52.4	270.1
Pinostrobin	54.8	270.1

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University



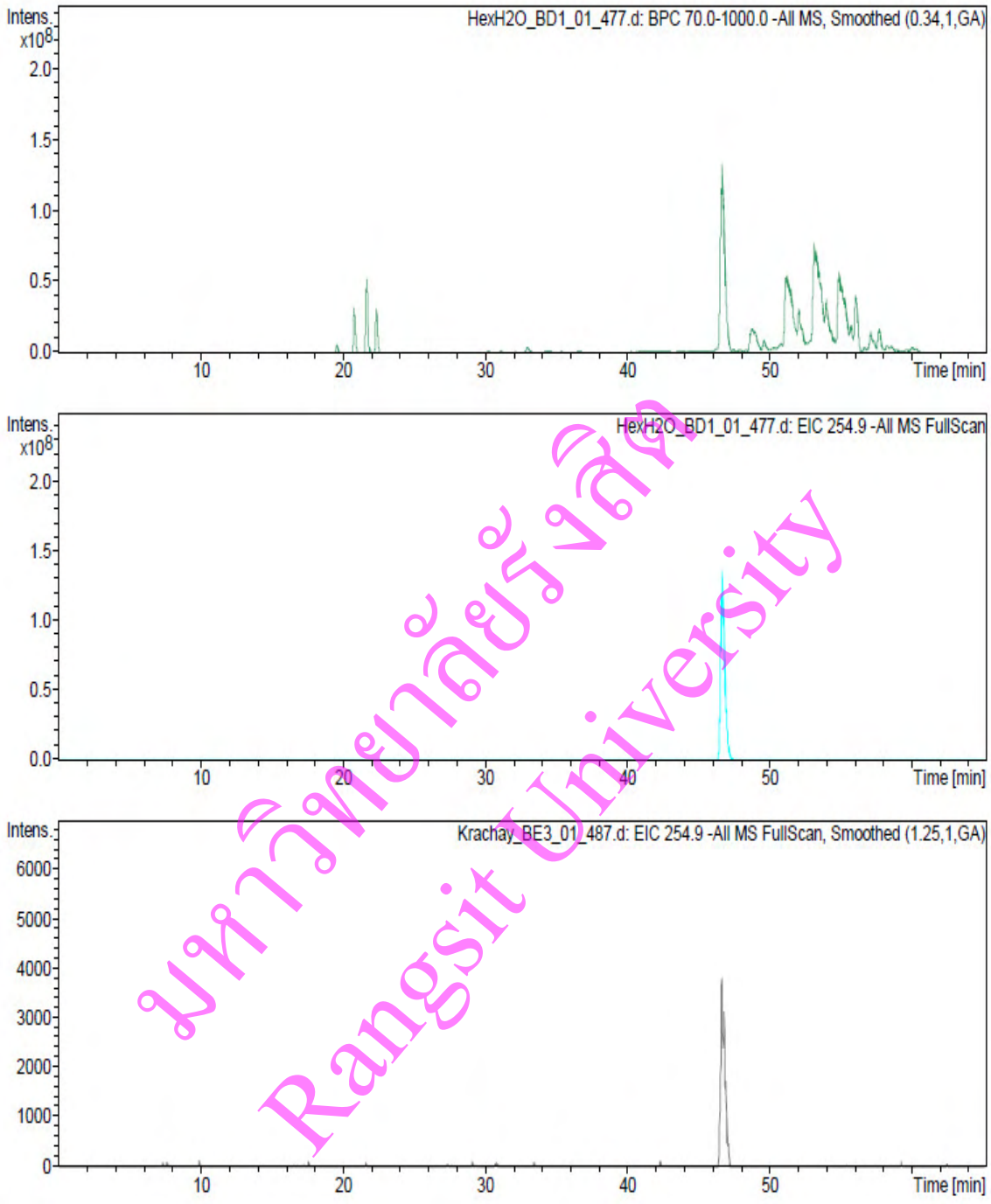
มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

รูปที่ 17 chromatogram ของสารสกัดตำรับยาชั้น dichloromethane ESI positive mode, borapetoside-C ในสารสกัดตำรับยาและ borapetoside-C ในสารสกัดบอระเพ็ดตามลำดับ



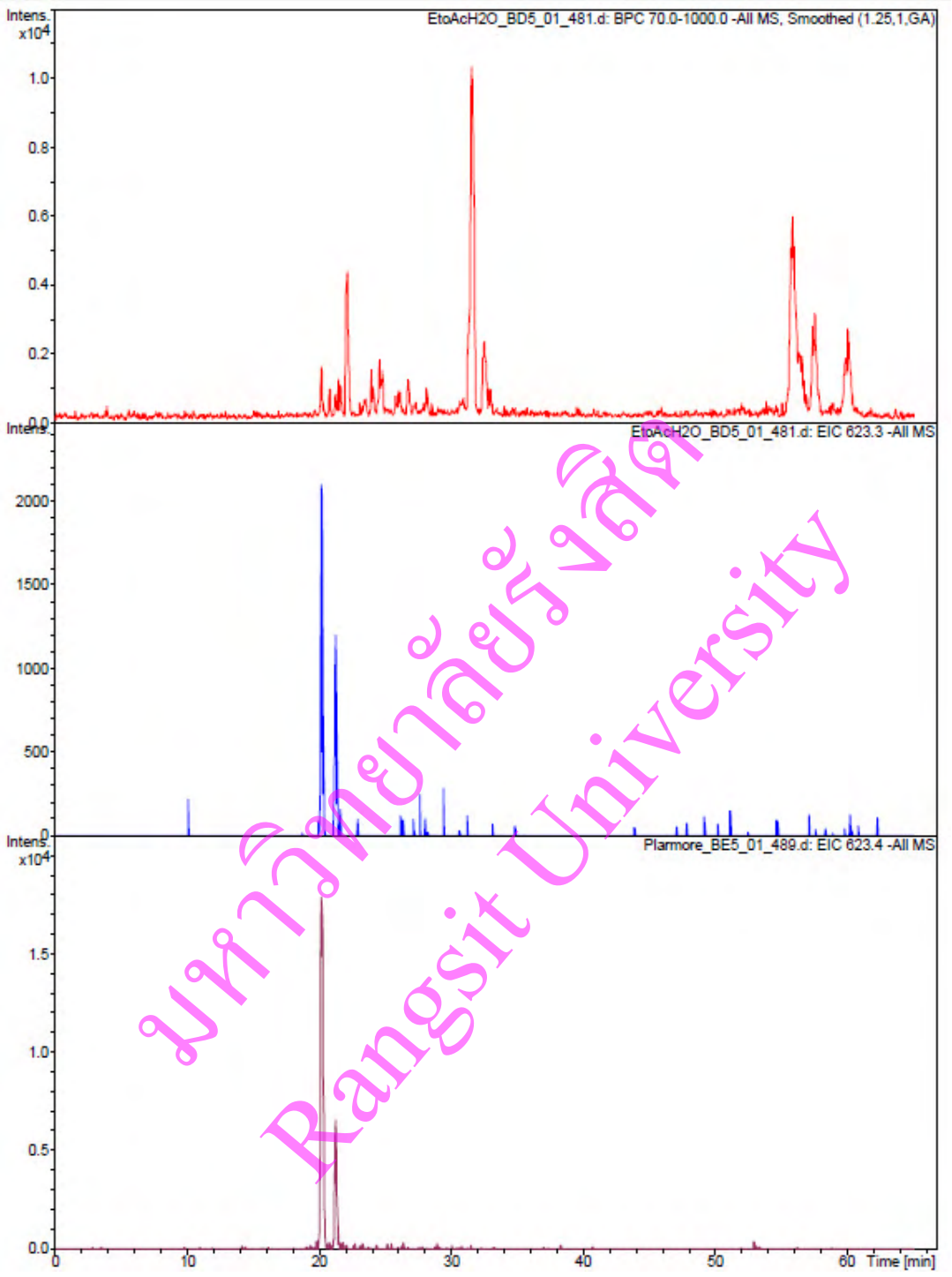
รูปที่ 18 chromatogram ของสารสกัดตำรับยาชั้น hexane ESI positive mode, imperatorin และ pinostrobin ในสารสกัดตำรับยา pinostrobin ในสารสกัดกระชายและ imperatorin ในสารสกัดมะตูม ตามลำดับจากบนลงล่าง

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University



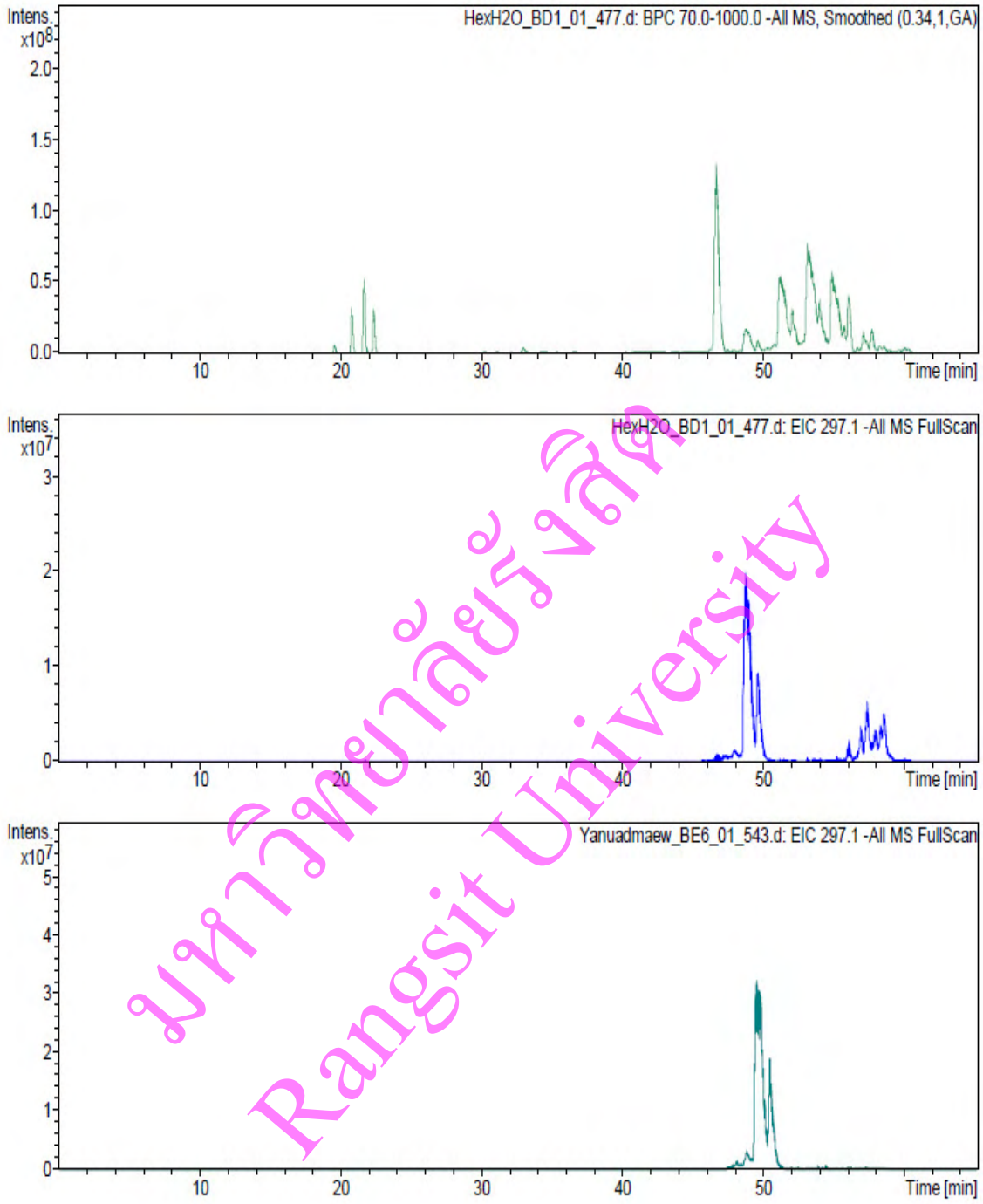
มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

รูปที่ 19 chromatogram ของสารสกัดตำรับยาชั้น hexane ESI negative mode, pinocembrin ในสารสกัดตำรับยาและ pinocembrin ในสารสกัดกระชายตามลำดับจากบนลงล่าง



มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

รูปที่ 20 chromatogram ของสารสกัดตำรับยาชั้น ethyl acetate ESI negative mode, verbascoside ในสารสกัดตำรับยาและ verbascoside ในสารสกัดเหงือกปลาหมอตามลำดับจากบนลงล่าง



มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

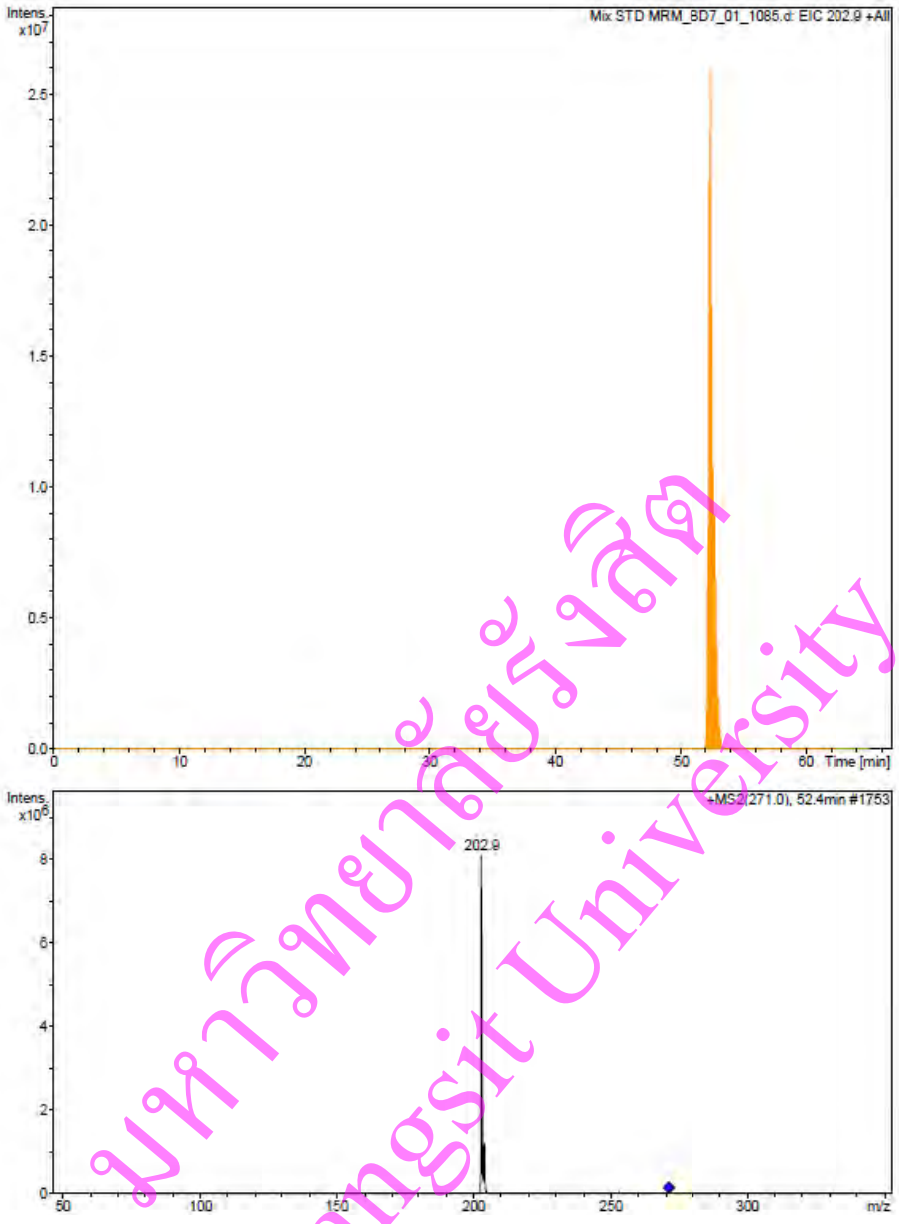
รูปที่ 21 chromatogram ของสารสกัดตำรับยาชั้น hexane ESI negative mode, 7,8-dihydroxy-5,6-methylenedioxyflavone ในสารสกัดตำรับยาและ 7,8-dihydroxy-5,6-methylenedioxyflavone ในสารสกัดแห้วหมูตามลำดับจากบนลงล่าง

จากการวิเคราะห์ผลทำให้ทราบว่าต้องใช้ตัวทำละลายหลายชนิดในการสกัด marker ต่างๆ ออกมาจากตำรับยาชนิดนี้ กล่าวคือ ต้องใช้ hexane ในการสกัด piperine imperatorin pinostrobin pinocembrin และ 7,8-dihydroxy-5,6-methylenedioxyflavone ใช้ dichloromethane ในการสกัด borapetoside-C ใช้ ethyl acetate ในการสกัด verbascoside และใช้น้ำควบคู่กับการ partition ด้วย n-butanol ในการสกัด adenosine higenamine และ salsolinol ออกมาจากตำรับยา อีกทั้ง ESI mode ที่ใช้ในการวิเคราะห์ก็ยังมีความแตกต่างกันคือ ESI positive mode ใช้วิเคราะห์ piperine imperatorin pinostrobin borapetoside-C adenosine higenamine และ salsolinol ส่วน ESI negative mode ใช้วิเคราะห์สารสามตัวที่เหลือ ซึ่งวิธีการสกัดและวิเคราะห์แบบนี้จะเหมาะสมในการระบุชนิดของสารเท่านั้น แต่ในเชิงของการควบคุมคุณภาพต้องคำนึงถึงปัจจัยอื่นๆด้วย เช่น ความยากง่ายของวิธีที่ใช้ในการสกัดและวิเคราะห์ ระยะเวลาที่ใช้ตลอดกระบวนการ เป็นต้น ซึ่งสิ่งเหล่านี้มีความสำคัญในเชิงของการนำไปปฏิบัติจริงในการผลิตยา ผู้วิจัยจึงทำการปรับวิธีการเพื่อใช้ในการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารสำคัญในตำรับยา

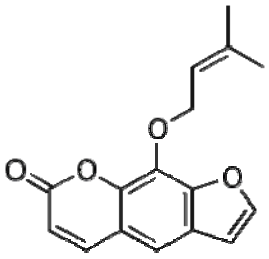
พัฒนาวิธีการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารสำคัญในตำรับยา

พบว่าระบบ LC ที่ใช้ในการระบุชนิดของสารใช้เวลาถึง 65 นาทีในการวิเคราะห์ต่อ 1 ตัวอย่าง ถึงแม้ว่าจะวิเคราะห์สารได้มากชนิดกว่าแต่ก็นับว่าเสียเวลาเป็นอย่างมาก (ยังไม่นับรวมเวลาที่ต้องเตรียมสารสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆอีก) ผู้วิจัยจึงเลือกเฉพาะกลุ่มสารสำคัญตัวแทน (selective marker) ที่จะใช้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารสำคัญในตำรับยา โดยกลุ่มสารที่เลือกคือ piperine imperatorin และ pinostrobin ซึ่งสารทั้งสามตัวมีการศึกษาว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพมากมายที่เกี่ยวข้องกับการนำมาใช้เพื่อลดความดันโลหิตซึ่งถือเป็นตัวแทนที่ดีจากสารสำคัญอื่นๆในตำรับยา อีกทั้งยังประหยัดเวลาในขั้นตอนของการสกัดเพราะใช้ hexane เพียงอย่างเดียว โดยมีวิธีการสกัดคือ sonicate ผงตำรับยาใน hexane 20 นาทีและทำซ้ำ 5 ครั้งโดยเปลี่ยนตัวทำละลายทุกครั้ง เพื่อจะได้สกัดสารสำคัญตัวแทนออกมาได้ทั้งหมด จากนั้นนำสารละลายที่ได้ทั้งหมดมารวมกันและระเหยแห้งด้วย evaporator จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ piperine imperatorin และ pinostrobin ด้วยวิธี LC-MS โดยใช้เวลาเพียงแค่ 25 นาทีและใช้ ESI positive mode เพียง mode เดียวในการวิเคราะห์ โดยการวิเคราะห์ปริมาณจะใช้ข้อมูลจาก fragmentation ions หลักที่ปรากฏจากการทำ ms/ms (รูปที่ 22-รูปที่ 24)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

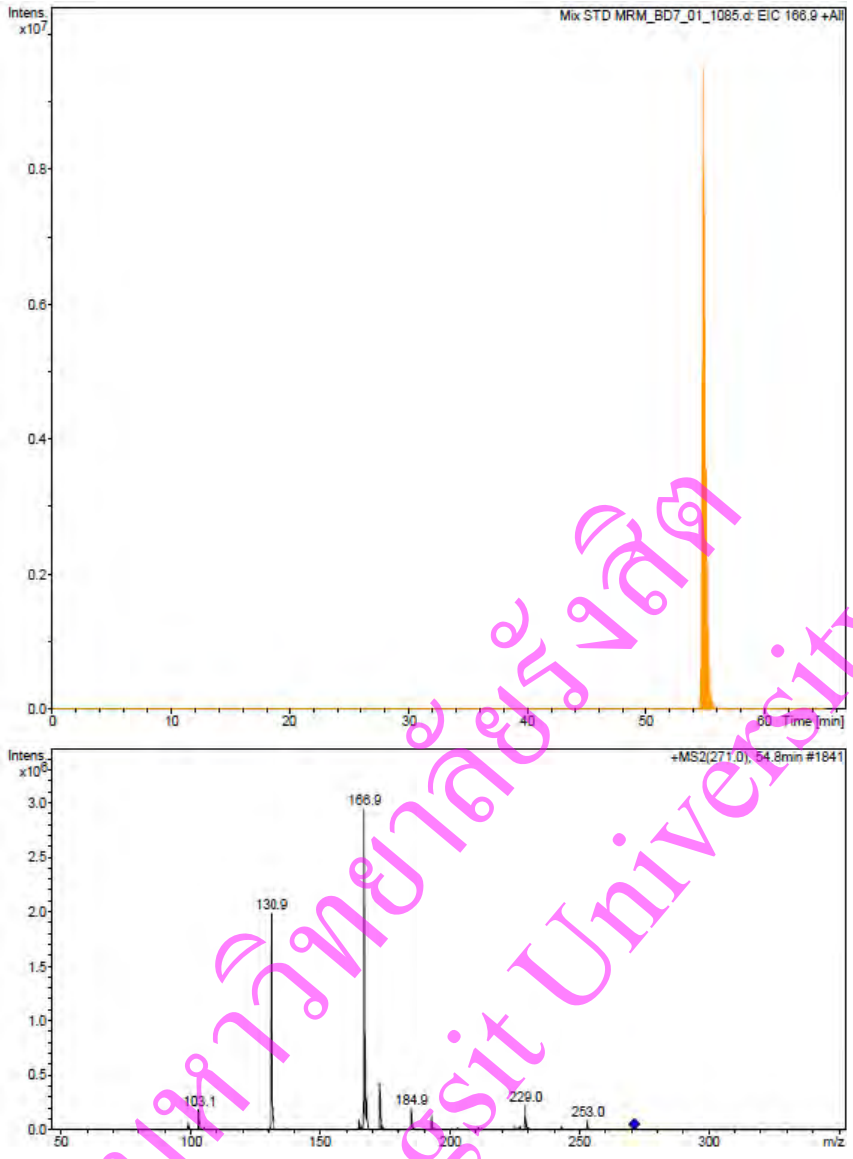


รูปที่ 22 โครงสร้าง chromatogram และ ms/ms fragmentation ของ imperatorin

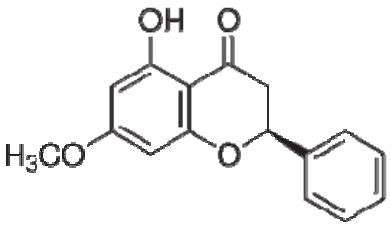


เมื่อใช้พลังงาน (amplitude) เท่ากับ 0.6 จะทำให้ส่วน methylbutene ที่เกาะกับ O ที่ต่อกับ ring 6 เหลี่ยมส่วนที่เป็น chromenone หลุดออกทำให้ได้ fragment ที่มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 202.9

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

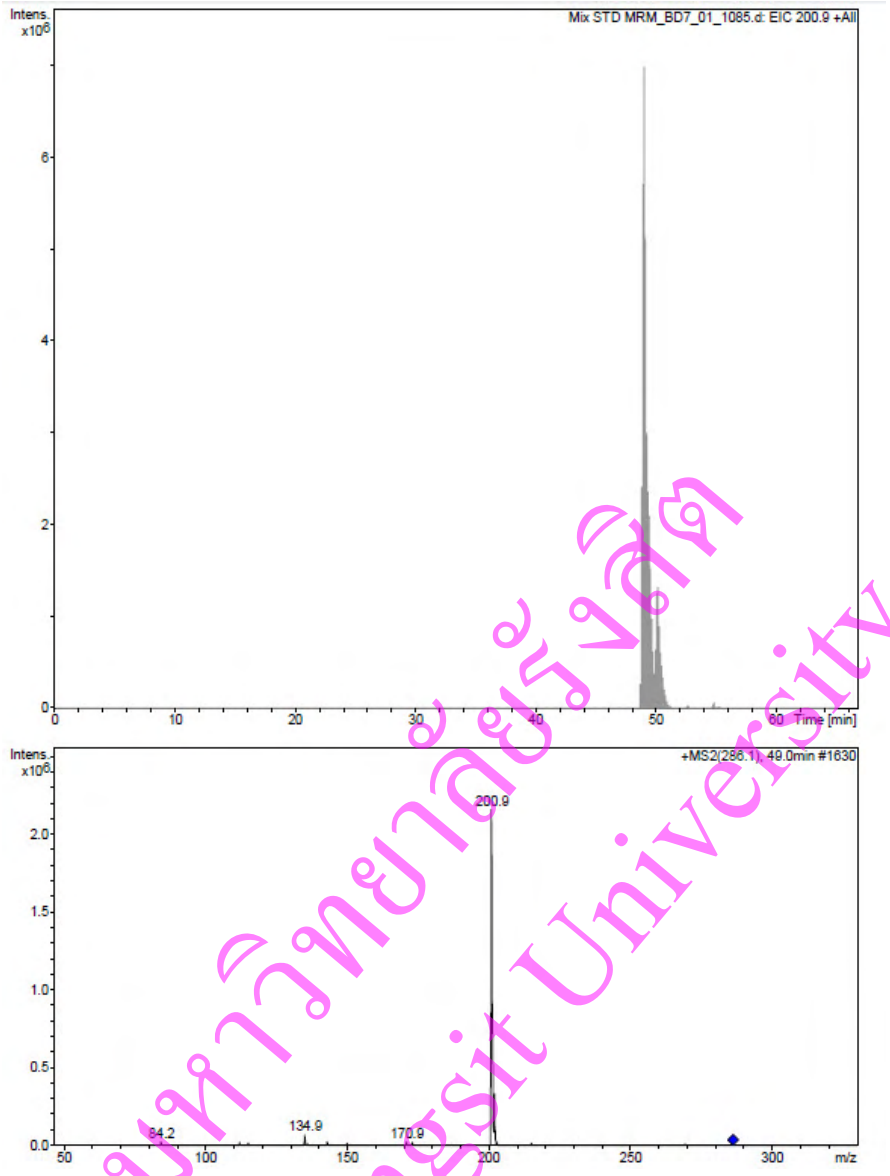


รูปที่ 23 โครงสร้าง chromatogram และ ms/ms fragmentation ของ pinostrobin

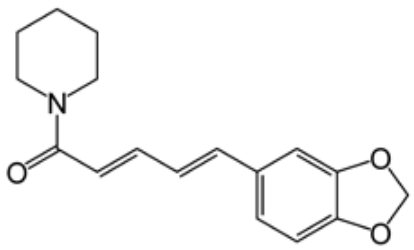


เมื่อใช้พลังงาน (amplitude) เท่ากับ 0.6 จะทำให้พันธะของ ether group (ระหว่าง O และ C ตำแหน่งที่ 2) แตกออก และจะเกิดเป็นแอลคีนระหว่าง C ตำแหน่งที่ 1 และ 2 จากนั้นโมเลกุลจะแตกหักที่พันธะเดี่ยวที่ต่อกับ carbonyl group ทำให้ได้ fragment ที่มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 166.9 และ 103.1

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University



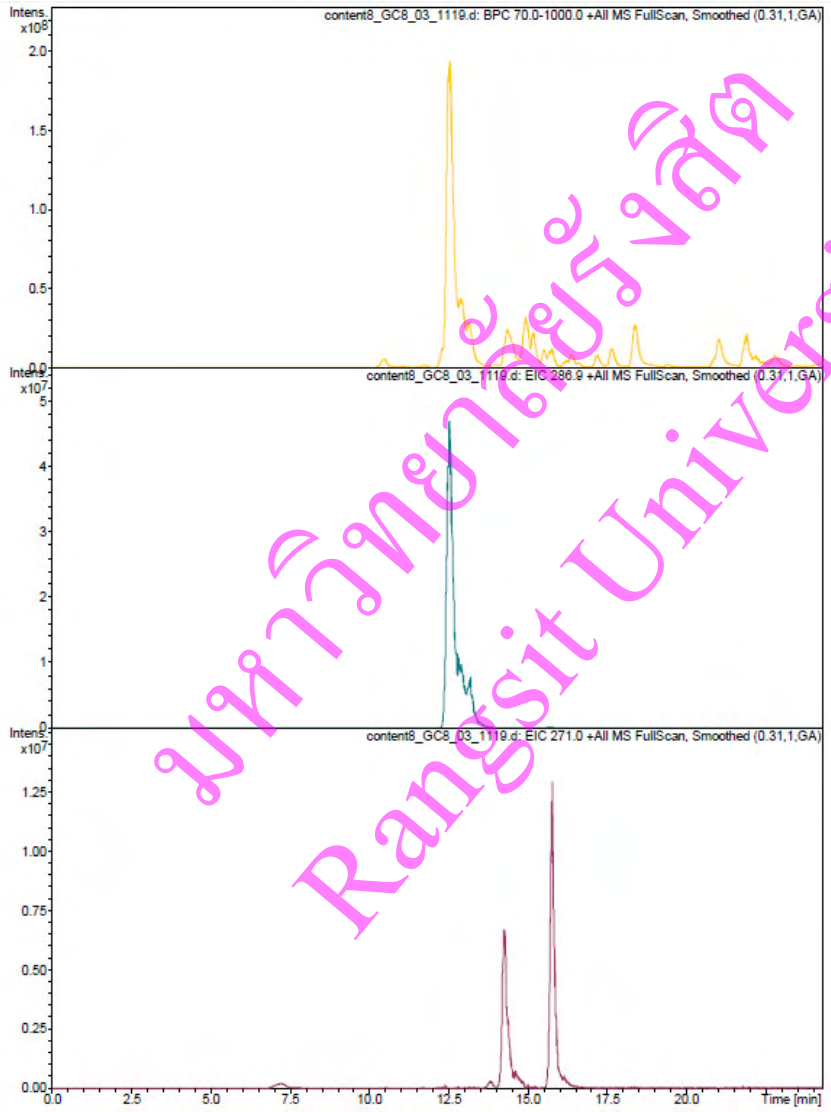
รูปที่ 24 โครงสร้าง chromatogram และ ms/ms fragmentation ของ piperine



เมื่อใช้พลังงาน (amplitude) เท่ากับ 0.7 จะทำให้ส่วน piperidine ring หลุดออกทำให้ได้ fragment ที่มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 200.9

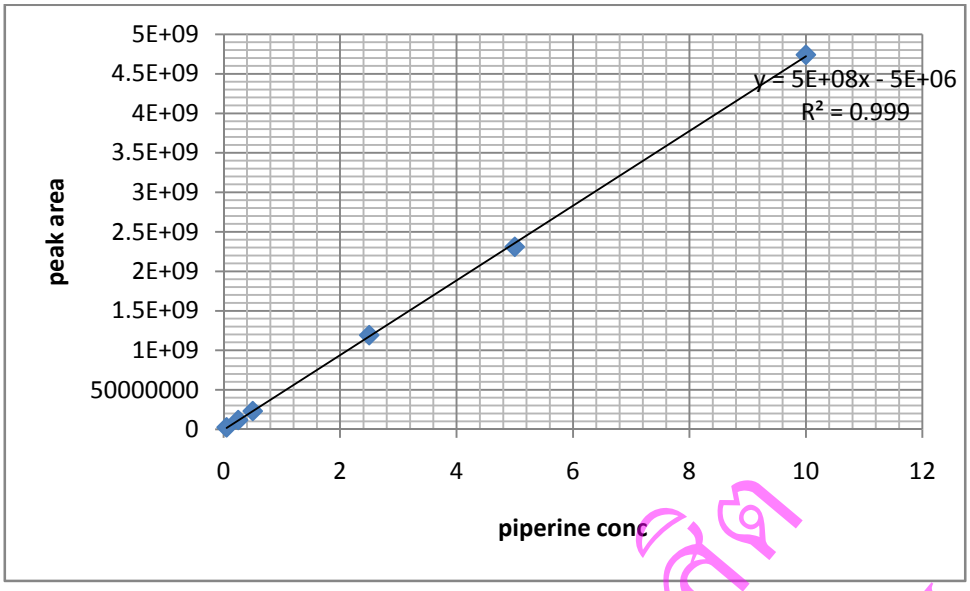
มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ผู้วิจัยทำการสร้างวิธีการวิเคราะห์ใหม่เพื่อใช้วิเคราะห์เฉพาะ piperine, imperatorin และ pinostrobin (รูปที่ 25) พบว่าสามารถแยกสารทั้งสามตัวออกจากกันได้ในระบบที่ใช้และทำ method validation ตามหัวข้อที่กำหนดในวิธีการทดลอง พบว่าวิธีการวิเคราะห์สารทั้งสามตัวด้วย LC-MS ESI positive mode ที่ใช้มีความถูกต้องแม่นยำน่าเชื่อถือ โดยดูจากค่าความเป็นเส้นตรงของกราฟที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณ (รูปที่ 26-รูปที่ 28) และค่า accuracy และ precision ผ่านตามเกณฑ์ที่กำหนดทั้งหมด (ตารางที่ 3)

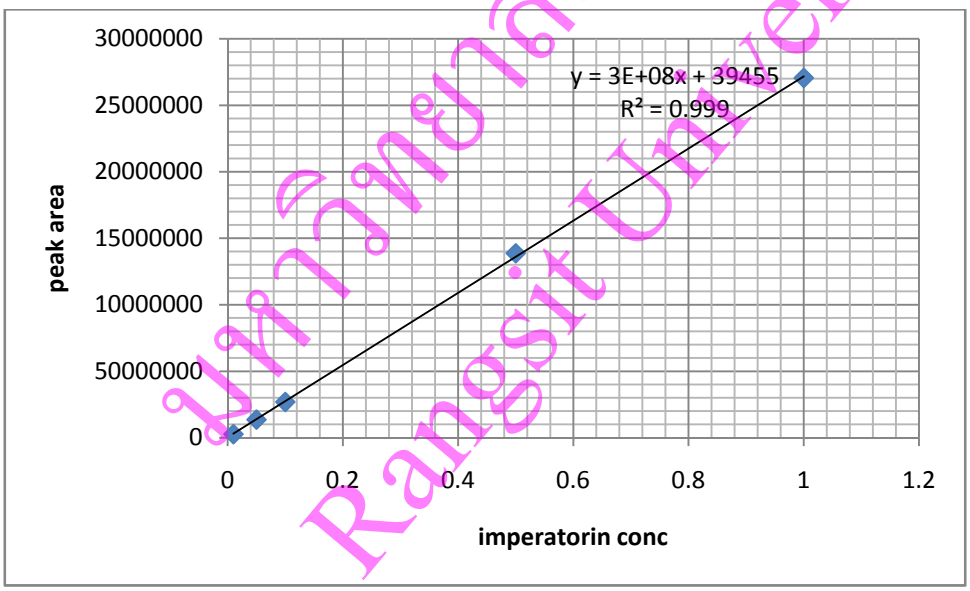


รูปที่ 25 chromatogram ของสารสกัดตำรับยาและ extracted ion ของสาร piperine imperatorin และ pinostrobin ที่พบในตำรับยา

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

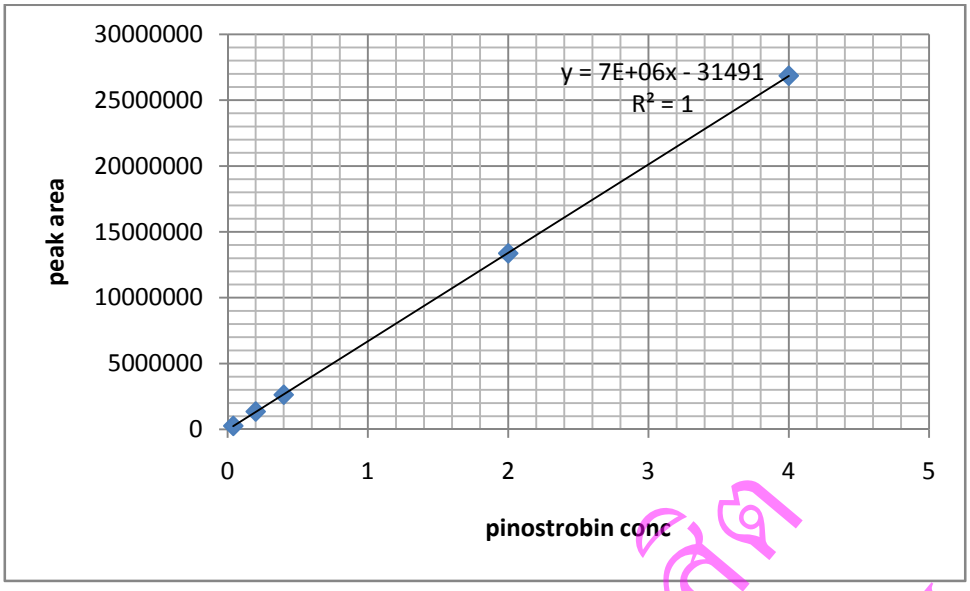


รูปที่ 26 กราฟมาตรฐานของ piperine



รูปที่ 27 กราฟมาตรฐานของ imperatorin

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University



รูปที่ 28 กราฟมาตรฐานของ pinostrobin

ตารางที่ 3 Repeatability Reproducibility และ Recovery ของ selective markers จากตำรับยา

Selective markers	R.S.D. (%)		% Recovery (Mean ± S.D.)
	Intraday (n = 6)	Interday (n = 18)	
Piperine	0.16	1.30	99.72 ± 0.41
Imperatorin	0.12	1.19	97.54 ± 0.57
Pinostrobin	0.11	0.96	98.07 ± 0.30

หลังจากพัฒนาวิธีการวิเคราะห์เสร็จแล้วก็ทำการเก็บตัวอย่างวัตถุดิบจากคลินิกวิโรจน์แผนไทยในจังหวัดนครศรีธรรมราชเป็นจำนวน 10 ชุดการผลิต เพื่อเฉลี่ยผลจากวัตถุดิบที่เก็บมาต่างครั้งกันเพื่อตั้งเป็นค่ามาตรฐานที่พึงมี ซึ่งผลที่ได้คือ ในตำรับยาลดความดันนี้ควรมีปริมาณ piperine 1.43±0.06 %w/w ปริมาณ imperatorin 0.05±0.002 %w/w และปริมาณ pinostrobin 0.3±0.03 %w/w ตามลำดับ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 5

สรุป อภิปราย และข้อเสนอแนะ

ในโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยมีความประสงค์จะพัฒนาการวิเคราะห์ตำรับยาลดความดันที่มีองค์ประกอบตัวยาสำคัญจากสมุนไพรทั้งหมด 6 ชนิดในตำรับ เพื่อใช้เป็นตัวอย่างของการทำมาตรฐานในเชิงวิเคราะห์ของตำรับยาสมุนไพรไทยเพื่อรองรับการผลิตของโรงงานยา Sun-Herb Thai Chinese Manufacturing หรือแหล่งอื่นที่สนใจให้ได้ผลิตภัณฑ์ประสิทธิภาพที่ผ่านการควบคุมมาตรฐาน ส่งผลให้เกิดการใช้ยาสมุนไพรไทยอย่างแพร่หลายและยังเป็นการส่งเสริมการเพาะปลูกพันธุ์พืชสมุนไพรไทยเพื่อนำมาใช้เป็นยาได้อีกด้วย นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้ยังสามารถนำไปสนับสนุนในส่วนของการควบคุมมาตรฐานตำรับยาสมุนไพรก่อนนำไปใช้ในการทดลองทางคลินิกต่อไป

สรุปผลการวิจัย

จากการวิจัยครั้งนี้ทำให้ได้ chromatographic fingerprint ของตำรับยาลดความดันซึ่งสามารถนำมาใช้ประกอบในการควบคุมคุณภาพ นอกจากนี้ยังสามารถระบุสารสำคัญจากตำรับยาได้ 10 ชนิด โดยเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาทั้งสิ้น จากนั้นทำการพัฒนาการวิเคราะห์และตรวจรับรองการวิเคราะห์ของตำรับยาลดความดันโดยเลือกใช้ selective markers คือ piperine pinostrobin และ imperatorin มาใช้ในการวิเคราะห์เพื่อควบคุมมาตรฐานยาที่จะผลิตต่อไป โดยมีการตั้งค่ามาตรฐานของสารทั้งสามตัวว่าควรมีปริมาณ piperine 1.43±0.06 %w/w ปริมาณ imperatorin 0.05±0.002 %w/w และปริมาณ pinostrobin 0.3±0.03 %w/w ตามลำดับ

อภิปรายผลการวิจัย

สภาพความมีขั้วและการเกิดไอออนของสารที่แตกต่างกันทำให้การใช้ chromatographic fingerprint แบบแยกตามตัวทำละลายและ MS ESI mode มีความจำเพาะเจาะจง ซึ่งเป็นลักษณะที่ดีในการนำไปใช้ในการสร้างมาตรฐานเชิงควบคุมคุณภาพของตำรับยาลดความดันนี้ดังที่จะเห็นได้ว่า fingerprint แต่ละอันมีเอกลักษณ์เป็นของตนเอง ส่วนการระบุชนิดของสารสำคัญที่พบจาก chromatographic fingerprint จะทำให้เรามีข้อมูลว่ามีสารใดเป็นองค์ประกอบอยู่ในตำรับยานี้บ้าง ซึ่งฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาก็จะขึ้นอยู่กับการมีอยู่ของสารสำคัญเหล่านี้นั่นเอง โดยจากการวิจัยพบสารสำคัญ 10

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตัวคือ piperine, imperatorin, pinostrobin, pinocembrin, 7,8-dihydroxy-5,6-methylenedioxyflavone, borapetoside-C, verbascoside, adenosine, salsolinol และ higenamine ซึ่งสามตัวแรกจะพบในสารสกัด hexane โดยใช้ ESI positive mode โดย piperine และ imperatorin มีการรายงานว่ามีฤทธิ์ลดความดันโลหิตผ่านการยับยั้ง Calcium-channel อีกทั้งยังมีฤทธิ์ปกป้องตับอีกด้วย ส่วน pinostrobin เป็นสารในกลุ่ม flavonoid มีฤทธิ์ต้านอักเสบและปกป้องตับ ในสารสกัด hexane โดยใช้ ESI negative mode พบ pinocembrin ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอักเสบเช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังพบ 7,8-dihydroxy-5,6-methylenedioxyflavone ซึ่งเป็นสารในหัวแห้วหมู โดยสารตัวนี้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จาก fingerprint ของสารสกัด dichloromethane โดยใช้ ESI positive mode จะพบ borapetoside-C ซึ่งมีฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือด ขณะที่ในสารสกัด ethyl acetate โดยใช้ ESI negative mode จะพบสาร verbascoside หรืออีกชื่อหนึ่งคือ actenoside ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอักเสบที่ดี ส่วน fingerprint ของสารสกัดน้ำโดยใช้ ESI positive mode จะพบ higenamine salsolinol และ adenosine ซึ่งมีฤทธิ์ลดความดันแต่สารทั้งสามตัวนี้พบน้อยมากในตำรับยานี้ อีกทั้งต้องใช้กรรมวิธีในการสกัดมากทำให้ไม่เหมาะสมในการเลือกมาเป็น selective markers ดังที่จะเห็นได้ว่าสารทั้ง 10 ตัวมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่ช่วยส่งเสริมฤทธิ์ลดความดัน มีสารที่มีฤทธิ์ช่วยลดน้ำตาลในเลือดและลดความอ้วน จึงช่วยในการลดปัจจัยเสี่ยงของผู้ป่วยโรคความดันโลหิตสูง นอกจากนี้สารที่มีฤทธิ์ต้านอักเสบและปกป้องตับยังอาจช่วยขจัดพิษของสมุนไพรตัวอื่นๆที่อาจจะเกิดขึ้นด้วยก็ได้ ซึ่งทำให้เห็นถึงความเกี่ยวข้องสัมพันธ์กันระหว่างข้อมูลทางวิทยาศาสตร์และความรู้การใช้สมุนไพรผสมในตำรับยาแผนไทยอีกด้วย แต่ในที่นี้ก็ต้องมีการศึกษาทางคลินิกมายืนยันต่อไปหลังจากที่ระบุสารสำคัญในตำรับยาได้แล้ว ผู้วิจัยจึงทำการเลือกสาร piperine imperatorin และ pinostrobin มาใช้เป็นสารมาตรฐานตัวแทนหรือ selective markers ในการนำไปวิเคราะห์เชิงปริมาณในขั้นตอนของการผลิตยาทั้งนี้เนื่องมาจากสารทั้งสามตัวสามารถสกัดได้โดยใช้ hexane เพียงอย่างเดียวก็เพียงพอ อีกทั้งสภาพขั้วของสารที่ใกล้กันทำให้สามารถปรับระบบ LC-MS เพื่อให้การวิเคราะห์เสร็จเร็วขึ้นจาก 65 นาทีมาเป็น 25 นาที อีกทั้งยังสามารถใช้เฉพาะ ESI positive mode ในการวิเคราะห์ก็เพียงพอ ซึ่งจะช่วยลดระยะเวลาตลอดทั้งกระบวนการได้เป็นอย่างมาก ตั้งแต่ขั้นตอนของการสกัดมาจนถึงการวิเคราะห์ อีกทั้งสารทั้งสามตัวนี้ยังเป็นสารตัวแทนของสมุนไพรต่างชนิดกันคือ พริกไทย มะตูมและกระชายซึ่งก็เป็นอีกข้อดีหนึ่งของการวิเคราะห์นี้

ข้อเสนอแนะ

ข้อมูลนี้จะถูกนำไปใช้ในการสนับสนุนการทดลองทางคลินิกต่อไป เพื่อผลักดันให้เกิดการใช้ตำรับยาแผนไทยอย่างแพร่หลาย ทำให้ผู้บริโภคได้รับยาที่มีคุณภาพและปลอดภัย

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บรรณานุกรม

Abramowiez M, Zuccotti G, Pflomm J et al (2012) Treatment guidelines: drugs for hypertension. The Medical Letter 10(113):1-8

Aronow WS (2008) Hypertension and the older diabetic. *Clin. Geriatr. Med*. 24:489-501

Arul V, Miyazaki S, Dhananjayen R (2005) Studies on the anti-inflammatory, antipyretic and analgesic properties of the leaves of *Aegle marmelos* Corr. J Ethnopharmacol 96(4):159-163

Association of Official Analytical Chemists (2002) *AOAC Requirements for Single Laboratory Validation of Chemical Methods*, Gaithersburg, United State of America.

Bassey E, Jackson C, Aquaisua A et al (2011) Effect of *Piper nigrum* on stomach of wistar rat. Int J Pharm Biomed Res 2(2):68-73

Bertin R, Chen Z, Martinez-Vazquez M et al (2013) Vasodilation and radical-scavenging activity of imperatorin and selected coumarinic and flavonoid compounds from genus Casimiroa. Phytomedicine (in press). DOI 10.1016/j.phymed.2013.10.030

Bureau of Policy and Strategy Ministry of Public Health (2013) Thai Ministry of Public Health database. http://203.157.10.11/report/index.php. Cited 23 Dec 2013

Cao YJ, He X, Wang N et al (2013) Effects of imperatorin, the active component from Radix Angelicae (Baizhi) on the blood pressure and oxidative stress in 2K,1C hypertensive rats. Phytomedicine 20(12):1048-1054

Carretero OA and Oparil S (2000) Essential hypertension. Part I: definition and etiology. Circulation 101:329-335

Chantong B, Kampeera T, Sirimanapong W et al (2008) Antioxidant activity and cytotoxicity of plants commonly used in veterinary medicine. Acta Hortic 786:91-97

Charoensin S (2008) Inhibitory mechanism of pinostrobin isolated from *Boesenbergia pandurata* on diethylnitrosamine-induced initiation stage of rat hepatocarcinogenesis. Department of Biochemistry. Chiang Mai, Chiang Mai University

Charoensin S, Punvittayagul C, Pompimon W et al (2010) Toxicological and clastogenic evaluation of pinocembrin and pinostrobin isolated from *Boesenbergia pandurata* in Wistar rats. Thai J Toxicology 25(1):29-40

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Chavalittumrong P, Attawish A, Chuthaputti A et al (1997) Toxicological study of crude extract of *Tinospora crispa* Mier ex Hook F.& Thoms. Thai Journal of Pharmaceutical Sciences 21(4):199-210

Chobanian AV, Bakris GL, Black HR et al (2003) Seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure. Hypertension 42:1206-1252

Chunlaratthanaphorn S, Lertprasertsuke N, Srisawat U et al (2007) Acute and subchronic toxicity study of the water extract from dried fruits of *Piper nigrum* L. in rats. Songklanakarin J Sci Technol 29:109-124

Conway J (1984) Hemodynamic aspects of essential hypertension in humans. Physiol Rev 64:617-660

Esler M, Lambert E, Schlaich M (2010) Point: Chronic activation of the sympathetic nervous system is the dominant contributor to systemic hypertension. J Appl Physiol 109:1996-1998

Expert Committee on Food Additives (1982) Evaluation of certain food additives and contaminants. WHO Technical Report Series 683. WHO Press. Geneva, Switzerland 20

Fahey JW, Stephenson KK (2002) Pinostrobin from honey and Thai ginger (*Boesenbergia pandurata*): a potent flavonoid inducer of mammalian phase 2 chemoprotective and antioxidant enzymes. J Agric Food Chem 50(25):7472-7476

Farnsworth NR, Akerele O, Bingel AS et al (1985) Medicinal plants in therapy. *Bull.* World Health Organ 63:965-981

Folkow B (1982) Physiological aspects of primary hypertension. *Physiol. Rev*. 62:347-504

Gaddam KK, Verma A, Thompson M, Amin R, Ventura H (2009) Hypertension and cardiac failure in its various forms. Med Clin North Am 93:665-680

Georgiev M, Pastore S, Lulli D et al (2012) *Verbascum xanthophoeniceum*-derived phenylethanoid glycosides are potent inhibitors of inflammatory chemokines in dormant and interferon-gamma-stimulated human keratinocytes. J Ethnopharmacol 144(3):754-760

Ghangale GR, Surve VS, Anbarasan K et al (2008) Evaluation of *Aegle marmelos* (Bael) for anti-inflammatory activity in rats. J Bombay Vet College 16(1):15-16

Guo W, Sun J, Jiang L et al (2012) Imperatorin attenuates LPS-induced inflammation by suppressing NF-ĸB and MAPKs activation in RAW 264.7 macrophages. Inflammation 35(6):1764-1772

Gupta MB, Singh N, Palit TK et al (1970) Anti-inflammatory activity of active constituents of *Cyperus rotundus*. Indian J Pharm 2:23

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Gupta MB, Palit TK, Singh N et al (1971) Pharmacological study to isolate the active constituents of *Cyperus rotundus* responsible for anti-inflammatory, antipyretic and analgesic activity, Indian J Med Res 59:76-82

Huang GJ, Deng JS, Liao JC (2012) Inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 participate in anti-inflammatory activity of imperatorin from *Glahnia littoralis*. J Agric Food Chem 60(7):1673-1681

Hlavackova L, Urbanova A, Ulicna O et al (2010) Piperine, active substance of black pepper, alleviates hypertension induced by NO synthase inhibition. Bratisl Lek Listy 111(8):426-431

Insull W (2009) The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment. Am J Med 122:S3-S14

Kadir FA, Othman F, Abdulla MA et al (2011) Effect of *Tinospora crispa* on thioacetamide-induced liver cirrhosis in rats. Indian J Pharmacol 43:64-68

Kamalakkannan N, Prince PSM (2003) Hypoglycaemic effect of water extracts of *Aegle marmelos* fruits in streptozotocin diabetic rats. J Ethnopharmacol 87:207–210

Kamarazaman IS, Amorn ZH, Ali RM et al (2012) Inhibitory properties of *Tinospora crispa* extracts on TNF-α induced inflammation on human umbilical vein endothelial cells (HUVECS). Int J Trop Med 7:24-29

Karnick CR. (1992) Clinical evaluation of *Cyperus rotundus* Linn. (Motha) on obesity: A randomized double blind placebo controlled trial on Indian patients. Indian Med 4:7-10

Kim HK, Choi YH, Verpoorte R (2010) NMR-based metabolomic analysis of plants. Nat Protoc 5:536-549

Kim DY, Kim MS, Sa BK et al (2012) *Boesenbergia pandurata* attenuates diet-induced obesity by activating AMP-activated protein kinase and regulating lipid metabolism. Int J Mol Sci 13:994-1005

Kim SS, Son YO, Chun JC et al (2005) Antioxidant property of an active component purified from the leaves of paraquat-tolerant *Rehmannia glutinosa*. Redox Rep 10(6):311-318

Kumar S, Saravana KM, Raja B (2010) Efficacy of piperine, an alkaloidal constituent of pepper on nitric oxide, antioxi-dants and lipid peroxidation markers in L-NAME induced hypertensive rats. Int J Res Pharm Sci 1(3):300-307

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Kumar S, Singhal V, Roshan R et al (2007) Piperine inhibits TNF-α induced adhesion of neutrophils to endothelial monolayer through suppression of NF-κ and IκB kinase activation. Eur J Pharmacol 575:177-186

Laupattarakasem P, Houghton PJ, Hoult JRS et al (2003) An evaluation of the activity related to inflammation of four plants used in Thailand to treat arthritis. J Ethnopharmacol 85(2-3):207–215

Lawlor DA and Smith GD (2005) Early life determinants of adult blood pressure. Curr Opin Nephrol Hy 14:259-264

Lemaure B, Touche A, Zbinden I et al (2007) Administration of *Cyperus rotundus* tubers extract prevents weight gain in obese Zucker rats. Phytother Res 21:724–730

Matsuda H, Ninomiya K, Morikawa T et al (2008) Protective effects of amide constituents from the fruit of *Piper chaba* on D-galactosamine/TNF-α-induced cell death in mouse hepatocytes. Bioorg Med Chem Lett 18:2038-2042

Matsuda H, Ninomiya K, Morikawa T et al (2009) Hepatoprotective amide constituents from the fruit of *Piper chaba*: Structural requirements, mode of action, and new amides. Bioorg Med Chem 17:7313-7323

Morikawa T (2010) Search for TNF-alpha sensitivity degradation principles from medicinal foods-hepatoprotective amide constituents from Thai natural medicine *Piper chaba*. Yakugaku Zasshi 130(6):785-791

Narender T, Shweta S, Tiwari P, Papi Reddy K, Khaliq T, Prathipati P, *et al*. 2007. Antihyperglycemic and antidyslipidemic agent from *Aegle marmelos*. Bioorg Med Chem Lett 17: 1808-1811.

Navar LG (2010) Counterpoint: Activation of the intrarenal rennin-angiotensin system is the dominant contributor to systemic hypertension. J Appl Physiol 109:1998-2000

Noor H, Ashcroft SJH (1989) Antidiabetic effects of *Tinospora cripa* in rats. J Ethnopharmacol 27:149-161

O'Brien E, Beevers G, Lip GYH (2007) *ABC of hypertension* London: BMJ Books

Oh H, Lee HS, Kim T et al (2002) Furocoumarins from Angelica dahurica with hepatoprotective activity on tacrine-induced cytotoxicity in Hep G2 cells. Planta Med 68(5):463-464

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Panda S, Kar A (2009) Periplogenin-3-O- -D-glucopyranosyl -(1⟶6)- -D-glucopyaranosyl-(1⟶4) –D cymaropyranoside, isolated from *Aegle marmelos* protects doxorubicin induced cardiovascular problems and hepatotoxicity in Rats. Cardiovasc Ther 27:108-116

Papi Reddy K, Singh AB, Puri A, Srivastava AK, Narender T. 2009 Synthesis of novel triterpenoid (lupeol) derivatives and their in vivo antihyperglycemic and antidyslipidemic activity. Bioorg Med Chem Lett 19: 4463-4466.

Picheansunthorn C, Chavalit M, Chirawong W (2011) Explanation of text on Pra Osoth Pra Narai. Ammarin printing and Publishing Co. Ltd. Bangkok. pp.109-110

Parma VS, Jain SC, Bisht KS, et al (1997) Phytochemistry of the Genus *Piper*. Phytochemistry 46:597-673.

Pathak N, Khandlewal S (2006) Cytoprotective and immunomodulating properties of piperine on murine splinocytes: an in vitro study. Eur J Pharmacol 576:160

Pathak N, Khandlewal S (2007) Role of oxidative stress and apoptosis in cadmium induced thymic atropy and splenomegaly in mice. Toxicol Lett 169:95

Praman S, Mulvany MJ, Williams DE et al (2012) Hypotensive and cardio-chronotropic constituents of *Tinospora crispa* and mechanisms of action on the cardiovascular system in anesthetized rats. J Ethnopharmacol 140:166-178

Praman S, Mulvany MJ, Allenbach Y et al (2011) Effects of an *n*-butanol extract from the stem of *Tinospora crispa* on blood pressure and heart rate in anesthetized rats. J Ethnopharmacol 133:675-686

Puavilai W, Laorugpongse D (2000) Hypertension at Ampur Ban Paew and some risk factors of hypertension. Bull Dept Med Serv 25:116-123

Puavilai W, Prompongsa S, Siriwiwattnakul N et al (2011) Prevalence and some important risk factors of hypertension in Ban Paew district, Second Report. J Med Assoc Thai 94(9):1069-1076

Raut NA, Gaikwad NJ (2006) Antidiabetic activity of hydroethanolic extract of *Cyperus rotundus* in alloxan induced diabetes in rats. Fitoterapia 77:585–588

Ruan CT, Lam SH, Chi TC et al (2012) Borapetoside C from Tinospora crispa improves insulin sensitivity in diabetic mice. Phytomedicine 19(8-9):719-724

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Sachdewa A, Raina D, Srivastava AK et al (2001) Effect of *Aegle marmelos* and *Hibiscus rosa sinensis* leaf extract on glucose tolerance in glucose induced hyperglycemic rats (Charles foster). J Environ Biol 22:53–57

Saraithong P, Saenphet S, Saenphet K (2010) Safety evaluation of ethanol extracts from *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. in male rats. Trend Res Sci Technol 2(1):19-22

Saxena RC, Punhami RC, Palit TK et al (1971) Preliminary report on the anti-inflammatory activity of *Cyperus rotusdus* in cojunctivities (in human subjects). Indian J Pharm. 3:9

Schapoval EE, Vargas MR, Chaves CG et al (1998) Antiinflammatory and antinociceptive activities of extracts and isolated compounds from *Stachytarpheta cayennensis*. J Ethnopharmacol 60:53–59

Seo WS, Pae HO, Oh GS et al (2001) Inhibitory effects of methanol extract of *Cyperus rotundus* rhizomes on nitric oxide and superoxide productions by murine macrophage cell line, RAW 264.7 cells. J Ethnopharmacol 76:59–64

Sharma G, Gupta V, Sharma S et al (2010) Toothache plant *Spilanthes Acmella* Murr.: a review. J Natura Conscientia 1:135–142

Shindo K, Kato M, Kinoshita A et al (2006) Analysis of antioxidant activities contained in the *Boesenbergia pandurata* Schult. Rhizome. Biosci Biotechnol Biochem 70:2281–2284

Singanan V, Singanan M, Begum H (2007) The hepatoprotective effect of bael leaves (*Aegle marmelos*) in alocohol induced liver injury in albino rats. Int J Sci Technol 2:83-92

Singh R, Rao HS (2008) Hepatoprotective effect of the pulp/seed of *Aegle Marmelos* correa ex Roxb against carbon tetrachloride induced liver damage in rats. Int J Green Pharm 2:232-234

Siripong P, Kupradinan P, Piyaviriyagul S et al (2001) Chronic toxicity of *Acanthus ebracteatus* Vahl. in rats. Bull Dep Med Sci 43(4):293-307

Sitthi-Amorn C, Chandraprasert S, Bunnag SC et al (1989) The prevalence and risk factors of hypertension in Klong Toey slum and Klong Toey government apartment houses. Int J Epidemiol 18:89-94

Sohn JH, Han KL, Lee SH et al (2005) Protective effects of panduratin A against oxidative damage of tert-butylhydroperoxide in human HepG2 cells. Biol Pharm Bull 28(6):1083-1086

Somchaichana J, Bunaprasert T, Patumraj S (2012) *Acanthus ebracteatus* Vahl. Ethanol extract enhancement of the efficacy of the collagen scaffold in wound closure: A study in a full-thickness-wound mouse model. J Biomed Biotechnol 2012:1-8

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Soromou LW, Chu X, Jiang L et al (2012) In vitro and in vivo protection provided by pinocembrin against lipopolysaccharideinduced inflammatory responses. International Immunopharmacology 14(1):66–74

Soromou LW, Jiang L, Wei M et al (2014) Protection of mice against lipopolysaccharide-induced endotoxic shock by pinocembrin is correlated with regulation of cytokine secretion. Journal of Immunotoxicology 11(1):56-61

Speranza L, Franceschelli S, Pesce M et al (2010) Antiinflammatory effects in THP-1 cells treated with verbascoside. Phytother Res 24:1398-1404

Sundaram EN, Raddy EN, Uma MP et al (2009) Effect of alcoholic extracts of Indian medicinal plants on the altered enzymatic activities of diabetic rats. Indian J Pharm Sci 71:594-598

Taqvi SIH, Shah AJ, Gilani AH (2008) Blood pressure lowering and vasomodulator effects of piperine. J Cardiovasc Pharmacol 52:452-458

Tian-Ye G, Yan L, Chun-Zhu L, Lin X, Guang-Ji W, Long-Sheng S (2011) Recent Development in Liquid Chromatography/Mass Spectrometry and Allied Topics for Traditional Chinese Medicine Research. CJNM 9:385-400

Tewtrakul S, Subhadhirasakul S, Karalai C (2009) Anti-inflammatory effects of compounds from *Kaempferia parviflora* and *Boesenbergia pandurata*. Food Chem 115(2):534-538

Thanabhorn S, Jaijoy K, Thamaree S et al (2005) Acute and subacute toxicities of the ethanol extract from the rhizomes of *Cyperus rotundus* Linn. Mu J Pharm 32(1-2):15-22

Tuchinda P, Reutrakul V, Claeson P et al (2002) Anti-inflammatory cylohexenyl chalcone derivatives in *Boesenbergia pandurata*. Phytochemistry 59:169-173

Tylicky L and Rutkowski B (2003) Hypertensive nephropathy: pathogenesis, diagnosis and treatment. IPCAS 14:168-173

Upadhya S, Shanbhag KK, Suneetha G et al (2004) A study of hypoglycemic and antioxidant activity of *Aegle marmelos* in alloxan induced diabetic rats. Ind J Physiol Pharmacol 48:476-480

Vasan RS, Beiser A, Seshadri S, Larson MG, Kannel WB, D Agostino RB, Levy D (2002) Residual lifetime risk for developing hypertension in middle-aged women and men: The Framingham Heart Study. JAMA 287:1003-1010

Veerappan A, Miyazaki S, Kadarkaraisamy M et al (2007) Acute and subacute toxicity studies of *Aegle marmelos* Corr., an Indian medicinal plant. Phytomedicine 14(2-3):209-215

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Vidya S, Sravya D, Neeraja P et al (2011) Evaluation of anti-inflammatory and analgesic activity of poly herbal formulation (PHF) in albino rats. Int J Res Pharm Sci 2(3):444-449

Vijayakumar RS, Surya D, Nalini N (2004) Antioxidant efficacy of black pepper (*Piper nigrum* L.) and piperine in rats with high fat diet induced oxidative stress. Redox Rep 9:105-110

Williams B, Poulter NR, Brown MJ et al (2004) British Hypertension Society guidelines for hypertension management 2004 (BHS-IV): summary. British Medical Journal 328:634–640

Xiong Q, Hase K, Tezuka Y et al (1998) Hepatoprotective activity of phenylethanoids from *Cistanche deserticola*. Planta Med 64(2):120-125

Yuliana ND, Khatib A, Verpoorte R (2011) Comprehensive extraction method integrated with NMR metabolomics: a new bioactivity screening method for plants, adenosine A1 receptor binding compounds in *Orthosiphon stamineus* Benth. Anal Chem 83(17):6902-6906

Yun JM, Kwon H, Hwang JK (2003) *In vitro* anti-inflammatory activity of panduratin A isolated from *Kaempferia pandurata* in RAW264.7 cells. Planta Med 69:1102–1108

Zhou Z, Fu C (2013) A new flavanone and other constituents from the rhizomes of Cyperus rotundus and their antioxidant activities. Chem Nat Compd 48(6):963-965

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

ประวัติผู้วิจัย

นายทศธน จรูญรัตน์ (Mr. Tossaton Charoonratana)

เกิด 18 พฤษภาคม 2525

ที่ทำงาน ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ต.หลักหก อ.เมือง จ.ปทุมธานี 12000

เบอร์โทรศัพท์ +66896551569

Email: Peair_fanhoidonk@yahoo.com

ปริญญาตรี

สาขาเภสัชศาสตร์

ปีที่จบ พ.ศ. 2547

สถาบัน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ปริญญาโท

สาขาเภสัชศาสตร์

ปีที่จบ พ.ศ. 2550

สถาบัน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ปริญญาเอก

สาขาเภสัชศาสตร์

ปีที่จบ พ.ศ. 2555

สถาบัน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประเทศไทย

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

ผลงานวิจัย

Charoonratana, T. 2013. Scientific approach in traditional Thai antihypertensive herbal recipes. *Bulletin of Heatlh, Science and Technology*. 11(1), 5-12.

Charoonratana, T., Wungsintaweekul, J., Pathompak, P., Georgiev MI., Choi, YH. and Verpoorte, R. 2013. Limitation of mitragynine biosynthesis in *Mitragyna speciosa* (Roxb.) Korth. through tryptamine availability. *Z. Naturforsch.* 68c, 394-405.

Charoonratana, T., Wungsintaweekul, J., Keawpradub, N. and Verpoorte, R. 2013. Molecular cloning and expression of tryptophan decarboxylase from *Mitragyna speciosa*. *Acta Physiol Plant*. 35, 2611-2621.

Wungsintaweekul, J., Choo-malee, J., **Charoonratana, T.** and Keawpradub, N. 2012. Methyl jasmonate and yeast extract stimulate mitragynine production in *Mitragyna speciosa* (Roxb.) Korth. shoot culture. *Biotechnol. Lett*. 34(10), 1945-1950.

Sitthithaworn, W., Wungsintaweekul, J., Sirisuntipong, T., **Charoonratana, T**., Ebizuka, Y. and De- Eknamkul W. 2010. Cloning and expression of 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthase cDNA from *Croton stellatopilosus* and expression of 2C-methyl-d-erythritol 4-phosphate synthase and geranylgeranyl diphosphate synthase, key enzymes of plaunotol biosynthesis. *J Plant Physiol.* 167, 292-300.

Puttarak P., **Charoonratana, T**. and Panichayupakaranant, P. 2010 Antimicrobial activity and stability of rhinacanthins-rich *Rhinacanthus nasutus* extract. *Phytomedicine.* 17, 323-327.

Panichayupakaranant, P., **Charoonratana, T**. and Sirikatitham, A. 2009. RP-HPLC Analysis of rhinacanthins in *Rhinacanthus nasutus*: Validation and application for the preparation of rhinacanthin high-yielding extract. *J. Chrom. Sci.* 47, 705-708.

สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ

Plant genetic engineering, Molecular biology, Quality control of herbal extract

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University