เถาวัลย์เปรียง: แนวทางการควบคุมคุณภาพวัตถุดิบและสารสกัด

ปฐม โสมวงศ์

หมวดวิชาเภสัชเคมีวิเคราะห์ วิทยาลัยเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต

บทคัดย่อ

เถาวัลย์เปรียง (*Derris scandens* (Roxb.) Benth.) เป็นพืชสมุนไพรที่ปรากฏอยู่ในบัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2561 ในรายการบัญชียาจากสมุนไพร ซึ่งพบว่า มีการกำหนดพืชสมุนไพรเถาวัลย์เปรียง ในรายการยาสำหรับรับประทานเพื่อรักษาโรคในกลุ่มอาการทางกล้ามเนื้อและกระดูก ในรายการยาดังกล่าวนี้พบว่าเถาวัลย์เปรียงมีการใช้ทางคลินิกในรูปแบบของผงพืชแห้งบรรจุแคปซูลและสารสกัดบรรจุแคปซูล ซึ่งเป็นยาสมุนไพรสำเร็จรูป ที่ขึ้นทะเบียนเป็นยาแผนโบราณ ด้วยรายงานวิจัยสมุนไพรเถาวัลย์เปรียงในปัจจุบัน พบว่าส่วนลำต้นของพืชชนิดนี้มีสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นองค์ประกอบทางเคมีอยู่หลายชนิด ได้แก่ benzyl derivatives, coumarins, flavonoids, steroids และ terpenoids และยังมีการค้นพบว่าสมุนไพรเถาวัลย์เปรียงมีฤทธิ์ต้านการอักเสบอย่างมีนัยสำคัญ โดยเป็นรายงานวิจัยทางคลินิกที่ได้ศึกษาประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์แคปซูลเถาวัลย์เปรียงที่เป็นยาแผนโบราณ ในการต้านอาการอักเสบของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม เปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยที่รักษาด้วยกลุ่มยา NSAIDs ซึ่งผลการวิจัยได้ระบุว่าการใช้ยาสมุนไพรเถาวัลย์เปรียงและการใช้ยา NSAIDs ในผู้ป่วยโรคดังกล่าวให้ประสิทธิผลทางคลินิกไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยที่พบว่าสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงแสดงฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งในหลอดทดลองอีกด้วย ซึ่งนับว่าเถาวัลย์เปรียงเป็นสมุนไพรที่มีรายงานวิจัยบ่งชี้ในเชิงประจักษ์ที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ในการรักษาตามตำรายา และมีแนวโน้มที่จะสามารถนำไปต่อยอดในการวิจัยและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อใช้รักษาโรคอื่นๆ เช่น มะเร็งด้วย อย่างไรก็ตามการพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพรเถาวัลย์เปรียง จำเป็นต้องมีการกำหนดชนิดและปริมาณสารสำคัญทางเคมีที่จะเป็นตัวบ่งชี้คุณภาพของผลิตภัณฑ์ ดังที่ปรากฏในข้อกำหนดมาตรฐาน (monograph) สมุนไพรเถาวัลย์เปรียง สารสกัด และผลิตภัณฑ์เถาวัลย์เปรียงแคปซูล ที่ได้ตีพิมพ์เผยแพร่ใน Thai Herbal Pharmacopoeia (THP) ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2559 โดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งได้ให้รายละเอียดมาตรฐานสมุนไพรเถาวัลย์เปรียง และตัวยาสำคัญในสมุนไพร รวมถึงวิธีการวิเคราะห์ทางเคมีโดยละเอียด เพื่อใช้เป็นแนวทางในการควบคุมคุณภาพวัตถุดิบสมุนไพร ตลอดจนผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปแก่ผู้ผลิตและยังเป็นแนวทางในการวิจัยและพัฒนาเพื่อต่อยอดสมุนไพรชนิดนี้ในแง่อื่นๆด้วย ซึ่งเนื้อหาในบทความทบทวนวิชาการนี้ ได้ให้รายละเอียดในส่วนของวิธีการวิเคราะห์สารสำคัญที่เป็นสารออกฤทธิ์ในสมุนไพรเถาวัลย์เปรียงอ้างอิงจาก monograph ของ Thai Herbal Pharmacopoeia ด้วย

คำสำคัญ: เถาวัลย์เปรียง การควบคุมคุณภาพ วัตถุดิบ สารสกัด ผลิตภัณฑ์แคปซูล

บทนำ

เถาวัลย์เปรียง (*Derris scandens* (Roxb.) Benth.) จัดเป็นพืชในวงศ์ Leguminosae มีชื่อสามัญที่เป็นที่รู้จักสากล คือ Hog Creeper Vine และมีชื่อท้องถิ่นอื่นๆ ที่เรียกในประเทศไทยได้แก่ เครือเขาหนัง เถาตาปลา เครือตาปลา (นครราชสีมา) ย่านเหมาะ (นครศรีธรรมราช) พานไสน (ชุมพร) เครือตับปลา [1] พืชชนิดนี้เป็นไม้เถาเลื้อยขนาดใหญ่ ยอดอ่อนมีขนนุ่ม ใบประกอบแบบขนนกเรียงสลับ ดอกช่อออกที่ซอกใบ ดอกย่อยรูปดอกถั่ว กลีบดอกสีขาวหรือชมพูอ่อน และผลเป็นฝักยาว [2] มีสรรพคุณตามตำรายาพื้นบ้านเป็นยาขับปัสสาวะ แก้ปวด แก้ไข้ บรรเทาอาการปวดเมื่อยของกล้ามเนื้อ [1,2] และถูกบรรจุในรายการบัญชียาจากสมุนไพร จัดอยู่ในกลุ่มยารักษาอาการทางกล้ามเนื้อและกระดูก โดยมีข้อบ่งใช้ที่ระบุอยู่ในบัญชียาหลักแห่งชาติ ตามประกาศในราชกิจจานุเบกษา พ.ศ. 2561 คือ ใช้บรรเทาอาการปวดกล้ามเนื้อ ลดการอักเสบของกล้ามเนื้อ บรรเทาอาการปวดหลังส่วนล่าง และอาการปวดจากข้อเข่าเสื่อม [3]

จากรายงานการศึกษาวิจัยองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของเถาวัลย์เปรียง พบว่าพืชชนิดนี้เป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญหลายชนิด โดยส่วนรากและลำต้น (เถา) เป็นแหล่งของสารสำคัญที่มีฤทธิ์ชีวภาพ เป็นองค์ประกอบอยู่มากที่สุด สารสำคัญที่ค้นพบดังกล่าวประกอบด้วยสารอนุพันธ์กลุ่ม benzyl derivatives เช่น derrisdione A และ กลุ่ม coumarins เช่น scandenin ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ eicosanoids ซึ่งเป็น signaling molecule ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ การค้นพบสารกลุ่ม flavonoids ได้แก่สารชนิด flavones เช่น laxifolin และชนิด isoflavones เช่น chandalone, derrisisoflavones A-E, eturunagarone, scandenone และ genistein ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ กลุ่ม isoflavone glycosides เช่น genistein-7-*O*-[α-rhamnopyranosyl-(1$\rightarrow$6)-β-glucopyranoside] ที่มีฤทธิ์ต้านกระบวนการอักเสบ และสาร isoflavone glycoside ดังกล่าวนี้ได้ถูกกำหนดให้ใช้เป็นสารชี้วัดคุณภาพในการวิเคราะห์ทางเคมี (analytical marker) ในข้อกำหนดมาตรฐานของสมุนไพรเถาวัลย์เปรียงในตำรายา Thai Herbal Pharmacopoeia โดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เนื่องจาก genistein-7-*O*-[α-rhamnopyranosyl-(1$\rightarrow$6)-β-glucopyranoside] เป็นสารที่พบมาก (major compound) โดยพบปริมาณร้อยละ 0.21-1.44 ในส่วนลำต้นของเถาวัลย์เปรียง [4,5] นอกจากนี้ยังมีรายงาน พบสารกลุ่มอื่นๆเช่น pterocarpans เช่น flemichapparins B,C กลุ่ม steroids ได้แก่ β-sitosterol และ β-sitosterol glucopyranoside และกลุ่ม triterpenes เช่น β-amyrin, betulinic acid และ lupeol [6]

เพื่อการยืนยันประสิทธิภาพในการรักษากลุ่มอาการปวดกล้ามเนื้อ และกระดูก ที่มีการใช้สมุนไพรเถาวัลย์เปรียงตามภูมิปัญญาไทยและปรากฏในข้อบ่งใช้ตามตำรายา นักวิจัยจึงได้นำสารสกัดจากส่วนเถาของพืช รวมถึง ยาสำเร็จรูปในรูปแบบของแคปซูลเถาวัลย์เปรียง มาศึกษาฤทธิ์ต้านกระบวนการอักเสบ (anti-inflammatory) ซึ่งจากหลักฐานการวิจัยพบว่า ทั้งสารสกัดและยาแคปซูลเถาวัลย์เปรียง มีฤทธิ์ต่อต้านกระบวนการอักเสบ ลดอาการปวด ได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีความปลอดภัยในการใช้รักษาอาการปวดเข่าจากโรคข้อเข่าอักเสบ (osteoarthritis) ได้เช่นเดียวกันกับยาในกลุ่ม NSAIDs เช่น ibuprofen และ naproxen โดยมีผลการวิจัยทางคลินิกบ่งชี้ในเชิงประจักษ์ [7-9] รวมถึงมีผลการศึกษาแบบการวิเคราะห์อภิมาน (meta-analysis) แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของการใช้เถาวัลย์เปรียงในการรักษา ซึ่งไม่แตกต่างกับการรักษาผู้ป่วยโดยใช้ยาลดปวดกลุ่ม NSAIDs และผลการวิจัยยังได้ยืนยันถึงความปลอดภัยในการใช้ยาเถาวัลย์เปรียงและผลข้างเคียงที่พบมี

ความคล้ายคลึงกับยาในกลุ่ม NSAIDs [10] ซึ่งจากรายงานวิจัยทั้งหมด ได้แสดงให้เห็นถึงคุณค่าและประสิทธิภาพของสมุนไพรเถาวัลย์เปรียง และบ่งชี้ว่าเถาวัลย์เปรียงสามารถนำมาพัฒนาต่อยอด เป็นยาในรูปแบบต่างๆ เพื่อเป็นทางเลือก ใช้สำหรับรักษาผู้ป่วย osteoarthritis ได้

นอกจากรายงานการวิจัยที่เป็นการศึกษาเพื่อยืนยันข้อบ่งใช้ตามภูมิปัญญา หรือ ตามตำรายาแพทย์แผนไทย ซึ่งได้แก่ ฤทธิ์ต้านการอักเสบและการลดอาการปวดของกลุ่มโรคกล้ามเนื้อและกระดูกแล้ว ยังมีรายงานว่า สารสกัดเถาวัลย์เปรียงมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในมนุษย์หลายชนิดและเชื้อรา [11,12] และสารสกัดเถาวัลย์เปรียงยังแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้หลายชนิดในการศึกษาระดับ *in vitro* ได้อย่างน่าสนใจ [13-17] ซึ่งในรายงานวิจัยหลายฉบับที่ได้ตีพิมพ์เผยแพร่เกี่ยวกับฤทธิ์ของสารสกัดเถาวัลย์เปรียง ได้ยืนยันความสัมพันธ์ของฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบกับสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีที่มีรายงานพบในพืชสมุนไพรชนิดนี้ หลายชนิด ตัวอย่างเช่น สารกลุ่ม flavonoids ชนิด isoflavones และ isoflavone glycosides ที่มีฤทธิ์ต้านกระบวนการอักเสบ ต้านเชื้อจุลชีพ รวมถึงต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง นอกจากสาร isoflavones และอนุพันธ์ดังกล่าว ผู้เขียนได้สนใจศึกษาและทำการทดลองวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญชนิดอื่นๆในสารสกัดเถาวัลย์เปรียงที่สกัดด้วยตัวทำละลายแอลกอฮอล์ ได้แก่การวิเคราะห์ปริมาณสาร lupeol (กลุ่ม triterpenes) ซึ่งพบเป็นองค์ประกอบทางเคมีที่มีอยู่ในสารสกัดเถาวัลย์เปรียง [6,18] เนื่องจากมีรายงานวิจัยพบว่าสาร lupeol แสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบ และฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งในหลอดทดลองได้ดี เช่นเดียวกับสาร isoflavones ที่มีรายงานการทดสอบยืนยันฤทธิ์ทางชีวภาพแล้ว และสาร lupeol นี้ยังได้ถูกนำไปศึกษาวิจัยอย่างกว้างขวาง เป็นการศึกษาเชิงลึกในระดับ preclinical เพื่ออธิบายกลไก และ mediators ที่เกี่ยวข้อง เพื่อยืนยันฤทธิ์ของสารที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งกระบวนการอักเสบ และการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง อีกด้วย [19-23]

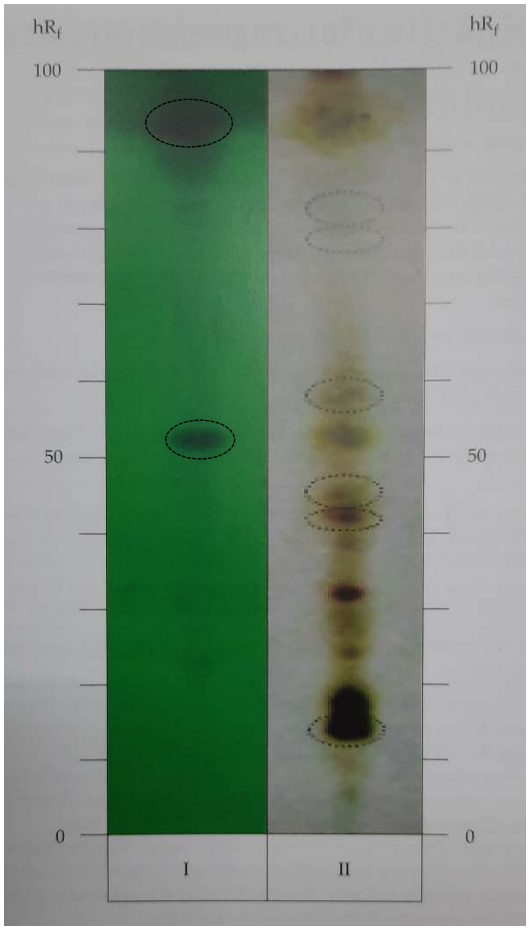
เนื่องจากสรรพคุณของเถาวัลย์เปรียงตามตำรายาและที่ปรากฏในรายการยาจากสมุนไพร ในบัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2561 เน้นไปที่ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และลดอาการปวดเท่านั้น ดังนั้นในปัจจุบันการควบคุมคุณภาพของสมุนไพร สารสกัดและผลิตภัณฑ์ยาแคปซูล จากเถาวัลย์เปรียง ที่ได้กำหนดไว้ใน monograph ของ Thai Herbal Pharmacopoeia 2018 นั้นได้กำหนดมาตรฐานคุณภาพทางเคมีของเถาวัลย์เปรียง โดยได้กำหนดปริมาณของสาร genistein-7-*O*-[α-rhamnopyranosyl-(1$\rightarrow$6)-β-glucopyranoside] ซึ่งเป็นสารที่มีโครงสร้างทางเคมีจัดอยู่ในกลุ่ม isoflavone glycosides ที่มีรายงานวิจัยยืนยันว่าเป็นสารออกฤทธิ์ต้านการอักเสบ [24] เป็นสารชี้วัดทางเคมี (chemical marker) ในผลิตภัณฑ์สารสกัดแห้ง และยาแคปซูลเถาวัลย์เปรียง [5] เพื่อเป็นแนวทางให้ผู้ผลิตยาจากสมุนไพรเถาวัลย์เปรียง ได้ทำการวิเคราะห์ และพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อยกระดับให้มีคุณภาพและมาตรฐานสากล ดังที่กำหนดไว้ใน monograph ที่การวิเคราะห์หาปริมาณของสารสำคัญที่เป็น chemical marker ซึ่งมีรายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการออกฤทธิ์ทางยาของสมุนไพรชนิดนั้นๆ เป็นส่วนสำคัญในการควบคุมคุณภาพสารสกัด ตลอดจนผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่ใช้เพื่อการบำบัดรักษาโรค

การควบคุมคุณภาพวัตถุดิบเถาวัลย์เปรียง

การควบคุมวัตถุดิบสมุนไพรเถาวัลย์เปรียง ได้ถูกบรรจุในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia) ตั้งแต่ Thai Herbal Pharmacopoeia 2016 ซึ่งพิมพ์ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2559 ที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้พัฒนาขึ้น เพื่อใช้เป็นมาตรฐานวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์สมุนไพรในประเทศไทย ซึ่งกำลังดำเนินการรวบรวมและจัดทำข้อกำหนดมาตรฐาน (monograph) ของสมุนไพรที่อยู่ในบัญชีรายการยาจากสมุนไพร ตามบัญชียาหลักแห่งชาติอย่างต่อเนื่อง ใน monograph ของเถาวัลย์เปรียง มีการระบุ ถึง ชื่อวิทยาศาสตร์ของพืช รวมถึงชื่อพ้อง ที่เรียกตามแต่ละท้องถิ่นในประเทศไทย ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพืช ลักษณะทางกายภาพ ทั้งในระดับมหภาค (macroscopic) และ องค์ประกอบของลักษณะเซลล์ของพืชเมื่อดูจากกล้องจุลทรรศน์ (microscopic) ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการพิสูจน์เอกลักษณ์วัตถุดิบสมุนไพรแห้ง ทั้งแบบที่เป็น crude drug และตัวอย่างสมุนไพรบดผง (powder) ดังแสดงในภาพที่ 1 (A และ B ตามลำดับ) นอกจากข้อกำหนดด้านกายภาพของพืชสมุนไพรแล้ว Thai Herbal Pharmacopoeia ยังได้ระบุถึง องค์ประกอบเคมีในพืช ซึ่งอาจมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ทางยาของสมุนไพรชนิดนั้น ๆ ซึ่งใน monograph ของเถาวัลย์เปรียงได้ระบุชื่อสารสำคัญที่พบในส่วนลำต้นของพืช ได้แก่ สารกลุ่ม isoflavone glycosides เช่น genistein-7-*O*-[α-rhamnopyranosyl-(1$\rightarrow$6)-β-glucopyranoside] สารกลุ่ม isoflavones เช่น derrisisoflavones A-E และสารกลุ่มอื่นๆเช่น coumarins และ sterols สารสำคัญเหล่านี้เป็นองค์ประกอบทางเคมีที่พบในส่วนลำต้นของเถาวัลย์เปรียง ซึ่งมีวิธีการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีระบุไว้ใน monograph ของ Thai Herbal Pharmacopoeia เรียบร้อยแล้ว ทั้งแบบการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยการนำเถาวัลย์เปรียงบดผงมาแช่สกัดด้วยแอลกอฮอล์และนำสารสกัดที่ได้มาทำปฏิกิริยาทางเคมีด้วยการใช้ magnesium ribbon และกรด HCl เข้มข้น และตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงสีของสารสกัด (Shinoda test) ซึ่งเป็นการทดสอบที่เฉพาะเจาะจงกับกลุ่มสาร flavonoids [25] และการทดสอบสารกลุ่ม glycosides โดยการนำ crude drug มาบดผง และทดสอบด้วยการเขย่ากับน้ำ จะเกิดฟองที่มีความคงตัวเป็นเวลามากกว่า 15 นาที นอกจากการทดสอบทางเคมีในข้างต้น เถาวัลย์เปรียงยังได้ถูกกำหนดให้มีการพิสูจน์เอกลักษณ์ตัวอย่าง crude drug ด้วยวิธี Thin-Layer Chromatography (TLC) ซึ่งวิธีการดังกล่าวได้ถูกกำหนดเป็นวิธีวิเคราะห์ชนิด chromatography วิธีการแรก ที่ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของพืชสมุนไพรตามมาตรฐานใน Thai Herbal Pharmacopoeia ทั้งนี้การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของพืช ด้วยวิธี TLC มีข้อดีกว่าวิธีการอื่นๆดังที่กล่าวข้างต้น คือ TLC สามารถตรวจสอบกลุ่มสารสำคัญได้หลายชนิด ทั้งกลุ่มสารที่มีความสามารถในการดูดกลืนแสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ได้แก่สารอินทรีย์ที่มีโครงสร้างทางเคมีที่มีหมู่ฟังก์ชั่นแบบ conjugated double bond หรือ aromatic ring และ กลุ่มสารสำคัญอื่นๆที่โครงสร้างเคมีไม่มีหมู่ฟังก์ชั่นที่สามารถดูดกลืนแสง UV แต่สามารถถูกตรวจวัดได้ด้วย spray reagent ต่างๆ เช่นการใช้ sulfuric acid ในตัวทำละลาย ethanol ที่ความเข้มข้น 20 %v/v ซึ่งเมื่อ spray ลงบนแผ่น TLC ที่มี spots ของสารสำคัญและนำแผ่น TLC ไปให้ความร้อนที่ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที จะเกิดสีบน spot ของสารตัวอย่างซึ่งสามารถนำมาเปรียบเทียบกับ spot ของสารมาตรฐานอ้างอิงได้ ทั้งนี้การพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยวิธี TLC จะใช้ค่า R_f value ของสาร ซึ่งคำนวณได้จากระยะทาง (cm) ที่สารสำคัญเคลื่อนที่บนแผ่น TLC หารด้วยระยะทางที่ตัวทำละลาย (mobile phase) เคลื่อนที่ จากข้อมูลอ้างอิงในตำรามาตรฐานสมุนไพร Thai Herbal Pharmacopoeia ได้แปลงค่า R_f value เป็นค่าร้อยละ โดย

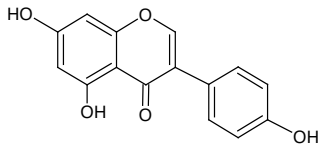
ใช้สัญลักษณ์เป็น hR_f value (เป็นการคำนวณเปรียบเทียบระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ เป็น 100 cm) ซึ่ง Thin-Layer Chromatogram ของเถาวัลย์เปรียงแสดงในภาพที่ 2

ภาพที่ 1. ภาพถ่าย crude drug (A) ของสมุนไพรเถาวัลย์เปรียง (RSU 0089) และเถาวัลย์เปรียงบดผง (B)

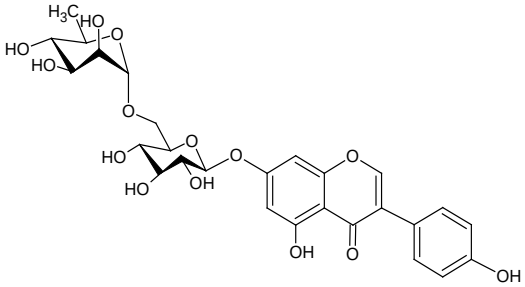


ภาพที่ 2. Thin-Layer Chromatogram ของสารสกัดเถาวัลย์เปรียง ซึ่งตรวจวัด spots สารสำคัญด้วยแสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร (I) และ sulfuric acid 20 %v/v spray reagent (II) [5]

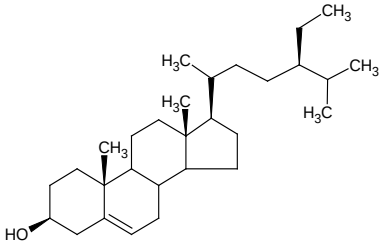
จากภาพ Thin-Layer Chromatogram ของสารสกัดเถาวัลย์เปรียง ซึ่งเตรียมจากเถาวัลย์เปรียงบดผง แช่สกัดด้วยตัวทำละลาย ethanol โดยการให้ความร้อนแก่ตัวทำละลายโดยตรง (reflux) เป็นเวลา 20 นาที และกรองส่วนกากของผงพืชออก นำสารสกัดที่ได้ มาวิเคราะห์ด้วย TLC ซึ่งระบบประกอบด้วย แผ่น TLC ชนิดที่เคลือบด้วยสาร silica gel GF254 เป็นวัฏภาคนิ่ง (stationary phase) และ develop แผ่น TLC ที่ spot สารสกัดที่จุดเริ่มต้น (hR_f = 0) แล้ว ด้วยสารละลายผสมระหว่าง chloroform, methanol และ น้ำ ในสัดส่วน (7: 4: 1) ตามลำดับ ซึ่งทำหน้าที่เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ในระบบ เมื่อ mobile phase เคลื่อนที่ ไปจนถึงด้านบนสุดดังภาพที่ 2 (hR_f = 100) นำแผ่น TLC ออกมาจาก tank เพื่อทำการตรวจวัดชนิดของสารสำคัญ โดยตรวจสอบ spot สารภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร จากภาพ chromatogram มาตรฐาน (I) จะพบ spot ของสารสำคัญอย่างน้อย 2 ชนิด ซึ่งให้จุดทึบแสง (quenching spot) บนแผ่น TLC ที่ hR_f values 53-55 และ 92-95 ซึ่งเกิดจากการที่สารสำคัญดังกล่าว มีความสามารถในการดูดกลืนแสง UV และทำให้บริเวณนั้นเกิดการบดบังการเรืองแสง fluorescence ของแผ่น TLC (silica gel GF254) นอกจากการตรวจสอบด้วยการดู spot ของสารสำคัญบนแผ่น TLC ภายใต้แสง UV แล้วยังสามารถใช้ sulfuric acid spray reagent ทำให้ spot ของสารอินทรีย์อื่นๆนั้นติดสีและปรากฏบนแผ่น TLC ดังภาพที่ 2 (II) ซึ่งจะเห็น spot ของสารสำคัญหลายชนิด ได้แก่ ที่ hR_f values 16-18, 40-42, 58-60, 78-80 และ 81-83



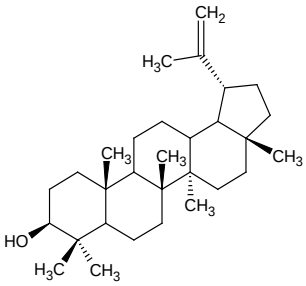
(A) Genistein



(B) Genistein-7-*O*-[α-rhamnopyranosyl-(1$\rightarrow$6)-β-glucopyranoside]



(C) β-Sitosterol



(D) Lupeol

ภาพที่ 3. โครงสร้างเคมีของสารสำคัญบางชนิดที่พบในสารสกัดจากส่วนลำต้นของเถาวัลย์เปรียง

จากภาพที่ 3 แสดงตัวอย่างสูตรโครงสร้างเคมีของสารสำคัญที่พบในสารสกัดด้วยตัวทำละลายแอลกอฮอล์จากส่วนลำต้นของเถาวัลย์เปรียง [6,11] ซึ่ง สารที่สามารถให้ผลทดสอบเป็นบวกกับการทดสอบ Shinoda test ได้แก่สาร genistein (A) ซึ่งเป็นสารกลุ่ม flavonoids ชนิดที่มีโครงสร้างเคมีแบบ isoflavone ส่วนการทดสอบการเกิดฟองของสารสกัดเมื่อเขย่ากับน้ำ เป็นการทดสอบสารชนิด saponin glycosides จากโครงสร้างทางเคมีของสาร A และ สาร B แสดงถึงหมู่ฟังก์ชั่นที่สามารถดูดกลืนแสง UV ได้ จากการที่มี conjugated double bond หรือ aromatic ring เป็นส่วนประกอบในโครงสร้าง ทำให้ สาร A และ B สามารถถูกตรวจสอบด้วยวิธี TLC โดยใช้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรเป็นเครื่องตรวจวัด spot ของสาร ซึ่งนอกจากสาร A และ B แล้ว สารชนิดอื่นๆที่มีคุณสมบัติดังกล่าวนี้ จะสามารถตรวจพบ spot ของสาร เป็นจุดทึบแสงบนแผ่น TLC (silica gel GF254) ได้เช่นเดียวกัน ส่วนสารสำคัญชนิดอื่นๆ ที่เป็นองค์ประกอบเคมีของเถาวัลย์เปรียง เช่นสารกลุ่ม steroids เช่น β-sitosterol (C) และสารกลุ่ม triterpenes เช่น lupeol (D) เมื่อดูจากโครงสร้างเคมีของสารในภาพที่ 3 พบว่า สาร C และสาร D ไม่มีส่วนโครงสร้างที่สามารถดูดกลืนแสง UV ได้ แต่สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยวิธี TLC ได้เช่นกัน โดยใช้ sulfuric acid spray reagent สเปรย์ลงบนแผ่น TLC และนำไปอังความร้อน ซึ่ง spot ของสารทั้งสองชนิดรวมถึงสารอินทรีย์ชนิดอื่นๆ สามารถติดสี และตรวจสอบ spot ของสารได้เช่นกัน ดังภาพที่ 2 (II)

นอกจากการตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของพืช และการตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมี เพื่อใช้พิสูจน์เอกลักษณ์ของสมุนไพรนั้นแล้ว ยังจำเป็นต้องมีการควบคุมคุณภาพด้านอื่นๆ เช่น การวิเคราะห์ความชื้นของผงยา (loss on drying) การวิเคราะห์สิ่งแปลกปลอมที่อาจเจือปนในวัตถุดิบยา (foreign matter) การวิเคราะห์เถ้าเพื่อศึกษาปริมาณการปนเปื้อนของสารอนินทรีย์ เช่นโลหะหนักในผงยา (total ash) การศึกษาปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ที่ตกค้างในสารสกัด เช่นปริมาณ ethanol ที่ใช้สกัดเถาวัลย์เปรียง เป็นต้น ปัจจัยการปลอมปนสิ่งปนเปื้อนต่างๆเหล่านี้ ส่งผลถึงคุณภาพ และความปลอดภัยในการใช้สมุนไพร ดังนั้นในตำรามาตรฐานสมุนไพรจึงได้กำหนดค่ามาตรฐานด้านต่างๆ (specification limits) เพื่อให้มีการวิเคราะห์เพื่อควบคุมการปนเปื้อนในวัตถุดิบสมุนไพร ด้วย [4,5]

การวิเคราะห์คุณภาพของสารสกัดแห้งเถาวัลย์เปรียง

สารสกัดแห้งเถาวัลย์เปรียง มีการนำมาใช้เป็นยาแก้ปวดและต้านการอักเสบ ตามตำรายามาตรฐานสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia 2018) สารสกัดแห้งนี้ ถูกกำหนดคุณสมบัติตามตำรายาให้เป็นสารที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลาย ethanol ในน้ำ (ความเข้มข้น 50% v/v) เมื่อระเหยจนตัวทำละลายแห้ง จะได้สารสกัดแห้งที่มีลักษณะเป็นผงสีเหลืองหรือเหลืองอมน้ำตาล (yellowish to yellow-brown powder) นอกจากคุณลักษณะทางกายภาพของสารสกัด ข้อกำหนดมาตรฐานในตำรายานี้ ยังได้กำหนดคุณภาพทางเคมีของสารสกัดแห้งเถาวัลย์เปรียงอีกด้วย โดยสารสกัดต้องมีสารสำคัญ (active ingredient) ในกลุ่ม isoflavone glycosides ที่มีฤทธิ์ต้านอาการอักเสบ ชื่อสาร genistein-7-*O*-[α-rhamnopyranosyl-(1$\rightarrow$6)-β-glucopyranoside] ($C_{27}H_{30}O_{14}$, MW = 578.52 g/mol) อยู่ในสารสกัด ซึ่งในการวิเคราะห์ ได้กำหนดให้มีการวิเคราะห์และคำนวณเพื่อแสดงปริมาณของสารสำคัญดังกล่าว ที่พบในสารสกัดแห้งจะต้องมีปริมาณไม่น้อยกว่า 0.5 % โดยน้ำหนักของสารสกัด อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์และคำนวณเพื่อระบุปริมาณสารสำคัญนี้ ใน Thai Herbal Pharmacopoeia [5] ได้ใช้วิธีการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน genistein ($C_{15}H_{10}O_5$, MW = 270.24 g/mol) ซึ่งเป็นสารส่วน aglycone

(ส่วนโครงสร้างเคมีหลักของ glycosides ที่ไม่ใช่โมเลกุลน้ำตาล) ของสารสำคัญดังกล่าว ซึ่งในธรรมชาติพบมากในถั่วเหลือง และปัจจุบันสามารถสังเคราะห์สาร genistein ที่มีความบริสุทธิ์สูงและนำมาใช้เป็นสารมาตรฐานอ้างอิงได้ [26] แทนการวิเคราะห์สาร glycosides โดยตรง ทั้งนี้อาจเนื่องจากปัญหาความไม่คงตัวทางเคมีของสาร glycosides ที่เกิดจากการมีโมเลกุลของน้ำตาลเป็นองค์ประกอบในโครงสร้างเคมีและเสื่อมสลายได้ง่ายด้วยปฏิกิริยา hydrolysis ที่อาจเกิดขึ้นได้จากความร้อนระหว่างการสกัดในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ ดังนั้นการวิเคราะห์ตามตำรายานี้ จึงใช้การเปรียบเทียบน้ำหนักสมมูลย์ของสาร genistein ต่อหนึ่งโมลของสาร genistein-7-*O*-[α-rhamnopyranosyl-(1$\rightarrow$6)-β-glucopyranoside] เพื่อคำนวณปริมาณของสารสำคัญ ในรูปของ glycosides ที่มีอยู่จริงในสารสกัด [27]

ในการแสดงปริมาณของ active ingredient ที่มีอยู่ในสารสกัด เป็นดัชนีชี้วัดคุณภาพทางเคมีที่สำคัญของสารที่นำมาใช้เป็นยา อ้างอิงจาก monograph ของตำรายามาตรฐานสากลของต่างประเทศ (USP, BP, EP) ได้มีการกำหนดขีดจำกัดของปริมาณสารสำคัญต่ำสุดและมากสุดที่ยอมรับได้เป็นช่วงค่ามาตรฐาน (specification limits) ของ active ingredient เอาไว้ ใน Thai Herbal Pharmacopoeia ก็ได้กำหนด specification limits ของปริมาณสาร active ingredient เช่นเดียวกัน โดยในสารสกัดแห้งเถาวัลย์เปรียงจะต้องมีปริมาณสาร genistein-7-*O*-[α-rhamnopyranosyl-(1$\rightarrow$6)-β-glucopyranoside] ไม่น้อยกว่า 90.0 % และไม่มากกว่า 110.0 % ของปริมาณที่ระบุในฉลาก (ฉลากที่ระบุปริมาณสารมีไม่น้อยกว่า 0.5 % โดยน้ำหนักของสารสกัดแห้ง) ตัวอย่างเช่น หากฉลากผลิตภัณฑ์สารสกัดเถาวัลย์เปรียง ระบุปริมาณสารดังกล่าวมีอยู่ 0.6% ในสารสกัดแห้ง หากเป็นผลิตภัณฑ์สารสกัดที่ได้มาตรฐานตามข้อกำหนดดังกล่าวนี้ จะต้องวิเคราะห์พบปริมาณสารสำคัญชนิดนี้อยู่ในช่วง 0.54 – 0.66 %

การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญข้างต้น ซึ่งเป็น chemical marker ในสารสกัดแห้งเถาวัลย์เปรียง ตามตำรา Thai Herbal Pharmacopoeia กำหนดให้วิเคราะห์ด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยวิธีการวิเคราะห์ทางเคมีด้วย HPLC มีข้อดี ที่มากกว่าวิธี TLC กล่าวคือ วิธี HPLC สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งในเชิงคุณภาพเช่นการพิสูจน์ชนิดของสารสำคัญ (identification) ด้วยการใช้ค่า retention time (เวลาของพีคของสารสำคัญที่ปรากฏใน chromatogram มีหน่วยเป็นนาที) ของตัวอย่าง เปรียบเทียบกับค่า retention time ของสารมาตรฐานอ้างอิงที่วิเคราะห์ด้วยระบบ HPLC เดียวกัน (หากเป็นสารชนิดเดียวกัน ค่า retention time ของสารทั้งสองที่นำมาเปรียบเทียบต้องเท่ากัน) และยังสามารถนำสัญญาณทางไฟฟ้าที่ปรากฏเป็นพื้นที่ใต้พีคของสารสำคัญ ใน chromatogram ที่ได้จาก HPLC มาวิเคราะห์ในเชิงปริมาณ โดยเปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานอ้างอิงที่ทราบความเข้มข้น ทำให้สามารถคำนวณปริมาณของสารสำคัญที่มีอยู่ในตัวอย่างได้ นอกจากนี้ วิธี HPLC ยังสามารถประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์สารสำคัญที่มีโครงสร้างทางเคมีหลากหลายกลุ่ม โดยการเปลี่ยนชนิด stationary phase หรือปรับเปลี่ยนชนิดของตัวทำละลาย mobile phase ได้หลากหลาย ซึ่งสามารถเพิ่มความเฉพาะเจาะจงต่อกลุ่มสารที่ต้องการจะวิเคราะห์ได้ รวมถึง HPLC ยังเป็นวิธีการวิเคราะห์ที่มีความไว สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณของสารสำคัญที่มีอยู่ในตัวอย่าง ในระดับความเข้มข้นที่น้อยมากๆเช่นระดับไมโครกรัมและนาโนกรัมได้ จึงเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งแตกต่างจากวิธี TLC ที่มีประโยชน์ในเชิงการวิเคราะห์เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์เพียงอย่างเดียว ไม่สามารถวิเคราะห์ในเชิงปริมาณได้ [28-30]

ระบบของ HPLC ที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์สารสกัดเถาวัลย์เปรียงตามวิธีมาตรฐานใน Thai Herbal Pharmacopoeia 2018 [5] ประกอบด้วย ส่วน mobile phase เป็นตัวทำละลายผสมสองชนิด (A และ B) ซึ่ง mobile phase A คือ acetonitrile และ mobile phase B เป็น สารละลาย acetic acid 1%v/v ในน้ำ ผสมกันในสัดส่วนต่างๆ ปรับเปลี่ยนตามเวลาในการ pump ส่วนตัวทำละลายเพื่อการแยกสาร (gradient elution) ดังนี้

ตารางที่ 1. สัดส่วนของ mobile phase ชนิด A และ B ที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์สารสกัดเถาวัลย์เปรียง [5]

Time (minutes)	Mobile phase A (% v/v)	Mobile phase B (% v/v)
0	15	85
15	22	78
30	45	55
35	15	85
40	15	85

ตัวทำละลายผสมตามสัดส่วนต่างๆ ดังตารางที่ 1 ถูก pump ขับเคลื่อนเข้าสู่ระบบ HPLC ด้วยอัตราเร็ว 1 mL/min ผ่านส่วนของ stationary phase คือ stainless steel column (25 cm × 4.6 mm) ที่มีอนุภาค silica-C18 (ขนาดอนุภาค 3-10 μm) บรรจุอยู่ใน column ซึ่งส่วนนี้จะเกิดการแยกสารเกิดขึ้น และการตรวจวัดสารสำคัญที่ถูกแยกได้แก่สาร genistein จะใช้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 260 nm เป็น detector ซึ่งสารมาตรฐานอ้างอิงชนิดเดียวกันดังกล่าวจะถูกเตรียมในความเข้มข้น 10 μg/mL และนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับ สารสกัดเถาวัลย์เปรียงตัวอย่างที่ถูกเตรียมโดยการชั่งสารสกัดแห้งและละลายในตัวทำละลาย ethanol 50%v/v ให้ได้สารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 1.25 mg/mL นำสารมาตรฐานอ้างอิงและสารละลายตัวอย่าง มาฉีดวิเคราะห์ด้วย HPLC (ปริมาตร 20 μL) เพื่อเปรียบเทียบพีคของสาร ซึ่งใน monograph ของวิธีการวิเคราะห์มาตรฐานนี้ ระบุค่า retention time ของสาร genistein ปรากฏที่เวลา 32 นาที [5]

การวิเคราะห์ในเชิงปริมาณสามารถนำค่า peak area หรือ peak height ที่ได้จาก chromatogram ของสารตัวอย่างมาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับพีคของสารมาตรฐานอ้างอิงที่ทราบความเข้มข้น ทำให้ สามารถคำนวณเป็นปริมาณของสารสำคัญที่มีอยู่ในตัวอย่างได้ ดังตัวอย่าง

<u>ตัวอย่าง 1</u> วิเคราะห์ตัวอย่างสารสกัดเถาวัลย์เปรียง ตรวจพบพีคของสาร genistein ในตัวอย่างสารสกัด ซึ่งให้ peak area (mAU) = 141500 เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับพีคของสารมาตรฐานอ้างอิง genistein (ความเข้มข้น 10 μg/mL) ซึ่งให้ peak area (mAU) = 65450 จงวิเคราะห์หาปริมาณของสาร genistein ที่มีอยู่ในตัวอย่างสารสกัด (ความเข้มข้น 1.25 mg/mL)

<u>การคำนวณ</u>

Peak area ของสาร genistein มีค่า 65450 มาจากพีคของสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 10 μg/mL

ถ้า Peak area ของสารตัวอย่าง มีค่า 141500 จะเทียบเท่ากับ genistein ที่มีความเข้มข้น = (141500/65450) ×10 = 21.62 μg/mL

ดังนั้น ปริมาณสาร genistein ที่พบในตัวอย่างสารสกัดมีความเข้มข้น 21.62 μg/mL หรือ 0.02162 mg/mL

<u>ตัวอย่าง 2</u> การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญข้างต้น ได้วิเคราะห์จากสารสกัดเถาวัลย์เปรียงน้ำหนักแห้งที่ชั่งน้ำหนักอย่างแม่นยำมา 500 mg นำมาละลายด้วยตัวทำละลาย ethanol 50% v/v และปรับปริมาตรใน volumetric flask ขนาด 100 mL จนได้สารละลายตัวอย่างเจือจางจากสารสกัด จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างมาวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC พบปริมาณสารสำคัญ genistein มีความเข้มข้น 0.02162 mg/mL จงคำนวณหาปริมาณสารสำคัญดังกล่าว ที่มีอยู่ในสารสกัดแห้ง

<u>การคำนวณ</u>

สารสกัดปริมาตร 1 mL วิเคราะห์พบสาร genistein มีปริมาณ 0.02162 mg

สารสกัดทั้งหมดมีปริมาตร 100 mL จะมีปริมาณสาร genistein = 0.02162 ×100 = 2.162 mg

ดังนั้น ปริมาณสาร genistein ที่พบในตัวอย่างสารสกัดแห้งหนัก 500 mg มีปริมาณ 2.162 mg

จึงคิดเป็นร้อยละ (2.162/500) ×100 = 0.43 ในสารสกัดแห้ง

<u>ตัวอย่าง 3</u> สารสกัดแห้งเถาวัลย์เปรียงมาตรฐานตาม Thai Herbal Pharmacopoeia 2018 ระบุปริมาณสารสำคัญชื่อ genistein-7-*O*-[α-rhamnopyranosyl-(1$\rightarrow$6)-β-glucopyranoside] ต้องมีปริมาณอยู่ไม่น้อยกว่า 0.5 % โดยน้ำหนัก (กล่าวคือหากมีสารสกัดแห้ง 100 กรัม จะพบสารสำคัญดังกล่าวไม่น้อยกว่า 0.5 กรัม) แต่การวิเคราะห์ปริมาณสารดังกล่าวดังแสดงในตัวอย่าง 1 และ 2 นั้นเป็นการวิเคราะห์สาร genistein ซึ่งเป็นสารส่วนโครงสร้างเคมีหลัก (aglycone) ของสารสำคัญ isoflavone glycoside ชื่อข้างต้น ดังนั้นปริมาณสารสำคัญ isoflavone glycoside ชนิดดังกล่าวที่ควรมีอยู่จริงในสารสกัดจะมีปริมาณเท่าใด

<u>การคำนวณ</u>

Genistein ($C_{15}H_{10}O_5$) มีน้ำหนักโมเลกุล = 270.24 g/mol และ genistein-7-*O*-[α-rhamnopyranosyl-(1$\rightarrow$6)-β-glucopyranoside] ($C_{27}H_{30}O_{14}$) มีน้ำหนักโมเลกุล = 578.52 g/mol หากเปรียบเทียบน้ำหนักสารทั้งสอง ต่อ 1 โมล

สาร genistein หนัก 2.162 mg (2.162×10^{-3} g) จะเทียบเท่ากับ genistein-7-*O*-[α-rhamnopyranosyl-(1$\rightarrow$6)-β-glucopyranoside] ปริมาณ (578.52/270.24) × (2.162×10^{-3}) = 0.0046 g

ดังนั้นสารสกัดแห้งที่ชั่งมาวิเคราะห์หนัก 0.5 g มีสาร genistein-7-*O*-[α-rhamnopyranosyl-(1$\rightarrow$6)-β-glucopyranoside] อยู่ปริมาณ 0.0046 g

จะคิดเป็นร้อยละ (0.0046/0.5) × 100 = 0.92 ต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง

การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญออกฤทธิ์ที่ระบุเป็น chemical marker ในสารสกัดแห้งเถาวัลย์เปรียง ดังตัวอย่าง 1-3 ที่ได้ยกมานี้ เป็นการวิเคราะห์สาร genistein โดยวิธี HPLC และนำผลที่ได้ไปคำนวณเป็นปริมาณของสารสำคัญชื่อ genistein-7-*O*-[α-rhamnopyranosyl-(1$\rightarrow$6)-β-glucopyranoside] โดยใช้การเปรียบเทียบน้ำหนักสมมูลย์ของสารทั้งสอง จากตัวอย่างจะพบว่า มีปริมาณสารสำคัญอยู่ร้อยละ 0.92 ในสารสกัดแห้ง ดังนั้นสารสกัดแห้งเถาวัลย์เปรียงดังตัวอย่างถือเป็นสารสกัดแห้งที่มีคุณภาพตามข้อกำหนดมาตรฐาน Thai Herbal Pharmacopoeia 2018 (สารสำคัญมีไม่น้อยกว่า 0.5% w/w)

นอกจากการควบคุมคุณภาพสารสกัดด้วยข้อกำหนดมาตรฐานด้านปริมาณของสารสำคัญ genistein-7-*O*-[α-rhamnopyranosyl-(1$\rightarrow$6)-β-glucopyranoside] ที่ควรมีไม่น้อยกว่าปริมาณที่กำหนด Thai Herbal Pharmacopoeia ยังได้กำหนดมาตรฐานด้านกายภาพอื่นๆของสารสกัด เช่น ความชื้นของสารสกัด ต้องมีไม่มากกว่า 6 % w/w จากการหาค่าน้ำหนักของน้ำในสารสกัดโดยวิธี loss on drying ด้วยการชั่งน้ำหนักสารสกัด 1 กรัมและวิเคราะห์เปรียบเทียบผลต่างของน้ำหนักสารสกัดก่อนและหลังให้ความร้อนสูง 105 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ด้วยคำนึงถึงคุณภาพของสารสกัดหากมีความชื้นหรือปริมาณน้ำมากกว่าค่าที่กำหนด อาจทำให้มีการเจริญของเชื้อจุลชีพในสารสกัดได้ รวมถึงน้ำอาจไปทำให้สารสำคัญเกิดการเสื่อมสลาย (degradation) ด้วยปฏิกิริยา hydrolysis ด้วย

การวิเคราะห์คุณภาพยาแคปซูลเถาวัลย์เปรียง

ยาแคปซูลเถาวัลย์เปรียงในไทยที่ขึ้นทะเบียนเป็นยาแผนโบราณ เลขที่ทะเบียนยาขึ้นต้นด้วยอักษร G ปัจจุบันพบทั้งรูปแบบของยาเดี่ยว และยาผสม (เถาวัลย์เปรียงบดผสมกับพืชสมุนไพรชนิดอื่นๆที่มีสรรพคุณรักษาโรคในกลุ่มอาการกล้ามเนื้อและกระดูก) ในส่วนของข้อกำหนดมาตรฐานตามตำรา Thai Herbal Pharmacopoeia ได้กำหนดมาตรฐานเฉพาะยาแคปซูลเถาวัลย์เปรียงที่เป็นยาเดี่ยว โดย ระบุอ้างถึงสรรพคุณของยาแคปซูลนี้ตามบัญชียาหลักแห่งชาติและหลักฐานงานวิจัยทางคลินิกในเชิงประจักษ์ของเถาวัลย์เปรียง ซึ่งใช้เป็นยาแก้ปวดและรักษาอาการอักเสบ (analgesic, anti-inflammatory) ของอาการปวดหลังส่วนล่าง (lower back pain) และโรคข้อเข่าเสื่อม (knee osteoarthritis) และยังได้กำหนดขนาดมาตรฐานของสารสกัดแห้งเถาวัลย์เปรียง ที่บรรจุในแคปซูลเพื่อรักษากลุ่มอาการดังกล่าว ต้องมีปริมาณ 400 mg ด้วย นอกจากข้อมูลด้านสรรพคุณและขนาดยาแล้วในตำรา Thai Herbal Pharmacopoeia ยังได้กล่าวถึงข้อห้ามใช้ของยาแคปซูลนี้ในคนท้อง และข้อควรระวังเมื่อใช้ยาแคปซูลเถาวัลย์เปรียงกับผู้ป่วยโรคแผลในกระเพาะอาหาร ซึ่งคำเตือนที่ได้ระบุ มาจากผลการศึกษาทางคลินิก โดยพบว่าผลข้างเคียงของยาแคปซูลเถาวัลย์เปรียงที่สำคัญ คือการก่อให้เกิดความระคายเคืองต่อเยื่อบุทางเดินอาหาร ซึ่งผลข้างเคียงดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกับยากลุ่ม NSAIDs ที่เป็นยาหลักในการรักษากลุ่มโรคดังกล่าว ดังนั้นจึงต้องระมัดระวังการใช้ยาแคปซูลเถาวัลย์เปรียงเพื่อรักษาอาการปวดและอักเสบในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม เป็นระยะเวลานาน [7-10]

Thai Herbal Pharmacopoeia ได้กำหนดให้มีการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีของยาแคปซูลเถาวัลย์เปรียง รวมถึงการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ โดยกำหนดให้วิเคราะห์ด้วยวิธีการเช่นเดียวกันกับ การควบคุมคุณภาพวัตถุดิบ และการวิเคราะห์คุณภาพของสารสกัดแห้ง กล่าวคือ มีการวิเคราะห์เพื่อพิสูจน์ทราบชนิดของสารสำคัญในยาแคปซูลด้วยวิธีการทดสอบเบื้องต้นทางพฤกษเคมี เช่นการตรวจสอบสารกลุ่ม flavonoids ด้วย Shinoda test และการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย chromatography

โดยตรวจสอบพีคสารสำคัญที่ปรากฏใน HPLC chromatogram ซึ่งต้องตรวจพบพีคของสาร genistein ในตัวอย่างแคปซูลที่วิเคราะห์ (พีคของสารสำคัญในตัวอย่างมีค่า retention time ตรงกันกับพีคของสาร genistein ที่ใช้เป็นสารมาตรฐานอ้างอิง) การพิสูจน์เอกลักษณ์ยาแคปซูลเถาวัลย์เปรียงดังที่ได้กล่าวมานี้ ทำเพื่อเป็นการยืนยันว่าในแคปซูลบรรจุสารสกัดเถาวัลย์เปรียงอย่างแท้จริง โดยใช้การตรวจองค์ประกอบทางเคมีที่ต้องพบในพืชชนิดนี้เป็นตัวบ่งชี้เอกลักษณ์ นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์ยาแคปซูลเถาวัลย์เปรียงยังถูกกำหนดข้อมูลมาตรฐานด้านปริมาณของสารสำคัญ ที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ในการรักษาของยาด้วย โดยได้กำหนดให้สาร genistein-7-*O*-[α-rhamnopyranosyl-(1$\rightarrow$6)-β-glucopyranoside] เป็น chemical marker ที่ต้องวิเคราะห์ในเชิงปริมาณ ในยาแคปซูลเถาวัลย์เปรียงเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ปริมาณสารดังกล่าวในผลิตภัณฑ์สารสกัดแห้ง ซึ่งวิธีการวิเคราะห์ปริมาณของสารดังกล่าวในผลิตภัณฑ์ยาแคปซูลนี้ ใช้วิธี HPLC ดังรายละเอียดตามที่ได้กล่าวไปแล้วในหัวข้อการวิเคราะห์คุณภาพสารสกัดแห้ง

นอกเหนือจากการควบคุมคุณภาพทางเคมีของผลิตภัณฑ์แคปซูลเถาวัลย์เปรียงแล้ว ความปลอดภัยในการบริโภคยาแคปซูลสมุนไพรเป็นปัจจัยหนึ่งที่ต้องมีการควบคุม ดังนั้นในส่วนของ monograph ของยาแคปซูลเถาวัลย์เปรียงที่ปรากฏในตำรายา ได้กำหนดหัวข้อขีดจำกัดของปริมาณเชื้อจุลชีพ (microbial limit) ที่อาจพบในผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพรสำเร็จรูปด้วย โดยยาแคปซูลเถาวัลย์เปรียงที่มีคุณภาพตามมาตรฐาน Thai Herbal Pharmacopoeia 2018 จะต้องผ่านการทดสอบ microbial limit ใน category 1A ซึ่งกำหนดให้ยาสมุนไพรในรูปแบบรับประทาน อาจมีปริมาณยีสต์และราปนเปื้อน ไม่มากกว่า 5×10^2 CFU (ต่อ g หรือต่อ mL) และปริมาณเชื้อแบคทีเรีย ชนิด aerobe ไม่มากกว่า 5×10^3 CFU (ต่อ g หรือต่อ mL) ทั้งนี้จะต้องไม่พบเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในคนได้แก่ *Escherichia coli* และ *Salmonella* spp. ในตัวอย่างยาแคปซูลเลย [5]

การวิเคราะห์คุณภาพวัตถุดิบเถาวัลย์เปรียงด้วยเทคนิค Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

การพิสูจน์เอกลักษณ์พืชสมุนไพรที่เป็นวัตถุดิบของยาสมุนไพร เป็นขั้นตอนสำคัญที่มีความจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อยืนยันพืชสมุนไพรชนิดนั้นๆคือสมุนไพรแท้จริงที่ใช้ตามตำรายา โดยขั้นตอนการพิสูจน์เอกลักษณ์เพื่อยืนยันชนิดของพืช (authentication) มีวิธีการหลายวิธี เช่นการตรวจพิสูจน์องค์ประกอบทางเคมีที่ต้องพบในพืช หรือสารสกัดจากพืช ชนิดนั้น ด้วย TLC และ HPLC ดังที่ได้อธิบายในหัวข้อต่างๆข้างต้น ซึ่งเป็นวิธีการมาตรฐานตามตำรายา นอกจากวิธีการมาตรฐานดังกล่าวแล้ว ปัจจุบันนักวิจัยและพัฒนาด้านสมุนไพร ยังได้คิดค้นวิธีการวิเคราะห์ใหม่ๆเพื่อพิสูจน์ยืนยันชนิดของพืชสมุนไพร ด้วยวิธีอื่นที่มีประสิทธิภาพ ใช้งานง่าย เหมาะกับการใช้ตรวจเอกลักษณ์ของพืชสมุนไพรตัวอย่างจำนวนมากๆด้วยความรวดเร็วและแม่นยำ อีกทั้งผลการวิเคราะห์ต้องมีความน่าเชื่อถือด้วย ซึ่งวิธีการใหม่ๆดังที่จะยกตัวอย่างคือ การพัฒนาการพิสูจน์เอกลักษณ์เถาวัลย์เปรียงและผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องด้วยการใช้วิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ELISA เป็นวิธีการวิเคราะห์ด้วยหลักการของ immunoassay ซึ่งเป็น complex immunoreaction ระหว่างสาร antigen และ antibody (สารจำพวกโปรตีน) นักวิจัยได้ประยุกต์วิธี ELISA เพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์เถาวัลย์เปรียง โดยกำหนดให้สาร genistein-7-*O*-[α-rhamnopyranosyl-(1$\rightarrow$6)-β-glucopyranoside] เป็นสารชี้วัดที่ต้องการวิเคราะห์เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืช โดยนักวิจัยได้สังเคราะห์สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันเรียกว่า immunogen (antigen) ที่เป็นสาร genistein-

7-*O*-[α-rhamnopyranosyl-(1$\rightarrow$6)-β-glucopyranoside] conjugate กับ bovine serum albumin (carrier protein) จากนั้นนำสาร immunogen ไปฉีดให้กับสัตว์ทดลองซึ่งใช้กระต่ายขาวเพศผู้พันธุ์ New Zealand เพื่อกระตุ้นให้สัตว์ทดลองสร้าง antibody ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อ immunogen ดังกล่าว เมื่อสัตว์ทดลองสร้างภูมิคุ้มกันที่มีต่อสาร immunogen แล้วจึงเก็บเลือดของสัตว์ทดลองเพื่อมาแยกเอาส่วนของ serum ที่มี antibody นำไปใช้พัฒนาเป็นชุดตรวจหรืออุปกรณ์ตรวจวัดที่มีความเฉพาะเจาะจงในการจับ (affinity) กับสารสำคัญที่เป็นสารชี้วัดในพืชสมุนไพร ซึ่งสาร antibody ที่ได้จากสัตว์ทดลองในการศึกษาวิจัยนี้ มีความสามารถในการจับจำเพาะต่อสาร genistein-7-*O*-[α-rhamnopyranosyl-(1$\rightarrow$6)-β-glucopyranoside] ที่มีในตัวอย่างพืชเถาวัลย์เปรียง และผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่มีส่วนผสมของเถาวัลย์เปรียงได้ ซึ่งสามารถใช้พิสูจน์เอกลักษณ์พืชสมุนไพรที่แท้จริง (authentication) และยังสามารถวิเคราะห์ในเชิงปริมาณได้ด้วย ในการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์สารชี้วัดในสมุนไพรเถาวัลย์เปรียงแบบ immunoassay นี้นักวิจัยได้ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับวิธี HPLC ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในตำรา Thai Herbal Pharmacopoeia ผลการศึกษาพบว่า วิธีการวิเคราะห์สารสำคัญดังกล่าวด้วยวิธี ELISA ให้ค่าความถูกต้อง มีความเที่ยงตรง มีความน่าเชื่อถือเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC และผลการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญที่ได้จากวิธี ELISA มีความสอดคล้องกับปริมาณของสารสำคัญที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างเดียวกันด้วยวิธี HPLC อีกด้วย ดังนั้นการวิเคราะห์สารชี้วัดในเถาวัลย์เปรียงด้วยวิธีการที่พัฒนาขึ้นใหม่นี้ สามารถใช้เป็นทางเลือกสำหรับการควบคุมคุณภาพวัตถุดิบเถาวัลย์เปรียง ตลอดจนผลิตภัณฑ์สมุนไพรเถาวัลย์เปรียงได้ [31,32]

บทสรุป

การขึ้นทะเบียนตำรับยาสมุนไพรในประเทศไทยที่เป็นยาแผนโบราณ เช่นยาสมุนไพรเถาวัลย์เปรียงทั้งชนิดยาเดี่ยวและเถาวัลย์เปรียงผสมกับสมุนไพรชนิดอื่นๆ ในรายละเอียดของคำขอขึ้นทะเบียนที่ยื่นต่อสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ได้กำหนดข้อมูลเชิงคุณภาพของผลิตภัณฑ์สมุนไพร ที่ต้องมีการวิเคราะห์คุณภาพ เช่นการตรวจสอบการปนเปื้อนของโลหะหนักและเชื้อจุลชีพก่อโรคที่อาจปนเปื้อนในวัตถุดิบสมุนไพรรวมถึงผลิตภัณฑ์สมุนไพร ไม่ให้มีปริมาณเกินกว่าค่าที่กำหนด [33] แต่ปัจจุบันกฎหมาย ยังไม่ได้กำหนดให้ต้องมีการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารสำคัญที่เป็นสารออกฤทธิ์ในสมุนไพร ซึ่งจะเป็นตัวชี้วัดคุณภาพของยาสมุนไพรในทางเคมีเหมือนกับตำรับยาแผนปัจจุบัน ดังนั้นการกำหนดมาตรฐานสมุนไพรเถาวัลย์เปรียง รวมถึงสมุนไพรอื่นๆ ใน Thai Herbal Pharmacopoeia ที่ให้รายละเอียดของชนิดและปริมาณของสารสำคัญที่พบในยาสมุนไพรรวมถึงวิธีการวิเคราะห์ทางเคมี จึงจัดทำขึ้นเพื่อกำหนดเป็นมาตรฐานของสมุนไพรที่ใช้เป็นยาเพื่อต้องการยกระดับยาสมุนไพรของประเทศไทยให้มีมาตรฐานและคุณภาพทัดเทียมกับยาแผนปัจจุบันที่ปรากฏในตำรายาต่างประเทศ ดังตัวอย่าง การกำหนดให้ genistein-7-*O*-[α-rhamnopyranosyl-(1$\rightarrow$6)-β-glucopyranoside] ซึ่งเป็นสารที่มีการรายงานจากงานวิจัยทางพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านการอักเสบของสมุนไพรเถาวัลย์เปรียง เป็นสาร chemical marker ที่มีการวิเคราะห์เพื่อใช้กำหนดคุณภาพสมุนไพรเถาวัลย์เปรียงที่จะพัฒนาเป็น สารสกัดสมุนไพร และผลิตภัณฑ์ยาแคปซูล

เอกสารอ้างอิง

1. ฐานข้อมูลเครื่องยาสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. เถาวัลย์เปรียง [ออนไลน์]. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 2553 [เข้าถึงเมื่อ 18 มิ.ย. 2563]. แหล่งที่มา: http://www.thaicrudedrug.com/main.php?action=viewpage&pid=63
2. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. เถาวัลย์เปรียง [ออนไลน์]. อุทยานธรรมชาติวิทยาสวนสิรีรุกขชาติ โดยมหาวิทยาลัยมหิดล. 2553 [เข้าถึงเมื่อ 19 มิ.ย. 2563]. แหล่งที่มา: https://pharmacy.mahidol.ac.th/siri/index.php?page=search_detail&medicinal_id=57
3. คณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ. บัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ.2561 [ออนไลน์]. ราชกิจจานุเบกษา. 2561 [เข้าถึงเมื่อ 19 มิ.ย. 2563]. แหล่งที่มา: http://www.fda.moph.go.th/sites/drug/Shared%20Documents/New/nlem2561.PDF
4. ประไพ วงศ์สินคงมั่น, เย็นจิตร เตชะดำรงสิน, ปราณี ชวลิตธำรง, ธิดารัตน์ บุญรอด, จารีย์ บันสิทธิ์. ข้อกำหนดทางเคมีและกายภาพของเถาวัลย์เปรียง. วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก. 2547; 3: 18-34.
5. Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. Thai Herbal Pharmacopoeia 2018, 1st ed.; Keawjawjom Printing & Publishing Suan Sunandha Rajabhat University: Bangkok, 2018; pp 522-32.
6. Deachathai S. Chemical constituents and biological activities of *Derris scandens* Benth. KKU Sci J. 2016; 44(3): 435-57.
7. ศิษฏิคม เบ็ญจขันธ์, ศิวาภรณ์ พุทธิวงศ์, นุชจรินทร์ บุญทัน, มัณฑนา วิจิตร, สุนทร วาปี, สุดธิมา การสมบัติ. การศึกษาประสิทธิผลและผลข้างเคียงของการใช้ยาแคปซูลเถาวัลย์เปรียงกับ Ibuprofen ในผู้ป่วยที่มีอาการข้อเข่าอักเสบ. วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก. 2555; 10(2): 115-23.
8. วิระพล ภิมาลย์, วนิดา ไทรชมภู, บรรลือ สังข์ทอง, กฤษณี สระมุณี. การทบทวนวรรณกรรมอย่างเป็นระบบและการวิเคราะห์อภิมานประสิทธิภาพในการลดอาการปวดของเถาวัลย์เปรียง. วารสารเภสัชกรรมไทย. 2558; 7(1): 82-91.
9. Kuptniratsaikul V, Pinthong T, Bunjob M, Thanakhumtorn S, Chinswangwatanakul P, Thamlikitkul V. Efficacy and safety of *Derris scandens* Benth extracts in patients with knee osteoarthritis. J Altern Complement Med. 2011; 17(2): 147-53.
10. Puttarak P, Sawangjit R, Chaiyakunapruk N. Efficacy and safety of *Derris scandens* (Roxb.) Benth. for musculoskeletal pain treatment: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. J Ethnopharmacol. 2016; 194: 316-23.
11. Hussain H, Harrasi AA, Krohn K, Kouam SF, Abbas G, Shah A, et al. Phytochemical investigation and antimicrobial activity of *Derris scandens*. J King Saud Univ Sci. 2015; 27(4): 375-8.

12. Mohotti S, Rajendran S, Muhammad T, Strömstedt AA, Adhikari A, Burman R, et al. Screening for bioactive secondary metabolites in Sri Lankan medicinal plants by microfractionation and targeted isolation of antimicrobial flavonoids from *Derris scandens*. J Ethnopharmacol. 2020; 246: 112158.
13. Saetung A, Itharat A, Dechsukum C, Wattanapiromsakul C, Keawpradub N, Ratanasuwan P. Cytotoxic activity of Thai medicinal plants for cancer treatment. Songklanakarin J Sci Technol. 2005; 27(2): 469-78.
14. Laupattarakasem P, Sripa B, Laupattarakasem W. Antimigration of cancer cells by *Derris scandens* on cholangiocarcinoma cells. Srinagarind Med J. 2007; 22(4): 339-45.
15. Tedasen A, Sukrong S, Sritularak B, Srisawat T, Graidist P. 5, 7, 4′-Trihydroxy-6, 8-diprenylisoflavone and lupalbigenin, active components of *Derris scandens*, induce cell death on breast cancer cell lines. Biomed Pharmacother. 2016; 81: 235-41.
16. Sangmalee S, Laorpaksa A, Sritularak B, Sukrong S. Bioassay-guided isolation of two flavonoids from *Derris scandens* with topoisomerase II poison activity. Biol Pharm Bull. 2016: b15-00767.
17. Kuljittichanok D, Diskul-Na-Ayudthaya P, Weeraphan C, Chokchaichamnankit D, Chiablaem K, Lirdprapamongkol K, et al. Effect of *Derris scandens* extract on a human hepatocellular carcinoma cell line. Oncol Lett. 2018; 16(2): 1943-52.
18. Somwong P, Kesornkupt C, Krainara D, Pannon P. Determination of lupeol, a cytotoxic compound against human cancer cell lines in the extracts of *Derris scandens*. In P. Paoprasert (eds.), Proceedings of the Pure and Applied Chemistry International Conference 2020 (PACCON2020), pp. CB13-18. Nonthaburi, Thailand, February 13-14, 2020.
19. Chaturvedi PK, Bhui K, Shukla Y. Lupeol: connotations for chemoprevention. Cancer Lett. 2008; 263(1): 1-13.
20. Saleem M. Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. Cancer Lett. 2009; 285(2): 109-15.
21. Siddique HR, Saleem M. Beneficial health effects of lupeol triterpene: a review of preclinical studies. Life Sci. 2011; 88(7-8): 285-93.
22. Tsai FS, Lin LW, Wu CR. Lupeol and its role in chronic diseases. In: Drug Discovery from Mother Nature. Adv Exp Med Biol. 2016; 929: 145-75.
23. Wang Y, Hong D, Qian Y, Tu X, Wang K, Yang X, et al. lupeol inhibits growth and migration in two human colorectal cancer cell lines by suppression of Wnt–β-catenin pathway. Onco Targets Ther. 2018; 11: 7987-99.

24. Laupattarakasem P, Houghton PJ, Hoult JR. Anti-inflammatory isoflavonoids from the stems of *Derris scandens*. Planta Med. 2004; 70(06): 496-501.
25. Gul R, Jan SU, Faridullah S, Sherani S, Jahan N. Preliminary phytochemical screening, quantitative analysis of alkaloids, and antioxidant activity of crude plant extracts from *Ephedra intermedia* indigenous to Balochistan. Sci World J. 2017; 2017: article ID 5873648.
26. Denis JD, Gordon IV JS, Carroll VM, Priefer R. Novel synthesis of the isoflavone genistein. Synthesis. 2010; 10: 1590-2.
27. Gray DE, Upton R, Chandra A, Porter A, Harris RK. Quantitative analysis of flavonol glycosides in *Ginkgo biloba*: a comparison of two analytical methods. Phytochem Anal. 2006; 17(1): 56-62.
28. Xie P, Chen S, Liang YZ, Wang X, Tian R, Upton R. Chromatographic fingerprint analysis—a rational approach for quality assessment of traditional Chinese herbal medicine. J Chromatogr A. 2006; 1112(1-2): 171-80.
29. Yang DZ, Yin XX, Ong CN, Tang DQ. Multidimensional information-based HPLC technologies to evaluate traditional Chinese medicine. J Chromatogr Sci. 2013; 51(7): 716-25.
30. Brusotti G, Cesari I, Dentamaro A, Caccialanza, Massolini G. Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: the role of analysis in the ethnopharmacological approach. J Pharm Biomed Anal. 2014; 87: 218-28.
31. Jutathis K, Kitisripanya T, Udomsin O, Inyai C, Sritularak B, Tanaka H, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay for genistein 7-O-[α-rhamnopyranosyl-(1$\longrightarrow$ 6)]-β-glucopyranoside determination in *Derris scandens* using a polyclonal antibody. Phytochem Anal. 2016; 27(6): 336-42.
32. Jutathis K, Pongkitwitoon B, Sritularak B, Tanaka H, Putalun W. Development of monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for quantitative quality control of *Derris scandens* (Roxb.) Benth. J Immunoassay Immunochem. 2019; 40(4): 407-18.
33. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข. คู่มือ/หลักเกณฑ์การขึ้นทะเบียนตำรับยาแผนโบราณ, พิมพ์ครั้งที่ 1; สำนักงานกิจการโรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก ในพระบรมราชูปถัมภ์: กรุงเทพฯ, 2556.