บทที่ 3
วิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบสมุนไพร และผลิตภัณฑ์สมุนไพร

วัตถุดิบสมุนไพรจีนได้รับจากมังคละโอสถ คลินิกการแพทย์แผนไทย-จีน ได้แก่

3.1.1 Cortex Eucommiae (Duzhong)

3.1.2 Herba Taxilli (Sangjisheng)

3.1.3 Poria (Fuling)

3.1.4 Radix Achyranthis Bidentatae (Niuxi)

3.1.5 Radix Angelicae Pubescentis (Duhuo)

3.1.6 Radix Angelicae Sinensis (Danggui)

3.1.7 Radix Codonopsis (Dangshen)

3.1.8 Radix et Rhizoma Asari (Xixin)

3.1.9 Radix et Rhizoma Glycyrrhizae (Gancao)

3.1.10 Radix Gentianae Macrophyllae (Qinjiao)

3.1.11 Radix Paeoniae Alba (Baishao)

3.1.12 Radix Rehmanniae Praeparata (Shudihuang)

3.1.13 Radix Saposhnikoviae (Fangfeng)

3.1.14 Ramulus Cinnamomi (Guizhi)

3.1.15 Rhizoma Chuanxiong (Chuanxiong)

3.1.16 ยาลูกกลอนตำรับตู๋หัวจี้เซิงได้รับจากมังคละโอสถ คลินิกการแพทย์แผนไทย-จีน

3.2 วัสดุ สารเคมี อุปกรณ์ และเครื่องมือ

3.2.1 สารเคมี

1.	3,5-Dinitrobenzoic acid	Merck, Germany
2.	5-(hydroxyl methyl) Furfural CRS	Tauto biotech, China
3.	95% Ethanol	องค์การสุรา กรมสรรพสามิต ประเทศไทย
4.	Absolute ethanol	RCI Labscan,Thailand
5.	Acetone	RCI Labscan,Thailand
6.	Acetonitrile HPLC grade	RCI Labscan,Thailand

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

7.	Ammonium glycyrrhizinate CRS	Tauto biotech, China
8.	Chloroform	RCI Labscan,Thailand
9.	Corn starch	CM Chemical & Lab supply, Thailand
10.	Diethyl ether	RCI Labscan,Thailand
11.	Ethyl acetate	RCI Labscan,Thailand
12.	Ethyl formate	RCI Labscan,Thailand
13.	Ferulic acid CRS	Union science, Thailand
14.	Formic acid	Merck, Germany
15.	Gelatin	BDH Laboratory, England
16.	Glacial acetic acid	Merck, Germany
17.	Hydrochloric acid	Merck, Germany
18.	Lactose	DMV-Fonterra Excipients, Germany
19.	Lead acetate	BDH Laboratory, England
20.	Magnesium stearate	Riedel-de Haen, Germany
21.	Methanol HPLC grade	RCI Labscan,Thailand
22.	*n*-Butanol	RCI Labscan,Thailand
23.	*n*-Hexane	RCI Labscan,Thailand
24.	*n*-Propanol	RCI Labscan,Thailand
25.	Oleanolic acid CRS	Union science, Thailand
26.	Osthole CRS	Tauto biotech, China
27.	Paeoniflorin CRS	Tauto biotech, China
28.	Petroleum ether	RCI Labscan,Thailand
29.	Polyvinylpyrrolidone K30 (PVP K30)	Union science, Thailand
30.	Polyvinylpyrrolidone K90 (PVP K90)	Union science, Thailand
31.	Potassium hydroxide	Merck, Germany
32.	Prim-*O*-glucosylcimifugin CRS	Union science, Thailand
33.	Quercitin CRS	Union science, Thailand
34.	Sodium bicarbonate	Merck, Germany
35.	Sodium sulfate	Merck, Germany
36.	Sodium hydroxide	Merck, Germany

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

37. Strong ammonium TS — Merck, Germany
38. Sulfuric acid — Merck, Germany
39. Talcum — Ilshin industrial, China
40. Toluene — RCI Labscan,Thailand
41. Vanillin — Merck, Germany

3.2.2 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ

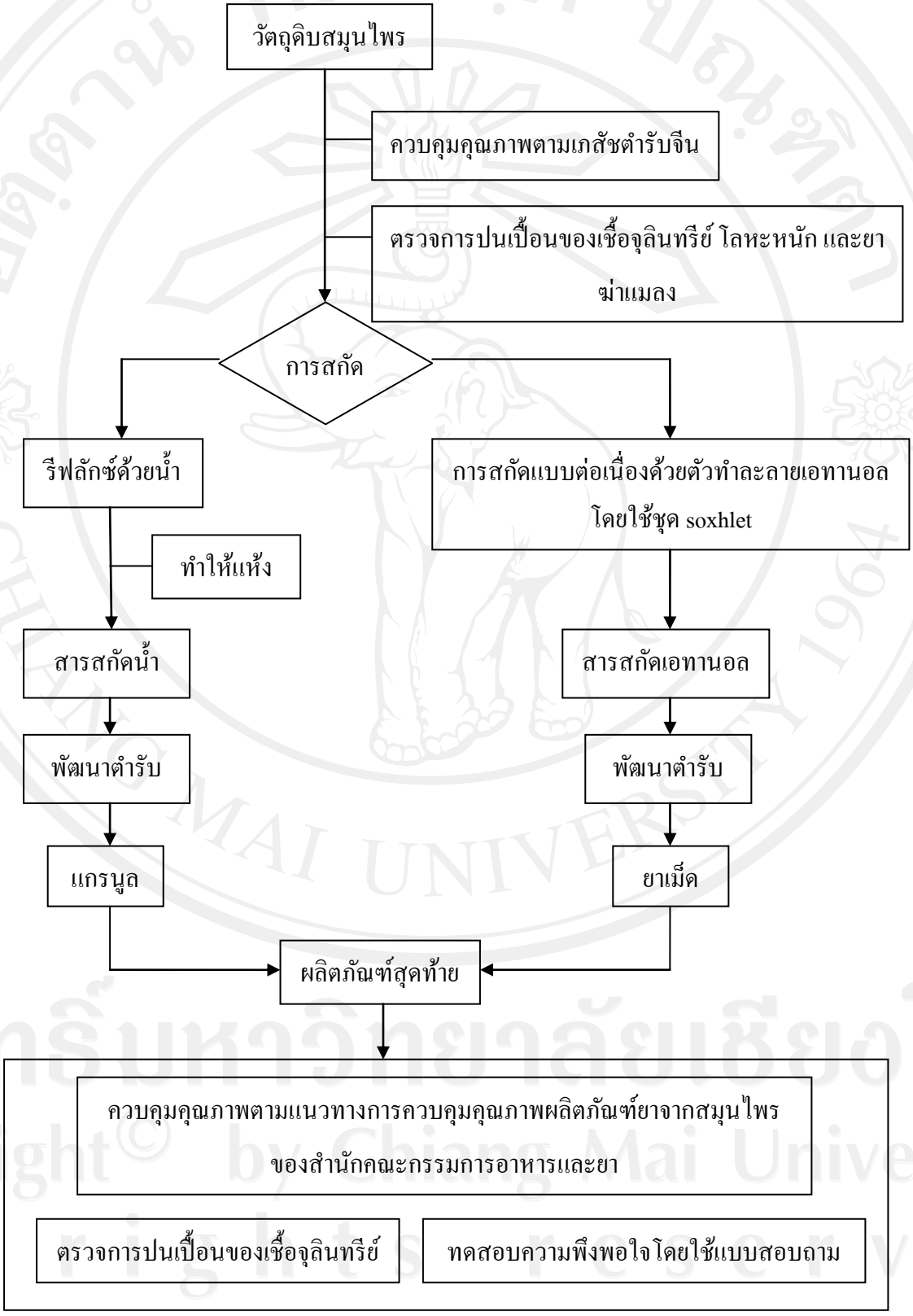
1. เครื่องวัดความแข็งของเม็ดยา (Erweka TBH 100)
2. เครื่องวัดขนาดอนุภาคโดยการแร่ง (Retsch AS200 basic)
3. เตาเผา (Carbolite CWF1100)
4. Analytical balance (OHAUS ARC 120, SARTORIUS ME 2155)
5. Beaker (Schott duran, Pyrex)
6. Cylinder (Pyrex, Witeg)
7. Disintegration tester (Pharmatest PTZ Auto 3)
8. Erlenmeyer flask
9. Evaporating dish
10. Filter paper (Whatman No. 1, 41)
11. Freeze dryer (Virtis Advantage)
12. Friability test apparatus (Pharmatest PTF 20E)
13. Funnel
14. Heating mantle (ELECTROMANTLE EM 0500/C MR1, ISOPAD U2/102)
15. High Performance Liquid Chromatography (Shimadzu)
    - Degasser Model DGU-20A5
    - Pump Model LC-20AD
    - Autosampler Model SIL-20AC
    - Column oven Model CTO-20A
    - Diode array detector Model SPD-M20A
    - Communication Bus Module Model CBM-20A
16. Hot air oven (BINDER ED240/E2)
17. Hydrolic Tablet Machine (Carver Laboratory press Model C)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

18.	Jolting volumeter	(Stampfvolumeter STAV 2003)
19.	Magnetic stirrer	(Fargo HMS-102)
20.	Micropipet	(GILSON MODEL PIPETMAN P20, P200, P1000)
21.	Microscope	(OLYMPUS CHS No. 1D0199)
22.	Moisture analysis	(Sartorius MA50, A&D MX-50)
23.	pH meter	(Inolab pH Level 2)
24.	Rotary evaporator	(Eyela N-1000)
25.	Single Punch Tablet Machine	(CMT 12)
26.	Slide and cover slit	
27.	Sonicator	(Elma S30H Elmasonic)
28.	Soxhlet apparatus	(PYREX)
29.	Spray dryer	(Lab-PLANT SD-04)
30.	Stabilizer	(Espec Humidity cabinet LHL-112, LHU-112)
31.	Thin layer chromatography plate 20x20 เซนติเมตร	(silica gel GF_{254}) ชนิดแผ่นอะลูมิเนียม ขนาด (Merck, Germany)
32.	Thin layer chromatography tank	
33.	UV viewer	(CAMAG)
34.	Vertex mixer	(Vortex Genie-2)
35.	Water bath	

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 แผนการทดลอง



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การประเมินคุณภาพสมุนไพรจีน

สมุนไพรทั้ง 15 ชนิด นำมาประเมินคุณภาพวัตถุดิบอ้างอิงตามมาตรฐานที่ระบุในเภสัชตำรับจีนปี 2005 โดยมีรายละเอียด ดังนี้

3.4.1.1 การตรวจเอกลักษณ์ (Identification)

ก. การตรวจเอกลักษณ์ทางเภสัชเวท (Pharmacognostic identification) ได้แก่

- การตรวจเอกลักษณ์ทางมหภาค (Macroscopical identification) ทำการตรวจสอบลักษณะที่ปรากฏ, รูปร่าง, ขนาด, ลักษณะการหัก, รอยตำหนิ, สี, กลิ่น และรส
- การตรวจเอกลักษณ์ทางจุลภาค (Microscopical identification) สมุนไพรที่นำมาตรวจสอบ มีดังนี้ Duhuo, Sangjisheng, Duzhong, Fuling, Danggui, Chuanxiong, Gancao, Baishao และ Fangfeng

วิธีทำ เตรียมผงพืชสมุนไพรเพื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยนำสมุนไพรมาหั่นหรือสับเป็นชิ้นเล็ก อบให้แห้งที่อุณหภูมิประมาณ 40-60 องศาเซลเซียส บดให้ละเอียดผ่านแร่งเบอร์ 60 นำไปเตรียมสไลด์แล้วส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ข. การตรวจเอกลักษณ์ทางเคมี (Chemical identification) ได้แก่

- การตรวจสอบโดยใช้ปฏิกิริยาทางเคมี มีรายละเอียด ดังนี้

- Sangjisheng : ตรวจหา Cardiac glycoside

ชั่งผงบดหยาบ 10 กรัม เติม 80 % เอทานอล 50 มล. นำไปรีฟลักซ์ 30 นาที กรองเก็บสารละลาย แล้วนำมาทำให้แห้งบน water bath นำส่วนที่เหลือเติมน้ำร้อน 10 มล. กรองเก็บสารละลายที่ได้ นำมาทำการแยกสกัดด้วยตัวทำละลายโดยใช้ diethyl ether 15 มล. 4 ครั้ง ทิ้งชั้น diethyl ether เก็บชั้นน้ำ นำมาเติมสารละลาย lead acetate ที่อิ่มตัวจนตกตะกอนสมบูรณ์ กรองเก็บสารละลายนำมาเติมเอทานอล 10 มล. แล้วเติมสารละลาย sodium sulfate ที่อิ่มตัวเพื่อขจัด lead ion กรองเก็บสารละลาย นำมาทำการแยกสกัดด้วยตัวทำละลายโดยใช้คลอโรฟอร์ม 15 มล. 3 ครั้ง นำชั้นคลอโรฟอร์มมาทำให้เข้มข้นโดยใช้ rotary evaporator จนเหลือ 1 มล.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หยดสารละลายเข้มข้นที่ได้บนกระดาษกรอง รอจนแห้งแล้วหยดสารละลาย alkaline 3,5-dinitrobenzoic acid ลงบนกระดาษกรอง ต้องไม่ปรากฏสีม่วงแดง

- Duzhong :

แช่ผงยา 1 กรัมในคลอโรฟอร์ม 10 มล. นาน 2 ชั่วโมง นำไปกรอง แล้วนำสารละลายไประเหยให้แห้งด้วย rotary evaporator จากนั้นเติมเอทานอล 1 มล. ผลบวกที่ได้จะเกิด elastic film ขึ้น

- Fuling ทดสอบ 2 วิธี ดังนี้
  - วิธีที่ 1 : ชั่งผงยา 1 กรัม นำไปรีฟลักซ์ด้วย acetone 10 มล. แล้วกรองนำสารละลายไประเหยให้แห้งด้วย rotary evaporator จากนั้นนำส่วนที่เหลือมาเติม glacial acetic acid 1 มล. แล้วเติม sulfuric acid 1 หยด ผลบวกจะเกิดสีแดงอ่อนแล้วจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อน
  - วิธีที่ 2 : นำผงยาเล็กน้อย เติม iodine potassium iodide TS 1 หยด ผลบวกจะเกิดสีแดงเข้ม
- Qinjiao ทดสอบ 2 วิธี ดังนี้
  - วิธีที่ 1 : ชั่งผงหยาบ 2 กรัม เติมตัวทำละลายผสมของ Chloroform: Methanol: Strong ammonium TS (75: 25: 5) 30 มล. หมักทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง กรองเก็บสารละลาย แล้วทำให้เข้มข้นบน water bath ให้เหลือประมาณ 1 มล. จากนั้นนำมาเติมสารละลาย hydrochloric acid (1 โมลาร์/ลิตร) 2 มล. ระเหยเอาคลอโรฟอร์มออกด้วย rotary evaporator รอให้เย็นแล้วกรองเก็บสารละลายแยกใส่หลอดทดลอง หลอดแรกให้เติม mercuric potassium iodide TS จะปรากฏตะกอนสีขาวเหลืองอ่อน สำหรับหลอดที่ 2 ให้เติม potassium iodobismuthate TS จะปรากฏตะกอนสีน้ำตาลแดง
  - วิธีที่ 2 : นำชิ้นส่วนของสมุนไพรมาส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร จะปรากฏการวาวแสงสีขาวเหลืองหรือเหลืองทอง
- Chuanxiong :

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชั่งผง 1 กรัม เติม petroleum ether (30-60 องศาเซลเซียส) 5 มล. แช่ 10 ชั่วโมง กรองเก็บ สารละลายนำมาทำให้แห้งด้วย rotary evaporator เติม methanol 1 มล. จากนั้นหยดสารละลาย 2 % 3,5-dinitrobenzoic acid ใน methanol 2-3 หยด ตามด้วยสารละลายอิ่มตัวของ potassium hydroxide ใน methanol 2 หยด จะปรากฏสีม่วงแดง

- การใช้วิธีทางโครมาโตกราฟีผิวบาง มีรายละเอียดดังนี้
  - Duhuo :

    ชั่งผงยา 2 กรัม เติม diethyl ether 10 มล. แล้วหมักทิ้งไว้ 1 คืน นำมากรองแล้วนำสารละลายมาระเหยให้แห้งด้วย rotary evaporator จากนั้นนำส่วนที่เหลือมาเติมคลอโรฟอร์ม 2 มล. แล้วนำไป spot บนแผ่น TLC โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น silica gel 60 GF_{254}, วัฏภาคเคลื่อนที่ ได้แก่ *n*-hexane: toluene: ethyl acetate (2:1:1), petroleum ether: toluene: ethyl acetate (2:1:1) และ *n*-hexane: toluene: chloroform (2:1:1) แล้วนำแผ่น TLC ที่ได้ไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร

  - Sangjisheng :

    ชั่งผงยา 5 กรัม เติม methanol: water (1:1) 60 มล. นำไปรีฟลักซ์ 1 ชั่วโมง จากนั้นกรองขณะร้อนแล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วย rotary evaporator ให้เหลือประมาณ 20 มล. แล้วนำมาเติมน้ำ 10 มล. ตามด้วยกรดซัลฟูริคเจือจาง 0.5 มล. นำไปรีฟลักซ์ 1 ชั่วโมง แล้วทำการแยกสกัดด้วยตัวทำละลายโดยใช้ ethyl acetate 30 มล. 2 ครั้ง รวมชั้น ethyl acetate แล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วย rotary evaporator ให้เหลือประมาณ 1 มล. จากนั้นจึงนำไป spot บนแผ่น TLC โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น silica gel 60 GF_{254} mixed with 0.5 % sodium hydroxide solution และวัฏภาคเคลื่อนที่เป็น toluene ที่อิ่มตัวด้วยน้ำ: ethyl acetate: formic acid (5:4:1) แล้วนำแผ่น TLC ที่ได้ไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร (ใช้ quercitin CRS ใน ethyl acetate 0.5 มก./มล. เป็นสารละลายมาตรฐาน)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- Dangshen :

ชั่งผงยา 1 กรัม เติม methanol 25 มล. นำไปสกัดด้วย sonicator 30 นาที แล้วกรอง นำสารละลายไประเหยตัวทำละลายจนแห้งด้วย rotary evaporator นำส่วนที่เหลือเติมน้ำ 2 มล. แล้วนำไป spot บนแผ่น TLC โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น silica gel 60 GF_{254} และวัฏภาคเคลื่อนที่เป็น *n*-butanol: glacial acetic acid: water (7:1:0.5) ตรวจสอบด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร และใช้น้ำยาฉีดพ่น 10 % sulfuric acid ในเอทานอล

- Fuling :

ชั่งผงยา 3 กรัม เติม 95% เอทานอล 50 มล. นำไปรีฟลักซ์ 1 ชั่วโมง แล้วกรองนำสารละลายไประเหยตัวทำละลายออกด้วย rotary evaporator ให้เหลือประมาณ 1 มล. แล้วนำไป spot บนแผ่น TLC โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น silica gel GF_{254} และวัฏภาคเคลื่อนที่ ได้แก่ *n*-hexane: ethyl acetate (4:1), *n*-hexane: ethyl acetate: methanol (4:0.5:0.5), *n*-hexane: chloroform: methanol (4:0.5:0.5) ตรวจสอบด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร และใช้น้ำยาฉีดพ่น 10 % sulfuric acid ในเอทานอล

- Duzhong :

ชั่งผงยา 3 กรัม เติม 95% เอทานอล 50 มล. นำไปรีฟลักซ์ 1 ชั่วโมง แล้วกรอง นำสารละลาย ไประเหยตัวทำละลายด้วย rotary evaporator ให้เหลือประมาณ 1 มล. แล้วนำไป spot บนแผ่นTLC โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น silica gel และวัฏภาคเคลื่อนที่ ได้แก่ *n*-hexane: ethyl acetate (4:1), *n*-hexane: chloroform (4:1) ตรวจสอบด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร และใช้น้ำยาฉีดพ่น 10 % sulfuric acid ในเอทานอล

- Niuxi :

ชั่งผงยา 2 กรัม เติม 95% เอทานอล 20 มล. นำไปรีฟลักซ์ 40 นาที กรองเก็บสารละลายแล้วนำสารละลายมาเติม hydrochloric acid 1 มล. จากนั้นนำไปรีฟลักซ์อีก 1 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วย rotary evaporator

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ให้เหลือประมาณ 5 มล. แล้วนำมาเติมน้ำ 10 มล. จากนั้นจึงสกัดด้วย petroleum ether 20 มล. นำไปสารละลายในชั้น petroleum ether มาทำให้แห้งด้วย rotary evaporator แล้วละลายส่วนที่เหลือในเอทานอล 2 มล. นำไป spot บนแผ่น TLC โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น silica gel GF_{254} และวัฏภาคเคลื่อนที่เป็น choroform: methanol (40:1) ตรวจสอบด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร และใช้น้ำยาฉีดพ่น phosphomolybdic acid TS อบแผ่น TLC ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส (ใช้ oleanolic acid CRS ในเอทานอล 1 มก./มล. เป็นสารละลายมาตรฐาน)

- Danggui ทดสอบ 2 วิธี ดังนี้
  - วิธีที่ 1 : ชั่งผงยา 0.5 กรัม เติม diethyl ether 20 มล. สกัดโดยใช้ sonicator 10 นาที กรองเก็บสารละลายแล้วนำมาทำให้แห้งด้วย rotary evaporator แล้วนำส่วนที่เหลือมาละลายในเอทานอล 1 มล. นำไป spot บนแผ่น TLC โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น silica gel GF_{254} และวัฏภาคเคลื่อนที่เป็น *n*-hexane: ethyl acetate (4:1) ตรวจสอบด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร
  - วิธีที่ 2 : ชั่งผงยา 3 กรัม เติมสารละลาย 1% sodium bicarbonate 50 มล. สกัดโดยใช้ sonicator 10 นาที กรอง นำสารละลายมาปรับให้ได้ pH 2-3 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเจือจาง แล้วนำมาทำการแยกสกัดด้วยตัวทำละลายโดยใช้ diethyl ether 20 มล. 2 ครั้ง รวมชั้น diethyl ether มาทำให้แห้งด้วย rotary evaporator แล้วเติม methanol 1 มล. นำไป spot บนแผ่น TLC โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น silica gel GF_{254} และวัฏภาคเคลื่อนที่เป็น chloroform: ethyl acetate: formic acid (4:1:0.1) และ diethyl ether: ethyl acetate: formic acid (3:3:0.1) ตรวจสอบด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร (ใช้ ferulic acid CRS ในเมทานอล 1 มก./มล. เป็นสารละลายมาตรฐาน)
- Gancao :

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชั่งผงยา 1 กรัม เติม diethyl ether 40 มล. นำไปรีฟลักซ์ 1 ชั่วโมง กรองเก็บส่วนที่เหลือนำมาเติม methanol 30 มล. นำไปรีฟลักซ์อีก 1 ชั่วโมง กรองเก็บสารละลาย นำมาทำให้แห้งด้วย rotary evaporator จากนั้นเติมน้ำ 40 มล. สกัดด้วย *n*-butanol 20 มล. 3 ครั้ง รวมชั้น *n*-butanol แล้วนำมาล้างด้วยน้ำ 50-60 มล. 3 ครั้ง โดยใช้กรวยแยก นำชั้น *n*-butanol ที่ได้มาระเหยให้แห้งด้วย rotary evaporator นำส่วนที่เหลือมาเติม methanol 5 มล. นำไป spot บนแผ่น TLC โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น silica gel GF_{254} ที่ฉาบด้วย 1% sodium hydroxide และวัฏภาคเคลื่อนที่เป็น ethyl acetate: formic acid: glacial acetic acid: water (15:1:1:2) ตรวจสอบด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร และใช้น้ำยาฉีดพ่น 10 % sulfuric acid ในเอทานอล แล้วอบแผ่น TLC ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส (ใช้ ammonium glycyrrhizinate CRS ในเมทานอล 2 มก./มล. เป็นสารละลายมาตรฐาน)

- Baishao :

ชั่งผงยา 0.5 กรัม เติมเอทานอล 10 มล. เขย่า 5 นาที กรองเก็บสารละลาย ระเหยให้แห้งด้วย rotary evaporator นำส่วนที่เหลือมาเติมเอทานอล 1 มล. นำไป spot บนแผ่น TLC โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น silica gel GF_{254} และวัฏภาคเคลื่อนที่เป็น chloroform: ethyl acetate: methanol: formic acid (40:5:10:0.2) ตรวจสอบด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร และใช้น้ำยาฉีดพ่น 5 % vanillin ใน sulfuric acid แล้วอบแผ่น TLC ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส (ใช้ paeoniflorin CRS ในเอทานอล 1 มก./มล. เป็นสารละลายมาตรฐาน)

- Shudihuang :

ชั่งผงยา 1 กรัม เติมเอทานอล 10 มล. หมักไว้ 24 ชั่วโมง กรองเก็บสารละลาย นำไป spot บนแผ่น TLC โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น silica gel GF_{254} และวัฏภาคเคลื่อนที่เป็น petroleum ether (60-90 องศาเซลเซียส): ethyl acetate (1:1) ตรวจสอบด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(ใช้ 5-(hydroxyl methyl) furfural CRS ในเอทานอล 0.5 มก./มล. เป็นสารละลายมาตรฐาน)

- Fangfeng :

ชั่งผงยา 1 กรัม เติม acetone 20 มล. สกัดด้วย sonicator 20 นาที กรองเก็บสารละลายมาทำให้แห้งด้วย rotary evaporator นำส่วนที่เหลือมาเติมเอทานอล 1 มล. นำไป spot บนแผ่น TLC โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น silica gel GF_{254} และวัฏภาคเคลื่อนที่เป็น chloroform: methanol (4:1) ตรวจสอบด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร (ใช้ prim-*O*-glucosylcimifugin CRS ในเอทานอล 1 มก./มล. เป็นสารละลายมาตรฐาน)

- Chuanxiong :

ชั่งผงยา 1 กรัม เติม diethyl ether 20 มล. นำไปรีฟลักซ์ 1 ชั่วโมง กรองเก็บสารละลายมาทำให้แห้งด้วย rotary evaporator นำส่วนที่เหลือมาเติม ethyl acetate 2 มล. นำไป spot บนแผ่น TLC โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น silica gel GF_{254} และวัฏภาคเคลื่อนที่เป็น *n*-hexane: ethyl acetate (9:1) ตรวจสอบด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร

- Guizhi :

ชั่งผงยา 0.5 กรัม เติมเอทานอล 10 มล. แช่ไว้ 20 นาที เขย่าเป็นระยะ กรองเก็บสารละลายนำไป spot บนแผ่น TLC โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น silica gel GF_{254} และวัฏภาคเคลื่อนที่เป็น petroleum ether (60-90 องศาเซลเซียส): ethyl acetate (17:3) ตรวจสอบด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร และใช้น้ำยาฉีดพ่น 5 % vanillin ใน sulfuric acid

3.4.1.2 การตรวจหาปริมาณเถ้า (Determination of Ash)

ก. ปริมาณเถ้ารวม (Total ash)

ชั่งผงยาให้มีน้ำหนักแน่นอน 3-5 กรัม ลงในถ้วยกระเบื้อง แล้วนำไปเผาในเตาเผาด้วยอุณหภูมิ 500-600 องศาเซลเซียส จนได้เถ้าสีขาวปราศจากคาร์บอน ทิ้งไว้ให้เย็นนำไปชั่งน้ำหนัก แล้วคำนวณ % Total ash (ถ้าเถ้าเผาแล้วมีสีดำ ให้เติมน้ำ 2 มล. แล้วไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทำให้แห้งบน water bath แล้วนำไปเผาอีกครั้งจนได้น้ำหนักคงที่ แล้วจึงนำไปคำนวณ % Total ash)

ข. ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายกรด (Acid-insoluble ash)

เติมกรดไฮโดรคลอริกเจือจางปริมาตร 25 มล. ลงในถ้วยกระเบื้องที่มีเถ้ารวม ต้มนาน 10 นาที กรองด้วยกระดาษกรองชนิดที่ปราศจากเถ้า ล้างตะกอนด้วยน้ำร้อนจนน้ำล้างตะกอนเป็นกลาง นำเถ้าที่กรองได้พร้อมกระดาษกรองใส่ลงในถ้วยกระเบื้องถ้วยเดิม ทำให้แห้ง แล้วนำไปเผาที่อุณหภูมิ 500-600 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่ คำนวณ % Acid-insoluble ash

3.4.1.3 การตรวจหาปริมาณน้ำ (Determination of Water)

ก. วิธี Drying in oven (วิเคราะห์ Duhuo, Duzhong, Dangshen, Fuling, Sangjisheng, Gancao, Qinjiao, Baishao, Shudihuang, Fangfeng, Chuanxiong และ Niuxi)

ชั่งผงยาให้ได้น้ำหนักแน่นอน 2-5 กรัมลงในขวดชั่ง นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส 5 ชั่วโมง แล้วใส่ desiccators 30 นาที ชั่งน้ำหนัก อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ใส่ desiccators 30 นาที ทำจนได้น้ำหนักคงที่ (ต่างกัน <5 มก.) คำนวณ % loss on drying

ข. วิธี Toluene distillation (วิเคราะห์ Guizhi, Danggui และ Xixin)

ใส่โทลูอีน 200 มล.และน้ำ 2 มล. ลงในขวดก้นกลม กลั่น 2 ชั่วโมง ทำให้เย็น อ่านปริมาตรน้ำที่กลั่นได้ ชั่งผงยาที่คาดว่าจะมีน้ำประมาณ 2-3 มล. ใส่ในขวดก้นกลมข้างต้น แล้วเติม glass bead ต้มไฟอ่อน ประมาณ 15 นาที จนโทลูอีนเริ่มเดือด ให้มีอัตราการหยด 2 หยดต่อวินาที จนกระทั่งคาดว่าน้ำหมดแล้ว เพิ่มอัตราเป็น 4 หยดต่อวินาที ผ่านไปอีกระยะหนึ่ง ล้าง condenser ด้วยโทลูอีน ต้มต่อไปอีก 5 นาที ทำให้เย็น อ่านปริมาตรน้ำและคำนวณร้อยละของปริมาณน้ำที่ได้

3.4.1.4 การตรวจหาปริมาณสารสกัดด้วยตัวทำละลาย (Determination of Extractive)

ก. Ether-soluble extractives ของ Duhuo

ชั่งผงยาให้ได้น้ำหนักแน่นอน 4 กรัม นำไปไว้ใน desiccators แล้วใช้ vacuum pump ดูดเอาอากาศภายในออกอย่างน้อย 30 นาที เก็บไว้นาน 48 ชั่วโมง แล้วนำไปรี-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ฟลักซ์ด้วย diethyl ether 70 มล. นาน 4 ชั่วโมง จากนั้นกรอง แล้วล้างส่วนที่เหลือด้วย diethyl ether เล็กน้อย รวม diethyl ether เข้าด้วยกันนำไปปรับปริมาตรใน volumetric flask 100 มล. ด้วย diethyl ether จากนั้นตวงมาอย่างแน่นอน 50 มล. ใส่ในถ้วยระเหยที่รู้น้ำหนักแน่นอน ตั้งถ้วยระเหยทิ้งไว้จนแห้ง นำไปใส่ใน desiccators 24 ชั่วโมง แล้วชั่งจนได้น้ำหนักคงที่ คำนวณ % Ether-soluble extractives

ข. Ethanol-soluble extractives

Dangshen ใช้ 45 % เอทานอล

Fuling, Sangjisheng, Danggui, Xixin, Gancao, Baishao ใช้ 70% เอทานอล

Duzhong ใช้ 75 % เอทานอล

Qinjiao, Fangfeng, Chuanxiong, Guizhi ใช้ 95 % เอทานอล

Niuxi ใช้ *n*-butanol ที่อิ่มตัวด้วยน้ำ

ชั่งผงยาน้ำหนักแน่นอน 2-4 กรัม เติมตัวทำละลายแอลกอฮอล์ 50-100 มล. ปริมาตรแน่นอน ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง แล้วนำไปรีฟลักซ์ 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น กรอง นำสารละลายมา 25 มล. ใส่ในถ้วยระเหยที่ทราบน้ำหนักแน่นอน ทำให้แห้งบน water bath นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง ใส่ใน desiccators 30 นาที ชั่งจนได้น้ำหนักคงที่ คำนวณ % Ethanol soluble extractive

ค. Water extractives ของ Shudihuang

ชั่งผงยาน้ำหนักแน่นอน 4 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ที่มีฝาปิดขนาด 250-300 มล. เติมน้ำ 100 มล. ปิดฝานำไปใส่เครื่องเขย่านาน 6 ชั่วโมง และตั้งทิ้งไว้ 18 ชั่วโมง กรองนำสารละลายมา 20 มล. ใส่ในถ้วยระเหยที่ทราบน้ำหนักแน่นอน ทำให้แห้งบน water bath นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง ใส่ใน desiccators 30 นาที ชั่งจนได้น้ำหนักคงที่ คำนวณ % water soluble extractives

3.4.1.5 การหาปริมาณน้ำมันหอมระเหย (Determination of volatile oil)

ชั่งผงยาน้ำหนักแน่นอนโดยให้มีปริมาณน้ำมันหอมระเหยประมาณ 0.5-1 มล. ลงในขวดก้นกลมแล้วเติมน้ำประมาณ 300-500 มล. นำไปกลั่นหาปริมาณน้ำมันหอมระเหยโดยใช้ชุดกลั่นหาปริมาณน้ำมันหอมระเหยชนิดเบากว่าน้ำ หลังจากกลั่นไปแล้ว 5 ชั่วโมงจนไม่มี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

น้ำมันหอมระเหยหยด รอให้เย็น แล้วอ่านปริมาตรน้ำมันหอมระเหย และคำนวณร้อยละของปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่ได้ (มล./ก.)

3.4.1.6 การตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ โลหะหนัก และยาฆ่าแมลง

ส่งตรวจการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ โลหะหนัก และยาฆ่าแมลงที่ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 10 เชียงใหม่

3.4.2 การสกัดตำรับยา Du huo ji sheng

3.4.2.1 วิธีการต้มตามแบบดั้งเดิม

ชั่งผงสมุนไพร Duhuo 9 กรัม และสมุนไพรอื่นอีก 14 ชนิด ชนิดละ 6 กรัม ใส่ลงในหม้อดินเผาหรือหม้อสแตนเลสที่มีฝาปิด เติมน้ำให้ท่วมตัวยาเล็กน้อย ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30-60 นาที เพื่อให้น้ำซึมเข้าตัวยาก่อน แล้วต้มให้น้ำเดือดต่อไปอีก 1 ชั่วโมง เทเก็บส่วนที่เป็นน้ำต้มไว้ นำกากที่เหลือไปต้มอีกครั้ง นำน้ำต้มทั้งสองครั้งมารวมกัน แล้วกรองด้วยสำลี จากนั้นจึงนำมากรองด้วยกระดาษกรองโดยใช้ vacuum pump นำสารละลายที่กรองได้มาทำให้เข้มข้นด้วย rotary evaporator แล้วคำนวณ % yield ที่ได้

3.4.2.2 วิธีรีฟลักซ์

ก. ชั่งผงสมุนไพร Duhuo 45 กรัม และสมุนไพรอื่นอีก 14 ชนิด ชนิดละ 30 กรัม นำมาผสมรวมกันในถุงพลาสติกแล้วเขย่า 5 นาที เทสมุนไพรที่ผสมแล้วลงใน flask ก้นกลมขนาด 10 ลิตร เติมน้ำ 4.5 ลิตร ทิ้งไว้ 30 นาที แล้วให้ความร้อนด้วย heating mentle รอจนน้ำเดือดแล้ว ตั้งให้เดือดต่อไปอีก 2 ชั่วโมง จากนั้นรอให้เย็นแล้วเทส่วนที่เป็นน้ำออก นำกากกลับไปเติมน้ำ 4.5 ลิตร แล้วต้มต่ออีก 2 ชั่วโมง นำน้ำที่ต้มได้ทั้งสองครั้งมารวมกัน แล้วกรองด้วยสำลี จากนั้นจึงนำมากรองด้วยกระดาษกรองโดยใช้ vacuum pump นำสารละลายที่กรองได้ไปทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นโดยใช้อุณหภูมิ inlet 200 องศาเซลเซียส, อุณหภูมิ outlet 85 องศาเซลเซียส และอัตราการไหล 2 รอบต่อนาที แล้วคำนวณ % yield ที่ได้

ข. ทำตามข้อ 3.4.2.2.ก. อีกครั้ง แต่หลังจากกรองแล้วให้นำมาทำให้เข้มข้นด้วย rotary evaporator ให้เหลือประมาณ 600 มล. แล้วจึงไปทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งเยือกแข็ง ชั่งน้ำหนักผงแห้งที่ได้นำมาคำนวณ % yield

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.2.3 วิธีการสกัดแบบต่อเนื่องด้วยตัวทำละลาย (Continuous extraction) ด้วย Soxhlet apparatus

ชั่งผงสมุนไพร Duhuo 45 กรัม และสมุนไพรอื่นอีก 14 ชนิด ชนิดละ 30 กรัม นำมาผสมรวมกันในถุงพลาสติกแล้วเขย่า 5 นาที นำผงผสมใส่ในถุงผ้าขาวบางนำไปสกัดด้วย 95% เอทานอล 4.5 ลิตร โดยใช้ชุด soxhlet เมื่อสกัดสมบูรณ์แล้ว นำมากรองด้วยกระดาษกรองโดยใช้ vacuum pump นำสารละลายที่กรองได้มาทำให้เข้มข้นด้วย rotary evaporator จนได้สารสกัดเข้มข้น ชั่งน้ำหนักสารสกัดเข้มข้นที่ได้นำมาคำนวณ % yield

3.4.3 การทดสอบคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของสารสกัดน้ำและเอทานอล

3.4.3.1 ลักษณะภายนอกและความเป็นกรด-ด่างของสารสกัดน้ำและเอทานอล

สังเกตลักษณะภายนอกของสารสกัด ได้แก่ สี กลิ่น การดูดความชื้น (ของแข็ง) ความหนืด (ของเหลว)

การวัดความเป็นกรด-ด่างของสารสกัด ให้ชั่งสารสกัด 0.1 กรัม ละลายในน้ำ 10 มล. แล้ววัดโดยใช้ pH meter

3.4.3.2 ทดสอบการละลายของสารสกัดน้ำและเอทานอล

ชั่งสารสกัด 0.1 กรัม นำมาละลายด้วยตัวทำละลาย ได้แก่ น้ำ เอทานอล โดยค่อยเพิ่มปริมาตรของตัวทำละลาย หาค่าการละลายโดยประเมินเทียบกับตาราง 4

ตาราง 4 ค่าการละลายและนิยามศัพท์ที่เกี่ยวข้อง [11]

นิยาม	ปริมาตร (มล.) ของตัวทำละลายที่ใช้ในการละลายตัวถูกละลาย 1 กรัม
Very soluble	น้อยกว่า 1
Freely soluble	1-10
Soluble	10-30
Sparingly soluble	30-100
Slightly soluble	100-1000
Very slightly soluble	1000-10000
Pracitically insoluble/ insoluble	มากกว่า 10000

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.4 สภาวะการทดสอบสารสกัดตำรับตู๋หัวจี้เชิงโดยใช้วิธีทางโครมาโทกราฟีผิวบาง

สารตัวอย่าง : สารสกัดที่ได้จากการต้มแบบดั้งเดิม (CB), สารสกัดน้ำจากวิธีรีฟลักซ์ (CR) และสารสกัดเข้มข้นด้วยเอทานอลจากวิธีการสกัดแบบต่อเนื่องด้วยตัวทำละลาย (CE)

วัฏภาคคงที่ : silica gel GF_{254}

วัฏภาคเคลื่อนที่ : chloroform: methanol (3:2), chloroform: methanol (2:3), *n*-hexane: petroleum ether (1:1), toluene: ethyl acetate (4:1) และ ethyl acetate: methanol (4:1)

การตรวจสอบ : แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร และ/หรือ ใช้การฉีดพ่นด้วย 10 % sulfuric acid ในเอทานอล

3.4.5 การทดสอบลักษณะลายพิมพ์นิ้วมือโดยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงของสารสกัดตำรับตู๋หัวจี้เชิง

3.4.5.1 การเตรียมตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่างน้ำหนักแน่นอนด้วยเครื่องชั่ง 5 ตำแหน่ง ละลายด้วยเมทานอลในขวดปรับปริมาตร 5 มล. ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล แล้วนำไปสกัดด้วย sonicator เป็นเวลา 30 นาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วกรองผ่านกระดาษกรองขนาดรูกรอง 0.45 ไมครอน เก็บไว้ใน vial ขนาด 2 มล.

3.4.5.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน osthole

ชั่งสารมาตรฐาน osthole น้ำหนักแน่นอนด้วยเครื่องชั่ง 5 ตำแหน่ง ละลายด้วยเมทานอลในขวดปรับปริมาตร 5 มล. ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล แล้วกรองผ่านกระดาษกรองขนาดรูกรอง 0.45 ไมครอน เก็บไว้ใน vial ขนาด 2 มล.

3.4.5.3 สภาวะที่ใช้

เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (Shimadzu)

- Degasser Model DGU-20A5
- Pump Model LC-20AD
- Autosampler Model SIL-20AC
- Column oven Model CTO-20A

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- Diode array detector Model SPD-M20A
- Communication Bus Module Model CBM-20A

คอลัมน์ชนิด reversed phase C18 (Mightysil® 5 ไมครอน, 4.6x250 มิลลิเมตร, Kanto chemical Co., INC., Tokyo)

อุณหภูมิของคอลัมน์ 40 องศาเซลเซียส

การไหลแบบเกรเดียนของ acetonitrile (A) กับน้ำ (B) จาก 30 % A ถึง 85 % A ภายใน 60 นาที ดังตาราง 5 และแบบไอโซเครติก 85 % A อีก 10 นาที ดังตาราง 5

อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ 1 มล.ต่อนาที

ปริมาตรของตัวอย่างที่ฉีด 10 ไมโครลิตร

ความยาวคลื่นที่วิเคราะห์ 320 นาโนเมตร

ตาราง 5 การเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่แบบเกรเดียน ที่เวลาต่างๆ

เวลา (นาที)	อัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ (A: B)
0	30: 70
60	85: 15
70	85: 15
75	30: 70

3.4.5.4 สารตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์

- นำยาลูกกลอนตำรับตู๋หัวจี้เซิงขนาดที่รับประทานต่อ 1 วัน มาสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ soxhlet extractor แล้วทำให้เข้มข้นด้วย rotary evaporator ได้เป็นสารสกัดเอทานอลโดยใช้ soxhlet extractor ของยาลูกกลอนตำรับตู๋หัวจี้เซิง (CDJW)
- สารสกัดที่ได้จากการต้มแบบดั้งเดิม (CB)
- สารสกัดน้ำหลังจากทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งเยือกแข็ง (CRF)
- สารสกัดเอทานอลจากวิธีการสกัดแบบต่อเนื่องด้วยตัวทำละลาย (CE)

นำสารตัวอย่างข้างต้นเตรียมเป็นสารละลายตัวอย่างตามวิธีในข้อ 3.4.5.1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.6 การพัฒนาเภสัชภัณฑ์ตำรับตู๋หัวจี้เซิง

3.4.6.1 การพัฒนายาแกรนูลจากสารสกัดน้ำ

ก. การพัฒนาตำรับยาแกรนูล

- การเตรียมแกรนูล

นำสารสกัดน้ำที่ทำให้แห้งด้วยแครื่องทำแห้งเยือกแข็ง (CRF) มาละลายในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วผสมกับ lactose ที่สัดส่วนต่าง ๆ กัน จนได้ก้อนเปียก แล้วนำไปผ่านแร่งเบอร์ 12 ได้เป็นแกรนูล อบให้แห้ง จากนั้นนำแกรนูลมาผ่านแร่งเบอร์ 16 จนได้แกรนูลที่ต้องการ

- การประเมินตำรับ

ประเมินลักษณะแกรนูลจากสี กลิ่น การละลาย

ข. การผลิตยาแกรนูล

- การดำเนินการผลิตยาแกรนูล

<u>วิธีการเตรียมแกรนูล</u>

1) ชั่ง CRF น้ำหนักแน่นอนลงในโกร่ง
2) หยดน้ำอุ่น (อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส) ลงบน CRF คนผสมจน CRF เป็นของเหลว
3) ค่อยๆเติม lactose ลงในข้อ 2 ผสมให้เข้ากันด้วยวิธีเจือจางเชิงอนุกรมแบบเรขาคณิต (geometric dilution) จนได้ก้อนเปียก (wet mass)
4) นำก้อนเปียกกดผ่านแร่งเบอร์ 12 จนได้แกรนูล
5) นำแกรนูลไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนแห้ง (ปริมาณความชื้นน้อยกว่า 5 %)
6) นำแกรนูลที่แห้งแล้วมากดผ่านแร่งเบอร์ 16 จนได้แกรนูลที่ต้องการ
7) บรรจุแกรนูลลงในซองอะลูมิเนียมฟอยด์ ซองละ 12 กรัม ปิดผนึกซองด้วยความร้อน

- การควบคุมคุณภาพยาแกรนูล

1) ลักษณะภายนอก สังเกตรูปร่าง สี กลิ่น ความแข็ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2) การตรวจสอบน้ำหนักที่หายไปเมื่อทำให้แห้ง (% loss on drying)

<u>วิธีการทดลอง</u>

ชั่งแกรนูลน้ำหนักประมาณ 1 กรัม ใส่ลงในถาดชั่งของเครื่องวัดปริมาณความชื้น (moisture analyzer) กดสวิทซ์เริ่มการทำงาน เครื่องจะให้ความร้อนจนกระทั่งน้ำหนักแกรนูลลดลงจนคงที่ ให้อ่านค่าร้อยละของปริมาณความชื้นที่ได้ (ทำซ้ำ 3 ครั้ง)

3) คุณสมบัติการไหล ทดสอบ 2 วิธี ดังนี้

3.1) การหามุมการไหล (repose angle)

3.1.1) นำกรวยแก้วมายึดกับขาตั้ง โดยให้มีระยะห่างจากปลายกรวยถึงพื้นประมาณ 10 ซม.

3.1.2) ชั่งหาน้ำหนักกระดาษ โดยใช้เครื่องชั่งวิเคราะห์ (w)

3.1.3) คำนวณหาพื้นที่ของแผ่นกระดาษสี่เหลี่ยม (a) แล้วคำนวณหาพื้นที่ของกระดาษ 1 กรัม (a/w)

3.1.4) นำกระดาษไปวางไว้ใต้กรวย

3.1.5) ชั่งแกรนูล 50 กรัม แล้วเทลงไปในกรวย ปล่อยให้แกรนูลไหลอย่างอิสระจากปลายกรวย ตกลงบนกระดาษ

3.1.6) ใช้ดินสอลากเส้นเป็นวงกลมตามแนวขอบนอกของกองแกรนูล

3.1.7) ลดระดับของปลายกรวยแก้วลงมาจนอยู่เหนือยอดของกองแกรนูลประมาณ ¼ นิ้ว แล้ววัดความสูงจากพื้นถึงปลายกรวยแก้วเป็นเซนติเมตร (h)

3.1.8) ตัดกระดาษตามเส้นที่ลากไว้ นำไปชั่งโดยเครื่องชั่งวิเคราะห์ คำนวณพื้นที่วงกลม

3.1.9) พื้นที่ของวงกลมคือ $A = \pi r^2$ ดังนั้นคำนวณ $r = (A/\pi)^{1/2}$ เซนติเมตร

3.1.10) คำนวณหา Repose Angle จากสูตร

$$\text{Tangent of Repose Angle} = \frac{\text{ความสูงของกองแกรนูล } (h)}{\text{รัศมีวงกลมที่เกิดจากกองแกรนูล } (r)}$$

3.2) การหา % Compressibility ratio

3.2.1) ชั่งแกรนูลให้มีปริมาตรประมาณ 50 มล. ให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.2) ค่อย ๆ เทแกรนูลลงในกระบอกตวงขนาด 100 มล.

3.2.3) เคาะกระบอกตวง 3 ครั้งกับพื้น โดยให้กระบอกตวงสูงจากพื้น 1 นิ้ว และการเคาะแต่ละครั้งห่างกัน 2 วินาที อ่านค่าปริมาตรของแกรนูลในกระบอกตวงเป็นค่า bulk volume

3.2.4) นำกระบอกตวงไปใส่ในเครื่องเคาะ (jolting volumeter) เคาะกระบอกตวงจนครบ 500 ครั้ง แล้วอ่านปริมาตรของแกรนูลในกระบอกตวงเป็นค่า tapped volume

3.2.5) คำนวณหาค่าของ bulk density และ tapped density จาก

Bulk density = น้ำหนักของแกรนูล/ Bulk volume

Tapped density = น้ำหนักของแกรนูล/ Tapped volume

3.2.6) คำนวณค่า compressibility ratio จากสูตร

$$\text{Compressibility ratio (\%)} = \frac{(\text{Tapped density} - \text{Bulk density})}{\text{Tapped density}} \times 100$$

4) การกระจายขนาดอนุภาค (particle size distribution)

<u>วิธีการทดลอง</u>

4.1) ชั่งน้ำหนักแร่งเปล่าโดยใช้แร่งเบอร์ 20, 40, 60, 70, 100 และถาดรอง

4.2) ประกอบแร่งตั้งแต่เบอร์ 20 ไล่ลงมาถึงถาดรอง

4.3) เทแกรนูลน้ำหนัก 100 กรัมแล้วปิดฝา เขย่า 10 นาที และความแรงในการเขย่า (amplitude) เท่ากับ 50

4.4) ชั่งน้ำหนักแร่งและแกรนูลที่ค้างอยู่บนแร่ง

4.5) บันทึกผล และหาขนาดเฉลี่ย

4.6) สร้างกราฟการกระจายของขนาดอนุภาค

5) ค่าความเป็นกรด-ด่าง

ชั่งแกรนูล 2 กรัม ละลายในน้ำ 25 มล. แล้ววัดค่า pH โดยใช้ pH meter

6) การละลาย

เทแกรนูล 12 กรัม ลงในน้ำอุ่น (50 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 150 มล. บันทึกผล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

7) HPLC fingerprint

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างและสภาวะการวิเคราะห์เหมือนกับการวิเคราะห์ลักษณะลายพิมพ์นิ้วมือของสารสกัดตำรับตู๋หัวจี้เซิง โดยเตรียมตัวอย่างให้มีความเข้มข้นประมาณ 10 มก./มล. และฉีดตัวอย่างปริมาตร 20 มล. (n=3)

8) การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์

ส่งตรวจเชื้อจุลินทรีย์ที่ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 10 เชียงใหม่

3.4.6.2 การพัฒนายาเม็ดจากสารสกัดเอทานอล

ก. การพัฒนาตำรับยาเม็ด

- การพัฒนาตำรับแกรนูลก่อนตั้งตำรับยาเม็ด

<u>วิธีการทดลอง</u>

1) เตรียมสารช่วยยึดเกาะต่าง ๆ ตามความเข้มข้นที่ต้องการ
2) ชั่งสารสกัดเอทานอลน้ำหนักแน่นอนใส่ลงในโกร่ง
3) ชั่งแป้งข้าวโพด (corn starch) แล้วผสมกับสารสกัดเอทานอลให้เข้ากันด้วยวิธีเจือจางเชิงอนุกรมแบบเรขาคณิต (geometric dilution)
4) ค่อย ๆ เทสารช่วยยึดเกาะที่เตรียมไว้ในข้อ 1 ลงไปผสมกันจนได้เป็นก้อนเปียก
5) นำก้อนเปียกกดผ่านแร่งเบอร์ 12 ให้ได้แกรนูล
6) อบแกรนูลที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เมื่อแห้งแล้วนำมาผ่านแร่งเบอร์ 16 จนได้แกรนูลที่ต้องการ

- การประเมินตำรับแกรนูลก่อนตั้งตำรับยาเม็ด

นำแกรนูลที่ได้ไปตอกอัดเป็นเม็ดด้วยเครื่องตอกไฮโดรลิกที่แรงตอกต่างๆ แล้ววัดความแข็งของยาเม็ดด้วยเครื่องวัดความแข็ง ERWEKA® (n=3)

- การพัฒนาตำรับยาเม็ด

ทำตามวิธีการทดลองเดียวกับการพัฒนาตำรับแกรนูลก่อนตั้งตำรับยาเม็ด เมื่อได้แกรนูลแล้วให้นำแกรนูลไปผสมกับ talcum 2 % ของแกรนูล เขย่าในถุงพลาสติก 2 นาที และผสมกับ magnesium stearate 1 % ของแกรนูล อีก 2 นาที แล้วจึงนำไปตอกด้วยเครื่องตอกเม็ดยาสากเดี่ยวแบบกึ่งอัตโนมัติ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- การประเมินตำรับยาเม็ด

1) ความชื้นที่สูญเสียขณะทำให้แห้งของยาเม็ด (% loss on drying)

นำยาเม็ดมาบดให้ละเอียดในโกร่ง แล้ววัดปริมาณความชื้นด้วย moisture analyzer ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

2) ความแข็งของยาเม็ด

วัดความแข็งของยาเม็ดด้วยเครื่องวัดความแข็ง ERWEKA® (n=3)

3) ความกร่อนของยาเม็ด ใช้ Roche Friabilator ในการทดสอบ

<u>วิธีการทดลอง</u>

3.1) ชั่งน้ำหนักเม็ดยา 20 เม็ดด้วยเครื่องชั่งวิเคราะห์

3.2) นำไปใส่ Roche Friabilator ให้หมุนจำนวน 100 รอบ

3.3) นำเม็ดยามาปัดฝุ่นออกแล้วนำไปชั่งด้วยเครื่องชั่งวิเคราะห์

3.4) คำนวณหาน้ำหนักของเม็ดยาที่หายไป

การประเมินผลความกร่อนของเม็ดยา สำหรับเม็ดยาโดยทั่วไปจะต้องมีเปอร์เซ็นต์ความกร่อนไม่เกิน 1.0 จึงจะยอมรับได้ แต่ถ้าเม็ดยาเกิดการแยกเป็นชั้นหรือแยกตรงฝาขณะทดสอบจะถือว่าเม็ดยานั้นไม่ผ่านการทดสอบไม่ว่าเปอร์เซ็นต์ความกร่อนจะเป็นเท่าใดก็ตาม

4) การแตกตัวของยาเม็ดโดยใช้เครื่องวัดการแตกตัว

<u>วิธีการทดลอง</u>

4.1) สุ่มตัวอย่างเม็ดยามาจำนวน 6 เม็ด

4.2) ใส่เม็ดยาลงไปในหลอดแก้วหลอดละ 1 เม็ด

4.3) ใส่ disks ทับเม็ดยาทั้ง 6 เม็ด

4.4) ใส่ immersion fluid ลงไปในบีกเกอร์ ซึ่งถ้าไม่มีการระบุใน monograph ก็ให้ใช้น้ำและควบคุมให้มีอุณหภูมิ 37 ± 2 องศาเซลเซียส

4.5) จุ่ม basket ที่มีเม็ดยาและ disk ทับอยู่ลงใน immersion fluid และ เปิดสวิทซ์ให้เครื่องทำงานยก basket ขึ้นและลง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การประเมินผล เมื่อครบกำหนดเวลาให้หยุดเครื่องแล้วยก basket ออกมาพิจารณาลักษณะเม็ดยาที่เหลืออยู่ ดังนี้

- ถ้าเม็ดยาทั้ง 6 เม็ดแตกกระจายผ่านตะแกรงหมดถือว่า ผ่านการทดสอบ
- แต่ถ้ามีเม็ดยา 1 หรือ 2 เม็ดที่แตกตัวไม่หมดยังคงค้างอยู่ บนตะแกรง ให้นำมาทดสอบใหม่อีก 12 เม็ด โดยทดสอบเหมือนเดิมครั้งละ 6 เม็ด

เมื่อครบเวลาของแต่ละชุดแล้วผลที่ได้จะต้องมีเม็ดยาไม่น้อยกว่า 16 เม็ดจากทั้งหมด 18 เม็ดที่แตกตัวอย่างสมบูรณ์ภายในระยะเวลาที่กำหนดจึงจะถือว่า ผ่านการทดสอบ

ข. การผลิตยาเม็ด

- การดำเนินการผลิตยาเม็ด

<u>วิธีการทดลอง</u>

1) เตรียม 5 % w/v polyvinylpyrrolidone K90 ในเอทานอล เป็นสารช่วยยึดเกาะ
2) ชั่งสารสกัดเอทานอลน้ำหนักแน่นอนใส่ลงในโกร่ง
3) ชั่ง corn starch แล้วผสมกับสารสกัดเอทานอลให้เข้ากันด้วยวิธีเจือจางเชิงอนุกรมแบบเรขาคณิต (geometric dilution)
4) ค่อยๆเทสารช่วยยึดเกาะที่เตรียมไว้ในข้อ 1 ลงไปผสมกันจนได้เป็นก้อนเปียก
5) นำก้อนเปียกกดผ่านแร่งเบอร์ 12 ให้ได้ตัวหนอนยาว
6) อบตัวหนอนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เมื่อแห้งแล้วนำมาผ่านแร่งเบอร์ 16 ได้เป็นแกรนูล
7) นำแกรนูลไปผสมกับ talcum 2 % โดยการเขย่าในถุงพลาสติก 2 นาที
8) จากนั้นนำแกรนูลในข้อ 7 ไปผสมกับ magnesium stearate 1 % โดยการเขย่าในถุงพลาสติกอีก 2 นาที
9) นำแกรนูลในข้อ 8 ไปตอกด้วยเครื่องตอกเม็ดยาสากเดี่ยวแบบกึ่งอัตโนมัติ
10) บรรจุยาเม็ดลงในขวดแก้วสีชาที่มีสารดูดความชื้นและปิดฝา

- การควบคุมคุณภาพยาเม็ด

1) ลักษณะภายนอกของยาเม็ด ได้แก่ รูปร่าง สี กลิ่น ความเป็นเนื้อเดียวกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2) การแปรผันของน้ำหนักเม็ดยา

<u>วิธีการทดลอง</u>

2.1) สุ่มตัวอย่างเม็ดยามาทั้งหมด 20 เม็ด

2.2) ชั่งน้ำหนักเม็ดยาแต่ละเม็ด

2.3) คำนวณหาค่าเฉลี่ยของน้ำหนักเม็ดยาหนึ่งเม็ด

2.4) คำนวณหาค่าต่ำสุดและค่าสูงสุดของน้ำหนักเม็ดยา โดยคิดจากน้ำหนักเฉลี่ยของเม็ดยาที่หาได้กับค่าเปอร์เซ็นต์การแปรผันของเม็ดยาที่กำหนดดังแสดง

Weight Variation Tolerances for Uncoated Tablets

Average Weight of Tablets (mg)	Maximum Percentage Difference Allowed
130 or less	10
130 – 324	7.5
More than 324	5

2.5) เปรียบเทียบน้ำหนักเม็ดยาแต่ละเม็ดกับช่วงน้ำหนักมาตรฐานที่คำนวณได้

การประเมินผลการแปรผันของน้ำหนักเม็ดยาจะเข้าตามมาตรฐานของเภสัชตำรับประเทศสหรัฐอเมริกาก็ต่อเมื่อ

- จะต้องมีเม็ดยาไม่เกิน 2 เม็ด ที่มีน้ำหนักเกินค่าเปอร์เซ็นต์ที่กำหนด ซึ่งคำนวณจากน้ำหนักเฉลี่ยของเม็ดยาที่นำมาทดสอบ
- จะต้องไม่มีเม็ดยาที่มีน้ำหนักเกินมากกว่าสองเท่าของค่าเปอร์เซ็นต์ที่กำหนดนั้น

3) ความหนาของเม็ดยา (Thickness)

ใช้ micrometer วัดความหนาของเม็ดยาแต่ละเม็ดจำนวน 20 เม็ด หาค่าเฉลี่ย

4) ความชื้นที่สูญเสียขณะทำให้แห้งของยาเม็ด (% loss on drying)

วิธีเดียวกับการหาความชื้นที่สูญเสียขณะทำให้แห้งของยาเม็ดในการประเมินตำรับยาเม็ดตามข้างต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5) ความแข็ง

วิธีเดียวกับการหาความแข็งในการประเมินตำรับยาเม็ดตามข้างต้น

6) ความกร่อน

วิธีเดียวกับการหาความกร่อนในการประเมินตำรับยาเม็ดตามข้างต้น

7) เวลาในการแตกตัว

วิธีเดียวกับการหาเวลาในการแตกตัวในการประเมินตำรับยาเม็ดตามข้างต้น

8) ค่าความเป็นกรด-ด่าง

นำยาเม็ดมาบดในโกร่งให้เป็นผง นำผงยามา 1 กรัม ละลายในน้ำ 30 มล. แล้ววัดโดยใช้ pH meter (n=3)

9) HPLC fingerprint ของยาเม็ด

เตรียมตัวอย่างให้มีความเข้มข้นประมาณ 10 มก./มล. (n=3) โดยบดเม็ดยาในโกร่งแล้วชั่งผงยาที่บดได้ด้วยน้ำหนักแน่นอนด้วยเครื่องชั่งวิเคราะห์มาละลายในเมทานอลแล้วปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรด้วยเมทานอล จากนั้นนำไปสกัดด้วย sonicator 30 นาที กรองผ่านกระดาษกรองขนาดรูกรอง 0.45 ไมครอน นำสารละลายที่กรองได้ไปทดสอบด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้สภาวะการทดสอบตามข้อ 3.4.5.3

10)การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์

ส่งตรวจเชื้อจุลินทรีย์ที่ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 10 เชียงใหม่

3.4.7 การศึกษาความคงสภาพของยาแกรนูลและยาเม็ดตำรับตู้หัวจี้เซิง

<u>วิธีการศึกษา</u>

แกรนูลสารสกัดน้ำที่ทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งเยือกแข็งบรรจุใส่ซองลามิเนตแล้วปิดปากซองด้วยความร้อน นำเข้าตู้ควบคุมอุณหภูมิและความชื้น ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 65 % และที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75 % เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 1, 2 และ 3 เดือน นำมาตรวจสอบลักษณะปรากฏภายนอก, ความชื้นที่สูญเสียขณะทำให้แห้ง, ความเป็นกรด-ด่าง และ HPLC fingerprint

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ยาเม็ดสารสกัดเอทานอลบรรจุใส่ขวดแก้วสีชาที่มีฝาปิด นำเข้าตู้ควบคุมอุณหภูมิและความชื้น ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 65 % และที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75 % เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 1, 2 และ 3 เดือน นำมาตรวจสอบลักษณะปรากฏภายนอก, ความชื้นที่สูญเสียขณะทำให้แห้ง, ความเป็นกรด-ด่าง, ความแข็ง, การแตกตัว และ HPLC fingerprint

3.4.8 การทดสอบความพึงพอใจของเภสัชภัณฑ์ตำรับตู๋หัวจี้เชิง

สำรวจความพึงพอใจของผู้มารับบริการที่มังคละโอสถ คลินิกการแพทย์แผนไทย-จีน ต่อรูปแบบเภสัชภัณฑ์ตำรับตู๋หัวจี้เชิง ได้แก่ ลูกกลอน แกรนูล ยาเม็ด โดยใช้แบบสอบถามแล้วนำมาวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธีทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved