# การศึกษามาตรฐานตำรับยาสมุนไพรเบญจกูลที่จำหน่ายในประเทศไทย

# Quality Evaluation of Commercial Benjakul Formulations in Thailand

รุจิลักขณ์ รัตตะรมย์[1*], อินทัช ศักดิ์ภักดีเจริญ[2], เบญญทิพย์ คงสิบ[3]

Ruchilak Rattarom[1*], Intouch Sakpakdeejaroen[2], Benyatip Khongsip[3]

Received: 1 December 2016 ; Accepted: 7 March 2017

## บทคัดย่อ

ตำรับเบญจกูลเป็นตำรับยาสมุนไพรที่อยู่ในบัญชียาหลักแห่งชาติ ปี 2555 ประกอบด้วยสมุนไพร 5 ชนิด ได้แก่ ดอกดีปลี รากช้าพลู เถาสะค้าน รากเจตมูลเพลิง และเหง้าขิง สรรพคุณขับลม บรรเทาอาการท้องอืด ท้องเฟ้อ และใช้เป็นยาบำรุงธาตุ งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเปรียบเทียบคุณภาพของตำรับยาเบญจกูลที่วางจำหน่ายในท้องตลาดและผลิตโดยโรงพยาบาลกับตำรับที่เตรียมขึ้นเอง โดยศึกษาคุณภาพของตำรับยาตามวิธีที่ระบุใน Thai Herbal Pharmacopoeia (THP) และหาปริมาณสารสำคัญด้วยเทคนิค HPLC ผลการศึกษาพบว่าตัวอย่างตำรับเบญจกูลมีคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์แตกต่างกัน ผลการตรวจสอบลายพิมพ์นิ้วมือของสารสกัดด้วยเทคนิค TLC และ HPLC พบว่ามี 1 ตัวอย่างที่มีความแตกต่างออกไป การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ ได้แก่ 6-gingerol, plumbagin และ piperine อยู่ในช่วง 0.333 – 0.289, 0.052 – 0.097 และ 1.208 – 2.489 %W/W ตามลำดับ และมี 1 ตัวอย่างที่ไม่สามารถวิเคราะห์ปริมาณ 6-gingerol และ plumbagin ได้ ผลตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อจุลชีพพบการปนเปื้อนของยีสต์และราเส้นใยเกินเกณฑ์มาตรฐาน 1 ตัวอย่าง จะเห็นได้ว่าตำรับยาเบญจกูลที่จำหน่ายในประเทศไทยยังมีตัวอย่างที่มีความแตกต่างกันในข้อกำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์สมุนไพร บ่งชี้ถึงวัตถุดิบหรือกระบวนการผลิตที่ไม่ได้มาตรฐาน การปนเปื้อนเชื้อจุลชีพ และอาจมีการปนปลอมสมุนไพรหรือสารอื่นๆ ผลการศึกษาที่ได้จะนำไปสู่การจัดทำเป็นข้อกำหนดเพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพและมาตรฐานของตำรับยาเบญจกูล เพื่อเพิ่มความเชื่อมั่นในประสิทธิภาพและความปลอดภัยแก่ผู้บริโภคต่อไปในอนาคต

**คำสำคัญ:** ตำรับยาเบญจกูล มาตรฐานตำรับยาสมุนไพร ลายพิมพ์นิ้วมือ

## Abstract

Benjakul is a Thai traditional formulation in the National List of Essential Medicines (Herbal medicines) 2011, which is composed of five plants: *Piper chaba* fruit, *Piper sarmentosum* root, *Piper interruptum* stem, *Plumbago indica* root and *Zingiber officinale* rhizome. It is normally used to relieve flatulence and dyspepsia, and also used as a tonic drug. The aim of this study was to evaluate the quality of Benjakul formulations which were available on the market compared with the in-house preparation. Samples were analysed following the methods described in Thai Herbal Pharmacopoeia (THP) and also the active compounds determined using HPLC. The result demonstrated varying

[1] *อาจารย์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม*

[2] *อาจารย์ สาขาวิชาการแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์*

[3] *นักศึกษา สาขาวิชาการแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์*

* *ติดต่อได้ที่: ดร.รุจิลักขณ์ รัตตะรมย์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ตำบลขามเรียง อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150 เบอร์โทรศัพท์ 0819276463 E-mail: rujiluk.r@msu.ac.th*

[1] *Lecturer, Faculty of Pharmacy, Mahasarakham University, Kantarawichai, Mahasarakham, 44150, Thailand*

[2] *Lecturer, Department of Applied Thai Traditional Medicine, Faculty of Medicine, Thammasat University, Pathum Thani 12120, Thailand*

[3] *Student, Department of Applied Thai Traditional Medicine, Faculty of Medicine, Thammasat University, Pathum Thani 12120, Thailand*

* *Corresponding author: Ruchilak Rattarom, Faculty of Pharmacy, Mahasarakham University, Kantarawichai, Mahasarakham, 44150, Thailand, E-mail: rujiluk.r@msu.ac.th*

physico-chemical properties among Benjakul samples. The average percentage of three active compounds, 6-gingerol, plumbagin and piperine were 0.333 – 0.289, 0.052 – 0.097 and 1.208 – 2.489 % w/w, respectively. However, there is one sample which had different both TLC and HPLC fingerprints, and the amount of 6-gingerol and plumbagin could not be determined. For microbial limit test, the total yeasts and molds count from one sample was above the official standard. These outcomes indicated non-conformity to THP in the quality of Benjakul formulation which may result from raw materials, manufacturing processes, contamination and adulteration. The results from this study may be further used for quality control and standardization to ensure the efficacy and safety of Benjakul formulation.

**Keywords:** Benjakul, quality control, fingerprint

## บทนำ

จากความนิยมในการใช้ยาสมุนไพรที่เพิ่มขึ้นในปัจจุบัน รวมถึงนโยบายของกระทรวงสาธารณสุขที่ส่งเสริมให้สถานพยาบาลในสังกัดใช้ยาสมุนไพรบำบัดโรคควบคู่กับยาแผนปัจจุบันในบัญชียาหลักแห่งชาติ เพื่อลดการนำเข้ายาแผนปัจจุบันจากต่างประเทศ ทำให้มีผลิตภัณฑ์ยาแผนโบราณจากสมุนไพรออกวางจำหน่ายอย่างแพร่หลาย ตำรับยาเบญจกูลเป็นตำรับยาหนึ่งที่ได้รับความนิยมอย่างกว้างขวาง สรรพคุณในบัญชียาหลักแห่งชาติใช้ขับลม บรรเทาอาการท้องอืด ท้องเฟ้อ และเป็นยาบำรุงธาตุ[1] ประกอบด้วยสมุนไพร 5 ชนิด ได้แก่ ดอกดีปลี (*Piper chaba* Hunt. วงศ์ Piperaceae) รากช้าพลู (*Piper sarmentosum* Roxb. วงศ์ Piperaceae) เถาสะค้าน (*Piper interruptum* Opiz วงศ์ Piperaceae) รากเจตมูลเพลิงแดง (*Plumbago indica* Linn. วงศ์ Plumbaginaceae) และเหง้าขิง (*Zingiber officinale* Roscoe วงศ์ Zingiberaceae) แต่ปัจจุบันสื่อต่างๆ โดยเฉพาะสื่อสังคมออนไลน์มีการนำเสนอข้อมูลเกี่ยวกับตำรับเบญจกูลที่นอกเหนือไปจากบัญชียาหลักฯ เช่น เป็นยาอายุวัฒนะ เสริมภูมิคุ้มกัน เป็นต้น ประกอบกับมีรายงานการศึกษาภูมิปัญญาการใช้สมุนไพรในการรักษาโรคมะเร็งของหมอพื้นบ้านภาคใต้ที่ใช้ตำรับเบญจกูลเป็นยาปรับธาตุในผู้ป่วยมะเร็งก่อนการรักษาด้วยตัวยาชนิดอื่น[2] และรายงานการวิจัยหลายรายงานที่สนับสนุนฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง ทั้งมะเร็งปอด มะเร็งต่อมลูกหมาก มะเร็งเต้านม[3, 4, 5, 6] แสดงให้เห็นแนวโน้มของเบญจกูลที่อาจพัฒนาไปใช้ในผู้ป่วยโรคมะเร็งได้ในอนาคต เมื่อสืบค้นข้อมูลงานวิจัยเกี่ยวกับการควบคุมภาพตำรับยาสมุนไพรไทย พบว่ายังไม่มีรายงานการจัดทำมาตรฐานตำรับยาเบญจกูลในรูปแบบยาสมุนไพรแผนโบราณมาก่อน ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาเปรียบเทียบคุณภาพของตำรับยาเบญจกูลที่วางจำหน่ายในท้องตลาดและโรงพยาบาลหรือหน่วยงานของรัฐกับตำรับยาเบญจกูลที่เตรียมขึ้นเอง โดยศึกษาคุณภาพของตำรับยาตามวิธีของ Thai Herbal Pharmacopoeia 2009 การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีของตำรับยาเบญจกูลเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน โดยจัดทำลายพิมพ์นิ้วมือของสารสกัดด้วยเทคนิค Thin layer chromatography (TLC) และ High-performance liquid chromatography (HPLC) และหาปริมาณสารสำคัญที่เป็นสารบ่งชี้ของตำรับด้วยเทคนิค HPLC รวมทั้งการตรวจสอบการปนเปื้อนจากเชื้อจุลชีพ งานวิจัยนี้จะเป็นการพัฒนาวิธีการควบคุมคุณภาพของตำรับยาสมุนไพรไทยที่ประกอบด้วยสมุนไพรหลายชนิด ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบคุณภาพของตำรับยาเบญจกูลจากแหล่งอื่นๆ ได้ และนำไปสู่การพัฒนาและควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ต่อไป

## วิธีการวิจัย

### การเตรียมตัวอย่างและเก็บตัวอย่างตำรับยาเบญจกูล

จัดเตรียมตำรับยาเบญจกูลที่เตรียมเอง โดย จัดหาสมุนไพรทั้ง 5 ชนิดจากหมอพื้นบ้านในจังหวัดจันทบุรี ในเดือนสิงหาคม 2557 ลักษณะสมุนไพรแห้งดังแสดงใน Figure 1 ล้างทำความสะอาด หั่น อบแห้งในตู้อบลมร้อน 45 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง นำไปบดละเอียดผ่านแร่งเบอร์ 60 ชั่งผงยาสมุนไพรแต่ละชนิดอย่างละ 1 กิโลกรัม นำมาผสมกันในเครื่องผสมผงยา เก็บที่อุณหภูมิห้องในถุงกันแสง จัดซื้อตำรับยาเบญจกูลสำเร็จรูปที่มีจำหน่ายในประเทศไทย ในระหว่างเดือน ตุลาคม-ธันวาคม 2557 ที่มีอายุนับจากวันผลิตไม่เกิน 1 ปี จำนวน 10 ตัวอย่าง จากแหล่งต่างๆ ได้แก่ ร้านยาแผนปัจจุบันและร้านยาแผนโบราณ ในเขตกรุงเทพฯ และปริมณฑล ตำรับที่ผลิตและจำหน่ายในโรงพยาบาล/หน่วยงานรัฐ และที่จำหน่ายผ่านเวปไซต์ โดยการค้นข้อมูลแหล่งจำหน่ายจาก www.google.com

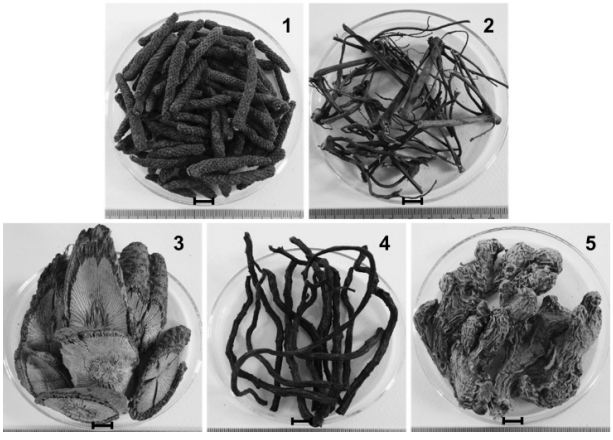


**Figure 1** Five plants comprising Benjakul formulation collected by traditional healer at Chantaburi Province, Thailand; 1) fruits of *Piper chaba* Hunt., 2) root of *Piper sarmentosum* Roxb., 3) stem *of Piper interruptum* Opiz, 4) root of *Plumbago indica* Linn., 5) rhizome of *Zingiber officinale* Roscoe.

**การศึกษาเปรียบเทียบคุณภาพตำรับยาเบญจกูลตามวิธีของ Thai Herbal Pharmacopoeia 2009**[7]

ปริมาณเถ้ารวม (total ash) และปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (acid insoluble ash) ทำการศึกษาโดยชั่งผงยา 2 กรัม อย่างแม่นยำ ใน porcelain crucible ที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนมีน้ำหนักคงที่ นำไปเผาในเตาเผา muffle furnace ที่ 450 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักเถ้ารวมที่ได้ จากนั้นนำเถ้ารวมที่ได้พร้อมถ้วยมาชั่งน้ำหนักที่แน่นอน จากนั้นต้มกับ 10% กรดไฮโดรคลอริค ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที กรองผ่านกระดาษกรองไร้เถ้า แล้วล้างเถ้าด้วยน้ำร้อนจนกระดาษลิตมัสเป็นกลาง นำกระดาษกรองและเถ้าไปเผาในเตาเผา muffle furnace ที่ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักเถ้าที่ได้ คำนวณปริมาณเถ้ารวมและปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรดเป็นร้อยละของน้ำหนักแห้งของผงยาที่ชั่งเมื่อเริ่มต้น

ความชื้น (loss on drying) ทำการศึกษาโดยชั่งผงยา 2 กรัม อย่างแม่นยำ นำไปหาปริมาณความชื้นด้วยเครื่อง moister analyzer ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนมีน้ำหนักคงที่ คำนวณปริมาณความชื้นเป็นร้อยละของน้ำหนักแห้งของผงยาที่ชั่งเมื่อเริ่มต้น

ปริมาณสารสกัดละลายน้ำและเอทานอล (water–soluble extractive and ethanol–soluble extractive) ทำการศึกษาโดยชั่งผงยา 3 กรัม อย่างแม่นยำในขวดรูปชมพู่ ตัวอย่างชุดที่ 1 สกัดด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ตัวอย่างชุดที่ 2 สกัดด้วย 95% เอทานอล ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เขย่าบนเครื่องเขย่าตัวอย่างอัตโนมัติเป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองเอาสารละลาย 20 มิลลิลิตรใส่ถ้วยระเหย นำไประเหยตัวทำละลายออกบนอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิจนเริ่มแห้ง จากนั้นอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนมีน้ำหนักคงที่ คำนวณปริมาณสารสกัดเป็นร้อยละของน้ำหนักแห้งของผงยาที่ชั่งเมื่อเริ่มต้น

สารสกัดจากการสกัดด้วย 95% เอทานอล นำไปใช้ในการศึกษาลายพิมพ์นิ้วมือของสารสกัดและหาปริมาณสารสำคัญของตำรับต่อไป

**การศึกษาลายพิมพ์นิ้วมือของสารสกัดด้วยเทคนิค Thin layer chromatography (TLC fingerprint)**

เตรียมสารมาตรฐานที่เป็นสารบ่งชี้ของตำรับ ซึ่งแยกได้จากตำรับและแสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอดในงานวิจัยก่อนหน้านี้[4] ได้แก่ 6-gingerol, plumbagin, piperine และ 6-shogaol ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดเบญจกูลความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน 95% เอทานอล โหลดสารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิดและสารสารละลายสารสกัดเบญจกูลแต่ละตัวอย่างลงบน TLC plate silica gel 60 f254 ขนาด 10x20 เซนติเมตร ด้วยเครื่อง Camag รุ่น Linomat 5 ปริมาตรตัวอย่างละ 15 ไมโครลิตร นำแผ่น TLC ไปใส่ใน TLC tank ที่บรรจุตัวทำละลายที่ทำการพัฒนาขึ้น 3 ระบบ ได้แก่ Hexane:EtOAc [6:4], Hexane:$CHCl_3$:EtOAc [4:4:2] และ Hexane:EtOAc:Acetone [6:3.5:0.5] นำแผ่น TLC ไปส่องภายใต้ UV cabinet ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร บันทึกภาพ จากนั้นนำไปสเปรย์ด้วย anisaldehyde sulfuric acid reagent บันทึกภาพ

**การศึกษาลายพิมพ์นิ้วมือของสารสกัดด้วยเทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC fingerprint) และหาปริมาณสารสำคัญของตำรับ**

เตรียมสารมาตรฐาน 6-gingerol, plumbagin และ piperine ที่ความเข้มข้นต่างๆ (12.5-400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และสารสกัดเบญจกูลความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรใน 95% เอทานอล กรองสารละลายด้วยตัวกรอง nylon ø 0.45 µm นำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ภายใต้สภาวะเดียวกับระบบซึ่งได้รับการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ในงานวิจัยก่อนหน้านี้[8] ดังนี้

HPLC: TSP ConstaMetric 4100 Bio with Autosampler, UV-Vis detector and ChromeQuest 5.0 software; Column: ZORBAX Eclipse XDB-C18 (250 x 4 mm, 5 µm); Mobile phase: Water (A) and Acetronitrile (B) with gradi-

ent elution (0 min: 40% B, 30 min: 50% B, 50 min: 95% B, 60 min: 100% B); Flow rate: 1.0 ml/min; Detection: 256 and 282 nm คำนวณหาปริมาณสารสำคัญของตำรับ โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารสำคัญทั้ง 3 ชนิด

ตรวจสอบการปนเปื้อนจากเชื้อจุลชีพของตำรับยาเบญจกูล ด้วยเทคนิค plate count

เตรียมสารสกัดเบญจกูลโดยชั่งผงยา 10 กรัม เติม phosphate buffer 90 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน กรองจนได้สารละลายใส เจือจางตัวอย่างแบบ ten-fold dilution 5 ระดับความเจือจางคือ $10^{-1}$, $10^{-2}$, $10^{-3}$, $10^{-4}$ และ $10^{-5}$ ตามลำดับ นำสารละลายตัวอย่างแต่ละระดับความเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA สำหรับทดสอบจำนวนทั้งหมดของจุลินทรีย์ที่ใช้อากาศ และอาหารเลี้ยงเชื้อ DG18 สำหรับทดสอบจำนวนทั้งหมดของยีสต์และราเส้นใย จากนั้นใช้ spreader เกลี่ยสารละลายตัวอย่างให้กระจายทั่วผิวหน้าอาหาร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับการทดสอบจำนวนทั้งหมดของจุลินทรีย์ที่ใช้อากาศ และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สำหรับการทดสอบจำนวนทั้งหมดของยีสต์และราเส้นใย นับจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์ทั้งหมด รายงานผลเป็นจำนวน colony-forming unit (cfu)/1 มิลลิลิตร

## การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ผลการทดลองโดยใช้สถิติเชิงบรรยาย (Descriptive Statistics) ได้แก่ ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

## ผลการวิจัย

**ผลการเตรียมตัวอย่างและเก็บตัวอย่างตำรับยาเบญจกูล**

ตำรับยาเบญจกูลที่เตรียมขึ้นเองให้รหัสเป็น BEN1 ตำรับยาเบญจกูลที่จัดซื้อผ่านช่องทางต่างๆ จำนวน 10 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างที่ผลิตโดยเอกชนจำนวน 6 ตัวอย่าง ซึ่งมีทะเบียนยาถูกต้อง 3 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่ผลิตและจำหน่ายในโรงพยาบาล/หน่วยงานรัฐ จำนวน 4 ตัวอย่าง ให้รหัสเป็น BEN2-BEN10 รายละเอียดของแต่ละตัวอย่างดังแสดงใน Table 1

**Table 1** Information of Benjakul formulations which were available on the market and the in-house preparation, collected from October – December 2014, produced not more than one year from the date of manufacture.

| Code | Manufacturer | Distributor | FDA drug registration | Dosage form |
|---|---|---|---|---|
| **BEN1** | In-house preparation | - | - | Powder |
| **BEN2** | Private manufacturer | Traditional drug store | Yes | Capsule |
| **BEN3** | Private manufacturer | Traditional drug store | Yes | Capsule |
| **BEN4** | Public hospital | Public hospital | No | Capsule |
| **BEN5** | Private manufacturer | Website | No | Capsule |
| **BEN6** | Public hospital | Public hospital | No | Capsule |
| **BEN7** | Private manufacturer | Traditional drug store | Yes | Capsule |
| **BEN8** | Private manufacturer | Traditional drug store | No | Powder |
| **BEN9** | Public hospital | Public hospital | No | Capsule |
| **BEN10** | Private manufacturer | Website | No | Capsule |
| **BEN11** | Public manufacturer | Public manufacturer | No | Capsule |

**ผลการศึกษาคุณภาพของตำรับยาเบญจกูล ตามวิธีของ Thai Herbal Pharmacopoeia 2009**

จากการตรวจสอบลักษณะตัวอย่างภายนอกพบว่าลักษณะผงยาของตำรับเบญจกูลทั้งที่เตรียมขึ้นเองและที่ซื้อจากท้องตลาดและผลิตและจำหน่ายในโรงพยาบาล/หน่วยงานรัฐ มีความละเอียดและกลิ่นใกล้เคียงกัน แต่มีสีแตกต่างกันเล็กน้อย ผลการเปรียบเทียบคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ ได้แก่ ปริมาณเถ้ารวม ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด และความชื้น พบว่าปริมาณเถ้ารวมและปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด มีค่าเฉลี่ยคิดเป็นร้อยละ 9.13 ± 0.11 และ 1.31 ± 0.09 ตามลำดับ โดยตัวอย่าง BEN3 มีค่าสูงสุด คือร้อยละ 12.46 และ 3.85 ตามลำดับ รองลงมาคือ BEN5 ร้อยละ 11.71 และ 2.87 ตามลำดับ ส่วนตัวอย่างอื่นๆ มีปริมาณเถ้ารวมน้อยกว่าร้อยละ 10 และปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรดน้อยกว่าร้อยละ 2 ปริมาณ

ความชื้นมีค่าเฉลี่ยร้อยละ 7.79 ± 0.33 และทุกตัวอย่างมีปริมาณความชื้นน้อยกว่าร้อยละ 10 การเปรียบเทียบปริมาณสารสำคัญ ได้แก่ ปริมาณสารสกัดละลายน้ำและเอทานอล พบว่ามีค่าเฉลี่ยคิดเป็นร้อยละ 18.52 ± 0.55 และ 8.39 ± 0.24 ตามลำดับ โดยตัวอย่าง BEN2 มีปริมาณสารสกัดละลายน้ำสูงสุด ร้อยละ 23.74 รองลงมาคือ BEN10 ร้อยละ 22.48 และ BEN2 เป็นตัวอย่างเดียวที่มีค่าปริมาณสารสกัดละลายเอทานอล มากกว่าร้อยละ 10 ผลการศึกษาดังแสดงใน Table 2

**Table 2** The average percentage of total ash, acid insoluble ash, water-soluble extractive, ethanol-soluble extractive and moisture content of Benjakul formulations (n = 3).

| Sample | Ash contents | | Extractives | | Moisture content |
|---|---|---|---|---|---|
| | Total ash | Acid insoluble ash | Water-soluble extractive | Ethanol-soluble extractive | |
| BEN1 | 8.34 ± 0.03 | 1.02 ± 0.34 | 16.54 ± 0.14 | 7.66 ± 0.01 | 8.1 ± 0.16 |
| BEN2 | 8.33 ± 0.07 | 0.39 ± 0.02 | 23.74 ± 1.26 | 12.80 ± 0.21 | 9.1 ± 0.23 |
| BEN3 | 12.46 ± 0.05 | 3.85 ± 0.08 | 17.57 ± 0.65 | 8.24 ± 0.22 | 6.7 ± 0.01 |
| BEN4 | 8.12 ± 0.02 | 0.92 ± 0.02 | 18.08 ± 0.66 | 7.40 ± 0.92 | 9.4 ± 0.28 |
| BEN5 | 11.71 ± 0.37 | 2.87 ± 0.32 | 18.36 ± 2.04 | 7.42 ± 0.23 | 7.8 ± 0.26 |
| BEN6 | 8.78 ± 0.17 | 0.90 ± 0.06 | 16.24 ± 0.15 | 6.98 ± 0.16 | 8.9 ± 0.84 |
| BEN7 | 8.94 ± 0.18 | 0.91 ± 0.04 | 17.28 ± 0.35 | 7.56 ± 0.05 | 5.9 ± 0.23 |
| BEN8 | 8.59 ± 0.05 | 1.09 ± 0.03 | 16.35 ± 0.03 | 7.44 ± 0.02 | 6.1 ± 0.47 |
| BEN9 | 8.80 ± 0.11 | 0.64 ± 0.02 | 20.48 ± 0.15 | 9.08 ± 0.29 | 7.5 ± 0.06 |
| BEN10 | 8.76 ± 0.10 | 0.90 ± 0.02 | 22.48 ± 0.25 | 9.50 ± 0.25 | 8.2 ± 0.33 |
| BEN11 | 7.65 ± 0.02 | 0.87 ± 0.04 | 16.61 ± 0.33 | 8.19 ± 0.30 | 8.0 ± 0.80 |
| Mean ± SD | 9.13 ± 0.11 | 1.31 ± 0.09 | 18.52 ± 0.55 | 8.39 ± 0.24 | 7.8 ± 0.33 |

**ผลการศึกษาลายพิมพ์นิ้วมือของสารสกัดด้วยเทคนิค Thin layer chromatography (TLC fingerprint)**

เมื่อนำสารละลายสารมาตรฐาน 4 ชนิด ได้แก่ ได้แก่ 6-gingerol, plumbagin, piperine และ 6-shogaol และสารละลายสารสกัดเบญจกูล BEN1-BEN11 ไปศึกษา TLC fingerprint โดยทดสอบในระบบตัวทำละลายที่แตกต่างกัน 3 ระบบ ผลการศึกษาพบว่าการใช้ TLC ภายใต้ระบบตัวทำละลายทั้ง 3 ระบบ สามารถแยกสารสำคัญที่เป็นสารบ่งชี้ทั้ง 4 ชนิดออกจากกันได้ และเมื่อเปรียบเทียบแถบสารที่แยกได้ในแต่ละตัวอย่าง พบว่าตัวอย่าง BEN2 ภายใต้ UV 366 นาโนเมตร มีรูปแบบแถบสารที่แตกต่างจากตัวอย่างอื่นอย่างชัดเจน TLC fingerprint ของสารสกัดทั้ง 11 ตัวอย่างเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิดดังแสดงใน Figure 2

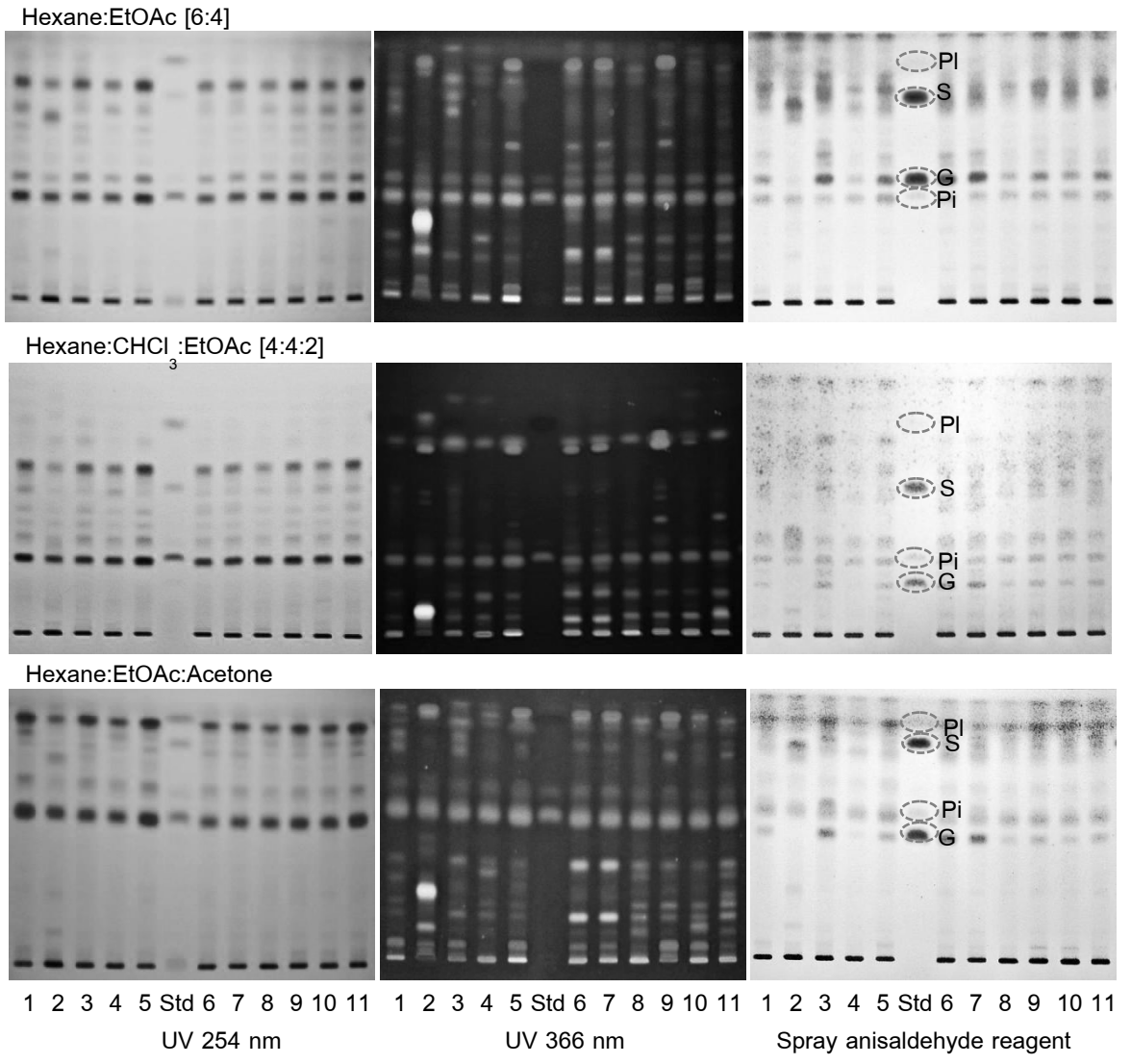


**Figure 2** TLC fingerprint of standard 6-gingerol (G), plumbagin (Pl), piperine (Pi), 6-shogaol (S) and the ethanolic extracts of Benjakul BEN1-BEN11 (1-11) in three different solvent systems.

**ผลการศึกษาลายพิมพ์นิ้วมือของสารสกัดด้วยเทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC fingerprint) และหาปริมาณสารสำคัญของตำรับ**

จากการศึกษา HPLC fingerprint ของสารละลายสารสกัดเบญจกูลแต่ละตัวอย่างภายใต้สภาวะและระบบเดียวกัน พบว่าสามารถใช้เปรียบเทียบความแตกต่างของตัวอย่างตำรับเบญจกูลแต่ละตัวอย่างได้ โดยตัวอย่าง BEN2 มีรูปแบบ HPLC fingerprint ที่แตกต่างจากตัวอย่างอื่นอย่างชัดเจน HPLC fingerprint เปรียบเทียบระหว่างสารละลายสารสกัดเบญจกูล BEN1- BEN11 ดังแสดงใน Figure 3

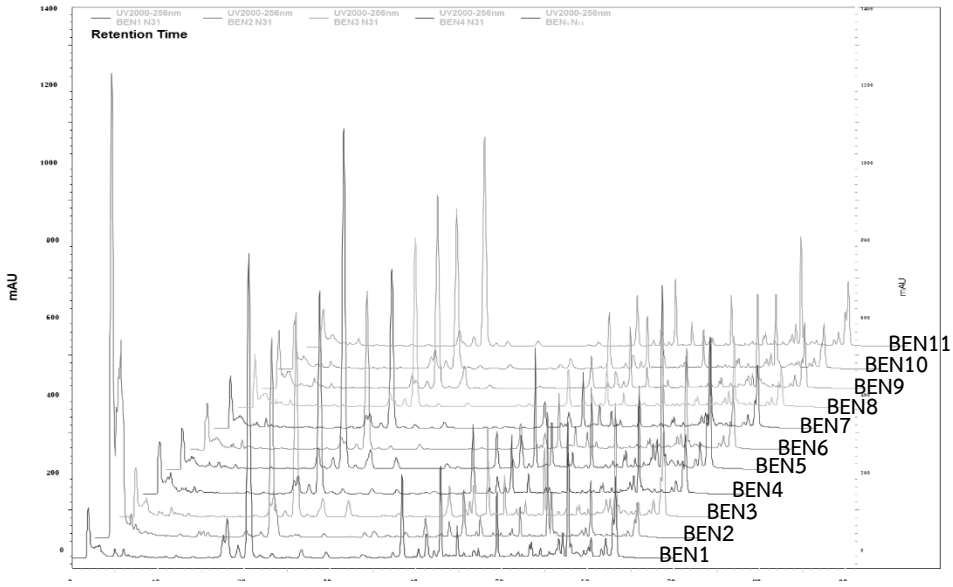


**Figure 3** HPLC fingerprint analysis of the ethanolic extracts of Benjakul (BEN1-BEN11).

จากการวิเคราะห์สารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด ด้วยเทคนิค HPLC พบว่า 6-gingerol, plumbagin และ piperine มีค่า retention time เท่ากับ 16.17, 18.64 และ 21.18 ตามลำดับ เมื่อนำสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ ไปวิเคราะห์และนำพื้นที่ใต้กราฟมาสร้างกราฟมาตรฐาน สมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐานของ 6-gingerol, plumbagin และ piperine คือ $y = 4869.3x + 1321.9$, $R^2 = 0.9999$; $y = 30309x + 9546.8$, $R^2 = 1$ และ $y = 19165x + 19995$, $R^2 = 1$ ตามลำดับ จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญของตำรับโดยนำพื้นที่ใต้กราฟของสารที่มี retention time ตรงกับสารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด มาวิเคราะห์เทียบกับสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐาน เพื่อหาปริมาณสารสำคัญทั้ง 3 ชนิดในแต่ละตัวอย่าง โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานเปรียบเทียบกับ HPLC fingerprint สารละลายสารสกัดเบญจกูล BEN1 ดังแสดงใน Figure 4

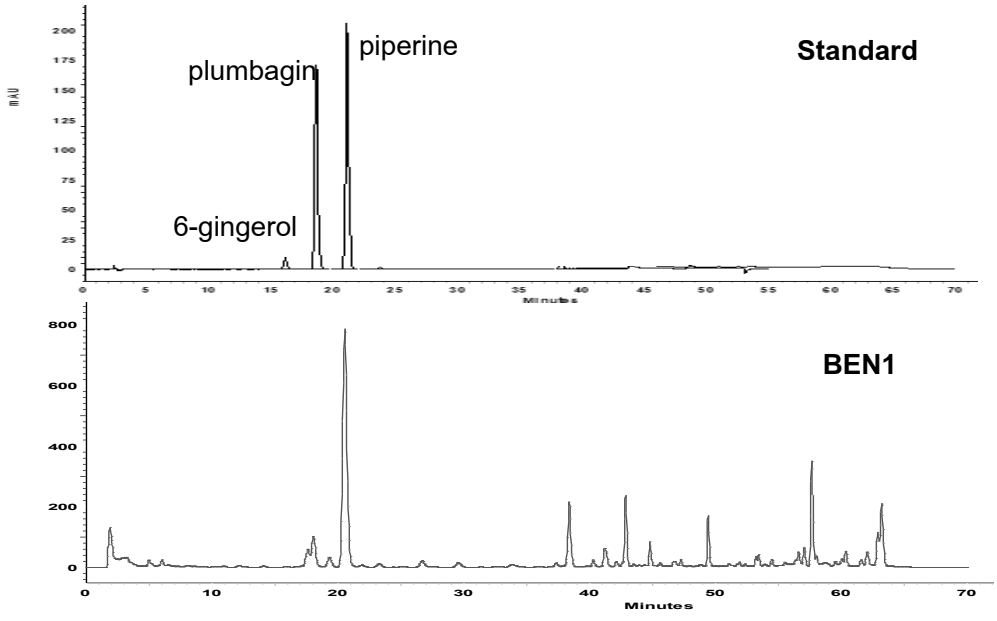


**Figure 4** HPLC chromatogram of standard compounds (6-gingerol, plumbagin, piperine) and BEN1, the ethanolic extract of Benjakul (in-house preparation).

ค่าเฉลี่ยของปริมาณสารสำคัญ 6-gingerol, plumbagin และ piperine ที่พบในตัวอย่างทั้ง 11 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 0.149 ± 0.004, 0.068 ± 0.002 และ 1.549 ± 0.019 ตามลำดับ โดยตัวอย่างที่มีปริมาณสารสำคัญทั้ง 3 ชนิดน้อยกว่าค่าเฉลี่ยมี 3 ตัวอย่าง คือ BEN4, BEN8 และ BEN10 ส่วนตัวอย่าง BEN2 ไม่พบ 6-gingerol และ plumbagin ผลการศึกษาดังแสดงใน Table 3

**Table 3** The average percentage of three active compounds; 6-gingerol, plumbagin and piperine in the ethanolic extract of Benjakul formulations (n = 3, triplicate).

| Sample | Amount of active compounds (Mean ± SD) | | |
|---|---|---|---|
| | 6-Gingerol | Plumbagin | Piperine |
| **BEN1** | 0.120 ± 0.003 | 0.083 ± 0.002 | 1.936 ± 0.015 |
| **BEN2** | ND | ND | 1.312 ± 0.007 |
| **BEN3** | 0.263 ± 0.003 | 0.052 ± 0.001 | 1.372 ± 0.006 |
| **BEN4** | 0.033 ± 0.002 | 0.057 ± 0.001 | 1.385 ± 0.008 |
| **BEN5** | 0.140 ± 0.004 | 0.086 ± 0.002 | 2.489 ± 0.005 |
| **BEN6** | 0.277 ± 0.002 | 0.058 ± 0.001 | 1.208 ± 0.001 |
| **BEN7** | 0.289 ± 0.002 | 0.057 ± 0.001 | 1.246 ± 0.002 |
| **BEN8** | 0.060 ± 0.002 | 0.065 ± 0.004 | 1.340 ± 0.004 |
| **BEN9** | 0.122 ± 0.008 | 0.067 ± 0.001 | 1.595 ± 0.011 |
| **BEN10** | 0.069 ± 0.006 | 0.060 ± 0.001 | 1.388 ± 0.011 |
| **BEN11** | 0.112 ± 0.002 | 0.097 ± 0.008 | 1.767 ± 0.135 |
| **(Mean ± SD)** | **0.149 ± 0.004** | **0.068 ± 0.002** | **1.549 ± 0.019** |

ND: Not detected

**ผลตรวจสอบการปนเปื้อนจากเชื้อจุลชีพของตำรับยาเบญจกูล ด้วยเทคนิค plate count**

การวิเคราะห์จำนวนทั้งหมดของจุลินทรีย์ที่ใช้อากาศ (total aerobic microbial count) และจำนวนทั้งหมดของยีสต์และราเส้นใย (total yeasts and molds count) ในตัวอย่างเบญจกูล รายงานผลเป็นจำนวน colony-forming unit (cfu)/1 มิลลิลิตร โดยอ้างอิงเกณฑ์มาตรฐานของ Thai Herbal Pharmacopoeia 2009 สำหรับยารูปแบบของแข็งที่ไม่ผ่านความร้อนก่อนรับประทาน การประเมินตัวอย่างตำรับเบญจกูล พบว่าตัวอย่างทั้งหมดมีจำนวนทั้งหมดของจุลินทรีย์ที่ใช้อากาศผ่านตามเกณฑ์มาตรฐานของตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย ส่วนการประเมินจำนวนทั้งหมดของยีสต์และราเส้นใย พบว่ามีตัวอย่างที่ไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน 1 ตัวอย่าง คือ BEN5 ซึ่งตัวอย่างดังกล่าวมีค่าจำนวนทั้งหมดของจุลินทรีย์ที่ใช้อากาศค่อนข้างสูงเช่นกัน ผลการทดลองดังแสดงใน Table 4

**Table 4** Microbial limit test of Benjakul formulations (n = 3). According to the specification of Thai Herbal Pharmacopoeia 2009[7] for non-sterile powder drug for internal use, total aerobic microbial count is not more than 2.0 x $10^5$ CFU/mL/g and total yeasts and molds count is not more than 2.0 x $10^4$ CFU/mL/g.

| Sample | Colony-forming unit (CFU/mL/g) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **Total aerobic microbial count** | **Result** | **Total yeasts and molds count** | **Result** |
| **BEN1** | Absence | Passed | Absence | Passed |
| **BEN2** | $1x10^2$ | Passed | Absence | Passed |
| **BEN3** | Absence | Passed | $1x10^2$ | Passed |
| **BEN4** | Absence | Passed | Absence | Passed |
| **BEN5** | $7x10^4$ | Passed | $8x10^4$ | Failed |
| **BEN6** | Absence | Passed | Absence | Passed |
| **BEN7** | Absence | Passed | Absence | Passed |
| **BEN8** | $6x10^4$ | Passed | $2x10^4$ | Passed |
| **BEN9** | Absence | Passed | Absence | Passed |
| **BEN10** | $8x10^4$ | Passed | $4x10^3$ | Passed |
| **BEN11** | $1x10^4$ | Passed | $4x10^3$ | Passed |

## วิจารณ์และสรุปผล

เนื่องจากตำรับยาเบญกูลยังไม่มีเกณฑ์มาตรฐานการควบคุมคุณภาพเฉพาะของตำรับ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการเปรียบเทียบระหว่างตำรับเบญจกูลที่เตรียมขึ้นเองและที่ซื้อจากท้องตลาดและผลิตและจำหน่ายในโรงพยาบาล/หน่วยงานรัฐ ในหัวข้อปริมาณเถ้ารวม ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรดความชื้น ปริมาณสารสกัด เอกลักษณ์ทางเคมี และปริมาณสารสำคัญ โดยสรุปผลเป็นค่าเฉลี่ยจากการศึกษา ส่วนการปนเปื้อนจากเชื้อจุลชีพใช้เกณฑ์มาตรฐานใน Thai Herbal Pharmacopoeia 2009 จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าตัวอย่าง BEN3 และ BEN5 เป็นตำรับที่มีปริมาณเถ้าสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐาน ซึ่งการตรวจสอบปริมาณเถ้า เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของยาสมุนไพรว่ามีการปนเปื้อนหรือปนปลอมสารอื่นๆ มาในตัวยาหรือไม่ ปริมาณเถ้ารวมที่สูงอาจแสดงถึงการใช้ปุ๋ยเคมีในการเพาะปลูก ส่วนปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรดที่สูง อาจเนื่องมาจากวัตถุดิบสมุนไพรในตำรับมีการปนเปื้อนของดิน ทราย ที่มาจากการเก็บเกี่ยวและการทำความสะอาดวัตถุดิบที่ไม่เหมาะสม[9] ตัวอย่างตำรับเบญจกูลหลายตัวอย่างมีปริมาณความชื้นค่อนข้างสูง อาจเนื่องมาจากสมุนไพรในตำรับมีน้ำมันหอมระเหยเป็นองค์ประกอบ เช่น ดอกดีปลี เหง้าขิง ซึ่งการหาความชื้นในการทดลองครั้งนี้ใช้เครื่อง moister analyzer ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าปริมาณความชื้นที่วัดได้จะรวมถึงปริมาณน้ำมันหอมระเหยในสารสกัดตำรับด้วย

นอกจากปริมาณเถ้าสูงกว่าเกณฑ์แล้ว ตัวอย่าง BEN5 ยังมีการปนเปื้อนของยีสต์และราเส้นใยเกินเกณฑ์มาตรฐาน ซึ่งตัวอย่างนี้เป็นตำรับเบญจกูลที่ผลิตโดยเอกชนที่ไม่มีการขึ้นทะเบียนยา และจำหน่ายผ่านเวปไซต์เป็นหลัก ตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของยีสต์และราเส้นใยสูงอีกตัวอย่างหนึ่งคือ BEN8 อาจเนื่องมาจากตัวอย่างนี้ จำหน่ายในรูปแบบผงยาบรรจุถุงซิปปิดผนึก ไม่ได้บรรจุแคปซูล จึงมีโอกาสสัมผัสความชื้นได้มากกว่า จึงเกิดการเจริญเติบโตของเชื้อจุลชีพได้ง่าย ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคที่ซื้อผลิตภัณฑ์นี้ไปบรรจุแคปซูลหรือทำเป็นยาลูกกลอนด้วยตนเอง

แม้ว่าผลการศึกษานี้จะไม่พบตัวอย่างที่มีจุลินทรีย์ที่ใช้อากาศสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐาน ในขณะที่ผลการศึกษาที่ผ่านมาหลายรายงานมักตรวจพบผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลชีพในผลิตภัณฑ์สมุนไพร แต่ก็มีความสอดคล้องกันในเรื่องปัญหาการปนเปื้อนยีสต์และราเส้นใยมากกว่าจุลินทรีย์ที่ใช้อากาศ[10, 11, 12] และการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่าตัวอย่างที่จัดซื้อจากท้องตลาดทั้งที่ผลิตโดยเอกชนและโรงพยาบาลหรือหน่วยงานของรัฐร้อยละ 60 ตรวจพบจุลินทรีย์ที่ใช้อากาศรวมถึงยีสต์และราเส้นใย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสมุนไพรในตำรับส่วนใหญ่เป็นพืชที่ใช้ส่วนราก เช่น รากช้าพลู

รากเจตมูลเพลิงแดง เหง้าขิง ซึ่งสมุนไพรส่วนรากมักมีโอกาสปนเปื้อนเชื้อราและ spore-forming bacteria ในดินได้มากกว่าส่วนอื่นๆ ของพืช[9] โดยเฉพาะตำรับที่ไม่มีการขึ้นทะเบียนตำรับมีแนวโน้มจะพบเชื้อทั้ง 2 ได้ในปริมาณสูง อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยไม่ได้มีการวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่อาจก่อโรคในยาแผนโบราณตามมาตรฐานที่ระบุใน Thai Herbal Pharmacopoeia 2009 ได้แก่ *Salmonella spp*., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Clostridium spp*. รวมถึงโลหะหนัก และปริมาณสารฆ่าศัตรูพืชและสัตว์ตกค้าง ซึ่งล้วนเป็นปัจจัยสำคัญในการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์จากสมุนไพร

ในการตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีโดยจัดทำลายพิมพ์นิ้วมือของสารสกัดด้วยเทคนิค TLC และ HPLC ของสารสกัดตำรับยาเบญจกูลเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน 6-gingerol, plumbagin, piperine และ 6-shogaol รวมถึงการหาปริมาณสารสำคัญ 6-gingerol, plumbagin และ piperine ด้วยเทคนิค HPLC ผลการศึกษาพบว่าเทคนิคการตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีโดยจัดทำลายพิมพ์นิ้วมือของสารสกัดสามารถใช้จำแนกตัวอย่างที่มีความแตกต่างกันออกจากกันได้ โดยตัวอย่าง BEN2 ให้ผลลายพิมพ์นิ้วมือจากทั้ง 2 เทคนิค แตกต่างจากตัวอย่างอื่นๆ และต่างจาก BEN1 ซึ่งเป็นตำรับยาเบญจกูลที่เตรียมขึ้นเอง แสดงให้เห็นว่าตัวอย่าง BEN2 อาจมีสมุนไพรหรือสารอื่นๆ ปนอยู่ในตำรับ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในตำรับพบว่าตัวอย่าง BEN2 เป็นพียงตัวอย่างเดียวที่ไม่สามารถตรวจพบสาร 6-gingerol และ plumbagin ซึ่งเป็นสารที่พบในเหง้าขิงและรากเตมูลเพลิงแดงตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าตัวอย่าง BEN2 อาจใช้วัตถุดิบที่ไม่มีคุณภาพหรือมีกระบวกการผลิตที่ไม่เป็นไปตามมาตรฐานทำให้เกิดการสลายตัวของสารดังกล่าว

ตำรับยาเบญจกูลที่จำหน่ายในประเทศไทยยังมีตัวอย่างที่มีความแตกต่างกันในข้อกำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์สมุนไพร ทั้งเรื่องปริมาณเถ้า ความชื้น ปริมาณสารสำคัญ ที่บ่งชี้ถึงวัตถุดิบหรือกระบวนการผลิตที่ไม่ได้มาตรฐาน การปนเปื้อนเชื้อจุลชีพ และอาจมีการปนปลอมสมุนไพรหรือสารอื่นๆ ในตำรับ ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์และผลการศึกษาที่ได้ จะนำไปสู่การพัฒนาจัดทำเป็นข้อกำหนดเพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพและมาตรฐานของตำรับยาเบญจกูล เพื่อเพิ่มความเชื่อมั่นในประสิทธิภาพและความปลอดภัยให้แก่ผู้บริโภคได้ต่อไปในอนาคต

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ปี 2558 และได้รับความอนุเคราะห์อุปกรณ์และเครื่องมือในการทำวิจัยจาก รศ.ดร.อรุณพร อิฐรัตน์ สาขาวิชาการแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

## เอกสารอ้างอิง

1. สำนักยา กระทรวงสาธารณสุข. บัญชียาจากสมุนไพร [Internet]. 2556 [เข้าถึงเมื่อ 2558 มีนาคม 8]. เข้าถึงได้จาก: http://drug.fda.moph.go.th:81/nlem.in.th/medicine/herbal/list
2. อรุณพร อิฐรัตน์, เพชรน้อย สิงห์ช่างชัย, ปราณี รัตนสุวรรณ. การศึกษาภูมิปัญญาหมอพื้นบ้านภาคใต้. รายงานโครงการวิจัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ 2542.
3. Rattarom R, Sakpakdeejaroen I, Itharat A. Cytotoxic effects of the ethanolic extract from Benjakul formula and its compounds on human lung cancer cells. Thai Journal of Pharmacology 2010;32:99-101.
4. Rattarom R, Sakpakdeejaroen I, Hansakul P, Itharat A. Cytotoxic activity against small cell lung cancer cell line and chromatographic fingerprinting of six isolated compounds from the ethanolic extract of Benjakul. J Med Assoc Thai 2014;97(Suppl 8):S70-5.
5. Ruangnoo S, Itharat A, Sakpakdeejaroen I, Rattarom R, Tappayutpijarn P, Pawa KK. *In vitro* cytotoxic activity of Benjakul herbal preparation and its active compounds against human lung, cervical and liver cancer cells**.** J Med Assoc Thai 2012;95(1):127-134.
6. Sakpakdeejaroen I, Itharat A. Cytotoxic compounds against breast adeno carcinoma cells (MCF-7) from Pikutbenjakul. J Health Res 2009;23(2):71-76.
7. Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. Thai herbal Pharmacopoeia. Vol. III. 1st ed. Bangkok: Office of National Buddishm Press; 2009.
8. Itharat A, Sakpakdeejaroen I. Determination of cytotoxic compounds of Thai traditional medicine called Benjakul using HPLC. J Med Assoc Thai 2010;93 (7):S198-S203.
9. นันทนา สิทธิชัย. มาตรฐานของสมุนไพรในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย. วารสารสมุนไพร 2547;11(1):21-32.
10. Paojinda P, Narknopmanee N. Determination of microbial contamination in herbal products [Internet]. 2003. [cited 2015 July 8]. Available from: http://www.

pharmacy.mahidol.ac.th/medplantdatab ase/ pdf/2003/20030066.pdf

11. สกุลรัตน์ รัตนาเกียรติ์. การศึกษาคุณภาพทางจุลชีววิทยาของยาจากสมุนไพรรูปแบบของแข็ง. การประชุมวิชาการ The 5th Annual Northeast Pharmacy Research Conference of 2013; 16 – 17 กุมภาพันธ์ 2556; คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม; 2556:128-132.
12. พิมลวรรณ โภคาพันธ์. การตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์สมุนไพรโดยวิธีมาตรฐานและวิธีพีซีอาร์. [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต]. ปทุมธานี: มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์; 2554.