

การแยกกรดไกลเซอไรซิคและกรดกอลลิคในสารสกัดยาธาตูปอบเชยด้วยวิธี รงคเลขผิวบาง-เดนสิโตเมทรี และการตรวจหาสารต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธีไบโอออโตกราฟี

สุรพงศ์ รัตนะ¹, บรรลือ สังข์ทอง², ปิไลธนา เลิศสถิตชนกร³

Received: 30 January 2017

Accepted: 23 March 2017

บทคัดย่อ

บทนำ ยาธาตูปอบเชย เป็นยาตำรับแพทย์แผนไทยที่ใช้ในการรักษาอาการท้องอืด ท้องเฟ้อ อาหารไม่ย่อย ในตำรับประกอบด้วยพืชสมุนไพร ห้าชนิด (กานพลู กระวาน ชะเอมเทศ สมุลแว้ง และอบเชยเทศ) และ ธาตุวัตถุ สองชนิด (การบูร และ เกล็ดสระแหน่) การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อพัฒนาระบบวิฤภาคเคลื่อนที่ของรงคเลขผิวบาง เพื่อตรวจหาสารสำคัญ 2 ชนิด คือ กรดไกลเซอไรซิค และ กรดกอลลิค พร้อมกันในระบบเดียวและตรวจหาสาร ต้านอนุมูลอิสระของตำรับยาธาตูปอบเชยด้วยวิธีไบโอออโตกราฟี (bioautography) วิธีดำเนินการวิจัย สกัด สมุนไพรเดี่ยวและสมุนไพรตำรับด้วยการต้ม 15 นาที กรองและกำจัดน้ำด้วยวิธีทำแห้งแบบเยือกแข็ง นำสารสกัด ที่ได้ไปหาสารสำคัญด้วยวิธีรงคเลขผิวบาง-เดนสิโตเมทรี โดยมีสารสำคัญ 2 ชนิด คือ กรดไกลเซอไรซิคและ กรดกอลลิค โดยใช้วิฤภาคเคลื่อนที่ 6 ระบบ และตรวจหาสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีไบโอออโตกราฟี ในสมุนไพรเดี่ยวและ สมุนไพรตำรับยาธาตูปอบเชย โดยวิธีรงคเลขผิวบาง-เดนสิโตเมทรี และฉีดพ่นด้วยสารละลายดีพีพีเอช ผลการวิจัย จากวิฤภาคเคลื่อนที่ทั้ง 6 ระบบ พบว่า ระบบที่ดีที่สุดคือ โทลูอีน : เอทิลอะซิเตต : เมทานอล : กรดฟอร์มิก ในอัตราส่วน 2.5:1:1 (% v/v) ให้ค่า Rf ของสารมาตรฐาน กรดไกลเซอไรซิคและ กรดกอลลิคเท่ากับ 0.18 และ 0.69 ตามลำดับ จากสเปกตรัมการดูดกลืนรังสียูวีที่ 200-400 นาโนเมตรของสปอตในสารสกัด พบว่า กรดกอลลิค มาจากกานพลู และ ไกลเซอไรซิค มาจากชะเอมเทศ กรดกอลลิคและสารต้านอนุมูลอิสระอื่นๆ ในตำรับที่อยู่บนแผ่นรงคเลขผิวบาง ถูกทดสอบด้วยสารละลายสเปย์ดีพีพีเอช **สรุปผลการวิจัย** การวิจัยครั้งนี้ การใช้วิธีรงคเลขผิวบางสามารถแยก สารสำคัญ 2 ชนิดพร้อมกันในวิฤภาคเคลื่อนที่ระบบเดียวกัน และตรวจหาสารด้วยวิธีเดนสิโตเมทรี ส่วนวิธีไบโอออโตกราฟี และฉีดพ่นด้วยสารละลายดีพีพีเอชสามารถใช้ในการตรวจหาสารต้านอนุมูลอิสระของตำรับยาธาตูปอบเชยได้

คำสำคัญ: รงคเลขผิวบาง, กรดไกลเซอไรซิค, กรดกอลลิค, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ยาธาตูปอบเชย

วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน 2560; 13 (ฉบับพิเศษ): 60-71

¹ ว.ท.ม., นักวิจัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อ.กันทรวิชัย จ.มหาสารคาม 44150

² Dr. rer. nat., ผู้ช่วยศาสตราจารย์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อ.กันทรวิชัย จ.มหาสารคาม 44150

³ Ph.D., ผู้ช่วยศาสตราจารย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา เขตธนบุรี กรุงเทพมหานคร 10600

* **ติดต่อผู้พิมพ์:** สุรพงศ์ รัตนะ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อ.กันทรวิชัย จ.มหาสารคาม 44150

e-mail: rattanasurapong@gmail.com

Simultaneous Separation of Glycyrrhizic Acid and Gallic Acid in Cinnamon Stomachic Mixture Extract by Thin Layer Chromatography-Densitometric Method and Screening of Anti-free Radical Substances by Bioautographic Method

Surapong Rattana¹, Bunleu Sungthong², Pilanthana Lertsatithanakorn³

Abstract

Introduction: Cinnamon stomachic mixture was a well-known remedy for treatment of flatulence and indigestion in Thai traditional medicine. The mixture were comprised of five herbs [*Syzygium aromaticum* (L.) Merr.&L.M.Perry, *Amomum kravanh* Pierre., *Glycyrrhiza glabra* Linn., *Cinnamomum bejolghota* (Buch.-Ham.) Sweet, and *Cinnamomum verum* J.Presl.] and two chemicals (menthol and camphor). The aims of this study were to develop TLC mobile phase system for simultaneous separation of 2 compounds (glycyrrhizic acid and gallic acid) and to screen anti-free radical substances by bioautographic method of cinnamon stomachic mixture extract and each herbs in the formulation. **Methods:** Each five herbs and formulation were boiled with water for 15 minutes, filtered through Buchner funnel with Whatman No.1 filter paper and followed by freeze-drying technique. All extracts were then analysed with TLC method. Six TLC mobile phase systems were investigated for simultaneous separation of glycyrrhizic acid and gallic acid. Bioautography was performed using 1,1 diphenyl 2-picrylhydrazil (DPPH) spraying reagent for anti-free radical substances screening of the spot on TLC. **Results:** The best mobile system of TLC analysis was toluene : ethyl acetate : methanol : formic acid (2:5:1:1, %v/v). This system showed R_f values of glycyrrhizic acid and gallic acid at 0.18 and 0.69, respectively. The UV absorption spectra at 200-400 nm of the corresponding spot in the extract confirmed that gallic acid in the mixture was derived from *Syzygium aromaticum* and glycyrrhizic acid was derived from *Glycyrrhiza glabra*. Gallic acid and other anti-free radical substances were tested with DPPH spraying reagents. **Conclusion:** In this research, two active ingredients were separated in the same mobile phase system and were detected with densitometry. Bioautography with DPPH spraying reagent could also be used for scanning anti-free radical substances of cinnamon stomachic mixture.

Keywords: Thin layer chromatography, glycyrrhizic acid, gallic acid, anti-free radical activity, cinnamon stomachic mixture

IJPS 2017; 13 (Supplement): 60-71

¹ M.Sc., Researcher, Faculty of Pharmacy, Mahasarakham University, Kantharawichai, Maha Sarakham 44150

² Dr. rer. nat., Assist. Prof., Faculty of Pharmacy, Mahasarakham University, Kantharawichai, Maha Sarakham 44150

³ Ph.D., Assist. Prof., Faculty of Science and Technology, Bansomdejchaopraya Rajabhat University, Thonburi, Bangkok 10600

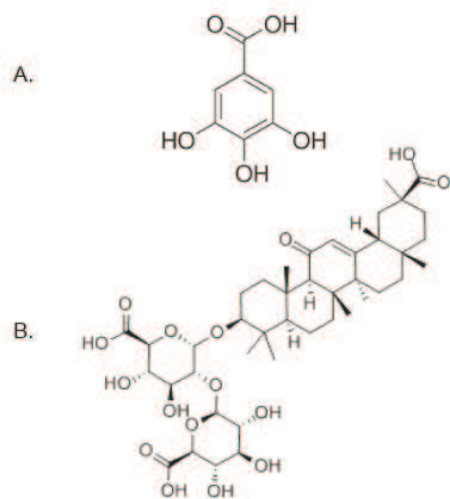
* **Corresponding author:** Surapong Rattana, Faculty of Pharmacy, Mahasarakham University, Kantharawichai, Maha Sarakham 44150 Thailand, e-mail: rattanasurapong@gmail.com

บทนำ

ตำรับยาธาตุบขะ เป็นตำรับยาแผนโบราณที่ถูกบรรจุไว้ในบัญชียาหลักแห่งชาติตั้งแต่ปี 2554 ปัจจุบันคณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติได้ประกาศบัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2556 ซึ่งเป็นฉบับล่าสุด และตำรับยาธาตุบขะยังคงปรากฏอยู่ในภาคผนวก 4 ซึ่งเป็นบัญชียาจากสมุนไพรอันเป็นส่วนหนึ่งของบัญชียาหลักแห่งชาติฉบับดังกล่าว ทั้งนี้ยาธาตุบขะเป็นยาแผนโบราณซึ่งจัดเป็นยารักษากลุ่มอาการทางระบบทางเดินอาหาร มีสรรพคุณขับลม บรรเทาอาการท้องอืด ท้องเฟ้อ รูปแบบตำรับอยู่ในรูปยาน้ำ ในยาน้ำ 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วยตัวยาสุมไพโร 5 ชนิด ได้แก่ เปลือกอบเชยเทศ เปลือกสมุลแว้ง ลูกกระวาน ดอกกานพลู และรากชะเอมเทศ ชนิดละ 800 มิลลิกรัม และสารแต่งกลิ่นรสได้แก่เกล็ดสะระแหน่และการบูร ชนิดละ 50 มิลลิกรัม การเตรียมตำรับยาธาตุบขะทำได้โดยนำตัวยาสุมไพโรทุกชนิดตม่น้ำประมาณ 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิตกลงก่อนเติมเกล็ดสะระแหน่ และการบูร ขนาดของยาธาตุบขะที่แนะนำให้รับประทานคือครั้งละ 15 - 30 มิลลิลิตร วันละ 3 ครั้ง หลังอาหาร พบรายงานการศึกษาวิจัยทางคลินิกเกี่ยวกับยาธาตุบขะโดยคณะวิจัยซึ่งประกอบด้วย แพทย์ เภสัชกร พยาบาลวิชาชีพ เจ้าพนักงานสาธารณสุขชุมชน เจ้าพนักงานเภสัชกรรม และแพทย์แผนไทยประยุกต์ในโรงพยาบาล 6 แห่ง รวมทั้งคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาลและกรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก ซึ่งได้ร่วมกันทำวิจัยเรื่องประสิทธิผลและความปลอดภัยของยาธาตุบขะในการรักษาภาวะอาหารไม่ย่อยที่ไม่ทราบสาเหตุ (Functional dyspepsia) ผลการวิจัยพบว่า การให้คนไข้รับประทานยาธาตุบขะติดต่อกันนาน 14 วัน มีประสิทธิผลและความปลอดภัยในการรักษาผู้ป่วย functional dyspepsia ไม่แตกต่างจาก

การรักษาด้วย simethicone ซึ่งเป็นยาแผนปัจจุบัน แต่เมื่อคิดต้นทุนค่ารักษาแล้วพบว่าค่ารักษาด้วยยาธาตุบขะมีราคาถูกกว่าการรักษาด้วย simethicone เกือบ 3 เท่า (Kristasilp et al., 2006)

จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าสารสกัดของเปลือกอบเชยเทศ เปลือกสมุลแว้ง ลูกกระวาน ดอกกานพลู และรากชะเอมเทศ ซึ่งเป็นตัวยาคัญในตำรับยาธาตุบขะ ถึงแม้จะมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชยเทศ เปลือกสมุลแว้ง และดอกกานพลู แต่สารพฤกษเคมีในน้ำมันหอมระเหยส่วนใหญ่เป็นสารประกอบกลุ่มเทอร์ปีนอยด์ (Veerapan et al., 2011; Lertsatitthanakorn et al., 2014; Wannissom et al., 2005)



รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของ A. gallic acid และ B. glycyrrhizic acid

อนึ่ง จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าสารบ่งชี้ (Marker) หรือสารสำคัญที่พบมากในตัวยาสุมุนไพร์ที่เป็นส่วนประกอบของตำรับยาธาตูปอบเชยนี้ล้วนเป็นสารประกอบกลุ่มฟีนอลิก ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกมีฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระและปรับภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Jang et al., 2007; Lin and Tang, 2007) คณะผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาพัฒนาระบบ TLC เพื่อตรวจหาสารสำคัญที่เป็นสารกลุ่มฟีนอลิก 2 ชนิด คือ glycyrrhizic acid และ gallic acid (ภาพที่ 1) พร้อมกันในระบบเดียว เนื่องจากสารทั้งสองชนิดนี้มีรายงานการตรวจวัดด้วยวิธีรังสีเอกซ์ฟลูออโรกราฟี (Khera et. al., 2011; Pathak et al., 2004) และตรวจหาสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีไบโอออโตกราฟี ของตำรับยาธาตูปอบเชย การหาสารต้านอนุมูลอิสระเพื่อเป็นพื้นฐานในการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อไป และเพื่อเพิ่มข้อมูลทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบของตำรับยาธาตูปอบเชย เพิ่มความมั่นใจในการใช้ยาธาตูปอบเชยในผู้ป่วยได้มากขึ้น

วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมี

สารละลายและสารมาตรฐานที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นสารเคมี AR grade, เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง ยี่ห้อ Scanvac บริษัท Labogene (Lyngø, Denmark), ชุดเครื่อง TLC-Densitometer บริษัท Camag (Muttentz, Switzerland) ประกอบด้วยเครื่องสปอตสาร รุ่น Linomat5, เครื่องถ่ายภาพแผ่น

TLC รุ่น Reprostar3, เครื่องเดินซีโอดีเตอร์ รุ่น TLC Scanner3, ควบคุมด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป winCATS version 1.4.2.8121 บริษัท Camag (Muttentz, Switzerland)

การสกัดสาร

สกัดสุมุนไพร์เดี่ยวและสุมุนไพร์ตำรับด้วยการต้มเดือดด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 15 นาที กรองด้วยเครื่องกรองบูชเนอร์ ใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และกำจัดน้ำด้วยวิธีทำแห้งแบบเยือกแข็ง

การหาสารสำคัญโดยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) Densitometry

นำสารสกัดที่ได้ไปหาลักษณะทางเคมีด้วยวิธีรังสีเอกซ์ฟลูออโรกราฟี โดยมีสารบ่งชี้ (marker) 2 ชนิด คือ glycyrrhizic acid และ gallic acid โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ 6 ระบบ ดังแสดงใน ตารางที่ 1 โดยใช้ แผ่น TLC GF254 บริษัท Merck (Darmstadt, Germany) ขนาด 10 x 10 เซนติเมตร สปอตสารที่ต้องการวัด 8 แทรค (ขนาด syringe 100 ไมโครลิตร ขนาดความยาวแทรคของสารตัวอย่างแต่ละแทรค 6 มิลลิเมตร ระยะห่างระหว่างแทรค 11.4 มิลลิเมตร ระยะห่างจากขอบ ด้าน x และ y กำหนดเป็น 10 มิลลิเมตร) ดังนี้ แทรค ที่ 1 และ 2 เป็น สารมาตรฐาน glycyrrhizic acid และ gallic acid (ตามลำดับ) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แทรค ที่ 3 สารสกัดตำรับยาธาตูปอบเชย ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แทรค ที่ 4-8 สุมุนไพร์เดี่ยว ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เรียงลำดับคือ กานพลู กระวาน ชะเอมเทศ สมุลแว้ง และ ออบเชยเทศ ทุกแทรค ใช้ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อแทรค แล้วนำไปแยกด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ จากตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ระบบวิภูภาคเคลื่อนที่ที่ใช้ในการทดลอง

ระบบที่	สารเคมีและอัตราส่วน (% v/v)	ที่มา
1.	toluene : ethyl acetate, 9:3	Patra <i>et. al.</i> , 2009
2.	toluene : ethyl acetate : formic acid, 5:3.5:1	Mena <i>et. al.</i> , 2010
3.	ethyl acetate : toluene : acetone, 4.5:4:1	Jain <i>et. al.</i> , 2011
4.	toluene : ethyl acetate : methanol : formic acid, 2:5:1:1	Adapted from Soonthornchareonnonne <i>et. al.</i> , 2008
5.	butanol : glacial acetic acid : water, 7:1:2	Khera <i>et. al.</i> , 2011
6.	ethanol : glacial acetic acid : toluene, 5.5:1:1.5	Mali <i>et. al.</i> , 2011

ตารางที่ 2 ชื่อพืช ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อวงศ์ และร้อยละการได้มาของสารสกัด

ชื่อไทย	ชื่อวิทยาศาสตร์	วงศ์	% yields
กานพลู	<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & L.M.Perry.	Myrtaceae	2.26 ± 0.13 ^{b*}
กระวาน	<i>Amomum krevanh</i> Pierre.	Zingiberaceae	1.87 ± 0.14 ^b
ชะเอมเทศ	<i>Glycyrrhiza glabra</i> Linn.	Fabaceae	10.17 ± 0.18 ^a
สมุลแว้ง	<i>Cinnamomum bejolghota</i> (Buch-Ham.) Sweet	Lauraceae	2.57 ± 0.12 ^b
อบเชยเทศ	<i>Cinnamomum verum</i> J.Presl.	Lauraceae	3.05 ± 0.11 ^b
ตำรับยา	-	-	12.78 ± 0.23 ^a

* a, b ที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ $p < 0.05$

ตารางที่ 3 ค่า Rf สารมาตรฐานทั้งสองชนิด โดยใช้ระบบวิภูภาคเคลื่อนที่ระบบต่างๆ

ระบบที่	Rf ของ gallic acid ตรวจวัดที่ 254 nm	Rf ของ glycyrrhizic acid ตรวจวัดที่ 254 nm
1.	0.05	Starting point
2.	0.29	Starting point
3.	0.45	0.07
4.	0.69	0.18
5.	0.73	0.16
6.	0.84	0.41

จากนั้น ตรวจวัด แผ่น TLC ที่ได้ ที่ความยาวคลื่น 254 nm, 366 nm และ ที่ visible light ทำการสแกน เดนสิโตแกรม ด้วยเครื่องเดนสิโตมิเตอร์ และ ทำการสแกนสเปกตรัมการดูดกลืนคลื่นยูวี ช่วงความยาวคลื่น 200 – 400 nm ในแต่ละสเปกตรัมที่มีค่า Rf ตรงกับสารมาตรฐาน ทั้งในสมุนไพรเดี่ยวและใน

ตำรับ หากมีลักษณะสเปกตรัมที่เหมือนกัน แสดงว่าเป็นสารชนิดเดียวกัน

การแยกสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธีไบโอออโตกราฟี

ในสารสกัดสมุนไพรเดี่ยวและสมุนไพรตำรับยาธาตุออบเชย โดยวิธีรังเคลซมิวบาง โดยใช้ระบบวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ดีที่สุด 1 ระบบ จากตารางที่ 1 และฉีดพ่นด้วยสารละลาย 1,1 diphenyl 2-picrylhydrazil (DPPH) โดยสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ คือ สารที่สามารถเปลี่ยนสีม่วงเป็นสีเหลืองได้ หลังจากการฉีดพ่นสเปรย์แล้ว

การทดสอบทางสถิติ

ทดสอบค่าความแตกต่างของร้อยละการได้มาของสารสกัดสมุนไพรเดี่ยวและสมุนไพรตำรับยาธาตุออบเชย โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวิธี ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากนั้นเปรียบเทียบความแตกต่างรายคู่โดย Duncan multiple range test

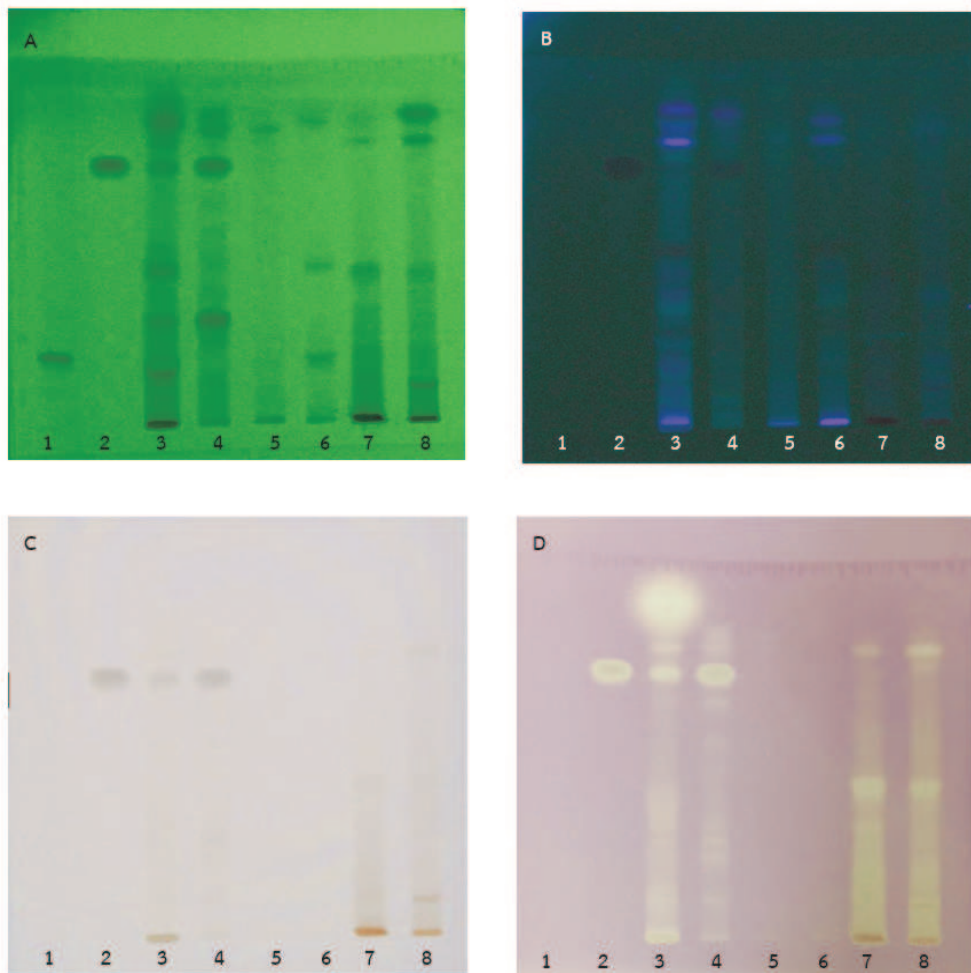
ผลการวิจัย

จากการศึกษาการสกัดสารโดยการต้มเดือดด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายที่ได้ไปกำจัดน้ำด้วยเครื่อง Freeze-dryer คำนวณหาร้อยละผลิตภัณฑ์ของสารสกัด ดังแสดงผล ในตารางที่ 2

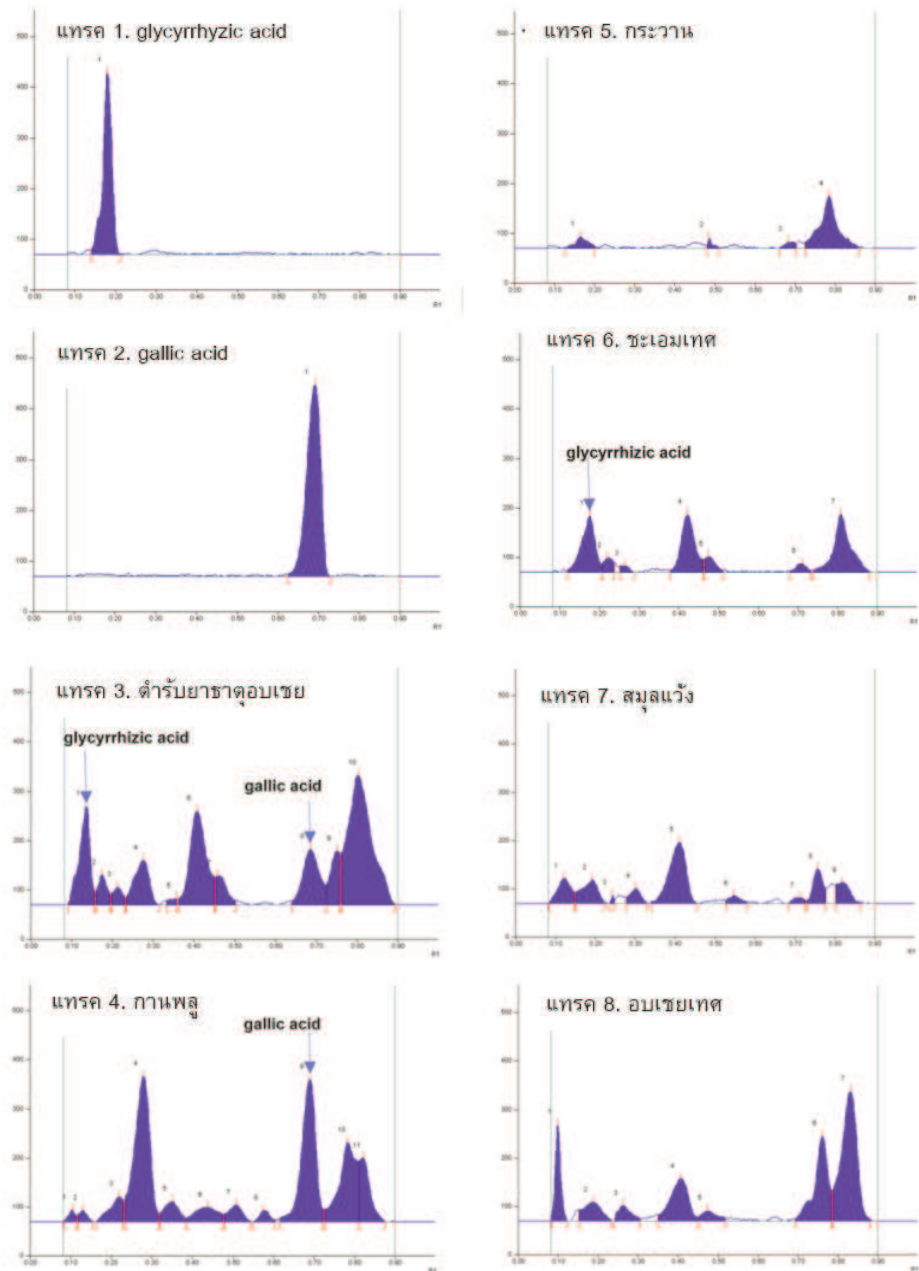
ผลการศึกษาการแยกสาร ด้วย TLC ด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ 6 ระบบ

จากการทำ TLC ด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ทั้ง 6 ระบบ ดังแสดงในตารางที่ 3 พบว่า วัฏภาคเคลื่อนที่ที่ให้ผลการแยกดีที่สุดคือ toluene : ethyl acetate : methanol : formic acid (2:5:1:1, %v/v) มี Rf ของ

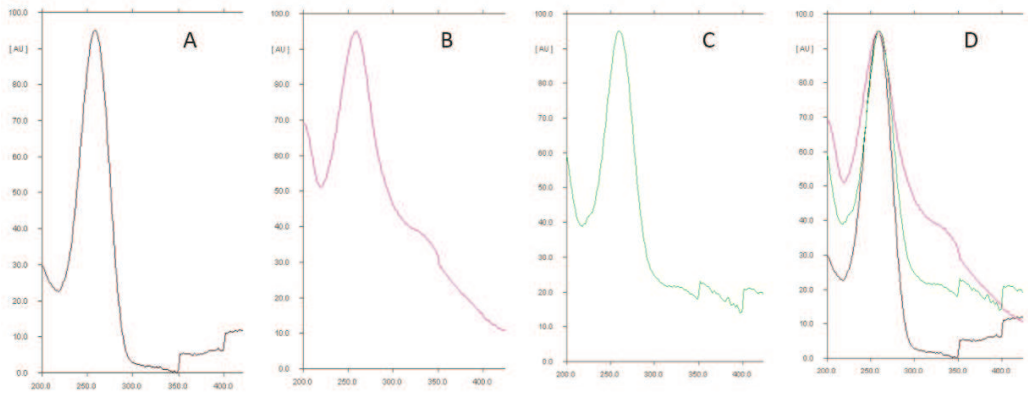
สารมาตรฐาน glycyrrhizic acid และ gallic acid เท่ากับ 0.18 และ 0.69 ตามลำดับ เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานคือ glycyrrhizic acid และ gallic acid และตรวจวัดที่ 254 nm, 366 nm และ ที่ visible light (ดังแสดงในภาพที่ 2A, 2B และ 2C) และเมื่อวิเคราะห์ลักษณะกราฟของเดนสิโตแกรม โดยใช้ความยาวคลื่น 254 nm (ภาพที่ 2A) ในการสแกน ได้ผลดังแสดงใน ภาพที่ 3 พบว่า มีพีคของสารตัวอย่าง ในตำรับและในสารสกัดสมุนไพรเดี่ยวตรงกับสารมาตรฐาน ดังนี้ glycyrrhizic acid ให้ค่า Rf ที่ 0.18 (ภาพที่ 3 แทรค 1) ในตำรับ มีสารที่ให้ค่า Rf ที่ 0.18 (ภาพที่ 3 แทรค 3) ในชะเอมเทศ มีสารที่ให้ค่า Rf ที่ 0.18 (ภาพที่ 3 แทรค 6) เมื่อทำการตรวจสอบลักษณะสเปกตรัมการดูดกลืนคลื่นยูวีที่ความยาวคลื่น 200 - 400 nm พบว่า glycyrrhizic acid (ภาพที่ 4A) สารที่ให้ค่า Rf ที่ 0.18 ในตำรับ (ภาพที่ 4B) และ สารที่ให้ค่า Rf ที่ 0.18 ในชะเอมเทศ (ภาพที่ 4C) ให้ลักษณะสเปกตรัมที่เหมือนกัน ดังแสดงใน ภาพที่ 4D ส่วน gallic acid ให้ค่า Rf ที่ 0.69 (ภาพที่ 3 แทรค 2) ในตำรับ มีสารที่ให้ค่า Rf ที่ 0.69 (ภาพที่ 3 แทรค 3) ในกานพลู มีสารที่ให้ค่า Rf ที่ 0.69 (ภาพที่ 3 แทรค 4) เมื่อทำการตรวจสอบลักษณะสเปกตรัมการดูดกลืนคลื่นยูวีที่ความยาวคลื่น 200 - 400 nm พบว่า gallic acid (ภาพที่ 5A) สารที่ให้ค่า Rf ที่ 0.69 ในตำรับ (ภาพที่ 5B) และ สารที่ให้ค่า Rf ที่ 0.69 ในกานพลู (ภาพที่ 5C) ให้ลักษณะสเปกตรัมที่เหมือนกัน (ภาพที่ 5D)



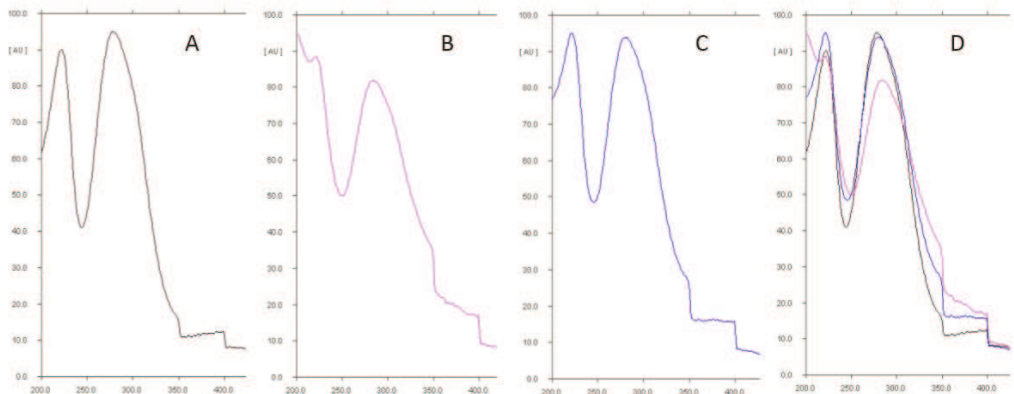
รูปที่ 2 ผล TLC สารในแต่ละแตรค: 1. glycyrrhizic acid 2. gallic acid 3. ตำรับยาธาตุดอบเชย 4. กานพลู 5. กระวาน 6. ชะเอมเทศ 7. สมุลแว้ง 8. อบเชยเทศ, Mobile phase = toluene : ethyl acetate : MeOH : formic acid (2:5:1:1, %v/v) ตรวจสอบที่ 254 nm (A.), 366 nm (B.), visible light (C.) และ DPPH spraying reagent (D.), ตามลำดับ



รูปที่ 3 เตนซิโตแกรมของสารมาตรฐาน ตำรับยาธาตุอุบเชย และ สมุนไพรเดี่ยว ที่ตรวจวัดที่ 254 nm จากภาพที่ 1 A. สารในแต่ละแก๊รด คือ 1. glycyrrhizic acid 2. gallic acid 3. ตำรับยาธาตุอุบเชย 4. กานพลู 5. กระวาน 6. ชะเอมเทศ 7. สมุลแว้ง 8. อบเชยเทศ



รูปที่ 4 ผลการสแกนสเปกตรัมการดูดกลืนรังสียูวีที่ความยาวคลื่น 200 – 400 nm ของ สารมาตรฐาน glycyrrhizic acid พิกัดที่ Rf 0.18 (A), พิกัดที่ Rf 0.18 ในตำรับยาธาตูปอบเซ(B), พิกัดที่ Rf 0.18 ในชะเอมเทศ(C) และ เปรียบเทียบทั้งหมดตามลำดับ(D)



รูปที่ 5 ผลการสแกนสเปกตรัมที่ 200 – 400 nm ของ สารมาตรฐาน gallic acid พิกัดที่ Rf 0.69 (A), พิกัดที่ Rf 0.69 ในตำรับยาธาตูปอบเซ(B) พิกัดที่ Rf 0.69 ในกานพลู(C) และ เปรียบเทียบทั้งหมดตามลำดับ(D)

ผลการศึกษาการแยกสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตำรับยาธาตุออบเชย

การแยกสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยการฉีดพ่นสารละลาย DPPH บนแผ่น TLC พบว่า gallic acid ที่พบในตำรับ ให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระดังแสดงในภาพที่ 2D โดยสมุนไพรมีให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH คือ กานพลู สมุลแว้ง และ อบเชยเทศ ส่วนกระวานและ ชะเอมเทศให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยในวิธีนี้ เนื่องจากไม่มีการเปลี่ยนสีม่วงให้เป็นสีเหลืองได้ ดังแสดงใน ภาพที่ 2D แทรค ที่ 5 และ 6

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากผลการศึกษาระบบวิภูภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมในการทดลองครั้งนี้ พบว่า ระบบที่ 1 2 และ 3 ให้ค่า Rf ที่ไม่เหมาะสมต่อการตรวจวิเคราะห์ กล่าวคือ glycyrrhizic acid อยู่ที่ starting point หรือ มีตำแหน่งสารสูงจาก starting point เพียงเล็กน้อยเท่านั้น มีการบิบบัดกับสารอื่นที่ใกล้เคียงกันมากไป จึงไม่เหมาะสม ส่วนระบบที่ 6 สามารถตรวจวัดได้ชัดเจน ทั้งสองสาร แต่เมื่อวิเคราะห์พร้อมสารตัวอย่างพบว่า พิกที่มี Rf สูงกว่า gallic acid มีการบิบบัดมากเกินไป และรบกวน พิก gallic acid จึงไม่เหมาะสม หากจะมีการศึกษา สารที่ Rf สูงกว่า gallic acid ระบบที่ 5 สามารถตรวจวัดสารมาตรฐานทั้งสองชนิดได้พร้อมและมีค่า Rf ใกล้เคียงกับ ระบบที่ 4 แต่ระบบที่ 5 มีความคมชัดของสารน้อยกว่า ดังนั้นระบบที่ 4 จึงเป็นรูปแบบที่เหมาะสมที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

จากการศึกษา ด้วยวิภูภาคเคลื่อนที่ toluene : ethyl acetate : methanol : formic acid (2:5:1:1, %v/v) พบว่า มี Rf ของสารมาตรฐาน glycyrrhizic acid และ gallic acid เท่ากับ 0.18 และ 0.69 ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์สารสกัดสมุนไพรวัดเดี่ยวและตำรับยาธาตุออบเชย แสดงในรูปที่ 2A, 2B

และ 2C จะเห็นว่า ในตำรับยาธาตุออบเชย พบทั้งสาร glycyrrhizic acid และ gallic acid ส่วนสมุนไพรวัดเดี่ยว ในกานพลูพบว่ามี gallic acid สอดคล้องกับการศึกษาของ Pathak et al., (2004) ที่พบว่า กานพลูมีสารประกอบฟีนอลิกจำนวนมากรวมทั้ง gallic acid ด้วย ส่วน ในชะเอมเทศพบว่ามี glycyrrhizic acid ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Singh et. al. (2009) ที่พบว่าสารสกัดชะเอมเทศมีสารชนิดนี้เป็นองค์ประกอบหลัก

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีไบโอออโตกราฟี (bioautography) ด้วยวิธี TLC ใช้วิภูภาคเคลื่อนที่ toluene : ethyl acetate : methanol : formic acid (2:5:1:1, %v/v) และฉีดพ่นด้วย DPPH spray reagent (ดังแสดงในรูปที่ 1D) พบว่า ตำรับยาธาตุออบเชยต้านอนุมูลอิสระได้เป็นอย่างดี เปลี่ยนสีม่วงของ DPPH radical เป็นสีเหลือง ของ DPPH ที่เป็น stable form ได้ ดังแสดงใน ภาพที่ 2 D แทรค 3 มีบริเวณที่เป็นสีเหลืองจำนวนมาก โดยมี gallic acid เป็นสารที่ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ชนิดหนึ่งในตำรับ ดังจะเห็นจาก ภาพที่ 2 D แทรค 3 ตำแหน่งของ gallic acid ที่ Rf 0.69 มีจุดสีเหลืองเกิดขึ้น ส่วนในกานพลู ภาพที่ 2 D แทรค 4 ตำแหน่งของ gallic acid ที่ Rf 0.69 มีจุดสีเหลืองเกิดขึ้น แสดงว่า gallic acid มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดกานพลู สอดคล้องกับ การศึกษาของ Abd El Azim et. al.,(2014) นอกจากนี้ยังพบว่า สมุลแว้ง และ อบเชยเทศตรวจพบสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ จำนวนมาก ดังจะเห็นได้จาก ภาพที่ 2 D แทรคที่ 7 และ 8 พบสารที่ให้บริเวณสีเหลืองจำนวนมาก เนื่องจากพืชสกุล Cinnamomum มีสารประกอบฟีนอลิกจำนวนมาก (Klejduš et. al., 2016) ซึ่งการมีสารฟีนอลิกปริมาณมากทำให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากตามไปด้วย (Rattana et. al., 2015) แต่ในกระวานและชะเอมเทศการตรวจวัดการต้านอนุมูลอิสระมีน้อย เนื่องจากไม่มีการเปลี่ยนสีม่วงให้เป็นสีเหลืองได้ ดัง

แสดงใน ภาพที่ 2 D track ที่ 5 และ 6

การศึกษาสารสกัดยาธาตุอบเชยในครั้งนี้ สารสกัดสมุนไพรที่เป็นแหล่งสารต้านอนุมูลอิสระใน ตำรับคือ กานพลู สมุลแว้งและ อบเชยเทศ ส่วน สารสำคัญที่ให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH คือ gallic acid (Yen et. al., 2002) เพราะเปลี่ยนสีม่วงของ DPPH radical เป็นสีเหลือง ของ DPPH ที่มีความ เสถียรได้ และตำแหน่ง Rf ของจุดสีเหลืองหลังสเปรย์ DPPH ตรงกับตำแหน่ง ของสารมาตรฐาน gallic acid

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าวิธี TLC- densitometry ที่พัฒนาขึ้น สามารถใช้ในการตรวจ วิเคราะห์สารสำคัญและแยกสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูล อิสระในตำรับยาธาตุอบเชยได้ หากต้องการตรวจ วิเคราะห์ glycyrrhizic acid และ gallic acid เพื่อใช้ในการ ควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์อื่น ๆ หรือ วิเคราะห์แบบ semi-quantitative analysis จะต้อง ทำการศึกษาต่อไป

สรุปการใช้เทคนิค TLC โดยใช้วัฏภาค เคลื่อนที่ คือ (toluene / ethyl acetate / methanol / formic acid, 2 : 5 : 1 : 1, v/v) สามารถวิเคราะห์ สารสำคัญที่เป็นสารบ่งชี้ได้ 2 ชนิดคือ glycyrrhizic acid และ gallic acid พร้อมกันได้ในระบบเดี่ยว และ ใช้ตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตำรับยาธาตุ อบเชยได้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ “ทุนอุดหนุนการวิจัย จากงบประมาณแผ่นดิน ปี 2559 มหาวิทยาลัยราชภัฏ บ้านสมเด็จเจ้าพระยาที่ผ่านการพิจารณาจาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)”

References

Abd El Azim MHM, El-Mesallamy AMD, El- Gerby M, Awad A. Anti-Tumor, Antioxidant and Antimicrobial and The

Phenolic Constituents of Clove Flower Buds (*Syzygium aromaticum*). *J Microb Biochem Technol* 2014; S8:007. doi:10.4172/1948-5948.S8-007

Jain V, Vyas A, Saraf S. TLC Densitometric Methods for Quantification of Gallic Acid in Triphala Churna for Routine Quality Control. *Res J Pharm Tech* 2011; 4: 230-233.

Jang HD, Chang KS, Huang YS, Hsu CL, Lee S-H, Su MS. Principal Phenolic Phytochemicals and Antioxidant Activities of Three Chinese Medicinal Plants. *Food Chem* 2007; 103: 749-756.

Khera D, Kohli K, Parmar N. Development and Validation of Stability-indicating HPTLC Method for Determination of Glycyrrhizic Acid in Bulk Drug and Pharmaceutical Formulations. *J Liq Chromatogr R T* 2011; 34(15): 1502-1517.

Klejduš B, Kovacik J. Quantification of Phenols in Cinnamon: A Special Focus on “Total Phenols” and Phenolic Acids Including DESI-Orbitrap MS Detection. *Ind Crops Prod* 2016; 83: 774–780.

Kristasilp K, Tuntiprawan K, Wanleepong K. et. al., The Effectiveness and Safety of The Cinnamon Stomachic Mixture Formulation in Functional Dyspepsia's Patient Treatment. *Siriraj Medical Journal* 2006; 58(11): 1103–1106.

Lertsatitthanakorn P, Manwiwattanakun K, Paengnakorn N, Khunkitti W.

- Antibacterial Activity of an Effective Essential Oil Formulated in Liquid Soap Against Skin Bacteria. *Chiang Mai J. Sci.* 2014; 41(1): 71-83.
- Lin JY, Tang CY. Determination of Total Phenolic and Flavonoid Contents in Selected Fruits and Vegetables, As Well As Their Stimulatory Effects on Mouse Splenocyte Proliferation. *Food Chem* 2007; 101: 140-147.
- Mali DS, Kondawar MS, Kamble KG. Quantitative Estimation of Gallic Acid and Ascorbic Acid in a Marketed Herbal Medicine: Triphala Churna by High Performance Thin Layer Chromatography. *Int J Pharm Tech Res* 2011; 3: 1593-1599.
- Meena AK, Rao MM, Panda P. *et al.* Standardisation of Ayurvedic Polyherbal Formulation, Pancasama Chuma. *Int J Pharmacog Phytochem Res* 2010; 2: 11-14.
- Pathak SB, Niranjana K, Padh H, Rajani M. TLC Densitometric Method for The Quantification of Eugenol and Gallic Acid in Clove. *Chromatographia* 2004; 60: 241-244.
- Patra KCH, Suresh P. Standardization of Polyherbal Siddha Formulation, Amukkara Choornam. *Ind J Traditional Knowledge* 2009; 8: 449-452.
- Rattana S, Sungthong B. Antioxidant Activities and Total Phenolic Contents of Methanolic Extract of Five Fragrant Flowers. *The 12th Mahasarakham University Research Conference* 2016: 359-365.
- Singh B, Mungara P, Nivsarkar M, Anandjiwala S. HPTLC Densitometric Quantification of Glycyrrhizin, Glycyrrhetic Acid, Apigenin, Kaempferol and Quercetin from *Glycyrrhiza glabra*. *Chromatographia* 2009; 70: 1665-1672.
- Soonthornchareonnon N., Sothanapanand U, Wongsinkhongman P. *TLC: A simple method for qualitative analysis of Thai crude drugs. Thai traditional medicine institution.* Department for development of Thai Traditional and alternative medicine. Ministry of Public Health. Thailand; 2008. 202-204.
- Veerapan P, Khunkitti W. *In Vitro* Antioxidant Activities of Essential Oils. *IJPS* 2011; 7(3): 30-38.
- Wannissorn B, Jarikasem S, Siriwangchai T, Thubthimthed S. Antibacterial Properties of Essential Oils from Thai Medicinal Plants. *Fitoterapia* 2005; 76: 233-236.
- Yen GC, Duh PD, Tsai HL. Antioxidant and Prooxidant Properties of Ascorbic Acid and Gallic Acid. *Food Chem* 2002; 79: 307-313.