

การวิเคราะห์ปริมาณ Eurycomanone ในรากปลาไหลเผือก ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

จิรานุช มิ่งเมือง^{*,†}, วิไลลักษณ์ ชื่นนางสี^{*}, อภิรักษ์ ตักดีเพชร^{*}, สมจิตร เนียมสกุล^{*},
ศักดิ์วิชัย อ่อนทอง^{*}, ณัฐตรา จันทรสวานิชย์^{*}

^{*}สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ ถนนพหลโยธิน 11000

[†]ผู้รับผิดชอบบทความ: jiranuch.m@dmsc.mail.go.th

บทคัดย่อ

Eurycomanone เป็นสารกลุ่ม quassinoids พบได้ในสมุนไพรรากปลาไหลเผือก (*Eurycoma longifolia* Jack วงศ์ Simaroubaceae) มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ลดไข้ รักษามาลาเรีย กระตุ้นความรู้สึกทางเพศของหนูตัวผู้ ซึ่งในประเทศไทยยังไม่มีวิธีควบคุมปริมาณสาร eurycomanone ในสมุนไพรชนิดนี้ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ eurycomanone ในรากปลาไหลเผือกด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ซึ่งสามารถสรุปวิธีวิเคราะห์โดยสกัดตัวอย่างรากปลาไหลเผือก 2 กรัม โดยการ reflux ด้วย methanol ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองและนำสารสกัดที่ได้มาระเหยจนแห้ง จากนั้นละลายกลับและปรับปริมาตรด้วย 50% methanol จนครบ 10 มิลลิลิตร นำสารละลายดังกล่าว ปริมาตร 20 ไมโครลิตร มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Atlantis® T3, C18, 4.6 × 150 มิลลิเมตร, 3 ไมโครเมตร และใช้ solvent A คือน้ำกลั่น และ solvent B คือ acetonitrile ต่อ methanol อัตราส่วน 1:1 เป็น mobile phase อัตราการไหล 1.5 มิลลิลิตร/นาที และตรวจวัดด้วย PDA ที่ความยาวคลื่น 243 นาโนเมตร ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ดังกล่าว พบว่า calibration curve มีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.06-0.36 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีค่า coefficient (R^2) เท่ากับ 0.9995 ค่า % recovery อยู่ในช่วง 96-105% ค่า HORRAT เท่ากับ 1.66-1.96 ค่า LOD และ LOQ มีค่าเท่ากับ 0.0106 และ 0.0354 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความเหมาะสม และสามารถนำไปใช้เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์ปริมาณ eurycomanone ในรากปลาไหลเผือก และสามารถนำไปสู่การกำหนดเกณฑ์ปริมาณสารสำคัญในรากปลาไหลเผือกต่อไป

คำสำคัญ: ปลาไหลเผือก, eurycomanone, การวิเคราะห์ปริมาณ, การพัฒนาวิธีวิเคราะห์

Quantitative Analysis of Eurycomanone in *Eurycoma longifolia* Jack (Root) by High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Jiranuch Mingmuang^{*,†}, Vilailak Chuennang-chee^{*}, Apirak Sakpetch^{*},

Somchit Niumsukul^{*}, Sakwichai Ontong^{*}, Nuchattra Chansuvanich^{*}

^{*}Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Tiwanon Road, Nonthaburi 11000, Thailand

[†]Corresponding author: jiranuch.m@dmisc.mail.go.th

Abstract

Eurycomanone is a quassinoid isolated from the roots of tongkat ali or *pla-lai phueak* (*Eurycoma longifolia* Jack, Family Simaroubaceae). It has shown antipyretic, antimalarial, and aphrodisiac activities. Since there is no quality control of eurycomanone in tongkat ali root in Thailand, a HPLC method for determination of eurycomanone content has been developed and validated. Sample preparation was undertaken by refluxing 2 g of powdered drug in 50 ml of methanol for 1 hr, filtering and evaporating the extract until it was dry. The residue was redissolved and adjusted with 50% methanol to 10 ml. A 20- μ l portion of sample solution was injected to HPLC system. The analysis was performed using Atlantis[®] T3, C18, 4.6 $\times$ 150 mm, 3- μ m column; and solvent A, distilled water, and solvent B, a mixture of acetonitrile and methanol (1:1) were used as a mobile phase at a flow rate of 1.5 ml/min, and detected with PDA at wavelength 243 nm. Linearity was established for the eurycomanone concentration range of 0.06-0.36 mg/ml with a coefficient of determination (R^2) 0.9995. The recovery rate was in the range of 96%-105%, while HORRAT was in the range of 1.66-1.96, and LOD and LOQ were 0.0106 μ g/ml and 0.0354 μ g/ml, respectively. It was shown that this developed method was suitable and could be used to analyze the content of eurycomanone in tongkat ali root and an appropriate specification of eurycomanone content in tongkat ali root could be established.

Key words: Tongkat Ali, eurycomanone, quantitative analysis, method development

บทนำ

ปลาไหลเผือก (*Eurycoma longifolia* Jack) ชื่ออื่น ๆ Tongkat Ali อยู่ในวงศ์ Simaroubaceae มีชื่อท้องถิ่นอื่น ๆ เช่น คะนาง ชะนาง (ภาคตะวันออก) กรูงบาตล ไหลเผือก ตริงบาตล (ภาคใต้) ตุงสอ ตริงบาตล หยกบ่อทอง เขียวก แห้วพันขึ้น (ภาคเหนือ) หยกไม้เถิง เอียนต่อน (ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ) เป็นต้น^[1,2] มีแหล่งกระจายพันธุ์แถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เป็นไม้พุ่ม หรือไม้ต้นขนาดเล็ก ลำต้นตั้งตรง มีความสูงตั้งแต่ 1-10 เมตร เปลือกต้นเป็นสีน้ำตาล แตกกิ่งก้านน้อย เรียงหนาแน่นช่วงปลายกิ่ง กิ่งก้านสั้นเป็นกระจุก ก้านใบออกจากลำต้นตรง

ส่วนปลายของลำต้น ใบประกอบแบบขนนก ใบย่อยประมาณ 8-13 คู่ ลักษณะใบรูปใบหอกแกมรูปไข่ หรือรูปขอบขนานแกมรูปไข่ ดอกเป็นช่อแบบแยกแขนง จะออกเป็นกระจุกที่ซอกใบและปลายกิ่ง เป็นช่อพวงใหญ่ ขนาดประมาณ 30 เซนติเมตร ดอกแยกเพศ อยู่บนต้นเดียวกันหรือเป็นแบบแยกเพศ แต่ลำต้นต่างกัน มีกลีบดอก 5 กลีบ แยกออกจากกันอย่างอิสระ มีสีม่วงปนแดง โดยจะออกดอกในช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงมกราคม ผลย่อยเป็นทรงรีหรือรูปไข่ มีขนาด 0.8-1.2 เซนติเมตร เปลือกนอกบาง กลางผลมีร่องตื้น ๆ ตามแนวยาวเมื่อผลแก่จะเป็นสีแดงถึงม่วง มักพบกระจายพันธุ์ทั่วไปตามป่า

เบญจพรรณ ปาดิบแล้ง ปาดิบขึ้น และป่าเต็งรัง รากปลาไหลเผือกมีลักษณะยาว หยั่งลึกลงไปใต้ดิน สีขาวนวล มีรสเบื่อเมา มีสรรพคุณทางยา ใช้รากแก้ไข้ แก้ไข้มาลาเรีย^[2,3] รากปลาไหลเผือกใช้เป็นส่วนผสมหลักของยาจันทน์ลีลา และเป็นตัวยารองในตำรับยาแก้ไข้ห้าราก ซึ่งเป็นยาสมุนไพรในบัญชียาหลักแห่งชาติ^[4]

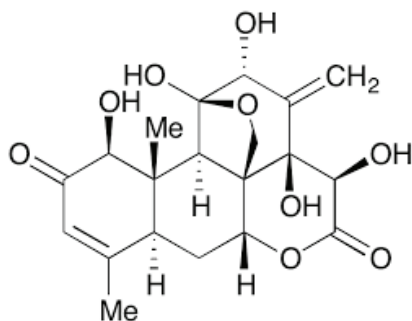
สารเคมีที่พบในรากปลาไหลเผือกเป็นสารกลุ่ม quassinoids, squalene และ triterpenes โดยสารสำคัญที่พบในรากปลาไหลเผือก คือ eurycomanone^[5,6] (รูปที่ 2) มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่น่าสนใจ เช่น ฤทธิ์ลดไข้ ฤทธิ์ต้านมาลาเรีย^[7,8] ฤทธิ์ต้านการอักเสบ^[9] ฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อ *Plasmodium falciparum*^[10] ฤทธิ์กระตุ้นความรู้สึกทางเพศ และกระตุ้นการเพิ่มปริมาณเชื้ออสุจิของหนูถีบจักร

ตัวผู้^[11] ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ cytochrome P450^[12,13]

ปัจจุบัน มีการนำรากปลาไหลเผือกมาใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย ทั้งในสูตรยาลดไข้จันทน์ลีลา และเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร รากปลาไหลเผือกมีขายในท้องตลาดมีราคาสูง การควบคุมคุณภาพจึงมีความสำคัญ เพื่อให้เลือกรากปลาไหลเผือกที่ดีและมีปริมาณสารสำคัญสูงเพื่อใช้ในการผลิตยาและผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรที่มีคุณภาพดี อย่างไรก็ตามการศึกษาเชิงปริมาณของสาร eurycomanone ในรากปลาไหลเผือกยังมีไม่มากนัก มีรายงานตีพิมพ์เผยแพร่ เช่น การวิเคราะห์สาร eurycomanone ด้วยวิธี Solid Phase Extraction Liquid Chromatography^[14], HPLC^[15,16], FTIR^[17] เป็นต้น สำหรับการศึกษาคูณภาพทางเคมีของสมุนไพรรากปลาไหลเผือกในประเทศไทย มีข้อ



รูปที่ 1 ต้น ดอก และรากปลาไหลเผือก (*Eurycoma longifolia* Jack)



รูปที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของ Eurycomanone

กำหนดคุณภาพในด้านเคมีฟิสิกส์^[18] แต่ยังมีได้ มีการกำหนดปริมาณสารสำคัญ การวิจัยครั้งนี้มีความต้องการที่จะพัฒนาวิเคราะห์หาปริมาณสาร eurycomanone ของวัตถุดิบรากปลาไหลเผือก ด้วยวิธี HPLC ซึ่งเป็นวิธีที่ให้ความถูกต้องแม่นยำ สะดวก รวดเร็วและเชื่อถือได้ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการประเมินคุณภาพวัตถุดิบรากปลาไหลเผือกที่พบในประเทศไทย และใช้ในการวิจัยและพัฒนาตำรับยาและผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรที่มีรากปลาไหลเผือกเป็นส่วนผสม

ระเบียบวิธีศึกษา

วัสดุ

1. ตัวอย่างรากปลาไหลเผือก

รวบรวมวัตถุดิบสมุนไพรปลาไหลเผือก (ราก) จำนวน 27 ตัวอย่าง ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ 2557 ถึง เมษายน 2559 เป็นสมุนไพรสดจากแหล่งธรรมชาติ ตรวจระบุชนิดให้ทราบชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องตามหลักอนุกรมวิธานพืชจำนวน 3 ตัวอย่าง (authentic) และสมุนไพรแห้งจากร้านขายยาสมุนไพรจากภาคต่าง ๆ ในประเทศ จำนวน 24 ตัวอย่าง ตัวอย่างสด

นำมาล้างทำความสะอาด ตัดเป็นชิ้น ๆ ผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำมาอบในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 3 วันนำมาบดเป็นผง นำไปผ่านร่อนเบอร์ 180 แล้วเก็บใส่ขวดแก้วสีชาปิดสนิท ส่วนสมุนไพรแห้งนำมาอบ ในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสจนแห้ง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อไล่ความชื้น แล้วนำมาบดผ่านร่อนเบอร์ 180 แล้วเก็บใส่ขวดแก้วสีชาปิดสนิท ตรวจสอบตัวอย่างที่นำมาศึกษาโดยนำตัวอย่างสมุนไพรมาตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีโครมาโทกราฟีชนิดผิวนาง โดยเปรียบเทียบลักษณะโครมาโทแกรมกับตัวอย่างอ้างอิง (authentic)

2. สารมาตรฐาน

eurycomanone ความบริสุทธิ์ > 90% (Chromadex®, Cannada)

3. ตัวทำละลาย

acetonitrile (HPLC grade), methanol (HPLC grade), น้ำ (deionized water)

4. เครื่องมือและอุปกรณ์

High Performance Liquid Chromatograph - PDA detector (Water®, USA)

Mettler Toledo Analytical Balance

Eyela NE-1 Rotary Evaporator

Retsch AS200 Basic Sieve

water bath

5. วัสดุวิทยาศาสตร์

Atlantis® T3 HPLC (C18, 4.6 × 150 ไมโครเมตร) column, 3 ไมโครเมตร, Atlantis® T3, Guard column (C18, 4.6×20 ไมโครเมตร) column, 3 ไมโครเมตร, Nylon filter syringe 0.45 μm, 13 ไมโครเมตร, PVDF membrane filter 0.45 ไมโครเมตร, กระดาษกรอง เบอร์ 4 และเครื่องแก้ว

วิธีการศึกษา

1. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสาร eurycomanone ในรากปลาไหลเผือก

1.1 การเลือกชนิดของตัวทำละลายในการสกัด

สกัดตัวอย่างรากปลาไหลเผือก น้ำหนัก 2 กรัม ด้วย hexane และ dichloromethane 50% methanol, methanol, และ น้ำกลั่น เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรอง นำสารสกัดไประเหยแห้งแล้วละลายกลับและปรับปริมาตรด้วย 50% methanol จนครบ 10 มิลลิลิตร โดยใช้ volumetric flask แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการสกัดสาร eurycomanone จากรากปลาไหลเผือกของตัวทำละลายแต่ละชนิด

1.2 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัด

สกัดตัวอย่างรากปลาไหลเผือก น้ำหนัก 2 กรัม ด้วย methanol เป็นเวลา 0.5, 1, และ 2 ชั่วโมง กรอง นำสารสกัดไประเหยแห้ง จากนั้นละลายกลับและปรับปริมาตรด้วย 50% methanol จนครบ 10 มิลลิลิตร โดยใช้ volumetric flask นำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC เพื่อเปรียบเทียบผลของระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดสาร eurycomanone จากรากปลาไหลเผือก

1.3 ความยาวคลื่นในการตรวจวิเคราะห์ eurycomanone

วัดการดูดกลืนแสง UV ของ eurycomanone เพื่อดูความยาวคลื่นที่สารนี้สามารถดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) และวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างรากปลาไหลเผือกโดยใช้ PDA เพื่อเลือกความยาวคลื่นสำหรับการตรวจวัด eurycomanone โดยที่ไม่พบการเกิด co-elute

1.4 การวิเคราะห์ปริมาณ eurycomanone ในรากปลาไหลเผือก

โดยสรุปวิธีจากผลการศึกษาข้อ 1.1-1.3

2. การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ทางเคมี

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ eurycomanone ในวัตถุดิบรากปลาไหลเผือก ที่พัฒนาขึ้นตามแนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดี่ยว กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข^[19]

2.1 ความเป็นเส้นตรง (linearity) และช่วงการวิเคราะห์ (range)

ฉีดสารละลายสารมาตรฐาน eurycomanone ที่ 6 ระดับความเข้มข้น ตั้งแต่ 0.06-0.36 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ 3 ครั้ง ด้วยเครื่อง HPLC นำค่า peak area และความเข้มข้นของสารละลาย eurycomanone ไปสร้าง calibration curve ศึกษา linearity โดยพิจารณาจาก coefficient (R^2) และช่วงความเข้มข้นที่ทำการทดสอบ (range)

2.2 ความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยง (precision)

เติมสารมาตรฐาน (spike) ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ ในช่วงการใช้งาน 3 ระดับ ลงใน sample blank แล้ววิเคราะห์ sample blank (unspiked) จำนวน 6 ซ้ำ และวิเคราะห์ spike sample ระดับละ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำทำ duplicate จากนั้นคำนวณค่า % recovery, %RSD และ HORRAT

$$\% \text{Recovery} = \frac{(C_1 - C_2) \times 100}{C_3}$$

เมื่อ C_1 คือ ความเข้มข้นของสารใน spike sample

C_2 คือ ความเข้มข้นของสารใน sample blank

C_3 คือ ความเข้มข้นของสารที่เติมไป (analyte)

2.3 ขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection, LOD)

LOD คำนวณจากจุดตัดของกราฟมาตรฐานที่ใช้เตรียม sample blank เมื่อกราฟมาตรฐานโดยใช้ spiked sample blank ที่ 6 ระดับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน ระดับละ 3 ขั้ว จากนั้นคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ y-intercept (Sy/x) และคำนวณค่า LOD โดยค่า LOD คือค่าความเข้มข้นที่ response กับ y-intercept + $3Sy/x$

2.4 ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ)

LOQ คำนวณโดย LOQ มีค่าเท่ากับ 10 เท่าของ Sy/x

2.5 ความจำเพาะ (specificity)

วิเคราะห์ method blank โดยสกัดและวิเคราะห์ตามวิธีที่พัฒนา ใช้สารเคมีทั้งหมด แต่ไม่มีตัวอย่างเพื่อตรวจสอบสารรบกวนที่อาจมาจากสารเคมีหรืออุปกรณ์ที่ใช้

3. การวิเคราะห์ปริมาณ eurycomanone ในรากปลาไหลเผือก

วิเคราะห์ปริมาณ eurycomanone ในรากปลาไหลเผือก จำนวน 27 ตัวอย่าง ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นในข้อ 1.4 ($n=4$)

ผลการศึกษา

1. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสาร

eurycomanone ในรากปลาไหลเผือก

1.1 ชนิดของตัวทำละลายในการสกัด

ผลการศึกษาพบว่า เมื่อนำสารละลายที่ได้จากการสกัดรากปลาไหลเผือกด้วย 50% methanol, methanol, และ น้ำกลั่น มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่า พื้นที่ใต้กราฟของ peak สาร eurycomanone ที่ retention time 13.9-14.2 นาที โดยการสกัดด้วย methanol ให้ปริมาณ eurycomanone สูงสุด (รูปที่ 3) และสารละลายที่ได้จากการสกัดด้วย hexane และ dichloromethane มีการตกตะกอนภายหลังการตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายในเวลาไม่เกิน 1 ชั่วโมง ซึ่งเป็นตะกอนที่คงทนไม่ละลายเมื่อตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง

ดังนั้น ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ eurycomanone ในรากปลาไหลเผือก จึงเลือกใช้ methanol เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ในการสกัดตัวอย่างรากปลาไหลเผือก

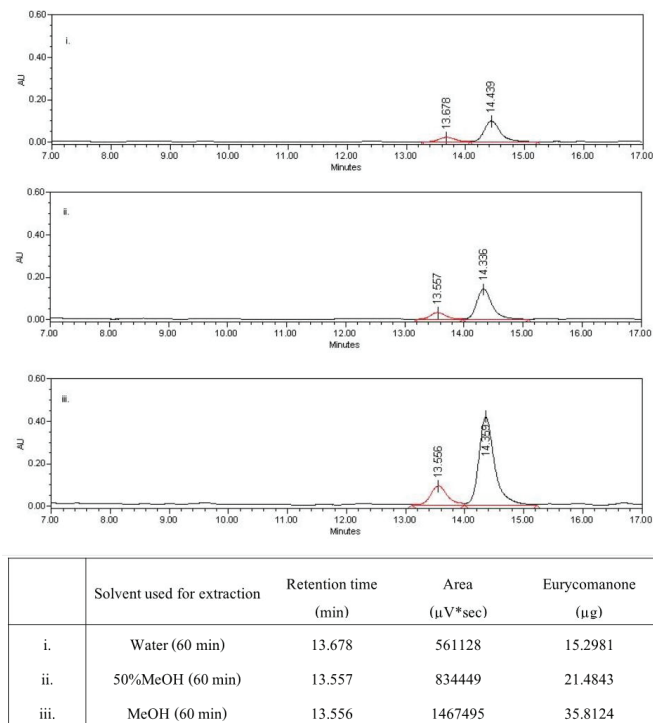
1.2 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัด

ผลการศึกษาพบว่า เมื่อสกัดตัวอย่างรากปลาไหลเผือก น้ำหนัก 2 กรัม โดยการ reflux ด้วย methanol เป็นเวลา 0.5, 1, และ 2 ชั่วโมง แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่าพื้นที่ใต้กราฟของ peak สาร eurycomanone ที่ retention time 13.84-14.09 นาที ทั้งการสกัดด้วยระยะเวลา 1 และ 2 ชั่วโมงมีค่าไม่แตกต่างกัน (รูปที่ 4)

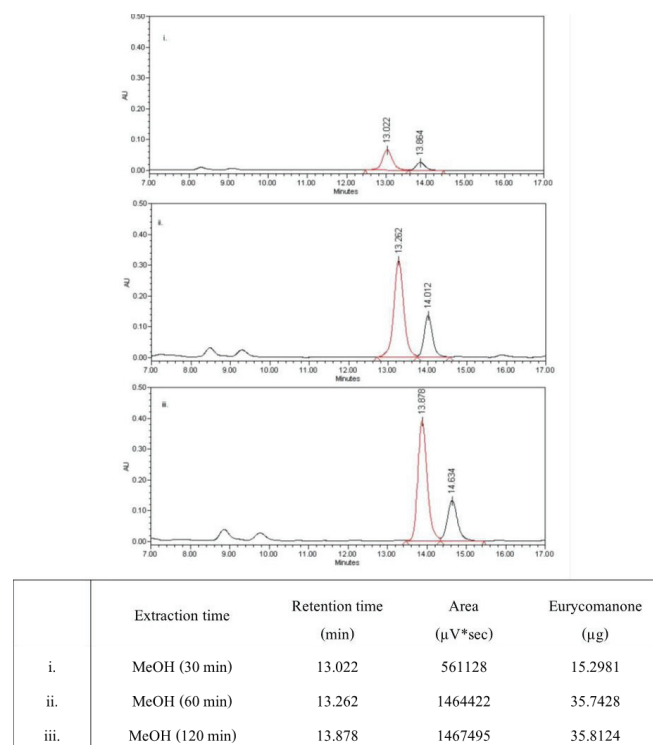
ดังนั้น ในการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสาร eurycomanone ในรากปลาไหลเผือก จึงเลือกใช้ methanol เป็นตัวทำละลายในการสกัดและใช้เวลาในการสกัด 1 ชั่วโมง

1.3 ความยาวคลื่นในการตรวจวิเคราะห์สาร eurycomanone

วัดการดูดกลืนแสง UV ของ eurycoma-



รูปที่ 3 ผลการสกัด eurycomanone จากรากปลาไหลเผือก ด้วย (i) น้ำ (ii) 50% methanol และ (iii) methanol



รูปที่ 4 ผลของระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด eurycomanone ในตัวอย่างรากปลาไหลเผือก

none พบว่าดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) มีค่าเท่ากับ 243 นาโนเมตร (รูปที่ 5) และเมื่อวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างรากปลาไหลเผือกด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้ PDA เป็น detector ที่ความยาวคลื่น 243 นาโนเมตร ไม่พบการเกิด co-elute ของสารอื่น (รูปที่ 6)

1.4 การวิเคราะห์ปริมาณสาร eurycomanone ในรากปลาไหลเผือก

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

สกัดผงรากปลาไหลเผือกน้ำหนัก 2 กรัม ด้วย methanol ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยวิธี reflux เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองและนำสารละลายมาระเหยจนแห้ง จากนั้นละลายกลับและปรับปริมาตรด้วย 50% methanol จนครบ 10 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน eurycomanone

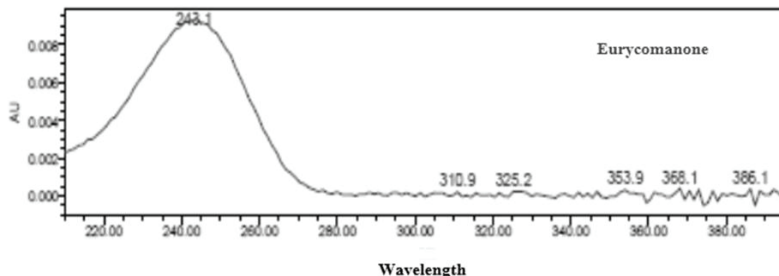
ชั่ง eurycomanone น้ำหนัก 30 มิลลิกรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 50 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางให้ได้ 6 ระดับ ความเข้มข้นที่ 0.06, 0.12, 0.18, 0.24, 0.30 และ 0.36 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

สภาวะของระบบโครมาโทกราฟี

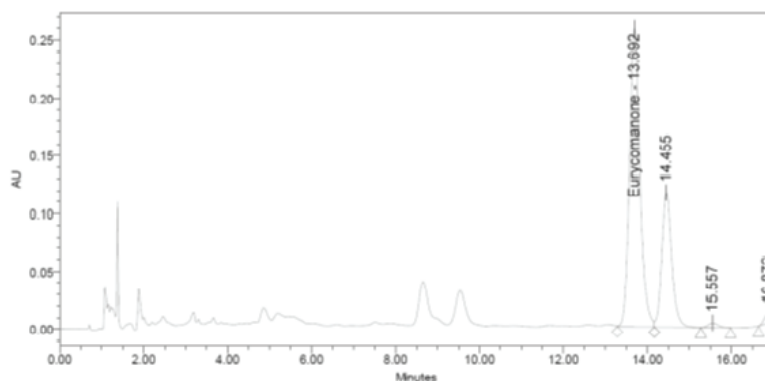
คอลัมน์ : Atlantis® T3 HPLC (C18, 4.6x150 mm)

การ์ดคอลัมน์ : Atlantis® T3 HPLC (C18, 4.6x20 mm)

วัฏภาคเคลื่อนที่ : Gradient program (ตารางที่ 1)



รูปที่ 5 UV spectrum ของ eurycomanone



รูปที่ 6 HPLC fingerprint ของสารละลายตัวอย่างรากปลาไหลเผือก

ตารางที่ 1 ภูมิภาคเคลื่อนที่แบบ Gradient program

เวลา (นาที)	อัตราการไหล (มิลลิลิตร/นาที)	น้ำ (%)	Acetonitrile:Methanol อัตราส่วน 1:1 (%)
0.0	1.5	90.0	10.0
6.0	1.5	90.0	10.0
14.0	1.5	85.0	15.0
15.0	1.5	0.0	100.0
20.0	1.5	0.0	100.0
21.0	1.5	90.0	10.0

อัตราการไหล : 1.5 มิลลิลิตร/นาที

การตรวจวัดสาร : PDA ที่ความยาวคลื่น 243
นาโนเมตร

ปริมาตรที่ฉีด : 20 ไมโครลิตร

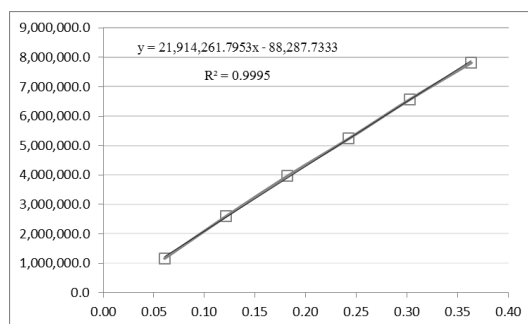
การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ทางเคมี
1.5 ความเป็นเส้นตรง (linearity) และ
ช่วงการวิเคราะห์ (range)

ฉีดสารละลายสารมาตรฐาน eurycomanone ที่ 6 ระดับความเข้มข้น ตั้งแต่ 0.06-0.36 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ 3 ครั้ง ด้วยเครื่อง HPLC นำค่า peak area และความเข้มข้นของสารละลาย eurycomanone ไปสร้าง calibration curve ผลการศึกษา (รูปที่ 7)

จากรูปที่ 7 พบว่า calibration curve ของสารมาตรฐาน eurycomanone มีลักษณะเป็นเส้นตรง ในช่วงความเข้มข้น 0.06-0.36 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยมีค่า coefficient (R²) เท่ากับ 0.9995

1.6 ความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยง (precision)

เติมสารมาตรฐาน (spike) ที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ในช่วงการใช้งาน 3 ระดับ ลงใน sample blank แล้ววิเคราะห์ sample blank (unspiked)



รูปที่ 7 Calibration curve ของสารละลายมาตรฐาน eurycomanone ในช่วงความเข้มข้น 0.06-0.36 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

จำนวน 6 ซ้ำ และวิเคราะห์ spike sample ระดับละ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำทำ duplicate ผลการศึกษาดังตารางที่ 2

*ตาม AOAC Peer-verified methods program on policies and procedures, Arlington, VA, USA (1998)

**การยอมรับความเที่ยง ประเมินจาก HORRAT (< 2)

1.7 ขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection, LOD)

พบว่า LOD มีค่าเท่ากับ 0.0106 มิลลิกรัม/

ตารางที่ 2 ผลการศึกษาความแม่นยำและความเที่ยง

Standard addition level	%Spike target	%Recovery		HORRAT**	เกณฑ์ยอมรับของ % Recovery*
		Individual	Average		
Low level	50	103.21	105.08	1.96	95-105
		105.41			
		104.55			
Medium level	100	97.38	98.47	1.81	95-105
		97.63			
		100.39			
High level	150	98.34	96.14	1.66	95 - 105
		94.29			
		95.81			

มิลลิลิตร

1.8 ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ)

LOQ จากการคำนวณมีค่าเท่ากับ 0.0354 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

1.9 ความจำเพาะ (specificity)

วิเคราะห์ method blank สารรบกวน peak ของ eurycomanone

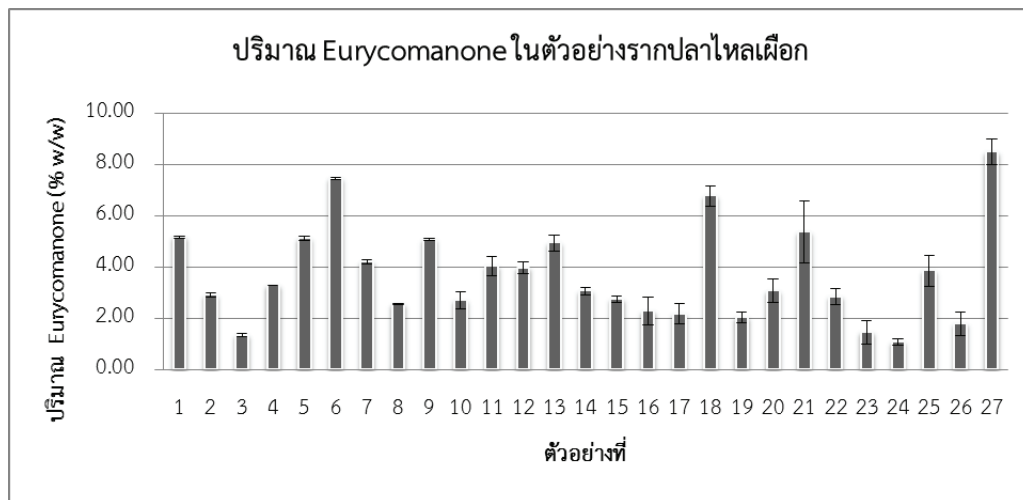
2. การวิเคราะห์ปริมาณสาร eurycomanone ในรากปลาไหลเผือก

ผลการวิเคราะห์ปริมาณ eurycomanone ในรากปลาไหลเผือก จำนวน 27 ตัวอย่าง พบว่า ปริมาณ eurycomanone มีค่าระหว่าง 1.1-8.5 % โดยน้ำหนัก มีค่าเฉลี่ยปริมาณ eurycomanone เท่ากับ 3.7% โดยน้ำหนัก และมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับ 1.9 (ตารางที่ 3 และรูปที่ 8)

อภิปรายผล

รากปลาไหลเผือกใช้เป็นส่วนผสมหลักของยา

จันทน์ลีลา และเป็นตัวยารองในตำรับยาแก้ไข้ห้าราก ซึ่งเป็นยาสมุนไพรในบัญชียาหลักแห่งชาติ โดยการรับประทานยาชนิดยาผงมักให้ชงกับน้ำร้อนเพื่อให้ได้ตัวยาออกมา สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณ eurycomanone หากสกัดด้วยน้ำจะได้ปริมาณ eurycomanone น้อย ในการวิเคราะห์ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นจึงใช้ methanol ในการสกัดตัวอย่าง แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสาร eurycomanone ในรากปลาไหลเผือก จากการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ eurycomanone พบว่าการวิเคราะห์มีความแม่นยำ โดยพิจารณาจาก %recovery ของการวิเคราะห์ spike sample อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ (95-105%) และค่า HORRAT อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ (HORRAT < 2) ซึ่งแสดงว่าวิธีดังกล่าวมีความเที่ยง และสามารถนำไปใช้วิเคราะห์ปริมาณ eurycomanone ในตัวอย่างรากปลาไหลเผือก วิธีที่ได้พัฒนาขึ้นมีความสะดวก รวดเร็ว ใน



รูปที่ 8 ปริมาณ eurycomanone ในรากปลาไหลเผือก

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ eurycomanone ในรากปลาไหลเผือกด้วยวิธี HPLC (mean $\pm$ SD, n = 4)

ตัวอย่างที่	ปริมาณ eurycomanone (%โดยน้ำหนัก)	ตัวอย่างที่	ปริมาณ eurycomanone (%โดยน้ำหนัก)
1	5.18 $\pm$ 0.04	15	2.75 $\pm$ 0.12
2	2.90 $\pm$ 0.08	16	2.28 $\pm$ 0.54
3	1.35 $\pm$ 0.07	17	2.18 $\pm$ 0.41
4	3.29 $\pm$ 0.01	18	6.77 $\pm$ 0.39
5	5.12 $\pm$ 0.08	19	2.05 $\pm$ 0.21
6	7.47 $\pm$ 0.04	20	3.07 $\pm$ 0.46
7	4.21 $\pm$ 0.07	21	5.36 $\pm$ 1.20
8	2.56 $\pm$ 0.04	22	2.85 $\pm$ 0.30
9	5.08 $\pm$ 0.05	23	1.46 $\pm$ 0.46
10	2.71 $\pm$ 0.32	24	1.08 $\pm$ 0.14
11	4.04 $\pm$ 0.37	25	3.86 $\pm$ 0.59
12	3.98 $\pm$ 0.22	26	1.80 $\pm$ 0.45
13	4.95 $\pm$ 0.32	27	8.49 $\pm$ 0.46
14	3.07 $\pm$ 0.15	$\bar{X}$	3.7
		SD	1.9

การเตรียมตัวอย่าง ใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้นกว่าวิธีที่มีรายงานมาก่อน มีความสามารถในการแยกสาร eurycomanone ออกจากสารอื่นที่เป็นองค์ประกอบในตัวอย่างได้ดี สามารถนำมาใช้ในการ

ควบคุมคุณภาพของรากปลาไหลเผือกต่อไป จากผลการวิเคราะห์ปริมาณ eurycomanone ในรากปลาไหลเผือกจำนวน 27 ตัวอย่าง พบว่าปริมาณ eurycomanone ในรากปลาไหลเผือกที่พบใน

ประเทศไทย มีปริมาณ 1.1-8.5% โดยน้ำหนัก ซึ่งหากเปรียบเทียบกับปริมาณ eurycomanone ที่ระบุไว้ในเภสัชตำรับของประเทศมาเลเซีย^[20] ได้กำหนดปริมาณ eurycomanone ในรากปลาไหลเผือก ในช่วง 0.8-1.5% โดยน้ำหนัก จะเห็นได้ว่าตัวอย่างสมุนไพรรากปลาไหลเผือกที่พบในประเทศไทย มีปริมาณสาร eurycomanone สูงกว่า ซึ่งงานวิจัยนี้ สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลในการกำหนดปริมาณ eurycomanone ในรากปลาไหลเผือกได้ โดยกำหนดจากค่าเฉลี่ยของปริมาณ eurycomanone ในตัวอย่างลบด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.83% เมื่อปัดเป็นเลขทศนิยม 1 ตำแหน่ง ได้ค่า 1.8% โดยน้ำหนัก ดังนั้น ในวัตถุดิบรากปลาไหลเผือกควรมีปริมาณ eurycomanone ไม่น้อยกว่า 1.8% โดยน้ำหนัก

ข้อสรุป

วิธีวิเคราะห์ปริมาณ eurycomanone ในรากปลาไหลเผือกด้วยเครื่อง HPLC ที่พัฒนาขึ้น โดยสกัดผงรากปลาไหลเผือก ด้วย methanol ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยวิธี reflux เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองและนำสารสกัดที่ได้มาระเหยจนแห้งจากนั้นละลายกลับและปรับปริมาตรด้วย 50% methanol จนครบ 10 มิลลิลิตร นำสารละลายดังกล่าว ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ฉีดเข้าสู่ระบบโครมาโทกราฟีของ HPLC โดยใช้คอลัมน์ชนิด Atlantis® T3 C18, 4.6x150 มิลลิเมตร และใช้ น้ำกลั่น และ (acetonitrile ต่อ methanol อัตราส่วน 1:1) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1.5 มิลลิลิตร/นาที และตรวจวัดด้วย PDA ที่ความยาวคลื่น 243 นาโนเมตร จะปรากฏ peak ของ eurycomanone ที่ retention time เท่ากับ 13.98 นาที ผลการทดสอบความใช้ได้

ของวิธีวิเคราะห์ดังกล่าว พบว่า calibration curve มีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.06-0.36 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีค่า coefficient (R^2) เท่ากับ 0.9995 ค่า % recovery อยู่ในช่วง 96-105% ค่า HORRAT เท่ากับ 1.66-1.96 ค่า LOD และ LOQ มีค่าเท่ากับ 0.0106 และ 0.0354 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความเหมาะสม สามารถนำไปใช้เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์ปริมาณ eurycomanone ในรากปลาไหลเผือก และสามารถนำไปสู่การกำหนดเกณฑ์ปริมาณสารสำคัญในรากปลาไหลเผือกต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ นายประถม ทองศรีรักษ์ ห้องปฏิบัติการเกษตร สวนสมุนไพรกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จังหวัดจันทบุรี ที่ให้อาหารอนุเคราะห์เก็บตัวอย่างสมุนไพร และสถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่สนับสนุนงบประมาณในการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Tem Smitinand. Thai plant names. Bangkok: Office of the Forest Herbarium. Department of National Park; 1980. p.148-9. (in Thai)
2. Boonyaprapat N, Chokchaicharoenporn O. Medicinal Plants indigenous to Thailand. Bangkok: Prachachon; 2000. p.175-6. (in Thai)
3. Supcharoen P, Rueng-rangsri N, Deewisej K. Herbal in central national park. 2nd ed. Nonthaburi: Thai Traditional Medicine Development Foundation; 2006. 108 p. (in Thai)
4. National List of Essential Medicines A.D.2011. Published in Government Gazette, Vol. 2, (28 June 2011). (in Thai)
5. H. Yusuf, Mustofa, M. Agus Wijayanti, R. Asmah Susidarti, P. Budi Setia Asih, Suryawati, et al. a new quassinoid of four isolated compounds from extracts *Eurycoma longifolia* Jack roots and their in-vitro

- antimalarial activity. International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences. 2013;4(3): 728-34.
6. Ang HH, Hitosuyanagi Y, Fukaya H, Takeya K. Quassinoids from *Eurycoma longifolia*. Phytochemistry. 2002;59(8):833-7.
 7. Kardono LB, Angerhofer CK, Tsauri S, Padmawinata K, Pezzuto JM, Kinghorn AD. Cytotoxic and antimalarial constituents of the root of *Eurycoma longifolia*. J Nat Prod. 1991;54(5):1360-7.
 8. Low BS, Teh CH, Yuen KH, Chan KL. Physico-chemical effects of the major quassinoids in a standardized *Eurycoma longifolia* extract (Fr 2) on the bioavailability and pharmacokinetic properties, and their implications for oral antimalarial activity. Nat Prod Commun. 2011;6(3):337-41.
 9. Hajjouli S, Chateauvieux S, Teiten MH, Orlikova B, Schumacher M, Dicato M, et al. Eurycomanone and eurycomanol from *Eurycoma longifolia* Jack as regulators of signaling pathways involved in proliferation, cell death and inflammation. Molecules. 2014;19(9):14649-66.
 10. Chan KL, Choo CY, Abdullah NR, Ismail Z. Antiplasmodial studies of *Eurycoma longifolia* Jack using the lactate dehydrogenase assay of *Plasmodium falciparum*. J Ethnopharmacol. 2004;92(2-3):223-7.
 11. Low BS, Das PK, Chan KL. Standardized quassinoids-rich *Eurycoma longifolia* extract improved spermatogenesis and fertility in male rats via the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. J Ethnopharmacol. 2013; 145(3):706-14.
 12. Purwantiningsih, Ismail S, Hussin AH, and Chan KL. Inhibitory effect of *Eurycoma longifolia* extract and eurycomanone on human cytochrome P450 isoforms. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2014;(6):441-5.
 13. Pan Y, Tiong KH, Abd-Rashid BA, Ismail Z, Ismail R, Mak JW, et al. Effect of eurycomanone on cytochrome P450 isoforms CYP1A2, CYP2A6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1 and CYP3A4 in vitro. J Nat Med. 2014;68(2):402-6.
 14. Zaini NN, Osman R, Juahir H, Saim N. Development of chromatographic fingerprints of *Eurycoma longifolia* (Tongkat ali) roots using online Solid Phase Extraction-Liquid Chromatography (SPE-LC). Molecules. 2016;21(5):1-10.
 15. Norhidayah A, Vejayam J, Yusoff M. Detection and quantification of eurycomanone levels in Tongkat Ali herbal products. Journal of Applied Sciences. 2015;15(7):999-1005.
 16. Khari N, Aisha AFA, Ismai Z. Reverse phase high performance liquid chromatography for the quantification of eurycomanone in *Eurycoma longifolia* Jack (Simaroubaceae) extracts and their commercial products. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 2014;13(5):801-7.
 17. Ling SK, Salbiah M, Fauziah A, Mohamad LN. Study of *Eurycoma longifolia* by FT-IR and 2D-IR correlation spectroscopy. Forest Research Institute Malaysia. Proceedings of the Seminar on Medicinal and Aromatic Plants (MAPS2008). Malaysia: 2009. p.258-67.
 18. Department of Medical Sciences. Thai herbal compendium on physico-chemical specification volume I. Nonthaburi: Department of Medical Sciences; 2016. p.17-9. (in Thai)
 19. Department of Medical Sciences. A practical guide for single laboratory method validation of chemical methods. Nonthaburi: Department of Medical Sciences; 2006. (in Thai)
 20. Department of Standards Malaysia. Phytopharmaceutical aspects of freeze dried water extract from Tongkat Ali roots - specification. Malaysia: Malaysian standard; 2011. 12 p.