นิพนธ์ต้นฉบับ

# คุณภาพทางเคมีของผลยอ

**อภิรักษ์ ศักดิ์เพ็ชร*, ดวงเพ็ญ ปัทมดิลก, พีรธรรม เทียมเทียบรัตน์, ศักดิ์วิชัย อ่อนทอง, ณุฉัตรา จันทร์สุวานิชย์**

*สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จังหวัดนนทบุรี 11000*

**ผู้รับผิดชอบบทความ: apirak.s@dmsc.mail.go.th*

## บทคัดย่อ

การศึกษาคุณภาพทางเคมีของผลยอมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีวิเคราะห์เชิงคุณภาพโดยการตรวจเอกลักษณ์ทางเคมี พัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ และศึกษาปริมาณสารสำคัญในตัวอย่างผลยอ เมื่อนำผลยอ 0.5 กรัม มาสกัดด้วยเมทานอล 20 มิลลิลิตร กรองและระเหยจนเหลือปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปตรวจเอกลักษณ์ด้วยวิธีรงคเลขผิวบาง (TLC) โดยใช้ silica gel GF254 เป็นวัฏภาคคงที่ และ โทลูอีน-ไดเอทิลอีเธอร์ (2:3) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญสโกโพเลทิน (scopoletin) ในผลยอด้วยวิธี Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) ได้ถูกพัฒนาขึ้น โดยต้มสกัดผลยอ 1 กรัม ด้วยเมทานอล 30 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที กรอง ระเหยเพื่อลดปริมาตร ปรับปริมาตรด้วยเมทานอลจนครบ 25 มิลลิลิตร นำสารละลาย ปริมาตร 2 ไมโครลิตร มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UPLC โดยใช้วัฏภาคคงที่ Acquity™ BEH C18 2.1 × 100 มิลลิเมตร, 1.7 ไมโครเมตร วัฏภาคเคลื่อนที่ประกอบด้วย A. เมทานอล-อะซีโตไนไตรล์ (1:1) B. น้ำ ใช้ gradient elution อัตราการไหล 0.45 มิลลิลิตร/นาที ตรวจวัดภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต (UV) ที่ความยาวคลื่น 345 นาโนเมตร การตรวจเอกลักษณ์ด้วยวิธี TLC พบสารสโกโพเลทิน ที่ $R_f$ เท่ากับ 0.3 การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารสโกโพเลทินที่พัฒนาขึ้น พบว่า calibration curve ของสารสโกโพเลทิน มีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 8-48 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ค่า $R^2$ เท่ากับ 0.9995 ค่า %recovery อยู่ในช่วง 99-105% ขีดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการหาปริมาณ มีค่าเท่ากับ 1 และ 3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อศึกษาปริมาณสารสำคัญในตัวอย่างผลยอโดยการวิเคราะห์ปริมาณสารสโกโพเลทิน ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น พบว่า มีค่าอยู่ในช่วง 0.02-0.07% โดยน้ำหนัก ผลที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมคุณภาพทางเคมีของผลยอต่อไป

***คำสำคัญ:*** ผลยอ, *Morinda citrifolia*, Rubiaceae, scopoletin, การวิเคราะห์เชิงปริมาณ

*Received date 11/07/16* *Accepted date 22/06/16*

# Chemical Quality of Noni Fruits

**Apirak Sakpetch*, Duangpen Pattamadilok, Peradham Thiemthieprat, Sakwichai Ontong, Nuchattra Chansuvanich**

*Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand*

**Corresponding author: apirak.s@dmsc.mail.go.th*

## Abstract

The objectives of the study on chemical quality of noni fruits were to investigate qualitative analysis method using TLC technique, to develop an analytical method for determining the amounts of active compounds and to determine the amounts of active compounds in noni fruits using the developed method. The determination was done on 0.5 g of powdered noni, extracted with methanol (20 ml), and then a TLC analysis was performed on silica gel GF254, using toluene-diethyl ether (2:3) as mobile phase. An analytical method for scopoletin content using UPLC was developed. Sample preparation was undertaken by refluxing 1 g of powdered noni fruit in 30 ml of methanol for 30 min., filtering, evaporating and adjusting to 25 ml. Then 2 $\mu$l of sample solution was subjected to UPLC analysis, using Acquity$^{TM}$ BEH C18 column, 2.1 × 100 mm, 1.7 $\mu$m as stationary phase. While (a) methanol-acetonitrile (1:1) and (b) distilled water were used as mobile phase. Gradient elution was performed with a flow rate set at 0.45 ml/min. Detection was conducted on UV345 nm. In the TLC analysis, spots of scopoletin appeared at $R_f$ value of 0.3. The analytical method for scopoletin content using UPLC was developed and validated. Linearity was established for scopoletin at the concentration range of 8-48 $\mu$g/ml with a coefficient of determination ($R^2$) value of 0.9995. Percent recovery was in the range of 99-105%. The LOD and LOQ were 1 and 3 $\mu$g/ml, respectively. As a result of scopoletin analysis in 17 samples of noni fruits, the amounts of this compound were in the range of 0.02-0.07% w/w. The result of this study will be useful for chemical quality control of noni fruits.

***Key words:*** noni fruits, *Morinda citrifolia,* Rubiaceae, scopoletin, quantitative analysis

## บทนำ

ยอ มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Morinda citrifolia* Linn. วงศ์ Rubiaceae[1] มีชื่ออื่น ๆ ได้แก่ มะตาเสือ (ภาคเหนือ) ยอบ้าน (ภาคกลาง) แยใหญ่ (กะเหรี่ยง แม่ฮ่องสอน)[1] ลักษณะเป็นไม้ต้น สูง 2-6 เมตร เปลือกต้นสีน้ำตาลแตกเป็นสะเก็ดแล้วหลุดออก กิ่งอ่อนเป็นสี่เหลี่ยม ใบเดี่ยวออกตรงข้าม ใบรูปรี กว้าง 8-15 เซนติเมตร ยาว 10-20 เซนติเมตร ขอบใบเรียบ แผ่นใบเรียบ สีเขียวเข้มเป็นมัน ดอกออกเป็นช่อกลมตามซอกใบ ดอกสีขาว กลีบดอกโคนเชื่อมติดกันเป็นหลอด ปลายแยกเป็น 5 แฉก มีกลิ่นหอม ผลเป็นผลรวม ผิวขรุขระเป็นตุ่ม ผลสุกมีกลิ่นเหม็นเอียน เมล็ดสีน้ำตาลมีหลายเมล็ด สรรพคุณยาไทย มีการใช้ใบ ในการบำรุงสายตา หัวใจ คั้นน้ำทาแก้โรคเกาต์ ปวดตามข้อเล็ก ๆ ของนิ้วมือ นิ้วเท้า หรือคั้นน้ำสระผมฆ่าเหา แก้กระษัย ใช้ใบปรุงเป็นอาหาร แก้ท้องร่วง ราก ใช้เป็นยาระบาย แก้กระษัย ผลโตเต็มที่แต่ไม่สุก จิ้มน้ำผึ้งรับประทาน มีคุณสมบัติเป็นยาขับลม บำรุงธาตุ เจริญอาหาร ขับลมในลำไส้ กระเพาะอาหาร แก้เหงือกเปื่อยเป็นขุมบวม ขับเลือดลม ขับโลหิต

ประจำเดือน ผลดิบ ต้มน้ำรับประทานกับรากผักชี แก้อาการอาเจียนของหญิงมีครรภ์[2] มีรายงานสารเคมีที่พบในส่วนต่าง ๆ ของยอ ดังนี้ ใบ พบสาร citrifolinoside B, quercetin 3-O-$\beta$-D-glucopyranoside, quercetin, 3-O-$\alpha$-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-$\beta$-D-glucopyranoside, kaempferol, 3-O-$\alpha$-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-$\beta$-D-glucopyranoside, ursolic acid, alanine, serine, threonine, tryptophan, tyrosine, valine เป็นต้น แก่น พบสาร physcion, 8-O-$\alpha$-L-arabinopyranosyl-(1→3)-$\beta$-D-galactopyranosyl-(1→6)-$\beta$-D-galactopyranoside ดอก พบสาร aracetin 7-O-$\beta$-D-glucopyranoside, 5,8-dimethylapigenin, 4'-O-$\beta$-D-galactopyranoside, 2-methyl-4-hydroxy-5,7-dimethoxyanthraquinone, 4-O-$\beta$-D-glucopyranosyl-(1→4)-$\alpha$-L-rhamnopyranoside เป็นต้น ราก พบสาร morenone 1, morenone 2, rubiadin, rubichloric acid, 1,3-dihydroxy-6-methyl anthraquinone, 8-hydroxy-8-methoxy-2-methyl anthraquinone เป็นต้น เปลือกราก พบสาร chlororubin, morindadiol, morindine, morindaidrine, soranjidiol, physcion เป็นต้น[3] ผล พบสาร asperulosidic acid, scopoletin, caproic acid, caprylic acid, quercetin 3-O-$\alpha$-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-$\beta$-D-glucopyranoside, ascorbic acid, hexanoic acid, octanoic acid เป็นต้น[3-5] การศึกษาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในยอมีการรายงานหลายวิธี เช่น การหาปริมาณ decacetyl asperulosidic acid และ asperulosidic acid ในผลิตภัณฑ์จากยอด้วยวิธี HPLC-MS[5] การหาปริมาณ 5,15-dimethylmorindol, lucidin, alizarin, rubiadin ซึ่งเป็นสารกลุ่ม anthraquinone ในผลและใบด้วยวิธี HPLC-UV[6] การหาปริมาณ scopoletin, 7-hydroxycoumarin และ 7-hydroxycoumarin ในรากและลำต้นด้วยวิธี HPLC-UV และ HPLC-FL[7] การหาปริมาณ scopoletin ในสารสกัดน้ำจากผลยอด้วยวิธี HPLC-UV[8] เป็นต้น การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีวิเคราะห์เชิงคุณภาพโดยการตรวจเอกลักษณ์ทางเคมี พัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ และศึกษาปริมาณสารสำคัญในตัวอย่างผลยอ

## ระเบียบวิธีศึกษา

### วัสดุ

**1. ตัวอย่างผลยอ**

ตัวอย่างผลยอ จำนวน 17 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ตัวอย่างของสมุนไพรที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Morinda citrifolia* Linn. ซึ่งได้จัดทำหลักฐานพันธุ์ไม้อ้างอิง (voucher specimen) เก็บรักษาที่พิพิธภัณฑ์พืชกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีหมายเลขพันธุ์ไม้อ้างอิง DMSC 5191 และตัวอย่างที่รวบรวมจากแหล่งธรรมชาติและร้านยาสมุนไพรในระหว่างเดือนธันวาคม 2556 - ธันวาคม 2557 นำมาทำความสะอาดตามความเหมาะสม แล้วนำไปอบในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนกว่าจะแห้ง บดเป็นผงละเอียด ผ่านแร่งเบอร์ 180 เก็บในภาชนะแก้วสีชาปิดสนิท

**2. สารมาตรฐาน**

scopoletin ความบริสุทธิ์ ≥ 97.0% (Sigma, Switzerland)

**3. สารเคมีและตัวทำละลาย**

methanol HPLC และ AR (Merck, Ger-

many), chloroform AR (Merck, Germany), DI Water, anisaldehyde (Fluka, Switzerland), sulfuric acid (Labscan, Thailand)

**4. เครื่องมือ**

Acquity$^{TM}$ Ultra Performance Liquid Chromatograph-PDA detector (Waters, USA) และ Empower 2 software, เครื่องชั่งไฟฟ้า ความละเอียด 0.01 มิลลิกรัม (Mettler-Toledo, Switzerland)

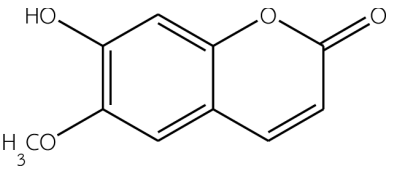
**5. วัสดุวิทยาศาสตร์และเครื่องแก้ว**

Acquity$^{TM}$ UPLC BEH C18, 2.1 × 100 mm, 1.7 $\mu$m (Waters, USA), PTFE syringe filter สำหรับกรองสารละลายตัวอย่าง, TLC plate ชนิด Silica gel GF254 precoated (E. Merck, Germany), กระดาษกรอง เบอร์ 4 (Whatman, UK), PVDF membrane filter 0.2 $\mu$m สำหรับกรองตัวทำละลาย, Nylon membrane filter 0.45 $\mu$m (Pall Corporation, USA) สำหรับกรอง DI water, Tuberculin syringe สำหรับดูดสารละลายตัวอย่างในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง, volumetric flask, pipette และเครื่องแก้ว

## วิธีการศึกษา

**1. วิธีวิเคราะห์เชิงคุณภาพของผลยอด้วยวิธีรงคเลขผิวบาง (TLC)**

วิธีวิเคราะห์เชิงคุณภาพด้วยวิธี TLC ได้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้สำหรับการตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีของผลยอ โดยใช้สารสโกโพเลทิน ซึ่งเป็นสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ในผลยอเป็น chemical marker โครงสร้างทางเคมีของสารสโกโพเลทิน ดังแสดงในรูปที่ 1




**รูปที่ 1** โครงสร้างทางเคมีของสโกโพเลทิน

**2. วิธีวิเคราะห์ปริมาณสโกโพเลทินในผลยอ**

**2.1 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารสโกโพเลทินในผลยอ**[10]

**ก. การเลือกชนิดของตัวทำละลายในการสกัด**

ทำการศึกษาผลของการสกัดตัวอย่างผลยอ 500 มิลลิกรัม ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ เมทานอล เอทิลอะซีเตท และน้ำ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่เวลา 60 นาที กรอง จากนั้น สารสกัดเมทานอลนำมาปรับปริมาตรด้วยเมทานอลจนครบ 50 มิลลิลิตร สารสกัดเอทิลอะซีเตทนำมาระเหยแห้งแล้วละลายกลับและปรับปริมาตรด้วยเมทานอลจนครบ 50 มิลลิลิตร ส่วนสารสกัดน้ำนำมาปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 50 มิลลิลิตร แล้วเปรียบเทียบผลของตัวทำละลายต่อความสามารถในการสกัดสารสโกโพเลทินจากผลยอ โดยการฉีดสารละลายตัวอย่างเข้าสู่ระบบ UPLC แล้วเปรียบ peak area ของสารสโกโพเลทินจากสารสกัดต่าง ๆ ประกอบกับ peak shape สิ่งเจือปนอื่น ๆ (impurity) และความคงตัวของสารละลายตัวอย่าง

**ข. การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัด**

ทำการศึกษาผลของการสกัดตัวอย่างผลยอ 1 กรัม ด้วยเมทานอลปริมาตร 30 มิลลิลิตร โดยวิธีต้มสกัดเป็นเวลา 30, 60 และ 120 นาที กรอง

ระเหยเพื่อลดปริมาตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยเมทานอลจนครบ 25 มิลลิลิตร แล้วเปรียบเทียบผลของเวลาต่อความสามารถในการสกัดสารสโกโพเลทินจากผลยอได้อย่างสมบูรณ์ โดยการฉีดสารละลายตัวอย่างเข้าสู่ระบบ UPLC แล้วเปรียบ peak area ของสารสโกโพเลทินในสารสกัดที่เวลาการสกัดต่าง ๆ

**ค. การศึกษาระบบโครมาโทกราฟี**

ได้แก่ ความยาวคลื่นในการตรวจวัดสารสโกโพเลทินชนิดของวัฏภาคคงที่ (stationary phase) และวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) การชะสาร (elution) ปริมาตรการฉีดสาร อุณหภูมิของระบบ

**2.2 การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์**

ทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารสโกโพเลทินในผลยอที่พัฒนาขึ้น ตามแนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข[11]

**3. การวิเคราะห์ปริมาณสารสโกโพเลทินในผลยอ**

ทำการศึกษาคุณภาพทางเคมีของผลยอโดยวิเคราะห์ปริมาณสารสโกโพเลทินในผลยอ จำนวน 17 ตัวอย่าง ซึ่งรวบรวมจากแหล่งต่าง ๆ ด้วยวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น

## ผลการศึกษา

**1. วิธีวิเคราะห์เชิงคุณภาพของผลยอด้วยวิธีรงคเลขผิวบาง (TLC)**

**การเตรียมตัวอย่าง**

นำตัวอย่างผลยอ น้ำหนัก 0.5 กรัม มาสกัดด้วยเมทานอล 20 มิลลิลิตร โดยวิธีต้มสกัดเป็นเวลา 20 นาที กรอง นำสารละลายที่ได้มาระเหยลดปริมาตรเหลือ 2 มิลลิลิตร

**การเตรียมสารละลายมาตรฐาน**

นำสารสโกโพเลทิน น้ำหนัก 2 มิลลิกรัม มาละลายในเมทานอลปริมาตร 5 มิลลิลิตร

**ระบบโครมาโทกราฟี**

| | |
|---|---|
| วัฏภาคคงที่ | silica gel 60 GF254 |
| วัฏภาคเคลื่อนที่ | โทลูอีน : ไดเอทิลอีเธอร์ อัตราส่วน 2:3 |
| ระยะทางการเคลื่อนที่ของวัฏภาคเคลื่อนที่ | 10 เซนติเมตร |
| ปริมาตรสารละลายที่ใช้ | 10 ไมโครลิตร สำหรับสารละลายตัวอย่าง<br>2 ไมโครลิตร สำหรับสารละลายมาตรฐาน |

**การตรวจวัด**

1) ภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร

2) พ่นด้วยน้ำยา anisaldehyde-$H_2SO_4$ reagent[9] แล้วตรวจสอบภายใต้แสงธรรมชาติและภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร

ผลการตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธี TLC ของตัวอย่างผงยอ จำนวน 17 ตัวอย่าง พบ spot ของสารสโกโพเลทินที่ค่า $R_f$ เท่ากับ 0.3 ในทุกตัวอย่าง ซึ่ง TLC chromatogram ของผลยอ ดังแสดงในรูปที่ 2

**2. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารสโกโพเลทินในผลยอ**

**2.1 การเลือกชนิดของตัวทำละลายในการสกัด**

ผลของการสกัดตัวอย่างผลยอ 500 มิลลิกรัม ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เป็นเวลา 60 นาที พบว่าเมทานอลสามารถสกัดสารสโกโพเลทินได้มากที่สุด โดยมี impurity ชนิดอื่นปนออกมาน้อย และสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้มีความคงตัวดีที่อุณหภูมิห้องในภาชนะกันแสง เป็นระยะเวลาอย่างน้อย 5 วัน ดังนั้น ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์นี้จึงเลือกใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายในการสกัด

**2.2 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัด**

ผลของการสกัดตัวอย่างผลยอ 1 กรัม ด้วยเมทานอล ปริมาตร 30 มิลลิลิตร โดยวิธีต้มสกัดที่เวลาต่าง ๆ กัน คือ 30, 60 และ 120 นาที กรองระเหยเพื่อลดปริมาตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยเมทานอล จนครบ 25 มิลลิลิตร แล้ววิเคราะห์ด้วย UPLC พบว่า เมื่อระยะเวลาการสกัดเพิ่มขึ้น peak area ของสารสโกโพเลทินไม่เพิ่มขึ้น แสดงว่าการสกัดสารสโกโพเลทินสามารถเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ที่เวลา 30 นาที ดังนั้น ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์นี้จึงเลือกใช้ระยะเวลาสำหรับการสกัด 30 นาที

นอกจากนี้ ยังได้ศึกษาผลของวัสดุที่ใช้ในการกรองสารละลายตัวอย่างชนิดต่าง ๆ (membrane filter) ได้แก่ nylon, PTFE และ PVDF ซึ่งในการเตรียมตัวอย่างสารละลายก่อนฉีดเข้าสู่ระบบ UPLC ซึ่งพบว่า เมื่อกรองสารละลายตัวอย่างผ่าน nylon ไม่มีผลต่อปริมาณสารสโกโพเลทินโดยดูจาก peak area ของสารดังกล่าว และไม่มีผลต่อความคงตัวของสารละลายตัวอย่างเมื่อตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 2 วัน ในขณะที่ PTFE และ PVDF มีผลทำให้ peak area ของสารสโกโพเลทินลดลง

**2.3 การศึกษาระบบโครมาโทกราฟี**

**ก. ความยาวคลื่นในการตรวจวัดสารสโกโพเลทิน** พบว่า สารดังกล่าวมีค่าการดูดกลืนแสง UV สูงสุดที่ความยาวคลื่น 254, 286, 326 และ 345 นาโนเมตร แต่เมื่อทดสอบกับตัวอย่างผลยอ พบว่าที่ความยาวคลื่น 345 นาโนเมตร ไม่พบ impurity อื่นจากผลยอที่ดูดกลืนแสง UV ที่ความยาวคลื่นนี้

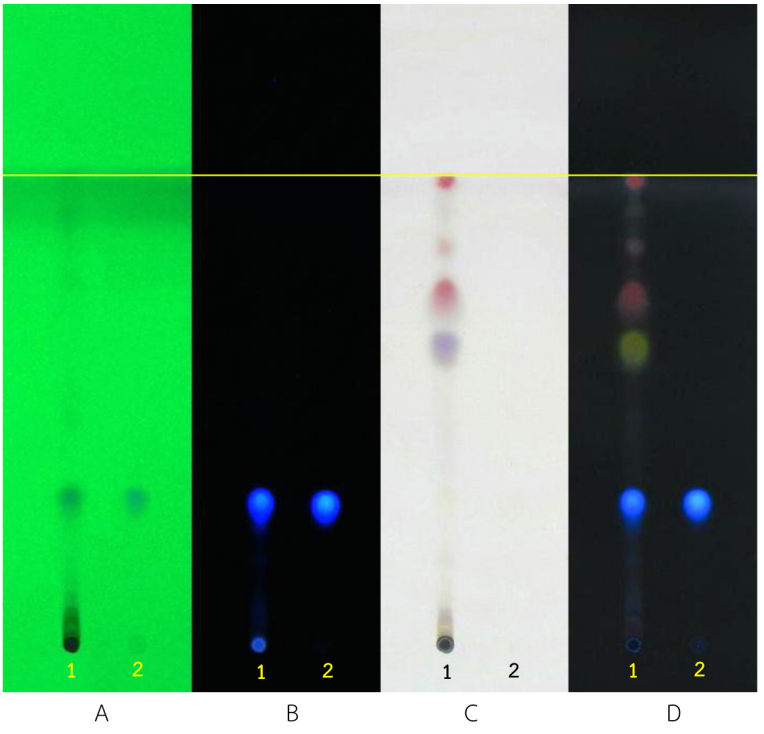
**ข. วัฏภาคคงที่** ได้ทำการเปรียบเทียบผลของคอลัมน์ชนิดต่าง ๆ ที่แตกต่างกันในเรื่องของชนิดอนุภาคภายใน (BEH C18, BEH C8 และ BEH Phenyl) ความยาวของคอลัมน์ (50 และ 100 มิลลิเมตร) โดยพิจารณาจากลักษณะ peak ของสโกโพเลทิน (peak shape และ peak symmetry) และ retention time พบว่า คอลัมน์ชนิด BEH C18, 2.1x100 mm, 1.7 $\mu$m ให้ peak ของสารสโกโพเลทินดีที่สุด ที่ retention time 1.1 นาที

**ค. วัฏภาคเคลื่อนที่** ผลการศึกษาชนิดและสัดส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่จะเลือกใช้โดยพิจารณาจาก peak shape และ retention time ของสารสโกโพเลทิน ความสามารถในการแยก impurity อื่นออกจากสารสโกโพเลทินในตัวอย่างผลยอ และความดันของระบบในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์นี้เลือกใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ซึ่งประกอบด้วย A. ส่วนผสมของเมทานอล-อะซีโตไนไตรล์ ในอัตราส่วน 1:1 B. น้ำกำจัดอิออน และทำ gradient elution ด้วยอัตราการไหล 0.45 มิลลิลิตร/นาที อุณหภูมิของตัวอย่างและอุณหภูมิของคอลัมน์ 30 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

จากผลการศึกษาข้างต้น สามารถสรุปวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารสโกโพเลทิน ได้ดังนี้

**การเตรียมตัวอย่าง**

นำผงตัวอย่างผลยอ น้ำหนัก 1 กรัม มาสกัดด้วยเมทานอล ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ด้วยวิธีต้มสกัดเป็นเวลา 30 นาที กรอง แล้วระเหยเพื่อลดปริมาตร แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอลจนครบ 25




**รูปที่ 2** TLC chromatogram ของสารสกัดเมทานอลจากผลยอ

1. สารสกัดเมทานอลจากผลยอ
2. สารสโกโพเลทิน

การตรวจวัด

A. UV 254 นาโนเมตร

B. UV 365 นาโนเมตร

C. Anisaldehyde–$H_2SO_4$, visible

D. Anisaldehyde–$H_2SO_4$, UV 365 นาโนเมตร

มิลลิลิตร

**การเตรียมสารละลายมาตรฐาน**

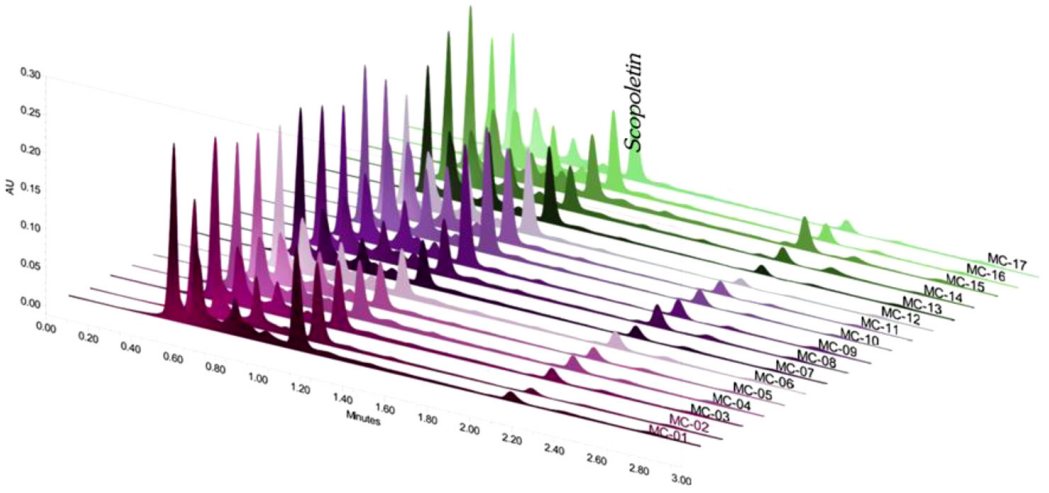
เตรียมสารละลายสารสโกโพเลทินในเมทานอล จำนวน 6 ระดับความเข้มข้น ในช่วง 8-48 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

**ระบบโครมาโทกราฟี**

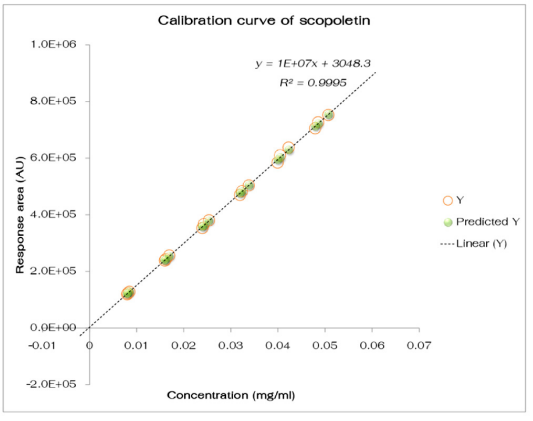
นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ฉีดเข้าสู่ระบบโครมาโทกราฟีซึ่งประกอบด้วย คอลัมน์ชนิด BEH C18, 2.1 × 100 mm, 1.7 $\mu$m และวัฏภาคเคลื่อนที่ประกอบด้วย A. เมทานอล-อะซีโตไนไตรล์ อัตราส่วน 1:1 และ B. น้ำกำจัดอิออน ทำ gradient elution อัตราการไหล 0.45 มิลลิลิตร/นาที และตรวจวัดสารด้วย UV ที่ความยาวคลื่น 345 นาโนเมตร โดย peak ของสารสโกโพเลทินจะปรากฏที่ retention time เท่ากับ 1.09 นาที chromatogram ของสารละลายตัวอย่างผลยอ ดังแสดงในรูปที่ 3

**2.4 การทดสอบความใช้ได้ของวิธี**

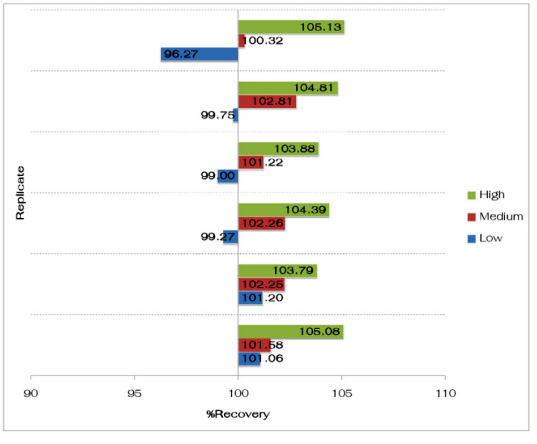
พบว่า calibration curve ของสารสโกโพ-



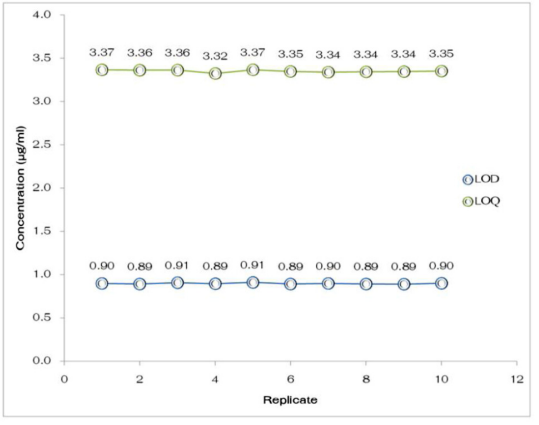

**รูปที่ 3** UPLC chromatogram ของสารละลายตัวอย่างผลยอ




**รูปที่ 4** calibration curve ของสารสโกโพเลทิน




**รูปที่ 5** ค่า %recovery ของวิธีวิเคราะห์

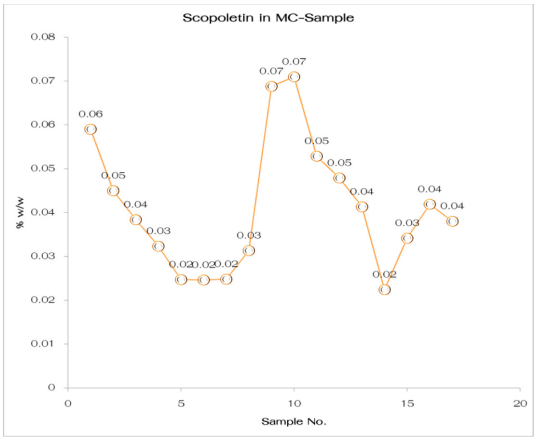



**รูปที่ 6** ค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) และขีดจำกัดของการหาปริมาณ (LOQ)

เลทินมีความเป็นเส้นตรงในช่วง 8-48 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีค่า correlation coefficient ($R^2$) เท่ากับ 0.9995 ค่า %recovery อยู่ในช่วง 95-105% มีค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) และขีดจำกัดของการหาปริมาณ (LOQ) เท่ากับ 1 และ 3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4-6

**3. การสำรวจคุณภาพของผลยอ**

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารสโกโพเลทินในผล




**รูปที่ 7** ปริมาณสารสโกโพเลทินในผลยอ

ยอ จำนวน 17 ตัวอย่าง ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น ผลแสดงดังรูปที่ 7

พบว่า ปริมาณสารสโกโพเลทินสูงสุดและต่ำสุดมีค่าเท่ากับ 0.07% และ 0.02% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ มีค่าเฉลี่ยของปริมาณสารดังกล่าว เท่ากับ 0.042% โดยน้ำหนัก

## อภิปรายผล

เมื่อทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญสโกโพเลทินในผลยอที่พัฒนาขึ้น พบว่าวิธีที่ดังกล่าวมีความเหมาะสม ให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง แม่นยำ รวดเร็ว สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมคุณภาพสมุนไพรชนิดนี้ต่อไปได้

ผลการศึกษาปริมาณสารสโกโพเลทินในตัวอย่างผลยอ จำนวน 17 ตัวอย่าง จะเห็นได้ว่าปริมาณสารสูงสุดและต่ำสุดมีความแตกต่างกันอย่างน้อย 3 เท่า ดังนั้น การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญดังกล่าวจึงมีความสำคัญสำหรับการควบคุมคุณภาพสมุนไพรชนิดนี้ และมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องศึกษาในตัวอย่างผลยอเพิ่มเติมเพื่อนำไปสู่การกำหนดเกณฑ์มาตรฐานของสารสโกโพเลทินในสมุนไพรชนิดนี้ต่อไป

## ข้อสรุป

การวิเคราะห์หาปริมาณสารสโกโพเลทินในผลยอมีวิธีการดังนี้ นำผงตัวอย่างผลยอ 1 กรัม มาต้มสกัดด้วย เมทานอล 30 มิลลิลิตร กรอง ระเหยลดปริมาตรและปรับปริมาตรด้วยเมทานอล จนครบ 25 มิลลิลิตร จากนั้นสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ฉีดเข้าสู่ระบบ UPLC ใช้คอลัมน์ชนิด BEH C18, 2.1 × 100 มิลลิเมตร, 1.7 ไมโครเมตร และ A. เมทานอล-อะซีโตไนไตรล์ (1:1) B. น้ำ เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ทำ gradient elution อัตราการไหล 0.45 มิลลิลิตร/นาที อุณหภูมิของตัวอย่างและคอลัมน์ที่ 30 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และตรวจวัดสารด้วย UV ที่ความยาวคลื่น 345 นาโนเมตร โดย peak ของสารสโกโพเลทินจะปรากฏที่ retention time เท่ากับ 1.09 นาที ส่วนผลการศึกษาคุณภาพของผลยอ จำนวน 17 ตัวอย่าง ซึ่งวัดจากปริมาณสารสโกโพเลทิน จะพบว่า ปริมาณสูงสุดและต่ำสุดของสารดังกล่าวมีความแตกต่างกันค่อนข้างมาก ดังนั้น การควบคุมคุณภาพของสมุนไพรชนิดนี้จึงมีความสำคัญ

### References

1. Office of Forest Herbarium, Forest and Plant Conservation Research Office, Department of National Parks, Wildlife and Plant Conservation. Tem Smitinand's Thai plant names. 2014 revised edition. Bangkok: National Office of Buddhism Printing House; 2014. (in Thai)
2. *Morinda citrifolia*. [Internet]. [cited 2013 Jun 10]; Available from http://www. rspg.or.th/plants_data/herbs/herbs_11_5.htm
3. Chan-Blanco Y, Vaillant F, Perez AM, Reynes M,

Brillouet J-M, Brat P. The noni fruit (*Morinda citrifolia* L.): a review of agricultural research, nutritional and therapeutic properties. J Food Comp Anal. 2006;19:645-54.

4. West BJ, Deng S. Thin layer chromatography methods for rapid identity testing of *Morinda citrifolia* L. (noni) fruit and leaf. Adv J Food Sci Tech. 2010;2(5):298-302.
5. Potterat O, Felten RV, Dalsgaard PW, Hamburger M. Identification of TLC markers and quantification by HPLC-MS of various constituents in noni fruit powder and commercial noni-derived products. J Agri Food Chem. 2007;55:7489-94.
6. Deng S, West BJ, Jensen CJ, Basar S, Westendorf J. Development and validation of an RP-HPLC method for the analysis of anthraquinones in noni fruits and leaves. Food Chem. 2009;116:505-8.
7. Ikeda R, Wada M, Nishigaki T, Nakashima K. Quantification of coumarin derivatives in noni (*Morinda citrifolia*) and their contribution of quenching effect on reactive oxygen species. Food Chem. 2009;113:1169-72.
8. Mahattanadul S, Ridtitid W, Nima S, Phdoongsombut N. Effects of *Morinda citrifolia* aqueous fruit extract and its biomarker scopoletin on reflux esophagitis and gastric ulcer in rats. J Ethnopharmacol. 2011;134:243-50.
9. Wagner H, Bladt S. Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas. 2nd ed. Germany: Springer-Verlag; 1996. 359 p.
10. Pattamadilok D, Sakpetch A, Thiemthieprat P, Thana-ariyaroj S, Chuennangchee V, Jiraputtarom A, *et al*. Final report: physico-chemical specification of medicinal plants in Pikad Tripholsamuttan. Part 1. Noni fruits. Nonthaburi: Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences; 2016. 25 p. (in Thai)
11. Department of Medical Sciences. A practical guide for single laboratory method validation of chemical method. Nonthaburi: Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health; 2006. 124 p. (in Thai)