นิพนธ์ต้นฉบับ

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารกลุ่มไทรเทอร์พีนส์ในบัวบกด้วยวิธี UPLC

จิรานุช มิ่งเมือง*, วิไลลักษณ์ ชื่นนางชี, อภิรักษ์ ศักดิ์เพ็ชร, สมจิตร์ เนียมสกุล, ศักดิ์วิชัย อ่อนทอง

สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ จังหวัดนนทบุรี 11000

* ***ผู้รับผิดชอบบทความ:*** *jiranuch.m@dmsc.mail.go.th*

บทคัดย่อ

บัวบก [*Centella asiatica* (L.) Urb., Apiaceae] เป็นสมุนไพรในบัญชียาหลักแห่งชาติ สารสำคัญในบัวบกเป็นสารกลุ่มไทรเทอร์พีนส์ และอนุพันธ์ ซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ ได้แก่ asiaticoside, madecassoside, asiatic acid และ madecassic acid ในบัวบกด้วยวิธี Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) ในวัตถุดิบและสารสกัดบัวบก โดยสกัดสมุนไพรหรือละลายสารสกัดบัวบกด้วย methanol นำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 4 ไมโครลิตร มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UPLC โดยใช้คอลัมน์ Acquity™ UPLC column BEH C_{18}, 2.1 x 50 มิลลิเมตร, 1.7 ไมโครเมตร และใช้ น้ำกลั่น และ acetonitrile เป็น mobile phase อัตราการไหล 0.6 มิลลิลิตร/นาที และตรวจวัดด้วย PDA ที่ความยาวคลื่น 205 นาโนเมตร ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ดังกล่าว พบว่า calibration curve ของ asiaticoside, asiatic acid และ madecassic acid มีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.01-0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ สาร madecassoside มีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.03-0.21 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ค่า coefficient (R^2) เท่ากับ 0.999 ค่า % recovery อยู่ในช่วง 95-105% ค่า HORRAT เท่ากับ 0.06-0.3 ค่า LOD และ LOQ ของ asiaticoside, madecassoside, asiatic acid และ madecassic acid มีค่า LOD เท่ากับ 0.0021, 0.0080, 0.0114 และ 0.01309 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และ LOQ เท่ากับ 0.0081, 0.0283, 0.0410 และ 0.0473 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ตามลำดับ) ซึ่งวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความเหมาะสม และสามารถนำไปใช้เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มไทรเทอร์พีนส์ และอนุพันธ์ ในวัตถุดิบและสารสกัดบัวบกต่อไป

คำสำคัญ: asiaticoside, madecassoside, asiatic acid, madecassic acid, *Centella asiatica*

Received date 06/04/20; Revised date 04/06/20; Accepted date 08/06/20

Quantitative Analysis of Triterpenoids Content in *Centella asiatica* (L.) Urban. by Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC)

Jiranuch Mingmuang*, Vilailak Chuennang-chee, Apirak Sakpetch, Somchit Niumsakul, Sakwichai Onthong

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

***Corresponding author:** jiranuch.m@dmsc.mail.go.th*

Abstract

Gotu kola [*Centella asiatica* (L.) Urban, or *buabok* in Thai] is an herb on the National List of Essential Medicine. The major substances in gotu kola are triterpenes and derivatives with various biological activities. The objective of this study was to develop analytical methods for quantification of asiaticoside, madecassoside, asiatic acid and madecassic acid in gotu kola raw material and extract using the ultra performance liquid chromatographic (UPLC) technique by extracting the powdered drug or dissolving the gotu kola extract with methanol. A 4-μl portion of sample solution was injected into the UPLC system using Acquity UPLC^{TM} column BEH C_{18}, 2.1 x 50 mm, 1.7 μm and using distilled water and acetonitrile as mobile phase, flow rate 0.6 ml/min and measured with a PDA at a wavelength of 205 nm. Linearity was established for asiaticoside, asiatic acid, and madecassic acid at concentration ranges of 0.01-0.1 mg/ml and 0.03-0.21 mg/ml for madecassoside with a determination coefficient (R^2) of 0.999. The % recovery was in the range of 95-105% and HORRAT was in the range of 0.06-0.3. For asiaticoside, madecassoside, asiatic acid and madecassic acid, their LOD values were 0.0021, 0.0080, 0.0114 and 0.01309 mg/ml, respectively, while their LOQ values were 0.0081, 0.0283, 0.0410 and 0.0473 mg/ml, respectively. It has been shown that the developed method is suitable and can be used to analyze the content of triterpenoids in gotu kola. The appropriate specification of triterpenoids content in gotu kola can be established.

Key words: asiaticoside, madecassoside, asiatic acid, madecassic acid, *Centella asiatica*

บทนำและวัตถุประสงค์

บัวบก มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Centella asiatica* (L.) Urban ชื่อพ้อง *Hydrocotyle asiatica* L., *Centella coriacea* Nanfeldt, *Hydrocotyle lunata* Lamarck และ *Trisanthus cochinchinensis* Loureiro วงศ์ Apiaceae มีชื่อไทยว่า ผักหนอก (เหนือ) ผักแว่น (ใต้) ปะหนะเอขาเต๊าะ (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน) มีชื่อจีนว่า Jixuecao และ มีชื่ออังกฤษหลายชื่อ เช่น Centella, Indian Pennywort, Indian Water Navewort, Asiatic Pennywort, Gotu Kola, Brahma-Manduki, Brahmi, Brahmi-Mandukparni, Ghortapre, Matoyahuho บัวบกมีการนำมาใช้เป็นยาและผลิตภัณฑ์สุขภาพ ส่วนที่ใช้คือทั้งต้น แพทย์แผนโบราณใช้ทั้งต้นรักษาอาการช้ำใน บำรุงหัวใจและบำรุงกำลัง รักษาอาการอ่อนเพลียเมื่อยล้า ขับปัสสาวะ ขับโลหิตเสีย รักษาโรคผิวหนัง ใช้รักษาบาดแผล[1-2]

จากรายงานผลการทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาพบว่า สารสกัดจากบัวบกสามารถเพิ่มความสามารถในการจดจำและการเรียนรู้ มีการจดสิทธิบัตรสาร

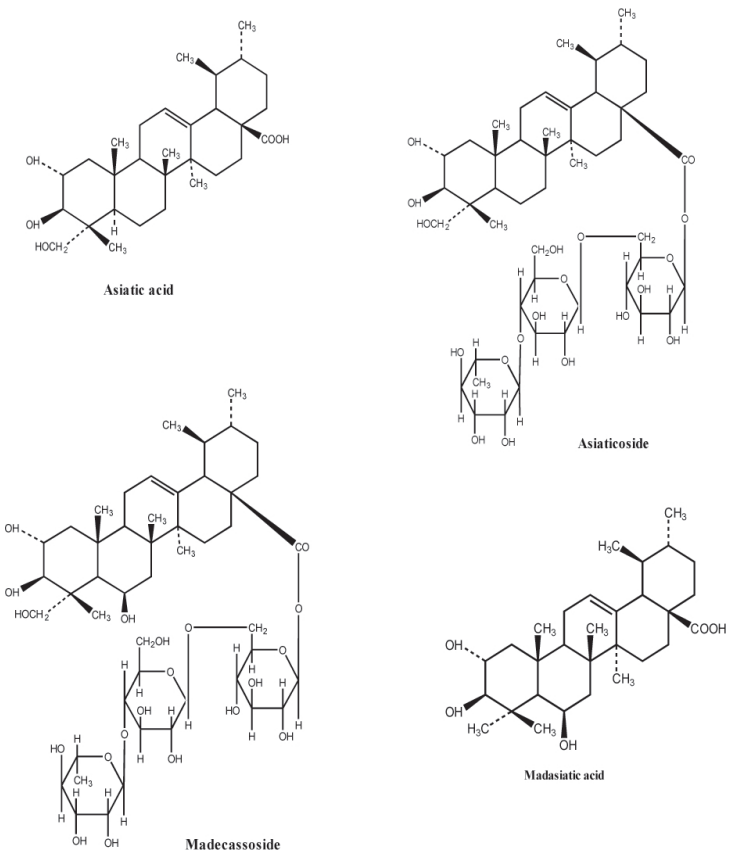
สกัดจากบัวบกในคุณสมบัติช่วยเพิ่มความสามารถในการจำ จากการทดสอบในสัตว์ทดลอง การศึกษาในระดับเซลล์ถึงกลไกการออกฤทธิ์บำรุงสมองพบว่าบัวบกทำให้การหายใจในระดับเซลล์สมองดีขึ้น ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการเสื่อมของเซลล์สมอง คงสภาพปริมาณของ acetylcholine ซึ่งจำเป็นต่อการทำงานของสมอง[3-4]

นอกจากนี้ บัวบกยังมีฤทธิ์ต้านอักเสบ เพิ่มการสร้างคอลลาเจน ช่วยลดความดันเลือดโดยการเพิ่มความยืดหยุ่นให้หลอดเลือด เพิ่มการไหลเวียนของหลอดเลือดดำ[4] รวมทั้งช่วยให้แผลหายเร็วขึ้น[5] ปัจจุบันครีมบัวบกถูกบรรจุอยู่ในบัญชียาหลักแห่งชาติ[6] ใช้รักษาแผล ป้องกันการเกิดแผลเป็น[7]

ปัจจุบัน มีการนำบัวบกมาใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย การควบคุมคุณภาพจึงมีความสำคัญ เพื่อให้เลือกวัตถุดิบบัวบกที่ดีและมีปริมาณสารสำคัญสูง เพื่อใช้ในการผลิตยาและผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรที่มีคุณภาพดี อย่างไรก็ตามการศึกษาเชิงปริมาณของสารไทรเทอร์พีนส์ ในบัวบกมีรายงานการวิเคราะห์ปริมาณ asiaticoside, madecassoside, asiatic acid และ madecassic acid ด้วยวิธี HPLC[8-13] และวิธี HPTLC[14-15] นอกจากนี้ได้มีการบรรจุวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มไทรเทอร์พีนส์ และอนุพันธ์ของบัวบกด้วยวิธี HPLC ในตำรามาตรฐานยาของประเทศสหรัฐอเมริกา[16] แต่เนื่องจากการวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มไทรเทอร์พีนส์ในบัวบกด้วยวิธี HPLC ใช้เวลานาน สำหรับประเทศไทย มีข้อกำหนดคุณภาพในด้านเคมีฟิสิกส์[17] แต่ยังมิได้มีการกำหนดปริมาณสารสำคัญ และยังไม่มีรายงานการจัดทำมาตรฐานทางเคมีของสารสกัดสมุนไพรดังกล่าว ทั้งนี้เพื่อเป็นการยกระดับด้านมาตรฐานคุณภาพของสารสกัดสมุนไพรเพื่อประโยชน์เชิงพาณิชย์

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญโดยใช้วิธี UPLC ซึ่งเป็นวิธีที่ให้ความถูกต้องแม่นยำ สะดวก รวดเร็วและเชื่อถือได้ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการประเมินคุณภาพ

ภาพที่ 1 ต้น และดอก สมุนไพรบัวบก [*Centella asiatica* (L.) Urban.]



ภาพที่ 2 โครงสร้างสารไทรเทอร์พีนส์ที่พบในบัวบก

วัตถุดิบบัวบกที่พบในประเทศไทย และใช้ในการวิจัยและพัฒนาตำรับยาและผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรที่มีบัวบกเป็นส่วนผสม

ระเบียบวิธีศึกษา

วัสดุ

1. ตัวอย่างบัวบก

1.1 ตัวอย่างวัตถุดิบสมุนไพรบัวบก

รวบรวมวัตถุดิบสมุนไพรบัวบก จำนวน 9 ตัวอย่าง ในช่วงเดือนพฤษภาคม ถึง สิงหาคม 2560 เป็นสมุนไพรสดจากแหล่งธรรมชาติ ตรวจระบุชนิดให้ทราบชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องตามหลักอนุกรมวิธานพืชจำนวน 1 ตัวอย่าง (authentic) และสมุนไพรแห้งจากร้านขายยาสมุนไพรจากภาคต่าง ๆ ในประเทศจำนวน 8 ตัวอย่าง ตัวอย่างบัวบกสดนำมาล้างทำความสะอาด หั่นเป็นชิ้น ๆ ผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำมาอบในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน นำมาบดเป็นผง นำไปผ่านแร่งเบอร์ 180 แล้วเก็บใส่ขวดแก้วสีชาปิดสนิท ส่วนสมุนไพรแห้งนำมาอบในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสจนแห้ง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อไล่ความชื้น แล้วนำมาบดเป็นผง ผ่านแร่งเบอร์ 180 แล้วเก็บใส่ขวดแก้วสีชาปิดสนิท ตรวจสอบตัวอย่างที่นำมาศึกษาโดยนำตัวอย่างสมุนไพรมาตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีโครมาโทกราฟีชนิดผิวบางโดยเปรียบเทียบลักษณะโครมาโทแกรมกับตัวอย่าง

อ้างอิง (authentic)

1.2 ตัวอย่างสารสกัดบัวบก

นำตัวอย่างวัตถุดิบสมุนไพรบัวบก (แห้ง) ที่ได้จาก ข้อ 1.1 จำนวน 9 ตัวอย่าง บดหยาบ แล้วนำมาสกัดด้วย 95% v/v ethanol โดยวิธี soxhlet extraction นำสารสกัดที่ได้มากรอง แล้วระเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator แล้วเก็บสารสกัดใส่ขวดแก้วสีชาปิดสนิท

1.3 ตัวอย่างสารสกัดบัวบกที่มีจำหน่ายในท้องตลาด

ซื้อตัวอย่างสารสกัดบัวบกที่มีจำหน่ายในท้องตลาด จำนวน 2 ตัวอย่าง ได้แก่ Centella extract (liquid) และ Pennywort extract powder นำมาเก็บในขวดแก้วสีชาปิดสนิท

2. สารมาตรฐาน

asiaticoside ความบริสุทธิ์ ≥ 98% (Chengdu Biopurify, China)

madecassoside ความบริสุทธิ์ ≥ 98% (Chengdu Biopurify, China)

asiatic acid ความบริสุทธิ์ ≥ 98% (Chengdu Biopurify, China)

madecassic acid ความบริสุทธิ์ ≥ 98% (Chengdu Biopurify, China)

3. สารเคมีและตัวทำละลาย

methanol (AR grade)

acetonitrile (HPLC grade)

น้ำ (deionized water)

4. เครื่องมือ

Acquity™ Ultra Performance Liquid Chromatography - PDA detector

(Water®, USA)

Mettler Toledo Analytical Balance

Retsch AS200 Basic Sieve

water bath

5. วัสดุวิทยาศาสตร์

Acquity™ UPLC column BEH C_{18}, 2.1 x 50 มิลลิเมตร, 1.7 ไมโครเมตร, PVDF membrane filter 0.2 ไมโครเมตร, Membrane filter 0.45 ไมโครเมตร, Nylon filter syringe 0.2 ไมโครเมตร, กระดาษกรองเบอร์ 4 และเครื่องแก้ว

วิธีการศึกษา

1. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารไทรเทอร์พีนส์ ในวัตถุดิบและสารสกัดบัวบก

1.1 การเลือกชนิดของตัวทำละลายในการสกัด

สกัดผงบัวบกน้ำหนัก 100 มิลลิกรัมด้วยน้ำกลั่น, 50% (v/v) methanol และ methanol ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ด้วยวิธี reflux เป็นเวลา 30 นาที กรองนำสารสกัดด้วยน้ำ และ สารสกัด 50% (v/v) methanol ไประเหยแห้งแล้วละลายกลับและปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 50 มิลลิลิตร โดยใช้ volumetric flask ส่วนสารสกัด methanol ให้กรองแล้วปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 50 มิลลิลิตร โดยใช้ volumetric flask แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UPLC เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการสกัดสารไทรเทอร์พีนส์ ได้แก่ asiaticoside (AS), madecassoside (MS), asiatic acid (AA) และ madecassic acid (MA) จากบัวบกของตัวทำละลายแต่ละชนิด

1.2 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัด

สกัดตัวอย่างบัวบก น้ำหนัก 100 มิลลิกรัม ด้วย 50% (v/v) methanol ด้วยวิธี reflux เป็นเวลา

30, 60 และ 120 นาที กรองนำสารสกัดไประเหยแห้ง แล้วละลายกลับและปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 50 มิลลิลิตร โดยใช้ volumetric flask แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UPLC เพื่อเปรียบเทียบระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดสารไทรเทอร์พีนส์ ได้แก่ AS, MS, AA และ MA จากบัวบก

1.3 ความยาวคลื่นในการตรวจวิเคราะห์สาร asiaticoside (AS), madecassoside (MS), asiatic acid (AA) และ madecassic acid (MA)

วัดการดูดกลืนแสง UV ของสารไทร-เทอร์พีนส์ ได้แก่ AS, MS, AA และ MA เพื่อดูความยาวคลื่นที่สารนี้สามารถดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) ของสารแต่ละชนิด และวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างบัวบกโดยใช้ PDA เพื่อเลือกความยาวคลื่นสำหรับการตรวจวัด AS, MS, AA และ MA โดยที่ไม่พบการเกิด co-elute

1.4 วัฏภาคคงที่และวัฏภาคเคลื่อนที่

วัฏภาคคงที่ เปรียบเทียบผลของคอลัมน์ชนิดต่าง ๆ ที่แตกต่างกัน ได้แก่ ชนิดอนุภาคภายในคอลัมน์ (BEH C_{18} และ BEH phenyl) ความยาวคอลัมน์ (50 และ 100 มิลลิเมตร) โดยพิจารณาเลือกคอลัมน์จากลักษณะ peak ของ AS, MS, AA และ MA (peak shape และ peak symmetry) และ retention time

วัฏภาคเคลื่อนที่ ศึกษาชนิดและสัดส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ โดยพิจารณาจาก peak shape และ retention time ของ AS, MS, AA และ MA ในสารละลายตัวอย่างบัวบก

1.5 การวิเคราะห์ปริมาณสารไทรเทอร์พีนส์ asiaticoside (AS), madecassoside (MS), asiatic acid (AA) และ madecassic acid (MA)

โดยสรุปวิธีจากผลการศึกษาข้อ 1.1-1.4

2. การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ทางเคมี

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารไทรเทอร์พีนส์ (AS, MS, AA และ MA) ในวัตถุดิบและสารสกัดบัวบกที่พัฒนาขึ้นตามแนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข[18]

2.1 ความเป็นเส้นตรง (linearity) และช่วงการวิเคราะห์ (range)

เตรียมสารละลายสารมาตรฐานจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ AS, MS, AA และ MA ที่ 6 ระดับความเข้มข้น โดยมีความเข้มข้นของ AS, AA และ MA ตั้งแต่ 0.01-0.08 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และ MS ตั้งแต่ 0.03-0.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยฉีดความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ 3 ครั้ง ด้วยเครื่อง UPLC นำค่า peak area และความเข้มข้นของสารละลาย AS, MS, AA และ MA ไปสร้าง calibration curve ศึกษา linearity โดยพิจารณาจาก coefficient (R^2) และช่วงความเข้มข้นที่ทำการทดสอบ (range)

2.2 ความแม่น (accuracy) และความเที่ยง (precision)

เติมสารมาตรฐาน (spike) แต่ละชนิด ที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ในช่วงการใช้งาน 3 ระดับลงใน sample blank แล้ววิเคราะห์ sample blank (unspiked) จำนวน 6 ซ้ำ และวิเคราะห์ spike sample ระดับละ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำทำ duplicate จากนั้นคำนวณค่า % recovery, %RSD และ HORRAT

$$\% \text{ recovery} = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100$$

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 ซ้ำ จากนั้นคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ y-intercept (Sy/x) และคำนวณค่า LOD โดยค่า LOD คือค่าความเข้มข้นที่ response กับ y-intercept + 3Sy/x (คำนวณจากกราฟมาตรฐานของสารแต่ละชนิด)

2.4 ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ)

LOQ คำนวณโดย LOQ มีค่าเท่ากับ 10 เท่าของ Sy/x (คำนวณจากกราฟมาตรฐานของสารแต่ละชนิด)

2.5 ความจำเพาะ (specificity)

วิเคราะห์ method blank โดยสกัดและวิเคราะห์ตามวิธีที่พัฒนาใช้สารเคมีทั้งหมด แต่ไม่มีตัวอย่างเพื่อตรวจสอบสารรบกวนที่อาจมาจากสารเคมีหรืออุปกรณ์ที่ใช้

3. การวิเคราะห์ปริมาณสารไทรเทอร์พีนส์ [asiaticoside (AS), madecassoside (MS), asiatic acid (AA) และ madecassic acid (MA)] ในวัตถุดิบและสารสกัดบัวบก

3.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารไทรเทอร์พีนส์ [asiaticoside (AS), madecassoside (MS), asiatic acid (AA) และ madecassic acid (MA)] ในวัตถุดิบและสารสกัดบัวบกที่เตรียมขึ้นในห้องปฏิบัติการ

วิเคราะห์ปริมาณสารไทรเทอร์พีนส์ (AS, MS, AA และ MA) ในวัตถุดิบสมุนไพรบัวบก จำนวน 9 ตัวอย่าง ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นในข้อ 1.5

3.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารไทรเทอร์พีนส์ [asiaticoside (AS), madecassoside (MS), asiatic acid (AA) และ madecassic acid (MA)] ในสารสกัดบัวบกที่ขายในท้องตลาด (commercial extract)

วิเคราะห์ปริมาณสารไทรเทอร์พีนส์ (AS, MS, AA และ MA) ในสารสกัดบัวบก ที่มีจำหน่ายในท้องตลาด จำนวน 2 ตัวอย่าง ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นในข้อ 1.5 นำมาเปรียบเทียบกับสารสกัดบัวบกที่เตรียมขึ้นในห้องปฏิบัติการ

ผลการศึกษา

1. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารไทรเทอร์พีนส์ ในวัตถุดิบบัวบก

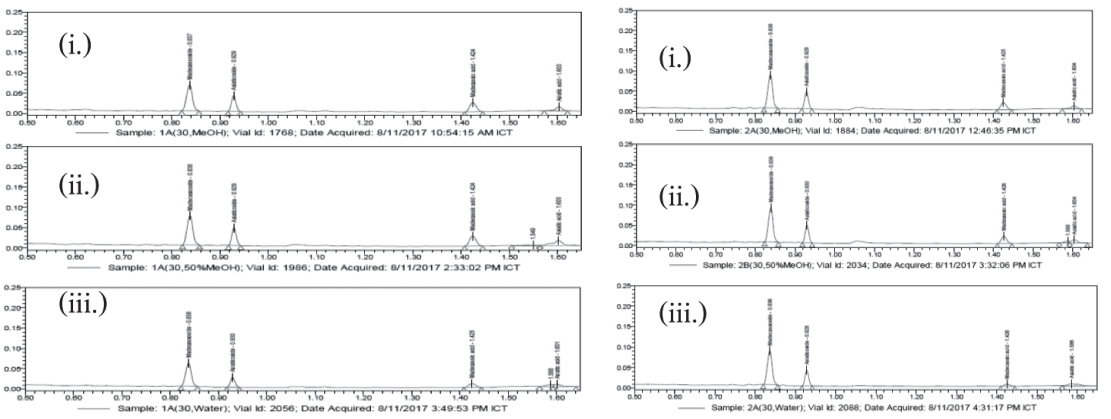
1.1 ชนิดของตัวทำละลายในการสกัด

ผลการศึกษาพบว่า เมื่อนำสารละลายที่ได้จากการสกัดบัวบกด้วย methanol, 50% v/v methanol และ น้ำกลั่น มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UPLC พบ peak ของ AS, MS, AA และ MA ที่ retention time 0.928-0.930, 0.836-0.839, 1.602-1.604 และ 1.424-1.427 นาที ตามลำดับ โดยการสกัดสารกลุ่มไทรเทอร์พีนส์ ด้วย methanol ให้ปริมาณสารไทรเทอร์พีนส์สูงสุด (ภาพที่ 3)

ดังนั้น ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ AS, MS, AA และ MA ในบัวบก จึงเลือกใช้ methanol เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ในการสกัดตัวอย่างบัวบก

1.2 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัด

ผลการศึกษาพบว่า เมื่อสกัดตัวอย่างบัวบก



Solvent	Sample	AS	MS	AA	MA
Water	Sample 1	15495	48382	6637	8909
	Sample 2	24856	68493	13168	5417
50% (v/v) MeOH	Sample 1	25188	53250	9728	21741
	Sample 2	27385	67281	6665	16343
MeOH	Sample 1	27727	59325	15559	23503
	Sample 2	27588	69678	8496	17110

ภาพที่ 3 ผลการสกัดสาร asiaticoside (AS), madecassoside (MS), asiatic acid (AA) และ madecassic acid (MA) ในบัวบกด้วยตัวทำละลาย (i) น้ำ, (ii) 50% (v/v) methanol และ (iii.) methanol

น้ำหนัก 200 มิลลิกรัม โดยการ reflux ด้วย methanol เป็นเวลา 30, 60 และ 120 นาที แล้วนำมาวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มไทรเทอร์พีนส์ด้วยเครื่อง UPLC พบว่าพื้นที่ใต้กราฟของ peak ของ AS, MS, AA และ MA ทั้งการสกัดสารที่เวลา 1 และ 2 ชั่วโมง ไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 4)

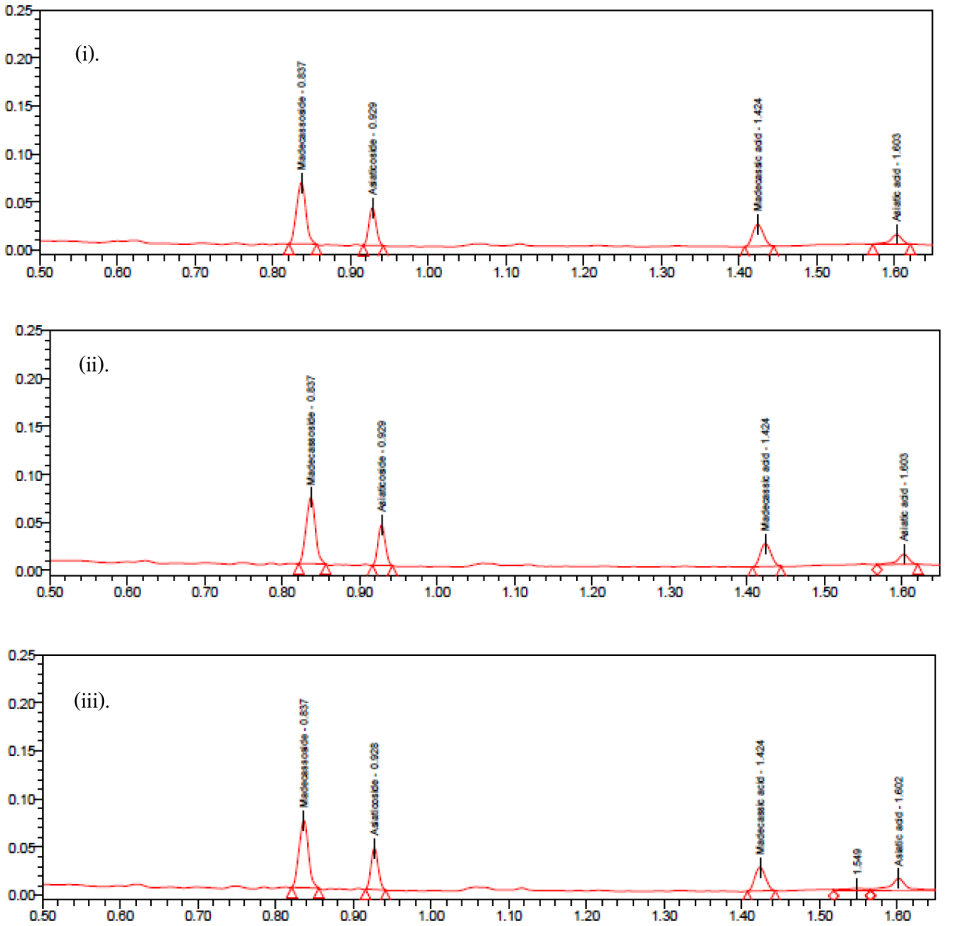
ดังนั้นในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารไทรเทอร์พีนส์ในวัตถุดิบบัวบกจึงเลือกใช้ methanol เป็นตัวทำละลาย และใช้เวลาในการสกัดที่เวลา 1 ชั่วโมง

1.3 ความยาวคลื่นในการตรวจวิเคราะห์สาร asiaticoside (AS), madecassoside (MS), asiatic acid (AA) และ madecassic acid (MA)

ความยาวคลื่นในการตรวจวิเคราะห์สาร AS, MS, AA และ MA วัดการดูดกลืนแสง UV ของ AS, MS, AA และ MA พบว่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) มีค่าเท่ากับ 205 นาโนเมตร และเมื่อวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างบัวบก ด้วยเครื่อง UPLC โดยใช้ PDA เป็น detector ที่ความยาวคลื่น 205 นาโนเมตร ไม่พบการเกิด co-elute ของสารอื่น

1.4 วัฏภาคคงที่และวัฏภาคเคลื่อนที่

วัฏภาคคงที่ การเปรียบเทียบผลของคอลัมน์ชนิดต่าง ๆ ที่แตกต่างกันในกรณีชนิดอนุภาคภายในคอลัมน์ พบว่า UPLC chromatographic finger-print ของสารละลายตัวอย่างบัวบกและตรวจวัดด้วย PDA ที่ความยาวคลื่น 205 นาโนเมตร โดยใช้ water และ acetonitrile เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ เมื่อใช้ UPLC column ชนิด BEH C_{18}, 2.1 x 50 มิลลิเมตร, 1.7



ภาพที่ 4 ผลของระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดสาร asiaticoside (AS), madecassoside (MS), asiatic acid (AA) และ madecassic acid (MA)ในบัวบกด้วยระยะเวลา (i) 30 นาที, (ii) 60 นาที, และ (iii.) 120 นาที

ไมโครเมตร พบ UPLC chromatogram ของสารกลุ่มไทรเทอร์พีนส์ได้แก่ AS, MS, AA และ MA ที่ retention time 0.928-0.930, 0.836-0.839, 1.602-1.604 และ 1.424-1.427 นาที ตามลำดับ และสามารถแยกออกจาก impurity อื่น ๆ ได้ดี จึงเลือกใช้ UPLC column ชนิดดังกล่าวในการวิเคราะห์ปริมาณสารไทรเทอร์พีนส์ในบัวบกที่ถูกพัฒนาขึ้น

วัฏภาคเคลื่อนที่ เมื่อเปลี่ยนองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ จาก acetonitrile เป็น methanol พบว่า retention time ของสารกลุ่มไทรเทอร์พีนส์ได้แก่ AS, MS, AA และ MA เปลี่ยนจาก 0.928 เป็น 0.960, 0.836 เป็น 0.924, 1.602 เป็น 2.440 และ 1.424 เป็น 1.594 นาที ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีการแยก (resolution) ของสารกลุ่มไทรเทอร์พีนส์ ที่ด้อยกว่าการใช้ acetonitrile เป็นส่วนผสม

1.5 การวิเคราะห์ AS, MS, AA และ MA โดยสรุปวิธีจากผลการศึกษาข้อ 1.1-1.4

การวิเคราะห์ปริมาณสาร AS, MS, AA และ MA ในวัตถุดิบและสารสกัดบัวบก

การเตรียมสารละลายตัวอย่างวัตถุดิบบัวบก

สกัดผงบัวบก น้ำหนัก 100 มิลลิกรัม ด้วย methanol ปริมาตร 25 มิลลิลิตร โดยวิธี reflux เป็น

เวลา 1 ชั่วโมง กรองและปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 50 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน AS, MS, AA และ MA

การเตรียมสารละลายตัวอย่างสารสกัดบัวบก

ชั่งสารสกัดบัวบกน้ำหนัก 20 มิลลิกรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรจนครบ ด้วย methanol

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ชั่งสารมาตรฐาน AS, MS, AA และ MA น้ำหนัก 30 มิลลิกรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 250 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางให้ได้ 6 ระดับ โดยสารละลายของสารมาตรฐาน AS, AA และ MA เตรียมความเข้มข้นที่ 0.01-0.08 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ สารละลายสารมาตรฐาน MS เตรียมความเข้มข้นที่ 0.03-0.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

สภาวะของระบบโครมาโทกราฟี

วัฏภาคคงที่ Column: Acquity® UPLC BEH C_{18} 1.7 μm, 2.1 **x** 50 mm

อุณหภูมิคอลัมน์ 40 องศาเซลเซียส

วัฏภาคเคลื่อนที่ Gradient Water: Acetonitrile

อัตราการไหล 0.6 มิลลิลิตร/นาที

การตรวจวัดสาร PDA ที่ความยาวคลื่น 205 นาโนเมตร

ปริมาตรการฉีด 4 ไมโครลิตร

2. การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ทางเคมี

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสาร AS, MS, AA และ MA ในวัตถุดิบและสารสกัดบัวบกที่พัฒนาขึ้นตามแนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข[18]

ตารางที่ 1 วัฏภาคเคลื่อนที่แบบ Gradient program

time (min)	flow (ml/min)	water	acetonitrile
initial	0.6	85	15
1.5	0.6	40	60
2.0	0.6	0	100
3.0	0.6	0	100
4.0	0.6	85	15

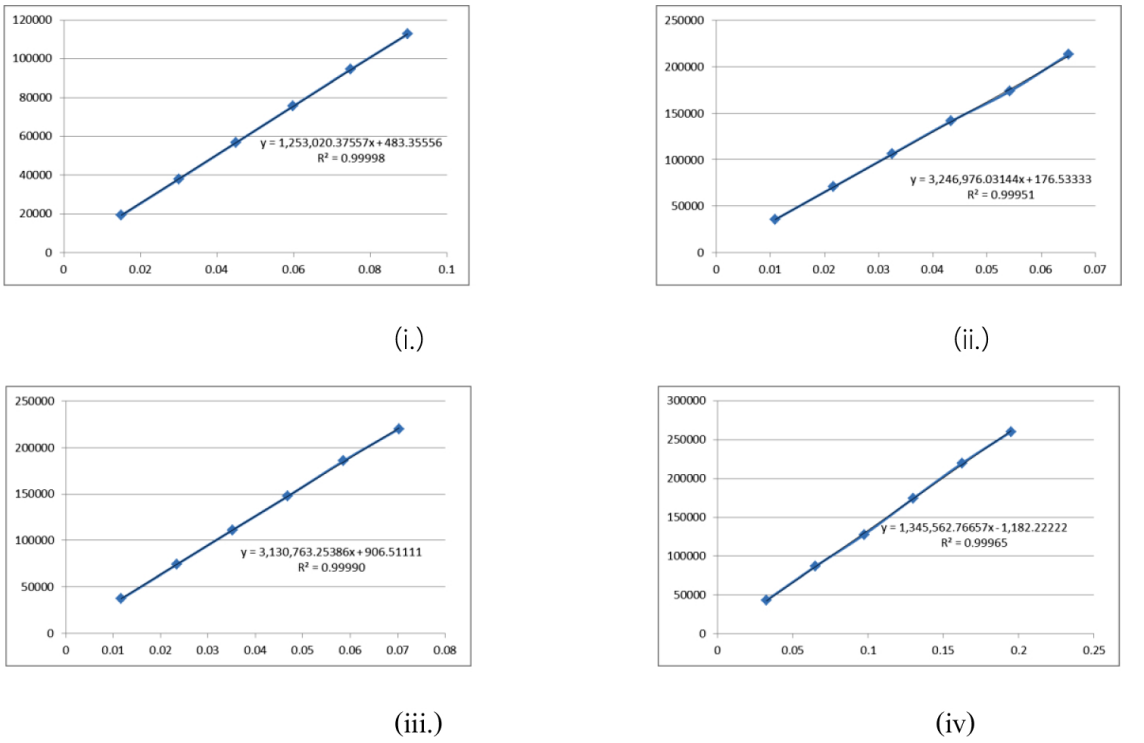
2.1 ความเป็นเส้นตรง (linearity) และช่วงการวิเคราะห์ (range)

การทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) และช่วงการวิเคราะห์ (range) โดยฉีดสารละลายสาร AS, MS, AA และ MA ที่ 6 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ 3 ครั้ง ด้วยเครื่อง UPLC นำค่า peak area และความเข้มข้นของสารละลาย สารมาตรฐาน AS, MS, AA และ MA ไปสร้าง calibration curve ผลการศึกษาดังภาพที่ 5

จากภาพที่ 5 พบว่า calibration curve ของสารมาตรฐาน AS (i), MS (ii), AA (iii.) และ MA (iv) มีลักษณะเป็นเส้นตรง โดยสารมาตรฐาน AS, AA และ MA มีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.01-0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ สารมาตรฐาน MS มีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.03-0.21 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยสารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิด มีค่า coefficient (R^2) เท่ากับ 0.999

2.2 ความแม่น (accuracy) และความเที่ยง (precision)

การทดสอบความแม่น (accuracy) โดยเติมสารมาตรฐาน (spike) ที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ในช่วงการใช้งาน 3 ระดับ ลงใน sample blank แล้ว



ภาพที่ 5 calibration curve ของสารละลายมาตรฐาน asiaticoside (i), asiatic acid (iii) และ madecassic acid (iii) ในช่วงความเข้มข้น 0.01-0.1 และ madecassoside (iv) ในช่วงความเข้มข้น 0.03-0.21 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

วิเคราะห์ sample blank (unspiked) จำนวน 6 ซ้ำ และวิเคราะห์ spike sample ระดับละ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำทำ duplicate ผลการศึกษาดังตารางที่ 2

2.3 ขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD)

พบว่า LOD ของ AS, MS, AA และ MA มีค่าเท่ากับ 0.0021, 0.0080, 0.0114 และ 0.01309 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

2.4 ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ)

LOQ จากการคำนวณ ของ AS, MS, AA และ MA มีค่าเท่ากับ 0.0081, 0.0283, 0.0410 และ 0.0473 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

2.5 ความจำเพาะ (specificity)

วิเคราะห์ method blank สารรบกวน peak ของ AS, MS, AA และ MA

3. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสาร asiaticoside (AS), madecassoside (MS), asiatic acid (AA) และ madecassic acid (MA) ในวัตถุดิบและสารสกัดบัวบก

3.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารไทรเทอร์พีนส์ [asiaticoside (AS), madecassoside (MS), asiatic acid (AA) และ madecassic acid (MA)] ในวัตถุดิบและสารสกัดบัวบกที่เตรียมขึ้นในห้องปฏิบัติการ

ผลการวิเคราะห์ปริมาณ AS, MS, AA และ MA ในวัตถุดิบ จำนวน 9 ตัวอย่าง พบว่า ปริมาณ AS, MS,

ตารางที่ 2 ผลการศึกษาความแม่นและความเที่ยงของสาร asiaticoside, madecassoside, asiatic acid และ madecassic acid

analyte	standard addition level	%spike target	%recovery individual	%recovery average	HORRAT**	% recovery criteria*
asiaticoside	low level	50	100.62	100.36	0.06	95–105
			100.22			
			100.23			
	medium level	100	98.96	99.20	0.17	95–105
			98.50			
			99.15			
	high level	150	98.15	98.14	0.10	95–105
			98.38			
			97.83			
madecassoside	low level	50	104.55	105.46	0.29	95–105
			105.90			
			104.63			
	medium level	100	101.12	102.56	0.29	95–105
			102.68			
			102.74			
	high level	150	103.94	102.59	0.36	95–105
			102.62			
			102.99			
asiatic acid	low level	50	95.27	94.71	0.49	95–105
			95.93			
			93.02			
	medium level	100	104.49	105.91	0.29	95–105
			106.06			
			106.39			
	high level	150	104.47	103.96	0.21	95–105
			104.54			
			104.98			
madecassic acid	low level	50	102.36	103.78	0.24	95–105
			103.33			
			103.51			
	medium level	100	99.51	99.02	0.22	95–105
			99.14			
			98.79			
	high level	150	98.41	99.14	0.19	95–105
			98.65			
			99.95			

*ตาม AOAC Peer-verified methods program on policies and procedures, Arlington, VA, USA (1998)
**การยอมรับความเที่ยง ประเมินจาก HORRAT (< 2)

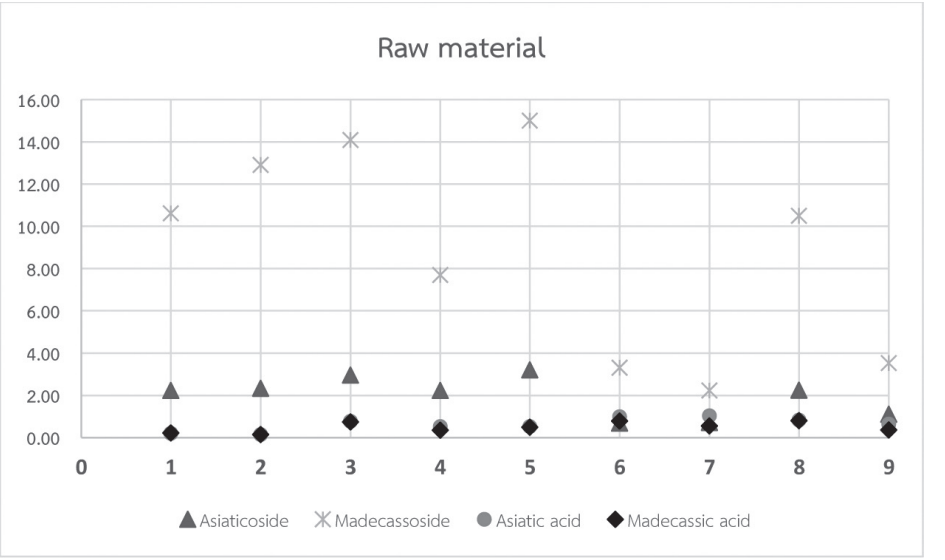
AA และ MA ในวัตถุดิบบัวบก มีค่าระหว่าง 0.69-3.23%, 2.23-15.15%, 0.13-1.03% และ 0.14-0.81% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ และมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับ 0.9, 4.75, 0.31 และ 0.24 ตามลำดับ และ ผลการวิเคราะห์ปริมาณ AS, MS, AA และ MA ในสารสกัดบัวบก มีค่าระหว่าง 2.13-13.27%, 7.48-63.47%, 0.42-3.91% และ 1.01-3.26% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ และมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับ 0.9, 4.75, 0.31 และ 0.24 ตามลำดับ (ตารางที่ 3-4 และภาพที่ 6-7)

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร asiaticoside, madecassoside, asiatic acid และ madecassic acid ในวัตถุดิบบัวบกด้วยวิธี UPLC

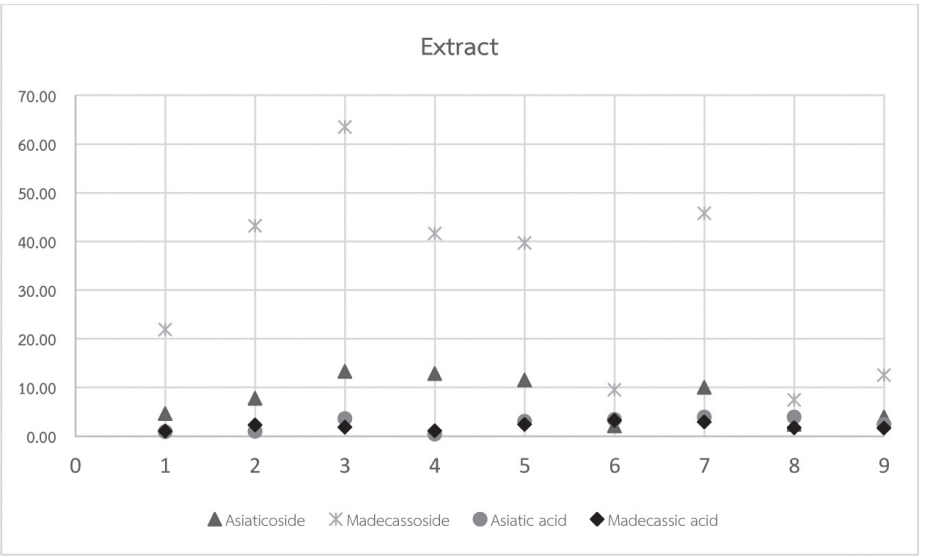
ตัวอย่าง	asiaticoside	madecassoside	asiatic acid	madecassic acid	total triterpenes
1	2.23	10.62	0.20	0.21	13.26
2	2.32	12.92	0.13	0.14	15.51
3	2.95	14.10	0.77	0.74	18.56
4	2.23	7.69	0.52	0.35	10.80
5	3.21	15.01	0.52	0.49	19.23
6	0.69	3.31	0.99	0.78	5.76
7	0.71	2.23	1.03	0.54	4.52
8	2.24	10.50	0.83	0.80	14.37
9	1.10	3.53	0.64	0.35	5.63
ค่าเฉลี่ย	1.97	8.88	0.63	0.49	11.96
SD	0.92	4.90	0.32	0.25	5.61

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร asiaticoside, madecassoside, asiatic acid และ madecassic acid ในสารสกัดบัวบก

ตัวอย่าง	asiaticoside	madecassoside	asiatic acid	madecassic acid	total triterpenes
1	4.62	21.92	0.90	1.01	28.45
2	7.74	43.18	0.97	2.28	54.17
3	13.27	63.47	3.62	1.83	82.19
4	12.87	41.61	0.42	1.11	56.02
5	11.51	39.65	3.02	2.41	56.59
6	2.12	9.52	3.42	3.26	18.33
7	10.01	45.78	3.91	2.94	62.64
8	2.40	7.48	3.91	1.72	15.51
9	3.90	12.51	2.42	1.67	20.50
ค่าเฉลี่ย	7.61	31.68	2.51	2.03	43.82
SD	4.48	19.50	1.39	0.77	23.65
Centella extract (liquid)	21.87	18.37	-	-	40.24
Pennywort extract powder	41.86	27.15	-	-	69.01



ภาพที่ 6 ปริมาณสาร asiaticoside, madecassoside, asiatic acid และ madecassic acid ในวัตถุดิบบัวบก



ภาพที่ 7 ปริมาณสาร asiaticoside, madecassoside, asiatic acid และ madecassic acid ในสารสกัดบัวบก

3.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารไทรเทอร์-พีนส์ [asiaticoside (AS), madecassoside (MS), asiatic acid (AA) และ madecassic acid (MA)] ในสารสกัดบัวบกที่ขายในท้องตลาด (commercial extract)

สารสกัดบัวบก commercial extract ซึ่งมีจำหน่าย 2 ชนิด คือ ชนิดผงแห้ง มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีน้ำตาลอ่อน และชนิดของเหลว เป็นของเหลวใส ไม่มีสี เมื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณ AS, MS, AA และ MA พบว่าสารสกัดบัวบก commercial extract พบเฉพาะพีคของ AS และ MS โดยมีปริมาณ AS, MS ในสารสกัดชนิดผงแห้ง 41.86 และ

27.15 และสารสกัดชนิดของเหลว เท่ากับ 21.87 และ 18.37% โดยน้ำหนัก

อภิปรายผล

บัวบกเป็นสมุนไพรที่มีศักยภาพเชิงพาณิชย์และมีประโยชน์ทั้งเป็นยาและเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพ สามารถนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น เครื่องดื่มสมุนไพร ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง มีรายงานการศึกษาทางวิทยาศาสตร์ทางด้านเคมี เภสัชวิทยาและพิษวิทยามากมายที่สนับสนุนการใช้ แต่การพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์นั้น ปัจจัยที่สำคัญหนึ่งที่ควรคำนึงถึงคือปัจจัยด้านคุณภาพของสมุนไพร เนื่องจากบัวบกมีสารสำคัญกลุ่มไทรเทอร์พีนส์ และไทรเทอร์พีนส์ไกลโคไซด์ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ในการวิเคราะห์ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นใช้ methanol ในการสกัดตัวอย่างวัตถุดิบแล้วนำมาวิเคราะห์ด้วย Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารไทรเทอร์พีนส์เอสเตอร์ไกลโคไซด์ ได้แก่ asiaticoside, madecassoside และ ไทรเทอร์พีนส์ ได้แก่ asiatic acid และ madecassic acid ในวัตถุดิบและสารสกัดบัวบก จากการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ asiaticoside, madecassoside, asiatic acid และ madecassic acid พบว่าการวิเคราะห์มีความแม่นยำ โดยพิจารณาจาก %recovery ของการวิเคราะห์ spike sample อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ (95-105%) และค่า HORRAT อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ (HORRAT < 2) ซึ่งแสดงว่าวิธีดังกล่าวมีความเที่ยง และสามารถนำไปใช้วิเคราะห์หาปริมาณสาร asiaticoside, madecassoside, asiatic acid และ madecassic acid ในตัวอย่างวัตถุดิบและสารสกัดบัวบก สำหรับการควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบและสารสกัดบัวบกต่อไป จากผลการวิเคราะห์ปริมาณสารไทรเทอร์พีนส์เอสเตอร์ไกลโคไซด์ ได้แก่ asiaticoside, madecassoside และ สารไทรเทอร์พีนส์ ได้แก่ asiatic acid และ madecassic acid ในวัตถุดิบและสารสกัดบัวบก จำนวน 9 ตัวอย่าง สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการกำหนดปริมาณสารไทรเทอร์พีนส์เอสเตอร์ไกลโคไซด์ และสารไทรเทอร์พีนส์ในบัวบกได้ โดยกำหนดจากค่าเฉลี่ยของปริมาณสารกลุ่มไทรเทอร์พีนส์รวมในตัวอย่าง ลบด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยมีปริมาณ asiaticoside, madecassoside, asiatic acid และ madecassic acid ในวัตถุดิบมีค่าเท่ากับ 1.07, 4.13, 0.32 และ 0.25% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ และในสารสกัดมีค่าเท่ากับ 3.13%, 12.17%, 1.12%, 1.19% โดยน้ำหนักตามลำดับ และสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลในการกำหนดปริมาณสารไทรเทอร์พีนส์รวมในวัตถุดิบบัวบกและสารสกัด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 5.77%, 17.61% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณสารไทรเทอร์พีนส์เอสเตอร์ไกลโคไซด์ ได้แก่ asiaticoside, madecassoside และ สารไทรเทอร์พีนส์ ได้แก่ asiatic acid และ madecassic acid ในวัตถุดิบบัวบกที่เก็บในประเทศไทย เมื่อเปรียบเทียบกับ WHO monograph และ USP monograph[17] ของสมุนไพรชนิดนี้ ซึ่งมีการกำหนดปริมาณสารไทรเทอร์พีนส์เอสเตอร์ไกลโคไซด์ ได้แก่ asiaticoside และ madecassoside ควรมีปริมาณไม่น้อยกว่า 2.0% โดยน้ำหนัก ซึ่งแสดงให้เห็นว่า สมุนไพรบัวบกของประเทศไทยมีคุณภาพที่ดี และมีปริมาณสารสำคัญสูงกว่าที่มาตรฐานกำหนด

นอกจากนี้ การศึกษาครั้งนี้ ยังได้เปรียบเทียบในสารสกัดบัวบกที่เตรียมขึ้นในห้องปฏิบัติการ โดยเปรียบเทียบกับสารสกัดที่มีขายในท้องตลาด มี 2 ชนิด คือ สารสกัด Centella extract ชนิดของเหลว และ

Pennywort extract powder ดูลักษณะทางกายภาพ และวิเคราะห์ปริมาณสารไทรเทอร์พีนส์ ได้แก่ asiaticoside, madecassoside, asiatic acid และ madecassic acid ในตัวอย่างพบว่า สารสกัดบัวบกที่เตรียมได้ในห้องปฏิบัติการ มีลักษณะเป็นของแข็งกึ่งเหลว มีสีเขียวอ่อน จนกระทั่งสีเขียวขี้ม้า มีกลิ่นเฉพาะตัว แต่สารสกัดบัวบกที่มีจำหน่ายในท้องตลาด ชนิดผง มีลักษณะเป็นผงแห้ง ละเอียด มีสีเหลืองอมน้ำตาล ไม่มีกลิ่น ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารไทรเทอร์พีนส์ ได้แก่ asiaticoside, madecassoside, asiatic acid และ madecassic acid ในตัวอย่าง พบว่า สารสกัดที่เตรียมในห้องปฏิบัติการตรวจพบ สาร asiaticoside, madecassoside, asiatic acid และ madecassic acid ซึ่งสารสกัดที่มีจำหน่ายในท้องตลาด ตรวจพบเฉพาะสารไทรเทอร์พีนส์เอสเตอร์ไกลโคไซด์ คือ asiaticoside และ madecassoside ไม่พบสารไทรเทอร์พีนส์ asiatic acid และ madecassic acid

นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาสัดส่วนของสารไทรเทอร์พีนส์เอสเตอร์ไกลโคไซด์ คือ asiaticoside และ madecassoside จากตัวอย่างวัตถุดิบและสารสกัดบัวบกที่เตรียมจากห้องปฏิบัติการพบว่า สัดส่วนของสารไทรเทอร์พีนส์เอสเตอร์ไกลโคไซด์ คือ madecassoside จะมีปริมาณสูงกว่า asiaticoside โดยพบสัดส่วนของ asiaticoside ต่อ madecassoside ในสัดส่วนประมาณ 1:4 ในทุกตัวอย่าง สำหรับสารสกัดบัวบกที่มีจำหน่ายในท้องตลาดมีสัดส่วนของ madecassoside จะมีปริมาณต่ำกว่า asiaticoside โดยพบสัดส่วนของ asiaticoside ต่อ madecassoside ในสัดส่วนประมาณ 2:1

ข้อสรุป

วิธีวิเคราะห์ปริมาณ asiaticoside, madecassoside, asiatic acid และ madecassic acid ในตัวอย่างบัวบกด้วยเครื่อง UPLC ที่พัฒนาขึ้น โดยสกัดผงบัวบก ด้วย methanol ปริมาตร 25 มิลลิลิตร โดยวิธี reflux เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองและปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 50 มิลลิลิตร สำหรับสารสกัดบัวบกโดยนำสารสกัดมาละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol นำสารละลายดังกล่าว ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ฉีดเข้าสู่ระบบโครมาโทกราฟีของ UPLC Column: Acquity® UPLC BEH C_{18} 1.7 μm, 2.1 x 50 mm อุณหภูมิคอลัมน์ 40 องศาเซลเซียส และใช้ Water:Acetonitrile เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ อัตราการไหล 0.6 มิลลิลิตร/นาที และตรวจวัดด้วย PDA ที่ความยาวคลื่น 205 นาโนเมตร จะปรากฏ peak ของ asiaticoside, madecassoside, asiatic acid และ madecassic acid ที่ retention time เท่ากับ 0.928-0.930, 0.836-0.839, 1.602-1.604 และ 1.424-1.427 นาที ตามลำดับ ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ดังกล่าว พบว่า calibration curve มีความเป็นเส้นตรง โดยสารมาตรฐาน asiaticoside, asiatic acid และ madecassic acid มีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.01-0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และสารมาตรฐาน madecassoside มีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.03-0.21 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีค่า coefficient (R^2) เท่ากับ 0.999 ค่า % recovery ของสารทุกตัวอยู่ในช่วง 95-105% ค่า HORRAT เท่ากับ 0.06-0.3 ค่า LOD ของ asiaticoside, madecassoside, asiatic acid และ madecassic acid มีค่าเท่ากับ 0.0021, 0.0080, 0.0114 และ 0.01309 ตามลำดับ และ LOQ มีค่าเท่ากับ 0.0081, 0.0283, 0.0410 และ 0.0473 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความรวดเร็ว เหมาะสม

สามารถนำไปใช้เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์ asiaticoside, madecassoside, asiatic acid และ madecassic acid ในตัวอย่างวัตถุดิบและสารสกัดบัวบกต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยในครั้งนี้ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ ศูนย์ตรวจสอบและรับรองคุณภาพสมุนไพร สถาบันวิจัยสมุนไพร ที่ช่วยเตรียมตัวอย่างวัตถุดิบและสารสกัดบัวบก และกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่สนับสนุนงบประมาณในการทำวิจัยครั้งนี้

References

1. Smitinand T. Thai plant names. Bangkok: Funny publishing company limited; 1980. p. 118. (in Thai)
2. Boonyaprapat N, Chokchaicharoenporn O. Medicinal Plants indigenous to Thailand. Bangkok: Prachachon; 2000. p. 508-15. (in Thai)
3. Hashim P, Sidek H, Helan MHM, Sabery A, Palanisamy UD, Ilhan M. Triterpene composition and bioactivities of *Centella asiatica*. Molecules. 2011;16:1310-22.
4. Yu QL, Duan HQ, Takaishi Y, Gao WY. A novel triterpene from *Centella asiatica*. Molecules. 2006;11:661-5.
5. Grimaldi R, Ponti FD, Angelo L. D, Caravaggi M, Guidi G, Lecchini S, Frigo G.M, Crema A. Pharmacokinetics of the total triterpenic fraction of *Centella asiatica* after single and multiple administrations to healthy volunteers. a new assay for asiatic acid. J Ethnopharmacol. 1990;28(2):235-41.
6. National List of Essential Medicines (No. 2) B.E. 2554 (2011). Published in Government Gazette on 28 June B.E. 2554 (2011). (in Thai)
7. Sondari D, Harmami SB, Ghozali M, Randy A, Amanda AS, Irawan Y. Determination of the active asiaticoside content in *Centella asiatica* as anti-cellulite agent. Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention. 2011;2(2):221-6
8. Inamdar PK, Yeole RD, Ghogare AB, Souza de NJ. Determination of biologically active constituents in *Centella asiatica*. Journal of Chromatography A. 1996;742(1-2):127-30.
9. Tiwari RK, Chanda S, Deepak M, Murli B, Agarwal A. HPLC method validation for simultaneous estimation of madecassoside, asiaticoside and asiatic acid in *Centella asiatica*. J Chem Pharm Res. 2010;2(3):223-9.
10. Thongnopnua P. High-performance liquid chromatographic determination of asiatic acid in human plasma. Thai Journal of Pharmaceutical Sciences. 2008;32:10-6.
11. Rafamantanana MH, Rozet E, Raoelison GE, Cheuk K, Ratsimamanga SU, Hubert Ph, Quetin-Leclercq J. An improved HPLC-UV method for the simultaneous quantification of triterpenic glycosides and aglycones in leaves of *Centella asiatica* (L.) Urb (Apiaceae). J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2009;877(23):2396-402.
12. Jain PK, Agrawal RK. High performance liquid chromatographic analysis of asiaticoside in *Centella asiatica* (L.) Urban. Chiang Mai Journal of Science. 2008;35(3):521-5.
13. Patarapanich C, Kongthong B, Laungchonlatan S. A HPLC method for determination of asiaticoside, madecassoside, asiatic acid and madecassic acid in the extract of *Centella asiatica* Linn. development, validation and application. Thai J Pharm Sci 2004;28:42.
14. Laungchonlathan S, Kongthong B, Patarapanich C. A TLC method determination of active constituents, madecassoside and asiaticoside from *Centella asiatica* Linn. in various seasons in Thailand. Thai J Pharm Sci 2004;28:43.
15. James JT, Dubery IA. Identification and quantification of triterpenoid centelloids in *Centella asiatica* (L.) Urban by densitometric TLC. Journal of Planar Chromatography-Modern TLC. 2011;24(1):82-7.
16. The United States Pharmacopoeial Convention. The United States Pharmacopoeia, The National Formulary 39th revision. Rockville, MD.: The United States Pharmacopoeial Convention, Inc.; 2016. p. 6541-7.
17. Department of Medical Sciences. Thai Herbal Pharmacopoeia 2019. Bangkok: Prachachon Co., Ltd.; 2019.
18. Department of Medical Sciences. A practical guide for single laboratory method validation of chemical methods. Nonthaburi: Department of Medical Sciences; 2006. (in Thai).