วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก Journal of Thai Traditional & Alternative Medicine
ปีที่ 19 ฉบับที่ 3 กันยายน-ธันวาคม 2564 Vol. 19 No. 3 September-December 2021

นิพนธ์ต้นฉบับ

การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณไรนาแคนทิน-ซี ในรากทองพันชั่ง

สาลินี ณ ระนอง*, ประภาพรรณ สุขพรรณ์, จิรานุช แจ่มทวีกุล

สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดนนทบุรี 11000

***ผู้รับผิดชอบบทความ:** *salinee87@hotmail.com*

บทคัดย่อ

ปริมาณสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบในสมุนไพรเป็นตัวบ่งชี้ที่ดีในการประเมินคุณภาพสมุนไพร โดยสามารถบอกได้ว่าสมุนไพรนั้นมีปริมาณสารสำคัญมากเพียงพอสำหรับการออกฤทธิ์หรือก่อให้เกิดพิษหรือไม่ การศึกษาวิจัยครั้งนี้ จึงทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อตรวจหาปริมาณสารไรนาแคนทิน-ซี ซึ่งเป็นสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบหลักในรากทองพันชั่ง โดยใช้เทคนิคโครมาโทรกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงหรือเอชพีแอลซี (High-Performance Liquid Chromatography: HPLC) ซึ่งวิธีวิเคราะห์นี้ผ่านการทดสอบความถูกต้องในหัวข้อความเฉพาะเจาะจง พิสัยและความเป็นเส้นตรง ความเที่ยง และความแม่น ทั้งนี้วิธีดังกล่าวสามารถแยกสารไรนาแคนทิน-ซี ออกจากองค์ประกอบทางเคมีอื่นในตัวอย่างรากทองพันชั่งได้ จากการทดสอบวิธีวิเคราะห์พบว่าความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.04-0.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่ 0.9995 การทดสอบความเที่ยงโดยการวิเคราะห์ซ้ำในสภาวะและเวลาเดียวกัน (precision) และการวิเคราะห์ซ้ำในสภาวะเดียวกันแต่เปลี่ยนวันเวลาที่ทำการวิเคราะห์ (intermediate precision) ให้ค่า %RSD เท่ากับ 0.39 และ 1.39 ตามลำดับ การทดสอบความแม่นให้ค่าร้อยละการคืนกลับที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง สูง เท่ากับร้อยละ 97.6, 97.5 และ 97.4 ตามลำดับ ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมานี้สามารถนำไปใช้ตรวจสอบปริมาณไรนาแคนทิน-ซี ในวัตถุดิบรากทองพันชั่งได้

คำสำคัญ: รากทองพันชั่ง, ไรนาแคนทิน-ซี, การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์, วิธีวิเคราะห์ปริมาณ, การควบคุมคุณภาพ

Received date 20/05/21; Revised date 29/07/21; Accepted date 02/12/21

Method Development and Validation for Quantification of Rhinacanthin-C in *Rhinacanthus nasutus* Roots

Salinee Na Ranong,* Prapapun Sukphan, Jiranuch Jamtaweekul

Bureau of Drug and Narcotic, Department of Medical Sciences, Ministry of Public health, Nonthaburi 11000, Thailand.

***Corresponding author:** salinee87@hotmail.com*

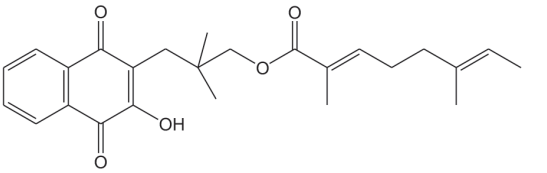
Abstract

The quantity of a chemical constituent in a herb is a good indicator for quality assessment as the constituent can indicate that the herb has enough active component to ensure its efficacy, or whether it is toxic. Therefore, the researchers developed an analytical method for quantifying the amount of rhinacanthin-C, which is a major chemical constituent found in the roots of *Rhinacanthus nasutus* (*thongphanchang* in Thai) by using the High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) technique. This method was validated for its specificity, linearity, precision and accuracy. The method could separate rhinacanthin-C from other chemical components in the sample of *R. nasutus* roots. The validation of this analytical method showed that the linearity was between 0.04 and 0.20 mg/mL and the correlation coefficient value was 0.9995. The precision and intermediate precision tests showed %RSD of 0.39% and 1.39%, respectively. The accuracy test showed %recovery at low, medium and high concentration levels of 97.6%, 97.5% and 97.4%, respectively. The results suggest that the developed method can be used to quantify the amount of rhinacanthin-C in raw *R. nasutus* roots.

Key words: *Rhianacanthus nasutus* root, rhinacanthin-C, method validation, assay, quality control

บทนำและวัตถุประสงค์

ทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz) เป็นพืชในวงศ์ Acanthaceae กระจายพันธุ์อยู่ในอินเดีย จีน และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้[1] การแพทย์แผนโบราณของไทยใช้รากทองพันชั่งเป็นยาแก้กลาก เกลื้อน ผื่นคัน[2] สารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบหลักในสมุนไพรทองพันชั่งคือสารไรนาแคนทิน-ซี (rhinacanthin-C) ซึ่งเป็นสารกลุ่มแนพโทควิโนน (naphthoquinone)[3] โดยมีรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ต้านแอนแอโรบิคแบคทีเรียแกรมบวก (*Streptococcus mutans* และ *Propionibacterium* acnes) และแอโรบิคแบคทีเรียแกรมบวก (*Staphylococcus aureus* และ *S. epidermidis*)[4], ฤทธิ์ต้านไวรัสกลุ่ม Cytomegalovirus[5], ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส[6], ฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Trichophyton rubrum, T. mentagrophytes* และ *Microsporum gypseum*[7], ฤทธิ์ต้านการแพ้[8], ฤทธิ์ต้านการอักเสบ[9] และฤทธิ์ต้านไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ PR8, HRV1B และ CVB3[10] เป็นต้น



ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของสารไรนาแคนทิน-ซี

จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่าทองพันชั่งเป็นสมุนไพรที่มีศักยภาพในการนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์จากสมุนไพร และสารไรนาแคนทิน-ซีที่เป็นองค์ประกอบหลักในทองพันชั่งเหมาะที่จะนำมาทำเป็นสารสำคัญ (marker) ในการควบคุมคุณภาพวัตถุดิบสมุนไพรทองพันชั่ง จากการทบทวนวรรณกรรมพบรายงานการศึกษาปริมาณสารไรนาแคนทิน-ซีในใบทองพันชั่งด้วยวิธีเอชพีแอลซี[7] แต่ยังไม่พบการศึกษาปริมาณไรนาแคนทิน-ซีในรากทองพันชั่ง จึงเป็นที่มาของงานวิจัยนี้

จากการศึกษาในปี 2009 ระบุว่าการสกัดใบทองพันชั่งด้วยตัวทำละลายเมทานอลจะทำให้ได้ปริมาณสารสกัดสูงที่สุด แต่การสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตทจะสามารถสกัดสารกลุ่มไรนาแคนทิน (rhinacanthins) ออกจากตัวอย่างใบทองพันชั่งได้มากที่สุด[7] ผู้วิจัยจึงเลือกตัวทำละลาย 2 ชนิดนี้มาทดลองหาวิธีที่เหมาะสมในการเตรียมสารละลายตัวอย่างในขั้นตอนการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ จากนั้นได้ทดสอบความถูกต้องของวิธีที่พัฒนาขึ้น เพื่อนำวิธีวิเคราะห์ที่ผ่านการทดสอบความถูกต้องแล้วไปใช้หาปริมาณไรนาแคนทิน-ซีในวัตถุดิบรากทองพันชั่งต่อไป

ระเบียบวิธีศึกษา

1. ตัวอย่างพืช

ตัวอย่างที่ใช้ในการทำวิจัยครั้งนี้ผ่านการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ว่าเป็นรากทองพันชั่งโดย อ.พท.นิรันดร์ วิพันธุ์เงิน อาจารย์ประจำวิทยาลัยเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต โดยรากทองพันชั่งสดเก็บจากจังหวัดกำแพงเพชร, สระแก้ว, ฉะเชิงเทรา, นครราชสีมา, กาญจนบุรี, ระยอง, เพชรบูรณ์, ราชบุรี, สกลนคร, ชุมพร, อุตรดิตถ์, สุโขทัย และอุดรธานี นำมาล้างทำความสะอาดและอบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และทำให้ขนาดเล็กลงโดยการบดและผ่านแร่งเบอร์ 80 และรากทองพันชั่งแห้งซื้อจากร้านขายสมุนไพรในจังหวัดสุราษฎร์ธานี, อุบลราชธานี และนนทบุรี นำมาลดขนาดและคัดขนาดโดยไม่ผ่านการล้างทำความสะอาดและอบแห้ง ซึ่งตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์คือ ตัวอย่างรากทองพันชั่งที่ปลูกที่จังหวัดเพชรบูรณ์

2. สารเคมี

สารมาตรฐานไรนาแคนทิน-ซี แยกให้บริสุทธิ์โดยสถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ความบริสุทธิ์ร้อยละ 94.36 สารเคมีเกรดเอชพีแอลซี (HPLC grade) ได้แก่ เมทานอลและอะซีโตไนไตรล์ (Macron Fine Chemicals, USA) สารเคมีเกรดงานวิเคราะห์ (analytical grade) ได้แก่ เมทานอล (Macron Fine Chemicals, USA) เอทิลอะซีเตท, กรดไฮโดรคลอริก, 30% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ เพลแล็ต (Carlo Erba, France)

3. เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องเอชพีแอลซี รุ่น alliance Waters 2695 Separations module, Waters 2996 Photodiode Array Detector โปรแกรม Empower1 และรุ่น alliance Waters e2695 Separations module, Waters 2998 PDA Detector โปรแกรม Empower3 (Waters, USA), คอลัมน์เอชพีแอลซี ชนิด C18 ขนาด 4.6X150 มิลลิเมตร อนุภาค 5 ไมโครเมตร รุ่น Capcell Pak C18 MG-II รุ่นการผลิต BSII66 และรุ่นการผลิต BSII71 (Osaka soda, Japan), เครื่องชั่ง

รุ่น XPE205 และรุ่น XP2U (Mettler, Switzerland), เครื่องเขย่าความถี่สูง รุ่น S 100 H (Elma, USA), อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ รุ่น WNE 22 (Memmert, Germany)

4. วิธีการศึกษา

4.1 การศึกษาเปรียบเทียบตัวทำละลายและวิธีสกัดที่เหมาะสมในการเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่างรากทองพันชั่ง 100 มิลลิกรัม เติมตัวทำละลายเมทานอลปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำไปรีฟลักซ์ (reflux) ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นระเหยตัวทำละลายออก แล้วละลายอีกครั้งด้วยเมทานอลปริมาตร 10 มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับการใช้เอทิลอะซีเตทในการสกัด และเปรียบเทียบการสกัดโดยวิธีรีฟลักซ์กับวิธีสกัดด้วยการเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความถี่สูง (sonicate) โดยใช้ตัวทำละลายเป็นเมทานอล ซึ่งใช้ตัวอย่าง 200 มิลลิกรัม และตัวทำละลาย 20 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 10, 20 และ 30 นาที โดยทำการทดสอบตัวอย่างละ 2 ซ้ำ

4.2 วิธีวิเคราะห์

การเตรียมสต๊อกสารละลายมาตรฐาน (standard stock solution)

ชั่งสารละลายมาตรฐานไรนาแคนทิน-ซี 5 มิลลิกรัม ละลายด้วยเมทานอลใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล แล้วเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความถี่สูงเป็นเวลา 10 นาที จะได้สารมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายมาตรฐานสำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve)

สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.04, 0.08, 0.12, 0.16 และ 0.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กับพื้นที่ใต้พีค โดยปิเปตสต๊อกสารละลายมาตรฐาน 1, 2, 3 และ 4 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอล จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0.04, 0.08, 0.12 และ 0.16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และที่ความเข้มข้น 0.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้นำสต๊อกสารละลายมาตรฐานที่เหลือมาใช้โดยไม่ต้องเจือจางจากนั้นกรองสารละลายมาตรฐานทุกความเข้มข้นด้วยหัวกรองชนิด PVDF ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง (sample solution)

ชั่งผงรากทองพันชั่ง 50 มิลลิกรัม ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล จากนั้นเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความถี่สูงเป็นเวลา 10 นาที แล้วกรองด้วยหัวกรองชนิด PVDF ขนาด 0.45 ไมโครเมตร โดยเตรียมตัวอย่างจำนวน 2 ซ้ำ

การวิเคราะห์ปริมาณสารไรนาแคนทิน-ซีด้วยเครื่องเอชพีแอลซี

ใช้เครื่องเอชพีแอลซี ยี่ห้อ Waters โมเดล alliance ที่ควบคุมการทำงานด้วยโปรแกรม Empower ในการทดสอบวิธีวิเคราะห์ โดยใช้คอลัมน์ชนิด C18 ขนาด 4.6x150 มิลลิเมตร อนุภาค 5 ไมโครเมตร ตั้งค่าอุณหภูมิคอลัมน์ที่ 25 องศาเซลเซียส สารละลายตัวพาที่ใช้ประกอบด้วย A คือ 0.1% กรดอะซีติกในน้ำ และ B คือ อะซีโตไนไตรล์ โดยมีการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนสารละลายตัวพาขณะทำการวิเคราะห์ (gradient) ดังตารางที่ 1 ตั้งค่าอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรการฉีด 50 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญเริ่มจากการทดสอบความเหมาะสมของระบบ (system suit-

ตารางที่ 1 สัดส่วนสารละลายตัวพา

เวลา (นาที)	อัตราการไหล (มิลลิลิตร/นาที)	%A	%B
0	1.0	25	75
20	1.0	25	75
22	1.0	5	95
27	1.0	5	95
30	1.0	25	75
35	1.0	25	75

ability) โดยการฉีดสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 5 ซ้ำ ซึ่งต้องได้ค่า %RSD ≤ 2.0 จากนั้นฉีดสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นอื่นที่เหลือความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ และฉีดสารละลายตัวอย่างตัวอย่างละ 2 ซ้ำ นำข้อมูลความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกับค่าเฉลี่ยของพื้นที่ใต้พีคมาสร้างกราฟเพื่อหาสมการเส้นตรง (y = ax+b) และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient: r) แล้วคำนวณปริมาณไรนาแคนทิน-ซีในตัวอย่าง โดยใช้สมการ

$R_0 = ((r_s-b)/a) \times V \times (100/W_s)$

R_0 = ปริมาณไรนาแคนทิน-ซีในตัวอย่าง (ร้อยละโดยน้ำหนัก)

r_s = พื้นที่ใต้พีคของไรนาแคนทิน-ซีในสารละลายตัวอย่าง

b = ค่าจุดตัดแกน y (y-intercept) ที่ได้จากสมการเส้นตรง

a = ค่าความชัน (slope) ที่ได้จากสมการเส้นตรง

V = ปริมาตรสุดท้ายของสารละลายตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

W_s = น้ำหนักของตัวอย่าง (มิลลิกรัม)

4.3 วิธีการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์และเกณฑ์การยอมรับ[11]

ความเฉพาะเจาะจง (specificity)

เปรียบเทียบพื้นที่ใต้พีคสารไรนาแคนทิน-ซีของสารละลายตัวอย่างที่เตรียมตามที่อธิบายไว้ในการเตรียมสารละลายตัวอย่างซึ่งมีความเป็นกรด-ด่าง (pH) ประมาณ 5 กับพื้นที่ใต้พีคของสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการทำให้สลายตัว ซึ่งเตรียมโดยชั่งผงตัวอย่างรากทองพันชั่ง 50 มิลลิกรัม ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร นำไปทดสอบการสลายตัวในสภาวะเครียด (stress testing) จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตรด้วยเมทานอล แล้วเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความถี่สูงเป็นเวลา 10 นาที โดยสภาวะที่ใช้ทดสอบมีดังนี้

- การสลายตัวด้วยความร้อน (thermal degradation): ต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง[11]
- การสลายตัวในสภาวะกรด (acid hydrolysis): เติมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 3 โนล่าร์ 3 หยด ต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง แล้วโดยเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 โนล่าร์ ประมาณ 2 หยด เพื่อปรับความเป็นกรด-ด่างให้อยู่ที่ประมาณ 5[11]
- การสลายตัวในสภาวะด่าง (basic hydrolysis): เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 โนล่าร์ 3 หยด ต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง แล้วโดยเติมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 3 โนล่าร์ ประมาณ 5 หยด เพื่อปรับความเป็นกรด-ด่างให้อยู่ที่ประมาณ 5[11]
- การสลายตัวด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (oxidation): เติม 30% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 40 ไมโครลิตร ต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 5 นาที[11]
- การสลายตัวด้วยแสง (photolysis): วางตัวอย่างภายใต้แสงไฟที่ความเข้มแสง 10,000 ลักซ์ต่อชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง[11-12]

เกณฑ์การยอมรับ คือ พีคไรนาแคนทิน-ซีต้องไม่ถูกรบกวนด้วยพีคอื่น ๆ โดยพิจารณาจากค่ามุมความบริสุทธิ์ (purity angle) ที่ต่ำกว่าค่าขีดแบ่งความบริสุทธิ์ (purity threshold)

การทดสอบพิสัยและความเป็นเส้นตรง (Range and Linearity)

เตรียมสารละลายมาตรฐานสำหรับสร้างกราฟมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.04, 0.08, 0.12, 0.16 และ 0.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาฉีดภายใต้สภาวะเครื่องที่ผ่านการทดสอบความเหมาะสมของระบบ

เกณฑ์การยอมรับ คือ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ≥ 0.995

การทดสอบความเที่ยง (Precision)

เตรียมสารละลายตัวอย่างตามที่อธิบายในการเตรียมสารละลายตัวอย่างในหัวข้อวิธีวิเคราะห์ โดยเตรียมตัวอย่างทั้งหมด 6 ตัวอย่าง

เกณฑ์การยอมรับ คือ ปริมาณไรนาแคนทิน-ซีในตัวอย่างทั้ง 6 ตัวอย่างมีค่า %RSD ≤ 2.0

การทดสอบความแม่น (Accuracy)

เตรียมสารละลายตัวอย่างโดยชั่งผงรากทองพันชั่ง 25 มิลลิกรัม ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วเติมสต๊อกสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2, 3 และ 4 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของไรนาแคนทิน-ซีที่ระดับความเข้มข้นต่ำ (67%), กลาง (100%) และสูง (133%) โดยเตรียมความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ จากนั้นปรับปริมาตรด้วยเมทานอลแล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความถี่สูงเป็นเวลา 10 นาที

เกณฑ์การยอมรับ คือ ร้อยละการคืนกลับ (%recovery) ที่แต่ละระดับความเข้มข้นมีค่าอยู่ในช่วง 97-103 % และมีค่า %RSD ≤ 2.0

ผลการศึกษา

ผลการศึกษาเปรียบเทียบตัวทำละลายและวิธีสกัดที่เหมาะสมในการเตรียมสารละลายตัวอย่าง

จากการทดลองหาวิธีเตรียมสารละลายตัวอย่างที่เหมาะสมพบว่า การสกัดโดยการรีฟลักซ์ด้วยตัวทำละลายเมทานอลและเอทิลอะซีเตทสามารถสกัดไรนาแคนทิน-ซีออกมาได้ในปริมาณใกล้เคียงกัน ผู้วิจัยจึงทดลองเตรียมสารละลายตัวอย่างโดยใช้ตัวทำละลายเป็นเมทานอลร่วมกับการเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความถี่สูง ซึ่งได้ผลไม่ต่างกับวิธีรีฟลักซ์ด้วยเอทิลอะซีเตท ดังแสดงในตารางที่ 2

เนื่องจากการเตรียมสารละลายตัวอย่างโดยใช้ตัวอย่าง 200 มิลลิกรัม ตัวทำละลาย 20 มิลลิลิตร ให้ค่าพื้นที่ใต้พีคที่ใกล้เคียงจุดสูงสุดของกราฟมาตรฐาน ดังนั้นในการเตรียมสารละลายตัวอย่างเพื่อทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ผู้วิจัยจึงปรับลดปริมาณตัวอย่างลงเป็น 50 มิลลิกรัม ละลายในตัวทำละลาย 10 มิลลิลิตร เพื่อให้ค่าพื้นที่ใต้พีคอยู่ในช่วงกึ่งกลางกราฟมาตรฐาน

ตารางที่ 2 ปริมาณไรนาแคนทิน-ซีที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีต่าง ๆ

วิธีสกัด		ปริมาณไรนาแคนทิน-ซี (%w/w) ± %RPD
รีฟลักซ์	เมทานอล	1.98 ± 0.92
	เอทิลอะซีเตท	2.01 ± 0.26
การเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความถี่สูงโดยใช้ตัวทำละลายเป็นเมทานอล	10 นาที	2.01 ± 0.10
	20 นาที	2.02 ± 0.40
	30 นาที	2.04 ± 0.36

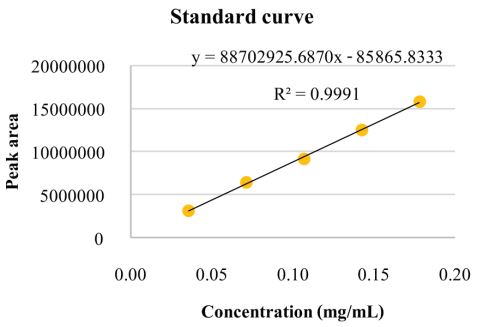
ผลการทดสอบความเฉพาะเจาะจง

จากการทดสอบฉีดตัวทำละลายเมทานอลและสารละลายมาตรฐานพบว่า ตัวทำละลายไม่มีสัญญาณรบกวนพีคของไรนาแคนทิน-ซีซึ่งมีค่ารีเทนชั่นไทม์หรืออาร์ที (retention time: RT) ประมาณ 13.3 นาที เมื่อนำสารละลายตัวอย่างที่ถูกทำให้สลายตัวในสภาวะต่าง ๆ มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับสารละลายตัวอย่างที่ไม่ถูกทำให้สลายตัวด้วยเทคนิคเอชพีแอลซีพบว่าสารไรนาแคนทิน-ซีทนต่ออุณหภูมิสูงและสภาวะกรดได้ดี แต่มีแนวโน้มที่จะสลายตัวเมื่ออยู่ในสภาวะด่างและเมื่อเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น ดังแสดงในตารางที่ 3

วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถแยกไรนาแคนทิน-ซีออกจากองค์ประกอบทางเคมีอื่นในสารละลายตัวอย่างรากทองพันชั่งได้ และยังสามารถแยกไรนาแคนทิน-ซีออกจากสารที่เกิดจากการสลายตัวของสารไรนาแคนทิน-ซีในสภาวะเครียดได้อีกด้วย ดังแสดงในภาพที่ 3

ตารางที่ 3 การสลายตัวของสารไรนาแคนทิน-ซีในตัวอย่างที่ผ่านการทดสอบในสภาวะต่าง ๆ

การทดสอบ	ร้อยละการสลายตัว
การสลายตัวด้วยความร้อน	3
การสลายตัวในสภาวะกรด	6
การสลายตัวในสภาวะด่าง	98
การสลายตัวด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชั่น	47
การสลายตัวด้วยแสง	13



ภาพที่ 2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานไรนาแคนทิน-ซีกับพื้นที่ใต้พีค

ผลการทดสอบพิสัยและความเป็นเส้นตรง

จากการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานไรนาแคนทิน-ซีที่ความเข้มข้น 0.04, 0.08, 0.12, 0.16 และ 0.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กับพื้นที่ใต้พีค พบว่าได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9995 ดังแสดงในภาพที่ 2

ผลการทดสอบความเที่ยง

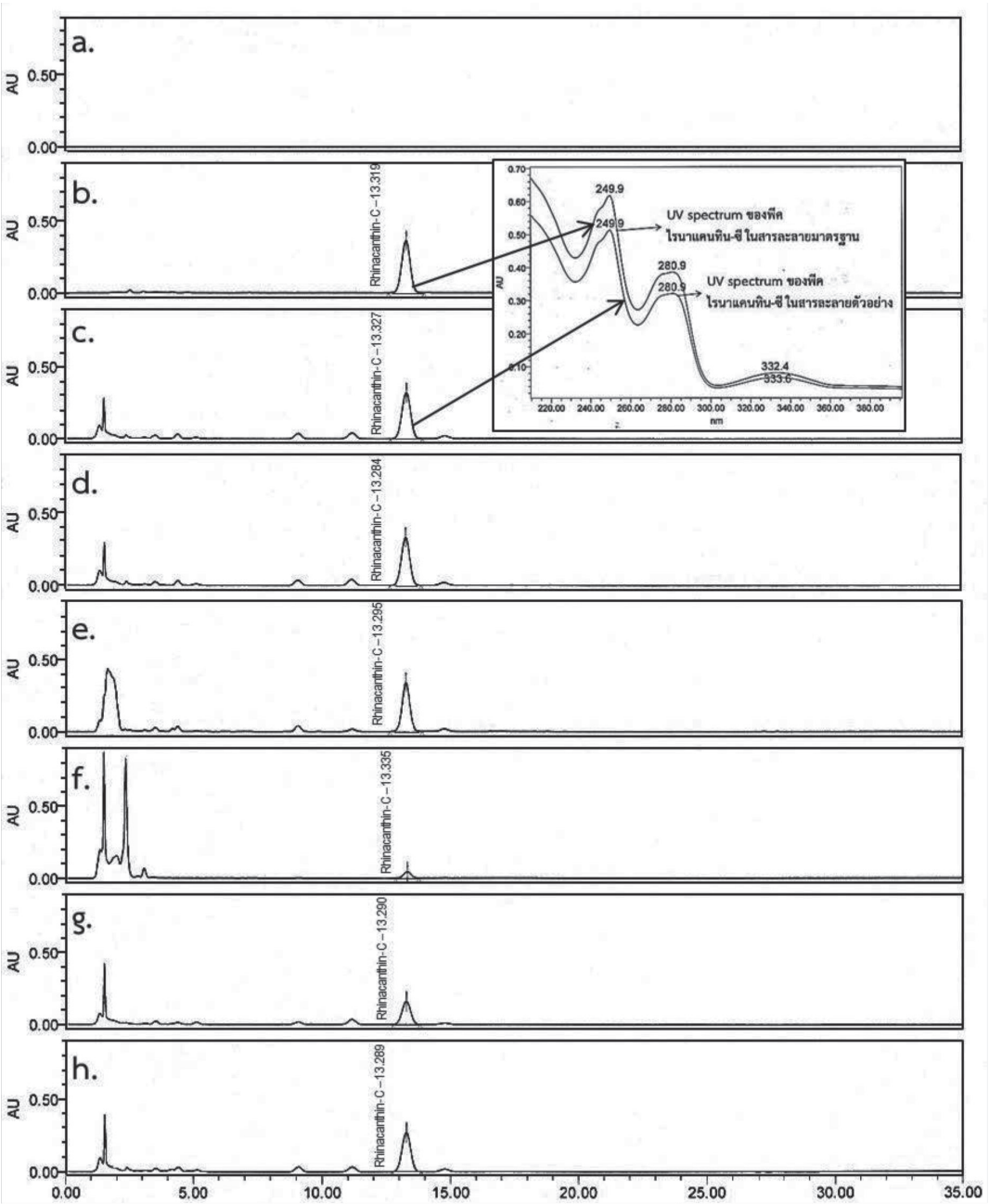
การวิเคราะห์ซ้ำในสภาวะและเวลาเดียวกัน (repeatability) พบว่ามีค่า %RSD เท่ากับ 0.39 และการวิเคราะห์ซ้ำในสภาวะเดียวกันแต่เปลี่ยนนักวิเคราะห์ วันเวลาที่ทำการวิเคราะห์ และเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ (intermediate precision) พบว่ามีค่า %RSD เท่ากับ 0.98, 1.39 และ 0.63 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4

ผลการทดสอบความแม่น

จากการทดสอบความแม่นที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง พบว่า ได้ค่าร้อยละการคืนกลับร้อยละ 97.55, 97.47 และ 97.44 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 5

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารไรนาแคนทิน-ซีในตัวอย่างรากทองพันชั่ง

หลังจากผ่านการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ผู้วิจัยได้นำวิธีที่พัฒนาขึ้นมานี้ใช้หาปริมาณไรนาแคนทิน-ซีในรากทองพันชั่งจำนวน 16 ตัวอย่าง โดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ พบว่ารากทองพันชั่งมีปริมาณไรนาแคนทิน-ซีเฉลี่ยร้อยละ 1.74 ± 0.38 โดยน้ำหนัก (%w/w) ซึ่งแต่ละตัวอย่างมีปริมาณไรนาแคนทิน-ซีดังแสดงในตารางที่ 6



ภาพที่ 3 โครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการทดสอบในสภาวะต่าง ๆ
a. = ตัวทำละลายเมทานอล, b.= สารละลายมาตรฐานไรนาแคนทิน-ซี, c. = ตัวอย่างที่เตรียมโดยไม่ผ่านการทดสอบในสภาวะเครียด, d. = ตัวอย่างที่ผ่านการทดสอบการสลายตัวด้วยความร้อน, e. = ตัวอย่างที่ผ่านการทดสอบการสลายตัวในสภาวะกรด, f. = ตัวอย่างที่ผ่านการทดสอบการสลายตัวในสภาวะด่าง, g. = ตัวอย่างที่ผ่านการทดสอบการสลายตัวด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชั่น, h. = ตัวอย่างที่ผ่านการทดสอบการสลายตัวด้วยแสง

ตารางที่ 4 ผลการศึกษาความเที่ยง

ตัวอย่าง รากทองพันชั่ง ที่ใช้ศึกษาความเที่ยง	การวิเคราะห์ซ้ำ ในสภาวะและ เวลาเดียวกัน	การวิเคราะห์ซ้ำใน สภาวะเดียวกันแต่ เปลี่ยนนักวิเคราะห์	การวิเคราะห์ซ้ำ ในสภาวะเดียวกัน แต่ เปลี่ยนวันเวลา ที่ทำการวิเคราะห์	การวิเคราะห์ซ้ำ ในสภาวะเดียวกัน แต่เปลี่ยนเครื่องมือ ที่ใช้ในการวิเคราะห์
ตัวอย่างที่ 1	1.70	1.67	1.74	1.72
ตัวอย่างที่ 2	1.68	1.67	1.75	1.69
ตัวอย่างที่ 3	1.70	1.68	1.75	1.71
ตัวอย่างที่ 4	1.69	1.65	1.73	1.70
ตัวอย่างที่ 5	1.69	1.66	1.72	1.70
ตัวอย่างที่ 6	1.70	1.66	1.74	1.71
ค่าเฉลี่ย ± %RSD	1.69 ± 0.39	1.67 ± 0.57	1.74 ± 0.70	1.71 ± 0.55
ความเที่ยงของการเปลี่ยนนักวิเคราะห์		ค่าเฉลี่ย ± %RSD	1.68 ± 0.98	
ความเที่ยงของการเปลี่ยนวันเวลาที่ทำการวิเคราะห์		ค่าเฉลี่ย ± %RSD	1.72 ± 1.39	
ความเที่ยงของการเปลี่ยนเครื่องมือวิเคราะห์		ค่าเฉลี่ย ± %RSD	1.70 ± 0.63	

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความแม่นของวิธีที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง

ตัวอย่างรากทองพันชั่ง ที่ใช้ศึกษาความแม่น	ร้อยละการคืนกลับที่ระดับ ความเข้มข้นต่ำ	ร้อยละการคืนกลับที่ระดับ ความเข้มข้นกลาง	ร้อยละการคืนกลับที่ระดับ ความเข้มข้นสูง
ตัวอย่างที่ 1	99.63	97.08	97.92
ตัวอย่างที่ 2	97.92	96.84	97.36
ตัวอย่างที่ 3	95.09	98.49	97.06
ค่าเฉลี่ย ± %RSD	97.55 ± 1.92	97.47 ± 0.75	97.44 ± 0.37

อภิปรายผล

จากผลการทดลองหาตัวทำละลายและวิธีที่เหมาะสมในการเตรียมสารละลายตัวอย่างพบว่า การสกัดด้วยเมทานอลร่วมกับการเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความถี่สูง ให้ผลไม่ต่างจากการสกัดโดยวิธีรีฟลักซ์ด้วยเอทิลอะซีเตท[7] ผู้วิจัยจึงเลือกใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย ร่วมกับการเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความถี่สูงเป็นเวลา 10 นาที ในการสกัดสารไรนาแคนทิน-ซีออกจากรากทองพันชั่ง เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายและสะดวก

ในขั้นตอนการพัฒนาวิเคราะห์ผู้วิจัยเลือกใช้สารละลายตัวพาที่ประกอบด้วย 0.1% กรดอะซีติกในน้ำ และอะซีโตไนไตรล์ เนื่องจากสารละลาย 0.1% กรดอะซีติกในน้ำมีค่าความเป็นกรด-ด่างประมาณ 3.3 ซึ่งอยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับคอลัมน์ที่เลือกใช้ และจากการทดลองปรับสัดส่วนสารละลายตัวพาพบว่าสัดส่วนของเฟสน้ำที่มากขึ้นจะสามารถแยกสารที่

ตารางที่ 6 ปริมาณไรนาแคนทิน-ซีในตัวอย่างรากทองพันชั่ง 16 ตัวอย่าง

แหล่งที่มา	ปริมาณสารไรนาแคนทิน-ซี (ร้อยละโดยน้ำหนัก)		
	ตัวอย่างที่ 1	ตัวอย่างที่ 2	ค่าเฉลี่ย ± %RPD
กำแพงเพชร	2.21	2.17	2.19 ± 2.10
สระแก้ว	1.41	1.41	1.41 ± 0.52
ฉะเชิงเทรา	2.14	2.09	2.12 ± 2.28
นครราชสีมา	2.99	3.04	3.01 ± 1.78
กาญจนบุรี	1.90	1.88	1.89 ± 0.74
ระยอง	2.09	2.10	2.10 ± 0.41
เพชรบูรณ์	1.74	1.74	1.74 ± 0.70
ราชบุรี	1.96	1.98	1.97 ± 1.11
สกลนคร	2.02	2.03	2.03 ± 0.17
ชุมพร	1.78	1.79	1.79 ± 0.38
อุตรดิตถ์	1.82	1.85	1.84 ± 1.78
สุโขทัย	1.62	1.61	1.62 ± 0.94
อุดรธานี	1.08	1.09	1.08 ± 1.47
สุราษฎร์ธานี	2.10	2.10	2.10 ± 0.20
อุบลราชธานี	1.11	1.12	1.11 ± 0.16
นนทบุรี	1.18	1.17	1.18 ± 0.22

*ข้อมูลที่เป็น outlier ไม่ได้นำมาคำนวณค่าเฉลี่ย (ตัด outlier โดยใช้วิธี interquartile range)

เป็นองค์ประกอบในสารละลายตัวอย่างออกจากกันได้ดีขึ้น แต่มีข้อเสียคือจะใช้เวลาในการวิเคราะห์นานขึ้น

สารละลายตัวพาที่เหมาะสมในการแยกพีคไรนาแคนทิน-ซีออกจากพีคของสารอื่นๆ ในสารละลายตัวอย่าง คือ 0.1% กรดอะซีติกในน้ำและอะซีโตไนไตรล์ในอัตราส่วน 75 และ 25 ซึ่งสารละลายตัวพาสัดส่วนนี้สามารถแยกสารที่เป็นองค์ประกอบหลักในรากทองพันชั่งได้ 4 พีค โดยพีคไรนาแคนทิน-ซีมีค่าอาร์ทีประมาณ 13.3 นาที ซึ่งแยกออกจากพีคอื่นได้ดีโดยมีค่าการแยก (resolution) มากกว่า 2

เพื่อยืดอายุการใช้งานของคอลัมน์และลดปัญหาการถูกรบกวนจากพีคอื่นในการวิเคราะห์ ผู้วิจัยจึงใช้สารละลายตัวพาที่มีการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนขณะทำการวิเคราะห์โดยเพิ่มสัดส่วนของอะซีโตไนไตรล์ให้สูงในช่วงท้ายเพื่อชะสารที่ไม่มีขั้วอื่น ๆ ในสารละลายตัวอย่างออกจากคอลัมน์ แล้วจึงค่อยเปลี่ยนสัดส่วนสารละลายตัวพากลับเป็นสัดส่วนเดิมก่อนจะฉีดสารละลายตัวอย่างถัดไป

สารมาตรฐานไรนาแคนทิน-ซีดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 249.9, 280.9 และ 332.4 นาโนเมตร โดยที่ความยาวคลื่นที่ 250 นาโนเมตร จะให้สัญญาณพีคของสารไรนาแคนทิน-ซีสูงสุดแต่ผู้วิจัยเลือกตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร เนื่องจากให้ค่าการแยกพีคไรนาแคนทิน-ซีออกจากพีคอื่นดีกว่าที่ความยาวคลื่น 250 นาโนเมตร

การทดสอบสารละลายตัวอย่างเพื่อดูการสลาย

ตัวภายใต้สภาวะต่างๆชี้ให้เห็นว่าสารไรนาแคนทิน-ซีไม่คงในสภาวะด่างและไม่คงตัวเมื่อเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น ในการทำวิจัยครั้งนี้คณะผู้วิจัยไม่ได้ศึกษาสารที่เกิดจากการสลายตัวของไรนาแคนทิน-ซีในแต่ละสภาวะว่าเป็นสารใด และเป็นสารที่มีฤทธิ์หรือมีพิษหรือไม่ หากมีผู้สนใจนำสารไรนาแคนทิน-ซีไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนาตำรับยาในอนาคตอาจต้องมีการศึกษาเรื่องดังกล่าวเพิ่มเติม

ข้อสรุป

จากผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมานี้มีความเฉพาะเจาะจงสามารถแยกไรนาแคนทิน-ซีออกจากสารอื่น ๆ ในสารละลายตัวอย่างได้ ค่าความเป็นเส้นตรงของสารมาตรฐานไรนาแคนทิน-ซีอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.04-0.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ 0.9995 การทดสอบความเที่ยงโดยการวิเคราะห์ซ้ำในสภาวะและเวลาเดียวกัน กับการวิเคราะห์ซ้ำในสภาวะเดียวกันแต่เปลี่ยนวันเวลาที่ทำการวิเคราะห์ให้ค่า %RSD เท่ากับ 0.39% และ 1.39% ตามลำดับ การทดสอบความแม่นให้ค่าร้อยละการคืนกลับที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง ร้อยละ 97.55, 97.47 และ 97.44 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมานี้มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการหาปริมาณไรนาแคนทิน-ซีในรากทองพันชั่ง

จากการนำวิธีที่ผ่านการทดสอบความถูกต้องแล้วมาวิเคราะห์หาปริมาณสารไรนาแคนทิน-ซีในตัวอย่างรากทองพันชั่งจำนวน 16 ตัวอย่าง พบว่าปริมาณไรนาแคนทิน-ซีที่พบในตัวอย่างวัตถุดิบรากทองพันชั่งมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ร้อยละ 1.74 ± 0.38 โดยน้ำหนัก

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ดร.ภญ.ปฐมาพร ปรึกษากรและคณะ จากสถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์เป็นอย่างสูง สำหรับการเอื้อเฟื้อสารมาตรฐานไรนาแคนทิน-ซีที่ใช้ในการวิจัยในครั้งนี้

References

1. Tunsaringkarn T, Palanuvej C, Issaravanich S, Vipunngeun N, Rungsiyothin A, Chuthaputti A, Ruangrungsi N. Quality assessment of *Rhinacanthus nasutus*. Journal of Health Research. 2009;23(3):111-5.
2. Pingboonrod S. Foreign plants in Thailand. Department of Sciences; 1950. 321. (in Thai)
3. Wu T, Hsu H, Wu P, Leu Y, Chan Y, Chern C, Yeh M, Tien H. Naphtoquinone esters from the root of *Rhinacanthus nasutus*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 1998;46(3):413-8.
4. Puttarak P, Charoonratana T, Panichayupakaranant P. Antimicrobial activity and stability of rhinacanthins-rich *Rhinacanthus nasutus* extract. Phytomedicine. 2010;17(5):323-7.
5. Sendl A, Chen J, Jolad S, Stoddart C, Rozhon E, Kernan M. Two new Naphthoquinones with antiviral activity from *Rhinacanthus nasutus*. Journal of Natural Products. 1996;59:808-11.
6. Shah MA, Khalil R, Ul-Haq Z, Panichayupakaranant P. α-Glucosidase inhibitory effect of rhinacanthins-rich extract from *Rhinacanthus nasutus* leaf and synergistic effect in combination with acarbose. Journal of Functional Foods. 2017;36:325-31.
7. Panichayupakaranant P, Charoonratana T, Sirikatitham A. RP-HPLC analysis of rhinacanthins in *Rhinacanthus nasutus*: validation and application for the preparation of rhinacanthin high-yielding extract. Journal of Chromatographic Science, 2009;47:705-8.
8. Tewtrakul S, Tansakul P, Panichayupakaranant P. Anti-allergic principles of *Rhinacanthus nasutus* leaves. Phytomedicine. 2009;16(10):929-34.

9. Tewtrakul S, Tansakul P, Panichayupakaranant P. Effects of rhinacanthins from *Rhinacanthus nasutus* on nitric oxide, prostaglandin E2 and tumor necrosis factor-alpha releases using RAW264.7 macrophage cells. Phytomedicine. 2009;16(6-7):581-5.
10. Ngoc T, Phuong N, Khoi N, Park S, Kwak H, Nhiem N, Trang B, Tai B, Song J, Ko H, Kim S. A new naphthoquinone analogue and antiviral constituents from the root of *Rhinacanthus nasutus*. Natural Product Research. 2019;33(3):360-6.
11. Yoosuk S. Standard operating procedure no.2213003 revision no. 2 Method validation of chromatographic method. Nonthaburi: Bureau of Drug and Narcotic, Department of Medical Sciences; 2020:1-18. (in Thai).
12. ICH expert working group. Stability testing: photostability testing of new drug substances and products Q1B. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use [Internet]. 1996. [cited 2021 Jan 21]; [12 screens]. Available from: https://database.ich.org/sites/default/files/Q1B%20Guideline.pdf