

การพัฒนาและการทดสอบความถูกต้องวิธีการตรวจวิเคราะห์สาร miroestrol ในผลิตภัณฑ์แคปซูลกวาวเครือขาวโดยเทคนิค UPLC

เดชมนตรี วจิสุนทร^{*†}, ธีระวุธ ปิ่นทอง^{*}, ประนอม เดชวิศิษฎ์สกุล^{*}, วุฒิชัย นุตกุล^{*},
สุภัสชา พูนศรีธธา^{*}, ไพริน ทองคุ้ม^{*}, สรเพชร มาสุต^{*}, ศักยวิชัย อ่อนทอง^{*}, สุนีย์ จันทรสกา[‡]

^{*}สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ จังหวัดนนทบุรี 11000

[†]คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50200

[‡]ผู้รับผิดชอบบทความ: detmontree.w@dmsc.mail.go.th

บทคัดย่อ

สารออกฤทธิ์สำคัญของกวาวเครือขาวคือสารไมโรเอสโตรล (miroestrol) ซึ่งพบว่าปริมาณที่ตรวจพบตามธรรมชาติมีความแปรปรวนสูง ดังนั้นจำเป็นต้องมีการควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์ เพื่อประสิทธิผลและความปลอดภัยของผู้บริโภค การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญไมโรเอสโตรล ด้วยวิธี UPLC ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์แคปซูลกวาวเครือขาว โดยการสกัดตัวอย่างผงยาด้วยเอทานอล แล้วทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นด้วย SPE ชนิดซิลิกา จากนั้นตรวจวิเคราะห์โดยระบบ UPLC โดยใช้คอลัมน์ BEH C18 (100x2.1 มิลลิเมตร, 1.7 ไมครอน) และใช้เฟสเคลื่อนที่ ซึ่งประกอบด้วยน้ำ และอะซิโตนไทรล์ ที่อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ทำการตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 214 นาโนเมตร ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีตาม ICH guideline พบว่าช่วงการวิเคราะห์ที่ทดสอบคือ 0.001-0.1 มิลลิกรัมต่อกรัม ให้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง มีค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.9999 ค่า %RSD ของการทดสอบความเที่ยงของวิธีในหัวข้อ repeatability และ intermediate precision เท่ากับ 2.06 และ 3.02 ตามลำดับ ค่า %recovery ของวิธีอยู่ในช่วง 102-105% ค่า LOD และ LOQ ของสารไมโรเอสโตรล เท่ากับ 0.5 และ 1 ไมโครกรัมต่อกรัม ผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างผลิตภัณฑ์แคปซูลกวาวเครือขาวด้วยวิธีที่พัฒนาได้นี้ พบว่า สามารถตรวจพบสารไมโรเอสโตรล ได้จำนวน 9 ตัวอย่าง จากตัวอย่างทั้งหมด 22 ตัวอย่าง โดยมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1.40-15.68 ไมโครกรัมต่อกรัม สรุปได้ว่าวิธีนี้มีความเหมาะสม สามารถนำไปใช้เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์สารไมโรเอสโตรล ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์แคปซูลกวาวเครือขาวได้เป็นอย่างดี

คำสำคัญ: ไมโรเอสโตรล, กวาวเครือขาว, UPLC

Development and Validation of Miroestrol Analysis in *Kwao Keur Khao* Capsules Using UPLC Technique

Detmontree Wachisunthon^{*,‡}, Theerawut Pinthong^{*}, Pranom Dechwisissakul^{*}, Wutichai Nutakul^{*}, Subhadhcha Poonsatha^{*}, Pairin Thongkump^{*}, Sorrapetch Marsud^{*}, Sakwichai Onthong^{*}, Sunee Chansakaow[†]

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

[†]Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200

[‡]Corresponding author: detmontree.w@dmisc.mail.go.th

Abstract

The main active compound of *Pueraria* spp. (*kwao kkruea khao* in Thai) is miroestrol, whose content has been found to be highly variable in nature. Thus, it is necessary to control the quality of raw materials and products to ensure their efficacy and consumers' safety. This study aimed to develop and validate a UPLC method for analysis of miroestrol in *kwao khruea khao* capsules. Each of the samples was extracted with ethanol and the extract obtained was cleaned up with a Sep-Pak si SPE cartridge. Miroestrol in the extract was separated on a BEH c18 (100 × 2.1 mm, 1.7 μm) column with a mobile phase composed of water and acetonitrile at a flow rate of 0.5 mL/min at detection wavelength of 214 nm. The developed method was validated according to the ICH guidelines. For miroestrol at the concentration range of 0.001–0.1 mg/g, its linearity was observed with a correlation coefficient (r) of 0.9999. The %RSDs of miroestrol content for repeatability and intermediate precision were 2.06% and 3.02%, respectively. The recovery rate of this method was 102–105%; and the limits of detection and quantification of miroestrol were 0.5 and 1 μg/g, respectively. The developed method was used for analysis of capsule products, and results showed that nine out of 22 samples contained miroestrol at concentrations of 1.40–15.68 μg/g. In conclusion, this method is suitable and can be properly used for miroestrol determination in *kwao khruea khao* capsules.

Key words: miroestrol, *Pueraria* spp., UPLC

บทนำและวัตถุประสงค์

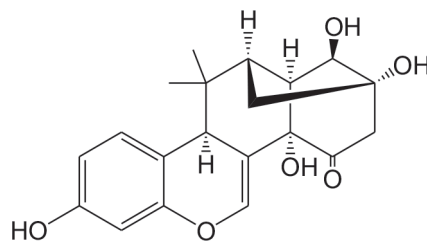
กวาวเครือขาวเป็นพืชสมุนไพรที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Pueraria mirifica* Airy Shaw & Suvat. และ *P. candollei* Wall. Ex Benth. ตามสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย^[1-2] ถือได้ว่าเป็นสมุนไพรไทยที่ใช้กันมาอย่างยาวนาน โดยมีรายงานว่า มีการกล่าวถึงการใช้ประโยชน์ของกวาวเครือขาวเป็นครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2474 โดยจัดพิมพ์ในรูปแบบของแผ่นพับชื่อว่า ตำรายาหัวกวาวเครือของหลวงอนุสารสุนทร

กรมการพิเศษเชียงใหม่ ซึ่งในตำรานี้ได้ระบุสรรพคุณไว้ว่า ใช้เป็นยาอายุวัฒนะ ช่วยเพิ่มความเป็นหนุ่มสาว ช่วยลดการเหี่ยวของผิวหนัง ช่วยให้ผมหงอกดำ บรรเทาอาการต่อกระดูก ช่วยเพิ่มความจำ ช่วยให้การเคลื่อนไหวของร่างกายดีขึ้น ช่วยเรื่องการไหลเวียนโลหิต ช่วยทำให้เจริญอาหารและช่วยเรื่องการนอนหลับ^[1] ปัจจุบันนิยมใช้กวาวเครือขาวเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับการชะลอวัย และใช้รักษาบรรเทาอาการวัยทองในสตรี โดยมีการศึกษาวิจัยทาง

คลินิกของกวางเครือขาวพบว่า การให้กวางเครือขาว โดยการรับประทานจะช่วยบรรเทาอาการวัยทอง เช่น อาการร้อนวูบวาบ นอนไม่หลับ อาการแพ้ปรวนปวดหลังปวดข้อ^[3-4] และอาการช่องคลอดแห้งได้^[5] นอกจากนี้ยังมีการทดสอบกวางเครือขาวในรูปแบบของเจลทาช่องคลอดซึ่งพบว่า สามารถบรรเทาอาการช่องคลอดแห้งได้แม้ประสิทธิภาพจะไม่ดีเท่ากับครีมเอสโตรเจน^[6]

สาเหตุที่กวางเครือขาวมีสรรพคุณทางยา เนื่องจากมีองค์ประกอบทางเคมีเป็นสารออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน หรือสารไฟโตเอสโตรเจน โดยมีรายงานว่า พบสารไฟโตเอสโตรเจนอย่างน้อย 17 ชนิด ในกวางเครือขาว โดยสามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม isoflavonoid จำนวน 10 ชนิด ได้แก่ daidzein, daidzin, genistein, genistin, kwakhurin, kwakhurin hydrate, tuberosin, puerarin, mirificin และ puerimircarpene; กลุ่ม coumestran จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ coumestrol, mirificoumestan, mirificoumestan glycol และ mirificoumestan hydrate และกลุ่ม chromene จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ ไมโรเอสโตรล (miroestrol), ไดออกซีไมโรเอสโตรล (deoxymiroestrol) และ ไอโซไมโรเอสโตรล (isomiroestrol)^[1] โดยในช่วงแรกของงานวิจัยกวางเครือขาวพบว่า สารไมโรเอสโตรล (ภาพที่ 1) เป็นสารออกฤทธิ์สำคัญเนื่องจากมีฤทธิ์เอสโตรเจนแรงที่สุด โดยพบว่า มีฤทธิ์เท่ากับ 0.25 เท่าของสาร 17 β -estradiol ต่อมา มีการแยกสารไดออกซีไมโรเอสโตรล ได้สำเร็จและพบว่า มีฤทธิ์มากกว่าสารไมโรเอสโตรล 10 เท่า แต่มีความคงตัวน้อยกว่า โดยพบว่า ในระหว่างขั้นตอนการสกัดและแยกสารนั้น ตัวสารไดออกซีไมโรเอสโตรล จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเปลี่ยนเป็นสารไมโรเอสโตรล และสาร

ไอโซไมโรเอสโตรล^[7] ดังนั้นด้วยความที่สารไมโรเอสโตรล มีความคงตัวสูงกว่า จึงมักถูกเลือกใช้เป็นสาร marker สำคัญสำหรับงานตรวจวิเคราะห์^[8] โดยปริมาณสารไมโรเอสโตรลในหัวกวางเครือขาวที่เคยมีการรายงานนั้นพบว่า Sunee Chansakaow และคณะได้รายงานไว้ที่ 0.002% w/w^[7] Satoko Shimokawa และคณะ รายงานผลการตรวจวิเคราะห์ไว้ที่ 0.004 %w/w^[8] และ Gorawit Yusakul และคณะ แสดงผลการตรวจวิเคราะห์จำนวน 4 ตัวอย่างไว้ที่ 0.018, 0.0061, 0.0069 และ 0.0000 %w/w^[9] ซึ่งจะเห็นว่าปริมาณสารสำคัญนี้มีค่าความแปรปรวนสูง โดยมีความแตกต่างกันสูงสุดถึง 9 เท่า รวมทั้งยังมีตัวอย่างที่ตรวจไม่พบสารไมโรเอสโตรลด้วย ดังนั้นถ้าไม่มีการควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบจะส่งผลให้ผู้บริโภคได้รับสารสำคัญนี้ในปริมาณที่ไม่แน่นอน ซึ่งจะมีผลต่อประสิทธิภาพและความปลอดภัยได้ รวมทั้งหากไม่มีการควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบที่ใช้ในการศึกษาวิจัย ก็จะส่งผลต่อความน่าเชื่อถือของข้อมูลการศึกษาที่ได้ด้วย ซึ่งที่ผ่านมา งานวิจัยทางคลินิกของกวางเครือขาวส่วนใหญ่แล้วยังขาดข้อมูลปริมาณสารสำคัญไมโรเอสโตรล^[10] ดังนั้นวิธีการตรวจวัดสารสำคัญนี้ จึงมีความสำคัญต่อการพัฒนาการใช้ประโยชน์ของสมุนไพรกวางเครือขาวเป็นอย่างมาก



ภาพที่ 1 โครงสร้างของ miroestrol

สำหรับผลิตภัณฑ์แคปซูลกวาวเครือขาวนั้น เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีการจำหน่ายและใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยอยู่ในรูปแบบของยาแผนโบราณที่นอกจาก กวาวเครือขาวแล้วยังมีส่วนผสมเป็นสมุนไพรชนิดอื่น ๆ อีกหลายชนิด ซึ่งพบว่า ยังไม่เคยมีรายงาน ถึงวิธีวิเคราะห์สารไมโรเอสโตรอล ในผลิตภัณฑ์ แคปซูลกวาวเครือขาวที่เป็นสารผสมนี้เลย ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาวิธีการตรวจ วิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญไมโรเอสโตรอล ในตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์แคปซูลกวาวเครือขาวที่มีความถูกต้อง แม่นยำ และเชื่อถือได้ ซึ่งเบื้องต้นจะทำให้ทราบ ข้อมูลปริมาณสารสำคัญไมโรเอสโตรอล ในตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์ที่จำหน่ายในท้องตลาด รวมทั้งยังสามารถ ใช้วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาได้นี้เป็นวิธีวิเคราะห์สำหรับการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์และวัตถุดิบสำหรับ งานวิจัย เพื่อให้ผลของงานวิจัยนั้นมีความน่าเชื่อถือ ซึ่งจะช่วยพัฒนาการใช้ประโยชน์จากกวาวเครือขาว ได้อย่างยั่งยืนต่อไป

ระเบียบวิธีศึกษา

วัสดุ

1. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์แคปซูลกวาวเครือขาว

รวบรวมตัวอย่างผลิตภัณฑ์แคปซูลกวาวเครือขาวที่มีจำหน่ายในท้องตลาดในช่วงปี 2561-2563 จำนวนทั้งสิ้น 22 ตัวอย่าง

2. สารมาตรฐาน

สารไมโรเอสโตรอล ได้มาจากการสกัดและแยกสารจากวัตถุดิบกวาวเครือขาวจนได้เป็นผลึกบริสุทธิ์ ไมโรเอสโตรอล ซึ่งทำการตรวจสอบโดยวิธี HPLC เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานไมโรเอสโตรอล ของ ดร.สุณีย์ จันทรสกา^[7] คณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัย

เชียงใหม่

3. สารเคมี

เอทานอล (AR grade), เฮกเซน (AR grade), เอทิล อะซิเตท (AR grade), อะซิโตนไไตรล์ (HPLC grade), น้ำ (ultrapure water)

4. เครื่องมือ

เครื่องชั่งไฟฟ้าความละเอียด 0.01 มิลลิกรัม (Mettler toledo), ultrasonic bath (Branson 5200), rotary evaporator (Eyela, Japan), centrifuge (Eppendorf), vacuum pump, vacuum manifold, nitrogen evaporator (N-EVAPTM112), AcquityTM Ultra Performance LC (Waters, USA)

5. วัสดุวิทยาศาสตร์

หลอดปั่นสาร ขนาด 50 มิลลิลิตร, nylon membrane filter ขนาด 0.2 ไมโครเมตร, nylon syringe filter ขนาด 0.2 ไมโครเมตร, silica SPE cartridge (Sep-Pak[®], 3 ลูกปาร์กเซนต์เมตร 500 มิลลิกรัม), หลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร, Acquity UPLC column BEH C18 (1.7 ไมครอน, 2.1 × 100 มิลลิเมตร) และเครื่องแก้ว

วิธีการศึกษา

1. การสกัดตัวอย่าง

ซึ่งตัวอย่างผงยาแคปซูลกวาวเครือขาว ตัวอย่าง ละ 2 กรัม ใส่ใน centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมเอทานอล 10 มิลลิลิตร แล้วทำการสกัดด้วยวิธี ultrasound-assisted extraction โดยนำไปตั้ง สกัดใน ultrasonic bath เป็นเวลา 25 นาที จากนั้นนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อ นาที นาน 10 นาที เพื่อเก็บสารละลายส่วนใส ส่วน ตะกอนที่เหลือทำการสกัดอีกรอบด้วยเอทานอล

10 มิลลิลิตร แล้วทำการล้างตะกอนอีก 2 รอบ ด้วย เอทานอล 5 มิลลิลิตร นำส่วนผสมทั้งหมดมารวมกันแล้ว นำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator จากนั้นทำการละลายกลับด้วย 80% เอทานอลในน้ำ โดยปรับปริมาตรเป็น 2 มิลลิลิตร

2. การเตรียมตัวอย่างให้บริสุทธิ์

ดำเนินการเตรียมตัวอย่างสารสกัดให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นด้วยเทคนิค solid phase extraction (SPE) ซึ่งเลือกใช้ SPE cartridge ชนิดซิลิกา โดยทำการปรับสถานะ SPE cartridge ด้วยเอทานอล ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ตามด้วยเฮกเซน ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากนั้นไปเปิดตัวอย่างสารสกัดปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงบน packing bed ของ SPE cartridge จะล้างสารรบกวนออกด้วยเฮกเซน ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และ elute สารสกัดออกมาด้วย 5% เอทานอล ในเอทิล อะซิเตท ปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำสารสกัดที่ได้ไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง nitrogen evaporator แล้วละลายกลับด้วยเอทานอล ปริมาตร 200 ไมโครลิตร โดยกรองด้วย nylon syringe filter

ตารางที่ 1 สภาวะ gradient ของ mobile phase

Time (min)	%mobile phase A	%mobile phase B
initial	83	17
2.7	83	17
3.0	75	25
4.2	75	25
4.5	68	32
6.0	68	32
6.5	32	68
8.5	32	68
9.0	83	17
10.0	83	17

ขนาด 0.2 ไมโครเมตร ก่อนการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UPLC

3. สภาวะของระบบ UPLC

column: Acquity UPLC column BEH

C18 (1.7 ไมครอน, 2.1×100 มิลลิเมตร)

column temperature: 35 °C

mobile phase A: น้ำ

mobile phase B: อะซิโตนไตรล

flow rate: 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที

injection volume: 1 ไมโครลิตร

detector: PDA detector ที่ความยาวคลื่น 214 นาโนเมตร

สภาวะ gradient ของ mobile phase: ตารางที่ 1

4. การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation)

4.1 การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (linearity และ range)

เตรียมสารไมโรเอสโตรอล ลงในตัวอย่างจำนวน 7 ระดับ ที่ช่วงความเข้มข้น 0.001-0.1 มิลลิกรัม/กรัม แล้วนำไปตรวจวิเคราะห์ตามวิธีที่พัฒนาได้ สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับ peak area ที่ได้ คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์ (correlation coefficient, r)

4.2 การทดสอบความเที่ยง (precision) ของวิธี

การทดสอบค่า repeatability โดยการทำตามวิธีวิเคราะห์ ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเดียวกันจำนวน 6 ตัวอย่าง ภายในวันเดียวกัน แล้วคำนวณค่า %RSD ของผลการตรวจวิเคราะห์ที่ได้

การทดสอบค่า intermediate precision โดย

การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเดียวกัน วันละ 6 ตัวอย่าง เพิ่มอีก 2 วัน แล้วหาค่า %RSD ของผลการตรวจวิเคราะห์ของทั้งหมด 3 วัน

4.3 การทดสอบความแม่นยำของวิธี (accuracy)

เติมสารไมโรเอสตรอล ลงในตัวอย่างจำนวน 3 ระดับ คือ 0.001, 0.01 และ 0.02 มิลลิกรัม/กรัม ระดับละ 3 ซ้ำ ทำการตรวจวิเคราะห์แต่ละตัวอย่างตามวิธี แล้วคำนวณหาค่า %recovery

4.4 การหาค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD)

ทำการทดสอบโดยการหาความเข้มข้นของสารไมโรเอสตรอล ในตัวอย่างที่ให้ค่า signal-to-noise เท่ากับ 3:1

4.4 การหาค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ)

LOQ มีค่าเท่ากับความเข้มข้นของสารไมโรเอสตรอล ในตัวอย่าง ที่ให้ค่า signal-to-noise เท่ากับ 10:1

4.5 ความจำเพาะเจาะจง (specificity) ของวิธี

วิเคราะห์ method blank โดยทำการสกัดและเตรียมตัวอย่างให้บริสุทธิ์ตามวิธีที่พัฒนาได้ โดยใช้สารเคมีและวัสดุทั้งหมดแต่ไม่มีตัวอย่าง แล้วทำการตรวจวิเคราะห์เพื่อตรวจสอบสารรบกวนที่อาจมาจากสารเคมีหรือวัสดุที่ใช้ในการสกัดและเตรียมตัวอย่างให้บริสุทธิ์

4.6 การสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve)

เตรียมสารไมโรเอสตรอลความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยชั่งสารไมโรเอสตรอล 0.2 มิลลิกรัม ละลายในเอทานอล ปริมาตรให้เป็น 1 มิลลิลิตร ใช้เตรียม working standard ความเข้มข้น 0.02, 0.015, 0.01, 0.005 และ 0.0005 มิลลิกรัม/

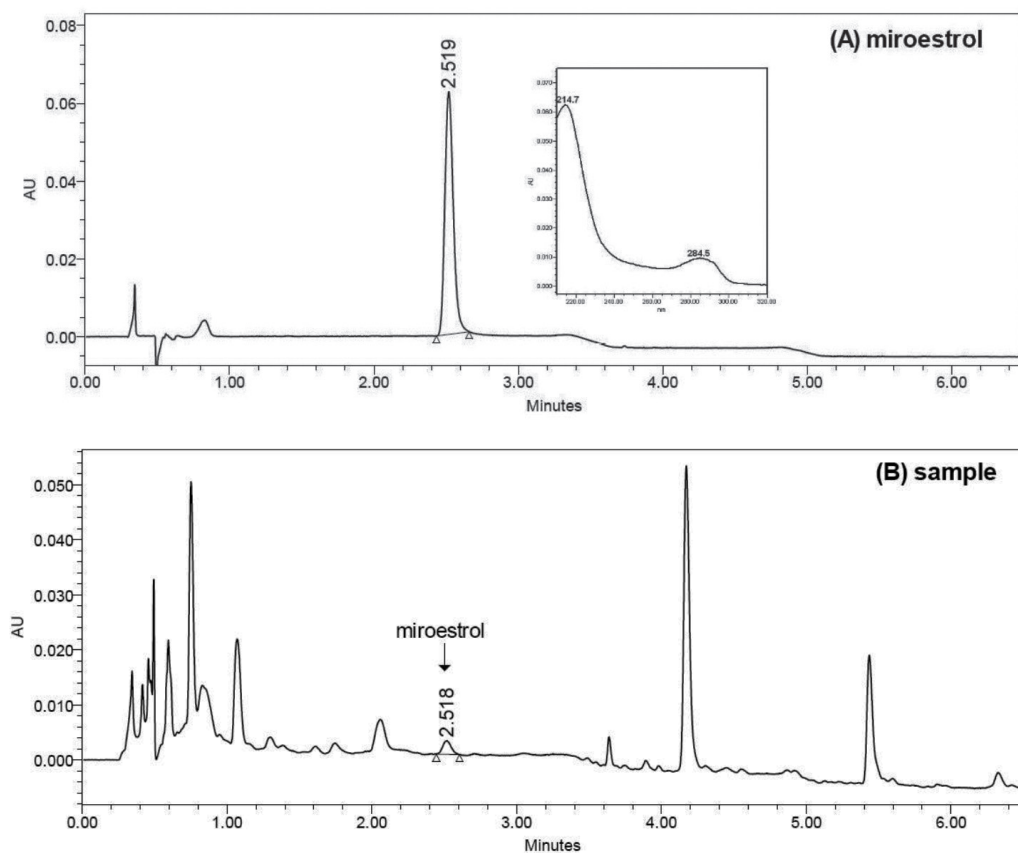
มิลลิลิตร สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารไมโรเอสตรอล กับ peak area คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์ (correlation coefficient, r)

ผลการศึกษา

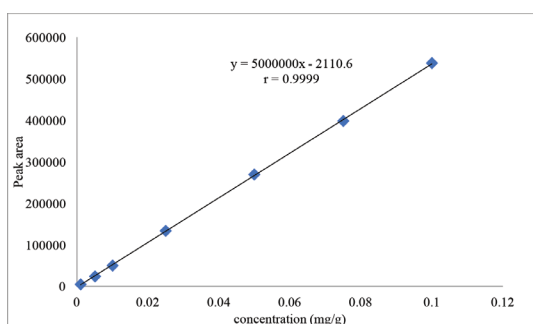
ตัวอย่างผลิตภัณฑ์แคปซูลกวาวเครือขาวที่ผ่านขั้นตอนการสกัดตัวอย่าง การเตรียมตัวอย่างให้บริสุทธิ์ และการตรวจวิเคราะห์โดย UPLC ตามวิธีที่พัฒนาได้นี้ ได้ตัวอย่างผลการตรวจวิเคราะห์เป็นโครมาโตแกรม เปรียบเทียบกับโครมาโตแกรมของสารไมโรเอสตรอลดังภาพที่ 2 ซึ่ง peak ของสารไมโรเอสตรอล มีค่า retention time ที่ประมาณ 2.52 นาที และ ยูวีสเปกตรัม จะต้องมียลักษณะเฉพาะตัวคือ มีค่า λ_{max} สองตำแหน่งที่ประมาณ 214 และ 283 นาโนเมตร เมื่อทำการวิเคราะห์ method blank ตามวิธีที่พัฒนาได้ไม่พบ peak รบกวนใด ๆ โดยวิธีนี้มีค่า LOD เท่ากับ 0.5 ไมโครกรัมต่อกรัม ที่ค่า signal-to-noise เท่ากับ 3:1 และมีค่า LOQ เท่ากับ 1 ไมโครกรัมต่อกรัม ที่ค่า signal-to-noise เท่ากับ 10:1 ในส่วนของกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารไมโรเอสตรอล กับ peak area ของสารไมโรเอสตรอล ที่ระดับ 0.0005-0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้กราฟเป็นเส้นตรงมีค่า r มากกว่า 0.999

ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์พบว่า ในช่วงความเข้มข้นของสารไมโรเอสตรอล ในตัวอย่างที่ระดับ 0.001-0.1 มิลลิกรัมต่อกรัม ได้กราฟเส้นตรงมีค่า r เท่ากับ 0.9999 (ภาพที่ 3)

ผลการทดสอบความเที่ยงของวิธี ในรูปแบบของค่า repeatability ได้ค่า %RSD ของผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเดียวกัน 6 ซ้ำ ภายในวันเดียวกัน เท่ากับ 2.18 และในรูปแบบของ intermediate preci-



ภาพที่ 2 ตัวอย่างผลการตรวจวิเคราะห์ (A) miroestrol (B) ตัวอย่างผลิตภัณฑ์



ภาพที่ 3 กราฟแสดง linearity ของวิธีวิเคราะห์

sion ได้ค่า %RSD ของผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเดียวกันวันละ 6 ซ้ำ จำนวน 3 วัน เท่ากับ 3.09 ซึ่งผลการทดสอบความเที่ยงของวิธีนี้แสดงดังตารางที่ 2

ผลการทดสอบความแม่นยำของวิธี โดยการเติม

สารไมโรเอสโตรล ที่ระดับความเข้มข้น 0.001, 0.01 และ 0.02 มิลลิกรัมต่อกรัม พบว่า มีค่า %recovery อยู่ในช่วง 102-105% ดังตารางที่ 3

ผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างผลิตภัณฑ์แคปซูลกวาวเครือขาวที่จำหน่ายในท้องตลาดโดยวิธีที่พัฒนาได้นี้ พบว่า จากการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างทั้งสิ้นจำนวน 22 ตัวอย่าง ซึ่งทำการตรวจวิเคราะห์ก่อนวันสิ้นอายุของผลิตภัณฑ์ตามที่ระบุบนฉลากพบว่า มีตัวอย่างที่ตรวจพบสารไมโรเอสโตรล จำนวน 9 ตัวอย่าง โดยมีความเข้มข้นของสารไมโรเอสโตรลอยู่ในช่วง 1.40-15.68 ไมโครกรัมต่อกรัม โดยผลการตรวจวิเคราะห์แต่ละตัวอย่างที่มีสารไมโรเอสโตรลแสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความเที่ยงของวิธี

	Day 1 (n = 6)	Day 2 (n = 6)	Day 3 (n = 6)
Repeatability			
Miroestrol ($\mu\text{g/g}$) (Mean $\pm$ S.D.)	3.06 $\pm$ 0.06	3.02 $\pm$ 0.06	2.90 $\pm$ 0.06
%RSD	2.06	1.91	2.18
Intermediate precision			
Miroestrol ($\mu\text{g/g}$) (Mean $\pm$ S.D.)	2.99 $\pm$ 0.09		
%RSD	3.02		

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความแม่นยำของวิธี

Concentration after adding standard (mg/mL)	Concentration found (mg/mL)	%recovery	%RSD (n = 3)
0.020	0.02103	105	0.56
0.010	0.01034	103	1.03
0.001	0.00102	102	0.82

ตารางที่ 4 ผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีสาร miroestrol

Sample no.	miroestrol ($\mu\text{g/g}$) (Mean $\pm$ S.D., n = 3)
1	2.25 $\pm$ 0.03
2	4.79 $\pm$ 0.12
3	3.41 $\pm$ 0.09
4	3.32 $\pm$ 0.02
5	3.41 $\pm$ 0.13
6	2.02 $\pm$ 0.13
7	2.23 $\pm$ 0.02
8	15.68 $\pm$ 0.78
9	1.40 $\pm$ 0.03

อภิปรายผล

วิธีตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาได้นี้ ใช้ระยะเวลาในการฉีดตัวอย่าง (runtime) 10 นาที และพีคของสารไมโรเอสโตรลออกมาที่ระยะเวลา (retention time) ประมาณ 2.5 นาที ถือได้ว่าเร็วที่สุดเมื่อเทียบ

กับวิธีวิเคราะห์สารไมโรเอสโตรล ด้วย HPLC ของงานวิจัยอื่น ๆ^[8-9,11] โดยสาเหตุหลักที่ใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์น้อยกว่าเป็นเพราะเครื่อง HPLC ที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นชนิด UPLC ที่มีประสิทธิภาพสูงกว่า HPLC ทั่วไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเรื่องของความเร็วของการตรวจวิเคราะห์ ส่วนที่มีความแตกต่างจากวิธีของงานวิจัยอื่นอีกประการหนึ่งก็คือ วิธีนี้จำเป็นต้องมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างให้บริสุทธิ์โดยเทคนิค SPE เนื่องจากตัวอย่างในงานวิจัยนี้เป็นผลิตภัณฑ์แคปซูล ซึ่งมีสมุนไพรชนิดอื่น ๆ ผสมอยู่ด้วย ทำให้มีสารรบกวนมากกว่าการวิเคราะห์ตัวอย่างวัตถุดิบกวาวเครือขาวเพียงอย่างเดียว การเตรียมตัวอย่างโดยเทคนิค SPE นี้จะช่วยขจัดสารรบกวนส่วนที่ไม่เกี่ยวข้องออก ซึ่งช่วยให้คอลัมน์สามารถแยกสารไมโรเอสโตรล ได้ง่ายขึ้น รวมทั้งช่วยลดการอุดตันของคอลัมน์ได้ ซึ่งจากการทดสอบความถูกต้องของวิธีพบว่า แม้จะมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างให้บริสุทธิ์

เพิ่มขึ้น แต่ผลการทดสอบก็บ่งชี้ว่าวิธีนี้มีความเที่ยงและความแม่นยำในเกณฑ์ดี มีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้เป็นวิธีสำหรับตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างผลิตภัณฑ์แคปซูลกวาวเครือขาวได้ รวมทั้งยังสามารถนำไปใช้เป็นวิธีสำหรับตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างวัตถุดิบกวาวเครือขาวที่มีสารปนเปื้อนน้อยกว่าได้อีกด้วย

จากผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างผลิตภัณฑ์แคปซูลกวาวเครือขาวที่จำหน่ายในท้องตลาด ซึ่งทำการตรวจวิเคราะห์ก่อนวันสิ้นอายุที่ระบุบนฉลากของผลิตภัณฑ์พบว่า มีตัวอย่างที่ตรวจไม่พบสารไมโรเอสโตรลที่ระดับ LOD ของวิธี (0.5 ไมโครกรัมต่อกรัม) จำนวน 13 ตัวอย่าง ส่วนตัวอย่างที่ตรวจพบสารไมโรเอสโตรลนั้น พบว่ามีความแตกต่างของปริมาณความเข้มข้นของสารสำคัญนี้สูงสุดถึงประมาณ 11 เท่า โดยเมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณเนื้อยากวาวเครือขาวที่ระบุบนฉลากต่อน้ำหนักผงยา 2 กรัม ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ของวิธีพบว่า กลุ่มตัวอย่างที่ตรวจไม่พบสารไมโรเอสโตรลนั้นมีเนื้อยากวาวเครือขาวอยู่ตั้งแต่ 153-640 มิลลิกรัม ส่วนกลุ่มตัวอย่างที่ตรวจพบสารไมโรเอสโตรลจำนวน 9 ตัวอย่าง มีเนื้อยากวาวเครือขาวอยู่ในช่วง 80-800 มิลลิกรัม ซึ่งจะพบข้อสังเกตคือ สามารถที่จะตรวจพบสารไมโรเอสโตรลได้ในตัวอย่างที่มีส่วนผสมของกวาวเครือขาวเพียง 80 มิลลิกรัม แต่ในขณะเดียวกัน ก็มีโอกาสที่จะตรวจไม่พบสารไมโรเอสโตรลได้ แม้ว่าตัวอย่างนั้นจะมีเนื้อยากวาวเครือขาวถึง 640 มิลลิกรัม ซึ่งสาเหตุหลักน่าจะมาจากปริมาณสารไมโรเอสโตรลในทางธรรมชาติที่มีความแปรปรวนสูง ตามที่มีรายงานว่า พบความแตกต่างกันถึง 9 เท่า รวมทั้งพบตัวอย่างที่ตรวจไม่พบสารไมโรเอสโตรลด้วย ดังนั้น ด้วยคุณภาพที่แตกต่างกันของวัตถุดิบ และปริมาณเนื้อยากวาวเครือขาวที่ไม่เท่ากันในแต่ละผลิตภัณฑ์

จะทำให้มีโอกาสดังกล่าวที่ปริมาณความเข้มข้นของสารไมโรเอสโตรลเมื่อเทียบกับน้ำหนักผงยาที่เท่ากัน ในแต่ละผลิตภัณฑ์ที่ตรวจพบจะมีความแตกต่างกันได้สูง ส่วนตัวอย่างที่ตรวจไม่พบสารสำคัญนั้นหากสามารถทำการเพิ่มปริมาณตัวอย่างที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์หรือตรวจเฉพาะตัววัตถุดิบกวาวเครือขาวเพียงอย่างเดียว ก็มีโอกาสดังกล่าวที่จะตรวจพบสารไมโรเอสโตรลได้ ซึ่งวิธีที่พัฒนาได้นี้จะสามารถนำไปใช้ได้เป็นอย่างดี

สำหรับสารสำคัญไมโรเอสโตรลนี้มีรายงานว่า พบได้เฉพาะในพืชกวาวเครือขาวเท่านั้น^[1] ดังนั้นหากสามารถทำการตรวจพบสารไมโรเอสโตรลได้ในผลิตภัณฑ์ใด เบื้องต้นจะสามารถยืนยันได้ว่าผลิตภัณฑ์นั้นมีส่วนผสมของกวาวเครือขาวอยู่จริง แต่สำหรับปริมาณที่เหมาะสมนั้นยังไม่มีเกณฑ์ที่ระบุไว้ จำเป็นต้องมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติม ซึ่งวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาได้จะเป็นประโยชน์สำหรับงานวิจัยและงานควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์ต่อไปได้

ข้อสรุป

วิธีวิเคราะห์สาร miroestrol ในผลิตภัณฑ์แคปซูลกวาวเครือขาวโดยวิธี UPLC ที่พัฒนาได้นี้ สามารถจัดสรรบวกรวบรวมได้ดีและใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์ที่รวดเร็ว มีผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีที่บ่งชี้ว่า วิธีนี้มีความไวและความจำเพาะ รวมทั้งมีความแม่นยำและความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ดี สามารถนำไปใช้เป็นวิธีสำหรับตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างผลิตภัณฑ์แคปซูลกวาวเครือขาวได้อย่างถูกต้องเชื่อถือได้ โดยผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างผลิตภัณฑ์แคปซูลกวาวเครือในท้องตลาดแสดงให้เห็นถึงความแปรปรวนของปริมาณสารไมโรเอสโตรลโดยต่างกันสูงสุดประมาณ 11 เท่า เมื่อเทียบกับน้ำหนักผงยาที่

เท่ากัน ดังนั้นจำเป็นต้องมีการควบคุมให้ได้มาตรฐาน เพื่อความปลอดภัยและประสิทธิภาพในการใช้ของผู้บริโภค ซึ่งวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาได้นี้จะสามารถนำไปใช้ประโยชน์สำหรับงานวิจัย เพื่อศึกษาหากระดับที่เหมาะสมของสารไมโรเอสโตรล ที่มีความปลอดภัยและมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังสามารถใช้วิธีนี้เป็นวิธีสำหรับตรวจวิเคราะห์เพื่อควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์ต่อไปได้

References

1. Malaivijitnond S. Medical applications of phytoestrogens from the Thai herb *Pueraria mirifica*. *Front Med*. 2012;6(1):8-21.
2. POWO (2021). Plants of the World Online. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. [Internet]. [cited 2021 Aug 27]. Available from: <http://www.plantsoftheworldonline.org/>
3. Lamlerkittikul S, Chandeying V. Efficacy and safety of *Pueraria mirifica* (Kwao Kruea Khao) for the treatment of vasomotor symptoms in perimenopausal women: phase II study. *J Med Assoc Thai*. 2004;87(1):33-40.
4. Virojchaiwong P, Suwithayasiri V, Itharat A. Comparison of *Pueraria mirifica* 25 and 50 mg for menopausal symptoms. *Arch Gynecol Obstet*. 2011;284:411-9.
5. Manonai J, Chittacharoen A, Theppisai U, Theppisai H. Effect of *Pueraria mirifica* on vaginal health. *Menopause*. 2007;14(5):914-24.
6. Suwanvesh N, Manonai J, Sophonsritsuk A, Cherdshewasart W. Comparison of *Pueraria mirifica* gel and conjugated equine estrogen cream effects on vaginal health in postmenopausal women. *Menopause*. 2017;24(2):210-5.
7. Chansakaow S, Ishikawa T, Seki H, Sekine K, Okada M, Chaichantipyuth C. Identification of deoxymiroestrol as the actual rejuvenating principle of "Kwao Keur", *Pueraria mirifica*. The know miroestrol may be an artifact. *J Nat Prod*. 2000;63(2):173-5.
8. Shimokawa S, Kumamoto T, Ishikawa T, Takashi M, Higuchi Y, Chaichantipyuth C, Chansakaow S. Quantitative analysis of miroestrol and kwakhurin for standardization of Thai miracle herb 'Kwao Keur' (*Pueraria mirifica*) and establishment of simple isolation procedure for highly estrogenic miroestrol and deoxymiroestrol. *Nat Prod Res*. 2013;27:371-8.
9. Yusakul G, Putalun W, Udomsin O, Juengwatanatrakul T, Chaichantipyuth C. Comparative analysis of the chemical constituents of two varieties of *Pueraria candollei*. *Fitoterapia*. 2011;82:203-7.
10. Kongkaew C, Scholfield NC, Dhippayom T, Dilokthornsakul P, Saokaew S, Chaiyakunapruk N. Efficacy and safety of *Pueraria candollei* var. *mirifica* (Airy Shaw & Suvat.) Niyomdham for menopausal woman: a systematic review of clinical trials and the way forward. *J Ethnopharmacol*. 2018;216:162-74.
11. Lee JH, Kim JY, Cho SH, Jeong JH, Cho S, Park HJ, Baek SY. Determination of miroestrol and isomiroestrol from *Pueraria mirifica* (White Kwao Krua) in dietary supplements by LC-MS-MS and LC-Q-Orbitrap/MS. *J Chromatogr Sci*. 2017;55(3):214-21.