

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสาร Mitragynine ในใบกระท่อมด้วยวิธี Ultra High Performance Liquid Chromatography

อัสวชัย ช่วยพรหม*, ศิริวรรณ ชัยสมบุญพันธ์, ศักดิ์วิชัย อ่อนทอง, พิรธรรม เทียมเทียบรัตน์, สายันท์ เรืองเขตร, ธนวัฒน์ ทองจีน

สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ ตำบลตลาดขวัญ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000

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

บทคัดย่อ

บทนำและวัตถุประสงค์: พืชกระท่อมได้รับการปลดออกจากสถานะยาเสพติดให้โทษในประเภท 5 มาเป็นพืชที่สามารถครอบครองบริโภค และใช้ประโยชน์จากพืชกระท่อมได้ ประกอบกับกระท่อมเป็นพืชที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจ สารออกฤทธิ์หลักในใบกระท่อมคือสาร mitragynine มีฤทธิ์ทำให้รู้สึกเคลิ้ม แก่ปวด การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสาร mitragynine ในใบกระท่อมด้วยวิธี Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) และทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น

วิธีการศึกษา: แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน ได้แก่ การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ mitragynine ในใบกระท่อมด้วยวิธี UHPLC การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ และการวิเคราะห์ปริมาณสาร mitragynine ในใบกระท่อมจำนวน 17 ตัวอย่าง

ผลการศึกษา: พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์คือ ใช้วัฏภาคคงที่เป็น ARC-18 ขนาด 4.6×150 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 2.7 ไมโครเมตร และวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เป็น 0.1% ortho-phosphoric acid ในน้ำ และ 0.1% ortho-phosphoric acid ใน acetonitrile อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตร/นาที ตรวจวัดที่ 222 นาโนเมตร มีค่า retention time เฉลี่ยที่ 7.19 นาที ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์พบ calibration curve มีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.30-30.00 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ค่า correlation coefficient (r) มีค่าเท่ากับ 0.9998 การทดสอบความแม่นยำของวิธีพบค่า % mean recovery อยู่ในช่วงร้อยละ 99.72-100.88 ค่า HORRAT อยู่ในช่วง 0.21-0.51 การทดสอบความเที่ยงพบว่าการวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวน 10 ซ้ำภายในวันเดียวกันและการวิเคราะห์ตัวอย่างเมื่อเปลี่ยนวันที่วิเคราะห์เป็นเวลา 3 วัน วันละ 10 ซ้ำ มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 0.53 และ 0.78 ตามลำดับค่า Limit of detection (LOD) มีค่าเท่ากับ 0.19 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรและค่า Limit of Quantification (LOQ) มีค่าเท่ากับ 0.64 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เมื่อนำวิธีวิเคราะห์นี้มาตรวจปริมาณสาร mitragynine ในตัวอย่างใบกระท่อมจำนวน 17 ตัวอย่าง พบปริมาณสาร mitragynine ในตัวอย่างใบกระท่อมทั้ง 17 ตัวอย่าง มีปริมาณอยู่ระหว่าง 0.99 ถึง 1.89 ร้อยละโดยน้ำหนัก (% w/w)

อภิปรายผล: การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสาร mitragynine ในวัตถุดิบใบกระท่อมด้วยเครื่อง UHPLC ที่พัฒนาขึ้น สกัดใบกระท่อมแห้งด้วยตัวทำละลาย ethanol โดยวิธี reflux ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์พบว่าทุกค่าอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ วิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อย วิธีการเตรียมวัฏภาคเคลื่อนที่ง่าย สะดวก และรวดเร็ว

ข้อสรุป: วิธีวิเคราะห์ปริมาณ mitragynine ในใบกระท่อมด้วยวิธี UHPLC ที่พัฒนาขึ้นมีความถูกต้อง แม่นยำเหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร mitragynine ในวัตถุดิบ สารสกัดใบกระท่อม และสามารถใช้ในการงานการวิเคราะห์แบบประจำได้

คำสำคัญ: กระท่อม, mitragynine, UHPLC

Development and Method Validation of Mitragynine Contents in *Mitragyna Speciosa* (Korth.) Havil. Leaves by Ultra High Performance Liquid Chromatography

Aussavashai Shuayprom^{*}, Siriwan Chaisomboonpan, Sakwichai Ontong, Peradhama Thiemthieprat, Sayan Ruengkhet, Thanawat Thongchin

Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Tiwanon Road, Talat Khwan Subdistrict, Mueang District, Nonthaburi 11000, Thailand

^{*}Corresponding author: aussavashai.s@dmisc.mail.go.th

Abstract

Introduction and Objective: *Kratom* (*Mitragyna speciosa*) plant has been removed from the list of controlled substances in Category 5, making it legally permissible for possession and consumption. Additionally, *kratom* is now recognized for its economic value. The primary active ingredient in *kratom* leaves is mitragynine, which induces pleasurable effects and provides pain relief. The objectives of this study were to develop a method for analyzing the quantity of mitragynine in *kratom* leaves using ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) and to test the validity of the developed analysis method.

Methods: The study was divided into three steps: developing the UHPLC method for analyzing mitragynine in *kratom* leaves, testing the validity of the analysis method, and analyzing the quantity of mitragynine in 17 *kratom* leaf samples.

Results: The appropriate conditions for the analysis were using an ARC-18 stationary phase measuring 4.6 × 150 millimeters with a particle size of 2.7 micrometers and a mobile phase consisting of 0.1% ortho-phosphoric acid in water and 0.1% ortho-phosphoric acid in acetonitrile at a flow rate of 1.0 milliliter per minute. The detection wavelength was set at 222 nanometers, with an average retention time of 7.19 minutes. The applicability test of the analysis method showed that the calibration curve was linear in the concentration range of 0.30–30.00 micrograms/milliliter, with a correlation coefficient (*r*) of 0.9998. The mean recovery percentage ranged from 99.72% to 100.88%, and the HORRAT values were in the range of 0.21–0.51. The precision test showed a relative standard deviation of 0.53 for samples analyzed on the same day and 0.78 for samples analyzed over three consecutive days. The limit of detection (LOD) was found to be 0.19 micrograms/milliliter, and the limit of quantification (LOQ) was 0.64 micrograms/milliliter. Using this developed UHPLC method for analysis, the study determined the quantity of mitragynine in the 17 *kratom* leaf samples, with concentrations ranging from 0.99% to 1.89% w/w.

Discussion: The method developed for analyzing mitragynine in raw *kratom* leaves using UHPLC involves the extraction of dried *kratom* leaves with ethanol as the solvent through the reflux method. The results of the validity test of the analysis method were all within acceptable limits. This developed analysis method requires less time for analysis and involves a simple, convenient, and rapid preparation of the mobile phase.

Conclusion and Recommendation: The developed UHPLC method for analyzing mitragynine in *kratom* leaves was found to be accurate, precise, and suitable for determining the quantity of mitragynine in raw *kratom* leaves and *kratom* leaf extracts. It can be used for routine analysis.

Key words: *Mitragyna speciosa* (Korth.) Havil., mitragynine, UHPLC

บทนำและวัตถุประสงค์

กระท่อม มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Mitragyna speciosa* (Korth.) Havil. จัดอยู่ในวงศ์เข็มและกาแฟ Rubiaceae เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง ใบสีเขียว ลำต้นจะมีความใหญ่สูงประมาณ 10-15 เมตร มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนชื้นแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะประเทศไทย มลายู จนถึงเกาะนิวกินี เติบโตได้ดีในที่ชุ่มชื้น ความชื้นสูง ดินอุดมสมบูรณ์ และมีแสงแดดปานกลาง กระท่อมในประเทศไทย มีอยู่อย่างน้อย 3 สายพันธุ์ เช่น พันธุ์แดงกวาง พันธุ์ยักษ์ใหญ่ และพันธุ์ก้านแดง เป็นต้น พบมากในป่าธรรมชาติบริเวณภาคใต้ เช่น จังหวัดสุราษฎร์ธานี จังหวัดนครศรีธรรมราช จังหวัดตรัง จังหวัดสตูล จังหวัดพัทลุง จังหวัดสงขลา จังหวัดยะลา จังหวัดปัตตานี จังหวัดนราธิวาส และยังพบในบางจังหวัดของภาคกลาง เช่น จังหวัดปทุมธานี มีชื่อเรียกแตกต่างกันไปในแต่ละพื้นที่ เช่น อีต้าง อีแดง กระท่อมท่อม เป็นต้น^[1-2]

ตำรายาไทยใช้ใบกระท่อม แก้วบิวดมวน บวดเบ่ง แก้วบวด แก้วท้องเสีย แก้วท้องร่วง แก้วบวดเมื่อยตามร่างกาย และระงับประสาท โดยใช้ใบสดหรือใบแห้งนำมาเคี้ยว สิบ หรือชงเป็นน้ำชา กลุ่มผู้ใช้แรงงาน และเกษตรกรบริโภคใบกระท่อมเพื่อกดความรู้สึกเหน็ดเหนื่อยเมื่อยล้า ทำให้ทำงานได้ยาวนานขึ้น กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข ได้รวบรวมตำรับยาแพทย์แผนโบราณที่ใช้พืชกระท่อมได้จำนวน 18 ตำรับทั้งหมดเป็นคัมภีร์ยาหลวงทั้งสิ้น เช่น ตำราพระโอสถพระนารายณ์ ตำรายาโรงพระโอสถ (สมัยรัชกาลที่ 2) ตำรายาศิลาจารย์วัดโพธิ์ (รัชกาลที่ 3) ตำราแพทย์ศาสตร์สงเคราะห์ (รัชกาลที่ 5) ตำรายาพระองค์เจ้าสายสนธิวงศ์เจ้ากรมหมอ

หลวง (รัชกาลที่ 5) ตำราเวชศึกษาของพระยาพิศณุประสาทเวช (รัชกาลที่ 5) ตำรายาแพทย์ตำบลงของพระยาแพทย์พงศาวิสุทธาธิบดี (แพทย์หลวงประจำพระองค์ในรัชกาลที่ 6) และคัมภีร์แพทย์ไทยแผนโบราณของขุนโสภิตบรรณลักษณ์ เป็นต้น^[2]

การศึกษาทางเภสัชวิทยาพบว่า สารที่พบในกระท่อมมากที่สุดเป็นสารกลุ่มอัลคาลอยด์ (alkaloids) ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในหลายระบบและถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคอย่างกว้างขวาง สารสำคัญที่พบคือสาร mitragynine ซึ่งพบเฉพาะในพืชกระท่อมเท่านั้น^[3] รายงานผลการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาพบว่าสาร mitragynine มีคุณสมบัติลดการปวด (analgesic) แก้ไอ (antitussive) บรรเทาอาการท้องร่วง (antidiarrheal) มีฤทธิ์ต้านมาลาเรีย (antimalarial)^[4-7] และมีฤทธิ์ต้านการซึมเศร้า (anti-depressant effect)^[4-9]

ประเทศอินโดนีเซียเป็นผู้เพาะปลูกและส่งออกกระท่อมรายใหญ่ที่สุดของโลก มีสัดส่วนการส่งออกร้อยละ 95 ของปริมาณการส่งออกทั่วโลก ส่วนที่เหลือส่งออกจากมาเลเซีย ไทย และเวียดนาม โดยมีประเทศสหรัฐอเมริกา เป็นตลาดผู้บริโภคสินค้าจากกระท่อมที่ใหญ่ที่สุดในโลก คิดเป็นมูลค่าตลาดประมาณ 30,000 ล้านบาทต่อปี คาดว่ามีผู้ใช้ผลิตภัณฑ์จากกระท่อมประมาณ 10-16 ล้านคน^[10]

ประเทศไทยได้มีการยกเลิกการกำหนดให้กระท่อมเป็นยาเสพติดให้โทษในประเภท 5 ประชาชนจึงสามารถครอบครอง บริโภค และใช้ประโยชน์จากกระท่อมได้ ประกอบกับกระท่อมเป็นพืชที่มีมูลค่าในทางเศรษฐกิจ จึงสมควรส่งเสริมให้มีการพัฒนาพืชกระท่อม ให้เป็นพืชที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจ โดยตามพระราชบัญญัติ พืชกระท่อม พ.ศ. 2565 กำหนด

ให้การใช้ใบกระท่อมเป็นวัตถุดิบหรือส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์สมุนไพรเป็นไปตามกฎหมายว่าด้วยผลิตภัณฑ์สมุนไพร การใช้ใบกระท่อมเป็นยาเป็นไปตามกฎหมายว่าด้วยยา การใช้ใบกระท่อมเป็นอาหารเป็นไปตามกฎหมายว่าด้วยอาหาร และการใช้ใบกระท่อมเครื่องสำอางเป็นไปตามกฎหมายว่าด้วยเครื่องสำอาง^[11]

การขออนุญาตผลิตภัณฑ์ดังกล่าว ต้องอาศัยข้อมูลการศึกษาทางวิทยาศาสตร์หลายด้าน ได้แก่ ข้อมูลด้านคุณภาพ ข้อมูลด้านความปลอดภัย ข้อมูลด้านประสิทธิภาพ โดยข้อมูลปริมาณสารสำคัญในวัตถุดิบสมุนไพรและผลิตภัณฑ์ (chromatographic profiles เช่น TLC, HPLC, GC)^[12] จัดเป็นข้อมูลที่มีความสำคัญในการขออนุญาต ทั้งนี้รายงานการศึกษาปริมาณสาร mitragynine ในวัตถุดิบใบกระท่อมและสารสกัดใบกระท่อมที่ผ่านมายังมีข้อจำกัดในเรื่องของเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ที่ยังใช้เวลานานเกินไป^[13-15] หรือวิธีการเตรียมตัวอย่างในการวิเคราะห์และวิธีการเตรียมวัสดุภาคเคลื่อนที่ที่ยังใช้เวลานาน มีความยุ่งยาก ไม่เหมาะสำหรับใช้ในการงานการวิเคราะห์แบบประจำ^[16]

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สาร mitragynine ในใบกระท่อม และทดสอบความถูกต้องของวิธี เพื่อให้ได้วิธีมาตรฐานที่มีความถูกต้องแม่นยำ สะดวก และรวดเร็ว สามารถใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพของวัตถุดิบและสารสกัดของใบกระท่อม เหมาะสมสำหรับใช้ในการงานการวิเคราะห์แบบประจำ เพื่อเตรียมข้อมูลสำหรับการขออนุญาตขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการวิจัยและพัฒนาและผลิตภัณฑ์ที่มีกระท่อมเป็นส่วนผสม รวมถึงเป็นข้อมูลในการพัฒนาพันธุ์กระท่อมและวิธีสกัดใบกระท่อมเพื่อให้ได้ปริมาณสารออก

ฤทธิ์ในปริมาณสูงเพื่อเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจของพืชกระท่อมต่อไป

ระเบียบวิธีศึกษา

1. วัสดุ

1.1 สารมาตรฐาน

mitragynine ความบริสุทธิ์ $\geq 95.4\%$ (Chromadex, Lot: 00013890-00223)

1.2 สารเคมีและตัวทำละลาย

methanol (HPLC grade), acetonitrile (HPLC grade), ethanol (AR grade), methanol (AR grade), hexane (AR grade) และน้ำปราศจากไอออน (deionized water)

1.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่อง Ultra High Performance Liquid Chromatography-DAD detector รุ่น 1290 Infinity II ผลิตภัณฑ์ของ Agilent คอลัมน์ชนิด ARC-18 ขนาด 4.6×150 มิลลิเมตร อนุภาคขนาด 2.7 ไมโครเมตร และ ARC-8 ขนาด 2.1×100 มิลลิเมตร อนุภาคขนาด 3.0 ไมโครเมตร ผลิตภัณฑ์ของ Restek ตู้บรอนไฟฟ้ารุ่น UL-50 ผลิตภัณฑ์ของ Memmert เครื่องบดปั่น รุ่น RT 34 ผลิตภัณฑ์ของ ChyunTseh Industrial เครื่องแรง รุ่น AS 200 Basic ผลิตภัณฑ์ของ Retsch เครื่องระเหยสุญญากาศ ผลิตภัณฑ์ของ Eyela ประกอบด้วย อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น SB-1000 เครื่อง rotavapor รุ่น N-1000 เครื่อง Aspirator รุ่น A-3S และเครื่องทำน้ำเย็นหมุนเวียน รุ่น CA-101 เครื่องชั่งไฟฟ้าความละเอียด 0.1 มิลลิกรัม รุ่น XB 220A ผลิตภัณฑ์ของ Precisa และ Nylon filter syringe ขนาด 0.2 ไมโครเมตร กระดาษกรองเบอร์ 4 และเครื่องแก้ว

1.4 ตัวอย่างใบกระท่อม

ตัวอย่างวัตถุดิบใบกระท่อมสดจำนวน 17 แหล่งตัวอย่าง แบ่งเป็นจากภาคใต้จำนวน 7 แหล่งตัวอย่าง โดยได้จากจังหวัดชุมพรจำนวน 4 แหล่งตัวอย่าง จังหวัดตรังจำนวน 2 แหล่งตัวอย่าง และจังหวัดกระบี่จำนวน 1 แหล่งตัวอย่าง และจากภาคกลางจำนวน 10 แหล่งตัวอย่าง โดยได้จากจังหวัดนนทบุรี จำนวน 4 แหล่งตัวอย่าง จังหวัดปทุมธานี จำนวน 3 แหล่งตัวอย่าง และ กรุงเทพมหานคร จังหวัดอยุธยา และจังหวัดนครปฐม จังหวัดละ 1 แหล่งตัวอย่าง เก็บในช่วงระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2564 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ 2565 ผ่านการตรวจระบุชื่อชนิด (plant identification) ของพรรณไม้ตามหลักอนุกรมวิธานพืช โดยนักพฤกษศาสตร์เปรียบเทียบกับตัวอย่างพรรณไม้แห่งหมายเลขอ้างอิง DMSC 5290 ว่าเป็นใบกระท่อม *Mitragyna speciosa* (Korth.) Havil.

2. วิธีดำเนินการ

2.1 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ mitragynine ในใบกระท่อม

1) การศึกษาวัฏภาคคงที่ (stationary phase) และวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase)

วิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน mitragynine และสารสกัดใบกระท่อมด้วยเครื่อง UHPLC เปรียบเทียบผลของคอลัมน์ที่แตกต่างกัน ได้แก่ ชนิดอนุภาคภายในคอลัมน์ (ARC-18 และ ARC-8) ความยาวคอลัมน์ (150 และ 100 มิลลิเมตร) โดยพิจารณาเลือกคอลัมน์จากลักษณะของ peak shape peak symmetry และ retention time

ศึกษาชนิดและสัดส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ โดยพิจารณาจาก peak shape และ retention time

ของสาร mitragynine ความสามารถในการแยก impurity จาก peak ของสาร mitragynine ในสารสกัดใบกระท่อม และความดันของระบบโครมาโทกราฟี

2) การศึกษาความยาวคลื่นที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์

วิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน mitragynine และสารสกัดใบกระท่อมด้วยเครื่อง UHPLC วัดการดูดกลืนแสง UV ของสารละลายมาตรฐาน mitragynine เพื่อดูความยาวคลื่นที่สาร mitragynine สามารถดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) และวิเคราะห์สารสกัดใบกระท่อมโดยใช้ diode array detector (DAD) เพื่อเลือกความยาวคลื่นสำหรับการตรวจวัด mitragynine ที่เหมาะสมและไม่มีการซ้อนทับของ peak (co-elute)

3) การศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด

วิเคราะห์ผลของการสกัดใบกระท่อมโดยวิธี reflux ด้วยตัวทำละลาย ethanol เปรียบเทียบกับการสกัดด้วยตัวทำละลาย methanol แล้วนำสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการสกัดสาร mitragynine จากใบกระท่อมของตัวทำละลาย ethanol กับ methanol

4) การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัด

วิเคราะห์ผลของการสกัดใบกระท่อมโดยวิธี reflux ด้วยตัวทำละลาย ethanol ที่เวลา 30 นาที 45 นาที และ 60 นาที แล้วนำสารสกัดใบกระท่อมที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC เพื่อเปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการสกัดกับปริมาณสาร mitragynine ที่สกัดได้

5) การศึกษาหาสภาวะของระบบโครมาโท

กราฟที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณ mitragynine ในใบกระท่อม

โดยการสรุปวิธีจากผลการศึกษาในหัวข้อ 1) - 4) ดังนี้

เตรียมสารละลายมาตรฐาน mitragynine ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

เตรียมสารสกัดใบกระท่อม โดยสกัดใบกระท่อมน้ำหนัก 0.1 กรัม ด้วย ethanol ปริมาตร 40 มิลลิลิตร โดยวิธี reflux เป็นเวลา 45 นาที กรองและนำสารสกัดที่ได้มาระเหยแห้ง ละลายกลับและปรับปริมาตรใน volumetric flask ด้วย methanol จนครบ 100 มิลลิลิตร กรองผ่าน nylon filter syringe

นำสารละลายมาตรฐาน mitragynine และสารสกัดใบกระท่อมที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC

2.2 การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

ทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสาร mitragynine ในใบกระท่อมที่พัฒนาขึ้นตามแนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข^[17]

1) การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (linearity and range)

เตรียมสารละลายมาตรฐาน mitragynine โดยชั่งสารมาตรฐาน mitragynine น้ำหนัก 10 มิลลิกรัม ละลายและปรับปริมาตรใน flask volumetric ด้วย methanol จนครบ 100 มิลลิลิตร จะได้ stock solution ของสารละลายมาตรฐาน mitragynine ความเข้มข้น 0.10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เจือจางให้ได้ 10 ระดับความเข้มข้น คือ 0.30, 0.60, 1.20, 2.50, 5.00, 10.00, 15.00, 20.00, 25.00 และ 30.00 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร วิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน mitragynine ที่เตรียมได้ด้วยเครื่อง UHPLC ความ

เข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำค่าพื้นที่ใต้พีค และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน mitragynine ไปสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) โดยมีเกณฑ์การยอมรับคือค่า r ต้องมีค่าไม่น้อยกว่า 0.995

2) การทดสอบความแม่นยำ (accuracy) โดยการทดสอบหาค่าร้อยละของการคืนกลับ (% recovery)

เตรียม sample blank (sample blank คือ ตัวอย่างใบกระท่อมที่นำมาสกัดและตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ mitragynine แล้วพบว่าไม่มีปริมาณสาร mitragynine ในปริมาณน้อย ๆ) โดยชั่งใบกระท่อม 0.1 กรัม สกัดด้วยวิธี reflux โดยใช้ ethanol เป็นเวลา 45 นาที กรองแล้วนำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้ง ละลายกลับและปรับปริมาตรใน volumetric flask ด้วย methanol จนครบ 100 มิลลิลิตร กรองผ่าน nylon filter syringe นำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC จำนวน 6 ซ้ำ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย (mean)

เตรียม spiked sample โดยเติมสารละลายสารมาตรฐาน mitragynine ที่ 3 ระดับความเข้มข้น ซึ่งเป็นจุดต่ำสุด จุดกึ่งกลาง และจุดสูงสุดของช่วงใช้งานลงใน sample blank ระดับละ 3 ซ้ำ จากนั้นนำสารละลาย spiked sample ที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณสาร mitragynine ด้วยเครื่อง UHPLC ความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ คำนวณหาค่า % recovery ที่แต่ละระดับความเข้มข้น หาค่าเฉลี่ยของค่าร้อยละของการคืนกลับ (% mean recovery) ค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% relative standard deviation, % RSD) และ HORRAT โดยมีเกณฑ์การยอมรับคือค่า % mean recovery ต้องอยู่ในช่วง 95-105 ค่า % RSD และ HORRAT ไม่เกิน 2.0

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

เมื่อ C1 คือ ความเข้มข้นของสารใน spiked sample
C2 คือ ความเข้มข้นของสารใน sample blank
C3 คือ ความเข้มข้นของสารที่เติม

3) การทดสอบความเที่ยง (precision)

repeatability: ทำโดยวิเคราะห์หาปริมาณสาร mitragynine ในสารสกัดใบกระท่อมซ้ำ 10 ครั้ง ในวันเดียวกัน คำนวณหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) โดยมีเกณฑ์การยอมรับคือ % RSD ต้องไม่เกิน 2.0

intermediate precision: ทำโดยวิเคราะห์หาปริมาณสาร mitragynine ในสารสกัด

ใบกระท่อม เป็นเวลา 3 วัน ๆ ละ 10 ซ้ำ คำนวณหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) โดยมีเกณฑ์การยอมรับคือ % RSD ต้องไม่เกิน 2.0

4) การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ

(limit of detection, LOD)

คำนวณค่า LOD จาก calibration curve ของกราฟที่ได้จากผลการทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) โดยค่า

$$\text{LOD (mg/ml)} = 3 \times \text{standard error/slope}$$

$$\text{LOD (\%w/w)} = \frac{\text{LOD (mg/ml)} \times \text{ปริมาตรที่เตรียม (ml)} \times \text{ระดับเจือจาง} \times 100}{1,000 \times \text{น้ำหนักตัวอย่าง (g)}}$$

5) การทดสอบขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ)

คำนวณค่า LOQ จาก calibration

curve ของกราฟที่ได้จากผลการทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) โดยค่า

$$\text{LOQ (mg/ml)} = 10 \times \text{standard error/slope}$$

$$\text{LOQ (\%w/w)} = \frac{\text{LOQ (mg/ml)} \times \text{ปริมาตรที่เตรียม (ml)} \times \text{ระดับเจือจาง} \times 100}{1,000 \times \text{น้ำหนักตัวอย่าง (g)}}$$

6) การยืนยันค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ)

เตรียมสารละลาย spiked sample ให้มีความเข้มข้นใกล้เคียงกับค่า LOQ ที่คำนวณได้แล้วตรวจวิเคราะห์ปริมาณ mitragynine ใน spiked sample ด้วยเครื่อง UHPLC จำนวน 6 ซ้ำ คำนวณค่า % RSD ค่า % recovery และ HORRAT (Horwitz

ratio) โดยมีเกณฑ์การยอมรับคือ ค่า % RSD ต้องมีค่าไม่เกิน 3 ค่า % recovery ต้องอยู่ในช่วงร้อยละ 95-105 และ HORRAT ต้องไม่เกิน 2

7) การทดสอบความจำเพาะ (specificity)

วิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน mitragynine ความเข้มข้น 0.010 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และสารสกัดใบกระท่อมด้วยเครื่อง UHPLC เพื่อตรวจสอบ

การแยกสาร mitragynine ออกจากกันและออกจาก การรบกวนของสารอื่น ซึ่งต้องมีค่า retention time แยกจากกันได้ดี

3. การวิเคราะห์ปริมาณสาร mitragynine ใน ใบกระท่อมจำนวน 17 ตัวอย่าง

เตรียมสารสกัดใบกระท่อมจำนวน 17 ตัวอย่าง โดยสกัดใบกระท่อมตัวอย่างละ 0.1 กรัม ด้วยวิธี reflux โดยใช้ ethanol ปริมาตร 40 มิลลิลิตร เป็น

เวลา 45 นาที กรองและนำสารสกัดที่ได้มาระเหยแห้ง ละลายกลับและปรับปริมาตรใน volumetric flask ด้วย methanol จนครบ 100 มิลลิลิตร กรองผ่าน nylon filter syringe นำสารสกัดใบกระท่อมที่ได้ไป วิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น สาร สกัดละ 3 ซ้ำ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย (mean)

การคำนวณค่าความเข้มข้นของสาร mitragynine ที่วิเคราะห์ได้จากสารสกัดใบกระท่อม (ร้อยละโดยนํ้าหนักตัวอย่างใบกระท่อม, % w/w)

$$C_s (\% \text{ w/w}) = \frac{C_0 (\text{mg/ml}) \times \text{ปริมาตรที่เตรียม (ml)} \times \text{ระดับเจือจาง} \times 100}{1,000 \times \text{น้ำหนักตัวอย่าง (g)}}$$

เมื่อ C_0 คือ ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ที่คำนวณได้จากกราฟมาตรฐาน

C_s คือ ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์เพื่อแปลงเป็นร้อยละโดยนํ้าหนัก

ผลการศึกษา

1. ผลการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสาร mitragynine ในใบกระท่อม

1.1 ผลการศึกษาวงจรการคงที่ (stationary phase) และวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase)

1) วัฏภาคคงที่

ผลการศึกษา UHPLC chromatographic fingerprint ของสารสกัดใบกระท่อมที่ ความยาวคลื่น 222 นาโนเมตร ใช้ 0.1% ortho-phosphoric acid ในนํ้า และ 0.1% ortho-phosphoric acid ใน acetonitrile เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่า เมื่อใช้ UHPLC column ชนิด ARC-18 ขนาด 4.6 × 150 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 2.7 ไมโครเมตร UHPLC chromatogram ที่ได้แสดง peak ของ สาร mitragynine ที่ retention time 7.19 นาที และมีการแยกออกจาก peak อื่นอย่างชัดเจน ใน

ขณะที่เมื่อใช้ UHPLC column ชนิด ARC-8 ขนาด 2.1 × 100 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 3.0 ไมโครเมตร UHPLC chromatogram ที่ได้แสดง peak ของสาร mitragynine ที่ retention time 6.58 นาที แต่พบ peak ของสาร mitragynine ซ้อนทับกับ peak ข้าง เคียง (Figure 1)

2) วัฏภาคเคลื่อนที่

ผลการศึกษา chromatographic fingerprint ของสารสกัดใบกระท่อมที่ความยาวคลื่น 222 นาโนเมตร ใช้ UHPLC column ชนิด ARC-18 เป็นวัฏภาคคงที่ พบว่าเมื่อปรับเปลี่ยนองค์ประกอบ ของวัฏภาคเคลื่อนที่จากนํ้าและ acetonitrile โดย เพิ่ม 0.1% ortho-phosphoric acid เข้าไป เป็น 0.1% ortho-phosphoric acid ในนํ้า และ 0.1% ortho-phosphoric acid ใน acetonitrile ค่า retention time ของสาร mitragynine เปลี่ยนจาก 8.02 นาที เป็น 7.19 นาที และมี peak shape ของสาร mitragy-

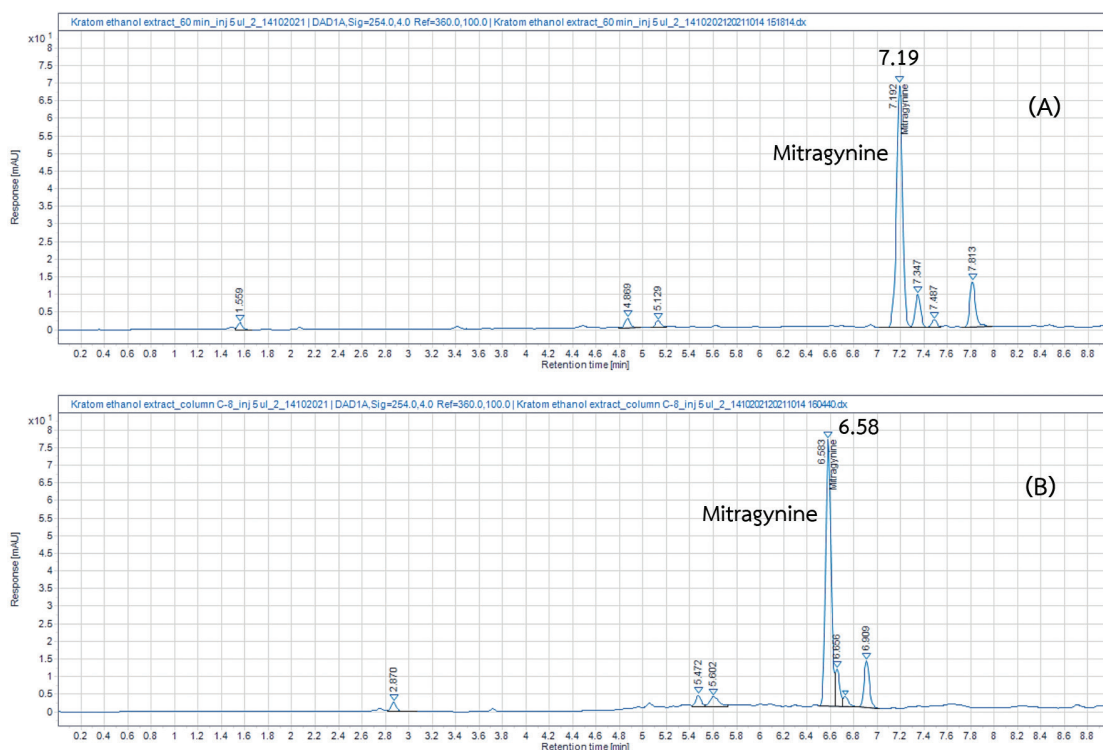


Figure 1 The UHPLC chromatogram of the *Mitragyna speciosa* leaf extract using different stationary phases, where (A) represents the ARC-18 UHPLC column, and (B) represents the ARC-8 UHPLC column

nine ดีขึ้น การแยกดีขึ้นและแยกจาก peak อื่นอย่างชัดเจน (Figure 2)

ดังนั้นในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ mitragynine ในใบกระท่อมด้วยเครื่อง UHPLC ครั้งนี้จึงเลือกใช้ UHPLC column ชนิด ARC-18, ขนาด 4.6×150 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 2.7 ไมโครเมตร เป็นวัฏภาคคงที่ ใช้ 0.1% ortho-phosphoric acid ในน้ำ และ 0.1% ortho-phosphoric acid ใน acetonitrile เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่

1.2 ผลการศึกษาความยาวคลื่นที่ใช้ในการตรวจวัดสาร mitragynine

ผลการศึกษาการดูดกลืนแสง UV ของ

สาร mitragynine ในสารละลายมาตรฐาน mitragynine และสาร mitragynine ในสารสกัดใบกระท่อมด้วยเครื่อง UHPLC โดยใช้ DAD เป็นเครื่องตรวจวัด พบค่า λ_{max} ของสาร mitragynine มีค่าเท่ากับ 222 และ 244 นาโนเมตร (Figure 3) และเมื่อวิเคราะห์สารสกัดใบกระท่อม ด้วยเครื่อง UHPLC ที่ความยาวคลื่น 222 นาโนเมตร ไม่พบการซ้อนทับกันของ peak ของสาร mitragynine กับสารอื่น ดังนั้นในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสาร mitragynine ในใบกระท่อม จึงเลือกการตรวจวัดการดูดกลืนแสง UV ที่ความยาวคลื่น 222 นาโนเมตร

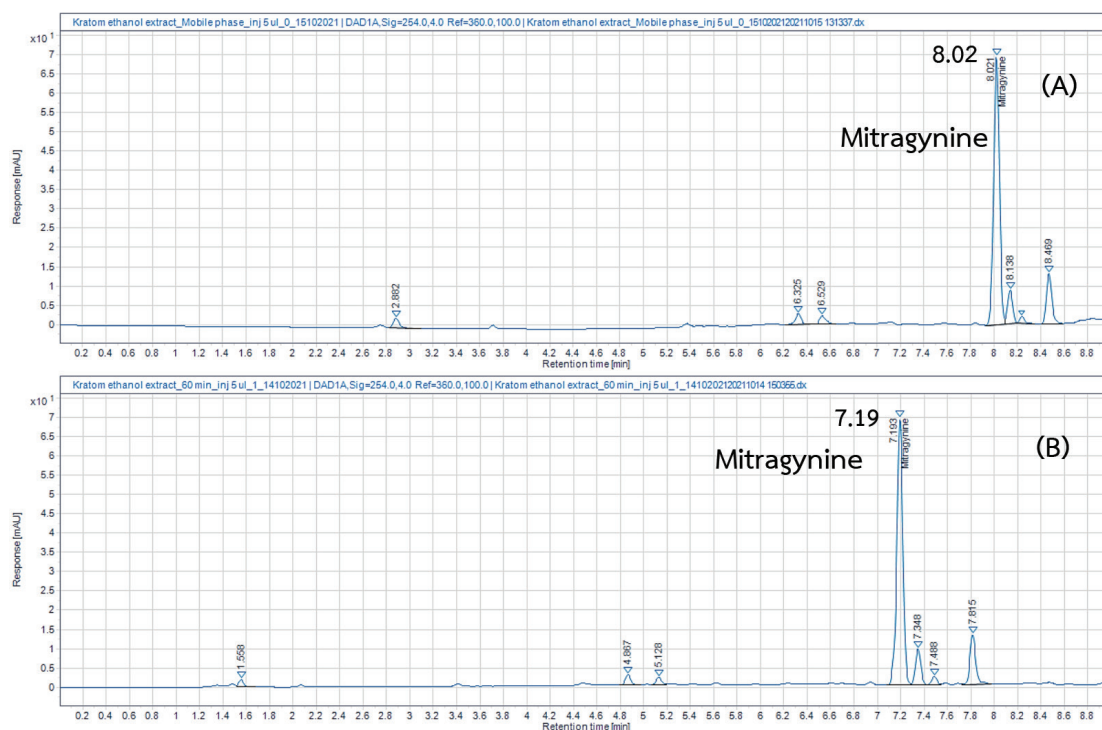


Figure 2 Chromatographic fingerprint of *Mitragyna speciosa* leaf extract was obtained using different mobile phases. (A) represents a mixture of water and acetonitrile, while (B) represents a combination of 0.1% ortho-phosphoric acid in water and 0.1% ortho-phosphoric acid in acetonitrile

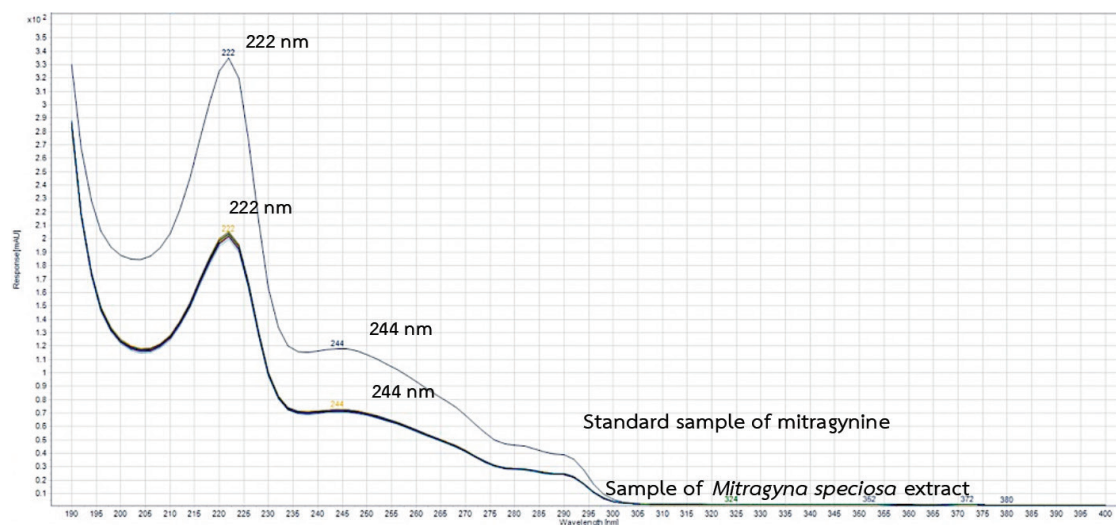


Figure 3 UV spectrum of mitragynine

1.3 ผลการศึกษานิตของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด

ผลการศึกษาผลของตัวทำละลายในการสกัดใบกระเทียม พบว่าตัวทำละลาย methanol สามารถสกัดสาร mitragynine ออกจากใบกระเทียมได้ดีกว่าตัวทำละลาย ethanol โดยสารสกัดใบกระเทียมด้วย methanol มีพื้นที่ใต้พีคเฉลี่ยของสาร mitragynine เท่ากับ 281.24 ในขณะที่สารสกัดใบกระเทียมด้วย ethanol มีพื้นที่ใต้พีคเฉลี่ยของสาร

mitragynine เท่ากับ 226.01 (Table 1) แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดใบกระเทียมด้วย methanol จะมีสีเข้มกว่าสีของสารสกัดใบกระเทียมด้วย ethanol และพบการตกตะกอนเมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25°C. ภายในเวลาไม่เกิน 2 ชั่วโมง ซึ่งเป็นตะกอนที่คงทนไม่สลายเมื่อตั้งทิ้งไว้ข้ามคืน ดังนั้นในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ mitragynine ในใบกระเทียมด้วยเครื่อง UHPLC ครั้งนี้จึงเลือกใช้ ethanol เป็นตัวทำละลายในการสกัด

Table 1 Comparing the peak area values of *Mitragyna speciosa* extracted using methanol and ethanol

Item	Sample	No.	Peak area under the curve of mitragynine
1	methanol extract (30 min)	1	281.36
2	methanol extract (30 min)	2	281.12
3	ethanol extract (30 min)	1	226.11
4	ethanol extract (30 min)	2	225.90

1.4 ผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัด

ผลการศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดใบกระเทียม พบว่าสารสกัดใบกระเทียมที่ได้จากการสกัดที่ระยะเวลา 30 นาที มีพื้นที่ใต้พีคเฉลี่ยของสาร mitragynine น้อยกว่าพื้นที่ใต้พีคเฉลี่ยของสาร mitragynine ที่ได้จากการสกัดใบกระเทียมที่ระยะเวลา

45 และ 60 นาที และพบว่าพื้นที่ใต้พีคเฉลี่ยของสาร mitragynine ที่ได้จากการสกัดที่ระยะเวลา 45 และ 60 นาที มีค่าไม่แตกต่างกัน (Table 2) ดังนั้นในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสาร mitragynine ในใบกระเทียมด้วยเครื่อง UHPLC ครั้งนี้ จึงเลือกใช้ระยะเวลาในการสกัดที่ระยะเวลา 45 นาที

Table 2 The peak area values of *Mitragyna speciosa* were extracted using ethanol at 30 minutes, 45 minutes, and 60 minutes

Item	Sample	No.	Peak area under the curve of mitragynine
1	ethanol extract (30 min)	1	221.65
2	ethanol extract (30 min)	2	225.47
3	ethanol extract (45 min)	1	248.25
4	ethanol extract (45 min)	2	247.17
5	ethanol extract (60 min)	1	246.17
6	ethanol extract (60 min)	2	246.28

1.5 ผลการศึกษาหาสภาวะของระบบโครมาโทกราฟีที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณ mitragynine ในใบกระท่อม

ผลการศึกษาการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานของ mitragynine และสารสกัดใบกระท่อมด้วยเครื่อง UHPLC พบว่าสภาวะของระบบโครมาโทกราฟีที่เหมาะสมที่ใช้ในการแยกสาร mitragynine คือใช้คอลัมน์ชนิด ARC-18 ขนาด 4.6×150 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 2.7 ไมโครเมตร เป็นวัฏภาค

คงที่และใช้ 0.1% ortho-phosphoric acid ใน water และ 0.1% ortho-phosphoric acid ใน acetonitrile แบบ gradient อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตร/นาที เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 222 นาโนเมตร จะปรากฏตำแหน่ง peak ของสาร mitragynine ที่ retention time ในช่วง 7.17-7.20 นาที (Table 3) และสัดส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่แบบ gradient program (Table 4)

Table 3 Presentation of the suitable chromatographic system for separating mitragynine using UHPLC

UHPLC Conditions	
Stationary phase	Raptor ARC-18 column, 4.6×150 mm, 2.7 μ m particle size
Column temperature	40°C
Mobile phase	Gradient: 0.1% ortho-phosphoric acid in water and 0.1% ortho-phosphoric acid in acetonitrile
Flow rate	1.0 mL/min
Detector conditions	Monitor at 222 nm
Injection volume	5 μ L

Table 4 Gradient conditions for mobile phase of UHPLC

Time (min)	Flow (ml/min)	0.1% ortho-phosphoric acid in water (%A)	0.1% ortho-phosphoric acid in acetonitrile (%B)
0.0	1.0	95	5
5.5	1.0	40	60
6.0	1.0	10	90
6.5	1.0	10	90
7.0	1.0	95	5
9.0	1.0	95	5

2. ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

2.1 ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (linearity and range)

ผลจากการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน mitragynine ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ 10 ระดับ ความเข้มข้น ตั้งแต่ 0.30-30.00 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน mitragynine กับพื้นที่ใต้พีคมีลักษณะเป็นเส้นตรงตลอดช่วงความเข้มข้นที่วิเคราะห์ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9999 (Figure 4)

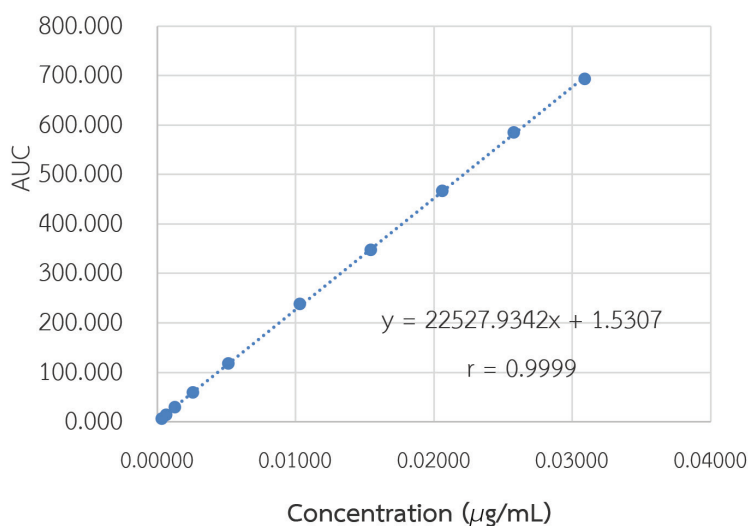


Figure 4 The calibration curve of mitragynine standard intensity against peak area under the curve (AUC)

2.2 ผลการทดสอบความแม่นยำ (accuracy) โดยผลการทดสอบร้อยละของการคืนกลับ (% recovery)

ผลการศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณสาร mitragynine ใน sample blank โดยทำการวิเคราะห์จำนวน 6 ซ้ำ และผลการศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณสาร mitragynine ใน spiked sample ที่เตรียมได้

จากการเติมสารละลายมาตรฐาน mitragynine ที่ 3 ระดับความเข้มข้น ลงใน sample blank ระดับละ 3 ซ้ำ โดยทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ พบว่าค่าร้อยละของการคืนกลับ ในทุกระดับความเข้มข้น อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ในช่วงร้อยละ 99.72-100.88 % RSD และ HORRAT ไม่เกิน 2.0 (Table 5)

Table 5 Accuracy determined for the UHPLC method

Sample	Sample blank (mg/ml)	Spiked level (mg/ml)	Sample spike (mg/ml)	%Recovery	%Recovery mean $\pm$ SD	%RSD	HORRAT
Mitragynine	0.0019	0.0007	0.0027	99.19	99.72 $\pm$ 1.64	1.64	0.51
			0.0027	100.55			
			0.0027	101.23			
			0.0027	96.65			
			0.0027	100.20			
			0.0027	100.48			
		0.0030	0.0050	101.80	100.12 $\pm$ 1.06	1.06	0.36
			0.0050	100.51			
			0.0049	100.24			
			0.0049	100.25			
			0.0049	99.11			
			0.0049	98.84			
		0.0062	0.0083	101.82	100.88 $\pm$ 0.59	0.59	0.21
			0.0082	101.16			
			0.0082	100.99			
			0.0082	100.29			
			0.0082	100.79			
			0.0082	100.23			

The acceptance criteria for %Recovery, according to the AOAC Peer-Verified Methods Program on Policies and Procedures in Arlington, VA, USA (1998), are 95–105%. The acceptance of precision is evaluated using the HORRAT (Horwitz Ratio) (< 2)

2.3 ผลการทดสอบความเที่ยง (precision)

1) repeatability

ผลการศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณสาร mitragynine ในตัวอย่างใบกระท่อม พบว่ามีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) เท่ากับ 0.53 (Table 6)

2) intermediate precision, between-day

ผลการศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณสาร mitragynine ในตัวอย่างใบกระท่อม พบว่ามีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) เท่ากับ 0.78 (Table 6)

Table 6 Precision determined for the UHPLC method

Sample	Repeatability; % RSD	Intermediate precision; % RSD
Mitragynine	0.53	0.78

2.4 ผลการทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD)

พบว่า LOD ของการวิเคราะห์ mitragynine เท่ากับ 0.19 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หรือเท่ากับ ร้อยละ 0.0191 โดยน้ำหนัก

2.5 ผลการทดสอบขีดจำกัดของการวัดเชิง

ปริมาณ (limit of quantitation, LOQ)

พบว่า LOQ ของการวิเคราะห์ mitragynine เท่ากับ 0.64 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หรือเท่ากับ ร้อยละ 0.0637 โดยน้ำหนัก โดยมีค่า % RSD เท่ากับ 1.69 ค่า HORRAT เท่ากับ 0.49 และร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วงร้อยละ 95.18-99.66 (Table 7)

Table 7 The results of the limit of quantitation study (LOQ)

Sample	Sample blank (mg/ml)	Spiked level (mg/ml)	Sample spike (mg/ml)	%Recovery	%Recovery mean $\pm$ SD	%RSD	HORRAT
Mitragynine	0.00195	0.0006	0.0016	97.99	98.23 $\pm$ 1.66	1.69	0.49
				99.66			
				97.92			
				99.14			
				99.47			
				95.18			

2.6 การทดสอบความจำเพาะ (specificity)

ผลจากการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน และสารละลายตัวอย่างพบว่า ภายใต้สภาวะ UHPLC

ที่พัฒนาขึ้น สามารถแยกสาร mitragynine ออกจากสารอื่นได้ และไม่มีการรบกวนของสารอื่นในตัวอย่าง โดยมีค่า retention time เท่ากับ 7.17 นาที (Figure 5)

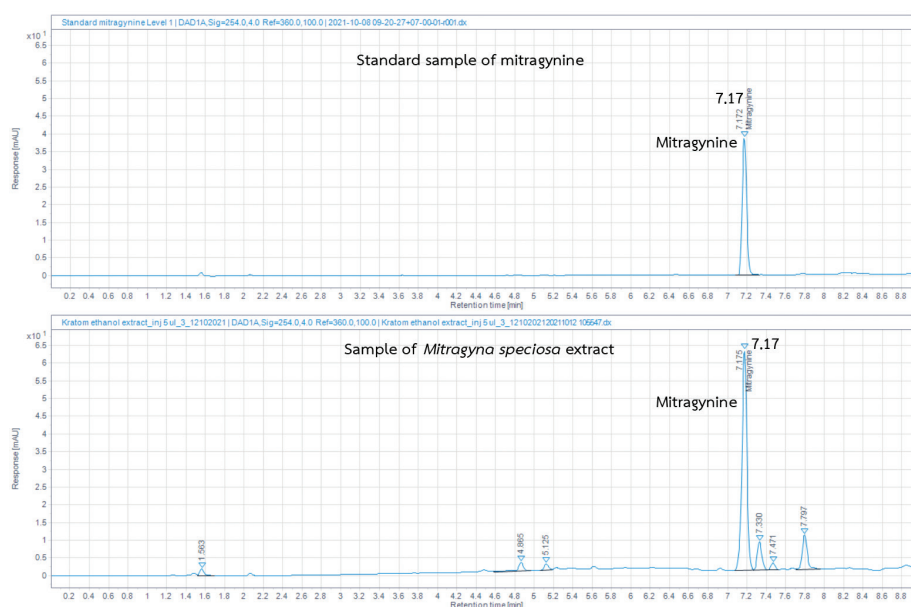


Figure 5 Chromatographic fingerprint of the standard mitragynine solution and the *Mitragyna speciosa* leaf extract

3. การวิเคราะห์ปริมาณ mitragynine ในใบกระเทียม

ผลการวิเคราะห์ปริมาณ mitragynine ใน

ตัวอย่างใบกระเทียม จำนวน 17 ตัวอย่าง พบว่าปริมาณสาร mitragynine ในตัวอย่างใบกระเทียมมีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 0.99-1.89 โดยน้ำหนัก (Table 8)

Table 8 The results of the analysis of mitragynine content in *Mitragyna speciosa* extract using UHPLC method.

Sample No.	Collection site	Mitragynine content (w/w)
1	Trang Province 1	0.99
2	Trang Province 2	1.23
3	Krabi Province	1.55
4	Chumphon Province 1	1.59
5	Chumphon Province 2	1.77
6	Chumphon Province 3	1.89
7	Chumphon Province 4	1.08
8	Phra Nakhon Si Ayutthaya	1.54
9	Pathum Thani Province 1	1.45
10	Pathum Thani Province 2	1.60
11	Pathum Thani Province 3	1.49
12	Nonthaburi Province 1	1.66
13	Nonthaburi Province 2	1.26
14	Nonthaburi Province 3	1.58
15	Nonthaburi Province 4	1.00
16	Nakhon Pathom Province	1.40
17	Bangkok	1.11

อภิปรายผล

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสาร mitragynine ในวัตถุดิบใบกระเทียมด้วยเครื่อง UHPLC โดยสกัดใบกระเทียมแห้งด้วยตัวทำละลาย ethanol โดยวิธี reflux เป็นเวลา 45 นาที ใช้คอลัมน์ชนิด ARC-18 ขนาด 4.6×150 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 2.7 ไมโครเมตร เป็นวัสดุภาคคงที่ และใช้ 0.1% ortho-phosphoric acid ในน้ำ และ 0.1% ortho-phosphoric acid ใน acetonitrile เป็นวัสดุภาค

เคลื่อนที่ อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตร/นาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 222 นาโนเมตร ใช้เวลาในการตรวจสอบ 9 นาที จะปรากฏตำแหน่ง peak ของ mitragynine ที่ retention time ในช่วง 7.17-7.20 นาที

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ได้ทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ พบว่ามีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.30-30.00 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) เท่ากับ 0.9998

ซึ่งมีค่ามากกว่าค่าที่ยอมรับได้ที่กำหนดค่า correlation coefficient (r) ต้องมีค่าไม่น้อยกว่า 0.995

การทดสอบความแม่นยำของวิธีพบค่า % mean recovery อยู่ในช่วงร้อยละ 97.72-100.88 ซึ่งในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ที่กำหนดค่าไว้ในช่วงร้อยละ 95-105 ค่า % RSD อยู่ในช่วง 0.59-1.64 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ที่กำหนดค่าไว้ไม่เกิน 2.0% และค่า HOR-RAT อยู่ในช่วง 0.21-0.51 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ที่กำหนดค่าไว้ไม่เกิน 2.0 แสดงว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความแม่นยำ

การทดสอบความเที่ยงของวิธี พบว่าผลการทดสอบความทำซ้ำได้ โดยการวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวน 10 ซ้ำภายในวันเดียวกัน และการวิเคราะห์ตัวอย่างเมื่อเปลี่ยนวันที่วิเคราะห์เป็นเวลา 3 วัน ๆ ละ 10 ซ้ำ มีค่า % RSD เท่ากับ 0.53 และ 0.78 ตามลำดับจากค่า % RSD ที่ได้พบว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้คือ ไม่มากกว่า 2.0 แสดงว่าวิธีวิเคราะห์นี้สามารถทำซ้ำได้และความเที่ยง ค่า LOD มีค่าเท่ากับ 0.19 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรและค่า LOQ มีค่าเท่ากับ 0.64 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

เมื่อนำวิธีวิเคราะห์ปริมาณสาร mitragynine ในใบกระท่อมด้วยวิธี UHPLC ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่นี้เปรียบเทียบกับวิธีการหาปริมาณสาร mitragynine ในวัตถุดิบและสารสกัดใบกระท่อมที่มีรายงานไว้ก่อนแล้ว พบว่าวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีค่า % recovery ใกล้เคียงกับวิธีการวิเคราะห์ที่มีรายงานไว้ก่อนหน้านี้^[13,15] ค่า LOD และ LOQ ที่ได้จากการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีค่าใกล้เคียงกับ ค่า LOD และ LOQ ที่ได้จากการวิเคราะห์ที่มีรายงานไว้ก่อนหน้านี้^[15-16] สำหรับการเปรียบเทียบระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์พบว่า วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ใช้เวลาในการวิเคราะห์ 9 นาที ซึ่งใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยกว่า

กว่าวิธีการวิเคราะห์ที่มีรายงานไว้ก่อนหน้านี้^[13-15] แต่ใช้เวลามากกว่ารายงานผลการวิเคราะห์ของ Suhanya Parthasarathy และคณะ ในปี 2013 ซึ่งใช้เวลาในการวิเคราะห์เท่ากับ 6 นาที^[16] แต่อย่างไรก็ตามวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีข้อได้เปรียบเหนือวิธีการวิเคราะห์ที่มีรายงานไว้ก่อนหน้านี้ ในแง่ของความเรียบง่ายและเวลาที่รวดเร็วในวิธีเตรียมตัวอย่างและการเตรียมวัสดุภาคเคลื่อนที่ โดยวิธีวิเคราะห์ก่อนหน้านี้ ใช้วิธีสกัดใบกระท่อมด้วยวิธีหมักด้วย methanol เป็นเวลา 5 วัน และใช้ acetonitrile - 0.05% formic acid (ปรับให้ PH เท่ากับ 5) เป็นวัสดุภาคเคลื่อนที่ ในขณะที่วิธีวิเคราะห์นี้เตรียมสารสกัดใบกระท่อมโดยการสกัดด้วยวิธี reflux ใช้ตัวทำละลาย ethanol ที่เวลา 45 นาที และการเตรียมวัสดุภาคเคลื่อนที่ 0.1% ortho-phosphoric acid ในน้ำ และ 0.1% ortho-phosphoric acid ใน acetonitrile ไม่จำเป็นต้องมีการปรับ PH ใด ๆ จึงเป็นการเตรียมวัสดุภาคเคลื่อนที่ที่ง่าย สะดวก และรวดเร็ว รวมถึงลดระยะเวลาสัมผัสสารเคมีที่เป็นอันตรายกับนักวิจัย

เมื่อนำวิธีวิเคราะห์นี้มาตรวจปริมาณสาร mitragynine ในตัวอย่างใบกระท่อมจำนวน 17 ตัวอย่าง พบปริมาณสาร mitragynine ในตัวอย่างใบกระท่อมทั้ง 17 ตัวอย่าง มีปริมาณอยู่ระหว่าง 0.99 ถึง 1.89 ร้อยละโดยน้ำหนัก ซึ่งข้อมูลปริมาณสาร mitragynine ในตัวอย่างใบกระท่อมในแหล่งพื้นที่ต่าง ๆ สามารถใช้เป็นข้อมูลให้ทราบถึงพื้นที่และระบบนิเวศที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของต้นกระท่อมที่สามารถสร้างสาร mitragynine ในปริมาณสูง เพื่อนำมาปรับใช้ในการเพาะปลูกต้นกระท่อมทางอุตสาหกรรมให้ได้ปริมาณสาร mitragynine ในใบกระท่อมปริมาณสูง รวมทั้งเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาพันธุ์กระท่อมและผลิตภัณฑ์ผสมกระท่อมสร้างเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจ

ของพืชกระท่อมต่อไป นอกจากนี้เนื่องจากสาร mitragynine เป็นสารออกฤทธิ์หลักของใบกระท่อม การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร mitragynine ในวัตถุดิบ ใบกระท่อมและสารสกัดใบกระท่อมจึงเป็นประโยชน์ต่อการขออนุญาตขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการวิจัยและพัฒนาและผลิตภัณฑ์ที่มีกระท่อมเป็นส่วนผสมต่อไป

ข้อสรุป

การศึกษานี้ได้พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ mitragynine ในใบกระท่อมด้วยวิธี UHPLC และทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ผลการศึกษาพบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้น มีความถูกต้องแม่นยำ สะดวก รวดเร็ว และประหยัดสารเคมีที่ใช้ใน mobile phase จึงนำวิธีที่ได้มาตรวจปริมาณ mitragynine ในตัวอย่างใบกระท่อม ทำให้ได้ข้อมูลซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาพันธุ์กระท่อม และผลิตภัณฑ์ผสมกระท่อม

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ที่สนับสนุนงบประมาณในการศึกษานี้

References

1. Bunsupa S. Kratom, the plant that everyone wants to know. [Internet]. [cited 2020 Dec 24]; Available from: <https://pharmacy.mahidol.ac.th/th/knowledge/article/354/กระท่อม/> (in Thai)
2. Department of Thai Traditional and Alternative Medicine. Guidelines for the utilization of Kratom. 1st ed. Bangkok: Beyond Publishing Co., Ltd.; 2022. (in Thai)
3. Thongpraditchote S. Pharmacological effects of mitragynine, an active compound in kratom leaves. Herbal

Information Booklet. 2006;24:6-16. (in Thai)

4. Hooper D. The anti-opium leaf. *Pharma J* 1907;78: 453.
5. Field E. XCVIII.-Mitragynine and mitraversine, two new alkaloids from species of *Mitragyne*. *J. Chem. Soc., Trans.* 1921;119:887-91.
6. Lee CM, Trager WF, Beckett AH. Corynantheidine-type alkaloids- ii: absolute configuration of mitragynine, speciociliatine, mitraciliatine and speciogynine. *Tetrahedron*. 1967;23:375-85.
7. Ponglux D, Wongseripipatana S, Takayama H, Kikuchi M, Kurihara M, Kitajima M, Aimi N, Sakai S. A new Indole Alkaloid, 7 α -Hydroxy-7H-mitragynine, from *Mitragyna speciosa* in Thailand. *Planta Med.* 1994;60(6):580-1.
8. Idayu NF, Hidayat MT, Moklas MA, Sharida F, Raudzah AR, Shamima AR, Apriyani E. Antidepressant-like effect of mitragynine isolated from *Mitragyna speciosa* Korth in mice model of depression. *Phytomedicine*. 2011;18(5):402-7.
9. Keawpradub N. Kratom leaves, medicinal properties, benefits and harms. [Internet] [cited 2020 Dec 24]; Available from: <https://www.oncb.go.th/ncsmi/cottage8/ใบกระท่อม%20สรรพคุณทางยา%20ประโยชน์และโทษ.pdf> (in Thai)
10. Phimphasri R. Thairath Plus: Money. Kratom, a new economic plant of Thailand how well will it go maybe depends on Indonesia. [Internet] [cited 2020 Dec 24]; Available from: <https://plus.thairath.co.th/topic/money/100383> (in Thai)
11. Kratom Plant Act B.E. 2565 (2022). Published in Royal Gazette, Vol. 139, Part 52 Kor. (2022 Aug 26) (in Thai)
12. Herbal Products Act B.E. 2562 (2019). Published in Royal Gazette, Vol 136, Part 56 Kor. (2019 Apr 30) (in Thai)
13. Kikura-Hanajiri R, Kawamura M, Maruyama T, Kitajima M, Takayama H, Goda Y. Simultaneous analysis of mitragynine, 7- hydroxymitragynine, and other alkaloids in the psychotropic plant "kratom" (*Mitragyna speciosa*) by LC-ESI-MS. *Forensic Toxicology*. 2009;27(2): 67-74.
14. Wang M, Carrell EJ, Ali Z, Avula B, Avonto C, Parcher JF, Khan IA. Comparison of three chromatographic techniques for the detection of mitragynine and other indole and oxindole alkaloids in *Mitragyna speciosa* (kratom) plants. *J Sep Sci*. 2014;37(12):1411-8.
15. Mudge EM, Brown PN. Determination of mitragynine

- in *Mitragyna speciosa* raw materials and finished products by liquid chromatography with UV detection: Single-laboratory validation. J AOAC Int. 2017;100(1): 18-24
16. Parthasarathy S, Ramanathan S, Murugaiyah V, Hamdan MR, Said MIM, Lai ChS, Mansor SM. A simple HPLC-DAD method for the detection of psychotropic mitragynine in *Mitragyna speciosa* (ketum) and its products for the application in forensic investigation. Forensic Sci. Int. 2013;266(1-3):183-7.
17. Department of Medical Science. Practical guidelines for testing the accuracy of chemical analysis methods in the single laboratory setting. Nothaburi: Department of Medical Science, 2006.