

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารโอเรียนทินและไวเทกซินในใบชะมวงด้วยวิธี Ultra High Performance Liquid Chromatography

พีรธรรม เทียมเทียบรัตน์*, ธนวัฒน์ ทองจีน, สายัณห์ เรืองเขตร, ศักดิ์วิชัย อ่อนทอง, ศิริวรรณ ชัยสมบุรณ์พันธ์, อัครชัย ช่วยพรหม

สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ ตำบลตลาดขวัญ อำเภอเมือง นนทบุรี 11000

* ผู้รับผิดชอบบทความ: peradhama.1969@gmail.com

บทคัดย่อ

บทนำและวัตถุประสงค์: ชะมวงมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Garcinia cowa* Roxb. วงศ์ Clusiaceae ใบอ่อนของชะมวงมีรสเปรี้ยว ช่วยระบายท้อง แก้ไข้ กัดฟอกเสมหะ และใช้เป็นอาหาร ปัจจุบันชะมวงถูกนำมาใช้เป็นองค์ประกอบทางยาและผลิตภัณฑ์สุขภาพที่หลากหลาย อย่างไรก็ตามยังไม่มีวิธีการควบคุมคุณภาพของสารที่พบในใบชะมวง ผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารโอเรียนทินและไวเทกซินในใบชะมวงด้วยวิธี Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC)

วิธีการศึกษา: แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน ได้แก่ การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารโอเรียนทินและไวเทกซินในใบชะมวงด้วยวิธี UHPLC การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์และการวิเคราะห์ปริมาณสารโอเรียนทินและไวเทกซินในใบชะมวงจำนวน 9 ตัวอย่าง

ผลการศึกษา: ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ดังกล่าว พบว่ากราฟมาตรฐานของโอเรียนทินและไวเทกซินมีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 1.32-127.01 และ 1.40-134.06 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.9999 ค่าร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วง 96.26-103.15% ซึ่ค่ากักตักของการตรวจพบของโอเรียนทินและไวเทกซิน มีค่าเท่ากับร้อยละ 0.002 และ 0.003 โดยน้ำหนักแห้งของใบชะมวง (ไมโครกรัม/ไมโครกรัม) ตามลำดับ ในขณะที่ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณมีค่าเท่ากับร้อยละ 0.006 และ 0.009 โดยน้ำหนักแห้งของใบชะมวง (ไมโครกรัม/ไมโครกรัม) ตามลำดับ ปริมาณโอเรียนทินและไวเทกซินในใบชะมวงมีค่าเฉลี่ยร้อยละ 0.10 และ 0.06 โดยน้ำหนักแห้งของใบชะมวง (ไมโครกรัม/ไมโครกรัม) ตามลำดับ

อภิปรายผล: การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารโอเรียนทินและไวเทกซินในวัตถุดิบใบชะมวงด้วยเครื่อง UHPLC ที่พัฒนาขึ้น การสกัดใบชะมวงแห้งด้วยตัวทำละลาย 50% เมทานอล โดยวิธีฟลักซ์ ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์พบว่าทุกค่าอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ วิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อย วิธีการเตรียมวัตถุดิบเคลื่อนที่ง่าย สะดวก และรวดเร็ว

ข้อสรุป: วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความเหมาะสม สามารถนำไปใช้เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารโอเรียนทินและไวเทกซินในใบชะมวงและสามารถนำไปสู่การกำหนดเกณฑ์ปริมาณสารสำคัญในใบชะมวงต่อไป

คำสำคัญ: ใบชะมวง, โอเรียนทิน, ไวเทกซิน, UHPLC

Development and Method Validation of Orientin and Vitexin Contents in *Garcinia cowa* Roxb. Leaves Using Ultra-High Performance Liquid Chromatography

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

Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Tiwanon Road, Talat Khwan Sub-District, Muang District, Nonthaburi 11000, Thailand

*Corresponding author: peradhama.1969@gmail.com

Abstract

Introduction and Objective: *Garcinia cowa* Roxb. (*Cha Muang* in Thai) belongs to the family Clusiaceae. Its young leaves taste sour and are used as laxative, antipyretic and mucolytic agents as well as food. *Cha Muang* has been used as an active ingredient of several herbal drugs and health products. However, the appropriate analytical methods for quality control of those compounds are still limited. This study aimed to develop analytical methods for quantification of orientin and vitexin in *G. cowa* leaf samples using the ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) technique.

Methods: The study was divided into three steps: developing the UHPLC method for analyzing orientin and vitexin in *G. cowa* leaves, testing the validity of the analysis method, and analyzing the quantity of orientin and vitexin in nine *G. cowa* leaf samples.

Results: This method was validated by establishing the linearity for orientin and vitexin at concentration ranges of 1.32–127.01 and 1.40–134.06 $\mu\text{g/mL}$, respectively, with a determination correlation coefficient (r) of 0.9999. The %recovery was in the range of 96.26 to 103.15%. Based on the dried weight of *G. cowa* leaves ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$), the limits of detection of orientin and vitexin were 0.002 and 0.003% w/w, respectively, the limits of quantification were 0.006 and 0.009% w/w, respectively, and the average contents of orientin and vitexin were 0.10 and 0.06% w/w, respectively.

Discussion: The UHPLC method developed for analyzing orientin and vitexin in raw *G. cowa* leaves involves the extraction of dried *G. cowa* leaves with 50% methanol as the solvent using the reflux method. The validity test results of the analysis method were all within acceptable limits. The analysis method requires less time and involves a simple, convenient, and rapid preparation of the mobile phase.

Conclusion and Recommendation: In *G. cowa* leaves, the newly developed method is suitable and can be used to analyze the contents of orientin and vitexin; and the appropriate specification of orientin and vitexin contents can be established.

Keywords: *Garcinia cowa* Roxb. leaves, orientin, vitexin, UHPLC

บทนำและวัตถุประสงค์

ชะมวง มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Garcinia cowa* Roxb. จัดอยู่ในวงศ์ Clusiaceae^[1] มีชื่ออื่น ๆ เช่น กะมวง มวงส้ม หมาโก้มก มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง สูงประมาณ 10 เมตร ใบเป็นใบเดี่ยว ขอบใบเรียบ ใบหนายาว สีเขียวอ่อนถึงสีเขียวอมม่วงแดง ก้านใบยาว 1-2 เซนติเมตร ตัวใบยาว 18-20 เซนติเมตร ใบออกเป็นคู่ตรงข้ามกัน มีกลิ่นหอม (Figure 1) ดอกขนาดเล็ก ประมาณ 10-15 มิลลิเมตร มี 3 กลีบ กลีบดอกแข็งสีนวล มีกลิ่นหอม ออกดอกตามกิ่ง ผลทรงกลม เว้าเป็นพู ผลมีเนื้อสีเหลือง รสฝาด ผลสุกสีเหลืองส้ม มีเมล็ดอยู่ภายใน 4-6 เมล็ด เจริญเติบโตได้ดีตามป่าชื้นทางภาคใต้และภาคตะวันออก อาจพบได้บ้างในเขตภาคกลาง ใบอ่อนของชะมวงมีรสเปรี้ยว มีสรรพคุณยาพื้นบ้านช่วยระบายท้อง แก้ไข้ กัดฟอกเสมหะ แก้อาตุพิการ^[2] มีรายงานวิจัยการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของใบชะมวงพบว่าสารสกัดจากใบชะมวงมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และฤทธิ์ลดไขมัน พบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ซีไกลโคไซด์ (flavonoid C-glycoside) 2 ชนิด คือ ไอเรียนทินและไวเทกซินและสารกลุ่มสเตียรอยด์ (steroids) ได้แก่ เบต้า-ซิโตสเตอรอล (beta-sitosterol) เป็นองค์ประกอบ^[3,4]

ปัจจุบันประชาชนมีการบริโภคใบชะมวงอย่างแพร่หลาย และจากข้อมูลการศึกษาทางวิทยาศาสตร์แสดงถึงฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจหลายชนิด แสดงถึงศักยภาพของพืชสมุนไพรชนิดนี้ที่สามารถนำไปพัฒนาต่อ ยอดเป็นผลิตภัณฑ์ยา หรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อช่วยป้องกัน หรือรักษาโรคได้ และในการนำใบชะมวงมาเป็นองค์ประกอบในการปรุงตำรับยา ยังไม่มีข้อมูลของปริมาณสารสำคัญ ใน

ปี 2545 มีรายงานการศึกษา HPLC Fingerprint ของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ได้แก่ ไอโซไอเรียนทิน (isoorientin), ไอเรียนทิน, ไวเทกซิน และไอโซไวเทกซิน (isovitexin) ด้วยวิธี HPLC-PDA^[5] พบว่าใช้เวลาในการวิเคราะห์ นาน 60 นาที ในปี 2555 มีรายงานการศึกษาการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสาร ไอโซไอเรียนทิน, ไอเรียนทิน, ไวเทกซิน และไอโซไวเทกซิน ด้วยวิธี HPLC-UV/DAD^[6] พบว่าใช้เวลาในการวิเคราะห์ นาน 30 นาที และต่อมาในปี 2561 มีรายงานการหาปริมาณสารไวเทกซินในสารสกัดและผลิตภัณฑ์ของพืชชาขี้เหล็กด้วยวิธี UHPLC-DAD^[7] ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน 16 นาที จากรายงานการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้นนี้ ล้วนแต่ทำให้สิ้นเปลืองวัสดุภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase) การวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารไอเรียนทินและไวเทกซินในใบชะมวงและทดสอบความถูกต้องของวิธีเพื่อให้ได้วิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการที่มีความถูกต้องแม่นยำ สะดวก รวดเร็ว และประหยัดสารเคมี เพื่อใช้ในการประเมินคุณภาพของใบชะมวง รวมทั้งการหาปริมาณสารสำคัญที่อยู่ในใบชะมวง ให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ ได้อย่างเหมาะสม นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการวิจัยและพัฒนาตำรับยาและผลิตภัณฑ์จากใบชะมวงต่อไป

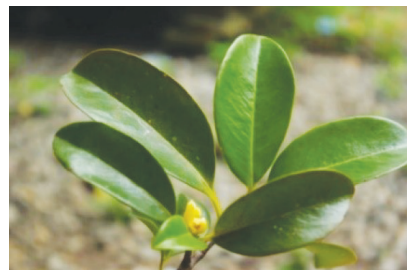


Figure 1 *Garcinia cowa* Roxb. leaves

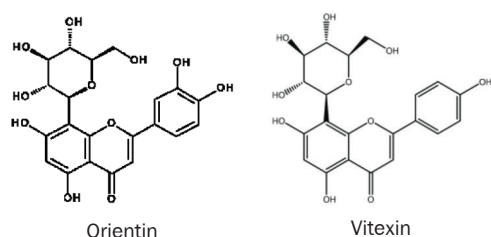


Figure 2 Chemical structure of Orientin and Vitexin

ระเบียบวิธีศึกษา

1. วัสดุ

1.1 ตัวอย่างสมุนไพร

ใบชะมวงสดระยะใบเพสลาด จำนวน 9 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 2 กิโลกรัม ที่เก็บจาก กรุงเทพมหานคร ตราด ระยอง จันทบุรี นนทบุรี นครนายก ขอนแก่น และชุมพร ในช่วงระหว่างเดือน

มีนาคม 2566 ถึงเดือนสิงหาคม 2566 (Table 1) ผ่านการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเภสัชเวทเปรียบเทียบกับตัวอย่างจริง (authentic) จำนวน 1 ตัวอย่าง ที่ได้จากอำเภอชะมวง จังหวัดจันทบุรี ว่าเป็นใบชะมวง *Garcinia cowa* Roxb. วงศ์ Clusiaceae (Figure 1) โดยนักพฤกษศาสตร์ ห้องปฏิบัติการพืชพันธุ์พืช สถาบันวิจัยสมุนไพร หมายเลขอ้างอิง DMSC 5215 จากนั้นนำมาคัดเลือกเฉพาะใบ ล้างด้วยน้ำให้สะอาด ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง และอบให้แห้งด้วยเตาอบร้อนไฟฟ้าที่มีพัดลมระบายอากาศที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง และนำตัวอย่างที่แห้งแล้วไปบดเป็นผงละเอียด ผ่านร่อนที่มีขนาดช่อง 180 ไมโครเมตร เก็บผงสมุนไพรใบชะมวงในขวดแก้วสีชา มีฝาปิดสนิท ระบุชื่อสมุนไพร แหล่งที่เก็บ วันที่เก็บ และวันที่เตรียมตัวอย่าง เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

Table 1 Twelve samples of fresh *Garcinia cowa* Roxb. leaves raw materials were obtained from natural sources in various provinces of Thailand

Sample	Natural sources
1	Makham District, Chanthaburi Province
2	Mueang District, Nonthaburi Province (Tree 1)
3	Mueang District, Nonthaburi Province (Tree 2)
4	Pathio District, Chumphon Province
5	Mueang District, Trat Province
6	Ban Na District, Nakhon Nayok Province
7	Mueang District, Rayong Province
8	Bang Khen District, Bangkok Province
9	Mueang District, Khon Kaen Province

1.2 สารมาตรฐาน

สารมาตรฐาน: โอเรียนทิน ความบริสุทธิ์ $\geq 98\%$ (CBP Ltd., Lot.no. PRF8062201), วิเทกซิน ความบริสุทธิ์ $\geq 98\%$ (Chromadex, Lot.no. 00022850-615)

1.3 สารเคมีและตัวทำละลาย

methanol HPLC grade (RCI Labscan Limited, Thailand), acetonitrile HPLC grade (RCI Labscan Limited, Thailand), ethanol AR (RCI Labscan Limited, Thailand), methanol

AR (Merck, Germany), ortho-phosphoric acid AR (RCI Labscan Limited, Thailand) และน้ำปราศจาก อีออน (deionized water)

1.4 วัสดุวิทยาศาสตร์และเครื่องแก้ว

กระดาษกรองเบอร์ 4 (Whatman, UK), PVDF membrane filter ขนาด 0.2 ไมโครเมตร, Nylon filter syringe ขนาด 0.2 ไมโครเมตร, เครื่องแก้ว และ micro pipette

1.5 เครื่องมือ

เครื่อง Ultra High Performance Liquid Chromatography รุ่น 1290 Infinity II (Agilent), คอลัมน์ชนิด ARC-18, ขนาด 4.6×150 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 2.7 ไมโครเมตร และ ARC-8, ขนาด 2.1×100 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 3.0 ไมโครเมตร (Restek), ตู้อบร้อนไฟฟ้ารุ่น UL-50 (Memmert), เครื่องบดปั่น รุ่น RT 34 (ChyunTseh Industrial), เครื่องแรง รุ่น AS 200 Basic (Retsch), แรงที่มีขนาดช่อง 180 ไมโครเมตร (Endocott), เครื่องระเหยสุญญากาศ ประกอบด้วย rotavapor รุ่น N-1000 (Eyela) และอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิรุ่น SB-1000 (Eyela), เครื่องทำสุญญากาศรุ่น A-3S (Eyela) และเครื่องทำน้ำเย็นหมุนเวียน รุ่น CA-101 (Eyela) และเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น XT 220A (Precisa)

วิธีการศึกษา

1. การศึกษาหาสภาวะของระบบโครมาโทกราฟี

1.1 การเตรียมสารมาตรฐาน

เตรียมสารละลายสารมาตรฐานโอเรียนทินและไวเทกซิน ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในสารละลาย 50% เมทานอล นำสารละลายสารมาตรฐานที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC

1.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

สกัดตัวอย่างใบชะมวงแห้ง น้ำหนัก 1 กรัม ด้วย 50% เมทานอล ปริมาตร 40 มิลลิลิตร โดยวิธีรีฟลักซ์ (reflux) เป็นเวลา 30 นาที กรองและนำสารสกัดที่ได้มาระเหยแห้ง ละลายและปรับปริมาตรด้วย 50% เมทานอล จนครบ 50 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดแก้ววัดปริมาตร (volumetric flask) กรองผ่าน Nylon filter syringe นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC

1.3 การเลือกชนิดของตัวทำละลายในการสกัด

สกัดตัวอย่างใบชะมวงแห้ง น้ำหนัก 1 กรัม โดยใช้ เมทานอล 40 มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับ 50% เมทานอล 40 มิลลิลิตร ด้วยวิธีรีฟลักซ์ เป็นเวลา 30 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 นำสารสกัดเมทานอลและสารสกัด 50% เมทานอล ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จากนั้นละลายและปรับปริมาตรด้วยเมทานอลและ 50% เมทานอล ตามลำดับ จนครบ 50 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดแก้ววัดปริมาตร กรองผ่าน Nylon filter syringe แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการสกัดสารโอเรียนทินและไวเทกซินจากใบชะมวง

1.4 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัด

สกัดตัวอย่างใบชะมวงแห้ง น้ำหนัก 1 กรัม ด้วย 50% เมทานอล โดยวิธีรีฟลักซ์ เป็นเวลา 20, 30 และ 45 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 นำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จากนั้นละลายและปรับปริมาตรด้วย 50% เมทานอล จนครบ 50 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดแก้ววัดปริมาตร กรองผ่าน Nylon filter syringe นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC เพื่อเปรียบเทียบผลของเวลาที่ใช้ในการสกัดสารโอเรียนทินและไวเทกซิน

1.5 การเลือกใช้ความยาวคลื่นในการตรวจ

วิเคราะห์สารโอเรียนทินและไวเทกซิน

สกัดตัวอย่างใบชะมวงแห้ง น้ำหนัก 1 กรัม ด้วย 50% เมทานอล โดยวิธีรีฟลักซ์ เป็นเวลา 30 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 นำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จากนั้นละลายและปรับปริมาตรด้วย 50% เมทานอล จนครบ 50 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดแก้ววัดปริมาตร กรองผ่าน Nylon filter syringe นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC วัดการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ต (ultraviolet, UV) ของโอเรียนทินและไวเทกซินเพื่อดูความยาวคลื่นที่สารชนิดนี้สามารถดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) และวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างใบชะมวงโดยใช้ DAD เพื่อเลือกความยาวคลื่นสำหรับการตรวจวัดสารโอเรียนทินและไวเทกซินโดยที่ไม่พบการซ้อนทับของพีคอื่น (peak, co-elute)

1.6 วัฏภาคคงที่ (Stationary phase) และวัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase)

วัฏภาคคงที่ เปรียบเทียบผลของคอลัมน์ชนิดต่าง ๆ ที่แตกต่างกันในเรื่องชนิดอนุภาคภายในคอลัมน์ (ARC-18 และ ARC-8) ความยาวคอลัมน์ (150 และ 100 มิลลิเมตร) โดยพิจารณาเลือกคอลัมน์จากลักษณะของ peak shape, peak symmetry และ retention time

วัฏภาคเคลื่อนที่ ศึกษาชนิดและสัดส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ โดยพิจารณาจาก peak shape และ retention time ของโอเรียนทินและไวเทกซิน ความสามารถในการแยกสิ่งเจือปน (impurity) จากพีคของโอเรียนทินและไวเทกซินในสารละลายตัวอย่างใบชะมวงและความดันของระบบโครมาโทกราฟี

2. การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ทางเคมี

ทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณโอเรียนทินและไวเทกซินในสารละลายตัวอย่างใบชะมวงที่พัฒนาขึ้นตามแนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข^[8]

2.1 การทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) และช่วงการวิเคราะห์ (range)

เตรียมสารละลายสารมาตรฐานจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ โอเรียนทินและไวเทกซิน โดยชั่งสารมาตรฐานโอเรียนทินและไวเทกซิน น้ำหนัก 10 มิลลิกรัม ตามลำดับ ละลายและปรับปริมาตรด้วย 50% เมทานอล จนครบ 50 มิลลิลิตร ด้วยขวดแก้ววัดปริมาตร จะได้ stock solution ของสารละลายสารมาตรฐานโอเรียนทินและไวเทกซิน เข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางให้ได้ 7 ระดับความเข้มข้น ตามลำดับ ใส่ลงในขวดแก้ววัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย 50% เมทานอล จะได้ 7 ระดับความเข้มข้นของสารละลายสารมาตรฐานโอเรียนทิน ดังนี้ คือ 1.32, 5.29, 10.58, 21.17, 42.34, 84.67 และ 127.01 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 7 ระดับความเข้มข้นของสารละลายสารมาตรฐานไวเทกซิน ดังนี้ คือ 1.40, 5.59, 11.17, 22.34, 44.69, 89.38 และ 134.06 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ฉีดสารละลายสารมาตรฐานโอเรียนทินและไวเทกซิน ที่ 7 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ด้วยเครื่อง UHPLC นำค่าพื้นที่ใต้พีค (peak area) และความเข้มข้นของสารละลายสารมาตรฐานโอเรียนทินและไวเทกซินไปสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r)

2.2 การทดสอบหาร้อยละของการคืนกลับ (%)

recovery) และความเที่ยง (precision)

เตรียม sample blank (sample blank คือ ตัวอย่างใบชะมวงที่นำมาสกัดและตรวจวิเคราะห์หาปริมาณโอเรียนทินและไวเทกซิน แล้วมีปริมาณสารโอเรียนทินและไวเทกซินในปริมาณต่ำ ๆ) โดย ชั่ง ตัวอย่างใบชะมวง 1 กรัม สกัดด้วย 50% เมทานอล โดยวิธีรีฟลักซ์ เป็นเวลา 30 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 นำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จากนั้นละลายและปรับปริมาตรด้วย 50% เมทานอล จนครบ 50 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดแก้ววัดปริมาตร กรองผ่าน Nylon filter syringe นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC จำนวน 6 ซ้ำ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย (mean)

เตรียม spiked sample ลงใน sample blank โดยเติมสารละลายสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 3 ระดับ ระดับละ 3 ซ้ำ จิตซ้ำละ 2 ครั้ง โดยเตรียม spiked sample ให้มีความเข้มข้น 50, 100, 150%

เติมสารละลายสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 3 ระดับ ลงใน sample blank แล้ววิเคราะห์ sample blank (unspiked) จำนวน 6 ซ้ำ และวิเคราะห์ spiked sample ระดับละ 3 ซ้ำ จากนั้นคำนวณค่าร้อยละของ

การคืนกลับ

$$\% \text{ recovery} = \frac{(C1 - C2) \times 100}{C3}$$

เมื่อ C1 คือ ความเข้มข้นของสารใน spiked sample

C2 คือ ความเข้มข้นของสารใน sample blank

C3 คือ ความเข้มข้นของสารที่เติม

การทดสอบความเที่ยง (precision)

Repeatability วิเคราะห์ปริมาณสารโอเรียนทินและไวเทกซินในตัวอย่างสารละลายใบชะมวง ซ้ำ 10 ครั้ง ในวันเดียวกัน คำนวณค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD)

Intermediate precision วิเคราะห์ปริมาณสารโอเรียนทินและไวเทกซินในตัวอย่างสารละลายใบชะมวง เป็นเวลา 3 วัน ๆ ละ 10 ซ้ำ คำนวณค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

2.2.1 การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ

(Limit of Detection, LOD)

คำนวณค่าประมาณ (estimated) ของ LOD จากกราฟมาตรฐาน

$$\text{LOD } (\mu\text{g/mL}), \text{ ค่าประมาณ} = 3 \times \text{standard error/slope}$$

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

เตรียมสารละลายตัวอย่างใบชะมวง โดยชั่ง ตัวอย่างใบชะมวง 1 กรัม สกัดด้วย 50% เมทานอล โดยวิธีรีฟลักซ์ เป็นเวลา 30 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 นำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จากนั้นละลายและปรับ

ปริมาตรด้วย 50% เมทานอล จนครบ 50 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดแก้ววัดปริมาตร กรองผ่าน Nylon filter syringe

เตรียมสารละลาย spiked sample ให้มีความเข้มข้นใกล้เคียงกับค่าประมาณของ LOD แล้วตรวจ

วิเคราะห์ปริมาณโอเรียนทินและไวเทกซินใน spiked sample 6 ซ้ำ

2.2.2 การทดสอบขีดจำกัดของการวัดเชิง

LOQ ($\mu\text{g/mL}$), ค่าประมาณ = $10 \times \text{standard error/slope}$

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

เตรียมสารละลาย spiked sample ให้มีความเข้มข้นใกล้เคียงกับค่าประมาณของ LOQ แล้วตรวจวิเคราะห์ปริมาณโอเรียนทินและไวเทกซินใน spiked sample 6 ซ้ำ ค่าวนค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์และค่าร้อยละของการคืนกลับ

2.2.3 การทดสอบความจำเพาะ (Specificity)

ฉีดสารละลาย mixed working standard solution ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และสารละลายตัวอย่างใบชะมวง ด้วยเครื่อง UHPLC เพื่อตรวจสอบการแยกสารโอเรียนทินและไวเทกซินออกจากกันและออกจากการรบกวนของสารอื่น ซึ่งต้องมีค่า retention time แยกจากกันได้ดี

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณโอเรียนทินและไวเทกซินในสารละลายตัวอย่างใบชะมวง

2.3.1 การเตรียมสารละลายตัวอย่างใบชะมวง

ปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ)

คำนวณค่าประมาณของ LOQ จากกราฟมาตรฐาน ดังนี้

ชั่งตัวอย่างใบชะมวง 1 กรัม สกัดด้วย 50% เมทานอลโดยวิธีรีฟลักซ์ เป็นเวลา 30 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 นำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จากนั้นละลายและปรับปริมาตรด้วย 50% เมทานอล จนครบ 50 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดแก้ววัดปริมาตร กรองผ่าน Nylon filter syringe นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC

วิเคราะห์ปริมาณโอเรียนทินและไวเทกซินในตัวอย่างใบชะมวง จำนวน 9 ตัวอย่าง ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น โดยที่แต่ละตัวอย่างให้วิเคราะห์ 3 ซ้ำ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

การคำนวณความเข้มข้นของสารโอเรียนทินและไวเทกซินในตัวอย่างสารละลายใบชะมวง (ร้อยละโดยน้ำหนักของตัวอย่างใบชะมวงแห้ง, % w/w)

CS (% w/w) = $\frac{C_0 (\mu\text{g/mL}) \times \text{ปริมาตรที่เตรียม (mL)} \times \text{ระดับเจือจาง} \times 100}{1,000,000 \times \text{น้ำหนักตัวอย่าง (g)}}$

เมื่อ C_0 คือ ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ที่คำนวณได้จากกราฟมาตรฐาน

CS คือ ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์เพื่อแปลงเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก

ผลการศึกษา

1. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณโอเรียนทินและไวเทกซินในใบชะมวง

1.1 การศึกษาหาสภาวะของระบบโครมาโทกราฟี

หลังจากนำสารละลายสารมาตรฐานของโอเรียนทินและไวเทกซินและสารละลายตัวอย่างใบชะมวงไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC พบว่าได้สภาวะของ

ระบบโครมาโทกราฟีที่เหมาะสมในการแยกสารโอเรียนทินและไวเทกซิน (Table 2) โดยสัดส่วนของภูมิภาคเคลื่อนที่แบบ gradient program จะเริ่มที่เวลา นาทีที่ 0.0 ถึง นาทีที่ 5.0 ใช้ % A : % B (90 : 10), นาทีที่ 5.0 ถึง นาทีที่ 6.0 ใช้ % A : % B (60 : 40), นาทีที่ 6.0 ถึง นาทีที่ 7.0 ใช้ % A : % B (15 : 85) และ นาทีที่ 7.0 ถึง นาทีที่ 7.5 ใช้ % A : % B (90 : 10) (Table 3, Figure 3)

Table 2 Optimal chromatography conditions for separation of orientin and vitexin by UHPLC system

	Optimal conditions
Stationary phase	UHPLC column ARC-18; 4.6 × 150 mm, 2.7 μm
Column Temperature	35 °C
Mobile phase	Gradient : 0.1 % ortho-phosphoric acid in deionized water and 0.1 % ortho-phosphoric acid in acetonitrile
Flow rate	1.0 mL/min
Detection	DAD 340 nm
Injection volume	10 μL

Table 3 Gradient program

Time (min)	Flow (mL/min)	0.1 % ortho-phosphoric acid in water (%A)	0.1 % ortho-phosphoric acid in acetonitrile (%B)
initial	1.0	90	10
5.0	1.0	60	40
6.0	1.0	60	40
7.0	1.0	15	85
7.5	1.0	90	10

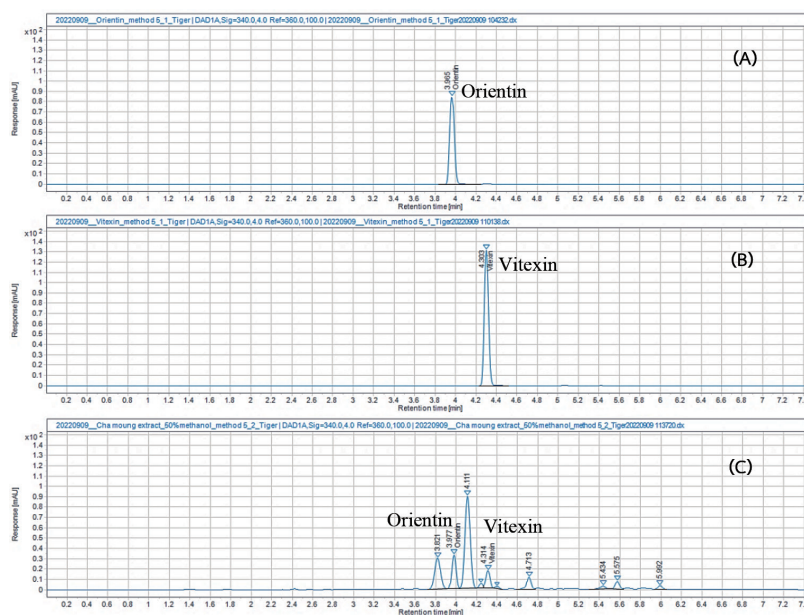


Figure 3 Chromatogram of standard solution of orientin (A), vitexin (B) and sample solution of *Garcinia cowa* Roxb. leaves (C)

1.2 การเลือกชนิดของตัวทำละลายในการสกัด

การศึกษาชนิดของตัวทำละลายในการสกัดพบว่าเมื่อนำสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการสกัดใบชะมวงด้วยเมทานอลและ 50% เมทานอล วิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ พบว่าพื้นที่ใต้พีคเฉลี่ยของสารโอเรียนตินและไวเทกซินจากการ

สกัดใบชะมวงด้วยเมทานอลที่ retention time 3.97 และ 4.30 นาที ตามลำดับ มีค่า 102.978 และ 61.597 ซึ่งน้อยกว่าใบชะมวงที่สกัดด้วย 50% เมทานอล คือ มีพื้นที่ใต้พีคเฉลี่ย เท่ากับ 188.693 และ 103.998 ตามลำดับ (Figure 4)

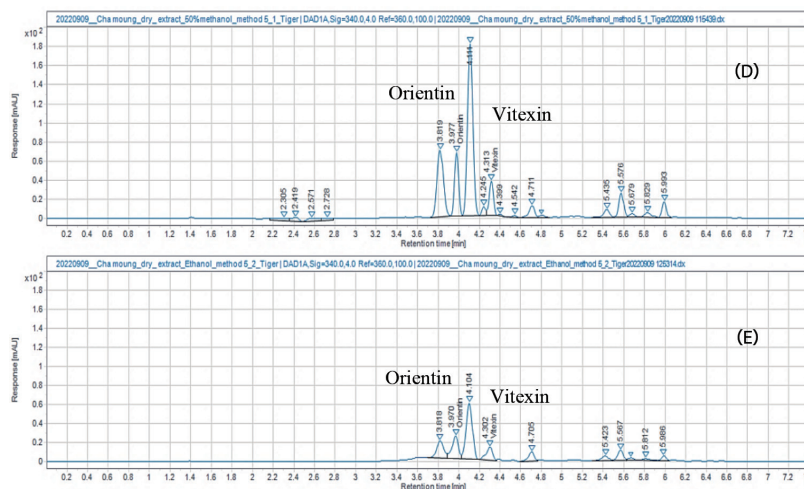


Figure 4 Effect of orientin and vitexin extraction in *Garcinia cowa* Roxb. leaves with 50% methanol (D) and methanol (E)

ดังนั้นในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณโอเรียนทินและไวเทกซินในใบชะมวงจึงเลือกใช้ 50% เมทานอลเป็นตัวทำละลายในการสกัดใบชะมวง

1.3 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัด

การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดพบว่า สารละลายที่ได้จากการสกัดด้วยใบชะมวง ซึ่งสกัดด้วยวิธีเดียวกันโดยการรฟลักซ์กับ 50% เมทานอล แต่ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดแตกต่างกัน เมื่อนำมา

วิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC พบว่าสารโอเรียนทินและไวเทกซินให้ retention time 3.98 และ 4.31 นาที ตามลำดับ จากการสกัดด้วยระยะเวลา 20, 30 และ 45 นาที มีค่าดังนี้ คือ ค่าพื้นที่ใต้พีคของสารโอเรียนทินและไวเทกซินจากการสกัดด้วยระยะเวลา 20 นาที น้อยกว่าการสกัดด้วยระยะเวลา 30 และ 45 นาที ส่วนค่าพื้นที่ใต้พีคของสารโอเรียนทินและไวเทกซินจากการสกัดด้วยระยะเวลา 30 และ 45 นาที ไม่แตกต่างกัน (Figure 5, Table 4)

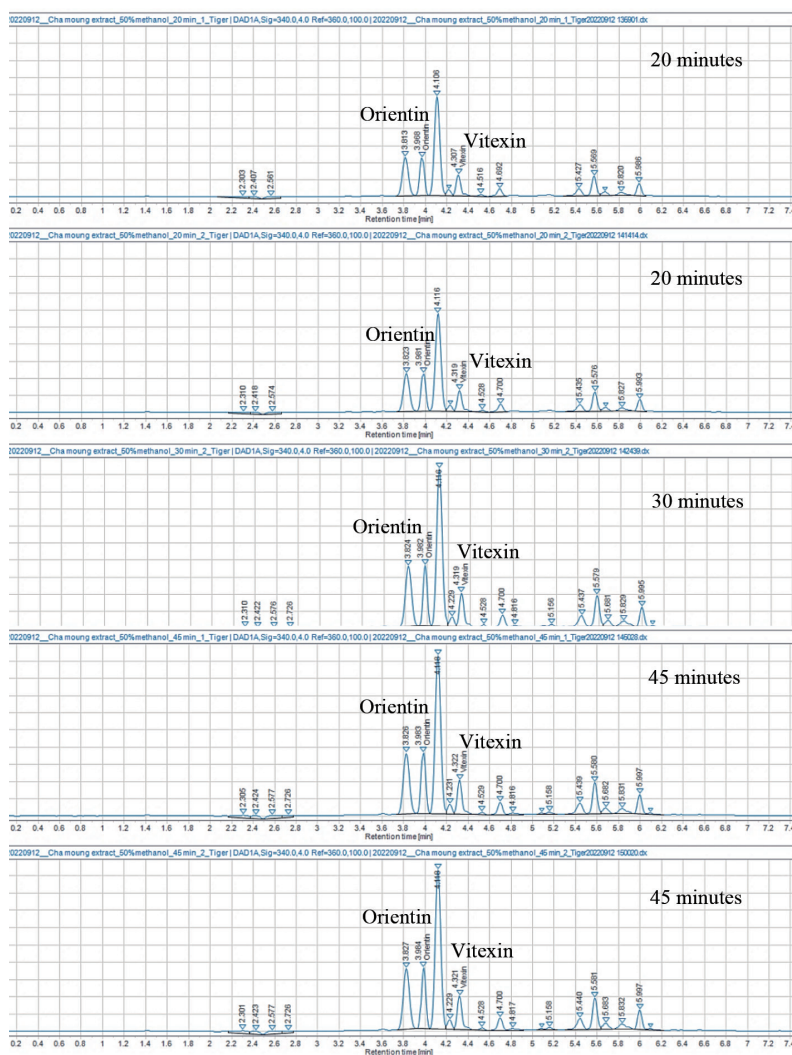


Figure 5 Effect of extraction time to extract orientin and vitexin from *Garcinia cowa* Roxb. leaves: 20, 30 and 45 minutes

Table 4 Area under the peak of orientin and vitexin were extracted with 50% methanol at 20, 30 and 45 minutes

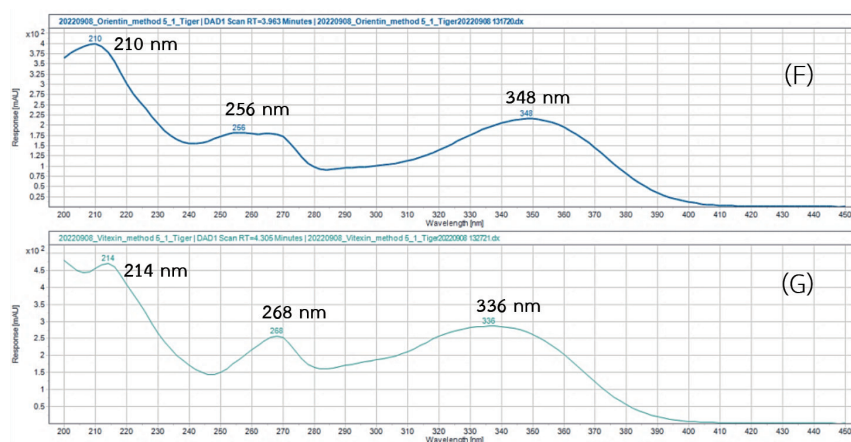
No.	Sample	Vial.	Retention time (minutes)/Area peak	
			orientin	vitexin
1	50% methanol extract (20 min)	1	3.968/124.867	4.317/77.335
2	50% methanol extract (20 min)	2	3.981/123.471	4.319/76.701
3	50% methanol extract (30 min)	1	3.982/200.431	4.319/125.494
4	50% methanol extract (30 min)	2	3.982/197.879	4.319/123.758
5	50% methanol extract (45 min)	1	3.983/199.943	4.322/125.693
6	50% methanol extract (45 min)	2	3.984/200.138	4.321/125.288

ดังนั้นในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารโอเรียนทินและไวเทกซินในใบชะมวง จึงเลือกใช้ 50% เมทานอล เป็นตัวทำละลายในการสกัดและใช้เวลาในการสกัด 30 นาที

1.4 ความยาวคลื่นในการตรวจวัดสารโอเรียนทินและไวเทกซิน

จากการศึกษาการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตของโอเรียนทินและไวเทกซิน พบว่า $\lambda_{\max}$ ของสาร

โอเรียนทินและไวเทกซินมีค่าเท่ากับ 210, 256 และ 348 นาโนเมตร (F) และ 214, 268 และ 336 นาโนเมตร (G) ตามลำดับ (Figure 6) และเมื่อวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างใบชะมวงด้วยเครื่อง UHPLC โดยใช้ DAD เป็นเครื่องตรวจวัด ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ไม่พบการซ้อนทับของพีคของสารอื่น (Figure 7)

**Figure 6** UV spectrum of orientin (F) and vitexin (G)

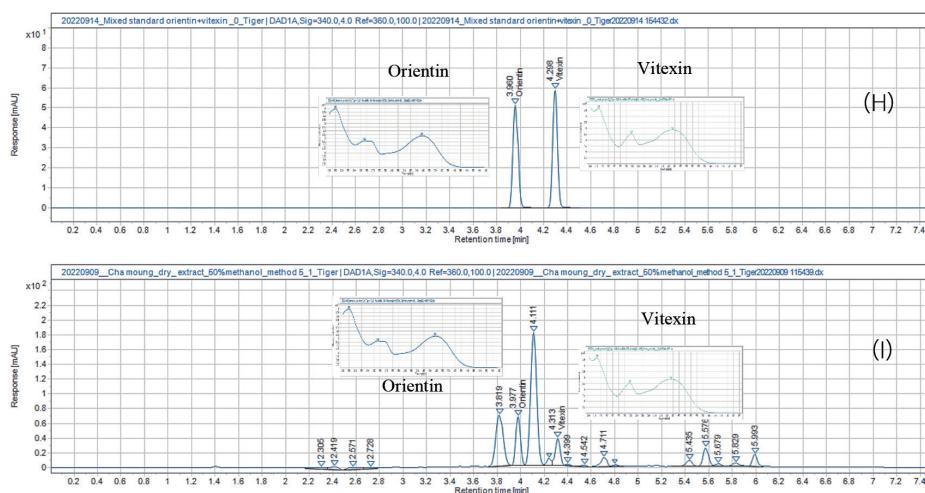


Figure 7 UV spectrum and chromatogram of orientin and vitexin in sample solution of *Garcinia cowa* Roxb. leaves (I) compare with mixed standard solution of orientin and vitexin (H)

ดังนั้น ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารโอเรียนทินและไวเทกซินในสารละลายตัวอย่างใบชะมวง จึงเลือกการตรวจวัดการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ต ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร

1.5 ภูมิภาคคงที่และภูมิภาคเคลื่อนที่

ภูมิภาคคงที่ พบว่าเมื่อใช้ UHPLC column ชนิด ARC-18 (J), ขนาด 4.6×150 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 2.7 ไมโครเมตร UHPLC chromatographic fingerprint ที่ได้ให้พีคของโอเรียนทินและไวเทกซินที่ retention time 3.98 และ 4.31 นาที ตามลำดับ ซึ่งมีการแยกจากสิ่งเจือปนอื่นอย่างชัดเจน แต่ UHPLC column ชนิด ARC-8 (K), ขนาด 2.1×100 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 3.0 ไมโครเมตร ให้การแยกสารออกจากสิ่งเจือปนอื่นได้น้อยกว่า column ชนิด ARC-18 (Figure 8)

ภูมิภาคเคลื่อนที่ พบว่าเมื่อปรับเปลี่ยนองค์ประกอบของภูมิภาคเคลื่อนที่จากน้ำและอะซิโตไนล์

(L) เป็น 0.1% ออร์โทฟอสโฟรีกแอซิด (0.1% ortho-phosphoric acid) ในน้ำ และ 0.1% ออร์โทฟอสโฟรีกแอซิด ในอะซิโตไนล์ (acetonitrile) (M) retention time ของสารโอเรียนทินและไวเทกซิน เปลี่ยนจาก 4.23 และ 4.62 นาที เป็น 3.98 และ 4.31 นาที จะได้ peak shape ของโอเรียนทินและไวเทกซินที่สมมาตร (symmetry) และแยกจากสิ่งเจือปนอื่นอย่างชัดเจน (Figure 8)

ดังนั้นในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณโอเรียนทินและไวเทกซินในสารละลายตัวอย่างใบชะมวงด้วยเครื่อง UHPLC จึงเลือกใช้ UHPLC column ชนิด ARC-18, ขนาด 4.6×150 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 2.7 ไมโครเมตร ใช้ 0.1% ออร์โทฟอสโฟรีกแอซิดในน้ำ และ 0.1% ออร์โทฟอสโฟรีกแอซิดในอะซิโตไนล์ เป็นภูมิภาคเคลื่อนที่ ตรวจวัดด้วย DAD ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร

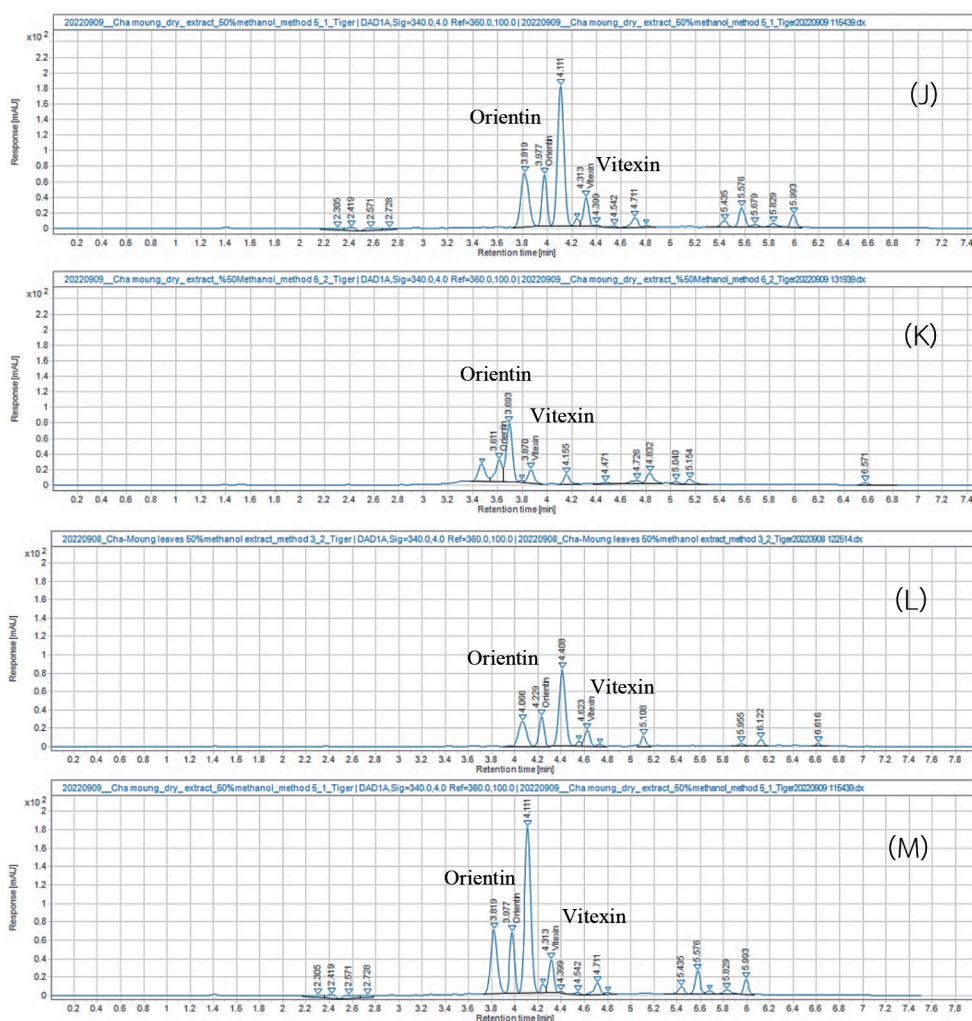


Figure 8 Chromatogram of sample solution of *Garcinia cowa* Roxb. leaves column ARC-18 (J) compared with column ARC-8 (K) and mobile phase (L) compare with mobile phase (M)

2. การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

2.1 การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์

จากกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายสารมาตรฐานและพื้นที่ใต้พีค พบว่าความเข้มข้นของสารละลายสารมาตรฐานโอเรียนทินและไวเทกซินกับพื้นที่ใต้พีคมีลักษณะเป็นเส้นตรง

โดยสารมาตรฐานโอเรียนทินมีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 1.32-127.01 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.99999 และสารมาตรฐานไวเทกซินมีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 1.40-134.06 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.99998 (Figure 9)

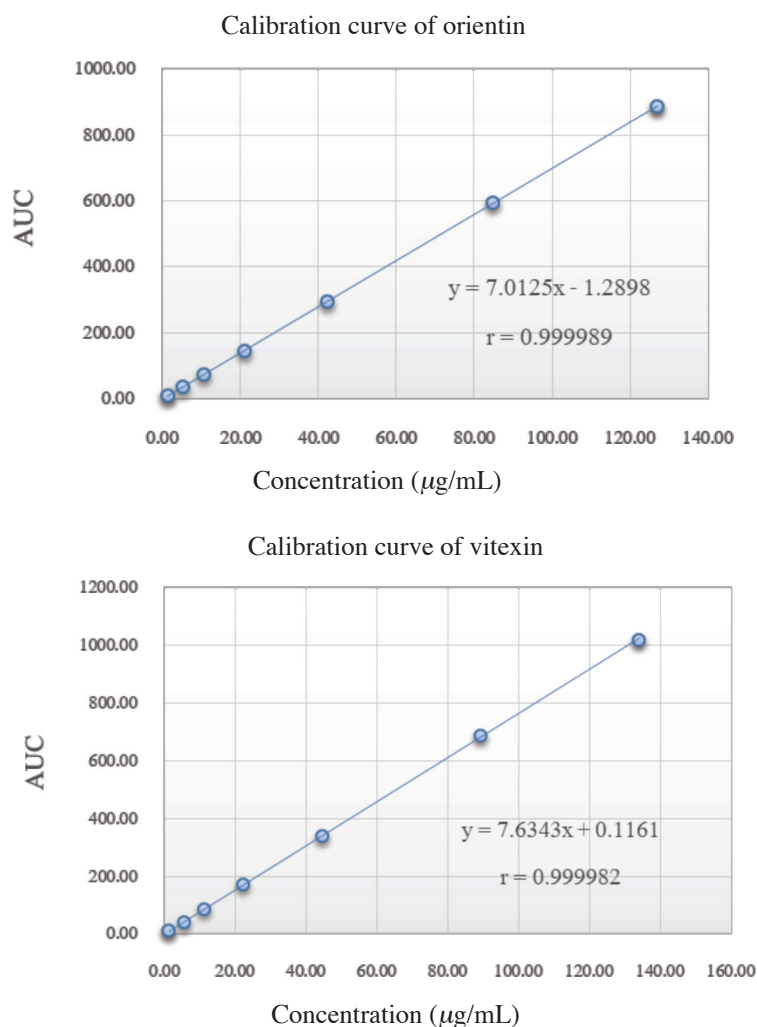


Figure 9 The calibration curve of orientin and vitexin standard intensity against peak area under the curve (AUC) concentration range of 1.32–134.06 µg/mL

2.2 การทดสอบร้อยละของการคืนกลับและความเที่ยง

เมื่อเติมสารละลายสารมาตรฐานโอเรียนทินและไวเทกซินที่มีความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ในช่วงการใช้งาน 3 ระดับ ลงใน sample blank วิเคราะห์ sample blank จำนวน 6 ซ้ำ และวิเคราะห์ spiked sample ระดับละ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำทำ duplicate ตามลำดับ การเตรียม spiked sample ให้มีความเข้มข้น 50,

100, 150% ความเข้มข้นของโอเรียนทินและไวเทกซินที่คำนวณได้เท่ากับร้อยละ 7.69, 14.29 และ 20.00 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง spiked sample พบว่าร้อยละของการคืนกลับของสารโอเรียนทินและไวเทกซินอยู่ในช่วงร้อยละ 96.26-102.25 และ 96.33-103.15 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ (Table 5)

การคำนวณ

sample blank ที่วิเคราะห์ได้ มีปริมาณความเข้มข้นของโอเรียนตินเฉลี่ย 1.3720 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (แทนค่าพื้นที่ใต้พีคของโอเรียนตินที่ค่า y จากสมการเส้นตรง $y = 7.0125x - 1.2898$ จะได้ค่า x คือ ปริมาณความเข้มข้นของโอเรียนตินที่คำนวณได้) ความเข้มข้นของโอเรียนตินใน sample blank (%w/w) โดยน้ำหนักแห้งของใบชะมวง เท่ากับ $(1.3720 \mu\text{g/mL}) \times (50 \text{ mL}) \times 1 \times 100 / \text{น้ำหนักใบชะมวง } 1.0019 \mu\text{g} / 1,000,000 = 0.0068\% \text{ w/w}$

$$\% \text{ recovery} = \frac{(C1 - C2) \times 100}{C3}$$

ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ

C1 คือ ความเข้มข้นของสารใน spiked sample เท่ากับ 1.4695 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

C2 คือ ความเข้มข้นของสารใน sample blank เท่ากับ 1.3720 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

C3 คือ ความเข้มข้นของสารที่เติม เท่ากับ 0.1015 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

$$\% \text{ recovery} = (1.4695 - 1.3720) \times 100 / 0.1015 = 96.01$$

เมื่อวิเคราะห์ระดับละ 3 ซ้ำ นิดซ้ำละ 2 ครั้ง จะได้ $\% \text{ recovery} = 96.32 \pm 1.21$ และ $\% \text{ RSD} = 1.25$

ในขณะเดียวกันการคำนวณร้อยละของการคืนกลับที่ระดับความเข้มข้นระดับกลางและระดับสูง จะคำนวณเหมือนกันกับระดับความเข้มข้นต่ำ แต่จะต่างกันเฉพาะค่า C1 และ C3

จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง spiked sample พบว่าร้อยละของการคืนกลับของสารโอเรียนติน อยู่ในช่วง 96.26-102.25% ดังแสดงใน Table 4

sample blank ที่วิเคราะห์ได้ มีปริมาณความเข้มข้นของไวเทกซินเฉลี่ย 0.6434 ไมโครกรัม/

มิลลิลิตร (แทนค่าพื้นที่ใต้พีคของไวเทกซินที่ค่า y จากสมการเส้นตรง $y = 7.6343x + 0.1161$ จะได้ค่า x คือ ปริมาณความเข้มข้นของไวเทกซินที่คำนวณได้) ความเข้มข้นของไวเทกซินใน sample blank (%w/w) โดยน้ำหนักแห้งของใบชะมวง

$$\text{เท่ากับ } (0.6434 \mu\text{g/mL}) \times (50 \text{ mL}) \times 1 \times 100 / \text{น้ำหนักใบชะมวง } 1.0019 \mu\text{g} / 1,000,000 = 0.0032\% \text{ w/w}$$

$$\% \text{ recovery} = \frac{(C1 - C2) \times 100}{C3}$$

ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ

C1 คือ ความเข้มข้นของสารใน spiked sample เท่ากับ 0.7467 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

C2 คือ ความเข้มข้นของสารใน sample blank เท่ากับ 0.6434 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

C3 คือ ความเข้มข้นของสารที่เติม เท่ากับ 0.1077 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

$$\% \text{ recovery} = (0.7467 - 0.6434) \times 100 / 0.1077 = 95.91$$

เมื่อวิเคราะห์ระดับละ 3 ซ้ำ นิดซ้ำละ 2 ครั้ง จะได้ $\% \text{ recovery} = 96.33 \pm 1.18$ และ $\% \text{ RSD} = 1.22$ ในขณะเดียวกันการคำนวณร้อยละของการคืนกลับที่ระดับความเข้มข้นระดับกลางและระดับสูง จะคำนวณเหมือนกันกับระดับความเข้มข้นต่ำ แต่จะต่างกันเฉพาะค่า C1 และ C3

จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง spiked sample พบว่าร้อยละของการคืนกลับของสารไวเทกซิน อยู่ในช่วง 96.33-103.15% (Table 5)

การทดสอบความเที่ยง

Repeatability วิเคราะห์ปริมาณสารโอเรียนตินและไวเทกซินในตัวอย่างสารละลายใบชะมวง พบว่ามีค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 0.24

และ 0.23 ตามลำดับ (Table 5)

การทดสอบ Intermediate precision, between-day วิเคราะห์ปริมาณสารโอเรียนตินและ

ไวเทกซิน ในตัวอย่างสารละลายใบชะมวง พบว่ามีค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 0.94 และ 1.50 ตามลำดับ (Table 6)

Table 5 Results of percentage recovery and repeatability

Analyzed substances	Sample blank		Spiked level		n = 6		
	($\mu\text{g/mL}$)	(%w/w)	(%)	(%w/w)	%Recovery mean $\pm$ SD	%RSD	HORRAT
Orientin	1.3720	0.0068	50	7.69	96.32 $\pm$ 1.21	1.25	0.47
			100	14.29	96.26 $\pm$ 0.22	0.22	0.09
			150	20.00	102.25 $\pm$ 0.08	0.08	0.04
Vitexin	0.6434	0.0032	50	7.69	96.33 $\pm$ 1.18	1.22	0.46
			100	14.29	99.83 $\pm$ 0.22	0.22	0.09
			150	20.00	103.15 $\pm$ 0.10	0.10	0.04

Table 6 Results of repeatability and intermediate precision between-day

Analyzed substances	% RSD of Repeatability	% RSD of intermediate precision between-day
Orientin	0.24	0.94
Vitexin	0.23	1.50

2.3 การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ

การคำนวณ

คำนวณค่าประมาณของ LOD จากกราฟมาตรฐานของโอเรียนติน

LOD ($\mu\text{g/mL}$), ค่าประมาณ = $3 \times \text{standard error/slope}$

standard error = 0.900816

slope = 7.012527

LOD ($\mu\text{g/mL}$), ค่าประมาณ = $(3 \times 0.900816)/7.012527 = 0.385 \mu\text{g/mL}$

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

$$= (0.385 \times 50) \times 1 \times 100/1,000,000/1.0019 = 0.002$$

พบว่า LOD ของการวิเคราะห์โอเรียนตินเท่ากับร้อยละ 0.002 โดยน้ำหนักแห้งของใบชะมวง

คำนวณค่าประมาณของ LOD จากกราฟมาตรฐานของไวเทกซิน

LOD ($\mu\text{g/mL}$), ค่าประมาณ = $3 \times \text{standard error/slope}$ standard error = 1.317304
 error/slope slope = 7.634283

LOD ($\mu\text{g/mL}$), ค่าประมาณ = $(3 \times 1.317304)/7.634283 = 0.518 \mu\text{g/mL}$

LOD (% w/w), ค่าประมาณ = $\frac{\text{LOD } (\mu\text{g/mL}) \times \text{ปริมาตรที่เตรียม (mL)} \times \text{ระดับเจือจาง} \times 100}{1,000,000 \times \text{น้ำหนักตัวอย่าง } (\mu\text{g})}$
 = $(0.518 \times 50) \times 1 \times 100/1,000,000/1.0019 = 0.003$

พบว่า LOD ของการวิเคราะห์ไ่วเทกซินเท่ากับร้อยละ 0.003 โดยน้ำหนักแห้งของใบชะมวง

2.4 การทดสอบขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ

การคำนวณ

คำนวณค่าประมาณของ LOQ จากกราฟ
 มาตรฐานของโอเรียนทิน

LOQ ($\mu\text{g/mL}$), ค่าประมาณ = $10 \times \text{standard error/slope}$

standard error = 0.900816

slope = 7.012527

LOQ ($\mu\text{g/mL}$), ค่าประมาณ = $(10 \times 0.900816)/7.012527 = 1.285 \mu\text{g/mL}$

LOQ (% w/w), ค่าประมาณ = $\frac{\text{LOQ } (\mu\text{g/mL}) \times \text{ปริมาตรที่เตรียม (mL)} \times \text{ระดับเจือจาง} \times 100}{1,000,000 \times \text{น้ำหนักตัวอย่าง } (\mu\text{g})}$
 = $(1.285 \times 50) \times 1 \times 100/1,000,000/1.0019 = 0.006$

% recovery = $\frac{(C1 - C2) \times 100}{C3}$

ที่ความเข้มข้นของ LOQ เท่ากับ 1.285 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

C1 คือ ความเข้มข้นของสารใน spiked sample
 เท่ากับ 1.5175 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

C2 คือ ความเข้มข้นของสารใน sample blank
 เท่ากับ 1.4233 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

C3 คือ ความเข้มข้นของสารที่เติม เท่ากับ
 0.0988 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

% recovery = $(1.5175 - 1.4233) \times 100/0.0988$
 = 95.34

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณโอเรียนทินใน spiked sample

6 ซ้ำ การคำนวณร้อยละของการคืนกลับ ที่เหลืออีก
 5 ครั้ง จะคำนวณเหมือนกันกับครั้งแรก แต่จะต่างกัน

เฉพาะค่า C1 และ C3

เมื่อวิเคราะห์ 6 ซ้ำ จะได้ % recovery = 96.61 ± 1.45
 และ % RSD = 1.50

คำนวณค่าประมาณของ LOQ จากกราฟ
 มาตรฐานของไ่วเทกซิน

LOQ ($\mu\text{g/mL}$), ค่าประมาณ = $10 \times \text{standard error/slope}$

standard error = 1.317304

slope = 7.634283

$$\text{LOQ } (\mu\text{g/mL}), \text{ ค่าประมาณ} = (10 \times 1.317304)/7.634283 = 1.726 \mu\text{g/mL}$$

$$\begin{aligned} \text{LOQ } (\% \text{ w/w}), \text{ ค่าประมาณ} &= \frac{\text{LOQ } (\mu\text{g/mL}) \times \text{ปริมาตรที่เตรียม (mL)} \times \text{ระดับเจือจาง} \times 100}{1,000,000 \times \text{น้ำหนักตัวอย่าง } (\mu\text{g})} \\ &= (1.726 \times 50) \times 1 \times 100/1,000,000/1.0019 = 0.009 \end{aligned}$$

$$\% \text{ recovery} = \frac{(C1 - C2) \times 100}{C3}$$

ที่ความเข้มข้นของ LOQ เท่ากับ 1.726 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

C1 คือ ความเข้มข้นของสารใน spiked sample เท่ากับ 0.7914 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

C2 คือ ความเข้มข้นของสารใน sample blank เท่ากับ 0.6639 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

C3 คือ ความเข้มข้นของสารที่เติม เท่ากับ 0.1328 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

$$\% \text{ recovery} = (0.7914 - 0.6639) \times 100/0.1328 = 96.01$$

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณไวเทกซินใน spiked sample 6 ซ้ำ การคำนวณร้อยละของการคืนกลับ ที่

เหลืออีก 5 ครั้ง จะคำนวณเหมือนกันกับครั้งแรก แต่จะต่างกันเฉพาะค่า C1 และ C3

$$\text{เมื่อวิเคราะห์ 6 ซ้ำ จะได้ } \% \text{ recovery} = 97.16 \pm 1.07 \text{ และ } \% \text{ RSD} = 1.10$$

พบว่า LOQ ของการวิเคราะห์โอเรียนทินและไวเทกซินเท่ากับร้อยละ 0.006 และ 0.009 โดยน้ำหนักแห้งของใบชะมวง (ไมโครกรัม/ไมโครกรัม) ตามลำดับ โดยมีค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 1.50 และ 1.10 ตามลำดับ และร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วงร้อยละ 95.07-98.97 และ 96.01-98.38 ตามลำดับ (Table 7)

Table 7 Results of Limit of Quantitation

Analyzed substances	Spiked sample ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ (% w/w)	n = 6		
			% Recovery	% Recovery mean $\pm$ SD	% RSD
Orientin	0.0988	0.006	95.36	96.61 $\pm$ 1.45	1.50
			97.24		
			98.97		
			95.07		
			97.09		
			95.94		
Vitexin	0.1328	0.009	96.01	97.16 $\pm$ 1.07	1.10
			96.50		
			97.89		
			96.11		
			98.38		
			98.08		

2.5 การทดสอบความจำเพาะ

จากการฉีดสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างใบชะมวง พบว่าภายใต้สภาวะ UHPLC ที่พัฒนาขึ้นสามารถแยกสารโอเรียนทินและ

ไวเทกซินออกจากกันได้ และไม่มีการรบกวนของสารอื่นในตัวอย่าง โดยมีค่า retention time เท่ากับ 3.97 และ 4.30 นาที ตามลำดับ (Figure 10)

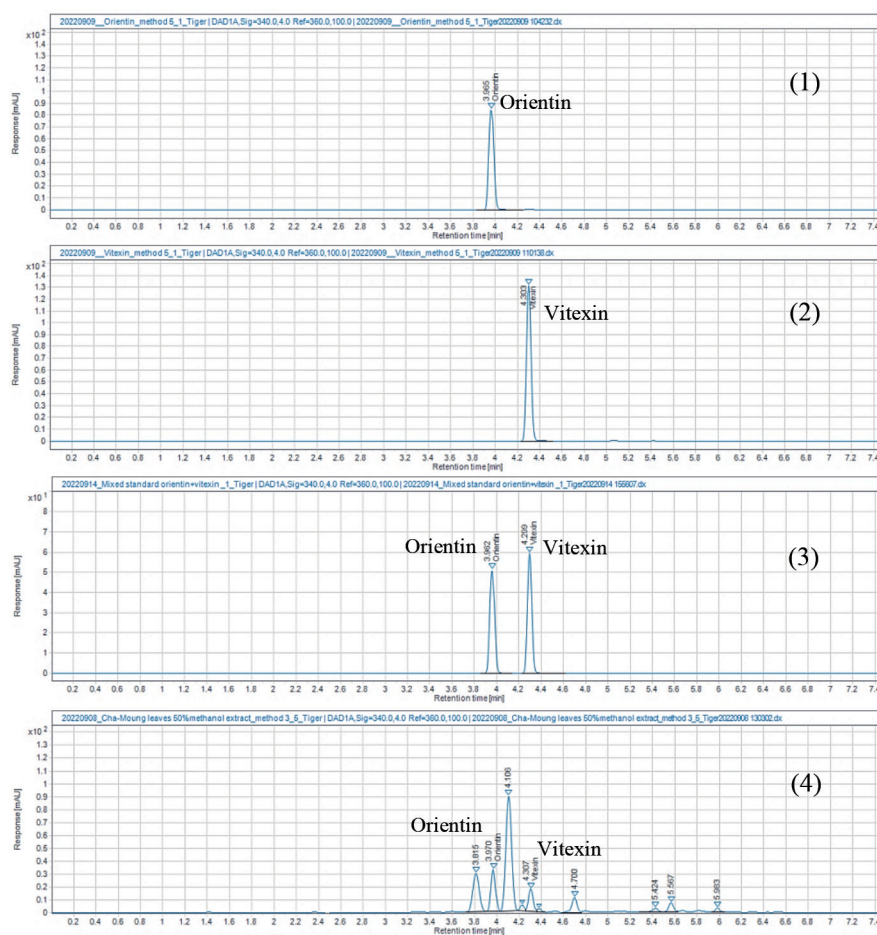


Figure 10 Chromatogram of standard solution of orientin (1), vitexin (2), mixed standard solution of orientin and vitexin (3) and sample solution of *Garcinia cowa* Roxb. leaves (4)

3. การวิเคราะห์ปริมาณโอเรียนทินและไวเทกซินในสารละลายตัวอย่างใบชะมวง

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารโอเรียนทินและไวเทกซินในตัวอย่างสารละลายใบชะมวง จำนวน 9

ตัวอย่าง พบว่าสารละลายตัวอย่างใบชะมวงมีปริมาณสารโอเรียนทินและไวเทกซิน เฉลี่ยร้อยละ 0.10 และ 0.06 โดยน้ำหนักแห้งของใบชะมวง (ไมโครกรัม/ไมโครกรัม) ตามลำดับ (Table 8)

Table 8 The results showed orientin and vitexin contents in sample solution of *Garcinia cowa* Roxb. leaves by Ultra High Performance Liquid Chromatography

Sample	Collection site	The concentration of orientin and vitexin are calculated from a linear equation of Calibration curve ($\mu\text{g/mL}$)		Orientin and vitexin content (% w/w)	
		orientin	vitexin	orientin	vitexin
1	Makham District, Chanthaburi Province	28.727	16.423	0.14	0.08
2	Mueang District, Nonthaburi Province (Tree 1)	23.079	15.547	0.12	0.08
3	Mueang District, Nonthaburi Province (Tree 2)	28.888	14.825	0.14	0.07
4	Pathio District, Chumphon Province	8.273	5.295	0.04	0.03
5	Mueang District, Trat Province	12.913	8.334	0.06	0.04
6	Ban Na District, Nakhon Nayok Province	16.275	10.461	0.08	0.05
7	Mueang District, Rayong Province	24.125	13.264	0.12	0.07
8	Bang Khen District, Bangkok Province	26.998	13.213	0.13	0.07
9	Mueang District, Khon Kaen Province	17.553	11.669	0.09	0.06
Mean				0.10	0.06

อภิปรายผล

ชะมวงเป็นสมุนไพรที่มีศักยภาพเชิงพาณิชย์และมีประโยชน์ทั้งเป็นอาหาร เป็นยาและเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพ สามารถนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น เครื่องดื่มสมุนไพร ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง มีรายงานการศึกษาทางวิทยาศาสตร์ด้านเคมีเภสัชวิทยาและพิษวิทยามากมายที่สนับสนุนการใช้ แต่การพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์นั้น ปัจจัยที่สำคัญที่ควรคำนึงถึงคือปัจจัยด้านคุณภาพของใบชะมวง เนื่องจากใบชะมวงมีสารสำคัญกลุ่มกลุ่มฟลาโวนอยด์ซีไกลโคไซด์ 2 ชนิด คือ ไอเรียนทินและไวเทกซิน และสารกลุ่มสเตียรอยด์ ได้แก่ เบต้า-ซิโตสเตอรอล เป็นองค์ประกอบ มีรายงานวิจัยการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของใบชะมวง พบว่าสารสกัดจากใบชะมวงมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ และฤทธิ์ลดไขมัน^[3,4]ในการพัฒนา

วิธีวิเคราะห์ปริมาณสารไอเรียนทินและไวเทกซินในตัวอย่างใบชะมวง โดยการสกัดตัวอย่างใบชะมวงใน 50% เมทานอล ด้วยวิธีรีฟลักซ์ กรองและนำสารสกัดมาระเหยแห้ง จากนั้นละลายกลับและปรับปริมาตรด้วย 50% เมทานอลจนครบ 50 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดแก้ววัดปริมาตร กรองผ่าน Nylon filter syringe นำสารละลายตัวอย่างดังกล่าวปริมาตร 10 ไมโครลิตรฉีดเข้าสู่ระบบโครมาโทกราฟีของเครื่อง UHPLC ซึ่งใช้คอลัมน์ชนิด ARC-18, ขนาด 4.6×150 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 2.7 ไมโครเมตร และใช้ 0.1% ออร์โท-ฟอสโฟริกแอซิดในน้ำและ 0.1% ออร์โทฟอสโฟริกแอซิดในอะซิโตนไทโรลเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตร/นาที ตรวจวัดด้วย DAD ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร จะปรากฏพิกของไอเรียนทินและไวเทกซิน ที่ retention time เท่ากับ

3.97 และ 4.30 นาที ตามลำดับ

ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ดังกล่าว พบว่ากราฟมาตรฐานมีความเป็นเส้นตรง โดยสามารถฐานโอเรียนทินมีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 1.32-127.01 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.9999 และสารมาตรฐานไวเทกซินมีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 1.40-134.06 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.9999 ค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วง 96.26-102.25 และ 96.33-103.15% ตามลำดับ ค่า HORRAT เท่ากับ 0.04-0.47 และ 0.04-0.46 ตามลำดับ LOD ของการวิเคราะห์โอเรียนทินและไวเทกซิน เท่ากับร้อยละ 0.002 และ 0.003 โดยน้ำหนักแห้งของใบชะมวง (ไมโครกรัม/ไมโครกรัม) ตามลำดับ LOQ ของการวิเคราะห์โอเรียนทินและไวเทกซิน เท่ากับร้อยละ 0.006 และ 0.009 โดยน้ำหนักแห้งของใบชะมวง (ไมโครกรัม/ไมโครกรัม) ตามลำดับ โดยมีค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับ 1.50 และ 1.10 ตามลำดับ และร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วงร้อยละ 95.07-98.97 และ 96.01-98.38 ตามลำดับ ปริมาณสารโอเรียนทินและไวเทกซินในสารละลายตัวอย่างใบชะมวง จำนวน 9 ตัวอย่าง มีค่าเฉลี่ยร้อยละ 0.10 และ 0.06 โดยน้ำหนักแห้งของใบชะมวง (ไมโครกรัม/ไมโครกรัม) ตามลำดับ สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการกำหนดปริมาณสารโอเรียนทินและไวเทกซินในตัวอย่างสารละลายใบชะมวงได้

UHPLC เป็น High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ที่มีการพัฒนาเพื่อให้มีประสิทธิภาพการแยกสาร ความไวในการแยกสารที่ดีขึ้น ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่น้อยลง และลดระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์ คือ เมื่อนำวิธีวิเคราะห์ปริมาณ

โอเรียนทินและไวเทกซินในใบชะมวงด้วยวิธี UHPLC ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่เปรียบเทียบกับ การหาปริมาณสารโอเรียนทินและไวเทกซินด้วยวิธี HPLC-UV/DAD^[6] และการหาปริมาณสารไวเทกซินในสารสกัดและผลิตภัณฑ์ของพืชชาด้วยวิธี UHPLC-DAD^[7] พบว่าวิธี HPLC/UV/DAD และวิธี UHPLC-DAD^[7] ใช้เวลาวิเคราะห์ต่อ 1 ตัวอย่าง นาน 30 นาที และ 16 นาที ตามลำดับ ทำให้สิ้นเปลืองวัฏภาคเคลื่อนที่ ส่วนวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ ใช้เวลาในการวิเคราะห์ 7.5 นาที ซึ่งรวดเร็วและประหยัดวัฏภาคเคลื่อนที่ ดังนั้นจึงเลือกใช้เครื่อง UHPLC ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณโอเรียนทินและไวเทกซินในใบชะมวง จากการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณโอเรียนทินและไวเทกซินที่พัฒนาขึ้น พบว่า ร้อยละของการคืนกลับจากการวิเคราะห์ spiked sample อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (95-105%) ซึ่งแสดงถึงความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ และค่า HORRAT อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (< 2) ซึ่งแสดงถึงความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น วิธีดังกล่าวจึงมีความเหมาะสม สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารโอเรียนทินและไวเทกซิน เพื่อใช้ควบคุมปริมาณสารของใบชะมวงต่อไปได้

ข้อสรุป

การศึกษานี้ได้พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารโอเรียนทินและไวเทกซินในใบชะมวงด้วยวิธี UHPLC และทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ผลการวิจัยพบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้น มีความถูกต้องแม่นยำ สะดวก รวดเร็ว และประหยัดสารเคมีที่ใช้ในวัฏภาคเคลื่อนที่ จึงนำวิธีที่ได้มาตรวจปริมาณสารโอเรียนทินและไวเทกซินในตัวอย่างใบชะมวง ทำให้ได้ข้อมูลซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาพันธุ์ชะมวง

และผลิตภัณฑ์ผสมใบชะมวง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่สนับสนุนงบประมาณในการวิจัยนี้ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ห้องปฏิบัติการพิษภัณฑ์พืช และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการวิจัยเพื่อแยกสารสำคัญจากสมุนไพรทุกท่าน ที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

References

1. Office of Forest Herbarium, Forest and Plant Conservation Research Office, Department of National Parks, Wildlife and Plant Conservation. Tem Smitinand's Thai plant names. 2001 revised edition. Bangkok: National Office of Buddhism Printing House; 2001. 71. (in Thai)
2. Boonyaprapat N, Chokchaicharoenporn O. Medicinal Plants Indigenous to Thailand. Bangkok: Prachachon; 1996. 1(1):761. (in Thai)
3. Pattamadilok D, Setakanna P, Kamphonchaidech S, Anulakkanapakorn K, Wongsinkongman P. Chemical constituent of *Garcinia cowa* leaves extract. J Thai Trad Alt Med (Supplement). 2009;7(2):135. (in Thai)
4. Pattamadilok D, Niumsakul S, Limpeanchob N, Ingkani-nan K, Wongsinkongman P. Chemical constituents and anti-hyperlipidemic activity of *Garcinia cowa* leaves. J Thai Trad Alt Med. 2010;8(2-3):158. (in Thai)
5. Abourashed E, Vanderplank J, Khan I. High-Speed Extraction and HPLC Fingerprinting of Medicinal Plants-I. Application to *Passiflora* Flavonoids, Pharmaceutical Biology. 2002; 40(2):81-91.
6. Wang J, Yue Y, Jiang H, Tang F. Rapid screening for flavone C-glycosides in the leaves of different species of bamboo and simultaneous quantitation of four marker compounds by HPLC-UV/DAD. Int J Anal Chem. Volume 2012, Article ID 205101, 8 pages doi:10.1155/2012/205101
7. Sepúlveda P, Costa G, Aragón D, Ramos F, Castellanos L. Analysis of vitexin in aqueous extracts and commercial products of Andean *Passiflora* species by UHPLC-DAD. J Appl Pharm Sci. 2018;8(9):81-86.
8. Department of Medical Sciences. A Practical Guide for Single Laboratory Method Validation of Chemical Methods. Nonthaburi: Department of Medical Sciences; 2006.