

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ Astragalin ในสารสกัดเอทานอลจากใบมะรุม ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีชนิดผิวบางสมรรถนะสูง

ศิริวรรณ ชัยสมบุญพันธ์*, ธนวัฒน์ ทองจีน, พีรธรรม เทียมเทียบรัตน์, สายันท์ เรืองเขตร, อัครชัย ช่วยพรหม

สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ตำบลตลาดขวัญ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000

*ผู้รับผิดชอบบทความ: schaisomboonpan01@gmail.com

บทคัดย่อ

บทนำและวัตถุประสงค์: Astragalin เป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ พบในใบมะรุม (*Drumstick tree, Moringa oleifera* Lam. วงศ์ Moringaceae) มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลาย เช่น ด้านออสเบ ด้านออกซิเดชัน และลดน้ำตาลในเลือด มีการนำสมุนไพรนี้มาใช้ประโยชน์ทั้งทางยาและผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ แต่ยังไม่มีการกำหนดปริมาณสารสำคัญของสมุนไพรชนิดนี้ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ astragalin ในสารสกัดเอทานอลจากใบมะรุมด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดผิวบางสมรรถนะสูง (High-performance thin layer chromatography: HPTLC) เพื่อใช้เป็นแนวทางในการควบคุมคุณภาพสารสกัดเอทานอลในใบมะรุม

วิธีการศึกษา: พัฒนาวิธีวิเคราะห์และทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เชิงปริมาณของสาร Astragalin ในสารสกัดเอทานอลจากใบมะรุม โดยชั่งตัวอย่างสารสกัดเอทานอลจากใบมะรุม 100 มิลลิกรัม มาละลายในเมทานอลปริมาตร 25.0 มิลลิลิตร นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร มาสปอตลงบนแผ่น HPTLC ซึ่งฉาบด้วยซิลิกาเจล เจอเฟ 254 นาโนเมตรด้วยเครื่องพ่นสารอัตโนมัติ (autosampler) โดยมีวัฏภาคเคลื่อนที่ประกอบด้วย เอทิลอะซิเตท กรดกลีเซอริกแอซิดิก กรดฟอร์มิกและน้ำ อัตราส่วน 20: 1: 1: 2 นำมาตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร หลังฉีดพ่นด้วยสารละลาย NP/PEG แล้วนำมาวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเครื่องเดนซิโตมิเตอร์ (densitometer)

ผลการศึกษา: ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ดังกล่าว พบว่ากราฟมาตรฐานของ astragalin มีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 1.96-11.76 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9996 ค่าความแม่นยำ astragalin อยู่ในช่วงร้อยละ 97.75-99.49 ค่าความเที่ยงอยู่ในช่วงร้อยละ 0.22-0.45 มีขีดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ เท่ากับ 0.313 และ 1.045 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อศึกษาปริมาณ astragalin ในสารสกัดเอทานอลจากใบมะรุมจำนวน 12 ตัวอย่าง พบว่ามีปริมาณสารดังกล่าวร้อยละ 0.06 โดยน้ำหนักของสารสกัดเอทานอลจากใบมะรุม (ไมโครกรัม/ไมโครกรัม)

อภิปรายผล: วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ รวดเร็วเนื่องจากสามารถสังเกตผลได้พร้อมกันหลายตัวอย่างในเวลาเดียวกัน ประหยัดเนื่องจากแผ่น HPTLC ที่ใช้เป็นวัฏภาคคงที่มีราคาถูกกว่าเมื่อเทียบกับคอลัมน์ HPLC เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและมีความปลอดภัยเนื่องจากใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ปริมาณน้อยกว่า นอกจากนี้ พบว่า สัดส่วนของ

วิฤภาคเคลื่อนที่ในวิธีที่พัฒนาขึ้น มีการใช้กรดคลอริกเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีที่เคยมีรายงานมาก่อน ดังนั้นจึงใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดผิวบางสมรรถนะสูงมาใช้ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ astragalin ในสารสกัดเอทานอลจากใบมะรุม

ข้อสรุป: วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความเหมาะสม สามารถนำไปใช้เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์ปริมาณ astragalin ในสารสกัดเอทานอลจากใบมะรุมและสามารถนำไปสู่การกำหนดเกณฑ์ปริมาณสารสำคัญในสารสกัดเอทานอลจากใบมะรุมต่อไป

คำสำคัญ: ใบมะรุม, astragalin, โครมาโทกราฟีชนิดผิวบางสมรรถนะสูง, HPTLC

Quantitative Analysis of Astragalin Contents in Ethanolic Extract of *Moringa oleifera* Lam. (leave) by High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC)

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

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

*Corresponding author: schaisomboonpan01@gmail.com

Abstract

Introduction and Objective: Astragalin, a flavonoid found in drumstick tree leaves (*Moringa oleifera* Lam., Moringaceae family), exhibits various biological activities, including anti-inflammatory and antioxidative effects and the ability to lower blood sugar levels. This herb has traditionally been used for medicinal purposes and in developing health products. However, there is currently no specification for the active marker content in this plant. This study aimed to develop an analytical method to quantify astragalin content in ethanolic extracts of drumstick tree leaves using high-performance thin-layer chromatography (HPTLC).

Methods: The development and validation were performed by weighing 100 mg of drumstick leave-ethanolic extract and dissolved in 25.0 mL of methanol. Subsequently, 1 μ L of the solution was applied to the HPTLC plate coated with Silica gel GF254 utilizing an autosampler. The mobile phase consisted of ethyl acetate, glacial acetic acid, formic acid, and water in a ratio of 20:1:1:2 (v/v/v/v). The developed plate was examined under UV366 nm after being sprayed with NP/PEG solutions, and astragalin content was quantitatively analyzed using a densitometer.

Results: This method was validated by establishing linearity for astragalin concentrations ranging from 1.96 to 11.76 μ g/mL, yielding a determination correlation coefficient (r) of 0.9996. The accuracy of astragalin ranged from 97.75% to 99.49%, while the precision (%RSD) ranged from 0.22% to 0.45%. The limits of detection and quantification were determined to be 0.313 and 1.045 μ g/mL, respectively. Quantitative analysis of astragalin in 12 leave-ethanolic extracts revealed an astragalin content of $0.06 \pm \%$ (w/w).

Discussion: The recently developed analytical method offers several advantages, including rapidity achieved through the simultaneous observation of multiple samples. It is also cost-effective, as the HPTLC plate employed as the stationary phase is more affordable than traditional high-performance liquid chromatography (HPLC) columns. Furthermore, this method is environmentally sustainable and safe, utilizing a reduced volume of mobile phase.

Notably, the newly established method incorporates a lower acid concentration in the mobile phase than previously reported techniques. Consequently, HPTLC has been utilized to establish a method for quantification of astragalin in the ethanolic extract of drumstick tree leaves.

Conclusion and Recommendation: This newly developed method is suitable and cost-effective for analyzing astragalin content in drumstick leaf ethanolic extracts. The validation of the astragalin determination method in drumstick leaves using HPTLC has been successfully established and could be used to analyze astragalin content in drumstick tree leaf extracts. Appropriate specifications for astragalin content in drumstick tree leaf extract could be established.

Key words: drumstick tree, *Moringa oleifera* Lam. leaf, astragalin, high-performance thin layer chromatography

บทนำและวัตถุประสงค์

มะรุม มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Moringa oleifera* Lam. จัดอยู่ในวงศ์ Moringaceae^[1] มีชื่อเรียกอื่น เช่น กาแ้งแดง ผักเนื้อไก่ ผักอีฮีม ผักอีฮูม มะค้อน ก้อม เล้ซ้อยะ drumstick tree, horse radish tree เป็นต้น มะรุมมีลักษณะเป็นไม้ต้น (tree) สูง 3-6 เมตร หรือสูงกว่า ผลัดใบ ใบประกอบแบบขนนก 3 ชั้น เรียงสลับ ปลายใบคี่ ไม่มีหูใบ ยาว 20-60 เซนติเมตร ใบชั้นหนึ่งมีใบย่อย 8-10 คู่ ใบแบบรูปไข่กลับรูปขนาน ใต้ใบสีเขียวอ่อน ใบอ่อนมีขนสีเทา ขนาดใบยาว 1-3 เซนติเมตร ช่อดอกแบบแยกแขนง ออกตรงซอกใบ ดอกสมบูรณ์เพศ สมมาตรด้านข้าง สีขาว มีกลิ่นหอม กลีบเลี้ยงและกลีบดอกมีอย่างละ 5 กลีบ เกสรเพศผู้ที่สมบูรณ์มี 5 อัน รังไข่ติดเหนือวงกลีบ ผลเป็นแบบแห้งแตก รูปยาวแคบ ห้อยลง เมล็ดมีปีก^[2-3]

จากรายงานการศึกษาพิษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าสารสกัดของใบมะรุมมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ เช่น ฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งลำไส้^[4] โดย Pamok และคณะ ได้ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งลำไส้ชนิด hemocrit

15 (HCT15) SW48 และ SW480 พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 80 จากใบมะรุมสามารถยับยั้งการแบ่งตัว (proliferation) ของเซลล์มะเร็งลำไส้ โดยมีผลต่อการแสดงออกของโปรตีน vascular endothelial growth factor (VEGF)^[4] ในปี 2557 Vongsak และคณะ ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากใบมะรุม พบสารสำคัญ 3 ชนิด ได้แก่ cryptochlorogenic acid, isoquercetin และ astragalin นอกจากนี้ยังได้วิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญทั้ง 3 ชนิดด้วยวิธี high performance liquid chromatography (HPLC)^[5] จากรายงานการศึกษาของ Auayporn และคณะในปี 2559 ได้ศึกษาผลของสารสกัดด้วยเอทานอลจากใบมะรุมต่อการแสดงออกของ VEGF ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29 cells) พบว่า ภายหลังจากทดสอบสารสกัดใบมะรุมใน HT-29 cells พบการแสดงออกของโปรตีน VEGF-A ลดลง และการแสดงออกของโปรตีน neuropilin-1 เพิ่มขึ้น ที่เวลา 24 ชั่วโมง และการแสดงออกของโปรตีน neuropilin-1 จะลดลงที่เวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับผลการแสดงออกของ

โปรตีน VEGF-A และ neuropilin-1 ใน HT-29 cells ภายหลังการทดสอบด้วยสาร astragaloside และ cryptochlorogenic acid ซึ่งพบว่า สารทั้งสองชนิดสามารถลดการแสดงออกของโปรตีน VEGF-A และเพิ่ม neuropilin-1 ที่เวลา 24 ชั่วโมง ก่อนที่จะเกิดการลด neuropilin-1 ที่เวลา 48 ชั่วโมง เช่นกัน^[6] จากรายงานพบว่า chlorogenic acid และอนุพันธ์มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น ลดระดับการสะสมไขมันในตับ ลดความอ้วน และยับยั้งการอักเสบเฉียบพลันของปอด และสามารถยับยั้งสารอนุมูลอิสระ^[7-10] นอกจากนี้ isoquercetin และ astragaloside มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบทางด้านผิวหนัง^[11-12]

ประเทศไทยมีการนำโสมมารวมมาบริโภคเป็นอาหารประจำวันอย่างแพร่หลาย และใช้เป็นยาตามภูมิปัญญาท้องถิ่นพื้นบ้าน จากข้อมูลการศึกษาทางวิทยาศาสตร์ข้างต้นแสดงถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของโสมที่น่าสนใจหลายชนิด มีศักยภาพสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ยาหรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร หรือผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง โดยนิยมใช้สารสกัดด้วยเอทานอลมาใช้เป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ อย่างไรก็ตาม การควบคุมคุณภาพทางเคมีของโสมเป็นสิ่งจำเป็นแต่ปัจจุบันข้อมูลดังกล่าวยังมีอยู่น้อยมาก สำหรับประเทศไทย มีข้อกำหนดคุณสมบัติทางกายภาพ - เคมีของโสมแห่งชาติ^[13] แต่ยังไม่ได้มีการกำหนดปริมาณสารสำคัญทั้งนี้เพื่อเป็นการยกระดับด้านมาตรฐานคุณภาพของสมุนไพรเพื่อประโยชน์เชิงพาณิชย์

การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ astragaloside ในสารสกัดเอทานอลจากโสมด้วยวิธีโครมาโทกราฟีชนิดผิวบาง

สมรรถนะสูงซึ่งเป็นวิธีที่ให้ความถูกต้องแม่นยำ สดวก รวดเร็วและเชื่อถือได้ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการประเมินคุณภาพสารสกัดของโสมและใช้ในการวิจัยและพัฒนาตำรับยาและผลิตภัณฑ์ที่มีสารสกัดโสมเป็นส่วนผสม

ระเบียบวิธีศึกษา

1. วัสดุ

1.1 ตัวอย่างสมุนไพร

โสมสด จำนวน 12 ตัวอย่าง ได้แก่ ภาคกลาง จำนวน 6 ตัวอย่าง คือ จังหวัดนนทบุรี (MOLE 1, MOLE 3) จังหวัดราชบุรี (MOLE 2) จังหวัดชัยนาท (MOLE 11) จังหวัดปทุมธานี (MOLE 12) และ จังหวัดนครสวรรค์ (MOLE 10) ภาคเหนือ จำนวน 2 ตัวอย่าง คือ จังหวัดแพร่ (MOLE 7) และ จังหวัดตาก (MOLE 8) ภาคใต้ จำนวน 4 ตัวอย่าง คือ จังหวัดตรัง (MOLE 5) จังหวัดสุราษฎร์ธานี (MOLE 4 และ MOLE 6) และ จังหวัดนครศรีธรรมราช (MOLE 9) จากแหล่งธรรมชาติของประเทศไทย เก็บในช่วงระหว่างเดือนตุลาคม 2565 ถึงเดือนกรกฎาคม 2566 ตรวจระบุชื่อชนิดวิทยาศาสตร์ตามหลักพฤกษศาสตร์ และเปรียบเทียบกับตัวอย่างพรรณไม้แห้งกับพรรณไม้อ้างอิงของพิพิธภัณฑ์พืช กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (หมายเลขอ้างอิง DMSC 5233)

1.2 สารมาตรฐาน

สารมาตรฐาน astragaloside (Figure 1) ความบริสุทธิ์ $\geq 98\%$ (Chromadex[®], lot no. 00011056-412)

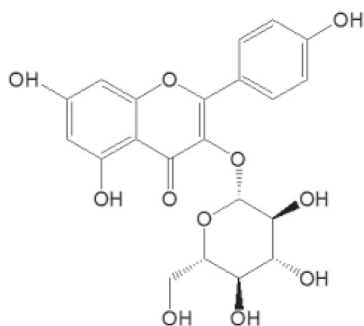


Figure 1 Chemical structure of astragaloside

1.3 สารเคมีและตัวทำละลาย

สารเคมี

Ethanol AR (RCI Labscan Limited, Thailand), ethyl acetate AR (Fisher Scientific, UK), n-hexane AR (RCI Labscan Limited, Thailand), n-butanol AR (RCI Labscan Limited, Thailand), formic acid (Merck, Germany), acetic acid, glacial (Merck, Germany), absolute ethanol (RCI Labscan Limited, Thailand), methanol AR (RCI Labscan Limited, Thailand), และน้ำกลั่น (distilled water)

สารละลาย

สารละลาย NP เตรียมโดยละลาย diphenylboric acid-2-aminoethyl ester จำนวน 1 กรัม ใน methanol 100 มิลลิลิตร^[14]

สารละลาย PEG เตรียมโดยละลาย polyethylene glycol 4000 จำนวน 5 กรัม ใน ethanol 100 มิลลิลิตร^[14]

1.4 วัสดุวิทยาศาสตร์และเครื่องแก้ว

HPTLC Silica gel 60F₂₅₄ Glass plate ขนาด 20x10 เซนติเมตร No.1056420001 (Merck, Germany), Nylon filter syringe ขนาด 0.2 ไมโครเมตร, กระดาษกรองเบอร์ 4 (Whatman, UK), เครื่องแก้ว

และ micropipette

1.5 เครื่องมือ

ตู้อบร้อนไฟฟ้ารุ่น UL-50 (Memmert), เครื่องบดป่น รุ่น RT 34 (ChyunTseh Industrial), เครื่องแรง รุ่น AS 200 Basic (Retsch), แร่งที่มีขนาดช่อง 180 ไมโครเมตร (Endocott), เครื่องระเหยสุญญากาศ ประกอบด้วย rotavapor รุ่น N-1000 (Eyela) และอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิรุ่น SB-1000 (Eyela), เครื่องทำสุญญากาศรุ่น A-3S (Eyela) และเครื่องทำน้ำเย็นหมุนเวียน รุ่น CA-101 (Eyela), ชุดเครื่อง TLC densitometer ประกอบด้วยเครื่องฟั่นสารตัวอย่าง (Automatic TLC Sampler 4), ถังแก้วสำหรับแยกสาร (TLC chamber ขนาด 10 x 20 เซนติเมตร) ยี่ห้อ CAMAG, เครื่องถ่ายภาพโครมาโตกราฟี (TLC Digital camera รุ่น TLC Visualizer 2) และ เครื่องตรวจอ่านแผ่น TLC (TLC Scanner 3) ยี่ห้อ CAMAG และเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น XT 220A (Precisa)

2. วิธีการศึกษา

2.1 การศึกษาหาสภาวะของระบบโครมาโตกราฟี

2.1.1 การเตรียมสารมาตรฐาน

เตรียมสารละลายสารมาตรฐาน astragaloside ความเข้มข้น 0.80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำสารละลายสารมาตรฐานที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีชนิดผิวบางสมรรถนะสูง

2.1.2 การเตรียมสารสกัดเอทานอลจากใบมะรุม

นำตัวอย่างใบมะรุมสดมาตัดแยกเอาเฉพาะใบ นำมาล้างด้วยน้ำให้สะอาด ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องพอหมาด ๆ และอบให้แห้งด้วยตู้

อบร้อนไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 45°C นาน 72 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่แห้งไปบดเป็นผงหยาบ ผ่านร่อนขนาด 180 ไมโครเมตร แล้วเก็บสมุนไพรรักษาในขวดแก้วสีชาที่มีฝาปิดสนิท ปิดฉลากระบุชื่อสมุนไพรรักษา ปริมาณ และวันที่เตรียมตัวอย่าง เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

นำผงสมุนไพรรักษาปริมาณ 50 กรัม มาสกัด

ด้วยเอทานอลโดยวิธีรีฟลักซ์ (reflux) แล้วนำไประเหยให้ตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศโดยใช้อุณหภูมิ 45°C ได้สารสกัดเอทานอลจากใบมะรุม ซึ่งมีลักษณะเป็นสารสกัดสีเขียวเข้ม กลิ่นเฉพาะตัว เพื่อนำมาศึกษาปริมาณสารสำคัญในขั้นตอนต่อไป (ลักษณะตัวอย่างดังแสดงตาม (Figure 2))



Figure 2 Dried drumstick tree leaves powder (*Moringa oleifera* Lam.), and drumstick tree leaves ethanolic extracts.

2.1.3 การเตรียมสารละลายสารสกัดเอทานอลจากใบมะรุม

ละลายสารสกัดเอทานอลจากใบมะรุม น้ำหนัก 100 มิลลิกรัม ด้วยเอทานอลและปรับปริมาตรด้วยเอทานอลจนครบ 25.0 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดแก้ววัดปริมาตร (volumetric flask) นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง TLC densitometer

2.1.4 การศึกษาชนิดและสัดส่วนของวิธภาคเคลื่อนที่

การศึกษานี้โดยพิจารณาจากความสามารถในการแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารในสารละลายตัวอย่างสารสกัดเอทานอลจากใบมะรุม และค่า R_F ที่เหมาะสมของ astragalin ในสารละลายตัวอย่างสารสกัดเอทานอลจากใบมะรุม

เตรียมวิธภาคเคลื่อนที่โดยผสมบิวทานอล (n-butanol), กรดแกลเซียลแอซิดิก และน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 6:3:1 และสารละลายผสมของเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate), กรดฟอร์มิก (formic acid), กรดแกลเซียลแอซิดิก (acetic acid, glacial) และน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 20:1:1:2 นำมาใส่ใน tank ที่ว่างอย่างน้อย 1-2 ชั่วโมง เพื่อให้บรรยากาศใน tank อิ่มตัว

2.1.5 การตรวจหาสารฟลาโวนอยด์ (flavonoids detection)

นำแผ่นเคลือบซิลิกาเจลไปพ่นด้วยสารละลายทดสอบ NP/PEG โดยมีเทคนิคดังนี้ นำแผ่นเคลือบซิลิกาเจลไปทำให้ร้อนที่อุณหภูมิ 80°C นาน 10 นาที จากนั้นพ่นด้วยสารละลาย NP ขณะที่แผ่นเคลือบซิลิกาเจลยังร้อน แล้วพ่นทับด้วย

สารละลาย PEG ทิ้งไว้ให้แห้งในอากาศและสังเกตผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร

2.2 การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

ทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ astragalin ในสารสกัดเอทานอลจากใบมะรุมที่พัฒนาขึ้นตามแนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดี่ยว กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข^[15]

2.2.1 การทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) และช่วงการวิเคราะห์ (range)

ซึ่งสารมาตรฐาน astragalin น้ำหนัก 10 มิลลิกรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยเมทานอลจนครบ 50.0 มิลลิลิตร ในขวดแก้ววัดปริมาตร จะได้สารละลายมาตรฐานเข้มข้นของสารมาตรฐาน astragalin ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางให้ได้ 6 ระดับความเข้มข้น ตามลำดับในขวดแก้ววัดปริมาตร ขนาด 25.0 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอล จะได้ 6 ระดับความเข้มข้น คือ 1.96, 3.92, 5.88, 7.84, 9.80 และ 11.76 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

นำสารละลายตัวอย่างสารสกัดและสารละลายสารมาตรฐาน astragalin มาสปีดบนแผ่นเคลือบซิลิกาเจลในแนวระดับเดียวกัน ให้เป็นแถบ (band) ขนาด 6×0.45 มิลลิเมตร ด้วยเครื่อง Autosampler โดยสปีดสารละลายตัวอย่างสารสกัด จำนวน 1 แถบ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร (วิเคราะห์ 3 ซ้ำ) และสารละลายสารมาตรฐาน 6 ระดับความเข้มข้น ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ตามลำดับ (ทุกระดับความเข้มข้นวิเคราะห์ 3 ซ้ำ) โดยให้ห่างจากขอบล่างประมาณ 1.5 เซนติเมตร และให้มีระยะห่างระหว่างสารละลายแต่ละชนิดไม่น้อยกว่า 0.5 เซนติเมตร จาก

นั้นนำแผ่นเคลือบซิลิกาเจลดังกล่าวมาจุ่มลงใน tank ซึ่งอ้อมตัวด้วยวัสดุภาควัสดุเคลือบที่ซึ่งเป็นสารละลายผสมของเอทิลอะซิเตท กรดฟอร์มิก กรดแกลซีลแอซิดิก และน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 20:1:1:2 รองจุ่มวัสดุเคลือบที่เป็นระยะทาง 8 เซนติเมตร จึงนำแผ่นเคลือบซิลิกาเจลออก ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้แห้ง แล้วจึงนำแผ่นเคลือบซิลิกาเจลไปพ่นด้วยสารละลายทดสอบ NP/PEG โดยมีเทคนิคดังนี้ นำแผ่นเคลือบซิลิกาเจลไปทำให้ร้อนที่อุณหภูมิ 80°C นาน 10 นาที จากนั้นพ่นด้วยสารละลายทดสอบ NP ขณะที่แผ่นเคลือบซิลิกาเจลยังร้อน แล้วพ่นทับด้วยสารละลายทดสอบ PEG ทิ้งไว้ให้แห้งในอากาศและสังเกตผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร (Figure 3) และนำมาอ่านแผ่นด้วยเครื่องตรวจอ่านแผ่นโครมาโทกราฟีผิวบาง ด้วยโปรแกรม Vision-CATS จากเครื่องตรวจอ่านแผ่น TLC นำค่าพื้นที่ใต้พีค (area under curve, AUC) ที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน จะได้กราฟมาตรฐาน (standard curve) จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณ astragalin ในสารละลายตัวอย่างสารสกัดเอทานอลจากใบมะรุม โดยนำค่าพื้นที่ใต้พีคที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐาน (Figure 4)

2.2.2 การทดสอบหาร้อยละของการคืนกลับ (% recovery) และความเที่ยง (precision)

เตรียม sample blank (sample blank คือ ตัวอย่างสารสกัดใบมะรุมที่นำมาตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ astragalin แล้วมีปริมาณสาร astragalin ในปริมาณต่ำ ๆ) โดยละลายสารสกัดเอทานอลจากใบมะรุม น้ำหนัก 100 มิลลิกรัม ด้วยเอทานอลและปรับปริมาตรด้วยเอทานอลจนครบ 25.0 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดแก้ววัดปริมาตร นำสารละลายตัวอย่างสาร

สกัดที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีชนิด
ผิวบางสมรรถนะสูงจำนวน 6 ซ้ำ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย
(mean)

เตรียม spiked sample ลงใน sample blank
โดยเติมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 3 ระดับ
ระดับ 3 ซ้ำ นิดซ้ำละ 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

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

เมื่อ C_1 คือ ความเข้มข้นของสารใน spiked
sample

$$\text{LOD } (\mu\text{g/mL}), \text{ ค่าประมาณ} = 3 \times \sigma/S$$

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

เตรียมสารละลายตัวอย่างสารสกัดเอทานอล
จากใบมะรุม โดยละลายสารสกัดเอทานอลจากใบ
มะรุม น้ำหนัก 100 มิลลิกรัม ด้วยเอทานอลและปรับ
ปริมาตรด้วยเอทานอลจนครบ 25.0 มิลลิลิตร โดยใช้
ขวดแก้ววัดปริมาตร

เตรียมสารละลาย spiked sample ให้มีความ

$$\text{LOQ } (\mu\text{g/mL}), \text{ ค่าประมาณ} = 10 \times \sigma/S$$

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

C_2 คือ ความเข้มข้นของสารใน sample

blank

C_3 คือ ความเข้มข้นของสารที่เติม

การทดสอบความเที่ยง

Repeatability วิเคราะห์ปริมาณสาร astragalin ในตัวอย่างสารสกัดเอทานอลจากใบมะรุม ซ้ำ 6 ครั้งในวันเดียวกัน คำนวณค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD)

Intermediate precision วิเคราะห์ปริมาณสาร astragalin ในตัวอย่างสารสกัดใบมะรุมเป็นเวลา 3 วัน วันละ 6 ซ้ำ คำนวณค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

2.2.3 การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจ

พบ (limit of detection, LOD)

คำนวณค่าประมาณ (estimated) ของ LOD จากกราฟมาตรฐาน ดังนี้

เข้มข้นใกล้เคียงกับค่าประมาณของ LOD แล้วตรวจวิเคราะห์ปริมาณ astragalin ใน spiked sample 6 ซ้ำ

2.2.4 การทดสอบขีดจำกัดของการวัดเชิง

ปริมาณ (limit of quantitation, LOQ)

คำนวณค่าประมาณของ LOQ จากกราฟมาตรฐาน ดังนี้

เตรียมสารละลาย spiked sample ให้มีความเข้มข้นใกล้เคียงกับค่าประมาณของ LOQ แล้วตรวจวิเคราะห์ปริมาณ astragalin ใน spiked sample 6 ซ้ำ คำนวณค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ และค่าร้อยละของการคืนกลับ

2.2.5 การทดสอบความจำเพาะ (specificity)

หยดสารละลายสารมาตรฐาน astragalin ความเข้มข้น 0.80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และสารละลายตัวอย่างสารสกัดเอทานอลจากใบมะรุม เพื่อตรวจสอบการแยกองค์ประกอบทางเคมีของสาร และค่า R_F ที่เหมาะสมของ astragalin ในสารละลายตัวอย่างสารสกัดเอทานอลจากใบมะรุม

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณ astragalin ในสารสกัดเอทานอลจากใบมะรุม

2.3.1 การเตรียมสารละลายตัวอย่างสารสกัดเอทานอลจากใบมะรุม

นำผงสมุนไพรใบมะรุม จำนวน 50 กรัม

มาสกัดด้วยเอทานอลโดยวิธีฟลักซ์ แล้วนำไปประเหยให้ตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศที่อุณหภูมิ 45 °C ได้สารสกัดเอทานอลจากใบมะรุม ละลายสารสกัดเอทานอลจากใบมะรุม น้ำหนัก 100 มิลลิกรัม ด้วยเอทานอลและปรับปริมาตรด้วยเอทานอลจนครบ 25.0 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดแก้ววัดปริมาตร นำสารละลายตัวอย่างสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีชนิดผิวบางสมรรถนะสูง

วิเคราะห์ปริมาณ astragalin ในตัวอย่างสารสกัดใบมะรุม จำนวน 12 ตัวอย่าง ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น โดยที่แต่ละตัวอย่างให้วิเคราะห์ 3 ซ้ำ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย (Mean)

การคำนวณความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ในตัวอย่างสารสกัดเอทานอลจากใบมะรุม (ร้อยละ โดยน้ำหนักตัวอย่างสารสกัดเอทานอลจากใบมะรุม, % w/w)

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

เมื่อ C_0 คือ ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ที่คำนวณได้จากกราฟมาตรฐาน

CS คือ ปริมาณร้อยละโดยน้ำหนักของสาร astragalin ในสารสกัดมะรุม

ผลการศึกษา

1. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ astragalin ในสารสกัดเอทานอลจากใบมะรุม

1.1 การศึกษาหาสภาวะของระบบโครมาโทกราฟี

หลังจากนำสารละลายสารมาตรฐานของ astragalin และสารละลายสารสกัดเอทานอลจากใบมะรุม ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีชนิด

ผิวบางสมรรถนะสูง พบว่าอัตราส่วนส่วนผสมตัวทำละลายที่ทำให้เกิดการแยกสารได้ดี และเหมาะสมในการแยกสาร astragalin คือเอทิลอะซิเตท, กรดฟอร์มิก, กรดแกลเชียลแอซีติก และน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 20:1:1:2 (Figure 3)

1.2 การศึกษาชนิดและสัดส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่

วัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่าสัดส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ทำให้การแยกองค์ประกอบทางเคมีของสาร

ในสารละลายสารสกัดเอทานอลจากใบมะรุมและค่า R_F ที่เหมาะสมของ astragalin ในสารละลายสารสกัดเอทานอลจากใบมะรุม คือ สารละลายผสมของ

เอทิลอะซิเตท:กรดฟอร์มิก:กรดแกลเลียลแอซีติก: น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 20:1:1:2 (v/v/v/v) (Figure 3)

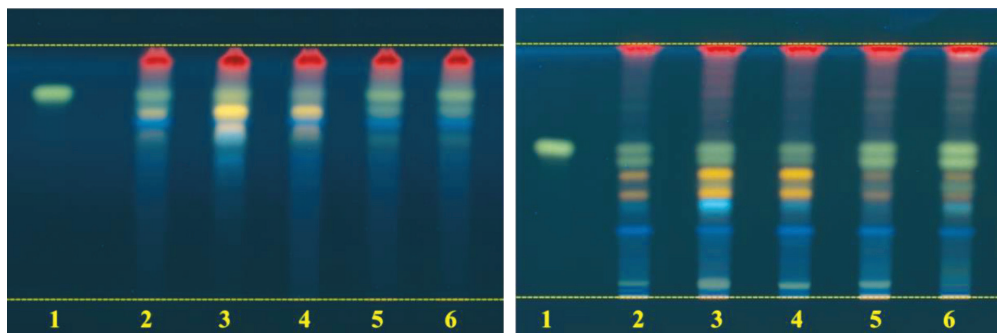


Figure 3 Chromatogram of standard astragalin (Track 1) and samples (Track 2, 3, 4, 5 and 6) after derivatized with NP/PEG solution and observed under UV 366 nm. The plate was developed with n-butanol, glacial acetic acid and distilled water in a ratio of 6: 3: 1 (v/v/v) and ethyl acetate, formic acid, glacial acetic acid and distilled water in a ratio of 20: 1: 1: 2 (v/v/v/v) in system1 and system 2, respectively.

2. การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

2.1 การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์

จากกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายสารมาตรฐาน

astragalin และพื้นที่ใต้พีค พบว่าความเข้มข้นของสารละลายสารมาตรฐาน astragalin กับพื้นที่ใต้พีคมีลักษณะเป็นเส้นตรง ในช่วงความเข้มข้น 1.96-11.76 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9996 (Figure 4)

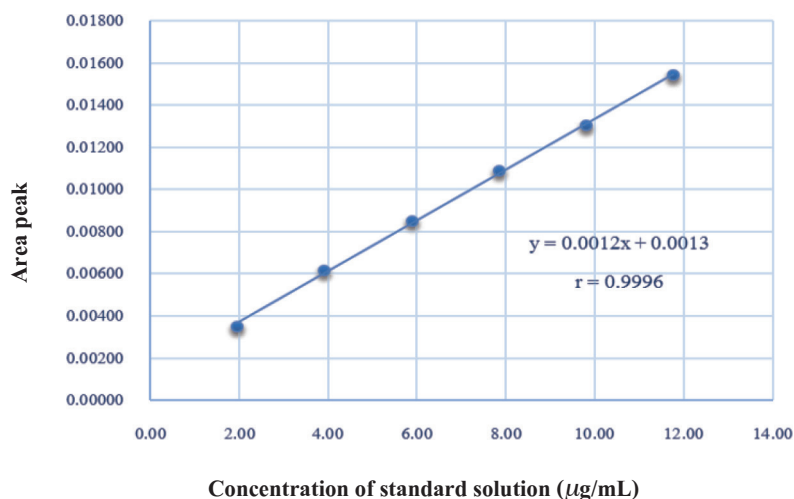


Figure 4 Calibration curve of astragalin concentration range of 1.96–11.76 μg/mL

2.2 การทดสอบร้อยละของการคืนกลับและความเที่ยง

เมื่อเติมสารละลายสารมาตรฐาน astragalin ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ จำนวน 3 ช่วงระดับการใช้งาน แล้ววิเคราะห์ตัวอย่าง unspiked sample พบว่ามีปริมาณ astragalin เท่ากับ 1.1474 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (คิดเป็นร้อยละ 0.0284 โดยน้ำหนัก)

การคำนวณ

Sample blank ที่วิเคราะห์ได้ มีปริมาณความ

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

ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ

C_1 คือ ความเข้มข้นของสารใน spiked sample เท่ากับ 1.4380 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

C_2 คือ ความเข้มข้นของสารใน sample blank เท่ากับ 1.1474 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

C_3 คือ ความเข้มข้นของสารที่เติม เท่ากับ 0.3015 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

$$\begin{aligned} \% \text{ recovery} &= (1.4380 - 1.1474) \times 100 / 0.3015 \\ &= 96.38 \end{aligned}$$

เมื่อวิเคราะห์ระดับละ 3 ซ้ำ ซัดซ้ำละ 2 ครั้ง จะได้ $\% \text{ recovery} = 97.75 \pm 1.50$ และ $\% \text{ RSD} = 1.54$ ในขณะที่เกี่ยวกับการคำนวณร้อยละของการคืนกลับที่ระดับความเข้มข้นระดับกลางและระดับสูง จะคำนวณเหมือนกันกับระดับความเข้มข้นต่ำ แต่จะต่างกันเฉพาะค่า C_1 และ C_3 และผลการวิเคราะห์ spiked sample พบว่าร้อยละของการคืนกลับของสาร astragalin อยู่ในช่วงร้อยละ 97.75-99.49 (Table 1)

เข้มข้นของแอสทรากาลินเฉลี่ย 1.1474 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (แทนค่าพื้นที่ใต้พีคของแอสทรากาลินที่ค่า y จากสมการเส้นตรง $y = 0.0012x + 0.0013$ จะได้ค่า x คือ ปริมาณความเข้มข้นของแอสทรากาลินที่คำนวณได้)

ความเข้มข้นของแอสทรากาลินใน sample blank (% w/w) โดยน้ำหนักของสารสกัดใบมะรุม

$$\begin{aligned} &\text{เท่ากับ } (1.1474 \mu\text{g/mL}) \times (25 \text{ mL}) \times 1 \times 100 / \\ &\text{น้ำหนักสารสกัดใบมะรุม } 0.1010 \mu\text{g} / 1,000,000 = \\ &0.0284\% \text{ w/w} \end{aligned}$$

การทดสอบความเที่ยง

การทดสอบความเที่ยง (repeatability) และ intermediate precision, between-day โดยวิเคราะห์ปริมาณสาร astragalin ในตัวอย่างสารละลายสารสกัดเอทานอลจากใบมะรุม จำนวน 6 ซ้ำ นำค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานมาหาค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) พบว่า มีค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับร้อยละ 0.22 และ 0.45 ตามลำดับ (Table 2)

Table 1 Results of percentage recovery and repeatability.

Analyzed substance	Sample blank ($\mu\text{g/mL}$)	Spike level (%)	Spike concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Astragalin content ($\mu\text{g/mL}$)		%Recovery Mean $\pm$ SD (n = 6)	%RSD (n = 6)
				Theoretical	Found (Average)		
Astragalin	1.1474	50	0.1508	1.2982	1.2690	97.75 $\pm$ 1.50	1.54
		100	0.3015	1.4489	1.4415	99.49 $\pm$ 1.59	1.60
		150	0.6300	1.7774	1.7477	98.33 $\pm$ 0.88	0.89

%Recovery acceptance criteria according to AOAC Peer-verified methods program on policies and procedures, Arlington, VA, USA (1998) is 95–105%

Table 2 Results of repeatability (%RSD) and intermediate precision (%RSD).

Analyzed substance	Repeatability (n = 6)		Intermediate precision between days (n = 6)	
	Mean	S.D.	Mean	S.D.
Astragalin	5.0798	0.0133	5.3177	0.0232
% RSD	0.22		0.45	

2.3 การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection; LOD) และขีดจำกัดของการหาปริมาณ (limit of quantitation; LOQ)

จากกราฟมาตรฐานสามารถหาค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ และขีดจำกัดของการหาปริมาณ โดย

คำนวณจากค่า $3\sigma/S$ และ $10\sigma/S$ โดย พบว่า LOD และ LOQ ของการวิเคราะห์ astragalin มีค่าเท่ากับ 0.313 และ 1.045 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (คิดเป็น 0.313 และ 1.045 ng/band) ตามลำดับ

การคำนวณค่าประมาณของ LOD และ LOQ จากกราฟมาตรฐาน

$$\text{LOD } (\mu\text{g/mL}), \text{ ค่าประมาณ} = 3 \times \sigma / S$$

$$\text{โดย } \sigma = 0.000126 \text{ และ } S = 0.001206$$

$$\text{LOD } (\mu\text{g/mL}), \text{ ค่าประมาณ} = (3 \times 0.000126) / 0.001206 = 0.313 \mu\text{g/mL}$$

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

$$= 0.313 \times 25 \times 1 \times 100 / 1,000,000 / 0.1010$$

$$= 0.008$$

พบว่า LOD ของการวิเคราะห์ astragalin เท่ากับร้อยละ 0.008 โดยน้ำหนักของสารสกัดเอทานอลจากใบมะรุ้ม (Table 3)

$$\text{LOQ } (\mu\text{g/mL}), \text{ ค่าประมาณ} = 10 \times \sigma/S$$

$$\text{โดย } \sigma = 0.000126 \text{ และ } S = 0.001206$$

$$\begin{aligned} \text{LOQ } (\mu\text{g/mL}), \text{ ค่าประมาณ} &= (10 \times 0.000126)/0.001206 \\ &= 1.045 \mu\text{g/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{LOQ } (\% \text{ w/w}), \text{ ค่าประมาณ} &= \frac{\text{LOD } (\mu\text{g/mL}) \times \text{ปริมาตรที่เตรียม (mL)} \times \text{ระดับเจือจาง} \times 100}{1,000,000 \times \text{น้ำหนักตัวอย่าง } (\mu\text{g})} \\ &= 1.045 \times 25 \times 1 \times 100/1,000,000/0.1010 \\ &= 0.026 \end{aligned}$$

พบว่า LOQ ของการวิเคราะห์ astragalin เท่ากับร้อยละ 0.026 โดยน้ำหนักของสารสกัดเอทานอลจากใบมะรุ้ม

การทดสอบเพื่อยืนยันผลขีดจำกัดของการหาปริมาณ (limit of quantitation; LOQ) โดยนำ un-

spiked sample มาเติม Astragalin ที่ระดับความเข้มข้นที่เป็นขีดจำกัดของการหาปริมาณ (LOQ) วิเคราะห์ปริมาณ astragalin ใน spiked sample โดยทำการทดลอง 6 ซ้ำ แล้วคำนวณร้อยละของการคืนกลับ

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

ที่ความเข้มข้นของ LOQ เท่ากับ 1.045 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

C_1 คือ ความเข้มข้นของสารใน spiked sample เท่ากับ 1.2256 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

C_2 คือ ความเข้มข้นของสารใน sample blank เท่ากับ 1.1474 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

C_3 คือ ความเข้มข้นของสารที่เติม เท่ากับ 0.0804 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

$$\% \text{ recovery} = (1.2256 - 1.1474) \times 100/0.0804 = 97.33$$

พบว่า ร้อยละการคืนกลับของ astragalin ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับค่า LOQ มีร้อยละการคืนกลับ (%)

recovery) และค่าความเที่ยง (% RSD) เป็น 97.84 ± 1.92 และ 1.97 ตามลำดับ (Table 4)

Table 3 Results of limit of detection

Analyzed substances	Spiked sample ($\mu\text{g/mL}$)	LOD (% w/w)	% Recovery of LOD (n = 6)	% Recovery of LOD (Mean $\pm$ S.D.)	% RSD
Astragalin	0.0284	0.008	104.93 98.09 101.51 98.09 108.35 104.93	102.65 $\pm$ 4.14	4.04

Table 4 Results of limit of quantitation

Analyzed substances	Spiked sample ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ (% w/w)	% Recovery of LOQ (n = 6)	% Recovery of LOQ (Mean $\pm$ SD)	% RSD
Astragalin	0.0804	0.026	97.33 98.36 95.27 100.41 96.30 99.38	97.84 $\pm$ 1.92	1.97

2.4 การทดสอบความจำเพาะ

จากการพ่นสารละลายสารมาตรฐานและสารละลายสารสกัดเอทานอลจากใบมะรุ้ม พบว่าภายใต้สภาวะโครมาโทกราฟีผิวบางที่พัฒนาขึ้น สามารถ

แยกสาร astragalin และองค์ประกอบทางเคมีของสารในสารละลายสารสกัดเอทานอลจากใบมะรุ้มออกจากกันได้ โดยมีค่า R_F เหลือเท่ากับ 55 (Figure 5)

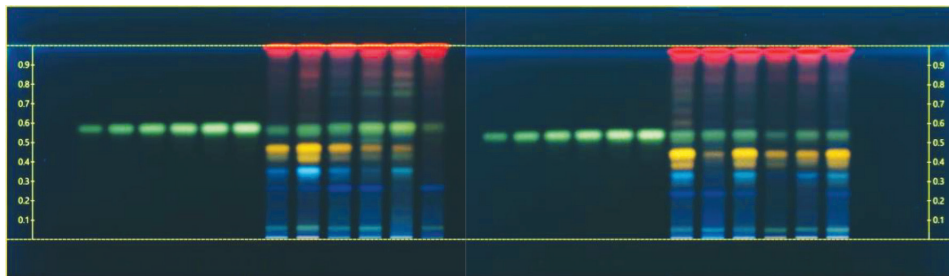


Figure 5 Chromatogram of 12 samples of Drumstick tree leaf extract solutions (tracks 7 – 12 and 13 – 18) compared with standard astragalin 6 concentrations (tracks 1 – 6). The samples were examined under ultraviolet light at 366 nm after spraying with NP/PEG solution.

3. การวิเคราะห์ปริมาณ astragalin ในสารสกัดเอทานอลจากใบมะรุม

ผลการวิเคราะห์ปริมาณ astragalin ในตัวอย่างสารละลายสารสกัดเอทานอลจากใบมะรุม จำนวน 12

ตัวอย่าง พบว่าปริมาณ astragalin มีค่าเฉลี่ยร้อยละ 0.06 โดยน้ำหนักของสารสกัดเอทานอลจากใบมะรุม (Table 5)

Table 5 Astragalin contents in Drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves ethanolic extracts sample solution by HPTLC densitometry.

Sample	Sample code	Sample weight (g)	The concentration of astragalin is calculated from a linear equation of calibration curve ($\mu\text{g/mL}$)	Astragalin content (% w/w)
1	MOLE 1	0.1040	1.52	0.04
2	MOLE 2	0.1096	3.13	0.07
3	MOLE 3	0.1029	2.55	0.06
4	MOLE 4	0.1028	4.76	0.12
5	MOLE 5	0.1077	7.12	0.17
6	MOLE 6	0.1083	1.03	0.02
7	MOLE 7	0.1067	2.52	0.06
8	MOLE 8	0.1054	1.90	0.05
9	MOLE 9	0.1091	2.13	0.05
10	MOLE 10	0.1068	0.35	0.01
11	MOLE 11	0.1055	1.68	0.04
12	MOLE 12	0.1053	1.60	0.04
Mean				0.06

อภิปรายผล

ใบมะรุมเป็นสมุนไพรที่มีศักยภาพเชิงพาณิชย์และมีประโยชน์ทั้งเป็นยาและเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพ แต่ยังไม่มีการกำหนดปริมาณสารสำคัญเพื่อใช้สำหรับควบคุมคุณภาพสมุนไพรชนิดนี้ มีรายงานการศึกษาฤทธิ์เคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าสารสกัดของใบมะรุมมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ เช่น ฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งลำไส้ ฤทธิ์ต่อการสลายไขมันในเซลล์ไขมันจากหนูขาว ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ยับยั้งการอักเสบเหนี่ยวนำของปอด ส่วน isoquercetin

และ astragalin มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบทางด้านผิวหนัง และมีรายงานผลการศึกษาศาสตร์ที่แยกได้จากใบมะรุม พบว่ามีสารประกอบที่สำคัญ 3 ชนิด ซึ่งเป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ได้แก่ crypto-chlorogenic acid isoquercetin และ astragalin

ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสาร astragalin ในสารสกัดเอทานอลจากใบมะรุมด้วยวิธีโครมาโทกราฟีชนิดผิวบางสมรรถนะสูงนั้น เมื่อนำสารละลายตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องเดนซิโตมิเตอร์แล้ว

สังเกตผลภายใต้แสง UV 366 nm ภายหลังการพ่นเฟลทด้วยน้ำยา NP/PEG ซึ่งเป็นน้ำยาที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ โดยจะสังเกตการเรืองแสงสีเขียวของ astragalin ได้

การศึกษาระบบที่เหมาะสมในการแยก พบว่าอัตราส่วนส่วนผสมของตัวทำละลาย บิวทานอล กรดกลูเซอิลแอซีติก และน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 6:3:1 (v/v/v) นั้นมีการแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารในตัวอย่างสารสกัดใบมะรุมได้ดี เนื่องจากระบบที่ใช้แยกมีความมีขั้วสูงจนเกินไป ทำให้องค์ประกอบทางเคมีเคลื่อนที่ได้รวดเร็ว และไม่เกิดการแยกที่สมบูรณ์ แต่เมื่อลดความมีขั้วลง โดยเปลี่ยนส่วนผสมของตัวทำละลายเป็นเอทิลอะซิเตท กรดฟอร์มิก กรดกลูเซอิลแอซีติก และน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 20:1:1:2 (v/v/v/v) แล้ว จะทำให้เกิดการแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารได้ดีกว่าและเหมาะสมในการแยกสาร astragalin ออกจากองค์ประกอบทางเคมีอื่น ๆ

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ดังกล่าว พบว่ากราฟมาตรฐานของ astragalin มีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 1.96-11.76 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9996 ร้อยละของการคืนกลับของสาร astragalin อยู่ในช่วงร้อยละ 97.75-99.49 มีขีดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ เท่ากับ 0.313 และ 1.045 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ การทดสอบความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์โดยคำนวณค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบน (%RSD) พบว่า มีค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 1.97 การทดสอบความแม่นยำของวิธีโดยคำนวณจากค่าร้อยละของการคืนกลับ (% recovery) พบว่า ร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วงร้อยละ 95.27-100.41 ปริมาณสาร astragalin ในตัวอย่างสารสกัดใบมะรุม จำนวน 12 ตัวอย่าง มีค่า

เฉลี่ยร้อยละ 0.06 โดยน้ำหนักของสารสกัดใบมะรุม พบว่า สารสกัดมะรุมจากภาคใต้มีปริมาณ astragalin สูงเมื่อเทียบกับภูมิภาคอื่น โดยสารสกัดใบมะรุมจากจังหวัดสุราษฎร์ธานีและตรังมีปริมาณ Astragalin สูงถึงร้อยละ 0.12 และ 0.17 ตามลำดับ และพบว่า สารสกัดใบมะรุม 6 ตัวอย่าง มีปริมาณ astragalin ต่ำกว่าค่าเฉลี่ย ในการศึกษาครั้งนี้อาจมีข้อจำกัดด้านระยะเวลาในการวิจัย ทำให้จำนวนตัวอย่างที่นำมาศึกษาในครั้งนี้มีน้อยยังมีแหล่งไม่มากพอที่จะเป็นตัวแทนของทั้งประเทศ หากต้องการกำหนดเป็นค่ามาตรฐานจึงควรเก็บตัวอย่างเพิ่มเติมให้ครอบคลุมและเป็นตัวแทนของกลุ่มตัวอย่าง อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาที่มีรายงานมา พบว่า วิธีที่พัฒนาขึ้นมีการใช้วัสดุภาคเคลื่อนที่ที่มีความปลอดภัยต่อผู้วิเคราะห์มากกว่า เนื่องจากมีการใช้กรดฟอร์มิก กรดกลูเซอิลแอซีติก ที่ลดลง นอกจากนี้ พบว่า วิธีที่พัฒนาขึ้นมีขีดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณที่ต่ำกว่า โดย ขีดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณของวิธีที่เคยมีรายงานพบว่ามีขีดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณของสาร astragalin เป็น 10.84 และ 36.13 ng/band ในขณะที่วิธีที่พัฒนาขึ้นมีค่าเท่ากับ 0.313 และ 1.046 ng/band นอกจากนี้ยังมีค่าประสิทธิภาพที่ใช้ในการแยก (resolution) ที่ดี สามารถแยกแถบของ astragalin ออกจากแถบของสารอื่นได้ดี นอกจากนี้วิธีโครมาโทกราฟีชนิดผิวบางสมรรถนะสูงที่มีการพัฒนาเพื่อให้มีประสิทธิภาพการแยกสารความไวในการแยกสารที่ดีขึ้น ใช้วัสดุภาคเคลื่อนที่น้อยลง วัสดุภาคอยู่กับที่คือแผ่น HPTLC มีราคาถูกสามารถเห็นผลการวิเคราะห์ได้ในคราวเดียวกัน ไม่ยุ่งยากในการตรวจวิเคราะห์ คือ เมื่อนำวิธีวิเคราะห์ปริมาณ astragalin ในสารสกัดเอทานอลจากใบ

มะรุมด้วยวิธีโครมาโทกราฟีชนิดผิวบางสมรรถนะสูงที่พัฒนาขึ้นมาใหม่เปรียบเทียบกับ การหาปริมาณด้วยวิธี HPLC พบว่าการหาปริมาณสาร astragalin ในใบมะรุมด้วยวิธี HPLC นี้ มีขั้นตอนการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ค่อนข้างยุ่งยาก ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน 40 นาที วัตถุประสงค์ที่คือคอลัมน์มีราคาแพง ดังนั้นจึงเลือกใช้เครื่องโครมาโทกราฟีชนิดผิวบางสมรรถนะสูงในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ astragalin ในสารสกัดเอทานอลจากใบมะรุม จากการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ astragalin ที่พัฒนาขึ้น พบว่าร้อยละของการคืนกลับจากการวิเคราะห์ spiked sample อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (95-105%) ซึ่งแสดงถึงความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น วิธีดังกล่าวจึงมีความเหมาะสม สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสาร astragalin เพื่อใช้เป็นแนวทางในการควบคุมคุณภาพสารสำคัญของวัตถุดิบใบมะรุม และสารสกัดใบมะรุมต่อไปได้

ข้อสรุป

การศึกษานี้ได้พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ astragalin ในสารสกัดเอทานอลจากใบมะรุมด้วยวิธีโครมาโทกราฟีชนิดผิวบางสมรรถนะสูงและทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความถูกต้องแม่นยำ สะดวก และประหยัดสารเคมีที่ใช้ในวัฏภาคเคลื่อนที่ จึงนำวิธีที่ได้มาตรวจปริมาณ astragalin ในตัวอย่างสารสกัดใบมะรุมจากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความเหมาะสม สามารถนำไปใช้เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์ปริมาณ astragalin ในสารสกัดเอทานอลจากใบมะรุมและสามารถนำไปสู่การกำหนดเกณฑ์ปริมาณสารสำคัญในสารสกัดใบมะรุมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่สนับสนุนงบประมาณในการศึกษานี้ ห้องปฏิบัติการฟิสิกส์และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการวิจัยเพื่อแยกสารสำคัญจากสมุนไพรทุกท่าน ที่ทำให้การศึกษานี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

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. Bangkok: Prachachon Co., Ltd.; 2001. p.366. (in Thai)
2. Chayamarit C. Key characters of plant families. Bangkok: Agricultural Cooperative Printing Federation of Thailand Co., Ltd; 2005. (in Thai)
3. Lianli L, Olson ME. Moringaceae. In Raven PH, AlShehbaz I, Zhu G. Flora of China. Missouri: Botanical Garden Press; 2001;8:196.
4. Supaporn P, Supap S, Usanee V, Kanokporn S. Antiproliferative effect of *Moringa oleifera* Lam. and *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk extracts on the colon cancer cells. Journal of Medicinal Plants Research. 2012;6(1):139-45.
5. Vongsak B, Sithisarn P, Gritsanapan W. Simultaneous HPLC quantitative analysis of active compounds in leaves of *Moringa oleifera* Lam. Journal of Chromatographic Science. 2014;52(7):641-5.
6. Auayporn A, Perayot P, Nopparat N, Penpun W. Effect of *Moringa oleifera* ethanolic leaf extract on VEGF expression in colon cancer (HT 29) cells. This research is financially supported by Silpakorn University Research and Development Institute. Faculty of Pharmacy, Silpakorn University; 2016.
7. Nakatani N, Kayano S, Kikuzaki H, Sumino K, Katagiri K, Mitani T. Identification, quantitative determination, and antioxidative activities of chlorogenic acid isomer in prune (*Prunus domestica* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2000;48(11):5512-6.
8. Rodriguez de Sotillo DV, Hadley M. Chlorogenic acid modifies plasma and liver concentrations of cholesterol, triacylglycerol, and minerals in (fa/fa) Zucker rats. Jour-

- nal of Nutritional Biochemistry. 2002;13(12):717-26.
9. Zhang X, Huang H, Yang T, Ye Y, Shan J, Yin Z. Chlorogenic acid protects mice against lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Injury*. 2010;41(7):746-52.
 10. Cho AS, Jeon SM, Kim MJ, Yeo J, Seo KI, Choi MS. Chlorogenic acid exhibits anti-obesity and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. *Food and Chemical Toxicology*. 2010;48(3):937-43.
 11. Kotani M, Matsumoto M, Fujita A, Higa S, Wang W, Sue-mura M. Persimmon leaf extract and astragalin inhibit development of dermatitis and IgE elevation in NC/Nga mice. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2000; 106(1): 159-66.
 12. Soromou LW, Chen N, Jiang L, Huo M, Wei M, Chu X. Astragalin attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses by down-regulating NF-kappaB signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2012; 419(2): 256-61.
 13. Wongsinkongman P, Thongchin T, Shuayprom A, Ontong S, Niumsukul S, Thongsrirak P. Physico-Chemical Properties of *Moringa oleifera* Lam. Dried Leaves. *Journal of Thai Traditional and Alternative Medicine*. 2019;17(2):168-80. (in Thai)
 14. Jansakul C, Srichanbarn A, Saelee A. Some pharmacological studies of a hypotensive fraction from *Derris scandens*. *Journal of the Science Society of Thailand*. 1997;23:323-34.
 15. Department of Medical Sciences. A practical guide for single laboratory method validation of chemical methods. Nonthaburi: Department of Medical Sciences; 2006. (in Thai)