

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์และการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ หาปริมาณสารโอเรียนทินและไวเทกซินในใบกะทกรกด้วยวิธีโครมาโทกราฟี ของเหลวประสิทธิภาพสูงพิเศษ

สันตกิจ นิลอุดมศักดิ์*, ธนวัฒน์ ทองจีน, สุดารัตน์ รูปคม, สายันท์ เรืองเขตร, พีรธรรม เทียมเทียบรัตน์

* สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ ตำบลตลาดขวัญ อำเภอเมือง นนทบุรี 11000

* ผู้รับผิดชอบบทความ: santakit.n@dmsc.mail.go.th

บทคัดย่อ

บทนำและวัตถุประสงค์: กะทกรกมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Passiflora foetida* L. วงศ์ Passifloraceae เป็นพืชสมุนไพรที่ไม่มีสารกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในปริมาณสูง โดยเฉพาะโอเรียนทิน (orientin) และไวเทกซิน (vitexin) สารสกัดเอทานอลจากใบมีฤทธิ์ระงับปวด ด้านอนุมูลอิสระ และด้านการอักเสบ จึงถูกนำมาใช้เป็นส่วนประกอบในยาและผลิตภัณฑ์สุขภาพอย่างแพร่หลาย อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันยังไม่มีวิธีการควบคุมคุณภาพสารสำคัญดังกล่าว ผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อวิจัยและพัฒนาวิธีวิเคราะห์และการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารโอเรียนทินและไวเทกซินในใบกะทกรกด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูงพิเศษ (Ultra-High Performance Liquid Chromatography, UHPLC)

วิธีการศึกษา: แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน ได้แก่ 1) การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารโอเรียนทินและไวเทกซินในใบกะทกรกด้วยวิธี UHPLC 2) การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (method validation) และ 3) การวิเคราะห์ปริมาณสารโอเรียนทินและไวเทกซินในใบกะทกรก จำนวน 14 ตัวอย่าง

ผลการศึกษา: การพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณโอเรียนทินและไวเทกซินในใบกะทกรกด้วยวิธี UHPLC ใช้ 50% เอทานอลเป็นตัวทำละลายในการสกัด ใช้เวลาในการสกัด 60 นาที เลือกใช้คอลัมน์ชนิด ARC-18, ขนาด 4.6×150 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 2.7 ไมโครเมตร เป็นวัฏภาคคงที่ ใช้ 0.1% ออร์โทฟอสโฟริกแอซิดในน้ำ และ 0.1% ออร์โทฟอสโฟริกแอซิดในอะซิโตนไทรลเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ตรวจวัดด้วย diode array detector (DAD) ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร analytical system ที่ใช้วิเคราะห์มี retention time เฉลี่ย ของโอเรียนทินและไวเทกซินที่ 3.98 และ 4.31 นาที ตามลำดับ ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ดังกล่าว พบว่ากราฟมาตรฐานของโอเรียนทินและไวเทกซิน มีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 1.27 – 122.30 และ 1.35 – 129.36 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.99998 ค่าร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วง 99.03 – 101.74% และ 97.70 – 101.05% ตามลำดับ ชีດจำกัดของการตรวจพบของโอเรียนทินและไวเทกซิน มีค่าเท่ากับร้อยละ 0.009 และ 0.012 โดยน้ำหนักแห้งของใบกะทกรก ในขณะที่ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณมีค่าเท่ากับร้อยละ 0.031 และ 0.042 โดยน้ำหนักแห้งของใบกะทกรก ตามลำดับ และจากการวิเคราะห์ตัวอย่างใบกะทกรก 14 ตัวอย่าง พบว่าปริมาณโอเรียนทินและไวเทกซินในใบกะทกรก มีค่าเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 1.00 และ 0.14 โดยน้ำหนักแห้งของใบกะทกรก ตามลำดับ

อภิปรายผล: การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารโอเรียนทินและไวเทกซินในวัตถุดิบใบกะทกรกด้วยเครื่อง UHPLC ที่พัฒนาขึ้น โดยใช้สารสกัดใบกะทกรกแห้งด้วยตัวทำละลาย 50% เอทานอล โดยวิธีรีฟลักซ์ นาน 60 นาที ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารโอเรียนทินและไวเทกซินในตัวอย่างสารละลายใบกะทกรก จำนวน 14 ตัวอย่าง พบว่ามีปริมาณสารโอเรียนทินและไวเทกซิน เฉลี่ยร้อยละ 1.00 และ 0.14 โดยน้ำหนักแห้งของใบกะทกรก ตามลำดับ ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์พบว่าทุกค่าอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ วิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อย วิธีการเตรียมวัตถุดิบที่ง่าย สะดวก และรวดเร็ว

ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ: วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความเหมาะสม สามารถนำไปใช้เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารโอเรียนทินและไวเทกซินในใบกะทกรก และเป็นพื้นฐานในการนำไปศึกษาวิจัยต่อเพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารทั้งสองในผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่มีใบกะทกรกเป็นส่วนประกอบ ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารโอเรียนทินและไวเทกซินสามารถใช้ประกอบการพิจารณากำหนดเกณฑ์มาตรฐานของปริมาณสารสำคัญทั้งสองในใบกะทกรกต่อไป

คำสำคัญ: โครมาโทกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูงพิเศษ, ใบกะทกรก, ไวเทกซิน, โอเรียนทิน

Development and Validation of Orientin and Vitexin Quantification Method in *Passiflora foetida* L. Leaves by Ultra–High Performance Liquid Chromatography

Santakit Ninudomsak^{*}, Thanawat Thongchin, Sudarat Rupkhom, Sayan Ruengkhet, Peradhama Thiemthieprat

^{*}Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Tiwanon Rd., Talat Khwan Subdistrict, Mueang District, Nonthaburi 11000 11000, Thailand

^{*}Corresponding author: santakit.n@dmisc.mail.go.th

Abstract

Introduction and Objectives: “Ka Thok Rok” has the scientific name *Passiflora foetida* L. belonging to Family Passifloraceae, commonly known as Fetid passionflower, is a medicinal plant whose leaves contain high amounts of phenolic and flavonoid compounds, particularly orientin and vitexin. Ethanol extracts from the leaves exhibit analgesic, antioxidant, and anti-inflammatory activities, leading to their widespread use in pharmaceuticals and herbal health products. However, standardized quality control methods for these active compounds are currently lacking. Therefore, this study aims to develop and validate an Ultra–High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) method for the quantitative analysis of orientin and vitexin in *P. foetida* leaves.

Methods: The study was divided into three steps: developing the UHPLC method for analyzing orientin and vitexin in Ka Thok Rok leaves, testing the validity of the analysis method, and analyzing the quantity of orientin and vitexin in 14 Ka Thok Rok leaf samples.

Results: The method developed for analyzing orientin and vitexin in raw Ka Thok Rok leaves using UHPLC involves the extraction of dried Ka Thok Rok leaves with 50% ethanol as the solvent through the reflux method for 60 minutes, the ARC–18 column, 4.6 × 150 mm, particle size 2.7 μm as the stationary phase, using 0.1% ortho-phosphoric acid in water and 0.1% ortho-phosphoric acid in acetonitrile as the mobile phase, and detecting with diode array detector (DAD) at 340 nm. The analytical system showed average retention times of 3.98 and 4.31 minutes for orientin and vitexin, respectively. This method was validated by establishing the linearity for orientin and vitexin at concentration range of 1.27 – 122.30 and 1.35 – 129.36 μg/mL, respectively, with equal determination correlation coefficient (r) of 0.99998. The % recovery were in the range of 99.03 to 101.74% and 97.70 to 101.05%, respectively. The limit of detection of orientin and vitexin were 0.009 and 0.012% w/w on a

dry basis, while limit of quantification were 0.031 and 0.042% w/w, respectively. The average content of orientin and vitexin in the 14 leaf samples were 1.00 and 0.14% w/w, respectively.

Discussion: The method developed for analyzing orientin and vitexin in raw Ka Thok Rok leaves using UHPLC involves the extraction of dried leaves with 50% ethanol as the solvent through the reflux method. Quantitative analysis of orientin and vitexin in 14 *Passiflora foetida* leaf samples revealed average orientin and vitexin contents of 1.00 and 0.14% w/w, respectively. The results of the validity test of the analytical method were all within acceptable limits. This developed orientin and vitexin quantification method requires less time for analysis and involves a simple, convenient, and rapid preparation of the mobile phase.

Conclusion and Recommendation: The developed analytical method is suitable and reliable for the quantification of orientin and vitexin in *P. foetida* leaves, and serves as a foundation for future research to quantify these compounds in herbal products containing *P. foetida* leaves. The content of orientin and vitexin found in this study can also provide inputs for the future establishment of standardized content of these active markers in Ka Thok Rok leaves.

Keywords: *Passiflora foetida* L. leaves, orientin, UHPLC, vitexin

บทนำและวัตถุประสงค์

กะทกรก มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Passiflora foetida* L. จัดอยู่ในวงศ์ Passifloraceae^[1] สรรพคุณในการรักษาโรคในทางการแพทย์แผนโบราณ พบว่า ผลแก่นำมาทำเป็นผงอาหารเสริมเพื่อใช้ซึ่งเป็นเครื่องดื่ม ในขณะที่ผลดิบใช้เพื่อกระตุ้นให้เกิดการอาเจียนเพื่อขับพิษ ส่วนใบสามารถนำไปใช้ได้หลายวิธี เช่น ทำเป็นชาสมุนไพร บดเป็นยาพอก หรือรับประทานเป็นผัก นอกจากนี้ ยังมีการใช้ใบและรากประสมกันเพื่อเป็นยาขับประจำเดือนและรักษาโรคฮิสทีเรีย ทั้งต้นนำมาต้มเป็นยาขับปัสสาวะเพื่อฤทธิ์ขับปัสสาวะหรือใช้เป็นยาพอกและโลชั่นเพื่อรักษาโรคผิวหนังที่มีอาการอักเสบ^[2] มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบด้วยเมทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของกะทกรกทั้งหมด 4 ส่วน ได้แก่ ใบ ดอก เปลือก และเมล็ด พบว่า สารสกัดใบกะทกรกมีฤทธิ์ของการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด รองลงมาคือ เปลือก เมล็ด และดอกตามลำดับ^[3] สารสกัดเอทานอลจากต้นกะทกรกทั้ง

ต้น มีฤทธิ์ต้านแผลในกระเพาะอาหารและต้านอนุมูลอิสระในหนูทดลอง^[4] สารสกัดด้วยเอทานอลจากใบกะทกรกแสดงฤทธิ์ระงับปวดอย่างมีนัยสำคัญในหนูไมซ์และต้านการอักเสบได้อย่างมีนัยสำคัญในหนูแรด^[5] มีรายงานว่าสารสกัดจากใบยังแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และต้านการอักเสบ (ค่า IC₅₀ เท่ากับ 612.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, 202.39 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 15.26 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ) สารสกัดหยาบด้วยเอทานอลความเข้มข้น 70% v/v จากใบกะทกรกมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เหนือกว่าสารสกัดจากดอกและเมล็ดอย่างมีนัยสำคัญ^[6]

มีรายงานการศึกษาสารสำคัญในกะทกรก พบว่าสารสกัดจากใบกะทกรกตรวจพบสารฟลาโวนอยด์ ได้แก่ แอลคาลอยด์, ฟีนอลิก, เฟลโวนอยด์, แซโพนิน และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ โดยมีปริมาณฟีนอลรวมเฉลี่ย 22.92 mg GAE/g น้ำหนักแห้ง, ปริมาณเฟลโวนอยด์รวมเฉลี่ย 7.01 mg CE/g น้ำหนักแห้ง,

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เฉลี่ย 2.77 mg GAE/g น้ำหนักแห้ง และฤทธิ์รีดิวซ์ธาตุเหล็กเฉลี่ย 3.20 mg GAE/g น้ำหนักแห้ง^[7] ใบและผลของกะทกรกมีสารสำคัญ คือ โอเรียนทิน (orientin) ไวเทกซิน (vitexin) ซึ่งเป็นสารกลุ่มฟเลโวนอยด์ (flavonoids)^[8] ซึ่งมีลักษณะเป็นผงสีขาว มีสูตรโครงสร้างดังแสดงใน Figure 1^[9] ไวเทกซินมีคุณสมบัติทางชีวภาพที่หลากหลาย รวมถึงการต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ต้านมะเร็ง ปกป้องระบบประสาท และปกป้องหัวใจ นอกจากนี้ ผลการศึกษาเมื่อเร็ว ๆ นี้ยังรายงานถึงประโยชน์ต่อสุขภาพด้านอื่น ๆ เช่น ช่วยลดไขมัน เฝ้าผลาญกลูโคส และปกป้องตับ^[10] โอเรียนทินเป็นสารฟเลโวนอยด์ชนิดซี-ไกลโคไซด์ (flavonoid C-glycoside) ที่พบได้ในพืชหลายชนิด จากรายงานวิจัยพบว่าสารโอเรียนทินมีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ชะลอวัย ต้านการอักเสบ ขยายหลอดเลือดและปกป้องระบบหัวใจและหลอดเลือด ปกป้องระบบประสาท ต้านเบาหวาน ปกป้องตับ รวมถึงฤทธิ์ช่วยปรับสมดุลและฟื้นฟูร่างกาย^[11]

จากฤทธิ์ทางชีวภาพที่กล่าวข้างต้น แสดงถึงศักยภาพของพืชสมุนไพรชนิดนี้ที่สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ยาจากสมุนไพร เพื่อช่วยป้องกันหรือรักษาโรคหรือบรรเทาอาการของโรคได้ การนำใบกะทกรกมาเป็นองค์ประกอบในการผลิตผลิตภัณฑ์สมุนไพรให้มีคุณภาพได้มาตรฐานทุกรุ่นที่ผลิต ควรต้องมีการควบคุมปริมาณสารสำคัญในวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์ ด้วยวิธีการวิเคราะห์ที่เหมาะสม แต่จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มฟเลโวนอยด์ในใบกะทกรกที่เคยมีรายงานยังใช้เวลานานในการวิเคราะห์ ในปี 2545 มีรายงานการศึกษา HPLC fingerprint ของ

สารกลุ่มฟเลโวนอยด์ในสารสกัดกะทกรก ได้แก่ ไอโซโอเรียนทิน (isoorientin), โอเรียนทิน, ไวเทกซิน และไอโซไวเทกซิน (isovitexin) ด้วยวิธี HPLC-PDA^[12] พบว่าใช้เวลาในการวิเคราะห์ นาน 60 นาที ในปี 2555 มีรายงานการศึกษากการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารไอโซโอเรียนทิน, โอเรียนทิน, ไวเทกซิน และไอโซไวเทกซิน ด้วยวิธี HPLC-UV/DAD^[13] พบว่าใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน 30 นาที และต่อมาในปี 2561 มีรายงานการหาปริมาณสารไวเทกซินในสารสกัดและผลิตภัณฑ์ของพืชชาเย็น กลุ่มสายพันธุ์ของพืชสกุลกะทกรก เสาวรส ที่พบได้ในแถบเทือกเขาแอนดีสในทวีปอเมริกาใต้ด้วยวิธี UHPLC-DAD^[14] ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน 16 นาที จากรายงานการวิจัยที่กล่าวมาข้างต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งรายงานเมื่อปี 2545 และ 2555 จะเห็นได้ว่าวิธีที่ใช้วิเคราะห์สารโอเรียนทินและไวเทกซินกินเวลานาน ทำให้สิ้นเปลืองวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase)

งานวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารโอเรียนทินและไวเทกซินในใบกะทกรกและทดสอบความถูกต้องของวิธี (method validation) เพื่อให้ได้วิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการที่มีความถูกต้องแม่นยำ สะดวก รวดเร็วและประหยัดสารเคมี เพื่อใช้ในการประเมินคุณภาพของใบกะทกรก รวมทั้งการหาปริมาณสารสำคัญที่อยู่ในใบกะทกรกต่อไป

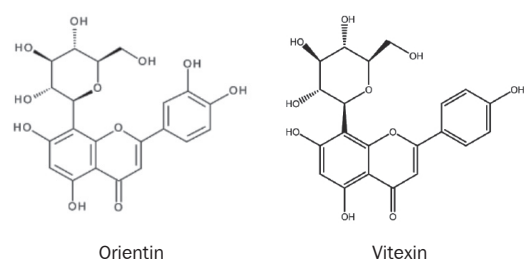


Figure 1 Chemical structures of orientin and vitexin

ระเบียบวิธีศึกษา

1. วัสดุ

1.1 ตัวอย่างสมุนไพร

ตัวอย่างวัตถุดิบกะทกรกสด จำนวน 14 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 5 กิโลกรัม ที่เก็บจาก 14 จังหวัด ได้แก่ นครปฐม สุพรรณบุรี กาญจนบุรี ชลบุรี ลำพูน นครพนม อ่างทอง สกลนคร ลำปาง มุกดาหาร นครสวรรค์ สิงห์บุรี พิจิตร และ ปทุมธานี ในช่วงระหว่างเดือนธันวาคม 2567 ถึง พฤษภาคม 2568 ผ่านการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเภสัชเวทเปรียบเทียบกับตัวอย่างจริง (authentic) จำนวน 1 ตัวอย่างที่ได้จากอำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี ว่าเป็นกะทกรก *Passiflora foetida* L. วงศ์ Passifloraceae โดยนักพฤกษศาสตร์ ห้องปฏิบัติการพิพิธภัณฑ์พืช สถาบันวิจัยสมุนไพร หมายเลขอ้างอิง DMSC 5375 จากนั้นนำมาคัดเลือกเฉพาะใบ ล้างด้วยน้ำให้สะอาด ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง และอบให้แห้งด้วยเตาอบร้อนไฟฟ้าที่มีพัดลมระบายอากาศที่อุณหภูมิ 45 - 50 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง และนำตัวอย่างที่แห้งแล้วไปบดเป็นผงละเอียด ผ่านแรงที่มีขนาดช่อง 180 ไมโครเมตร เก็บผงสมุนไพรไปกะทกรกในขวดแก้วสีชาที่มีฝาปิดสนิท ระบุชื่อสมุนไพร แหล่งที่เก็บ วันที่เก็บ และวันที่เตรียมตัวอย่าง เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

1.2 สารมาตรฐาน

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

1.3 สารเคมีและตัวทำละลาย

methanol HPLC grade, acetonitrile HPLC grade, ethanol AR, ortho-phosphoric acid AR

ของ RCI Labscan Limited, Thailand; methanol AR (Merck, Germany), และน้ำปราศจากไอออน (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 micropipette

1.5 เครื่องมือ

เครื่อง Ultra-High Performance Liquid Chromatography รุ่น 1290 Infinity II (Agilent) ดีเทคเตอร์ ชนิด Diode Array Detector (DAD), 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 (Mettler), เครื่องบดปั่น รุ่น RT 34 (ChyunTseh Industrial), เครื่องแรงรุ่น 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)

2. วิธีการศึกษา

2.1 การศึกษาหาสภาวะของระบบโครมาโทกราฟี

2.1.1 การเตรียมสารมาตรฐาน

เตรียมสารละลายสารมาตรฐานโอเรียนทิน และไวเทกซิน ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในสารละลาย 50% เมทานอล นำสารละลายสาร

มาตรฐานที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC

2.1.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

สกัดตัวอย่างใบกะทกรกแห้ง น้ำหนัก 1 กรัม ด้วยเอทานอล ปริมาตร 40 มิลลิลิตร โดยวิธีรีฟลักซ์ (reflux) เป็นเวลา 30 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 และนำสารสกัดที่ได้มาระเหยแห้ง ละลายและปรับปริมาตรด้วยเอทานอล จนครบ 50 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดแก้ววัดปริมาตร (volumetric flask) ปิเปตมา 2 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยเอทานอล จนครบ 10 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดแก้ววัดปริมาตร กรองผ่าน Nylon filter syringe นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC

2.1.3 การเลือกชนิดของตัวทำละลายในการสกัด

สกัดตัวอย่างใบกะทกรกแห้ง น้ำหนัก 1 กรัม โดยใช้เอทานอล 40 มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับ 50% เอทานอล 40 มิลลิลิตร ด้วยวิธีรีฟลักซ์ เป็นเวลา 60 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 นำสารสกัดเอทานอลและสารสกัด 50% เอทานอล ไประเหยแห้ง ด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จากนั้นละลายและปรับปริมาตรด้วยเอทานอลและ 50% เอทานอล ตามลำดับ จนครบ 50 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดแก้ววัดปริมาตร ปิเปตมา 2 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วย 50% เอทานอล จนครบ 10 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดแก้ววัดปริมาตร กรองผ่าน nylon filter syringe แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการสกัดสารโอเรียนทินและไวเทกซินจากใบกะทกรกของตัวทำละลายทั้งสองชนิด

2.1.4 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัด

สกัดตัวอย่างใบกะทกรกแห้ง น้ำหนัก 1 กรัม ด้วย 50% เอทานอล โดยวิธีรีฟลักซ์ เป็นเวลา 30, 45,

60 และ 90 นาที แล้วเตรียมสารละลายตัวอย่าง ด้วยวิธีเดียวกับในข้อ 2.1.3 โดยใช้ 50% เอทานอลในการปรับปริมาตร นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC เพื่อเปรียบเทียบผลของเวลาที่ใช้ในการสกัดกับปริมาณสารโอเรียนทินและไวเทกซินที่ได้

2.1.5 การเลือกใช้ความยาวคลื่นในการตรวจวิเคราะห์สารโอเรียนทินและไวเทกซิน

สกัดตัวอย่างใบกะทกรกแห้ง น้ำหนัก 1 กรัม (เหมือนข้อ 2.1.4) นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC วัดการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet, UV) ของโอเรียนทินและไวเทกซินเพื่อดูความยาวคลื่นที่สารชนิดนี้สามารถดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) และวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างใบกะทกรกโดยใช้ DAD เพื่อเลือกความยาวคลื่นสำหรับการตรวจวัดสารโอเรียนทินและไวเทกซินโดยที่ไม่พบการซ้อนทับของพีคอื่น (co-eluting peaks)

2.1.6 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) จากพีคของโอเรียนทินและไวเทกซินในสารละลายตัวอย่างใบกะทกรกและความดันของระบบโครมาโทกราฟี

2.2 การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ทางเคมี

ทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณโอเรียนตินและไวเทกซินในสารละลายตัวอย่างใบกะทกรกที่พัฒนาขึ้นตามแนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดี่ยว กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข^[15] และ ICH Harmonised Guideline Validation of Analytical Procedures Q2(R1)^[16]

2.2.1 การทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) และช่วงการวิเคราะห์ (range)

เตรียมสารละลายสารมาตรฐานจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ โอเรียนตินและไวเทกซิน โดยชั่งสารมาตรฐานโอเรียนตินและไวเทกซิน น้ำหนัก 10 มิลลิกรัม ตามลำดับ ละลายและปรับปริมาตรด้วย 50% เมทานอล จนครบ 50 มิลลิลิตร ด้วยขวดแก้ววัดปริมาตร จะได้ stock solution ของสารละลายสารมาตรฐานโอเรียนตินและไวเทกซิน เข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางให้ได้ 7 ระดับความเข้มข้น ตามลำดับ ใส่ลงในขวดแก้ววัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย 50% เมทานอล จะได้ 7 ระดับความเข้มข้นของสารละลายสารมาตรฐานโอเรียนติน ดังนี้ คือ 1.27, 5.10, 10.19, 20.38, 40.77, 81.54 และ 122.30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 7 ระดับความเข้มข้นของสารละลายสารมาตรฐานไวเทกซิน ดังนี้ คือ 1.35, 5.39, 10.78, 21.56, 43.12, 86.24 และ 129.36 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นิดสารละลายสารมาตรฐานโอเรียนตินและไวเทกซิน ที่ 7 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ด้วยเครื่อง UHPLC นำค่าพื้นที่ใต้พีค (peak area) และความเข้มข้นของสารละลายสารมาตรฐานโอเรียนตินและ

ไวเทกซินไปสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) สมการคำนวณความเข้มข้นจากพื้นที่ใต้พีค และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r)

2.2.2 การทดสอบหาค่าร้อยละของการคืนกลับ (% recovery) และความเที่ยง (precision)

การทดสอบร้อยละของการคืนกลับ (% recovery)

เตรียม sample blank (sample blank คือ ตัวอย่างใบกะทกรกที่นำมาสกัดและตรวจวิเคราะห์หาปริมาณโอเรียนตินและไวเทกซิน แล้วมีปริมาณสารโอเรียนตินและไวเทกซินในปริมาณต่ำ ๆ) โดยชั่งตัวอย่างใบกะทกรก sample blank 1 กรัม แล้วเตรียมสารละลายตัวอย่างที่สกัดด้วย 50% เอทานอล โดยวิธีรีฟลักซ์ เป็นเวลา 60 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 นำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จากนั้นละลายและปรับปริมาตรด้วย 50% เอทานอล จนครบ 50 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดแก้ววัดปริมาตร ปิเปตมา 2 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วย 50% เอทานอล จนครบ 10 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดแก้ววัดปริมาตร กรองผ่าน nylon filter syringe นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC จำนวน 6 ซ้ำ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย (mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD)

เตรียม spiked sample ลงใน sample blank โดยเติมสารละลายสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 3 ระดับ ระดับละ 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 จากนั้นคำนวณค่าร้อยละของการคืนกลับ (% recovery) ซึ่งช่วงที่ยอมรับได้คือร้อยละ 95 - 105 คำนวณค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% relative standard deviation, %RSD) เกณฑ์การยอมรับ (acceptance criteria) คือ % RSD < 2 และคำนวณค่า HorRat (intra-laboratory repeatability) ซึ่งเกณฑ์การยอมรับอยู่ในช่วง 0.3 - 1.3

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

เมื่อ C1 คือ ความเข้มข้นของสารใน spiked sample

C2 คือ ความเข้มข้นของสารใน sample blank

C3 คือ ความเข้มข้นของสารที่เติม

การทดสอบความเที่ยง (precision)

Repeatability precision วิเคราะห์ปริมาณ

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

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

ซึ่งตัวอย่างใบกะทกรก 1 กรัม สกัดด้วย 50% เอทานอล โดยวิธีรีฟลักซ์ เป็นเวลา 60 นาที แล้วเตรียมสารละลายตัวอย่างใบกะทกรกด้วยวิธีที่อธิบายในข้อ 2.2.2 โดยใช้ 50% เอทานอลในการปรับปริมาตร แล้วนำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC

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

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

สารโอเรียนทินและไวเทกซินในตัวอย่างสารละลายใบกะทกรกเข้มข้น 4,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซ้ำ 10 ครั้ง ในวันเดียวกัน นำค่าพื้นที่ใต้พีคมาคำนวณปริมาณสารสารโอเรียนทินและไวเทกซิน คำนวณค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) เกณฑ์การยอมรับ (acceptance criteria) คือ % RSD < 2

Intermediate precision วิเคราะห์ปริมาณสารโอเรียนทินและไวเทกซินในตัวอย่างสารละลายใบกะทกรกเข้มข้น 4,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 วัน วันละ 10 ซ้ำ คำนวณค่า % RSD เกณฑ์การยอมรับ (acceptance criteria) คือ % RSD < 2

2.2.3 การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD)

คำนวณค่าประมาณ (estimated) ของ LOD จากกราฟมาตรฐาน

2.2.4 การทดสอบขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ)

คำนวณค่าประมาณของ LOQ จากกราฟมาตรฐาน ดังนี้

เตรียมสารละลาย spiked sample ให้มีความเข้มข้นใกล้เคียงกับค่าประมาณของ LOQ แล้วตรวจวิเคราะห์ปริมาณโอเรียนทินและไวเทกซินใน spiked sample 6 ซ้ำ คำนวณค่า % RSD และ % recovery เกณฑ์การยอมรับ (acceptance criteria) คือ % RSD < 2

2.2.5 การทดสอบความจำเพาะ (specificity)

ฉีดสารละลาย mixed working standard solution ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และสารละลายตัวอย่างใบกะทกรก ด้วยเครื่อง UHPLC เพื่อตรวจสอบการแยกสารโอเรียนทินและไวเทกซินออกจากกันและออกจากสารอื่น ซึ่งต้องมีค่า retention time แยกจากกันได้ดี คำนวณ peak purity และค่า resolution

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณโอเรียนทินและไวเทกซินในสารละลายตัวอย่างใบกะทกรก

2.3.1 การเตรียมสารละลายตัวอย่างใบกะทกรก

ซึ่งตัวอย่างใบกะทกรก 1 กรัม สกัดด้วย 50% เอทานอล โดยวิธีรีฟลักซ์ เป็นเวลา 60 นาที เตรียมสารละลายตัวอย่างตามวิธีที่อธิบายในข้อ 2.2.2 โดยใช้ 50% เอทานอลในการปรับปริมาตร แล้วนำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC วิเคราะห์ปริมาณโอเรียนทินและไวเทกซินในตัวอย่างใบกะทกรก จำนวน 14 ตัวอย่าง ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นโดยแต่ละตัวอย่างวิเคราะห์ 3 ซ้ำ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของสารโอเรียนทินและไวเทกซินในตัวอย่างสารละลายใบกะทกรก และคำนวณเป็นค่าร้อยละโดยน้ำหนักของตัวอย่างใบกะทกรกแห้ง (% w/w) ด้วยสมการ

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

เมื่อ C_0 คือ ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ที่คำนวณได้จากกราฟมาตรฐาน

C_s คือ ปริมาณของสารที่วิเคราะห์เมื่อคำนวณเป็นร้อยละโดยน้ำหนักสมุนไพรแห้ง (g/100 g dried herb)

ผลการศึกษา

1. ผลการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณโอเรียนทินและไวเทกซินในใบกะทกรก

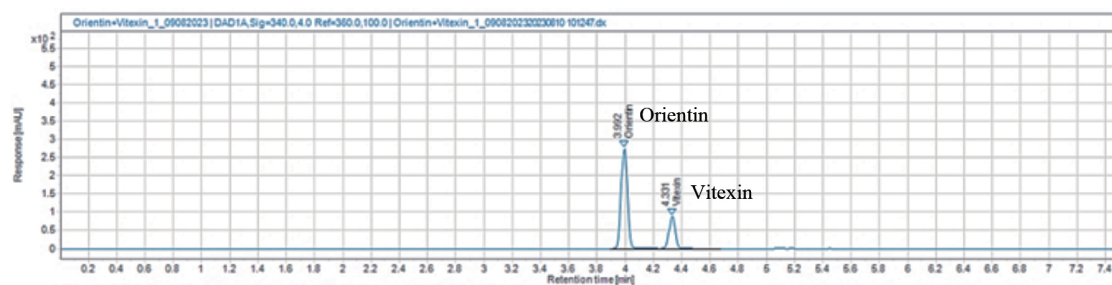
1.1 ผลการศึกษาหาสภาวะของระบบโครมาโทกราฟี

หลังจากนำสารละลายสารมาตรฐานของโอเรียน-

ทินและไวเทกซินและสารละลายตัวอย่างใบกะทกรกไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC พบว่าได้สภาวะของระบบโครมาโทกราฟีที่เหมาะสมในการแยกสารโอเรียนทินและ ไวเทกซิน และสัดส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่แบบ gradient program ที่เหมาะสม ดังแสดงใน Table 1 และ Figure 2

Table 1 Optimal chromatography conditions for the separation of orientin and vitexin by UHPLC system

Optimal UHPLC 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 (A) and 0.1% ortho–phosphoric acid in acetonitrile (B)		
Flow rate	1.0 mL/min		
Detection	DAD 340 nm		
Injection volume	10 μL		
Gradient program of mobile phase			
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 2** Chromatogram of mixed standard solution of orientin and vitexin using optimal UHPLC condition

1.2 ผลการเลือกชนิดของตัวทำละลายในการสกัด

การศึกษาชนิดของตัวทำละลายในการสกัดพบว่าเมื่อนำสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการสกัดไปกะเทรกด้วยเอทานอลและ 50% เอทานอล วิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC ตัวอย่างละ 2 ขั้ว พบว่าพื้นที่ใต้พีคเฉลี่ยของสารไอรีนทินและไวเทกซินจากการสกัดไปกะเทรกด้วยเอทานอล ที่ retention time

เฉลี่ย 3.99 และ 4.34 นาที ตามลำดับ มีค่า 114.189 และ 26.018 ซึ่งน้อยกว่าไปกะเทรกที่สกัดด้วย 50% เอทานอล ที่มีพื้นที่ใต้พีคเฉลี่ย เท่ากับ 186.454 และ 42.128 ตามลำดับ (Figure 3) ดังนั้น ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณไอรีนทินและไวเทกซินในไปกะเทรก จึงเลือกใช้ 50% เอทานอล เป็นตัวทำละลายในการสกัดไปกะเทรก

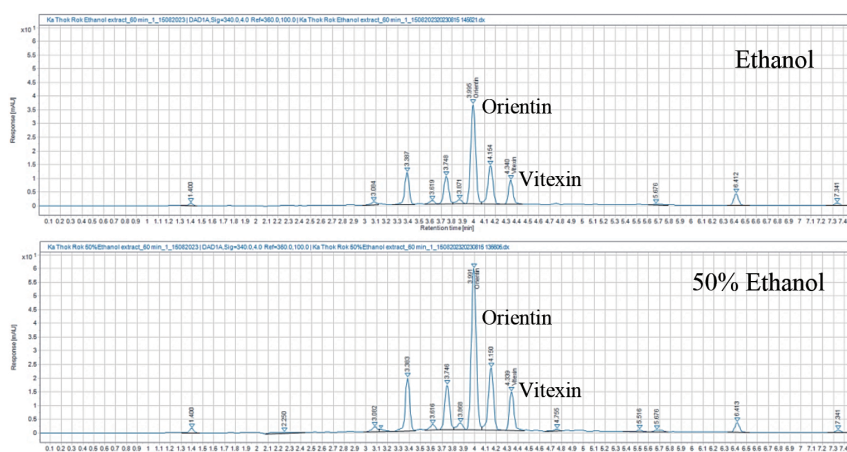


Figure 3 Effect of ethanol and 50% ethanol as solvent for the extraction of orientin and vitexin from *Passiflora foetida* L. leaf sample

1.3 ผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัด

การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัด พบว่าสารละลายที่ได้จากการสกัดด้วยเอทานอล ซึ่งสกัดด้วยวิธีเดียวกันโดยการรีฟลักซ์กับ 50% เอทานอล แต่ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดแตกต่างกัน (30, 45, 60 และ 90 นาที) เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC พบว่าสารโอเรียนทินและไวเทกซินให้ retention time ที่ 3.99 และ 4.34 นาที ตามลำดับ

โดยค่าพื้นที่ใต้พีคของสารโอเรียนทินและไวเทกซิน จากการสกัดด้วยระยะเวลา 30, 45 นาที มีค่าน้อยกว่า การสกัดด้วยระยะเวลา 60 และ 90 นาที ซึ่งค่าพื้นที่ใต้พีคจากการสกัดด้วยระยะเวลา 60 นาที และ 90 นาที มีค่าใกล้เคียงกัน (Table 2) ดังนั้น ในการพัฒนานิ่ววิเคราะห์ปริมาณสารโอเรียนทินและไวเทกซินในใบกะทกรก จึงเลือกใช้ 50% เอทานอล เป็นตัวทำละลายในการสกัด และใช้เวลาในการสกัดนาน 60 นาที

Table 2 Effect of extraction time (30, 45, 60 and 90 minutes) on peak areas of orientin and vitexin extracted from *Passiflora foetida* L. leaf sample using 50% ethanol as solvent

Extraction time (minutes)	Vial.	Retention time (minutes)/Peak area	
		Orientin	Vitexin
30 min	1	3.995/75.372	4.340/17.195
	2	3.995/75.471	4.340/16.991
45 min	1	3.995/114.470	4.341/26.135
	2	3.996/114.289	4.341/26.258
60 min	1	3.991/186.454	4.339/42.128
	2	3.991/185.972	4.339/42.214
90 min	1	3.991/186.114	4.339/42.123
	2	3.991/185.988	4.339/42.195

1.4 ความยาวคลื่นในการตรวจวัดสารโอเรียนทินและไวเทกซิน

จากการศึกษาการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตของโอเรียนทินและไวเทกซิน พบว่า $\lambda_{\max}$ ของสารโอเรียนทินมีค่าเท่ากับ 210, 256 และ 348 นาโนเมตร และไวเทกซิน และ 214, 268 และ 336 นาโนเมตร และเมื่อวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างใบกะทกรกด้วย

เครื่อง UHPLC โดยใช้ DAD เป็นเครื่องตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ไม่พบการซ้อนทับของพีคของสารอื่น (Figure 4) ดังนั้น วิธีวิเคราะห์ปริมาณสารโอเรียนทินและไวเทกซินในสารละลายตัวอย่างใบกะทกรก จึงเลือกการตรวจวัดการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ต ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร

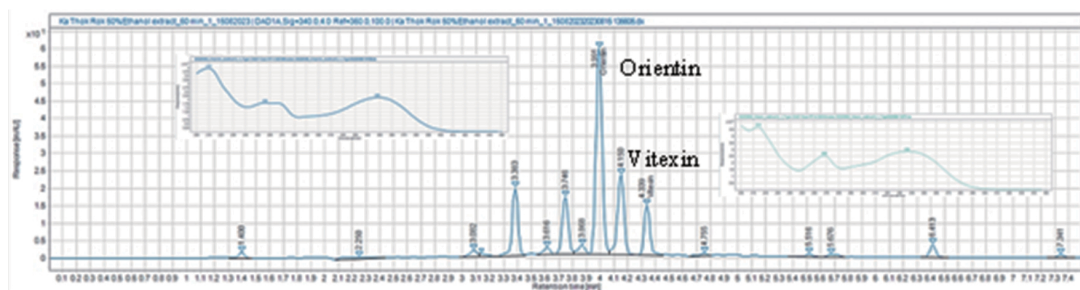


Figure 4 UV spectrum at 340 nm of orientin and vitexin in *Passiflora foetida* L. leaf sample solution

1.5 ภูมิภาคคงที่และภูมิภาคเคลื่อนที่

ภูมิภาคคงที่ พบว่าเมื่อใช้ UHPLC column ชนิด ARC-18, ขนาด 4.6×150 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 2.7 ไมโครเมตร UHPLC chromatographic fingerprint ที่ได้ ให้พีคของโอเรียนทินและไวเทกซินที่ retention time 3.98 และ 4.31 นาที ตามลำดับ ซึ่งมีการแยกจากสิ่งเจือปนอื่นอย่างชัดเจน แต่ UHPLC column ชนิด ARC-8, ขนาด 2.1×100 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 3.0 ไมโครเมตร ให้การแยกสารออกจากสิ่งเจือปนอื่นได้น้อยกว่า column ชนิด ARC-18 (Figure 5)

ภูมิภาคเคลื่อนที่ พบว่าเมื่อปรับเปลี่ยนองค์ประกอบของภูมิภาคเคลื่อนที่จากน้ำและอะซิโตนไทรล์เป็น 0.1% ออร์โทฟอสโฟริกแอซิด (0.1% ortho-phos-

phoric acid) ในน้ำ และ 0.1% ออร์โทฟอสโฟริกแอซิดในอะซิโตนไทรล์ retention time ของสารโอเรียนทินและไวเทกซิน เปลี่ยนจาก 4.23 และ 4.62 นาที เป็น 3.98 และ 4.31 นาที และได้ peak shape ของโอเรียนทินและไวเทกซินที่สมมาตร (symmetry) แยกจากสิ่งเจือปนอื่นอย่างชัดเจน (Figure 5)

ดังนั้น ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณโอเรียนทินและไวเทกซินในสารละลายตัวอย่างใบกะทกรกด้วยเครื่อง UHPLC จึงเลือกใช้ UHPLC column ชนิด ARC-18, ขนาด 4.6×150 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 2.7 ไมโครเมตร ใช้ 0.1% ออร์โทฟอสโฟริกแอซิดในน้ำ และ 0.1% ออร์โทฟอสโฟริกแอซิดในอะซิโตนไทรล์เป็นภูมิภาคเคลื่อนที่ และตรวจวัดด้วย DAD ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร

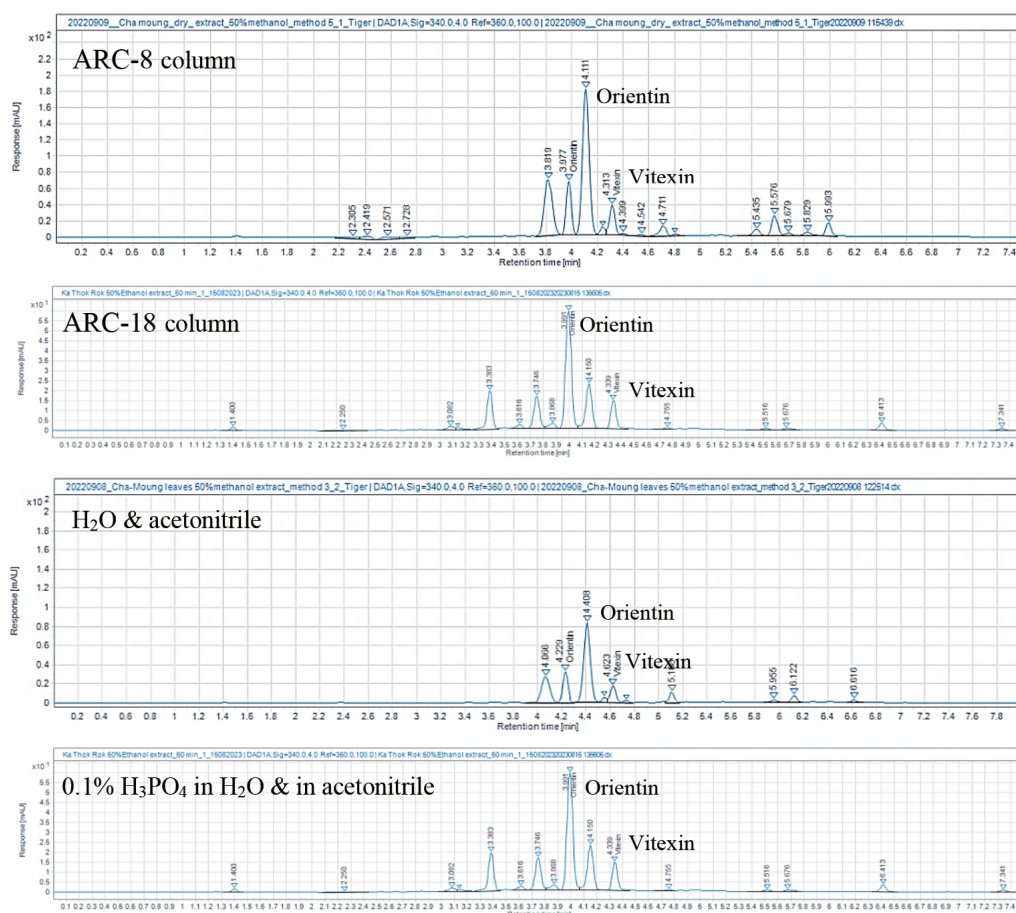


Figure 5 Effect of ARC-8 VS ARC-18 UHPLC columns and two types of mobile phase in gradient program (water and acetonitrile VS 0.1% ortho-phosphoric acid in water and in acetonitrile) on chromatograms of 50% ethanolic extract of *Passiflora foetida* L. leaf sample solution

2. ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (method validation)

**2.1 ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity)
และช่วงการวิเคราะห์ (range)**

จากกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ
สารละลายสารมาตรฐานและพื้นที่ใต้พีค พบว่าความ
เข้มข้นของสารละลายสารมาตรฐานโอเรียนทินและ
ไวเทกซินกับพื้นที่ใต้พีคมีลักษณะเป็นเส้นตรง

โดยสามารถฐานโอเรียนทินมีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 1.27 - 122.30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.99998 และสามารถฐานไวเทกซินมีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 1.35 - 129.36 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.99998 (Figure 6)

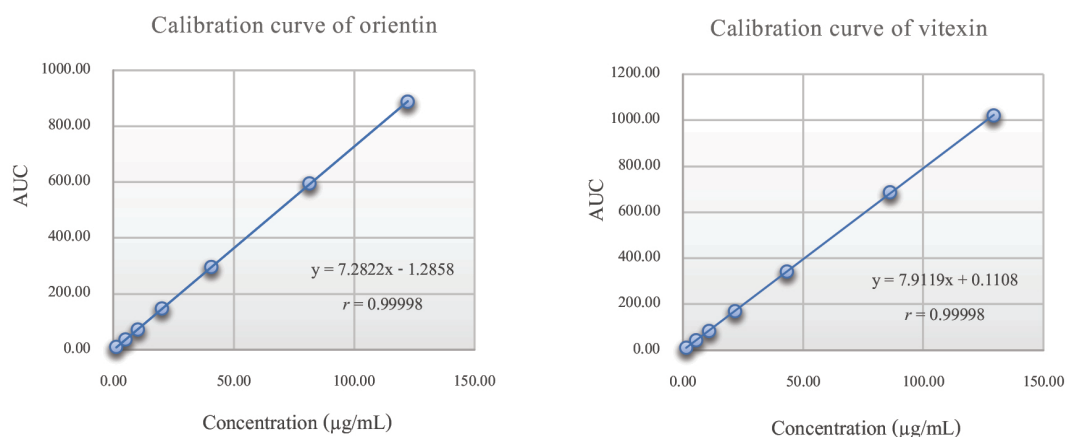


Figure 6 Calibration curves of orientin and vitexin peak areas under the curve (AUC) and concentrations of standard solutions in $\mu\text{g/mL}$.

2.2 ผลการทดสอบร้อยละของการคืนกลับ (% recovery) และความเที่ยง (precision)

เมื่อเติมสารละลายสารมาตรฐานโอเรียนทินและไวเทกซินที่ความเข้มข้นระดับต่าง 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% ความเข้มข้นของโอเรียนทินที่คำนวณได้เท่ากับ 2.9114, 10.1925 และ 30.5800 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และไวเทกซินที่คำนวณได้เท่ากับ

3.0800, 10.7800 และ 28.7467 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง spiked sample พบว่าในทุกระดับความเข้มข้นร้อยละของการคืนกลับของสารโอเรียนทินและไวเทกซินอยู่ในช่วงร้อยละ 99.03 - 101.74 และ 97.70 - 101.05 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (ร้อยละ 95 - 105) และมีค่า % RSD ไม่เกิน 2.00 ส่วนค่า HorRatr ที่แสดง repeatability ของการวิเคราะห์สารโอเรียนทินและไวเทกซินภายในห้องปฏิบัติการเดียว อยู่ในช่วง 0.59 - 1.28 และ 0.36 - 0.91 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ (0.3 - 1.3) (Table 3)

Table 3 Results of % recovery and repeatability

Analyzed substance	Sample blank concentration		Spiked sample concentration		% Recovery	%RSD (n=6)	HorRatr
	($\mu\text{g/mL}$)	(%w/w)	(%)	($\mu\text{g/mL}$)	(mean $\pm$ SD)		
Orientin	20.8677	0.5207	50	2.9114	100.84 $\pm$ 1.07	1.07	1.28
			100	10.1925	101.74 $\pm$ 0.82	0.80	1.06
			150	30.5800	99.03 $\pm$ 0.40	0.40	0.59
Vitexin	4.8916	0.1221	50	3.0800	97.70 $\pm$ 0.41	0.42	0.51
			100	10.7800	101.05 $\pm$ 0.68	0.68	0.91
			150	28.7467	100.97 $\pm$ 0.24	0.24	0.36

ผลการทดสอบความเที่ยง (precision)

Repeatability precision ของการวิเคราะห์ปริมาณสารโอเรียนทินและไวเทกซินในตัวอย่างสารละลายใบกะทกรก พบว่ามีค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) เท่ากับ 0.24 และ 0.23 ตามลำดับซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับ

Intermediate precision, between-day ของการวิเคราะห์ปริมาณสารโอเรียนทินและไวเทกซินในตัวอย่างสารละลายใบกะทกรก พบว่ามีค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) เท่ากับ 0.94 และ 1.50 ตามลำดับ ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับ

2.3 ผลการทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD)

จากการคำนวณค่าประมาณของ LOD ของโอเรียนทิน ตามสูตรในวิธีการศึกษาข้อ 2.2.3 พบว่า

- ค่าประมาณของ LOD ($\mu\text{g/mL}$) จากกราฟมาตรฐานของโอเรียนทิน มีค่า $0.367 \mu\text{g/mL}$
 - ค่าประมาณของ LOD (% w/w) เท่ากับร้อยละ 0.009 โดยน้ำหนักแห้งของใบกะทกรก
- ส่วนการคำนวณค่าประมาณของ LOD ของไวเทกซินตามสูตรในวิธีการศึกษาข้อ 2.2.3 พบว่า
- ค่าประมาณของ LOD ($\mu\text{g/mL}$) จากกราฟมาตรฐานของไวเทกซิน มีค่า $0.500 \mu\text{g/mL}$
 - ค่าประมาณของ LOD (% w/w) เท่ากับร้อยละ 0.012 โดยน้ำหนักแห้งของใบกะทกรก

2.4 ผลการทดสอบขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ)

จากการคำนวณค่าประมาณของ LOQ ของโอเรียนทิน ตามสูตรในวิธีการศึกษาข้อ 2.2.4 พบว่า

- ค่าประมาณของ LOQ ($\mu\text{g/mL}$) จากกราฟมาตรฐานของโอเรียนทิน มีค่า $1.225 \mu\text{g/mL}$

• ค่าประมาณของ LOQ (% w/w) เท่ากับร้อยละ 0.031 โดยน้ำหนักแห้งของใบกะทกรก

- % recovery = 97.49 ± 1.94 และ % RSD = 1.99 เมื่อวิเคราะห์ 6 ซ้ำ

ส่วนการคำนวณค่าประมาณของ LOQ ของไวเทกซิน ตามสูตรในวิธีการศึกษาข้อ 2.2.4 พบว่า

- ค่าประมาณของ LOQ ($\mu\text{g/mL}$) จากกราฟมาตรฐานของไวเทกซิน มีค่า $1.665 \mu\text{g/mL}$
- ค่าประมาณของ LOQ (% w/w) เท่ากับร้อยละ 0.042 โดยน้ำหนักแห้งของใบกะทกรก
- % recovery = 99.06 ± 1.34 และ % RSD = 1.35 เมื่อวิเคราะห์ 6 ซ้ำ

2.5 การทดสอบความจำเพาะ (specificity)

จากการฉีดสารละลายสารมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างใบกะทกรก พบว่าภายใต้สภาวะ UHPLC ที่พัฒนาขึ้นสามารถแยกสารโอเรียนทินและไวเทกซินออกจากกันได้ และไม่มีการรบกวนของสารอื่นในตัวอย่าง โดยมีค่า retention time เท่ากับ 3.97 และ 4.30 นาที ตามลำดับ peak purity มีค่าเท่ากับร้อยละ 95.32 และ 95.14 ตามลำดับ และมีค่า resolution เท่ากับ 1.07 และ 1.52 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการแยกยังอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

3. การวิเคราะห์ปริมาณโอเรียนทินและไวเทกซินในสารละลายตัวอย่างใบกะทกรก

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารโอเรียนทินและไวเทกซินในตัวอย่างสารละลายใบกะทกรก จำนวน 14 ตัวอย่าง พบว่าสารละลายตัวอย่างใบกะทกรกมีปริมาณสารโอเรียนทินและไวเทกซิน เฉลี่ยร้อยละ 1.00 และ 0.14 โดยน้ำหนักแห้งของใบกะทกรกตามลำดับ (Table 4)

Table 4 Concentrations ($\mu\text{g/mL}$) and contents (% w/w) of orientin and vitexin in *Passiflora foetida* L. leaf extract sample solutions, and as percent by weight of dried leaf samples

Sample No.	Collection site District/Province	Concentration* ($\mu\text{g/mL}$)		Content** (% w/w)	
		orientin	vitexin	orientin	vitexin
1	Kamphaeng Saen/ Nakhon Pathom	55.371	3.121	1.38	0.08
2	Song Phi Nong/ Suphanburi	23.613	4.892	0.59	0.12
3	Mueang/ Kanchanaburi	22.893	3.901	0.57	0.10
4	Bo Thong/ Chonburi	32.859	6.794	0.82	0.17
5	Mueang/ Lamphun	37.170	2.385	0.93	0.06
6	That Phanom/ Nakhon Phanom	60.500	2.064	1.51	0.05
7	Mueang/ Ang Thong	32.491	6.179	0.81	0.15
8	Phu Phan/ Sakon Nakhon	46.246	1.601	1.15	0.04
9	Mueang/ Lampang	39.347	7.263	0.98	0.18
10	Wan Yai/ Mukdahan	42.607	2.252	1.06	0.06
11	Banphot Phisai/ Nakhon Sawa	45.851	6.958	1.14	0.17
12	In Buri/ Sing Buri	43.818	9.017	1.09	0.22
13	Dong Charoen/ Phichit	50.201	9.104	1.25	0.23
14	Thanyaburi/ Pathum Thani	28.714	12.900	0.71	0.32
	Mean	40.120	5.602	1.00	0.14
	SD	11.298	3.319	0.28	0.08

* Concentrations of orientin and vitexin calculated from linear equation of its standard curve from AUC analyzed by UHPLC.

** Content (% w/w) of orientin and vitexin in g per 100 g of dried leaf sample

อภิปรายผล

ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่ใช้กะทกรก ส่วนมากจะใช้สารสกัดของดอกมากกว่าใบ แต่ก็มีผลิตภัณฑ์ที่ใช้ใบกะทกรกด้วยเช่นกัน แต่ไม่ว่าจะใช้ส่วนของใบหรือดอก ผลิตภัณฑ์ส่วนมากจะมีคำกล่าวอ้างทางสุขภาพเพื่อช่วยให้นอนหลับได้ดีขึ้น คลายเครียด โดยบางผลิตภัณฑ์อาจใช้ผสมกับสมุนไพรอื่นที่มีสรรพคุณคล้ายกัน เพื่อเสริมฤทธิ์กัน^[20] ซึ่งคำกล่าวอ้างทางสุขภาพนี้มีพื้นฐานจากการใช้พื้นบ้าน ใน

ประเทศเวียดนาม กะทกรกเป็นสมุนไพรชนิดหนึ่งในตำรายาสมุนไพรพื้นบ้าน ใช้ส่วนเหนือดินแห้งที่มีดอก (dry aerial flowering part) 20 - 40 กรัม ต้มกับ siro (medicinal wine) หรือน้ำหรือแอลกอฮอล์ในสัดส่วนที่เท่ากัน ทำเป็นยาต้ม (decoction) ใช้ดื่มก่อนนอนเพื่อช่วยให้นอนหลับ^[21] สรรพคุณที่กล่าวมานี้ส่วนหนึ่งเนื่องจากสารออกฤทธิ์กลุ่ม C-glycosyl flavonoids เช่น วิเทซิน (vitexin), ไอโซวิเทซิน (isovitexin), โอเรียนทิน (orientin) และไอโซโอเรียนทิน (isoorientin)

ทำหน้าที่เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลัก (bioactive constituents) ที่รับผิดชอบต่อการออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลางในการทำให้สงบระงับช่วยให้นอนหลับ (sedative-hypnotic) คลายความวิตกกังวล (anxiolytic) และลดกิจกรรมการเคลื่อนไหวของร่างกาย (motor activity-reducing effects)^[17-19] นอกจากนี้ ไวกะทิงยังมีฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้านการอักเสบ ปกป้องระบบประสาท และปกป้องหัวใจ ลดไขมัน เพิ่มการเผาผลาญ กลูโคส และปกป้องตับ^[10] ส่วนโอเรียนตินที่พบได้ในพืชหลายชนิดก็มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลายเช่นกัน เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้านการอักเสบ ขยายหลอดเลือด และปกป้องระบบหัวใจและหลอดเลือด ปกป้องระบบประสาท ด้านเบาหวาน ปกป้องตับ และช่วยปรับสมดุลและฟื้นฟูร่างกาย^[11] ดังนั้น ในการวิจัยและพัฒนาวิธีควบคุมคุณภาพของใบกะทิงนี้จึงเลือกวิเคราะห์สารโอเรียนตินและไวกะทิงซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญของใบกะทิง

ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารโอเรียนตินและไวกะทิงในตัวอย่างใบกะทิงจะใช้ 50% เอทานอลเป็นตัวทำละลายในการสกัด ใช้เวลาในการสกัด 60 นาที เลือกใช้คอลัมน์ชนิด ARC-18, ขนาด 4.6×150 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 2.7 ไมโครเมตร เป็นวัฏภาคคงที่ ใช้ 0.1% ออร์โทฟอสโฟริกแอซิดในน้ำ และ 0.1% ออร์โทฟอสโฟริกแอซิดในอะซิโตนไทรล์เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ตรวจวัดด้วย diode array detector (DAD) ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร analytical system ที่ใช้วิเคราะห์มี retention time เฉลี่ยของโอเรียนตินและไวกะทิงที่ 3.98 และ 4.31 นาที ตามลำดับ ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ดังกล่าว พบว่ากราฟมาตรฐานมีความเป็นเส้นตรง

โดยสารมาตรฐานโอเรียนตินมีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 1.27 - 122.30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.99998 และสารมาตรฐานไวกะทิงมีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 1.35 - 129.36 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.99998 ค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วง 99.03 - 101.74 และ 97.70 - 101.05% ตามลำดับ ค่า HorRat อยู่ในช่วง 0.59 - 1.28 และ 0.36 - 0.91 ตามลำดับ LOD ของการวิเคราะห์โอเรียนตินและไวกะทิง เท่ากับร้อยละ 0.009 และ 0.012 โดยน้ำหนักแห้งของใบกะทิง ตามลำดับ LOQ ของการวิเคราะห์โอเรียนตินและไวกะทิง เท่ากับร้อยละ 0.031 และ 0.042 โดยน้ำหนักแห้งของใบกะทิง ตามลำดับ โดยมีค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับ 1.99 และ 1.35 ตามลำดับ และร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วงร้อยละ 95.11 - 99.89 และ 97.26 - 100.45 ตามลำดับ ปริมาณสารโอเรียนตินและไวกะทิงในสารละลายตัวอย่างใบกะทิง จำนวน 14 ตัวอย่าง มีค่าเฉลี่ยร้อยละ 1.00 และ 0.14 โดยน้ำหนักแห้งของใบกะทิง ตามลำดับ สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการกำหนดปริมาณสารโอเรียนตินและไวกะทิงในตัวอย่างสารละลายใบกะทิงได้

UHPLC เป็น High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ที่มีการพัฒนาเพื่อให้มีประสิทธิภาพการแยกสาร ความไวในการแยกสารที่ดีขึ้น ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่น้อยลง และลดระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์ คือ เมื่อนำวิธีวิเคราะห์ปริมาณโอเรียนตินและไวกะทิงในใบกะทิงด้วยวิธี UHPLC ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่เปรียบเทียบกับ การหาปริมาณสารโอเรียนตินและไวกะทิงด้วยวิธี HPLC-UV/DAD^[13]

และการหาปริมาณสารโวลเทกซินในสารสกัดและผลิตภัณฑ์ของพืชชาวน้ำด้วยวิธี UHPLC-DAD^[14] พบว่าวิธี HPLC/UV/DAD และวิธี UHPLC-DAD ใช้เวลาวิเคราะห์ตัวอย่างต่อ 1 ตัวอย่าง นาน 30 นาที และ 16 นาที ตามลำดับ ทำให้สิ้นเปลืองวัสดุภาคเคลื่อนที่ ส่วนวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ ใช้เวลาในการวิเคราะห์ 7.5 นาที ซึ่งรวดเร็วและประหยัดวัสดุภาคเคลื่อนที่ ดังนั้นจึงเลือกใช้เครื่อง UHPLC ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณโอเรียนทินและโวลเทกซินในใบกะทกรก จากการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณโอเรียนทินและโวลเทกซินที่พัฒนาขึ้น พบว่าร้อยละของการคืนกลับจากการวิเคราะห์ spiked sample อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (95 - 105%) ซึ่งแสดงถึงความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์และค่า HorRatr อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ซึ่งแสดงถึงความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น วิธีดังกล่าวจึงมีความเหมาะสมสามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารโอเรียนทินและโวลเทกซิน เพื่อใช้ควบคุมปริมาณสารสำคัญของใบกะทกรกต่อไปได้

ข้อสรุป

การศึกษานี้ได้พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารโอเรียนทินและโวลเทกซินในใบกะทกรกด้วยวิธี UHPLC และทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ผลการวิจัยพบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้น มีความถูกต้องแม่นยำ สะดวก รวดเร็ว และประหยัดสารเคมีที่ใช้ในวัสดุภาคเคลื่อนที่ จึงนำวิธีที่ได้มาตรวจปริมาณสารโอเรียนทินและโวลเทกซินในตัวอย่างใบกะทกรก พบว่ามีปริมาณเฉลี่ยร้อยละ 1.00 และ 0.14 โดยน้ำหนักแห้งตามลำดับ ข้อมูลที่ได้สามารถใช้เป็นพื้นฐานในการกำหนดมาตรฐานของใบกะทกรกและปริมาณขึ้น

ต่ำของสารทั้งสองชนิดในวัตถุดิบใบกะทกรกแห้งในอนาคตรวมทั้งเป็นประโยชน์ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารสำคัญทั้งสองชนิดในผลิตภัณฑ์ผสมใบกะทกรกและนำมาใช้ในการวิจัยเพื่อพัฒนาพันธุ์กะทกรกให้มีสารสำคัญสูงต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่สนับสนุนงบประมาณในการวิจัยนี้ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ห้องปฏิบัติการฟิสิกส์และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการวิจัยเพื่อแยกสารสำคัญจากสมุนไพรทุกท่าน ที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

References

1. Smitinand T. Thai plant names. Bangkok: The Forest Herbarium, Royal Forest Department; 2001. p. 71. (in Thai).
2. Sunita K, Shinde C, Sharma BP, Rout S, Gunjal M. *Passiflora foetida* L.: A review of its ethnomedicinal uses. J Biodivers Conservation. 2025;9(2):253-7.
3. Suksomran W, Phothiwat K, Panon O. Phytochemical compositions and antioxidant activity of *Passiflora foetida* L. VRU Res Dev J Sci Technol. 2022;17(1):29. (in Thai).
4. Sathish R, Sahu A, Natarajan K. Antiulcer and antioxidant activity of ethanolic extract of *Passiflora foetida* L. Indian J Pharmacol. 2011;43(3):336-8.
5. Sasikala V, Saravanan S, Parimelazhagan T. Analgesic and anti-inflammatory activities of *Passiflora foetida* L. Asian Pac J Trop Med. 2011;4(8):600-3.
6. Buachoon N, Klomsungcharoen W. Effect of *Passiflora foetida* Linn. extract on antioxidant, tyrosinase inhibition, antimicrobial and anti-inflammatory activity. Journal of Science and Technology Mahasarakham University. 2026;45(2):215-26. (in Thai).
7. Tandoro Y, Widyawati PS, Budianta TDW, Sumargo G. Phytochem identification and antioxidant activity of

- Passiflora foetida* fruit and leaves extracts: A comparative study. Int J Pharm Pharm Sci. 2020;12(6):55-8.
8. Chiavaroli A, Di Simone SC, Sinan KI, Ciferri MC, Flores GA, Zengin G, et al. Pharmacological properties and chemical profiles of *Passiflora foetida* L. extracts: novel insights for pharmaceuticals and nutraceuticals. Processes. 2020;8(9):1034. doi:10.3390/pr8091034.
 9. Yu Y, Pei F, Li Z. Orientin and vitexin attenuate lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW264.7 cells: a molecular docking study, biochemical characterization, and mechanism analysis. Food Sci Hum Wellness. 2022;11(5):1277-88.
 10. Peng Y, Gan R, Li H, Yang M, McClements DJ, Gao R, Sun Q. Absorption, metabolism, and bioactivity of vitexin: recent advances in understanding the efficacy of an important nutraceutical. Crit Rev Food Sci Nutr. 2021;61(6):1049-64. doi:1080/10408398.2020.1753165.
 11. Fahmy MI, Sadek MA, Abdou K, El-Dessouki AM, El-Shiekh RA. Orientin: a comprehensive review of a promising bioactive flavonoid. Inflammopharmacology. 2025;33(3):1713-28. doi:10.1007/s10787-025-01690-5.
 12. Abourashed EA, Vanderplank JR, Khan IA. High-speed extraction and HPLC fingerprinting of medicinal plants-I. application to passiflora flavonoids. Pharm Biol. 2002;40(2):81-91. doi:10.1076/phbi.40.2.81.5844.
 13. Wang J, Yue YD, 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. 2012;2012:205101. doi:10.1155/2012/205101.
 14. Sepúlveda P, Costa GM, Aragón DM, 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):81-6.
 15. Department of Medical Sciences. A practical guide for single laboratory method validation of chemical methods. Nonthaburi: Department of Medical Sciences; 2006.
 16. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. ICH Q2(R1): validation of analytical procedures: text and methodology; 2005.
 17. Coleta M, Batista MT, Campos MG, Carvalho R, Cotrim MD, de Lima TCM, da Cunha AP. Neuropharmacological evaluation of the putative anxiolytic effects of *Passiflora edulis* Sims, its sub-fractions and flavonoid constituents. Phytother Res. 2006 Dec; 20(12):1067-73. doi:10.1002/ptr.1997.
 18. Sakalem ME, Negri G, Tabach R. Chemical composition of hydroethanolic extracts from five species of the *Passiflora* genus. Rev Bras de Farmacogn. 2012 Dec;22(6): 1219-32. doi:10.1590/S0102-695x2012005000108.
 19. Janda K, Wojtkowska K, Jakubczyk K, Antoniewicz J, Skonieczna-Żydecka K. *Passiflora incarnata* in neuropsychiatric disorders - A Systematic Review. Nutrients. 2020 Dec;12(12): 3894. doi:10.3390/nu12123894.
 20. Patil AS, Lade BD, Paikrao HM. A Scientific Update on *Passiflora foetida*. Eur J of Med Plants. 2015;5(2):145-155. Article no.EJMP.2015.014.
 21. Department of Thai Traditional and Alternative Medicine, Ministry of Public Health. Herbal medicines used in primary health care in ASEAN [Internet]. 2014. [cited 2026 Aug 15]. p. 190-1. Available from: <https://tpd.dtam.moph.go.th/wp-content/uploads/2023/12/Herbal-Medicines-Used-in-Primary-Health-Care-in-ASEAN.pdf>