

การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดโรสแมรินิก ในใบหญ้าหนวดแมวและผลิตภัณฑ์ ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลว ประสิทธิภาพสูงพิเศษ

สิริชัย กระปี่ศรี*, ยาบารียะห์ สะมาแห, กรวิกา จารุพันธ์, ศิริวรรณ ชัยสมบุญพันธ์

สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 88/7 ถนนติวานนท์ ตำบลตลาดขวัญ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000

* ผู้รับผิดชอบบทความ: sirichai.k@dmso.mail.go.th

บทคัดย่อ

บทนำและวัตถุประสงค์: ปัจจุบันในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทยยังไม่พบว่ามีข้อกำหนดมาตรฐานในหัวข้อการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญสำหรับวัตถุดิบหญ้าหนวดแมวและผลิตภัณฑ์ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการสกัดและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดโรสแมรินิก (rosmarinic acid) ในวัตถุดิบใบหญ้าหนวดแมว ยาแคปซูล และยาขง โดยใช้วิธีโครมาโทกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูงพิเศษ (Ultra-High Performance Liquid Chromatography (UHPLC))

วิธีการศึกษา: การศึกษาวิจัยนี้แบ่งเป็น 3 ส่วน 1) พัฒนารูปแบบการสกัดกรดโรสแมรินิกจากวัตถุดิบใบหญ้าหนวดแมวด้วยตัวทำละลาย 50% v/v ethanol โดยวิธี reflux 2) ตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ตามหลักเกณฑ์ ICH guideline ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูงด้วยเครื่อง UHPLC และ 3) วิเคราะห์หาปริมาณกรดโรสแมรินิกในวัตถุดิบใบหญ้าหนวดแมว และผลิตภัณฑ์

ผลการศึกษา: ผลการทดสอบพบว่าวิธีการสกัดกรดโรสแมรินิกจากใบหญ้าหนวดแมวด้วยตัวทำละลาย 50% v/v ethanol โดย reflux เป็น เวลา 30 นาที ซึ่งเป็นสภาวะการสกัดที่เหมาะสม และสภาวะของระบบโครมาโทกราฟีที่เหมาะสมที่ใช้ในการแยกกรดโรสแมรินิก คือ การใช้คอลัมน์ชนิด C18 ขนาด 4.6×150 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร เป็นวัฏภาคคงที่ และสารละลายตัวพาเป็นส่วนผสมระหว่าง acetonitrile และ 0.1% formic acid ในน้ำ (30 : 70) แบบ isocratic อัตราการไหล 0.5 มิลลิตร/นาที เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 330 นาโนเมตร จะปรากฏตำแหน่งของกรดโรสแมรินิกในช่วง 9.6 – 9.7 นาที โดยวิธีดังกล่าวมีความจำเพาะเจาะจงและมีช่วงการวิเคราะห์ที่มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 10 – 140 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ($r \geq 0.9999$) ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์หาค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วง 96.42 – 100.77 ค่า %RSD อยู่ในช่วง 0.74 – 1.91 และมีความทนต่อสภาวะที่เปลี่ยนแปลงไปได้แก่สัดส่วนสารละลายตัวพา อัตราการไหลของตัวพา และอุณหภูมิคอลัมน์ การวิเคราะห์หาปริมาณกรดโรสแมรินิกในวัตถุดิบใบหญ้าหนวดแมว จำนวน 14 ตัวอย่าง มีค่าร้อยละ 0.35 – 2.30 โดยน้ำหนัก และค่าเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 0.60 ± 0.16 โดยน้ำหนัก

อภิปรายผล: วิธีวิเคราะห์หาปริมาณกรดโรสแมรินิกในใบหญ้าหนวดแมว ที่พัฒนาขึ้นนี้มีข้อได้เปรียบเหนือกว่าวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณกรดโรสแมรินิกในมอโนกราฟีหญ้าหนวดแมวของ European Pharmacopoeia 11.0 ในแง่ของความเรียบง่าย และเวลาที่รวดเร็วในวิธีเตรียมตัวอย่างและการเตรียมวัฏภาคเคลื่อนที่ รวมทั้งวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวมี retention time ของ rosmarinic acid peak ที่ 9.7 นาที ซึ่งน้อยกว่าวิธีวิเคราะห์ของ European Pharmacopoeia

11.0 ที่มี retention time ของ rosmarinic acid peak ที่ 11.0 นาที นอกจากนี้วิธีดังกล่าวยังใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดโรสแมรินิกในผลิตภัณฑ์หญาหนดแมวได้อีกด้วย

ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ: วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นวิธีที่มีประโยชน์ ไม่เพียงแต่สำหรับหาปริมาณกรดโรสแมรินิกเท่านั้น แต่ยังรวมถึงการกำหนดมาตรฐานปริมาณกรดโรสแมรินิกในหญาหนดแมว เพื่อนำไปเพิ่มเติมเป็นข้อกำหนดปริมาณกรดโรสแมรินิก (Rosmarinic acid content) ของมอโนกราฟหญาหนดแมว รวมถึงผลิตภัณฑ์หญาหนดแมว เพื่อใช้สำหรับการจัดทำมอโนกราฟผลิตภัณฑ์หญาหนดแมว และการตีพิมพ์ในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia) ฉบับใหม่ในอนาคต

คำสำคัญ: โครมาโทกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูงพิเศษ, โรสแมรินิกแอซิด, หญาหนดแมว

Development and Validation of Analytical Method for Quantitative Analysis of Rosmarinic Acid from *Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq. Leaf and Its Finished Products by Ultra-High Performance Liquid Chromatography

Sirichai Krabesri*, Yabareeyah Samahae, Kornvika Charupant, Siriwan Chaisomboonpan

Bureau of Drug and Narcotic, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, 88/7 Tiwanon Road, Talat Khwan Subdistrict, Mueang District, Nonthaburi Province 11000, Thailand

*Corresponding author: sirichai.k@dmasc.mail.go.th

Abstract

Introduction and Objectives: The current Thai Herbal Pharmacopoeia (THP) lacks the specification for the quantitative determination of active marker in both the raw material of *Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq. (Ya Nuat Maeo in Thai) or Java tea and its finished products. This study aimed to develop an extraction method and validate an analytical method for rosmarinic acid content in this medicinal plant and its finished products, namely, capsule and herbal tea.

Methods: This research was divided into three parts: 1) development of an extraction method for rosmarinic acid from ground *O. aristatus* leaf using reflux extraction with 50% v/v ethanol; 2) validation of the analytical method using Ultra-High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) in accordance with ICH guideline; and 3) determination of rosmarinic acid content in raw material and its finished products.

Results: The optimal condition for the extraction of rosmarinic acid from ground *O. aristatus* leaf was determined to be reflux extraction using 50% v/v ethanol for 30 minutes. The optimized chromatographic system utilized a C18 column (4.6 × 150 mm, 5 μm) as the stationary phase. The mobile phase consisted of an isocratic mixture of acetonitrile and 0.1% formic acid in water (30 : 70), with a flow rate of 0.5 ml/min and UV detection at 330 nm. Under these conditions, the peak for rosmarinic acid appeared at a retention time of 9.6 – 9.7 minutes. The method demonstrated high specificity and excellent linearity within the concentration range of 10 – 140 μg/ml, with a correlation coefficient ($r \geq 0.9999$). The accuracy study was confirmed with % recovery ranging from 96.42 – 100.77 with % relative standard deviation (% RSD) values between 0.74 – 1.91. Furthermore, the method exhibited robustness against variations in mobile phase proportions, flow rate, and column temperature. The analysis of 14 samples of Java tea revealed rosmarinic acid contents ranging from 0.35% to 2.30% w/w, with a mean of 0.60 ± 0.16 % w/w.

Discussion: This developed method for quantifying rosmarinic acid in Java tea offers distinct advantages over the European Pharmacopoeia 11.0 method. It provides greater simplicity and speed in both sample and mobile phase preparation. Furthermore, the proposed method yields a shorter retention time for the rosmarinic acid peak at 9.7 minutes, compared to 11.0 minutes in the European Pharmacopoeia 11.0 method. Additionally, this validated method was successfully applied to determine the rosmarinic acid content in commercial Java tea products as well.

Conclusion: This validated analytical method serves as a valuable tool for not only determining the rosmarinic acid content, but also standardizing the rosmarinic acid content in Java tea, to be added under the requirements on rosmarinic acid content in the Ya Nuat Maeo monograph in THP, including in its commercial medicinal products for future preparation of product monographs and publication in the new edition of Thai Herbal Pharmacopoeia.

Keywords: *Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq., rosmarinic acid, UHPLC

บทนำและวัตถุประสงค์

หญ้าหนวดแมว (Java tea) หรือ พยับเมฆ มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq. เป็นพืชสมุนไพรในวงศ์ Lamiaceae^[1] ที่มีการใช้มาอย่างยาวนานในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมถึงประเทศไทย^[2-3] หญ้าหนวดแมวมีสรรพคุณลดไข้ ขับปัสสาวะ ขับน้ำ และยังสามารถใช้รักษาโรคกระเพาะปัสสาวะอักเสบ โรคเบาหวาน โรคไขข้ออักเสบ เป็นต้น^[2, 4-8] ปัจจุบันหญ้าหนวดแมวได้รับการบรรจุอยู่ในบัญชียาหลักแห่งชาติด้านสมุนไพร ชนิดยาชง^[2] และนอกจากนี้ยังมีจำหน่ายเป็นชนิดยาแคปซูลในท้องตลาดด้วย มีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีพบว่าส่วนใหญ่เป็นสารกลุ่ม phenolic compound ได้แก่ rosmarinic acid (Figure 1), 3'-hydroxy-5, 6, 7, 4'-tetramethoxyflavone (TMF), sinensetin และ eupatorin เป็นต้น^[9]

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารสกัดจากหญ้าหนวดแมวมีฤทธิ์ต้านการสร้างหลอดเลือดใหม่^[4] ต้านเบาหวาน^[7-8] ต้านอนุมูลอิสระ^[9-12] ต้านการอักเสบ^[12] ต้านมะเร็งต่อมลูกหมาก^[13] โดยสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาคือ rosmarinic acid ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลาย เช่น ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ และช่วยป้องกันการสะสมของพริกนุ่นไนโต^[4-5] ดังนั้น rosmarinic acid จึงเป็นสารสำคัญที่สามารถใช้เป็นเครื่องชี้วัดคุณภาพในหญ้าหนวดแมวซึ่งสอดคล้องกับใน European Pharmacopoeia 11.0 อย่างไรก็ตามในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทยฉบับปัจจุบัน ปี ค.ศ. 2021 (Thai Herbal Pharmacopoeia 2021: THP2021) ฉบับปัจจุบัน พบว่ามีข้อกำหนดมาตรฐานของหญ้าหนวดแมว ในด้านการตรวจ

พิสูจน์เอกลักษณ์และค่าทางฟิสิกส์-เคมีไว้แล้ว แต่ยังไม่มีการกำหนดมาตรฐานในหัวข้อการหาปริมาณสารสำคัญไว้สำหรับวัตถุดิบ และยังไม่มีความมาตรฐานของผลิตภัณฑ์ด้วย^[1] การกำหนดเกณฑ์มาตรฐานดังกล่าวจะช่วยควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์ ทำให้สามารถรับประกันความสม่ำเสมอของปริมาณสารสำคัญในแต่ละรุ่นการผลิต (batch) ซึ่งส่งผลต่อประสิทธิผลในการรักษาของผู้ป่วยได้

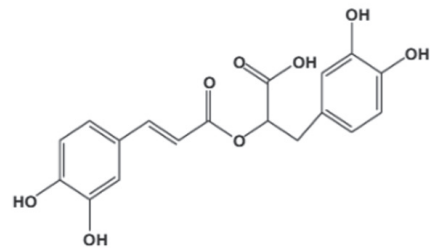


Figure 1 Chemical structure of rosmarinic acid

การหาปริมาณ rosmarinic acid นั้น สามารถใช้วิธีทางโครมาโทกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง (High-Performance Liquid Chromatography: HPLC) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่สำคัญสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในสมุนไพร เนื่องจากมีความถูกต้อง (accuracy) ความแม่นยำ (precision) และความจำเพาะเจาะจง (specificity) สูง^[14] แม้ไว้ใน European Pharmacopoeia 11.0 จะมีโมโนกราฟหญ้าหนวดแมว ซึ่งมีข้อกำหนดและวิธีการหาปริมาณสาร rosmarinic acid โดยวิธี HPLC อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวมีการเตรียมสารละลายตัวพา (mobile phase) ที่ค่อนข้างซับซ้อน อีกทั้ง retention time ของ rosmarinic acid ปรากฏที่ 11 นาที นอกจากนี้ตำรายังกล่าวยังไม่มียาโมโนกราฟ และวิธีมาตรฐานของการวิเคราะห์หาปริมาณ rosmarinic acid ใน

ผลิตภัณฑ์ชนิดยาแคปซูล และยาขง^[15] อีกทั้งในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาที่พัฒนาวิธีในการตรวจผลิตภัณฑ์ดังกล่าว จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาวิธีมาตรฐาน รวมถึงการหาค่ามาตรฐานของ rosmarinic acid และตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation) ให้ครอบคลุมวัตถุดิบ และผลิตภัณฑ์หยาบหนวดแมวตามแนวทางของ ICH guideline^[16] เพื่อให้มั่นใจว่าวิธีที่พัฒนานั้นสามารถนำไปใช้งานได้จริงในห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพยาสมุนไพร

ดังนั้น การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ rosmarinic acid ในวัตถุดิบใบหยาบหนวดแมว ยาแคปซูล และยาขง โดยใช้วิธี Ultra-High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) สำหรับนำข้อมูลที่ได้ไปเสนอเป็นข้อกำหนดมาตรฐานของวัตถุดิบใบหยาบหนวดแมวเพิ่มเติมในข้อกำหนดปริมาณ rosmarinic acid (Rosmarinic acid content) ซึ่งต้องกำหนดทั้งปริมาณขั้นต่ำของ rosmarinic acid และวิธีวิเคราะห์ รวมทั้งเพื่อนำข้อมูลไปจัดทำมาตรฐานแคปซูลหยาบหนวดแมวและยาขงหยาบหนวดแมว สำหรับบรรจุลงในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทยเพื่อใช้เป็นมาตรฐานอ้างอิงต่อไป

ระเบียบวิธีศึกษา

1. วัสดุ

1.1 สารมาตรฐาน

Rosmarinic acid ความบริสุทธิ์ > 99.06% (Lot: 268907, PhytoLab, Germany)

1.2 สารเคมีและตัวทำละลาย

acetonitrile (HPLC grade, Fisher Scientific, UK), ethanol (HPLC grade, CARLO ERBA,

Italy), water type I ผลิตจาก Milli-Q® IQ 7000 (Merck, Germany), formic acid (AR grade, Sigma-Aldrich, Merck, Germany)

1.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

Ultra-High Performance Liquid Chromatograph (UHPLC) รุ่น Ultimate 3000 (Thermo Scientific, USA), คอลัมน์ Verticep® C18 ขนาด 4.6×150 มิลลิเมตร, 5 ไมโครเมตร, guard cartridge Verticep® C18 ขนาด 4.6×10 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร (Vertical Chromatography Co., Ltd., Thailand), เครื่องเขย่าความถี่สูง (Sonicator) รุ่น Branson 1200 (Branson, USA), ชุด reflux, เตาไฟฟ้า, กระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman®, China), PVDF (HL) syringe filter ขนาด $0.2 \mu\text{m}$ (Thermo Scientific, USA), เครื่องบดบั่น, เครื่องชั่งรุ่น XP 205DR (Mettler Toledo, Switzerland), เครื่องชั่งรุ่น XP2U (Mettler Toledo, Switzerland), เครื่องแก้ว

1.4 ตัวอย่างหยาบหนวดแมวและผลิตภัณฑ์

ตัวอย่างวัตถุดิบใบ รวมยอดอ่อน (stem tip) ของหยาบหนวดแมวแห้ง จำนวน 11 แหล่งตัวอย่าง ได้จากจังหวัดหนองบัวลำภู สิงห์บุรี อ่างทอง นครปฐม นครนายก ปราจีนบุรี ราชบุรี อุตรดิตถ์ นนทบุรี แหล่งละ 1 ตัวอย่าง และกรุงเทพฯ 2 ตัวอย่าง ส่วนตัวอย่างสดได้จากจังหวัดเชียงราย 1 ตัวอย่าง และ นนทบุรี 2 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 14 ตัวอย่างนำตัวอย่างทั้งหมดไปอบที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมงตัวอย่างดังกล่าวผ่านการตรวจระบุชนิด (plant identification) ตามข้อกำหนดของตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ซื้อจากท้องตลาดเป็นยาที่มีเลขทะเบียนยา G ประกอบด้วย ผลิตภัณฑ์ยาชนิดแคปซูลจาก 3 บริษัท และยาขงจาก 2 บริษัท ทั้งนี้

ตัวอย่างที่กล่าวข้างต้นต้องผ่านการบดเป็นผงและผ่านแรงเบอร์ 30 ก่อนที่จะนำไปทดสอบ

2. วิธีการศึกษา

2.1 การพัฒนาวิธีการสกัดหยาบหนวดแมว

พัฒนาวิธีสกัดหยาบหนวดแมวเพื่อให้ได้วิธีสกัดที่เหมาะสม และหาปริมาณ rosmarinic acid ด้วยเครื่อง UHPLC

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

กรณีเปรียบเทียบวิธีการสกัดตัวอย่างเพื่อให้ได้วิธีสกัดที่เหมาะสม เตรียมสารละลายของผงใบหนวดแมวโดยดัดแปลงการสกัดจากวิธี reflux ของ European Pharmacopoeia 11.0^[15] ซึ่งสกัดผงใบหนวดแมวจำนวน 0.1 กรัม โดยชั่งละเอียดเทคนิค 4 ตำแหน่ง ด้วย 50% v/v ethanol ปริมาตร 18 มิลลิลิตร โดยวิธี reflux หรือ sonicate เป็นเวลา 30 นาที กรอง ปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลายเดียวกันให้ครบ 20 มิลลิลิตร และกรองผ่าน PVDF (HL) syringe filter 0.2 μm โดยเปรียบเทียบกับวิธีสกัดของ European Pharmacopoeia 11.0^[15] ซึ่งสกัดผงใบหนวดแมวจำนวน 0.5 กรัม โดยชั่งละเอียดเทคนิค 4 ตำแหน่ง ด้วย 50% v/v ethanol ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ด้วยวิธี reflux เป็นเวลา 30 นาที กรอง ปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลายเดียวกันให้ครบ 100 มิลลิลิตร และกรอง

ส่วนของผลิตภัณฑ์ชนิดแคปซูล และยาขงใช้วิธีสกัดแบบวัตถุดิบโดยชั่งผงยาจากผลิตภัณฑ์ดังกล่าวให้มีปริมาณผงหนวดแมวจำนวน 0.1 กรัม โดยชั่งละเอียดเทคนิค 4 ตำแหน่ง สกัดด้วย 50% v/v ethanol ปริมาตร 18 มิลลิลิตร ด้วยวิธี reflux

เนื่องจากผลิตภัณฑ์ดังกล่าวบรรจุด้วยผงใบหนวดแมวที่บดแล้วซึ่งมีเมทริกซ์ในลักษณะเดียวกัน

2.2 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสาร rosmarinic acid

2.2.1 วิธีวิเคราะห์

การพัฒนาวิเคราะห์ด้วย UHPLC ต้องเลือกใช้คอลัมน์ และตรวจวัดด้วย ความยาวคลื่นที่เหมาะสม รวมทั้งมีการปรับอัตราส่วนของสารละลายตัวพา และหาเวลาการเคลื่อนที่ที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์สาร rosmarinic acid เพื่อให้วิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็ว ถูกต้อง และมีความแม่นยำ (accuracy)

2.2.1.1 การสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve)

ซึ่งสารมาตรฐาน rosmarinic acid 10.0 มิลลิกรัม โดยชั่งละเอียดเทคนิค 7 ตำแหน่ง ใน volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำ 50% v/v ethanol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าแล้วปรับปริมาตรจนครบเพื่อเตรียมสารละลายมาตรฐานตั้งต้น และเตรียมสารละลายมาตรฐาน rosmarinic acid จากสารละลายมาตรฐานตั้งต้น เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 20 - 140 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2.1.2 สภาวะเครื่องโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูงพิเศษ

ในการทดสอบวิธีวิเคราะห์นี้ใช้คอลัมน์ Verticep® ชนิด C18 ขนาด 4.6 × 150 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร และ guard cartridge Verticep® C18 ขนาด 4.6 × 10 มิลลิเมตร อนุภาค 5 ไมโครเมตร ตั้งค่าอุณหภูมิคอลัมน์ที่ 25 °C สารละลายตัวพาเป็นส่วนผสมระหว่าง acetonitrile และ 0.1 % formic acid ในน้ำ ในอัตราส่วน 30 : 70 แบบ isocratic อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตร/นาที

ปริมาตรการฉีด 20 ไมโครลิตร และตรวจวัดด้วยอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 330 นาโนเมตร

2.2.1.3 ความเหมาะสมของระบบ (system suitability)

ฉีดสารละลายมาตรฐาน rosmarinic acid ความเข้มข้น 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 5 ซ้ำ เพื่อตรวจสอบความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟ ต้องมีค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% relative standard deviation: %RSD) ไม่เกิน 2.00 ก่อนการสร้างกราฟมาตรฐาน

2.2.2 การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (method validation)

เป็นการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสาร rosmarinic acid ในหญ้าหนวดแมว และในผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาขึ้นตามแนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมี^[16] โดยมีรายละเอียดดังนี้

2.2.2.1 การทดสอบความจำเพาะ (specificity)

เตรียมสารละลายมาตรฐาน rosmarinic acid ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากข้อ 2.2.1.1 และสารละลายตัวอย่างหญ้าหนวดแมว และผลิตภัณฑ์หญ้าหนวดแมวที่สกัดโดยวิธี reflux จากข้อ 2.1 และวิเคราะห์สารละลายข้างต้นภายใต้สภาวะ UHPLC ที่พัฒนาขึ้น โดยโครมาโทแกรมของสารละลายตัวอย่างดังกล่าวจะต้องมีค่า retention time ของ rosmarinic acid peak สอดคล้องกับสารละลายมาตรฐาน และไม่มีสัญญาณจากสารอื่น ๆ รบกวน ใน rosmarinic acid peak ด้วย

2.2.2.2 การทดสอบความเป็นเส้นตรง และช่วงของการวิเคราะห์ (linearity and range)

เตรียมสารละลายมาตรฐาน rosmarinic

acid โดยซึ่งสารมาตรฐาน rosmarinic acid จำนวน 10.0 มิลลิกรัม โดยซึ่งละลายเจือจางด้วย 7 ตำแหน่งละลายด้วย 50% v/v ethanol และปรับปริมาตรใน volumetric flask จนครบ 50 มิลลิลิตร จะได้ stock solution ของสารละลายมาตรฐาน rosmarinic acid ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แล้วเจือจางให้ได้สารละลายในช่วงระดับความเข้มข้น คือ 10 - 140 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร วิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน rosmarinic acid ที่เตรียมได้ด้วยเครื่อง UHPLC ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ และนำค่าพื้นที่ใต้กราฟ และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน rosmarinic acid ไปสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) โดยมีเกณฑ์การยอมรับคือค่า r ต้องมีค่าไม่น้อยกว่า 0.995

2.2.2.3 การทดสอบความแม่นยำ (accuracy) โดยการทดสอบหาร้อยละของการคืนกลับ (% recovery)

เตรียม sample blank (sample blank คือ ตัวอย่างหญ้าหนวดแมวที่นำมาสกัดและตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ rosmarinic acid แล้วพบว่าไม่มีปริมาณสาร rosmarinic acid ในปริมาณน้อย) หรือในกรณี sample blank ของผลิตภัณฑ์เตรียมจากผงยาจากผลิตภัณฑ์ชนิดแคปซูล หรือยาขง โดยสกัดผงหญ้าหนวดแมวดังกล่าว จำนวน 0.1 กรัม ด้วย 50% v/v ethanol ปริมาตร 18 มิลลิลิตร โดยวิธี reflux เป็นเวลา 30 นาที กรองและปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลายเดียวกันให้ครบ 20 มิลลิลิตร กรองผ่าน PVDF (HL) syringe filter 0.2 μ m นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC จำนวน 3 ซ้ำ แล้ว นำมาหาค่าเฉลี่ย (mean)

เตรียม spiked sample โดยเติมสารละลายสาร

มาตรฐาน rosmarinic acid ที่ 3 ระดับความเข้มข้น ซึ่งเป็นจุดต่ำสุด จุดกึ่งกลาง และจุดสูงสุดของช่วงใช้งานลงใน sample blank ระดับละ 3 ซ้ำ จากนั้น นำสารละลาย spiked sample ที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณสาร rosmarinic acid ด้วยเครื่อง UHPLC ความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ คำนวณหาค่า % recovery ที่แต่ละระดับความเข้มข้น, ร้อยละเฉลี่ยของการคืนกลับ (% mean recovery), และ % RSD โดยมีเกณฑ์การยอมรับคือ % mean recovery ต้องอยู่ในช่วง 95.00 - 105.00 และ % RSD ต้องไม่เกิน 2.00

2.2.2.4 การทดสอบสภาพทำซ้ำได้ (repeatability) และความเที่ยง (precision)

Repeatability: ทำโดยวิเคราะห์หาปริมาณสาร rosmarinic acid ในสารละลายของใบหญ้าหนวดแมว ผลิตภัณฑ์ยาแคปซูล หรือยาขง ซ้ำ 6 ครั้ง ในวันเดียวกัน คำนวณหา % RSD โดยเกณฑ์การยอมรับ คือ % RSD ต้องไม่เกิน 2.00

Intermediate precision: ทำโดยวิเคราะห์หาปริมาณสาร rosmarinic acid ในสารละลายใบหญ้าหนวดแมว ผลิตภัณฑ์ยาแคปซูล หรือ ยาขง 6 ซ้ำ ในสภาวะเดียวกับข้างต้นแต่เปลี่ยนนักวิเคราะห์ วัน และเวลา คำนวณหา % RSD โดยเกณฑ์การยอมรับคือ % RSD ต้องไม่เกิน 2.00

2.2.2.5 ความทนของวิธี (robustness)

ทดสอบความทนของวิธี (robustness) โดยทดลองเปลี่ยนสภาวะของเครื่อง UHPLC ได้แก่ เปลี่ยนสัดส่วนสารละลายตัวพา เปลี่ยนอัตราการไหลของตัวพา หรือเปลี่ยนอุณหภูมิของคอลัมน์ ดังนี้

- เปลี่ยนสัดส่วนสารละลายตัวพา คือ อัตราส่วนผสมระหว่าง acetonitrile และ 0.1% formic acid เป็น 28 : 72, 30 : 70 และ 32 : 68

- เปลี่ยนอัตราการไหลของตัวพาเป็น 0.4, 0.5 และ 0.6 มิลลิลิตร/นาที

- เปลี่ยนอุณหภูมิของคอลัมน์เป็น 23.0, 25.0 และ 27.0 องศาเซลเซียส

ฉีดสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง เข้าเครื่อง UHPLC อย่างละ 3 ซ้ำ โดยเปลี่ยนสภาวะหนึ่งในสภาวะข้างต้น และคงอีกสองสภาวะที่เหลือไว้ ทำสลับเช่นนี้จนครบทั้งสามสภาวะดังกล่าว นำค่า peak area ของสาร rosmarinic acid มาคำนวณหาปริมาณ และใช้คำนวณหาค่า %RSD โดยเกณฑ์การยอมรับ คือ % RSD ต้องไม่เกิน 2.00

2.2.2.6 Filter effect

แม้ว่าการทดสอบนี้ไม่ใช่เกณฑ์การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ของ ICH guideline^[16] แต่การดูดซับสารสำคัญในตัวอย่างโดยการกรองผ่านเมมเบรนฟิลเตอร์ (membrane filter) แต่ละชนิดอาจเกิดขึ้นได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทดสอบว่า membrane filter ดังกล่าวต้องไม่มีผลต่อการวิเคราะห์^[17] และมีการศึกษาก่อนหน้านี้ว่าสารที่มีคุณสมบัติเป็นกรด เช่น benzoic acid อาจมีการสูญเสียของสารจากการดูดซับ (% adsorption loss) โดย PVDF filter ในตัวทำละลาย acetonitrile ซึ่งมีค่า % adsorption loss 0.18 - 7.82^[18]

เตรียมสารละลายตัวอย่างของใบหญ้าหนวดแมวจำนวน 4 ตัวอย่าง ดังที่อธิบายในหัวข้อการเตรียมสารละลายตัวอย่าง จากนั้นกรอง และไม่กรองผ่าน PVDF (HL) syringe filter ฉีดเข้าเครื่อง UHPLC อย่างละ 2 ซ้ำ คำนวณหาค่าร้อยละความแตกต่างของพื้นที่ใต้พีค (% difference of peak area) ของสารละลายตัวอย่างที่กรองเปรียบเทียบกับที่ไม่ได้กรองโดยเกณฑ์ผ่าน คือ ค่าไม่มากกว่า 2.00

$$\% \text{ difference} = \frac{(\text{peak area of filtered sample} - \text{peak area of nonfiltered sample})}{\text{peak area of nonfiltered sample}} \times 100$$

3. การวิเคราะห์หาปริมาณสาร rosmarinic acid ในหญ้าหนวดแมว

เตรียมสารละลายหญ้าหนวดแมว จำนวน 14 ตัวอย่าง สกัดหญ้าหนวดแมว ตัวอย่างละ 0.1 กรัม โดยชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง โดยวิธี reflux ด้วย 50% v/v ethanol ปริมาตร 18 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที กรองและปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลายเดียวกัน จนครบ 20 มิลลิลิตร กรองผ่าน PVDF (HL) syringe filter นำสารละลายหญ้าหนวดแมว ที่ได้ไป วิเคราะห์ ด้วยเครื่อง UHPLC ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น สารละลาย ละ 2 ซ้ำ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย (mean)

การคำนวณค่าความเข้มข้นของสาร rosmarinic acid ที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่าง คำนวณเป็นร้อยละ โดยน้ำหนักตัวอย่างหญ้าหนวดแมว (% w/w)

4. การวิเคราะห์ปริมาณสาร rosmarinic acid ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์

เตรียมสารละลายโดยสกัดหญ้าหนวดแมวจาก ผลิตภัณฑ์ที่มีจำหน่ายในท้องตลาด และมีการขึ้น ทะเบียนยา ได้แก่ยาแคปซูล จำนวน 3 ตัวอย่าง และยา ชง จำนวน 2 ตัวอย่าง โดยนำผงยาออกจาก 20 แคปซูล หรือ ในกรณียาชง 20 ชอง แล้วนำไปบดผ่านแรงมี ขนาดเบอร์ 30 ซึ่งตัวอย่างให้มีปริมาณหญ้าหนวดแมว ละ 0.1 กรัม โดยชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง มา สกัดโดยวิธี reflux ด้วย 50% v/v ethanol ปริมาตร 18 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที กรอง และปรับปริมาตร ด้วยตัวทำละลายเดียวกันจนครบ 20 มิลลิลิตร กรอง ผ่าน PVDF (HL) syringe filter นำสารละลายของ

แคปซูล หรือยาชงหญ้าหนวดแมวที่ได้ไปวิเคราะห์ ด้วยเครื่อง UHPLC ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น สารละลาย ละ 2 ซ้ำ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย (mean)

การคำนวณปริมาณสาร rosmarinic acid ที่ วิเคราะห์ได้จากตัวอย่าง คำนวณเป็นร้อยละโดย น้ำหนักตัวอย่างหญ้าหนวดแมวในแคปซูลและยาชง (% w/w) รวมทั้งปริมาณต่อแคปซูล หรือต่อชอง

ผลการศึกษา

1. ผลการพัฒนาวิธีการสกัดหญ้าหนวดแมว

ผลการเปรียบเทียบการสกัด พบว่าการสกัดผง ใบหญ้าหนวดแมว จำนวน 0.1 กรัม ด้วย 50% v/v ethanol ปริมาตร 18 มิลลิลิตร โดยวิธี reflux เป็น เวลา 30 นาที กรองและปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลาย เดียวกันให้ครบ 20 มิลลิลิตร ได้ปริมาณ rosmarinic acid ดีกว่าการสกัดด้วย ultrasonic bath และไม่ ต่างกับวิธี reflux ของ European Pharmacopoeia 11.0^[15] (Table 1)

ส่วนผลการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานของ rosmarinic acid และสารละลายของหญ้าหนวดแมว และผลิตภัณฑ์ ด้วยเครื่อง UHPLC พบว่าสภาวะของ ระบบโครมาโทกราฟี (Table 2) ที่พัฒนาขึ้นเป็นสภาวะ มีความเหมาะสมในการแยกสาร rosmarinic acid ไม่ พบการซ้อนทับกันของ peak ของสาร rosmarinic acid กับสารอื่น และปรากฏตำแหน่ง peak ของสาร rosmarinic acid ที่ retention time ในช่วง 9.6 - 9.7 นาที (Figures 2 - 4)

Table 1 Comparison of rosmarinic acid contents of powdered Java Tea obtained from reflux and sonication extractions in various conditions for 30 minutes

Samples	Rosmarinic acid contents (% w/w)		
	Reflux extraction (0.1 g of sample in 50% ethanol 20 ml)	Reflux extraction (0.5 g of sample in 50% ethanol 100 ml) ^[15]	Sonication (0.1 g of sample in 50% ethanol 20 ml)
1	0.57	0.54	0.48
2	0.62	0.60	0.48
3	0.35	0.36	0.31
4	0.66	0.64	0.55
5	0.66	0.63	0.55
6	0.54	0.50	0.43

Table 2 Suitable chromatographic system for separating rosmarinic acid by UHPLC

UHPLC Conditions	
Stationary phase	Verticep [®] C18, 4.6 × 150 mm, 5 µm particle size and guard cartridge C18 ขนาด 4.6 × 150 mm, 5 µm particle size
Column temperature	25 °C
Mobile phase	acetonitrile : 0.1% formic acid (30 : 70), isocratic
Flow rate	0.5 ml/min
Detector condition	330 nm
Injection volume	20 µl
System suitability	% RSD ≤ 2.00

2. ผลการพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสาร rosmarinic acid

ความเหมาะสมของระบบ (system suitability)

พบว่าการฉีดสารละลายมาตรฐาน rosmarinic acid ความเข้มข้น 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 5 ซ้ำ เพื่อตรวจสอบความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟีมีค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) เท่ากับ 0.15 ซึ่งไม่เกิน 2.00

ผลการทดสอบความจำเพาะ (specificity)

ผลจากการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน และ สารละลายตัวอย่างพบว่า ภายใต้สภาวะ UHPLC ที่พัฒนาขึ้น สามารถแยกสาร rosmarinic acid ออกจากสารอื่นได้ และไม่มีการรบกวนของสารอื่นในตัวอย่าง โดยมีค่า retention time เท่ากับ 9.710 - 9.730 นาที (Figures 2 - 4)

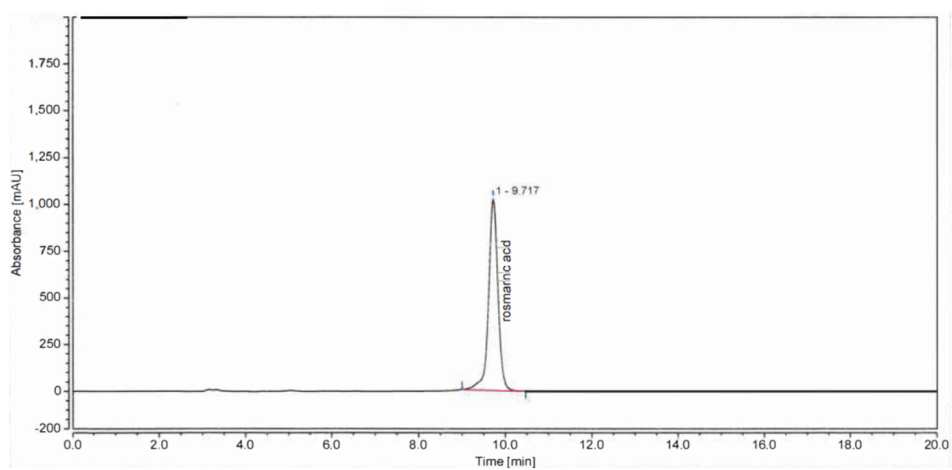


Figure 2 Chromatogram of rosmarinic acid standard

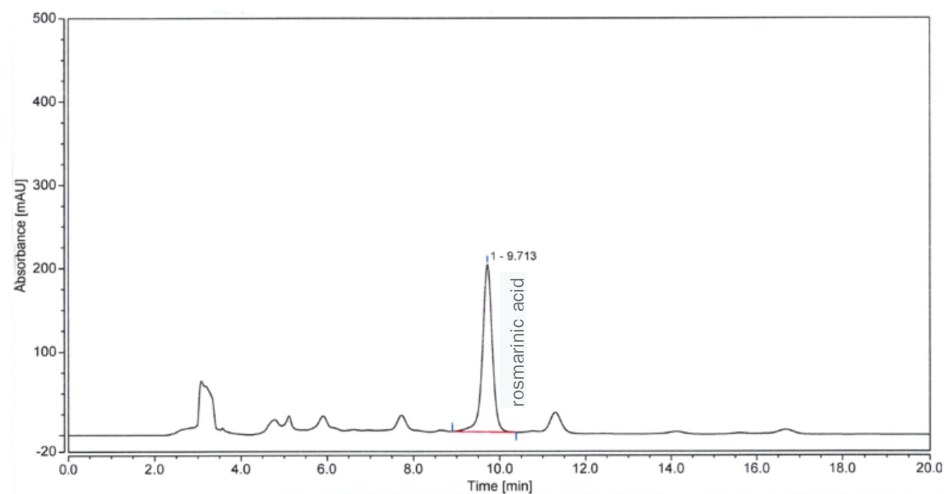


Figure 3 Chromatogram of powdered Java tea

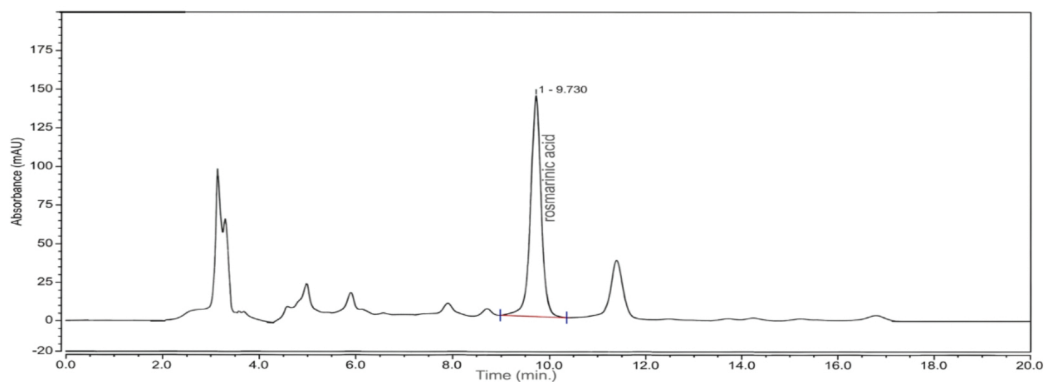


Figure 4 Chromatogram of powdered Java tea product

ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (linearity and range)

ผลจากการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน rosmarinic acid ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ 8 ระดับ ตั้งแต่ 10 - 140 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบว่า

ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน rosmarinic acid กับพื้นที่ใต้กราฟมีลักษณะเป็นเส้นตรงตลอดช่วงความเข้มข้นที่วิเคราะห์ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9999 ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับ (Figure 5)

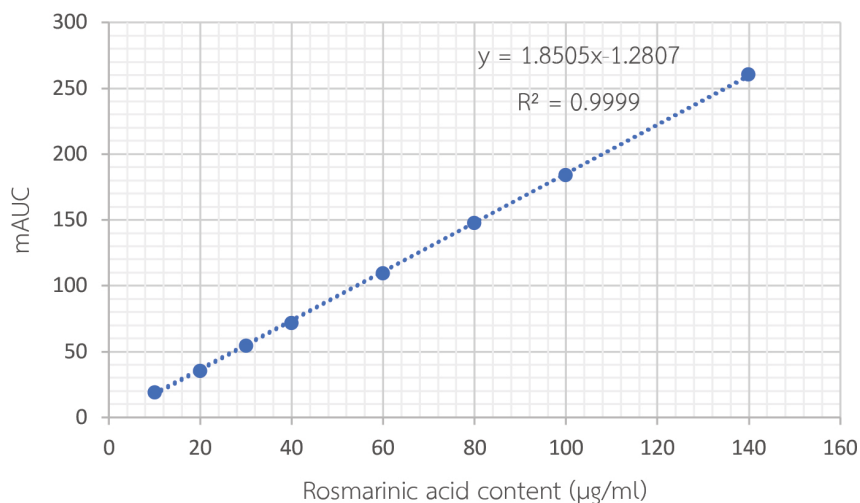


Figure 5 Calibration curve of rosmarinic acid standard solutions

ผลการทดสอบความแม่นยำ (accuracy) โดยผลการทดสอบร้อยละของการคืนกลับ (% recovery)

ผลการศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณสาร rosmarinic acid ใน sample blank ที่เตรียมจากผงใบหญ้าหนวดแมว ผลิตรากันต์ชนิดแคปซูล หรือ ยาขง โดยทำการวิเคราะห์จำนวน 3 ซ้ำ และผลการศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณสาร rosmarinic acid ใน spiked sample

ที่เตรียมได้จากการเติมสารละลายสารมาตรฐาน rosmarinic acid ที่ 3 ระดับความเข้มข้น ลงใน sample blank ข้างต้น ระดับละ 3 ซ้ำ โดยทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ พบว่าค่าร้อยละของการคืนกลับ (% recovery) ในทุกระดับความเข้มข้นอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ในช่วงร้อยละ 96.42 - 100.77 และมี % RSD ไม่เกิน 2.00 (Table 3)

Table 3 Accuracy test results of rosmarinic acid analyses in Java tea and its finished products

Sample	Spiked concentration	% Recovery			% Mean recovery	% RSD	Acceptance criteria
		Injection					
	(mg/ml)	1	2	3			
1. Powdered Java tea	0.01	98.40	99.07	101.43	99.63	1.60	95.00 – 105.00
	0.02	98.79	102.64	100.88	100.77	1.91	95.00 – 105.00
	0.03	98.85	100.93	97.39	99.06	1.80	95.00 – 105.00
2. Capsule	0.01	97.66	96.35	96.53	96.85	0.74	95.00 – 105.00
	0.02	97.06	95.21	96.97	96.42	1.08	95.00 – 105.00
	0.03	97.84	96.28	98.75	97.62	1.28	95.00 – 105.00
3. Tea	0.01	100.51	97.53	98.29	98.78	1.57	95.00 – 105.00
	0.02	95.01	94.53	97.92	95.82	1.91	95.00 – 105.00
	0.03	96.41	95.72	97.97	96.70	1.19	95.00 – 105.00

ผลการทดสอบความเที่ยง (precision)**1) Repeatability**

ผลการศึกษาความเที่ยงการวิเคราะห์ปริมาณสาร rosmarinic acid ในตัวอย่างของใบหญ้าหนวดแมว ผลิตภัณฑ์ชนิดแคปซูล หรือยาขง จากการวิเคราะห์ซ้ำ 6 ครั้งในวันเดียวกัน พบว่ามีร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) เท่ากับ 1.33, 1.21, 1.42 ตามลำดับ (Table 4) ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับ

2) Intermediate precision, inter-day

ผลการศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณสาร rosmarinic acid ในตัวอย่างของใบหญ้าหนวดแมว ผลิตภัณฑ์ชนิดแคปซูล หรือยาขง 6 ซ้ำ โดยเปลี่ยนนักวิเคราะห์ และวันที่วิเคราะห์ พบว่ามีร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) เท่ากับ 1.42, 1.50, 1.61 ตามลำดับ (Table 4) ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับ

Table 4 Precision test results of rosmarinic acid analyses in Java tea and its finished products

Sample	Repeatability	Intermediate precision	Acceptance criteria of
	% RSD	% RSD	% RSD
1. Powdered Java tea	1.33	1.42	≤ 2.00
2. Capsule	1.21	1.50	≤ 2.00
3. Tea	1.42	1.61	≤ 2.00

ผลการทดสอบความทนของวิธี (robustness)

ผลการทดสอบความทนของวิธีโดยเปลี่ยนสัดส่วนสารละลายตัวพา เปลี่ยนอัตราการไหลของตัว

พา และเปลี่ยนอุณหภูมิของคอลัมน์ พบว่า % RSD อยู่ในช่วง 0.17 - 1.23 (Table 5)

Table 5 Robustness test results of rosmarinic acid analyses in Java tea and its finished products

Sample	Mobile phase (Acetonitrile: 0.1%formic acid)	% RSD	Flow rate (ml/min)	% RSD	Temperature (°C)	% RSD
1. Powdered Java tea	28 : 72	0.17	0.40	0.82	23.00	0.97
	30 : 70	0.30	0.50	0.30	25.00	0.40
	32 : 68	1.08	0.60	1.23	27.00	0.70
2. Capsule	28 : 72	0.35	0.40	0.50	23.00	0.90
	30 : 70	0.40	0.50	0.40	25.00	0.20
	32 : 68	0.58	0.60	0.43	27.00	0.80
3. Tea	28 : 72	0.87	0.40	0.43	23.00	0.22
	30 : 70	0.50	0.50	0.50	25.00	0.30
	32 : 68	0.67	0.60	0.68	27.00	0.40

ผลการทดสอบ Filter effect

ผลการทดสอบ Filter effect ในตัวอย่างใบ
หญ้าหนวดแมวที่สุ่มมา จำนวน 4 ตัวอย่าง พบว่า

% difference ของ peak area ของสารละลายตัวอย่าง
ที่กรองเปรียบเทียบกับที่ไม่ได้กรองอยู่ในช่วง 0.04 -
0.62 โดยเกณฑ์ผ่าน คือ ค่าไม่มากกว่า 2 (Table 6)

Table 6 Test results of filter effect

Sample	Rosmarinic acid peak area under the chromatogram		% Difference of peak areas
	Filter	Non-filter	
1. Chiang Rai	190.62	190.31	0.16
2. Bangkok 1	47.03	46.94	0.19
3. Bangkok 2	41.39	41.38	0.04
4. Nonthaburi 1	40.74	40.49	0.62

3. การวิเคราะห์ปริมาณ rosmarinic acid ใน ใบหญ้าหนวดแมว

ผลการวิเคราะห์ปริมาณ rosmarinic acid
ในตัวอย่างใบหญ้าหนวดแมว จำนวน 14 ตัวอย่าง

พบว่าปริมาณสาร rosmarinic acid ในตัวอย่าง
ใบหญ้าหนวดแมว มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 0.35 - 2.30
โดยน้ำหนัก (Table 7)

Table 7 Rosmarinic acid contents in powdered Java tea samples collected from various provinces

Sample No.*	Collection site (Province)	Rosmarinic acid content (% w/w)
1	Nong Bua Lam Phu	0.57
2	Sing Buri	0.62
3	Ang Thong	0.35
4	Nakhon Pathom	0.66
5	Nakhon Nayok	0.66
6	Prachin Buri	0.54
7	Uttaradit	0.74
8	Bangkok 1	0.54
9	Bangkok 2	0.50
10	Nonthaburi 1	0.47
11	Ratchaburi	0.56
12	Chiang Rai	2.18
13	Nonthaburi 2	0.99
14	Nonthaburi 3	2.30
	Mean	0.60**
	SD	0.16**

* Samples No. 1 – 11 were obtained as dried specimens, while No. 12 – 14 were obtained as fresh Java tea which was later dried and ground at the Bureau of Drug and Narcotic.

**Samples 12 and 14 were excluded as outliers.

4. การวิเคราะห์ปริมาณสาร rosmarinic acid ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์

ผลการวิเคราะห์ปริมาณ rosmarinic acid ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์หญ้าหนวดแมว จำนวน 5 ตัวอย่าง

พบว่าปริมาณสาร rosmarinic acid ในตัวอย่างหญ้าหนวดแมว มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 0.37 - 0.44 และ 0.22 - 0.61 โดยน้ำหนักสำหรับแคปซูล และยาขงตามลำดับ (Table 8)

Table 8 Rosmarinic acid contents in Java tea products

Sample No.	Dosage form	Labeled amount of powdered Java tea per capsule or sachet*	Rosmarinic acid content (% w/w) in capsule or sachet	Rosmarinic acid content (mg) per capsule or sachet	Indication and use
1	Capsule 1	160 mg / 320 mg	0.43	1.76	Diuretic: take 2 cap. 2 times a day.
2	Capsule 2	410 mg / 410 mg	0.44	1.80	Diuretic: take 1 cap. 2 times a day.
3	Capsule 3	350 mg / 500 mg	0.37	1.85	Diuretic: take 1 – 2 cap. 3 times a day.
4	Tea 1	2 g / 2 g	0.61	12.20	Diuretic: take infusion of 1 tea bag 2 times a day
5	Tea 2	0.7 g / 1 g	0.22	2.20	Diuretic: take infusion of 2 tea bags as needed

*The first figures are labeled amount of powdered Java tea and the second figures are the total weight of the herbal drug powder contained in each capsule or sachet.

อภิปรายผล

rosmarinic acid เป็นสารในกลุ่ม polyphenols ที่มีรายงานการศึกษาว่ามีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และพบมากในหญ้าหนวดแมว สามารถละลายได้ดีใน ethanol^[19] การศึกษานี้จึงเลือกใช้ rosmarinic acid เป็น active marker^[15] การเปรียบเทียบวิธีสกัดตัวอย่างระหว่างวิธีที่ดัดแปลงมาโดย reflux ตัวอย่าง 0.1 กรัม ด้วย 50% v/v ethanol 18 มิลลิลิตร กรองและปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลายจนครบ 20 มิลลิลิตร กับวิธี sonicate โดยใช้ตัวอย่างและตัวทำละลายเช่นเดียวกันเป็นเวลา 30 นาที พบว่าวิธี reflux ให้ปริมาณ rosmarinic acid ที่มากกว่า และเมื่อเทียบกับวิธีสกัดตัวอย่างของ European Pharmacopoeia 11.0 ซึ่ง reflux ตัวอย่าง 0.5 กรัม ด้วย 50% v/v ethanol 95 มิลลิลิตร กรองและปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลายจนครบ 100 มิลลิลิตร^[15] พบว่าวิธีที่พัฒนา

ได้ผลไม่ต่างกัน หรือไม่น้อยกว่า จึงเป็นวิธีที่ช่วยประหยัดตัวทำละลาย และลดเวลาเตรียมตัวอย่างลง นอกจากนี้ ยังใช้วิธีที่พัฒนาดังกล่าวในการสกัดสารละลายของผลิตภัณฑ์ได้ด้วย เนื่องจากผลิตภัณฑ์ชนิดยาแคปซูล และยาผงจะบรรจุด้วยผงหญ้าหนวดแมวที่บดแล้ว ซึ่งมีแมทริกซ์ในลักษณะเดียวกันกับวัตถุดิบ

ทั้งนี้ วิธีวิเคราะห์ปริมาณสาร rosmarinic acid ในวัตถุดิบหญ้าหนวดแมว และผลิตภัณฑ์ชนิดยาแคปซูล และยาผงด้วยเครื่อง UHPLC ที่พัฒนาขึ้นนี้ ได้ผ่านการทดสอบความถูกต้องของวิธีตาม ICH guideline^[16] โดยสกัดหญ้าหนวดแมวแห้ง และผลิตภัณฑ์ด้วยตัวทำละลาย 50% v/v ethanol ด้วยวิธี reflux เป็นเวลา 30 นาที ใช้คอลัมน์ชนิด C18 ขนาด 4.6 × 150 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร ซึ่งมี guard cartridge C18 ขนาด 4.6 × 10 มิลลิเมตร

อนุภาค 5 ไมโครเมตร เป็นวัฏภาคคงที่ และใช้ acetonitrile และ 0.1% formic acid ในน้ำ อัตราส่วน 30 : 70 เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ แบบ isocratic อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตร/นาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 330 นาโนเมตร สอดคล้องตาม European Pharmacopoeia 11.0^[15] และควบคุมอุณหภูมิคอลัมน์ที่ 25 °C จะปรากฏตำแหน่ง peak ของ rosmarinic acid ที่ retention time ในช่วง 9.6 - 9.7 นาที

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (method validation) ได้ทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์พบว่ามีความเป็นเส้นตรง (linearity) ในช่วงความเข้มข้น 10 - 140 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) เท่ากับ 0.9999 ซึ่งมีค่ามากกว่าค่าที่ยอมรับได้ที่กำหนดค่า correlation coefficient (r) ต้องมีค่าไม่น้อยกว่า 0.995 ส่วนการทดสอบความแม่นยำของวิธี (accuracy) พบค่า % mean recovery อยู่ในช่วงร้อยละ 96.42 - 100.77 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ที่กำหนดค่าไว้ในช่วงร้อยละ 95.00 - 105.00 ค่า % RSD อยู่ในช่วง 0.74 - 1.91 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ที่กำหนดค่าไว้ไม่เกิน 2.00 แสดงว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความแม่นยำ ส่วนการทดสอบความเที่ยงของวิธี (precision) พบว่าผลการทดสอบความทำซ้ำได้ (repeatability) โดยการวิเคราะห์ตัวอย่างวัตถุุดิบ และผลิตภัณฑ์จำนวน 6 ซ้ำ ภายในวันเดียวกัน และการวิเคราะห์ตัวอย่างดังกล่าว เมื่อเปลี่ยนผู้วิเคราะห์ และวันที่วิเคราะห์ 6 ซ้ำ (intermediate precision, inter-day) มีค่า % RSD อยู่ในช่วง 1.21 - 1.42 และ 1.42 - 1.61 ตามลำดับ อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ คือ ไม่มากกว่า 2.00 แสดงว่าวิธีวิเคราะห์นี้สามารถทำได้และมีความเที่ยง ส่วนการทดสอบหั่วข้อ filter

effect ซึ่งเป็นการทดสอบว่าการกรองด้วย PVDF (HL) syringe filter อาจดูดซับสารสำคัญหรือไม่นั้น พบว่า syringe filter ที่ใช้ไม่มีผลต่อการวิเคราะห์หา rosmarinic acid เนื่องจากมี % difference อยู่ในช่วง 0.04 - 0.62 ซึ่งมีค่าไม่เกิน 2

นอกจากนี้ เมื่อนำวิธีวิเคราะห์ปริมาณสาร rosmarinic acid ในใบหญ้าหนวดแมวด้วยวิธี UHPLC ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่นี้ เปรียบเทียบกับวิธีการหาปริมาณสาร rosmarinic acid ในวัตถุุดิบ และสารสกัดใบหญ้าหนวดแมวที่มีรายงานไว้ก่อนแล้ว พบว่าวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีข้อได้เปรียบเหนือกว่าวิธีการวิเคราะห์ที่มีรายงานไว้ก่อนหน้านี้^[15,20] ในแง่ของความเรียบง่าย และเวลาที่รวดเร็วในวิธีเตรียมตัวอย่างและการเตรียมวัฏภาคเคลื่อนที่ ขณะที่ European Pharmacopoeia 11.0 ใช้ phosphoric acid, acetonitrile, water (1 : 19 : 80) ต่อ phosphoric acid, methanol, acetonitrile (1 : 40 : 59), แบบ gradient^[15] สำหรับการเปรียบเทียบระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์สารสำคัญ rosmarinic acid พบว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นใหม่ใช้เวลาตรวจพบ rosmarinic acid peak ไม่เกิน 10 นาที ซึ่งใช้เวลาน้อยกว่าวิธีการวิเคราะห์ที่มีรายงานไว้ก่อนหน้านี้^[15, 20]

เมื่อนำวิธีวิเคราะห์นี้มาตรวจปริมาณสาร rosmarinic acid ในตัวอย่างใบหญ้าหนวดแมวจำนวน 14 ตัวอย่าง พบปริมาณสาร rosmarinic acid อยู่ระหว่างร้อยละ 0.35 ถึง 2.30 โดยน้ำหนัก ค่าเฉลี่ยเมื่อตัดค่า outlier ออกคือ ร้อยละ 0.60 ± 0.16 โดยน้ำหนัก อีกทั้งตัวอย่างที่จะนำมากำหนดค่ามาตรฐาน ควรพิจารณาทั้งตัวอย่างสดที่ทำแห้งเอง และตัวอย่างจากร้านจำหน่ายสมุนไพร ในการศึกษานี้พบว่าตัวอย่างสดที่จัดทำแห้งเองพบปริมาณ rosmarinic acid

สูงกว่าตัวอย่างจากร้านจำหน่ายสมุนไพร ประมาณ 2 - 5 เท่า แสดงให้เห็นว่าความใหม่ของตัวอย่างมีผลต่อปริมาณสาร rosmarinic acid อย่างไรก็ตาม หากใช้เกณฑ์ตัดสินของ European Pharmacopoeia ซึ่งกำหนดให้หญ้าหนวดแมวแห้งมี rosmarinic acid content ไม่น้อยกว่าร้อยละ 0.3 โดยน้ำหนัก^[15] จะเห็นได้ว่าทั้ง 14 ตัวอย่างที่ศึกษาผ่านเกณฑ์มาตรฐานของ European Pharmacopoeia แสดงให้เห็นว่า วัตถุดิบหญ้าหนวดแมวของประเทศไทยมีปริมาณ rosmarinic acid ผ่านเกณฑ์มาตรฐานที่สามารถส่งออกไปยังทวีปยุโรปได้^[15]

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร rosmarinic acid ในผลิตภัณฑ์ชนิดยาแคปซูล และยาชง ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น ได้สุ่มตัวอย่างที่มีเลขทะเบียนยามา ตรวจวิเคราะห์ เพื่อให้ทราบปริมาณที่แน่นอนของ หญ้าหนวดแมวที่ระบุบนฉลาก พบว่ามีปริมาณ rosmarinic acid อยู่ในช่วงร้อยละ 0.37 - 0.44 และ 0.22 - 0.61 โดยน้ำหนัก สำหรับแคปซูล และยาชง ตามลำดับ จาก Table 8 จะเห็นว่าแต่ละบริษัทมีขนาดบรรจุของผงหญ้าหนวดแมวในแคปซูลหรือซองยาชง ที่หลากหลาย แต่ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ rosmarinic acid ในยาแคปซูล 1 - 3 พบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน คือ 1.76 - 1.85 มิลลิกรัมต่อแคปซูล ขณะที่ยาชง 1 และ 2 มีปริมาณ rosmarinic acid 12.20 และ 2.20 มิลลิกรัมต่อซอง ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันมาก แม้จะเติมน้ำของยาชงของบริษัทที่ 2 จำนวน 2 ซอง ต่อครั้งตามฉลากก็ยังได้รับปริมาณสารสำคัญน้อยกว่ายาชง 1 ซองของบริษัทที่ 1 อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ยังไม่ได้กำหนด ให้ระบุปริมาณ rosmarinic acid บนฉลากผลิตภัณฑ์ หญ้าหนวดแมว เพียงแต่ให้ระบุปริมาณผงหญ้า

หนวดแมวต่อแคปซูลหรือต่อซองบนฉลากเท่านั้น ทั้งนี้ การกำหนดเกณฑ์มาตรฐานปริมาณสารสำคัญของผลิตภัณฑ์ในตำรายา^[1] โดยทั่วไปจะกำหนดช่วง เป็นร้อยละของปริมาณสารสำคัญที่ระบุบนฉลาก (% Labeled amount, %LA) เช่น 90.0 - 110.0 %LA

การศึกษานี้จะเป็นแนวทางจัดทำข้อกำหนด มาตรฐานสาร rosmarinic acid ในวัตถุดิบหญ้า หนวดแมว และผลิตภัณฑ์ชนิดยาแคปซูล และยา ชง ต่อไป ซึ่งจะช่วยในขั้นตอนการควบคุมคุณภาพ ทำให้สามารถรับประกันความสม่ำเสมอของปริมาณ สารสำคัญในแต่ละรุ่นการผลิต (batch) ซึ่งส่งผลต่อ ประสิทธิภาพในการรักษาของผู้ป่วย

ข้อสรุป

การศึกษานี้ได้พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ ปริมาณ rosmarinic acid ในทั้งใบหญ้าหนวดแมว และผลิตภัณฑ์ชนิดแคปซูลและยาชง ด้วยวิธี UHPLC โดยสกัดผงใบหญ้าหนวดแมวแห้ง หรือ ผงยาของ ผลิตภัณฑ์ดังกล่าว ชั่ง 0.1 กรัม reflux ด้วยตัวทำ ละลาย 50% v/v ethanol จำนวน 18 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที กรอง และปรับปริมาตรเป็น 20 มิลลิลิตร ด้วยตัวทำละลายเดิม กรองผ่าน PVDF (HL) syringe filter ขนาด 0.2 ไมโครเมตร ก่อนนำไป วิเคราะห์ด้วย UHPLC ซึ่งใช้คอลัมน์ชนิด C18 ขนาด 4.6 × 150 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร ซึ่ง มี guard cartridge C18 ขนาด 4.6 × 10 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร เป็นวัฏภาคคงที่ และใช้ acetonitrile และ 0.1% formic acid ในน้ำ (30 : 70) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ แบบ isocratic อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 330 นาโน เมตร ซึ่งควบคุมอุณหภูมิคอลัมน์ที่ 25 °C จะปรากฏ

ตำแหน่ง peak ของ rosmarinic acid ที่ retention time ในช่วง 9.6 - 9.7 นาที และทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ซึ่งผ่านตามเกณฑ์ ICH Guideline^[16] ข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ต่อการจัดทำข้อกำหนดมาตรฐานในหัวข้อปริมาณสารสำคัญ (Rosmarinic acid content) และกำหนดค่ามาตรฐานปริมาณ rosmarinic acid ในมอโนกราฟยาสมุนไพร และผลิตภัณฑ์สำหรับบรรจุในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทยต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่สนับสนุนงบประมาณ และเครื่องมือ ในการศึกษานี้

References

1. Thai Pharmacopoeia Committee. Thai herbal pharmacopoeia. Nonthaburi: Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health; 2021. p.785. Available from: <https://bdn.dmso.moph.go.th/th/detailAll/1080/ebook/136>
2. National Drug System Development Committee. National List of Essential Medicines B.E. 2566 (2023). Royal Thai Government Gazette. 2023 Jun 2;140 (Special Pt 130 Ng):16. Available from: <https://herbal.fda.moph.go.th/media.php?id=511902077832798208&name=001-66.pdf> (in Thai).
3. Doan DD, Nguyen NH, Doan HK, Nguyen TL, Phan TS, Nguyen VD, Magnus G, Rolf J, Gerd L, Nils ES. Studies on the individual and combined diuretic effects of four Vietnamese traditional herbal remedies (*Zea mays*, *Imperata cylindrica*, *Plantago major* and *Orthosiphon stamineus*). J Ethnopharmacol. 1992;36(3):225-31. doi:10.1016/0378-8741(92)90048-V. PMID: 1434681. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1434681/>
4. Tabana YM, Al-Suede FS, Ahamed MB, Dahham SS, Saad SD, Loiy EAH, Saba K, Mohamad T, Doblin S, Aman S, Amin MSAM. Cat's whiskers (*Orthosiphon stamineus*) tea modulates arthritis pathogenesis via the angiogenesis and inflammatory cascade. BMC Complement Altern Med. 2016;16(1):480. doi:10.1186/s12906-016-1467-4. PMID: 27881135. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27881135/>
5. Arafat OM, Tham SY, Sadikun A, Zhari I, Haughton PJ, Asmawi MZ. Studies on diuretic and hypouricemic effects of *Orthosiphon stamineus* methanol extracts in rats. J Ethnopharmacol. 2008;118(3):354-60. doi:10.1016/j.jep.2008.04.015. PMID: 18602231. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18602231/>
6. Yam MF, Ang LF, Basir R, Salman IM, Ameer OZ, Asmawi MZ. Evaluation of the anti-pyretic potential of *Orthosiphon stamineus* Benth standardized extract. Inflammopharmacology. 2009;17(1):50-54. doi:10.1007/s10787-008-8038-3. PMID: 19127348. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19127348/>
7. Wang Q, Wang J, Li N, Liu J, Zhang J, Zhang P, Chen H. A systematic review of *Orthosiphon stamineus* Benth. in the treatment of diabetes and its complications. Molecules. 2022;27(2):444. doi:10.3390/molecules27020444. PMID: 35056765. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35056765/>
8. Lokman EF, Saparuddin F, Muhammad H, Othman MH, Zulkipli A. *Orthosiphon stamineus* as a potential antidiabetic drug in maternal hyperglycemia in streptozotocin induced diabetic rats. Integr Med Res. 2019;8(3):173-9. doi:10.1016/j.imr.2019.05.006. PMID: 31334030. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31334030/>
9. Kaviya S, Prakash M, Gayathiri S, Umashankari E. A review on phytochemistry and therapeutic effect of cat's whisker plant (*Orthosiphon stamineus*). World J Pharm Res [Internet]. 2025;14(16):1189-206. [cited 2025 Aug 3]. Available from: https://wjpr.s3.ap-south-1.amazonaws.com/article_issue/263fbf924016d0222b8e98d115b29f99.pdf
10. Ashraf K, Halim H, Lim SM, Kalavathy R, Sadia S. In vitro antioxidant, antimicrobial and antiproliferative studies of four different extracts of *Orthosiphon stamineus*, *Gynura procumbens* and *Ficus deltoidea*. Saudi J Biol Sci. 2020;27(1):417-32. doi:10.1016/j.sjbs.2019.11.003. PMID: 31889866. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31889866/>
11. Alshawsh MA, Abdulla MA, Ismail S, Amin ZA, Qader SW, Hadi AHA, Harmal NS. Free radical scavenging,

- antimicrobial and immunomodulatory activities of *Orthosiphon stamineus*. *Molecules*. 2012;17(5):5385-95. doi:10.3390/molecules17055385. PMID: 22569417. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22569417/>
12. Hsu CL, Hong BH, Yu YS, Yen GC. Antioxidant and anti-inflammatory effects of *Orthosiphon aristatus* and its bioactive compounds. *J Agric Food Chem*. 2010;58(4):2150-6. doi:10.1021/jf903557c. PMID: 20095565. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20095565/>
 13. Suhaimi SH, Hasham R, Hafiz Idris MK, Ismail HF. Optimization of ultrasound-assisted extraction conditions followed by solid phase extraction fractionation from *Orthosiphon stamineus* Benth. (Lamiaceae) leaves for antiproliferative effect on prostate cancer cells. *Molecules* [Internet]. 2019;24(22):4183. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/22/4183>
 14. Liang YZ, Xie P, Chan K. Quality control of herbal medicines. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* [Internet]. 2004;812(1-2):53-70. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1570023204006762>
 15. European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care. *European Pharmacopoeia*. 11th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2022. p. 1572-74.
 16. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. ICH harmonised guideline: validation of analytical procedures Q2(R2) [Internet]. Geneva: International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use; 2023 [cited 2026 Jan 17]. Available from: https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_Q2-R2_Guideline_2023_1130.pdf
 17. The United States Pharmacopeial Convention. <1092> The dissolution procedure: development and validation. In: *United States Pharmacopeia 47-National Formulary 42 (USP 47-NF 42)*. Rockville (MD): The United States Pharmacopeial Convention; 2024. p. 8350-8363.
 18. Carlson M, Thompson RD. Analyte loss due to membrane filter adsorption as determined by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr Sci*. 2000;38(2):77-83. doi: 10.1093/chromsci/38.2.77 PMID: 10677837
 19. National Center for Biotechnology Information. PubChem compound summary for CID 5281792, rosmarinic acid [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2004 [cited 2026 Jan 17]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Rosmarinic-Acid>
 20. Kamphan C, Poowanna R, Pongnaratorn P, Chan-ae P, Ohnon W, Pakdee N. The comparison of rosmarinic acid in *Orthosiphon aristatus* extract by high performance liquid chromatography. *Huachiew Chalermprakiet Sci Technol J*. 2022;8(2):81-91. (in Thai).