

การหาปริมาณ Imperatorin ในผลมะตูมด้วยวิธี Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC)

ดวงเพ็ญ ปัทมดิลก อภิรักษ์ ศักดิ์เพชร พิธีธรรม เทียมเทียบริตน์ สิริกาญจน์ ธนอริยโรจน์
ศักดิ์วิชัย อ่อนทอง และณัฏฐรา จันทร์สุวานิชย์

สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ Imperatorin มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ต้านออกซิเดชัน ต้านเนื้องอก ขยายหลอดเลือด ต้านการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด เป็นต้น เป็นสารออกฤทธิ์ชนิดหนึ่งที่พบในผลมะตูม (*Aegle marmelos* (L.) Corrêa วงศ์ Rutaceae) ซึ่งเป็นสมุนไพรที่มีการใช้ประโยชน์ทั้งทางยาและผลิตภัณฑ์สุขภาพ แต่ยังไม่มีการควบคุมคุณภาพสมุนไพรชนิดนี้ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ imperatorin ในผลมะตูมด้วยวิธี Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) ซึ่งสามารถสรุปวิธีวิเคราะห์ได้ดังนี้ การสกัดตัวอย่างโดยการ reflux ผลมะตูม 1 กรัมใน hexane ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที กรองและนำสารสกัดที่ได้มาระเหยแห้ง จากนั้นละลายกลับและปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 25 มิลลิลิตร นำสารละลายตัวอย่าง 3 มิลลิลิตร มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UPLC โดยใช้ BEH C18, 2.1×50 มิลลิเมตร, 1.7 ไมโครเมตร และใช้ 60% methanol เป็น mobile phase อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตร/นาที ตรวจวัดด้วย PDA ที่ความยาวคลื่น 302 นาโนเมตร การทดสอบความใช้ได้ของวิธี พบว่า calibration curve มีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.0402-0.2414 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีค่า coefficient (R^2) เท่ากับ 0.999896 ค่า %recovery อยู่ในช่วง 99.43-103.00% ค่า HORRAT ได้เท่ากับ 0.60-0.88 มี LOD และ LOQ เท่ากับ 0.0026 และ 0.0086 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความเหมาะสม สามารถนำไปใช้เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์ปริมาณ imperatorin ในผลมะตูม และสามารถนำไปสู่การกำหนดเกณฑ์ปริมาณสารสำคัญในผลมะตูมต่อไป

บทนำ

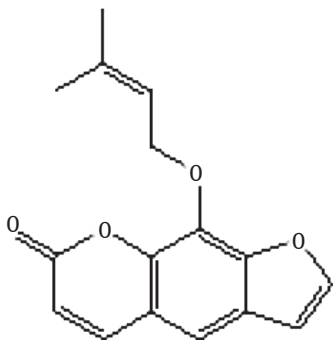
มะตูม (*Aegle marmelos* (L.) Corrêa วงศ์ Rutaceae) มีชื่อสามัญ ได้แก่ Bael Fruit Tree, Bengal Quince และ Bilak ชื่อท้องถิ่น ได้แก่ กะทันตาเถร ตุ่มตั่ง ตุ่ม (ปัตตานี) พะโงงค์ (เขมร) มะปิ่น (เหนือ) มะปิสำ (แม่ฮ่องสอน)⁽¹⁾ เป็นไม้ต้นผลัดใบ สูง 10-15 เมตร กิ่งก้านมีหนามแหลม ใบประกอบแบบขนนกปลายคี่ มักมี 3 ใบย่อย รูปไข่ถึงรูปรี ดอกออกเป็นช่อกระจุกหลวมๆ หรือเป็นช่อกระจุก ดอกสมบูรณ์เพศ กลีบเลี้ยงและกลีบดอกมี 4-5 กลีบ สีขาว มีกลิ่นหอม เกสรเพศผู้ 30-50 อัน ยาวเท่ากลีบดอก ผลสดเนื้อหลายเมล็ด ทรงกลมถึงรี เปลือกชั้นนอกหนาและแข็ง เปลือกชั้นในอ่อนนุ่มและฉ่ำน้ำ จะเปลี่ยนเป็นแข็งเมื่อผลสุก เมล็ดทรงรีแบน มีจำนวนมาก ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของผลมะตูม เช่น ต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านเชื้อรา ต้านไวรัส ยับยั้งการหดเกร็งของลำไส้ รักษาแผลในกระเพาะอาหาร คลายกล้ามเนื้อเรียบ ต้านฮีสตามีน ลดระดับน้ำตาลในเลือด ลดไขมัน ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation เป็นต้น⁽²⁾ การแพทย์พื้นบ้านไทยใช้ผลมะตูมแก้แต่ยังไม่สุก สดหรือแห้ง ฝานบางๆ ชงรับประทานแก้ท้องเสีย แก้บิด แก้โรคระเคาะอาหาร ฝาดสมาน เจริญอาหาร แก้อาการพิษ การขับผายลม บำรุงกำลัง ผลแก่สุกทุบให้เปลือกแตก ต้มทั้งลูกกับน้ำตาลแดง เป็นยาระบายท้อง แก้อ่อนในกระหายน้ำ แก้มูกเลือด บิดเรื้อรัง และมีการใช้ผลมะตูมในพิกัด “ตรีผลสมุฏฐาน” แก้มุฏฐานแห่งตรีโทษ ขับลมต่างๆ แก้ไตพิการ



ภาพที่ 1 ผลมะตูม

imperatorin หรือ marmelosin (ภาพที่ 2) เป็นสารเคมีที่พบในผลมะตูม เป็นสารกลุ่ม furanocoumarin มีคุณสมบัติสามารถละลายได้ในน้ำร้อนแต่ไม่ละลายในน้ำเย็น ละลายได้ใน chloroform, benzene, alcohol, ether และ petroleum ether สาร imperatorin มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลาย เช่น ต้านออกซิเดชัน⁽³⁾ ต้านเนื้องอก⁽⁴⁾ ขยายหลอดเลือด⁽⁵⁾ ต้านการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด⁽⁶⁾ ต้านชัก⁽⁷⁾ ยับยั้งการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสเอชไอวี⁽⁸⁾ และยับยั้ง Cytochrome P450⁽⁹⁾ เป็นต้น องค์ประกอบทางเคมีชนิดอื่นๆ ที่พบในผลมะตูม เช่น luvangetin, aurapten, psoralen, marmelide และ tannin เป็นต้น⁽²⁾

จากการทบทวนรายงานการวิจัย พบว่า มีรายงานการศึกษาวิธีวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารสำคัญในผลมะตูมหลายวิธี ได้แก่ การหาปริมาณแทนนินรวม (วิธี Folin-Denis)⁽¹⁰⁾ การหาปริมาณฟีนอลรวม (วิธี Folin-Ciocalteu)⁽¹¹⁾ การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (วิธี Aluminium chloride colorimetry)⁽¹²⁾ ซึ่งล้วนแต่เป็นการหาปริมาณในลักษณะของปริมาณกลุ่มสารสำคัญ ส่วนการหาปริมาณสารสำคัญเดี่ยวๆ ในผลมะตูม ได้แก่ การหาปริมาณ imperatorin ด้วยวิธี qNMR (quantitative nuclear magnetic resonance)⁽¹³⁾ นอกจากนี้ ยังมีการควบคุมคุณภาพด้วยวิธี chromatographic fingerprint ได้แก่ HPLC fingerprint profile และ HPTLC fingerprint profile ของใบมะตูม⁽¹⁴⁾ ด้วยโดยสาร aegeline เป็นสารสำคัญในใบมะตูมและใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร



ภาพที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของ imperatorin

เนื่องจาก imperatorin เป็นสารเคมีที่พบในผลมะตูมและมีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลาย การศึกษาวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ imperatorin ในผลมะตูมด้วยวิธี Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) ให้ได้วิธีวิเคราะห์ที่ให้ผลถูกต้อง แม่นยำ รวดเร็ว และเชื่อถือได้ ผลจากการศึกษาวิจัยนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมคุณภาพวัตถุดิบ ตลอดจนการวิจัยและพัฒนาตำรับยาที่มีผลมะตูมเป็นส่วนประกอบต่อไปในอนาคต

วัสดุและวิธีการ

วัสดุ

1. ตัวอย่างผลมะตูม

รวบรวมตัวอย่างผลมะตูม จำนวน 29 ตัวอย่าง ในช่วงเดือนมิถุนายน 2554 ถึงเมษายน 2556 เป็นผลสดจากแหล่งธรรมชาติ จำนวน 3 ตัวอย่าง และผลแห้งจากร้านยาสมุนไพร จำนวน 26 ตัวอย่าง ผลสดนำมาล้างให้สะอาดผ่านเป็นแว่น ผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำมาอบในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน นำมาบดเป็นผง ผ่านแรงเบอร์ 180 แล้วเก็บในขวดแก้วสีชาปิดสนิท ส่วนผลแห้งนำมาอบในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อไล่ความชื้น แล้วนำมาบดเป็นผง ผ่านแรงเบอร์ 180 แล้วเก็บในขวดแก้วสีชาปิดสนิท

2. สารมาตรฐาน

imperatorin (marmelosin) ความบริสุทธิ์ $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich, India)

3. ตัวทำละลาย

hexane (AR grade), methanol (HPLC grade), น้ำ (Deionized water)

4. เครื่องมือ

- Acquity™ Ultra Performance Liquid Chromatography –PDA detector (Waters®, USA)
- Mettler Toledo Analytical Balance
- Eyela NE-1 Rotary Evaporator
- Retsch AS200 Basic Sieves
- Water bath

5. วัสดุวิทยาศาสตร์

Acquity™ UPLC column BEH C18, 2.1 × 50 มิลลิเมตร, 1.7 ไมโครเมตร, PVDF membrane filter 0.2 ไมโครเมตร, Membrane filter 0.45 ไมโครเมตร, Nylon filter syringe 0.2 ไมโครเมตร, กระดาษกรอง เบอร์ 4 และเครื่องแก้ว

วิธีการ

1. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ imperatorin ในผลมะตูม

1.1 การเลือกชนิดของตัวทำละลายในการสกัด

สกัดตัวอย่างผลมะตูม น้ำหนัก 1 กรัม ด้วย hexane และ methanol ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ด้วยวิธี reflux เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรอง นำสารสกัด hexane ไประเหยแห้ง แล้วละลายกลับและปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 25 มิลลิลิตร โดยใช้ volumetric flask ส่วนสารสกัด methanol ให้นำไประเหยเพื่อลดปริมาตร จากนั้นปรับปริมาตรกลับจนครบ 25 มิลลิลิตร โดยใช้ volumetric flask แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UPLC เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการสกัดสาร imperatorin จากผลมะตูมของตัวทำละลายแต่ละชนิด

1.2 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัด

สกัดผลมะตูมแห้ง น้ำหนัก 1 กรัม ด้วย hexane โดยวิธี reflux เป็นเวลา 30 และ 60 นาที กรอง แล้วนำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้ง จากนั้นละลายกลับและปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 25 มิลลิลิตร โดยใช้ volumetric flask นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UPLC เพื่อเปรียบเทียบผลของเวลาที่ใช้ในการสกัดสาร imperatorin

1.3 ความยาวคลื่นในการตรวจวัดสาร imperatorin

วัดการดูดกลืนแสง UV ของ imperatorin เพื่อดูความยาวคลื่นที่สารชนิดนี้สามารถดูดกลืนแสงสูงสุด (λmax) และวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างผลมะตูมโดยใช้ PDA เพื่อเลือกความยาวคลื่นสำหรับการตรวจวัด imperatorin โดยที่ไม่พบการเกิด co-elute

1.4 ภูมิภาคคงที่และภูมิภาคเคลื่อนที่

ภูมิภาคคงที่ เปรียบเทียบผลของคอลัมน์ชนิดต่างๆ ที่แตกต่างกันในเรื่องชนิดอนุภาคภายในคอลัมน์ (BEH C18, BEH C8 และ BEH phenyl) ความยาวคอลัมน์ (50 และ 100 มิลลิเมตร) โดยพิจารณาเลือกคอลัมน์จากลักษณะ peak ของ imperatorin (peak shape และ peak symmetry) และ retention time

ภูมิภาคเคลื่อนที่ ศึกษาชนิดและสัดส่วนของภูมิภาคเคลื่อนที่ โดยพิจารณาจาก peak shape และ retention time ของ imperatorin ความสามารถในการแยก impurity จาก peak ของ imperatorin ในสารละลายตัวอย่างผลมะตูม และความดันของระบบโครมาโทกราฟี

1.5 วิธีวิเคราะห์ปริมาณสาร imperatorin

โดยสรุปวิธีจากผลการศึกษาในข้อ 1.1-1.4

2. การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ทางเคมี

ทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ imperatorin ในผลมะตูมที่พัฒนาขึ้นตามแนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข⁽¹⁵⁾

2.1 ความเป็นเส้นตรง (Linearity) และช่วงการวิเคราะห์ (Range)

นิตสารละลายสารมาตรฐาน imperatorin ที่ 6 ระดับความเข้มข้น ตั้งแต่ 0.0402-0.2414 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง ด้วยเครื่อง UPLC นำค่า peak area และความเข้มข้นของสารละลายสารมาตรฐาน imperatorin ไปสร้าง calibration curve ศึกษา Linearity โดยพิจารณาจาก coefficient (R^2) และช่วงความเข้มข้นที่ทำการทดสอบ (Range)

2.2 ความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision)

เติมสารมาตรฐาน (spike) ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ ในช่วงการใช้งาน 3 ระดับ ลงใน sample blank แล้ววิเคราะห์ sample blank (unspiked) จำนวน 6 ซ้ำ และวิเคราะห์ spiked sample ระดับละ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำทำ duplicate จากนั้นคำนวณค่า %recovery, %RSD และ HORRAT

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

เมื่อ C_1 คือ ความเข้มข้นของสารใน spiked sample

C_2 คือ ความเข้มข้นของสารใน sample blank

C_3 คือ ความเข้มข้นของสารที่เติมลงไป (analyte)

2.3 ขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD)

LOD คำนวณจากจุดตัดของกราฟมาตรฐานที่เตรียมโดยใช้ sample blank เมื่อสร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้ spiked sample blank ที่ 6 ระดับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน ระดับละ 3 ซ้ำ จากนั้นคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ y-intercept (Sy/x) และคำนวณค่า LOD โดย LOD คือ ความเข้มข้นที่ response กับ y-intercept + 3 Sy/x

2.4 ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ)

LOQ คำนวณโดย LOQ มีค่าเท่ากับ 10 เท่าของ Sy/x

2.5 ความจำเพาะ (Specificity)

วิเคราะห์ method blank โดยสกัดและวิเคราะห์ตามวิธีที่พัฒนา ใช้สารเคมีทั้งหมด แต่ไม่มีตัวอย่างเพื่อตรวจสอบสารรบกวนที่อาจมาจากสารเคมีหรืออุปกรณ์ที่ใช้

3. การวิเคราะห์ปริมาณ imperatorin ในตัวอย่างผลมะตูม

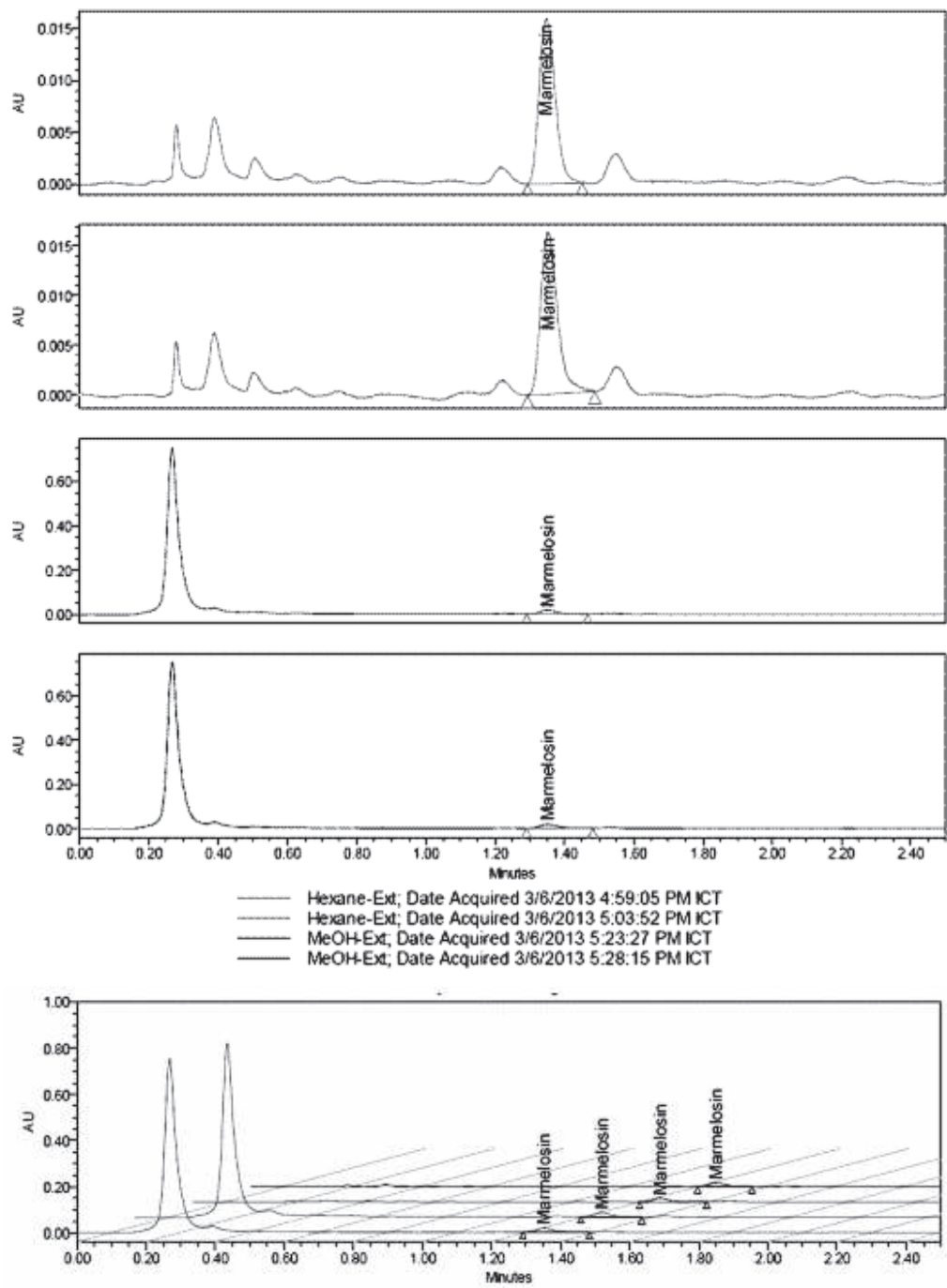
วิเคราะห์ปริมาณ imperatorin ในผลมะตูม จำนวน 29 ตัวอย่าง ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นในข้อ 1.5

ผล

1. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ imperatorin ในผลมะตูม

1.1 ชนิดของตัวทำละลายในการสกัด

ผลการศึกษาพบว่า เมื่อนำสารละลายที่ได้จากการสกัดผลมะตูมด้วย hexane และ methanol วิเคราะห์ด้วยเครื่อง UPLC พบว่า พื้นที่ใต้กราฟของ peak สาร imperatorin ที่ retention time 1.3 นาที มีค่าไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 3) แต่สารละลายตัวอย่างที่ได้จากการสกัดด้วย methanol จะมีสีของสารละลายตัวอย่างเข้มกว่าการสกัดด้วย hexane และยังพบการตกตะกอนเมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายในเวลาไม่เกิน 6 ชั่วโมง ซึ่งเป็นตะกอนที่คงทนไม่สลายเมื่อตั้งทิ้งไว้ข้ามคืน

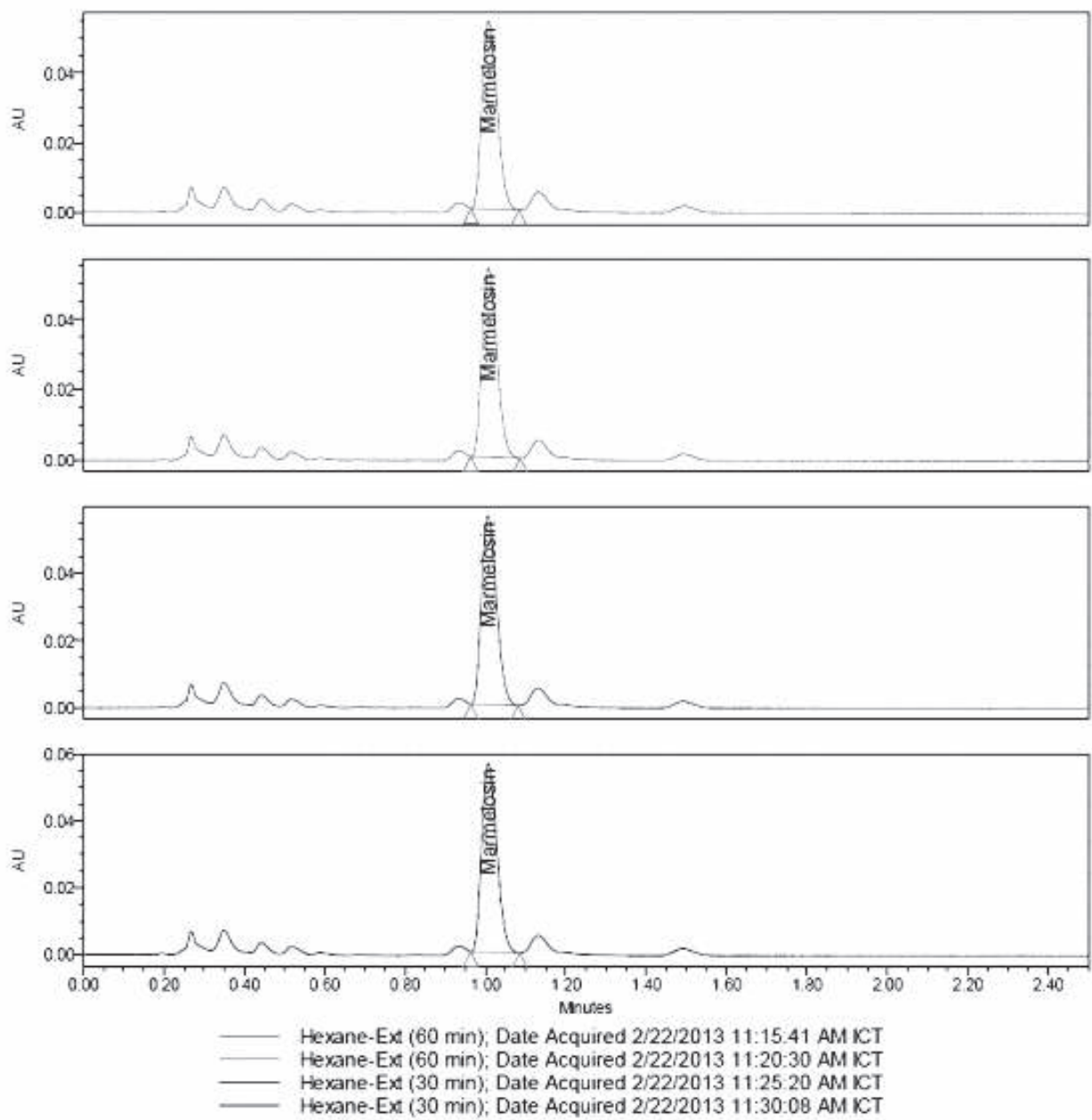


ภาพที่ 3 ผลการสกัด imperatorin (marmelosin) ในผลมะตูมด้วย hexane และ methanol

ดังนั้น ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ imperatorin ในผลมะตูม จึงเลือกใช้ hexane เป็นตัวทำละลาย อินทรีย์ในการสกัดตัวอย่างผลมะตูม

1.2 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัด

สารละลายที่ได้จากการสกัดตัวอย่างผลมะตูม ซึ่งสกัดด้วยวิธีเดียวกันโดยการ reflux กับ hexane แต่ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดแตกต่างกัน เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UPLC พบว่า พื้นที่ใต้กราฟของ peak สาร imperatorin ที่ retention time 1.0 นาที ทั้งจากการสกัดด้วยระยะเวลา 30 และ 60 นาที มีค่าไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 4)



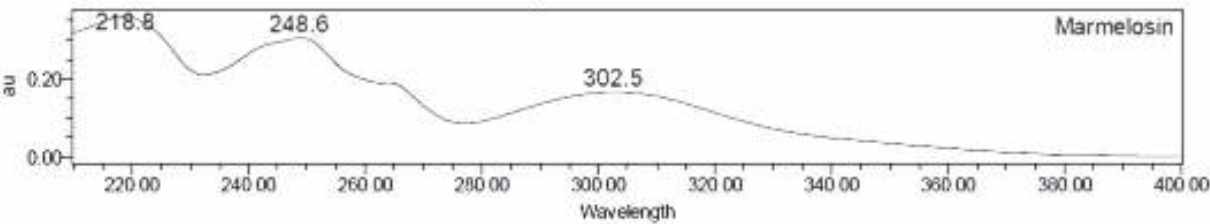
	Sample	Vial Id	Retention time (min)	Area (μV*sec)	Height (μV)
1	Hexane-Ext (60 min)	1297	1.008	141610.52	53879.63
2	Hexane-Ext (60 min)	1302	1.007	137679.07	53321.92
3	Hexane-Ext (30 min)	1307	1.006	144786.61	56025.46
4	Hexane-Ext (30 min)	1312	1.007	147092.25	56494.11

ภาพที่ 4 ผลของระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด imperatorin (marmelosin) จากตัวอย่างผลมะตูม

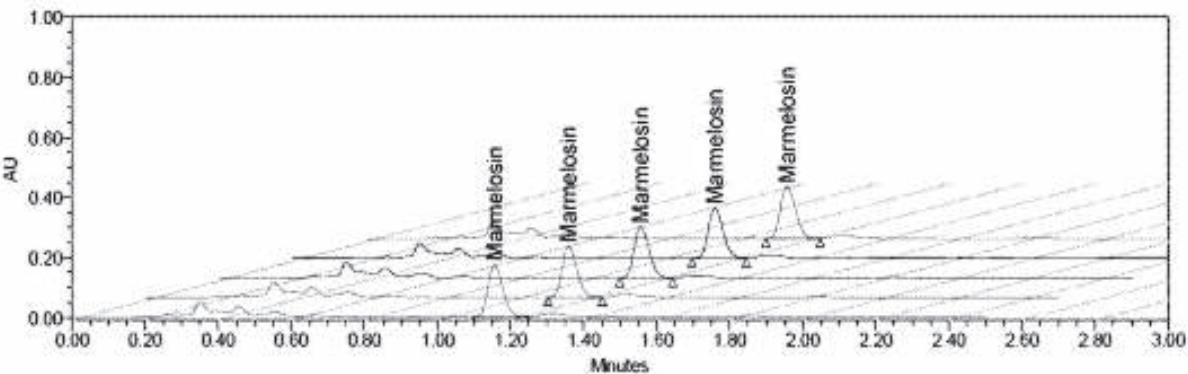
ดังนั้น ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ imperatorin ในผลมะตูมจึงเลือกใช้ hexane เป็นตัวทำละลายในการสกัดและใช้เวลาในการสกัดเพียง 30 นาที

1.3 ความยาวคลื่นในการตรวจวัด imperatorin

จากการศึกษาการดูดกลืนแสง UV ของ imperatorin พบว่า λ_{max} ของสารดังกล่าว มีค่าเท่ากับ 218.8, 248.6 และ 302.5 นาโนเมตร (ภาพที่ 5) และเมื่อวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างผลมะตูมด้วยเครื่อง UPLC โดยใช้ PDA เป็น detector ที่ความยาวคลื่น 302 นาโนเมตร ไม่พบการเกิด co-elute ของสารอื่น (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 5 UV spectrum ของ imperatorin (marmelosin)



ภาพที่ 6 UPLC fingerprint ของสารละลายตัวอย่างผลมะตูม

ดังนั้น ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ imperatorin ในผลมะตูม จึงเลือกตรวจวัดการดูดกลืนแสง UV ที่ความยาวคลื่น 302 นาโนเมตร ในการตรวจวัด

1.4 วัตถุประสงค์และวัตถุประสงค์เคลื่อนที่

วัตถุประสงค์ที่ จากการศึกษ UPLC chromatographic fingerprint ของสารสกัด hexane จากผลมะตูมและตรวจวัดด้วย PDA ที่ความยาวคลื่น 302 นาโนเมตร โดยใช้ 70 % methanol เป็นวัตถุประสงค์เคลื่อนที่พบว่า เมื่อใช้ UPLC column ชนิด BEH C18, 2.1 × 50 มิลลิเมตร, 1.7 ไมโครเมตร พบว่า UPLC chromatogram ที่ได้ให้ peak ของ imperatorin ที่ retention time 0.6 นาที ซึ่งมีแยกจาก impurity อื่นอย่างชัดเจน ดังนั้น จึงเลือก UPLC column ชนิดดังกล่าวสำหรับวิธีวิเคราะห์ปริมาณ imperatorin ที่พัฒนาขึ้น

วัตถุประสงค์เคลื่อนที่ เมื่อปรับเปลี่ยนองค์ประกอบของวัตถุประสงค์เคลื่อนที่เป็น 55 % และ 60 % methanol พบว่า retention time ของสาร imperatorin เปลี่ยนเป็น 1.4 และ 1.2 นาที ตามลำดับ และเมื่อใช้ 60 % methanol เป็นวัตถุประสงค์เคลื่อนที่จะได้ peak shape ของ imperatorin ที่ดีขึ้น แต่เมื่อใช้ 55 % methanol ความดันของระบบ UPLC จะสูงขึ้น ซึ่งจะทำให้อายุการใช้งานของ UPLC column สั้นลง

ดังนั้น ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ imperatorin ในผลมะตูมด้วยเครื่อง UPLC จึงเลือกใช้ Acquity™ BEH C18, 2.1 × 50 มิลลิเมตร, 1.7 ไมโครเมตร และ 60% methanol เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ตรวจวัดด้วย PDA ที่ความยาวคลื่น 302 นาโนเมตร

1.5 วิธีวิเคราะห์ปริมาณ imperatorin ในผลมะตูม

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

สกัดผงมะตูม น้ำหนัก 1 กรัม ด้วย hexane ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยวิธี reflux เป็นเวลา 30 นาที กรองและนำสารสกัดที่ได้มาระเหยแห้ง จากนั้นละลายกลับและปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 25 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน imperatorin

ชั่ง imperatorin น้ำหนัก 20 มิลลิกรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 100 มิลลิลิตร ด้วย volumetric flask จากนั้นเจือจางให้ได้ 6 ระดับความเข้มข้น คือ 0.04, 0.08, 0.12, 0.16, 0.20 และ 0.24 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

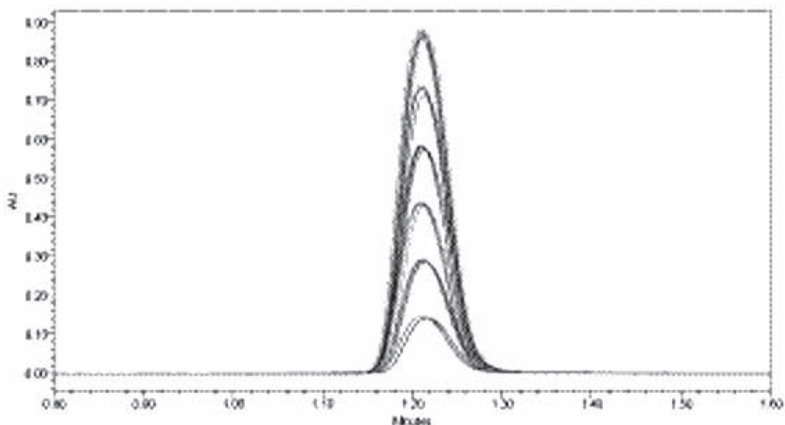
สภาวะของระบบโครมาโทกราฟี

วัฏภาคคงที่	Acquity™ UPLC BEH C18, 2.1 × 50 มิลลิเมตร, 1.7 ไมโครเมตร
อุณหภูมิคอลัมน์	ambient
วัฏภาคเคลื่อนที่	60 % methanol
อัตราการไหล	0.5 มิลลิลิตร/นาที
การตรวจวัดสาร	PDA ที่ความยาวคลื่น 302 นาโนเมตร
ปริมาตรการฉีด	3 ไมโครลิตร
โดย retention time ของ imperatorin เท่ากับ 1.2 นาที	

2. การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

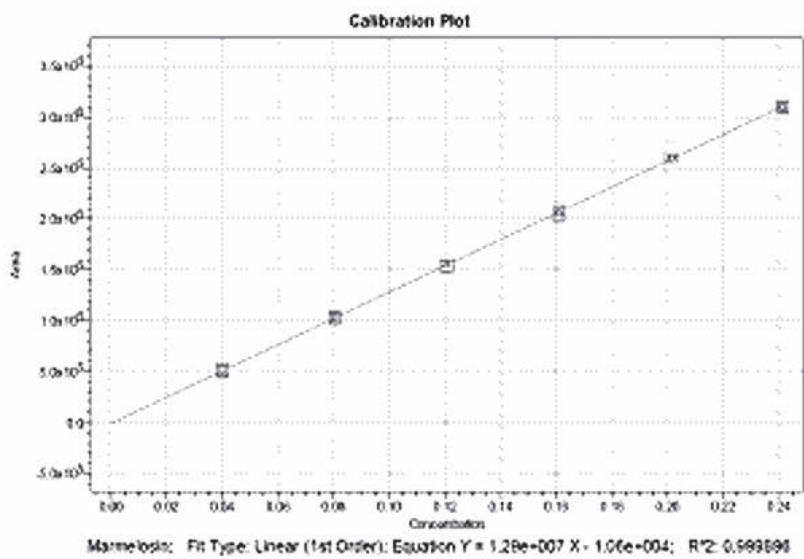
2.1 ความเป็นเส้นตรง (Linearity) และช่วงการวิเคราะห์ (Range)

ฉีดสารละลายสารมาตรฐาน imperatorin ที่ 6 ระดับความเข้มข้น ตั้งแต่ 0.0402–0.2414 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 3 ขั้ว และวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง ด้วยเครื่อง UPLC นำค่า peak area และความเข้มข้นของสารละลายสารมาตรฐาน imperatorin ไปสร้าง calibration curve ผลการศึกษา (ภาพที่ 7–8)



ภาพที่ 7 Chromatogram ของสารละลายสารมาตรฐาน imperatorin

ในช่วงความเข้มข้น 0.0402–0.2414 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



ภาพที่ 8 Calibration curve ของสารละลายสารมาตรฐาน imperatorin ในช่วงความเข้มข้น 0.0402-0.2414 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

จากภาพที่ 7-8 พบว่า calibration curve ของสารมาตรฐาน imperatorin มีลักษณะเป็นเส้นตรง ในช่วงความเข้มข้น 0.0402-0.2414 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยมีค่า coefficient (R^2) เท่ากับ 0.999896

2.2 ความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision)

เมื่อเติมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ ในช่วงการใช้งาน 3 ระดับ ลงใน sample blank วิเคราะห์ sample blank จำนวน 6 ซ้ำ และวิเคราะห์ spiked sample ระดับละ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำทำ duplicate ผลการศึกษา (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลการศึกษาความแม่นยำและความเที่ยง

Standard addition level	%Spiked target	%Recovery		HORRAT**	เกณฑ์การยอมรับของ %recovery*
		Individual	Average		
Low level	50	104.8272	103.00	0.60	95-105%
		101.7207			
		102.4670			
Medium level	100	100.1012	99.43	0.88	95-105%
		96.8887			
		101.2907			
High level	150	103.1674	101.06	0.76	95-105%
		99.1816			
		100.8324			

* ตาม AOAC Peer-verified methods program on policies and procedures, Arlington, VA, USA (1998)
** การยอมรับความเที่ยง ประเมินจาก HORRAT (< 2)

2.3 ขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD)

พบว่า LOD มีค่าเท่ากับ 0.0026 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

2.4 ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ)

LOQ จากการคำนวณ มีค่าเท่ากับ 0.0086 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

2.5 ความจำเพาะ (Specificity)

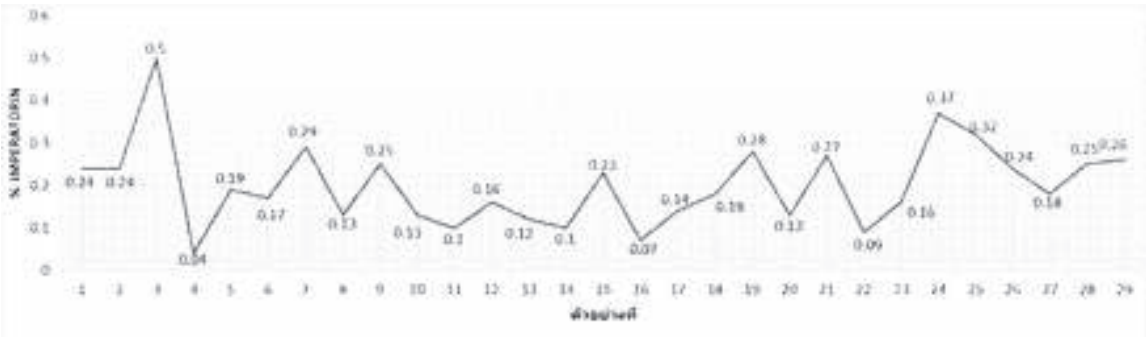
ผลการวิเคราะห์ method blank ไม่พบสารรบกวน peak ของ imperatorin

3. การวิเคราะห์ปริมาณ imperatorin ในตัวอย่างผลมะตูม

ผลการวิเคราะห์ปริมาณ imperatorin ในผลมะตูม จำนวน 29 ตัวอย่าง พบว่า ปริมาณ imperatorin มีค่าอยู่ในช่วง 0.04–0.5 % โดยน้ำหนัก มีค่าเฉลี่ยของปริมาณ imperatorin เท่ากับ 0.20 % โดยน้ำหนัก ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับ 0.09 (ตารางที่ 2 และภาพที่ 9)

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ imperatorin ในผลมะตูมด้วยวิธี UPLC

ตัวอย่างที่	ปริมาณ imperatorin (% โดยน้ำหนัก)	ตัวอย่างที่	ปริมาณ imperatorin (% โดยน้ำหนัก)
1	0.24	16	0.07
2	0.24	17	0.14
3	0.50	18	0.18
4	0.04	19	0.28
5	0.19	20	0.13
6	0.17	21	0.27
7	0.29	22	0.09
8	0.13	23	0.16
9	0.25	24	0.37
10	0.13	25	0.32
11	0.10	26	0.24
12	0.16	27	0.18
13	0.12	28	0.25
14	0.10	29	0.26
15	0.23	$\bar{x}$	0.20
		SD	0.09



ภาพที่ 9 ปริมาณ imperatorin ในผลมะตูม

วิจารณ์

วิธีรับประทานผลมะตูมโดยมากจะต้มเป็นน้ำมะตูม ซึ่งจะได้น้ำมะตูมที่มีลักษณะใสเนื่องจากการต้มจะเติมน้ำในปริมาณมาก แต่ในการวิเคราะห์ปริมาณ imperatorin หากสกัดโดยการต้มกับน้ำและนำมาลดปริมาตร สารสกัดที่ได้จะมีลักษณะเป็นเมือก ข้นหนืด ไม่สามารถทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ได้ จึงต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในการสกัดแทน UPLC เป็น High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) ที่มีการพัฒนาเพื่อให้มีประสิทธิภาพการแยกสาร ความไวในการแยกสารที่ดีขึ้น ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่น้อยลง และลดระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์ ดังนั้น จึงเลือกใช้เครื่อง UPLC ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ imperatorin ในผลมะตูมจากการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ imperatorin ที่พัฒนาขึ้น พบว่า %recovery จากการวิเคราะห์ spiked sample อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (95–105%) ซึ่งแสดงถึงความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ และค่า HORRAT อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (< 2) ซึ่งแสดงถึงความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น วิธีดังกล่าวจึงมีความเหมาะสม สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสาร imperatorin เพื่อการควบคุมคุณภาพของผลมะตูมต่อไปได้จากผลการวิเคราะห์ปริมาณ imperatorin ในผลมะตูม จำนวน 29 ตัวอย่าง สามารถนำไปสู่การกำหนดมาตรฐานปริมาณ imperatorin ในผลมะตูมได้ โดยกำหนดจากค่าเฉลี่ยปริมาณสารดังกล่าวลบด้วย 10% ของค่าเฉลี่ยนั้น ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.18% เมื่อปัดเลขเป็นทศนิยม 1 ตำแหน่ง ได้ค่า 0.20% ดังนั้น ผลมะตูมควรมีปริมาณ imperatorin ไม่น้อยกว่า 0.20% โดยน้ำหนัก

สรุป

วิธีวิเคราะห์ปริมาณ imperatorin ในผลมะตูมด้วยเครื่อง UPLC ที่พัฒนาขึ้น โดยสกัดผงมะตูม น้ำหนัก 1 กรัม ด้วย hexane ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยวิธี reflux เป็นเวลา 30 นาที กรองและนำสารสกัดที่ได้มาระเหยแห้ง จากนั้นละลายกลับและปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 25 มิลลิลิตร นำสารละลายดังกล่าว ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ฉีดเข้าสู่ระบบโครมาโทกราฟีของ UPLC ซึ่งใช้ column ชนิด BEH C18, 2.1 × 50 มิลลิเมตร, 1.7 ไมโครเมตร และใช้ 60% methanol เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตร/นาที และตรวจวัดสารด้วย PDA ที่ความยาวคลื่น 302 นาโนเมตร จะปรากฏ peak ของ imperatorin ที่ retention time เท่ากับ 1.2 นาที ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ดังกล่าว พบว่า calibration curve มีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.0402–0.2414 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีค่า coefficient (R²) เท่ากับ 0.999896 ค่า %recovery อยู่ในช่วง 99.43–103.00% ค่า HORRAT เท่ากับ 0.60–0.88 ค่า LOD และ LOQ มีค่าเท่ากับ 0.0026 และ 0.0086 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความเหมาะสม สามารถนำไปใช้เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์ปริมาณ imperatorin ในผลมะตูม และสามารถนำไปสู่การกำหนดเกณฑ์ปริมาณสารสำคัญในผลมะตูมต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. เต็ม สมิตินันท์. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย : ชื่อพฤกษศาสตร์-ชื่อพื้นเมือง. กรุงเทพฯ : กรมป่าไม้; 2523. หน้า 8.
2. นันทวัน บุญยะประกัศร, อรุณ โชคชัยเจริญพร, บรรณธิการ. สมุนไพรไม้พุ่มบ้าน เล่ม 3. กรุงเทพฯ : คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล; 2542. หน้า 570–578.
3. Piao XL, Park IH, Baek SH, Kim HY, Park MK, Park JH. Antioxidative activity of furanocoumarins isolated from Angelicae dahuricae. J Ethnopharmacol 2004; 93(2–3): 243–6.
4. Yang LL, Wang MC, Chen LG, Wang CC. Cytotoxic activity of coumarins from the fruits of *Cnidium monnieri* on leukemia cell lines. Planta Med 2003; 69(12): 1091–5.

5. He JY, Zhang W, He LC, Cao YX. Imperatorin induces vasodilation possibly via inhibiting voltage dependent calcium channel and receptor-mediated Ca^{2+} influx and release. *Eur J Pharmacol* 2007; 573(1-3): 170-5.
6. Chen IS, Chang CT, Sheen WS, Teng CM, Tsai IL, Duh CY, et al. Coumarins and antiplatelet aggregation constituents from Formosan *Peucedanum japonicum*. *Phytochemistry* 1996; 41(2): 525-30.
7. Luszczyk JJ, Wojda E, Raszewski G, Glowinski K, Czuczwar SJ. Influence of imperatorin on the anticonvulsant activity and acute adverse effect profile of lamotrigine in maximal electroshock-induced seizures and chimney test in mice. *Pharmacol Rep* 2008; 60(4): 566-73.
8. Sancho R, Márquez N, Gómez-Gonzalo M, Calzado MA, Bettoni G, Coiras MT, et al. Imperatorin inhibits HIV-1 replication through an Sp1-dependent pathway. *J Biol Chem* 2004; 279(36): 37349-59.
9. Kleiner HE, Reed MJ, DiGiovanni J. Naturally occurring coumarins inhibit human cytochromes P450 and block benzo[a]pyrene and 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene DNA adduct formation in MCF-7 cells. *Chem Res Toxicol* 2003; 16(3): 415-22.
10. Polshettiwar SA, Ganjiwale RO, Wadher SJ, Yeol PG. Spectrophotometric estimation of total tannins in some ayurvedic eye drops. *Indian J Pharma Sci* 2007; 69(4): 574-6.
11. McDonald S, Prenzler PD, Antolovich M, Robards K. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chem* 2001; 73: 73-84.
12. Rajan S, Gokila M, Jency P, Brindha P, Sujatha RK. Antioxidant and phytochemical properties of *Aegle marmelos* fruit pulp. *Int J Curr Pharm Res* 2011; 3(2): 65-70.
13. Chauthe SK, Sharma RJ, Agil F, Gupta RC, Singh IP. Quantitative NMR: an applicable method for quantitative analysis of medicinal plant extracts and herbal products. *Phytochem Anal* 2012; 23(6): 689-96.
14. Janarthanan UK, Varadharajan V, Krishnamurthy V. Physicochemical evaluation, phytochemical screening and chromatographic fingerprint profile of *Aegle marmelos* (L.) leaf extracts. *World J Pharm Res* 2012;1(3): 813-37.
15. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549.

Quantitative Analysis of Imperatorin in Bael fruit by Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC)

Duangpen Pattamadilok Apirak Sakpetch Peradhama Thiemthieprat

Sirikarn Thanaariyaroj Sakwichai Ontong and Nuchattrra Chansuvanich

Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand.

ABSTRACT Imperatorin is an active principle for anti-oxidation, anti-tumor, vasodilation, anti-platelet aggregation in Bael fruit (*Aegle marmelos* (L.) Corrêa, Family Rutaceae). Although this plant is widely used in traditional medicine and health products, there is no quality control method for it. The objective of this study is to develop an analytical method for determination of imperatorin content in Bael fruit using UPLC. Sample preparation was prepared by refluxing 1 g of powdered drug in 50 ml of hexane for 30 min, filtering and evaporating until dryness. The residue was redissolved and adjusted with methanol to 25 ml. A 3 µl-portion of sample solution was injected to UPLC system. The analysis was performed using BEH C18, 2.1×50 mm, 1.7 µm column and 60% methanol as the mobile phase at flow rate of 0.7 ml/min, and detected with PDA at wavelength 302 nm. This method was validated. Linearity was established for imperatorin concentration range of 0.0402–0.2414 mg/ml with a coefficient of determination (R^2) 0.999896. %Recovery was in the range of 99.43–103.00%. HORRAT was in the range of 0.60–0.88. LOD and LOQ were equal to 0.0026 and 0.0086 mg/ml, respectively. It was shown that this developed method was suitable and could be used to analyze the content of imperatorin in Bael fruit. The appropriate specification of imperatorin content in Bael fruit could be established.