การวิเคราะห์หาปริมาณสารแอนทราควิโนนจากพืชด้วยเทคนิคโครมาโทรกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบวัฏภาคย้อนกลับ

QUANTITATIVE ANALYSIS OF ANTHRAQUINONE FROM PLANTS BASED ON REVERSED–PHASE HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

รุจิรา คุ้มทรัพย์* และกัญญาลักษณ์ กระทาง

Ruchira Khoomsab* and Kanyarak Kratang

สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

Chemistry Program, Faculty of Science and Technology, Phetchabun Rajabhat University

*corresponding author e–mail: topkan13@gmail.com

(Received: 4 November 2019; Revised: 30 November 2019; Accepted: 26 December 2019)

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาหาปริมาณของสารประกอบแอนทราควิโนน 4 ชนิด พร้อมกัน คือ แอนทราควิโนน อะลิซาริน ไครโซฟานอล และอีโมดิน ในพืชจำนวน 8 ตัวอย่าง ได้แก่ รากยอ เนื้อในฝักคูน เมล็ดคูน เปลือกคูน ใบคูน ใบขี้เหล็ก เมล็ดกระเจี๊ยบแดง และเมล็ดแมงลัก ด้วยวิธีโครมาโทรกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง สภาวะที่ใช้แยกสารประกอบด้วย คอลัมน์ C18 (150×4.6 มิลลิเมตร 3.5 ไมครอน) แบบวัฏภาคย้อนกลับ และการชะแบบไอโซเคติก ด้วย 0.1%v/v ออโธ–ฟอสฟอริกเอซิด : อะซิโตไนไตรล์ อัตราส่วน (50 : 50 โดยปริมาตร) ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ผลการทดลอง พบว่า ในรากยอพบสารแอนทราควิโนน อะลิซาริน และอีโมดิน ในคูนพบสารไครโซฟานอล เฉพาะในเนื้อในฝักคูนและเมล็ดคูน เมล็ดแมงลักพบสารอะลิซาริน และอีโมดิน และใบขี้เหล็กพบเฉพาะสารแอนทราควิโนน การประเมินความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ พบว่า มีช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.5–10.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของแอนทราควิโนน อะลิซาริน ไครโซฟานอล และอีโมดิน และค่าสัมประสิทธิ์ความเป็นเส้นตรง (R^2) มากกว่า 0.9995 การประเมินความแม่นของวิธี พบว่ามีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 75.1–106.8 อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีความเที่ยงที่น่าพอใจโดยมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) ในช่วงร้อยละ 0.2–2.0 (n=7)

คำสำคัญ: แอนทราควิโนน โครมาโทรกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง วัฏภาคย้อนกลับ

Abstract

The purpose of the research was study to evaluate the simultaneous quantitation of four anthraquinone compounds, namely anthraquinone, alizarin, chrysophanol and emodin in 8 plants include root of Noni (*Morinda citrifolia* L.), *Cassia fistula* L. (pulp, seeds, peel and leaves), *Cassia siamea* leaves, Rosell seeds and Basil seeds by High Performance Liquid Chromatography. For component separation, the method utilized a C18 column (150×4.6 mm, 3.5–Micron) in reverse phase with isocratic elution using a mobile phase of 0.1% v/v Ortho–phosphoric : Acetonitrile (50 : 50 v/v). Wavelength of 254 nm was used for detection. The results of determine anthraquinone compounds, anthraquinone, alizarin and emodin were found in the Noni roots. Chrysophanol was found in only pulp and seeds of *Cassia fistula L*. sample. Alizarin and emodin were found in Basil seeds sample and anthraquinone was found in *Cassia siamea* Britt leaves. The validation of the chromatographic method was performed that the linear calibration curves were obtained over the concentration range of 0.5–10.0 µg/mL for anthraquinone alizarin chrysophanol and emodin with good correlation coefficients (R^2 > 0.9995). The accuracy of the method was reported as the recovery in the range of 75.1–106.8%. However, this method gave satisfactory precision in terms of relative standard deviation (RSD) value in the range 0.2–2.0% (n=7).

Keywords: Anthraquinone, High performance liquid chromatography, Reversed–phase

บทนำ

ปัจจุบันการใช้ประโยชน์จากสารสกัดจากพืชมีความนิยมสูงเนื่องจากเป็นการคัดหรือสกัดเอาเฉพาะส่วนที่มีประโยชน์ของสารชีวภัณฑ์ในพืชสมุนไพรออกมา ซึ่งจัดว่าเป็นการแปรรูปพืชสมุนไพรในขั้นแรกก่อนการนำสารสกัดดังกล่าวไปใช้เป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์อื่นๆ ต่อไป โดยพืชสมุนไพรมีคุณสมบัติในการรักษาหรือบรรเทาอาการเจ็บป่วยไม่สบายเช่นเดียวกับยา และการช่วยบำรุงและรักษาสภาวะความสมดุลของร่างกายมนุษย์ รวมถึงการนำไปใช้เพื่อประโยชน์ด้านเกษตรกรรมในการป้องกันและกำจัดศัตรูพืช ที่ไม่มีฤทธิ์ตกค้างที่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อมอื่นๆ เมื่อกล่าวถึงแอนทราควิโนนในปัจจุบันพบงานวิจัยจำนวนมากในทางเภสัชกรรมนำมาใช้เป็นส่วนประกอบของยาระบาย และใช้ทาภายนอกแก้โรคผิวหนัง (Monton et al., 2017; Sakulpanich & Grisanapan, 2009; Sakulpanich et al., 2012; Sihanat et al., 2018) แอนทราควิโนนเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีกลิ่นหอมอยู่ในกลุ่มควิโนน (Quinone) พบมากใน

พืชหลายสกุล รวมทั้งสกุลแคสเซีย (Cassia) ได้แก่ ขี้เหล็ก คูน ชุมเห็ดเทศ และทรงบาดาล (สมศักดิ์, 2542)

การสกัดสารจากพืชเป็นจุดเริ่มต้นสำคัญในขั้นตอนการแยกสาร (Isolation) และการทำให้สารบริสุทธิ์ (Purification) การพัฒนากระบวนการหรือวิธีการสกัดสาระสำคัญจากพืช จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะสามารถทำให้ได้ปริมาณสารที่ต้องการและทราบประสิทธิภาพของการสกัดสารด้วยวิธีการต่างๆ ปัจจุบันจึงมีการค้นหาแนวทางการสกัดสารที่มีประสิทธิภาพสูง เพื่อลดระยะเวลา ลดขั้นตอนการสกัดสาร ลดค่าใช้จ่าย และลดการใช้ตัวทำละลายให้น้อยลง การสกัดสารด้วยเทคนิคดั้งเดิมนั้นมีหลายวิธี เช่น การหมัก การต้ม การสกัดรีฟลักซ์ (Reflux) และซอกห์เลต (Soxhlet) เป็นต้น ซึ่งการเลือกวิธีการสกัดอาจทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่สกัด คุณสมบัติของสารในการทนความร้อน และชนิดตัวทำละลายที่ใช้ สำหรับวิธีการวิเคราะห์แอนทราควิโนนอยู่หลากหลายวิธี เช่น UV–vis spectrophotomertry TLC Densitometric TLC Image analysis Ultrasonic assisted Microwave และ High performance liquid chromatography (HPLC) เป็นต้น (Ain et al. 2016; Duval et al., 2016; Kuma & Spandana, 2013; Monton et al., 2017; Sihanat et al., 2018) เทคนิคโครมาโทรกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงหรือ HPLC เป็นเทคนิคการแยกองค์ประกอบของสารผสมที่น่าสนใจ ซึ่งอาศัยความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของแต่ละองค์ประกอบของสารผสมบนเฟสคงที่ (Stationary phase) ภายใต้การพาของเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ซึ่งสามารถทำได้ทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณวิเคราะห์ และนิยมใช้แบบวัฏภาคย้อนกลับ (Reverse phase) เพราะค่อนข้างเสถียรและเฟสเคลื่อนที่หาได้ง่าย จึงเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมมากวิธีหนึ่ง เพราะเป็นเทคนิคที่ให้ความเที่ยง ความแม่น มีสภาพไวสูงและประหยัดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์เมื่อเปรียบเทียบกับเครื่องมืออื่นๆ (Duval et al., 2016)

อย่างไรก็ตามเพื่อที่จะให้ได้สารที่สนใจ ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างนั้นจึงเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญอย่างมาก โดยสารที่สกัดออกมาต้องมีปริมาณและความเข้มข้นที่เครื่องมือสามารถวัดได้ โดยการเตรียมตัวอย่างที่ผู้วิจัยใช้ในครั้งนี้ คือ วิธีการสกัดโดยใช้อ่างควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าร่วมด้วยในการสกัดเป็นเทคนิคที่ง่าย ราคาไม่แพง ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารแอนทราควิโนน อะลิซาริน ไครโซฟานอล และอีโมดิน โดยใช้เทคนิค HPLC ที่ได้จากพืชในท้องถิ่นที่สามารถพบได้ในประเทศไทย และเป็นข้อมูลสำหรับการนำพืชสมุนไพรในกลุ่มนี้ไปประยุกต์ใช้เป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์ด้านสมุนไพรไทยต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ Anthraquinone standard ($C_{14}H_8O_2$) 98% บริษัท ACROS Organics™ ประเทศสหรัฐอเมริกา Alizarin standard ($C_{14}H_8O_4$) 98% บริษัท CARLO ERBA .Ltd ประเทศฝรั่งเศส Chrysophanol standard ($C_{15}H_{10}O_4$) 99% และ Emodin standard ($C_{15}H_{10}O_5$) 99% บริษัท SIGMA–ALDRICH .Ltd ประเทศสหรัฐอเมริกา และ Acetonitrile (CH_3CN) 99% เกรด HPLC ส่วนตัวทำลาย ได้แก่ Methanol (CH_3OH) Ortho–Phosphoric acid (H_3PO_4) Acetic acid (CH_3COOH) Formic acid (HCOOH) และ Hydrochloric acid (HCl) เกรดงานวิเคราะห์

2. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography: HPLC) รุ่น Agilent series 1260 ประเทศเยอรมนี คอลัมน์ รุ่น ZORBAX Eclipse Plus (C18 150×4.6 mm 3.5–Micron) บริษัท Agilent Technologies ประเทศสหรัฐอเมริกา Guard Column รุ่น Hardware kit (4.6 mm ID × 12.5 mm 4–Pack) บริษัท Agilent Technologies ประเทศสหรัฐอเมริกา

3. การเตรียมตัวอย่างพืช

ตัวอย่างพืช ได้แก่ รากยอ คูน ขี้เหล็ก กระเจี๊ยบแดง แมงลัก เก็บรวบรวมจากพื้นที่ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์ ส่วนของพืชที่ใช้ศึกษา ได้แก่ รากยอ เนื้อในฝักคูน เมล็ดคูน เปลือกคูน ใบคูน ใบขี้เหล็ก เมล็ดกระเจี๊ยบแดง และเมล็ดแมงลัก นำมาทำความสะอาดโดยล้างด้วยน้ำสะอาด แล้วทำการแยกส่วนที่ต้องการใส่ในถาดสแตนเลสแล้วนำเข้าตู้อบแห้งที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส จนพืชแห้งและน้ำหนักคงที่ นำไปบดให้ละเอียด เก็บในโถดูดความชื้นเพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป

4. การทดสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ (Method validation)

4.1 การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity)

ความจำเพาะเจาะจงของวิธี ทำได้โดยนำตัวอย่างของแบลงค์ คือ 0.1% v/v ออโท–ฟอสฟอริก เอซิด : อะซิโตไนไทรล์ ในอัตราส่วน 50: 50 และ สารมาตรฐานผสมแอนทราควิโนน อะลิซาริน ไครโซฟานอล และอีโมดินที่ความเข้มข้น 3 µg/mL ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ปริมาตร 5 µL อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ความยาวคลื่น 254 nm

4.2 การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (Linearity and range)

ทำการตรวจสอบการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานแอนทราควิโนน (Anthraquione) อะลิซาริน (Alizarin) ไครโซฟานอล (Crysophanol) อีโมดิน (Emodin) ที่ระดับ

ความเข้มข้น 0.5 1 2 3 5 7 และ 10 µg/mL และทำการวิเคราะห์โดยการฉีดเข้าเครื่อง HPLC ปริมาตร 5 µL อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ความยาวคลื่น 254 nm ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

4.3 การทดสอบค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (Limit of detection : LOD) และค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์เชิงปริมาณ (Limit of the quantitation : LOQ)

การทดสอบค่า LOD และ LOQ สามารถคำนวณได้โดยใช้วิธีการของ Shi et al. (2014) นำผลข้อมูลจากการทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ของกราฟมาตรฐาน ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีค โดยการพิจารณาจุดตัดกราฟมาตรฐานของ Y-intercept คือ ค่าความเข้มข้นต่ำสุด คำนวณความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (LOD) และค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์เชิงปริมาณได้อย่างแม่นยำ (LOQ) จากสมการที่ 1 และสมการที่ 2

$$LOD = 3\left(\frac{S_{y/x}}{b}\right) \quad \text{.....} \quad (1)$$

$$LOQ = 10\left(\frac{S_{y/x}}{b}\right) \quad \text{.....} \quad (2)$$

เมื่อ $$S_{y/x} = \sqrt{\frac{(\sum y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$$

โดย $S_{y/x}$ = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการทำ Linearity

y_i = ค่าสัญญาณที่ได้จากการวิเคราะห์จริง

$\hat{y}_i$ = ค่าสัญญาณที่ได้จากสมการเส้นตรง ($y = ax + c$)

b = ความชันของสมการเส้นตรง

4.4 การทดสอบความแม่น (Accuracy) และความเที่ยง (Precision)

เติมสารละลายมาตรฐานแอนทราควิโนนเข้มข้น 100 µg/mL จำนวน 1.25 5.00 และ 12.50 mL ตามลำดับ ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 5 mL ในแต่ละขวด และปรับด้วยตัวทำละลายอะซิโตไนไทรล์ ให้ครบ 50 mL จะได้ความเข้มข้นเท่ากับ 2.5 10.0 และ 25.0 µg/mL (สารละลายมาตรฐานอะลิซาริน ไครโซฟานอล และอีโมดิน เตรียมเช่นเดียวกับสารละลายมาตรฐานแอนทราควิโนน) เตรียมตัวอย่างใบขี้เหล็ก โดยการชั่งตัวอย่างมา 1 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน นำตัวอย่างมาเติมสารละลายมาตรฐานแอนทราควิโนน อะลิซาริน ไครโซฟานอล และอีโมดิน แต่ละความเข้มข้น 2.5 10.0 และ 25.0 µg/mL ความเข้มข้นละ 1 ขวด ขวดละ 1 mL (แต่ละความเข้มข้นทำซ้ำ 7 ซ้ำ) เติมสารละลายเมทานอล (pH=1) จำนวน 25 mL นำไปไว้ในอ่างควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าที่ 70 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ใส่ขวดก้นกลม ขนาด 25 mL แล้วนำไประเหยเมทานอลออกจนแห้ง เติม

ตัวทำละลายอะซิโตไนไทรล์ 4 mL นำไป sonicate จนตัวอย่างที่ติดอยู่ที่ก้นขวดกลมละลายออก จากนั้นนำมาเทใส่ขวดปรับปริมาตรขนาด 5 mL แล้วปรับปริมาตรให้ครบด้วยตัวทำละลายอะซิโตไนไทรล์ กรองด้วย Syringe filter nylon ขนาด 0.22 µm × 13 mm ใส่ขวด Vial แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC หาค่าความแม่นและความเที่ยง ทำโดยการฉีดเข้าเครื่อง HPLC และทำการวิเคราะห์โดยการคำนวณหาร้อยละการกลับคืน (% Recovery) ของสารมาตรฐานที่เติมความเข้มข้น 0.5 2.0 และ 5.0 µg/mL เทียบกับปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้และ ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) ได้จากการทำการทดลอง 7 ซ้ำ

5. การเตรียมตัวอย่างและผลการวิเคราะห์ตัวอย่าง

การวิเคราะห์หาปริมาณแอนทราควิโนน อะลิซาริน ไครโซฟานอล และอีโมดิน จากพืช ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์ ทั้งหมด 8 ตัวอย่าง ได้แก่ รากยอ เนื้อในฝักคูน ใบคูน เมล็ดคูน เปลือกคูน ใบขี้เหล็ก เมล็ดกระเจี๊ยบแดง และเมล็ดแมงลัก โดยนำตัวอย่างพืชแห้งที่บดละเอียดแล้วมาชั่ง 1 กรัม ใส่ในขวดรูปกรวยขนาด 25 mL เติมสารละลายเมทานอล (pH=1) จำนวน 25 mL พร้อมเขย่าแล้วปิดฟรอยส์ นำไปไว้ในอ่างควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าที่ 70 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ใส่ขวดก้นกลมขนาด 25 mL แล้วนำไประเหยเมทานอลออกจนแห้ง เติมตัวทำละลายอะซิโตไนไทรล์ 4 mL แล้วนำไป sonicate จนตัวอย่างที่ติดอยู่ที่ก้นขวดกลมละลายออก เทใส่ขวดปรับปริมาตร ขนาด 5 mL ปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลายอะซิโตไนไทรล์ กรองด้วย Syringe filter nylon ขนาด 0.22 µm × 13 mm ใส่ขวด Vial นำไปด้วยวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

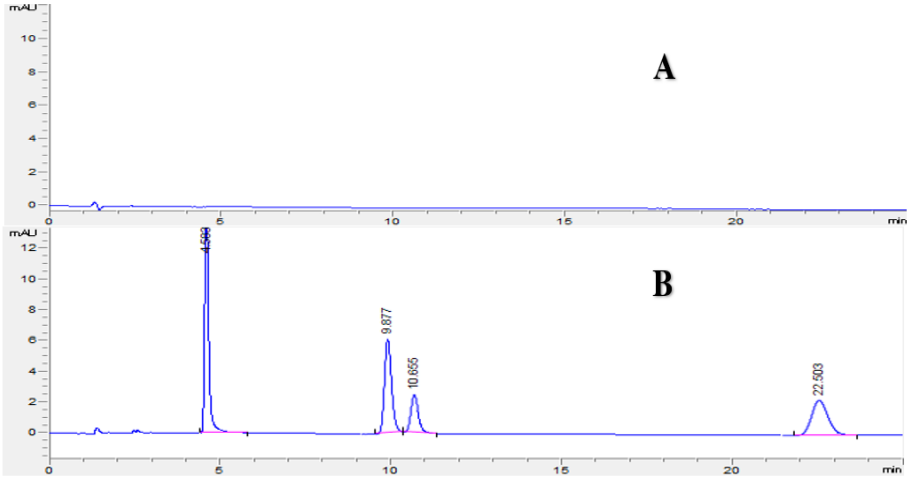
1. ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Validation of the method)

การตรวจสอบความถูกต้องแม่นยำ เป็นการวิเคราะห์เพื่อให้เกิดความมั่นใจว่าวิธีวิเคราะห์ให้ผลที่ถูกต้อง มีความเหมาะสมสามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างจริง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษา Method validation ซึ่งเป็นกระบวนการยืนยันความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ได้กำหนดพารามิเตอร์ ที่จะศึกษาดังนี้

1.1 ผลความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ (Specificity)

ผลการศึกษาความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ แสดงได้จากระหว่างโครมาโทแกรมของแบลงค์ คือ 0.1 %v/v ออโท–ฟอสฟอริก เอซิด : อะซิโตไนไทรล์ (50 : 50) และโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสม แอนทราควิโนน อะลิซาริน ไครโซฟานอล และอีโมดิน (เข้มข้น 3 µg/mL) เพื่อศึกษาว่าแบลงค์ไม่ถูกรบกวนจากสารอื่น ในการวิเคราะห์แยก

ตัวอย่างที่ต้องการศึกษา โดยการตรวจพบจะต้องไม่พบสิ่งรบกวนในตำแหน่งเดียวกันกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ได้ผล ดังภาพที่ 1

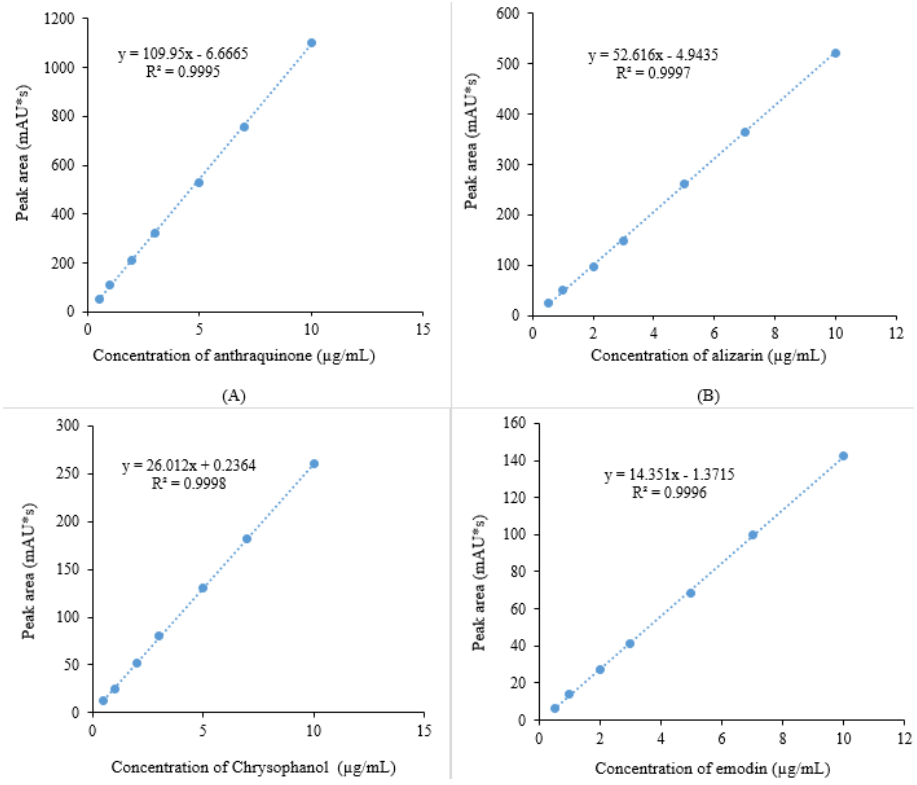


ภาพที่ 1 โครมาโทแกรม (A) 0.1 %v/v ออโท–ฟอสฟอริก เอซิด : อะซิโตไนไทรล์ (50 : 50) และ (B) โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานแอนทราควิโนน อะลิซาริน ไครโซฟานอล และอีโมดิน ที่ความเข้มข้น 3 µg/mL

จากการศึกษาความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ พบว่า โครมาโทแกรมของแบลงค์ คือ 0.1 % v/v ออโท–ฟอสฟอริก เอซิด : อะซิโตไนไทรล์ที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ ไม่พบพีคใดๆ เกิดขึ้นในช่วงการวิเคราะห์ และเมื่อเทียบกับโครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐานผสม (อะลิซาริน แอนทราควิโนน ไครโซฟานอล และอีโมดิน) ความเข้มข้น 3 µg/mL พบพีคขึ้นที่เวลา 4.583 9.877 10.655 และ 22.503 นาที ตามลำดับ ใช้เวลาในการวิเคราะห์ทั้งหมด 23 นาที แสดงให้เห็นว่าผลการวิเคราะห์ไม่พบสิ่งรบกวนที่ตำแหน่งเดียวกับสารที่ต้องการตรวจวัด

1.2 ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (Linearity and Range)

ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงของสารมาตรฐานแอนทราควิโนน อะลิซาริน ไครโซฟานอล และอีโมดิน ที่ระดับความเข้มข้นระหว่าง 0.5–10.0 µg/mL เมื่อนำพื้นที่ใต้พีคและความเข้มข้นไปสร้างกราฟความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.5–10.0 µg/mL ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 แสดง Linearity ของสารมาตรฐาน (A) แอนทราควิโนน (B) อะลิซาริน (C) ไครโซฟานอล และ (D) อีโมดิน ที่ช่วงความเข้มข้นระหว่าง 0.5–10.0 µg/mL

จากการศึกษาความเป็นเส้นตรงและช่วงการทดสอบของสารมาตรฐาน แอนทราควิโนน อะลิซาริน ไครโซฟานอล และอีโมดิน ได้ช่วงการทดสอบที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.5–10.0 µg/mL และค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจหรือ R^2 ได้เท่ากับ 0.9995 0.9997 0.9998 และ 0.9996 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าผ่านเกณฑ์ที่กำหนด คือ ค่า R^2 มีค่ามากกว่า 0.995

1.3 ผลการทดสอบ LOD และ LOQ

จากผลศึกษาความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์เพื่อมาคำนวณหาค่า $S_{y/x}$ LOD และ LOQ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

สารมาตรฐาน	ช่วงการทดสอบ (µg/mL)	สมการความสัมพันธ์	R^2	$S_{y/x}$	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
แอนทราควิโนน	0.5–10	y = 109.95x – 6.67	0.9995	7.6811	0.2096	0.6986
อะลิซาริน	0.5–10	y = 52.62x – 4.94	0.9997	2.7113	0.1546	0.5153
ไครโซฟานอล	0.5–10	y = 26.01x + 0.24	0.9998	1.4139	0.1631	0.5435
อีโมดิน	0.5–10	y = 14.35x – 1.37	0.9996	1.0584	0.2213	0.7376

จากการศึกษาการทดสอบขีดจำกัดการตรวจวัดต่ำสุด และขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ (LOD และ LOQ) ของสารมาตรฐานแอนทราควิโนน อะลิซาริน ไครโซฟานอล และอีโมดิน พบว่า ได้ค่า LOD อยู่ที่ 0.2096 0.1546 0.1631 และ 0.2213 µg/mL ตามลำดับ และค่า LOQ อยู่ที่ 0.6986 0.5153 0.5435 และ 0.7376 µg/mL ตามลำดับ

1.4 ผลการทดสอบความแม่นและความเที่ยง (Accuracy and Precision)

ผลศึกษาการทดสอบความแม่นและความเที่ยงของการวิเคราะห์ โดยการหาร้อยละการคืนกลับมา (% Recovery) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) โดยการเติมสารละลายมาตรฐานผสม 4 ชนิด (แอนทราควิโนน อะลิซาริน ไคโซฟานอล และอีโมดิน) ในตัวอย่างใบขี้เหล็กที่ระดับความเข้มข้น 0.5 2.0 5.0 µg/mL ได้ค่า % Recovery และ % RSD ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์และค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (แอนทราควิโนน อะลิซาริน ไครโซฟานอล และอีโมดิน) (n=7)

สารมาตรฐาน	ความเข้มข้นที่ Spiked ในตัวอย่าง (µg/mL)	ความเข้มข้นที่ตรวจพบ (µg/mL)	% RSD	% Recovery
อะลิซาริน	0.5	0.3984±0.0064	1.6	79.7
	2.0	1.5015±0.0088	0.8	75.1
	5.0	4.1040±0.0069	0.6	82.1
แอนทราควิโนน	0.5	0.5338±0.0064	1.5	106.8
	2.0	1.7778±0.0182	1.0	88.9
	5.0	4.7072±0.0042	0.4	94.1
อีโมดิน	0.5	0.3816±0.0150	0.8	76.3
	2.0	1.7778±0.0182	1.0	88.9
	5.0	4.1470±0.0564	1.4	82.9
ไครโซฟานอล	0.5	0.4424±0.0029	0.7	88.5
	2.0	1.9216±0.0150	0.8	96.1
	5.0	4.8957±0.0321	0.7	97.9

ผลการทดสอบความแม่นและความเที่ยงของการวิเคราะห์ โดยการเติมสารละลายมาตรฐาน (แอนทราควิโนน อะลิซาริน ไครโซฟานอล และอีโมดิน) ในตัวอย่างใบขี้เหล็กซึ่งเป็นตัวแทนของ sample blank ที่ความเข้มข้น 0.5 2.0 5.0 µg/mL ได้ค่า % Recovery ในช่วง 75.1–106.8 พบว่า % Recovery ผ่านเกณฑ์ที่กำหนด คือ 70%–110% และ % RSD ไม่เกิน 2% ตามที่ AOAC (2002) ได้กำหนดไว้

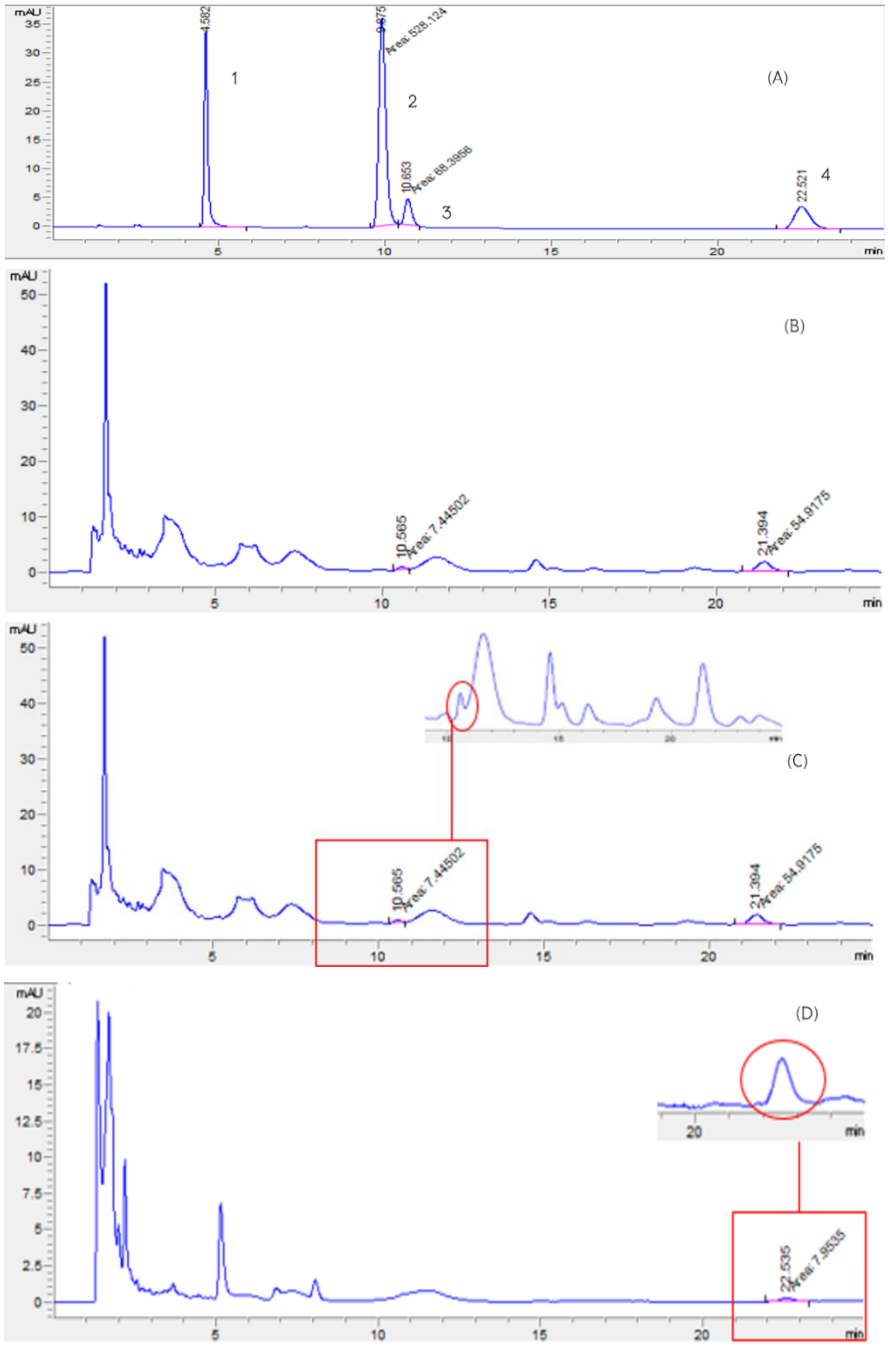
2. ผลการวิเคราะห์ปริมาณแอนทราควิโนน อะลิซาริน ไครโซฟานอล และอีโมดิน ในตัวอย่างพืช

ผลการศึกษาหาปริมาณแอนทราควิโนน อะลิซาริน ไครโซฟานอล และอีโมดิน ในตัวอย่างพืช 8 ชนิด ได้แก่ รากยอ ใบขี้เหล็ก เมล็ดแมงลัก เมล็ดกระเจี๊ยบแดง เนื้อในฝักคูน เปลือกคูน เมล็ดคูน และใบคูน แสดงตัวอย่างโครมาโทแกรม ดังภาพที่ 3 และคำนวณปริมาณสารกลุ่มแอนทราควิโนนที่วิเคราะห์ ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ (แอนทราควิโนน อะลิซาริน ไครโซฟานอล และอีโมดิน) ในตัวอย่างพืช 8 ชนิด (n=4)

ชนิดตัวอย่าง	ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้ (µg/g)			
	แอนทราควิโนน	อะลิซาริน	ไครโซฟานอล	อีโมดิน
รากยอ	80.56±19.04	7.03±2.75	–	55.12±2.30
ใบขี้เหล็ก	0.84±0.09	–	–	–
เมล็ดกระเจี๊ยบแดง	–	–	–	–
เมล็ดแมงลัก	–	1.27±0.03	–	2.89±0.24
เนื้อในฝักคูน	–	–	1.63±0.10	–
เปลือกคูน	–	–	–	–
เมล็ดคูน	–	–	1.42±0.13	–
ใบคูน	–	–	–	–

หมายเหตุ – หมายถึง ตรวจไม่พบ



ภาพที่ 3 โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์สารมาตรฐานผสม 4 ตัว (1) อะลิซาริน (2) แอนทราควิโนน (3) ไครโซฟานอล และ (4) อิโมดิน (A) ตัวอย่างสารสกัดรากยอ (B) เมล็ดแมงลัก (C) และ เนื้อในฝักคูน (D) จากเครื่อง HPLC คอลัมน์ C–18 เฟสเคลื่อนที่ 50 : 50 ของ 0.1% v/v ออโท–ฟอสฟอริก เอซิด : อะซิโตไนไทรล์ ปริมาตรฉีด 5 µL

จากการศึกษาหาปริมาณกลุ่มสารแอนทราควิโนน โดยเทียบกับสารมาตรฐาน 4 ชนิด ประกอบด้วย สารแอนทราควิโนน สารอะลิซาริน สารไครโซฟานอล และสารอีโมดิน วิเคราะห์ในตัวอย่าง 8 ชนิด ได้แก่ รากยอ ใบขี้เหล็ก เมล็ดแมงลัก เมล็ดกระเจี๊ยบแดง เนื้อในฝักคูน เปลือกคูน เมล็ดคูน และใบคูน พบว่า สารแอนทราควิโนนเป็นสารหลักที่พบในรากยอ โดยมีปริมาณสารแอนทราควิโนน อะลิซาริน และอีโมดิน อยู่มากที่สุด เท่ากับ 80.56±19.04 7.03±2.75 และ 55.12±0.00 µg/g ตามลำดับ รองลงมา คือ เมล็ดแมงลัก มีปริมาณอะลิซารินและอีโมดินอยู่ที่ 1.27±0.03 และ 2.89±0.00 µg/g ตามลำดับ สำหรับในตัวอย่างคูน ได้แบ่งส่วนต่างๆ ในการวิเคราะห์ คือ เนื้อในฝักคูน เปลือกคูน เมล็ดคูน และใบคูน พบว่า เนื้อในฝักคูนและเมล็ดคูนมีปริมาณไครโซฟานอลอยู่ที่ 1.63±0.00 และ 1.42±0.03 µg/g ตามลำดับ ส่วนเปลือกคูนและใบคูนไม่พบพีคในโครมาโทรแกรมที่ตรงกับสารมาตรฐานที่วิเคราะห์ อย่างไรก็ตามพืชบางชนิดที่ไม่พบพีคตรงกับสารมาตรฐานที่ทำการตรวจวัด อาจมีสารสำคัญที่ปรากฏในกลุ่มแอนทราควิโนนชนิดอื่นที่มีฤทธิ์เป็นยาระบาย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการพบสาร Rhein เป็นสารหลักที่พบในฝักคูน (Sakulpanich & Gritsanapan, 2009) และมี Rhein 0.0993% w/w ในคูน (Chewchinda et al., 2014) สำหรับใบขี้เหล็กมีปริมาณแอนทราควิโนนอยู่ที่ 0.84±0.09 µg/g ส่วนตัวอย่างที่เหลือไม่พบสารแอนทราควิโนน อะลิซาริน ไครโซฟานอล และอีโมดิน ดังนั้นตัวอย่างที่พบกลุ่มสารแอนทราควิโนนที่ทำการวิเคราะห์สามารถนำมาใช้เป็นยาระบายได้ การเปรียบเทียบปริมาณแอนทราควิโนน จากงานวิจัยที่เกี่ยวข้องมีปริมาณของแอนทราควิโนนจากรากยออยู่ที่ 103.2±4.8 mg/g (Temiyaputra et al., 2008) ในขณะที่ สมศักดิ์ (2542) พบปริมาณของแอนทราควิโนนจากฝักคูน และใบขี้เหล็กอยู่ที่ 0.6 และ 0.12 g/100 g ซึ่งปริมาณแอนทราควิโนนที่ศึกษาครั้งนี้มีค่าน้อยกว่าจากงานวิจัยดังกล่าว อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ได้ใช้เทคนิค HPLC วิเคราะห์สารกลุ่มแอนทราควิโนน แสดงให้เห็นการตรวจสอบวิธีที่ยอมรับได้ พบว่า มีค่า $R^2 \geq 0.999$ เป็นตัวยืนยันความเป็นเส้นตรง ส่วนค่า % RSD ต่ำกว่า 2 และ % Recovery อยู่ในช่วง 75.1–106.8 เป็นตัวยืนยันค่าความเที่ยงและความถูกต้องของวิธี

สรุปผลการวิจัย

การวิเคราะห์สารประกอบแอนทราควิโนนจากพืชด้วยเทคนิคโครมาโทรกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบวัฏภาคย้อนกลับและใช้การชะแบบไอโซเคติก สามารถวิเคราะห์หาปริมาณกลุ่มแอนทราควิโนน 4 ชนิด พร้อมกัน (แอนทราควิโนน อะลิซาริน ไครโซฟานอล และอีโมดิน) ในเวลาเพียง 23 นาที มีวิธีการเตรียมตัวอย่างที่ง่ายไม่ซับซ้อน จึงลดเวลาในการสกัดได้มาก สามารถวิเคราะห์สารผสมในปริมาณน้อยได้และสามารถวิเคราะห์ซ้ำ ซึ่งให้ผลการตรวจสอบความความเที่ยงและความแม่นที่ดี สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์สารประกอบแอนทราควิโนน

ในพืชชนิดอื่นๆ และเป็นทางเลือกในการพัฒนาเป็นส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพรไทยต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ที่ให้การสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2560 ขอขอบคุณ ดร.เสาวภา ชูมณี ที่ให้คำปรึกษาและความรู้ที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยนี้ ขอขอบคุณศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่สนับสนุนเครื่องมือ และสถานที่ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

สมศักดิ์ นวลแก้ว. (2542). **การเปรียบเทียบปริมาณแอนทราควิโนนและรูปแบบไซโมแกรมของไอโซไซม์ในพืชสกุลแคสเซีย**. (วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต). มหาวิทยาลัยมหิดล, สาขาวิชาเภสัชศาสตร์ (เภสัชเคมีและพฤกษเคมี).

Ain, N. J., Sakinah, M. A. M. & Zularisam, A.W. (2016). Effects of Different Extraction Conditions on The Production of Anthraquinone . **Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 10**(17), 128–135.

AOAC. (2002). **Official Method of Analysis**. (16th ed). Washington DC : Association of Official Analytica.

Chewchinda, S., Sithisarn, P., & Gritsanapan, W. (2014). Rhein Content in Cassia Fistula Pod Pulp Extract Determined by HPLC and TLC–Densitometry in Comparison. **Journal of Health Research, 28**(6), 409–411.

Duval, J., Pecher, V., Poujol, M., & Lesellier, E. (2016). Research advances for the extraction, analysis and uses of anthraquinones: A review. **Industrial Crops and Products, 94**, 812–833.

Kumar, H.& Spandana M. (2013). Qualitative and Quantitative Study of Anthraquinone Derivatives in the Root Extract of *Rheum australe* of Nepal (syn.*Rheum emodi*) by HPLC. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 2**(4), 40–42.

Monton, C., Duangjit, S., Chankana, N., Charoenchai, L. & Suksaeree, J. (2017). The Optimazation of the Anthraquinones Extraction from Senna tora Seeds Using Two–Factor Spherical Composite Experimental Design. **Proceedings of the RSU International Research Conference** (pp. 88–96). Bangkok: Rangsit University.

Sakulpanich, A. & Gritsanapan, W. (2009). Determination of Anthraquinone Glycoside Content in Cassia fistula Leaf Extracts for Alternative Source of Laxative Drug. **International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences, 3**(1), 42–45.

Sakulpanich, A, Chewchinda, S., Sithisarn, P. & Gritsanapan, W. (2012). Standardization and toxicity evaluation of *Cassia fistula* pod pulp extract for alternative source of herbal laxative drug. **Pharmacognosy Journal, 4**(28), 6–12.

Shi YB., Li HL., Wang HQ., Yang YB., Zhang XY., Wang H., Zhu ZJ., Zhang ZY., & Zhang CA. (2014). Simultaneous determination of five anthraquinones in a Chinese traditional preparation by RP–HPLC using an improved extraction procedure. **Journal of Integrative Medicine, 12**(5), 455–62.

Sihanat, A., Palanuvej, C., Ruangrungsi N. & Rungsihirunrat, K. (2018).Estimation of Aloe–emodin Content in *Cassia grandis* and *Cassia garrettiana* Leaves Using TLC Densitometric Method and TLC Image Analysis. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, **80**(2), 359–365.

Temiyaputra,W., Suebsanga, T., Yajom, K., Piyaworanon, S. & Leksawasdi, N. (2008). Influences of Anthraquinone Extraction Techniques from *Morinda sp.* on Extraction Efficiency. **Kasetsart Journal Natural Science, 42**, 118–126.