

บทนำ

จากการศึกษาในเบื้องต้นของทีมนักวิจัยนี้ในการศึกษาพิษเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการปกป้องเซลล์ระดับชนิด HepG2 ของผลไม้โบราณจำนวน 32 ชนิด พบว่าในจำนวนพืชตัวอย่างที่นำมาทดสอบนั้น สารสกัดจากผลของลำพูมีฤทธิ์ทั้งสองดังกล่าวที่ดีมาก เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical decolorization assay และ ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay โดยเปรียบเทียบกับ trolox และ ascorbic acid และพบว่าสารสกัดจากผลลำพูมีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ระดับได้ดีอีกด้วยโดยมีพิษต่อเซลล์ในระดับต่ำ และเมื่อทดสอบฤทธิ์ดังกล่าวกับสารสกัดจากส่วนอื่นของต้นลำพูยังคงพบฤทธิ์ดังกล่าวเช่นกัน รายงานเกี่ยวกับการศึกษาสารเคมีที่พบในลำพูถือว่ามีการศึกษากันน้อยมาก ผลลำพูมีองค์ประกอบเป็นเพคติน 11% ส่วนเนื้อไม้ของลำต้นมีสารให้สีคือ emodin และ chrysophanic acid ส่วนเปลือกมีแทนนินกลุ่ม pyrogallol 17.1% สารสกัดจากดอกลำพูพบสารผสมของไฮโดรคาร์บอนสายยาว (C23-C33) สารผสมของเอสเทอร์สายยาว แอลกอฮอล์สายยาว (C26, C30 และ C33), β -sitosterol, stigmasterol, kaempferol, quercetin, gallic acid และ β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจว่าส่วนใดของลำพูมีฤทธิ์ชีวภาพมากที่สุดและยังมีฤทธิ์ชีวภาพอื่น ๆ ที่น่าสนใจอีกด้วยหรือไม่ โดยการที่สารมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีจึงเป็นไปได้ว่าจะมีฤทธิ์ปกป้องเซลล์อื่น ๆ เช่น เซลล์สมองได้ และมีความน่าสนใจในการนำมาทดสอบฤทธิ์ anti-Alzheimer ด้วย ดังนั้นการค้นหารายการจากธรรมชาติที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพจึงเป็นที่น่าสนใจและให้ประโยชน์ในการป้องกันโรคต่าง ๆ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อประเทศชาติได้ในระยะยาว จากข้อมูลข้างต้นผู้วิจัยเล็งเห็นถึงประโยชน์ของลำพูจึงสนใจศึกษาถึงวิธีการสกัดที่เหมาะสมสำหรับส่วนต่าง ๆ ของลำพู ได้แก่ ผล เมล็ด กลีบเลี้ยง เกสร และรากอากาศของลำพู โดยใช้ตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ และนำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ชีวภาพด้วยวิธีการต่าง ๆ ในโครงการย่อยที่ 2-6 เพื่อให้ทราบถึงสารสกัดใดมีฤทธิ์ที่ดี เพื่อนำมาเป็นข้อมูลในการแยกสกัดสารต่อไปและทดสอบฤทธิ์ดังกล่าวในเชิงลึกต่อไป รวมทั้งทำการแยกสารสกัดให้ได้สารบริสุทธิ์เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมี โดยในเบื้องต้นทำการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบที่แยกได้ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีและการตรวจสอบเบื้องต้นทางพิษเคมีเพื่อเป็นการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดหายากที่แยกได้ด้วยการทดสอบกับน้ำยาทดสอบชนิดต่าง ๆ เพื่อให้ทราบถึงองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดหายากในเบื้องต้น เช่น flavonoid, alkaloid, terpene และ lipid เป็นต้น จากการศึกษาด้วยเทคนิคสเปกโตรสโกปีจะทำให้ทราบโครงสร้างสารเคมีของสารที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ เมื่อทราบถึงองค์ประกอบและโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบแล้ว จะสามารถทำนายคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของสารได้ ซึ่งจะนำไปใช้เป็นข้อมูลประกอบเพื่อพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณเพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพสารสกัดจากลำพู และสามารถใช้ประโยชน์ในการตรวจหาความคงตัวของสารนั้นได้ ทั้งนี้ในระหว่างการทำเนินการวิจัยจะคัดเลือกสารสกัดจากส่วนของลำพูที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพดีที่สุดมาเตรียมเป็นสารสกัดหายาก ถึงแม้ว่าส่วนต่าง ๆ ของต้นลำพูนั้นจะมีความสำคัญต่อการกระจายพันธุ์ สามารถปลูกทดแทนได้ และแพร่พันธุ์ได้ค่อนข้างรวดเร็ว รวมทั้งอาจมีการพัฒนาทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อทดแทนการทำลายพืชได้ก็ตาม แต่จากการสกัดในขั้นเริ่มต้นพบว่าสารสกัดหายากที่เตรียมได้จากลำพูมี yield ค่อนข้างสูง จึงไม่ปัญหาลึกในการเตรียมสารสกัดในปริมาณสูงและไม่กระทบต่อสิ่งแวดล้อม

บทบทวนวรรณกรรม

ลำพู มีชื่อสามัญคือ cork tree และมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Sonneratia caseolaris* (L.) Engl. อยู่ในวงศ์ Sonneratiaceae ชื่อพ้อง ได้แก่ *Rhizophora caseolaris* L.; *Sonneratia acida* L., *S. lanceolata* Blume ลำพู เป็นไม้ต้นขนาดกลาง (จำนง ทองประเสริฐ, 2540) ลำพูมีสรรพคุณทางยา คือ ใช้น้ำที่ได้จากการหมักดอกผลมาดื่ม เพื่อยับยั้งอาการเลือดไหลไม่หยุด และนำคั้นจากผลกิ่งสุกช่วยบรรเทาอาการไอ น้ำที่สกัดจากดอกเป็นส่วนผสมใน ยาขับเลือดในระบบปัสสาวะ นอกจากนี้ ยังใช้ใบบดผสมกับข้าวโพดรักษาฝีดาษ เปลือกไม้มีแทนนินประมาณ ร้อยละ 17.1 ของน้ำหนักแห้ง (จำนง ทองประเสริฐ, 2540; Bandaranayake, 2007; Skatsson, 2007) ส่วนใบ นำมาใช้พอกกระหม่อมเวลาเลือดตีสขึ้น (Sangdee, 2007) เปลือกผลสุกใช้เป็นยาขับพยาธิ (Bandaranayake, 2007; Duke และ Wain, 1980) ชาวพม่าใช้ผลลำพูเป็นยาพอก และชาวอินโดนีเซียพอกใบที่บดและผสมกับเกลือ แล้วบริเวณบาดแผลหรือแผลฟกช้ำ ส่วนชาวมาลายันใช้เปลือกผลแก้ขับพยาธิ ผลเกือบสุกในการแก้อาการไอ และใบที่ทุบ แล้วรักษาอาการปัสสาวะเป็นเลือดและไข้ทรพิษ (Ng และ Sivasothi, 2005; Perry, 1980) กลิ่นหอมจากดอกลำพู ในช่วงกลางคืนสามารถดึงดูดสัตว์หลายชนิด เช่น ค้างคาวบางชนิด และแมลงหลายชนิด โดยเฉพาะหิ่งห้อย ซึ่งมา ดูดกินน้ำหวานจากเกสรดอกลำพู ซึ่งแสดงว่าลำพูเป็นแหล่งอาหารและที่อยู่ที่สำคัญของสัตว์และแมลงด้วย และถือเป็นพืชที่มีความสำคัญต่อระบบนิเวศชายฝั่งแม่น้ำและป่าชายเลนในด้านการรักษาพื้นที่และอุ้มดินไม่ให้ถูกพัดพา และเป็นที่อยู่อาศัยของสิ่งมีชีวิตชายฝั่งหลายชนิด (Azuma และคณะ, 2002; Duke, 1983) เมื่อผลลำพูสุกจะร่วงที่ โคนต้นเป็นจำนวนมาก โดยบางส่วนจะลอยตามน้ำและตกเป็นต้นในบริเวณที่เหมาะสม ทำให้มีการแพร่กระจาย พันธุ์อย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะบริเวณชายเลนส่วนที่ห่างจากน้ำทะเล

รายงานเกี่ยวกับการศึกษาสารเคมีที่พบในลำพูถือว่ามีการศึกษาค่อนข้างน้อยมาก จากการศึกษาของ Duke ในปี ค.ศ.1983 รายงานว่าส่วนผลลำพูมีองค์ประกอบเป็นเพคติน 11% ส่วนเนื้อไม้ของลำต้นมีสารให้สีคือ emodin และ chrysophanic acid ส่วนเปลือกมีแทนนินกลุ่ม pyrogallol 17.1% (Ganguly และ Sircar, 1974; Xu และคณะ, 1997) มีรายงานการพบสารกลุ่ม gibberellins ในพืชกลุ่มที่ใกล้เคียงคือต้น *Sonneratia apetala* (Chanma และ Deerasamee, 1995; Ganguly และคณะ, 1970) สารสกัดจากดอกลำพูพบสารผสมของไฮโดรคาร์บอนสายยาว (C_{23} - C_{33}) สารผสมของเอสเทอร์สายยาว แอลกอฮอล์สายยาว (C_{26} , C_{30} และ C_{33}), β -sitosterol, stigmasterol, kaempferol, quercetin, gallic acid และ β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside (Chanma และ Deerasamee, 1995; Cannell, 1998)

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในทะเล (marine fouling bacteria) พบว่าสารสกัดชั้นเมธานอลจากลำพู มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ทั้งนี้คาดว่าฤทธิ์ต้านแบคทีเรียดังกล่าวเกิดจากการออกฤทธิ์เสริมกันของสารสำคัญในสารสกัด ชั้นเมธานอล (Devi และคณะ, 1997) รวมทั้งมีรายงานถึงสารสกัดจากลำพูมีฤทธิ์ทำลายตัวอ่อนของยุง *Culex quinquefasciatus* โดยพบว่าสารสกัดในชั้นปิโตรเลียมอีเทอร์ มีฤทธิ์ดีกว่าสารสกัดในชั้นคลอโรฟอร์ม (Devi และ คณะ, 1997)

จากการศึกษาในเบื้องต้นของทีมนักวิจัยนี้ในการศึกษาพิษเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการปกป้องเซลล์ ตับชนิด HepG₂ ของผลไม้โบราณจำนวน 32 ชนิดโดยทีมนักวิจัยนี้ในโครงการวิจัยเรื่อง พิษเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูล อิสระของผลไม้ไทยบางชนิดและการเตรียมในรูปแบบตำรับเจลและครีม ได้พบว่าในจำนวนพืชตัวอย่างที่นำมาทดสอบ นั้น สารสกัดจากผลของลำพูมีฤทธิ์ทั้งสองดังกล่าวที่ดีมาก เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical decolorization assay และ ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay โดยเปรียบเทียบฤทธิ์กับสาร Trolox และ ascorbic acid และพบว่าสารสกัดจากผลยังมีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ตับได้ดีอีกด้วยโดยมีพิษต่อเซลล์ใน ระดับต่ำ และจากการนำส่งสารสกัดเพื่อทดสอบยืนยันผลความเป็นพิษต่อเซลล์ที่สำนักงานวิทยาศาสตร์และ

เทคโนโลยีแห่งประเทศไทยได้ให้ผลที่สอดคล้องกัน อีกทั้งเมื่อทดสอบฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระและปกป้องเซลล์ดับ ดังกล่าวกับสารสกัดจากส่วนอื่นของต้นลำพูยังคงพบฤทธิ์ดังกล่าวเช่นกัน ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจว่าส่วนใดของลำพู มีฤทธิ์ชีวภาพมากที่สุดและยังมีฤทธิ์ชีวภาพอื่นๆ ที่น่าสนใจอีกด้วยหรือไม่ โดยการที่สารมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดี จึงเป็นไปได้ว่าจะมีฤทธิ์ปกป้องเซลล์อื่นๆ เช่น เซลล์ตับ เซลล์ผิวหนัง และเซลล์สมองได้ และมีความน่าสนใจในการ นำมาทดสอบฤทธิ์ anti-Alzheimer ด้วย ปัจจุบันอนุมูลอิสระเป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์มากกว่า 100 ชนิด ภาวะที่ ปริมาณอนุมูลอิสระมีมากเกินไปที่ระบบต้านอนุมูลอิสระจะจัดการได้ จะเกิดภาวะที่เรียกว่า oxidative stress ขึ้นมา ซึ่งจะส่งผลกระทบต่างๆ ต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต เช่น การทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของดีเอ็นเอ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และเกิดการทำลายของกลุ่มโมเลกุลที่มีพันธะ S-H และเยื่อหุ้มเซลล์ ก่อให้เกิดผลเสียต่อเซลล์ และ การทำลายเซลล์ ซึ่งเป็นสาเหตุ ของการแก่ (aging) และรุนแรงไปถึงการเกิดเป็นโรคภัยไข้เจ็บต่างๆ เช่น เส้นเลือด ตีบ โรคเกี่ยวกับภูมิคุ้มกัน (autoimmune disease) รวมไปถึงโรคมะเร็ง โรคมะเร็ง โรครูมาตอยด์ ความผิดปกติของหลอดเลือด โรคอัลไซเมอร์ รวมทั้งโรคผิวหนังหลายชนิด (เช่น โรคสะเก็ดเงิน ผื่นแพ้สัมผัส ผื่นแพ้ยา หรือสารเคมีที่มี แสงแดดเป็นตัวกระตุ้น) อนุมูลอิสระถูกสร้างขึ้นมาจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของร่างกายเอง และในภาวะที่ ผิดปกติเช่นภาวะของโรคหรือภาวะที่ร่างกายแวดล้อมด้วยมลพิษโดยในภาวะที่ผิดปกติจะส่งผลให้ร่างกายเกิดการ สะสมของอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นการค้นหารายการจากธรรมชาติที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพ จึงเป็นที่น่าสนใจและให้ประโยชน์ในการป้องกันโรคต่างๆ ดังกล่าว ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อประเทศชาติได้ในระยะ ยาว เนื่องจากลำพูเป็นพืชชายเลนจึงมีการสะสมแทนนินในปริมาณสูงเพื่อป้องกันการกัดกินของสัตว์น้ำหรือสัตว์ที่ หากินตามชายเลน และทำให้พืชทนทานต่อความเค็มหรือการกัดกร่อนของกระแสน้ำ สารแทนนินชนิดดังกล่าวอาจ มีฤทธิ์ชีวภาพที่น่าสนใจได้เช่นกัน จากข้อมูลข้างต้นผู้วิจัยเล็งเห็นถึงประโยชน์ของลำพูจึงสนใจศึกษาถึงวิธีการสกัด ที่เหมาะสมสำหรับส่วนต่างๆ ของลำพู ได้แก่ เนื้อผล เมล็ด เกสร ที่หุ้มเกสร และรากอากาศ ด้วยตัวทำละลายชนิด ต่างๆ และศึกษาวิธีการเตรียมสารสกัดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อพัฒนาเป็นยาต่อไป

การเตรียมสารสกัดหยาบจากลำพูสามารถใช้ตัวทำละลายหลายหมักส่วนต่าง ๆ ของลำพู โดยนำพืชแห้งมาหมัก กับตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ จากข้าวต่ำไปหาสูง จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกไปจะได้สารสกัดหยาบ (crude extract) โดยในสารสกัดหยาบที่มีขี้ผึ้งใช้วิธีทำแห้งด้วยการ freeze drying สารสกัดหยาบที่ได้สามารถนำมา ตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นได้ก่อน เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการแยกและสกัดต่อไป การตรวจสอบ เบื้องต้นทางพิษวิทยาเคมีเป็นการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดหยาบที่แยกได้ด้วยการทดสอบกับน้ำยา ทดสอบชนิดต่าง ๆ เพื่อให้ทราบถึงองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดหยาบอย่างคร่าว ๆ เช่น flavonoids, alkaloids, terpenes และ lipid เป็นต้น (Audette และคณะ, 1969; Cannell, 1998; Chhabra, Uiso และ Mshiu, 1984; Chifundera, Baluku และ Mashimango, 1993; Deeni และ Sadiq, 2002; Duez และคณะ, 1991; Gebrie และ คณะ, 2005; Reid และคณะ, 2005; Sandabe, Onyeyili และ Chibuzo, 2006; Shaalan และคณะ, 2005; Sparg, van Staden และ Jäger, 2002; Tanira และคณะ, 1994; Teo และคณะ, 1990; Tona และคณะ, 1998; Twaij, Kery และ Al-Khazraji, 1983; Verpoorte, 1989; Wilbert และ Haiek, 1991) การตรวจสอบเบื้องต้นทางพิษวิทยาเคมี สามารถบอกถึงองค์ประกอบทางเคมีของพืชแต่ละชนิด จึงส่งผลต่อการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพหรือสรรพคุณทางยา กลุ่มสารเคมีในพืชมี 2 กลุ่ม คือ primary metabolites เป็นสารทั่วไปที่จำเป็นต่อการดำรงชีพของพืช และ secondary metabolites เป็นสารที่พบได้เฉพาะในพืชบางชนิดเท่านั้น สารจำพวก secondary metabolites เหล่านี้ ได้แก่ (A) Terpenoids และ steroids (B) Phenolic compounds เช่น anthraquinone glycosides, flavonoids, tannins และ coumarins และ (C) N-containing compounds เช่น cyanogenic glycosides และ alkaloids

หลักการแยกสารสกัดหยาบที่ได้ให้เป็นสารที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้นด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีแบ่ง ออกเป็น 2 ชนิด คือ 1. การแยกสารที่มีขี้ผึ้งต่ำถึงปานกลาง นิยมแยกด้วย silica gel โดยใช้ตัวทำละลายที่มีขี้ผึ้งต่ำ

ชนิดต่าง ๆ เป็นองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ สารที่มีขั้วต่ำกว่าจะถูกชะออกมาก่อนสารที่มีขั้วสูงกว่า และ 2. การแยกสารที่มีขั้วค่อนข้างสูง นิยมแยกด้วย RP-C18 โดยใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วสูง เช่น acetonitrile, methanol และน้ำ เป็นองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ สารที่มีขั้วสูงกว่าจะถูกชะออกมาก่อนสารที่มีขั้วต่ำกว่า นอกจากนี้ยังสามารถแยกสารสกัดหยาบตามขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุลด้วยเทคนิค size exclusion chromatography โดยใช้ Sephadex LH-20 บรรจุลงในคอลัมน์แก้วที่ค่อนข้างยาว สารที่มีขนาดใหญ่หรือน้ำหนักโมเลกุลสูงจะถูกชะออกมาก่อน ในขณะที่สารที่มีขนาดเล็กหรือน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะถูกชะออกมากภายหลัง เทคนิคทางโครมาโทกราฟีดังกล่าวนี้จะช่วยให้สารบริสุทธิ์มากขึ้น หากสารที่ต้องการแยกมีปริมาณต่ำมากหรือมีความซับซ้อนขององค์ประกอบสูงสามารถแยกสารให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วย high-performance liquid chromatography (HPLC) โดยใช้ HPLC column ที่เป็น RP C-18 จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกสารให้ดีขึ้นเป็นต้น (Pieters และ Vlietinck, 2005) ตัวอย่างการแยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติให้บริสุทธิ์โดยอาศัยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีชนิดต่าง ๆ ได้แก่

Recrystallization

สามารถแยกสารจำพวก ginkgolides ที่มีรสขมจากรากและใบแปะก๊วย *Ginkgo biloba* ได้ง่าย (Nakanishi, 2005) โดยการสกัดด้วยเมทานอล จากนั้นนำสารสกัดหยาบมาแยกส่วน (partition) ด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด ที่ไม่เข้ากัน คือ น้ำและเบนซีน (benzene) นำสารสกัดในชั้นน้ำมาทำให้แห้งแล้วจึงตกผลึกซ้ำ (recrystallization) ด้วยเอทานอล (ethanol) จะได้ของผสมที่ประกอบด้วยสารจำพวก ginkgolides สามารถแยก ginkgolides ให้บริสุทธิ์ต่อไปด้วย silica gel และใช้คอลโรฟอร์เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ในที่สุดจะสามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้หลายชนิด และทำให้สารแต่ละชนิดบริสุทธิ์ขึ้นด้วยการตกผลึกซ้ำ สารจำพวก ginkgolides มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายอย่าง เช่น มีฤทธิ์ยับยั้ง platelet-activating factor receptor (PAFR) จึงช่วยเพิ่มการไหลเวียนโลหิตและเพิ่มความจำ ในปัจจุบันนำไปใช้กับผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ (dementia) และผู้ป่วยอัลไซเมอร์ เป็นต้น

Adsorbent

ตัวอย่างของการแยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในเชิงอุตสาหกรรม เช่น การแยกสารต้านมะเร็ง paclitaxel จากเซลล์พืชพะยอมหรือจากเปลือกต้น *Taxus chinensis* โดยเริ่มจากการกำจัดสารเจือปน (impurity) ออกจากสารสกัดหยาบ (crude extract) ด้วยการใช้สารดูดซับ (adsorbent) sylopute แล้วตามด้วยการตกตะกอน (precipitation) จนได้ paclitaxel ที่บริสุทธิ์ออกมา (Pyo และคณะ, 2005) เทคนิคดังกล่าวนี้สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ในปริมาณมาก ซึ่งการกำจัดสารเจือปนด้วย sylopute มีประสิทธิภาพดีกว่าสารดูดซับ activated carbon

Solid phase extraction

Belamide A จัดเป็น antimitotic tetrapeptide ที่แยกได้จาก marine cyanobacterium *Symploca* sp. โดยเตรียมสารสกัดหยาบที่มีลักษณะเป็นน้ำมันจากการสกัดตัวอย่างด้วยไดคลอโรมีเทนและเมทานอล จากนั้นแยกสารสกัดหยาบด้วย solid phase extraction column ทำการชะสารตามลำดับความมีขั้วจากน้อยไปหามาก จากนั้นเลือกส่วนสกัดที่ประกอบด้วยสารจำพวกเปปไทด์มาแยกต่อจนได้ belamide A ที่บริสุทธิ์โดยใช้ reversed-phase HPLC (Simmons และคณะ, 2006)

Normal phase HPLC

สามารถแยกสารจำพวก polyphenolic compound ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (antioxidant) จากเมล็ดมะขาม *Tamarindus indica* L. ด้วยการใช้ normal phase HPLC และติดตามการแยกสารด้วย UV-diode-array detector ที่ความยาวคลื่น 250, 278 และ 340 นาโนเมตร (Sudjaroen และคณะ, 2005)

α -L-Galactosyl saponin เป็นสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเล (marine natural product) ที่พบได้ยาก เพราะโมเลกุลประกอบด้วยน้ำตาล L-galactose (L-Gal) ซึ่งพบได้ยากในสิ่งมีชีวิต สารชนิดนี้แยกได้จาก marine octoral *Muricea* c.f. *purpurea* โดยเตรียมสารสกัดหยาบจากการหมักตัวอย่างด้วยไดคลอโรมีเทน จากนั้นแยกสาร

สกัดหยาบที่ได้ด้วย silica gel โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ที่ประกอบด้วยไดคลอโรมีเทนและเมธานอล จากนั้นจึงตกตะกอนสารที่แยกได้ด้วยไดเอทิลอีเธอร์ (diethyl ether) นำตะกอนที่ได้มาละลายแล้วแยกให้บริสุทธิ์มากขึ้นด้วย normal phase HPLC โดยมีวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ประกอบด้วยเอทิลอะซิเตต (ethyl acetate) : อะซีโตน (acetone) ในอัตราส่วน 9 : 1 จะสามารถแยกได้ α -L-galactosyl saponin ซึ่งเป็นสารบริสุทธิ์

Reversed-phased HPLC

สามารถศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในแมงมุม *Parawixia bistriata* ด้วย reversed-phase HPLC (Cesar และคณะ, 2005) และพิสูจน์สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารที่แยกได้ด้วย UV spectrophotometry, mass spectrometry (ESI-MS/MS) และ ^1H NMR spectroscopy ทำให้ค้นพบ PwTx-II ที่จัดเป็น alkaloid toxin ที่ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาททำให้หนูทดลองเกิดอาการชักและตายได้ ในขณะนี้กำลังมีการพัฒนาสารพิษชนิดนี้ไปเป็นยารักษาโรค

Gradient HPLC

ตัวอย่างของการแยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติด้วย gradient HPLC เช่น การแยกสารจำพวก flavonoids ออกจากสารสกัดหยาบของเมล็ดองุ่นและเปลือกสน ด้วยการใช้ reversed-phase octadecylsilyl (LiChrosorb RP C18) column โดยมีเมธานอลและกรดอะซิติกเป็นส่วนผสมของวัฏภาคเคลื่อนที่ (Phillipson, 2001) เทคนิคนี้สามารถแยกสารออกจากกันได้ค่อนข้างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูง

Chiral HPLC

ตัวอย่างของการแยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่เป็น enantiomer ให้บริสุทธิ์ เช่น การแยกสารที่มีฤทธิ์ต้านมาเลเรียจากพืช *Bulbine frutescens* ซึ่งสารประกอบ 1-4 เป็น enantiomer ที่ถูกแยกออกจากกันด้วย chiral OD-H HPLC column (Mutanyatta และคณะ, 2005)

(-)-Synephrine และ (+)-synephrine เป็น enantiomer ที่ออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่อ α - และ β -receptor ได้ต่างกัน enantiomer ทั้งสองแยกได้จากผลของ *Citrus aurantium* L. var. *amara* โดยใช้ protein-based chiral stationary phase with cellobiohydrolase เป็น chiral selector (Chiral-CBH) (Cesar และคณะ, 2005) มีวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ประกอบด้วย 2-propanol (5% w/w) ใน sodium phosphate buffer (pH 6.0; 10 mM) และ disodium EDTA (50 μM) จากรายงานดังกล่าวพบว่า *C. aurantium* มี (-)-synephrine เป็นองค์ประกอบหลัก

LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) เป็นเครื่องมือที่นำเทคนิคทางโครมาโทกราฟีซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะสูงและมีประสิทธิภาพในการแยกสารสูง มาใช้ร่วมกับเทคนิคทางแมสสเปกโตรสโกปีซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารโดยใช้น้ำหนักโมเลกุลของสาร ซึ่งสามารถให้ข้อมูลทั้งเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพในเวลาเดียวกัน นอกจากนี้ การใช้แมสสเปกโตรสโกปีเป็นเครื่องตรวจวัดสาร (detector) ช่วยให้สามารถตรวจวิเคราะห์สารได้อย่างมีประสิทธิภาพแม้จะมีสารในปริมาณน้อยมากในระดับพิโคกรัม ทำให้ในปัจจุบันได้มีการนำเอาเครื่องมือชนิดนี้มาใช้ในการวิเคราะห์สารประกอบอินทรีย์เคมีจากสกัดพืชสมุนไพรจากธรรมชาติ ซึ่งใช้ประโยชน์ในการควบคุมคุณภาพของสารสกัดที่เป็นวัตถุดิบในการผลิตยาและยาสำเร็จรูป เช่น การใช้ LC-MS ในการศึกษาในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณของสารประกอบอินทรีย์เคมีประเภท triterpenoids, saponins และ flavonoid glycosides ที่เป็นองค์ประกอบในผลของพืชจากแอฟริกาใต้ *Cyclanthera pedata* ซึ่งมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) ลดระดับน้ำตาลในเลือด (hypoglycemic) และลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือด (hypcholesterolemia) (Pellati, Benvenuti และ Melegari, 2005) นอกจากนี้ยังมีการใช้ LC-MS ในการควบคุมคุณภาพและการศึกษาความคงตัวของสารที่เป็น marker และส่วนประกอบที่มีฤทธิ์ (active constituent) ในสารสกัดทิงเจอร์ 60% ของดอก Calendula ผลของ Milk-thistle และ ดอก Passion ซึ่งใช้เป็นยาต้านการอักเสบที่ใช้ภายนอก (anti-inflammatory) และสมานแผล (wound healing) ใช้เป็นสารช่วย (adjuvant) ใน

การรักษาด้วยแสงและตัวออกเสปเรอริงและใช้ช่วยลดอาการหงุดหงิด กระวนกระวายและนอนไม่หลับตามลำดับ (Bilia และคณะ, 2002)

การแยกและการทำให้บริสุทธิ์นับว่าเป็นส่วนสำคัญในกระบวนการค้นพบยาและพัฒนา ยา เพราะไม่ว่าจะเป็นการค้นหายาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ การสังเคราะห์สารใหม่ที่น่าสนใจ หรือการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนสกัดหรือสารชนิดต่าง ๆ ก็ตามจำเป็นต้องอาศัยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีเพื่อแยกสารให้บริสุทธิ์ เช่น TLC, CC และ HPLC เป็นต้น นอกจากนี้ในกรณีที่ต้องการพิสูจน์สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารที่แยกได้ต้องอาศัยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปีร่วมด้วย เช่น UV, IR, MS และ NMR เป็นต้น ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาโดยนำเทคนิคทางโครมาโทกราฟีมาใช้ร่วมกับ สเปกโตรสโกปี เช่น HPLC-UV, LC-MS และ LC-NMR เป็นต้น ซึ่งช่วยให้การแยกสารรวดเร็วขึ้นและมีประสิทธิภาพในการแยกสารสูงขึ้นรวมทั้งทราบถึงโครงสร้างทางเคมีได้อย่างถูกต้อง อย่างไรก็ตามก่อนทำการแยกสารทุกชนิดควรมีความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของสารที่ต้องการแยก รวมทั้งเทคนิคทางโครมาโทกราฟีและเครื่องมือทางสเปกโตรสโกปีที่เกี่ยวข้อง เพื่อให้สามารถเลือกเทคนิคและเครื่องมือที่เหมาะสมกับสารที่ต้องการแยกให้บริสุทธิ์ ซึ่งจะส่งผลให้การแยกสารมีความไวและความจำเพาะเจาะจงสูง รวมถึงสารไม่สลายตัวไปในระหว่างทำการแยกสารนั้น

การแยกสารที่มีการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพควบคู่ไปด้วย (bioassay-guided fractionation) จะช่วยให้สามารถแยกสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจได้รวดเร็วมากยิ่งขึ้น โดยแบ่งส่วนสกัดเพียงเล็กน้อย ประมาณ 10-20 มิลลิกรัม ที่ได้จากการแยกด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีในขั้นตอนต่าง ๆ ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (Cadoni และคณะ, 2000; Pieters และ Vlietinck, 2005) ส่วนสกัดใดที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดีจะถูกนำไปแยกต่อด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ต่อไป ฤทธิ์ทางชีวภาพที่คาดว่าจะติดตามจากสารสกัดลำพูในระหว่างทำการแยกสารได้แก่ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และฤทธิ์ฆ่าหรือยับยั้งแบคทีเรีย เพราะจากการศึกษาในเบื้องต้นพบว่าสารสกัดหยาบจากลำพูมีฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าว

สารสกัดจากลำพูที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่เตรียมได้นี้จะเป็นแนวทางนำไปสู่การควบคุมคุณภาพและมาตรฐานยาสมุนไพรต่อไป เทคนิคในการวิเคราะห์สารสกัด ได้แก่ เทคนิคไทเทรชัน การวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ กัน หรือ LC MS เป็นต้น การเลือกใช้เทคนิคใดในการวิเคราะห์จะพิจารณาจากโครงสร้างทางเคมีของสารที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นสำคัญ หากสารนั้นดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตได้จะเลือกใช้การวัดค่าการดูดกลืนแสง หากสารนั้นมีความเป็นกรดหรือด่างแรงพอที่จะเกิดปฏิกิริยาได้อย่างสมบูรณ์กับการละลายมาตรฐานกรดหรือด่าง หรือเกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนหรือสารประกอบเชิงซ้อนได้อย่างสมบูรณ์ ก็อาจเลือกใช้เทคนิคไทเทรชันได้ และในการศึกษานี้พยายามใช้วิธี LC MS มาร่วมในการวิเคราะห์สารดังกล่าวด้วย เนื่องจากมีความพร้อมในส่วนเครื่องมือและอุปกรณ์และ LC MS นี้เป็นเทคนิคที่มีความไวสูงในการวิเคราะห์สาร ซึ่งน่าจะมีส่วนดีในการนำมาประยุกต์ใช้กับงานวิเคราะห์สารจากธรรมชาติ

การอธิบายโครงสร้างทางเคมีของสารสกัดที่แยกได้ด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี เช่น UV (ultraviolet-visible spectrophotometry), IR (Infrared spectroscopy), MS (mass spectrometry) และ NMR (nuclear magnetic resonance spectrometry) เป็นต้น สามารถใช้ UV ศึกษาหมู่ฟังก์ชันที่ดูดกลืนแสงได้ หรือสารที่มีคอนจูเกชันหรือวงแหวนอะโรเมติกอยู่ในโมเลกุล สามารถใช้ IR ศึกษาหมู่ฟังก์ชันที่บนโมเลกุลได้ ใช้ MS ศึกษามวลโมเลกุลและยืนยันโครงสร้างทางเคมีจาก fragment ion ที่แตกออกมา และ NMR ใช้ศึกษาจำนวนโปรตอนในโมเลกุล ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตอนและคาร์บอน หรือโปรตอนกับโปรตอนที่อยู่ใกล้กันได้ จากข้อมูลทางสเปกโตรสโกปีทั้งหลายดังกล่าวจะทำให้สามารถอธิบายโครงสร้างทางเคมีของสารได้อย่างถูกต้องและรวดเร็ว (Wolfender, Ndjoko and Hostettmann, 2003)

เมื่ออธิบายโครงสร้างทางเคมีได้แล้ว จะสามารถทำนายคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของสารได้ซึ่งจะทำให้ทราบถึงความคงตัวของสารเคมีและกายภาพของสารนั้นได้ เพื่อให้เกิดความเข้าใจอย่างถูกต้องเกี่ยวกับความคงตัวของสารสามารถนำสารที่ได้มาศึกษาความคงตัว เช่น การนำสารสกัดหรือสารบริสุทธิ์มาเก็บไว้ในที่อุณหภูมิห้อง และ 45 องศาเซลเซียส ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 75% RH เป็นเวลานาน 1, 2, 4 และ 6 เดือน จากนั้นจึงนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญว่ายังมีอยู่หรือสลายตัวไปมากน้อยเพียงใด (Yoshioka และ Stella, 2000) ตามมาตรฐานสากล ICH

คำสำคัญ:

(ภาษาไทย) ลำพู ความคงตัว โพลีฟีนอล ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน โลหะหนัก

(ภาษาอังกฤษ) *Sonneratia caseolaris*; Stability; Polyphenols; Antioxidant activity, Heavy metals

วิธีดำเนินการวิจัย

สารเคมี

1. Distilled water (ultra pure water ASTM type I, 18.2 M Ω cm ผลิตจากเครื่อง TKA GenPure ultra pure water machine (TKA Wasseraufbereitungssysteme GmbH, Germany)
2. Ethanol (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
3. Methanol (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
4. Ethylcetate (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
5. Silica gel F254 TLC (Merck Darmstadt, Germany)
6. Deuterted methanol (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., USA)
7. Deuterated chloroform (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., USA)
8. HPLC acetonitrile (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
9. HPLC methanol (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
10. Phosphoric acid (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
11. Acetic acid (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
12. Gallic acid (Fluka 48630) lot:1262844 (Fluka ,Spain)
13. Luteolin -7-O-glucoside (Extrasynthese 0053) lot: 07112614 (Extrasynthese, Genay France)
14. Luteolin (Extrasynthese 0053) lot: 07112622 (Extrasynthese, Genay France)
15. Folin-Ciocalteu reagent (CarLo ErbaReagenti, Milano, Italy)
16. Sodium carbonate (Ajax Finechem, Seven Hills, Australia)

เครื่องมือที่ใช้

1. Hot air oven (FED 720 Binder, BINDER GmbH, Tuttlingen, Germany)
2. Cutting mill (Retsch Muhle, Dietz-motoren GmbH & Co. KG, Germany)
3. Spray dryer (Minispray Dryer, Büchi 190, Switzerland)
4. Rotary evaporator (Buchi, Switzerland)
5. NMR (Bruker, Germany)
6. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Agilent 1100 series VWD detector
7. HPLC Column RP-18 (10 μ m) Semi-preparative Merck, LiChroCART 250-10 HPLC-Cartridge, LiChrospher 100 RP-10 (10 μ m), Lot No. 94035341
1. Analytical balance 4 ตำแหน่ง (Sartorius รุ่น CP224S)
2. Ultrasonicator (ยี่ห้อ ELMA Transsonic 890/H)
3. ตู้ดูดความชื้น (Desiccator)
4. บีกเกอร์ขนาด 50 ml
5. ขวดปริมาตรขนาด 10 ml
6. syringe filter 0.45 μ m
7. syringe ขนาด 1 ml

ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

1. การเตรียม การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และองค์ประกอบทางเคมีของสกัดสารจากส่วนต่าง ๆ ของ ลำพู

เก็บตัวอย่างส่วนต่าง ๆ ของต้นลำพู (*Sonneratia caseolaris* L.) คือ กิ่งใบเลี้ยง เมล็ด เนื้อผล ปีกผล เกสร รากอากาศ นำมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น ทำตัวอย่างพืชให้แห้งด้วยการอบที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 72 ชั่วโมงหรือจนกว่าตัวอย่างพืชจะแห้งสนิท จากนั้นจึงนำตัวอย่างพืชที่แห้งแล้วมาบดย่อยขนาด ด้วยเครื่อง cutting mill โดยใช้แรงขนาด 20 mesh เก็บตัวอย่างพืชที่บดแล้วไว้ในที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สำหรับการนำมาศึกษาในขั้นตอนต่อไป นำตัวอย่างพืชแต่ละส่วนที่บดแล้วมาหมักด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ (เมธานอล และที่ผ่านการซักรีดด้วยสารทำละลายคือไดคลอโรมีเทน เอธิลอะซีเตต และ เมธานอล) เป็นเวลานาน 72 ชั่วโมง และนำต้มที่นำมาผ่านการสเปรย์ตาย โดยใช้อัตราส่วนระหว่างผงพืชแห้ง : สารทำละลาย (1:4) และจากนั้น นำสารละลายที่ได้จากการสกัดมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 1 แล้วจึงระเหยตัวทำละลายออกไป ภายใต้อุณหภูมิด้วยเครื่อง rotary evaporator เก็บรักษาสารสกัดหยาบ (crude extract) ที่ได้ใน desiccator จนแห้งสนิท ชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้แล้วนำไปคำนวณหา %yield ทั้งนี้ได้เตรียมสารสกัดหยาบจากส่วนต่าง ๆ ของลำพูด้วยการต้มในน้ำและการเตรียมผ่านวิธี spray dry อีกด้วย รวมทั้งนำคั้นสดและนำมาทำแห้งด้วยการ freeze drying สารสกัดที่ได้ทำการวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Follin-Ciocalteu ตามที่ Kumazawa และคณะ (2002) รายงานไว้ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-vis spectrophotometer (Perkin Elmer รุ่น 1100 series บริษัท Agilent) ที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร (n=5) โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ gallic acid สำหรับข้อมูลปริมาณสารสกัด และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ได้แสดงไว้ใน ตารางที่ 1 ของรายงานโครงการวิจัยที่ 3

2. การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากลำพูด้วย HPLC

การเตรียมสารสกัดจากกิ่งใบเลี้ยงและเมล็ดของลำพูให้หมักผงพืชแห้งแต่ละชนิดด้วยเมธานอลเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาระเหยเมธานอลออกไปด้วย rotary evaporator จะได้สารสกัดเมธานอลจาก กิ่งใบเลี้ยงและเมล็ดของลำพู นำสารสกัดดังกล่าวมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยเปรียบเทียบกับสารละลาย มาตรฐานที่ประกอบด้วย gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin โดยใช้เทคนิค HPLC คอลัมน์ที่ใช้ คือ LiChroCART semipreparative column ซึ่งเป็น RP-18 semi-preparative column (250 mm x 4.6 mm i.d.; 10 µm) ทำการแยกสารด้วยระบบ gradient ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ประกอบด้วย acetonitrile และ 0.01% (v/v) aqueous phosphoric acid มีอัตราเร็วในการไหล 5.0 มิลลิลิตร/นาที สารละลาย 2 ระบบที่ใช้ในการแยกสารคือ (A) acetonitrile และ (B) 0.01% (v/v) aqueous phosphoric acid โดยมี gradient elution program ที่เริ่มจาก gradient elution 0-20% A ที่ 0-10 นาที ต่อมาทำ isocratic elution 20% A ที่ 10-20 นาที ตามด้วย gradient elution 20-60% A ที่ 20-30 นาที ตรวจวัดปริมาณสารที่แยกได้ด้วย VWD detector ที่ความยาวคลื่น 280 นาโน เมตร retention time ของสารสำคัญ 3 ชนิด คือ gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin ที่ retention time ต่างๆ ดังนี้ 7.96, 18.97 และ 28.38 ตามลำดับ วิธีวิเคราะห์เช่นนี้สามารถวิเคราะห์หาปริมาณของสารสำคัญ 3 ชนิด (gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin) ได้ในเวลาเดียวกัน

3. การวิเคราะห์หาปริมาณของ Gallic acid, Luteolin glycoside และ Luteolin ในสารสกัดลำพูสกัดด้วยการหมักด้วย Methanol ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography

นำสารสกัดลำพูแห้งน้ำหนัก 0.0500 g ปรับปริมาตรด้วย 100% MeOH จนได้ปริมาตร 10 ml (5mg/ml) โดยใช้เครื่อง Ultrasonicator เพื่อช่วยในการละลายสารสกัด แล้วเจือจางด้วย methanol ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.25 mg/ml ใช้ syringe ขนาด 1 ml ดูดสารกรองผ่าน syringe filter ขนาด 0.45 μm และฉีดเข้า HPLC ปริมาตร 20 μl สังเกต peak ที่ตรงกับสารมาตรฐาน ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ จากนั้นนำค่าพื้นที่ใต้พีคมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย และค่า SD

ระบบที่ใช้กับเครื่อง High Performance Liquid Chromatograph (HPLC)

Mobile phase = 0.01%(v/v) H_3PO_4 : CH_3CN

Flow rate = 5 ml/minute

Column = RP-18 (10 μm) Semi-Preparative

Wavelength = 280 nm

Method = Gradient elution

0-20 % CH_3CN	เวลา 10 นาที
20 % CH_3CN	เวลา 10-20 นาที
20-60 % CH_3CN	เวลา 20-30 นาที
60 % CH_3CN	เวลา 30-40 นาที

4. การศึกษาวิธีการสกัดที่เหมาะสม (Optimization of extraction procedure) สำหรับการเตรียมสารสกัดจากลำพู

การศึกษาวิธีการสกัดที่เหมาะสมเป็นการวิเคราะห์หาปริมาณ gallic acid, luteolin glycoside และ luteolin ในสารสกัดหยาบที่ได้จากเมล็ดลำพู โดยอาศัยเทคนิคการวิเคราะห์ด้วย HPLC เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการสกัดสารสำคัญ 3 ชนิด ดังกล่าว ออกจากผงพืชแห้ง ซึ่งเริ่มจากการสกัดผงพืชแห้งด้วยเมทานอลในน้ำที่มีความเข้มข้น 20, 50, 70, 90 และ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยผงพืชที่นำมาสกัดจะร่งผ่าน sieve No.20 mesh ก่อน จากนั้นจึงชั่งน้ำหนักผงพืชประมาณ 1 กรัม สกัดด้วยเมทานอล 30 มิลลิลิตร จำนวนครั้งที่สกัด คือ 1 ครั้ง สกัดด้วย sonicator เป็นเวลานาน 15, 30, 40 และ 60 นาที จากนั้นนำสารละลายที่สกัดได้มากรองและระเหยแห้งด้วย rotatory evaporator ทิ้งไว้ให้แห้งสนิทใน desiccator นำมาชั่งน้ำหนัก คำนวณหา % yield จากนั้นจึงนำสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ 3 ชนิด คือ gallic acid, luteolin glycoside และ luteolin ด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้คอลัมน์และสภาวะในการแยกสารสำคัญตามหัวข้อ 3 ดังกล่าวข้างต้น โดยมี gradient elution เป็นดังนี้

0-20 % CH_3CN	เวลา 10 นาที
20 % CH_3CN	เวลา 10-20 นาที
20-60 % CH_3CN	เวลา 20-30 นาที

5. การศึกษา Linearity, limit of detection และ quantification ของ gallic acid

เตรียมสารละลายมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้น 0.2, 5, 10, 15, 20 และ 25 $\mu\text{g/ml}$ (ใช้ 70%MeOH เป็นตัวทำละลาย) นำสารละลายมาตรฐานที่เตรียมได้มาวิเคราะห์ด้วย HPLC ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ใช้เครื่องมือ High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) Agilent 1100 series โดยมี VWD detector เป็นดีเทคเตอร์ ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 280 nm และใช้ Column RP-18 (10 μm) Semi-preparative Merck, LiChroCART 250-10 HPLC-Cartridge, LiChrospher 100 RP-10 (10 μm), Lot No. 94035341 โดยมี Mobile phase เป็น 0.01%(v/v) H_3PO_4 : CH_3CN ทำ gradient elution ที่ Flow rate = 5 ml/minute

6. การศึกษา Linearity, limit of detection และ quantification ของ luteolin glycoside

เตรียมสารละลายมาตรฐาน luteolin glycoside ที่ความเข้มข้น 1, 17, 30, 45, 60 และ 72 µg/ml (ใช้ 70% MeOH เป็นตัวทำละลาย) นำสารละลายมาตรฐานที่เตรียมได้มาวิเคราะห์ด้วย HPLC ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ใช้เครื่องมือ High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) Agilent 1100 series โดยมี VWD detector เป็นดีเทคเตอร์ ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 280 nm และใช้ Column RP-18 (10 µm) Semi-preparative Merck, LiChroCART 250-10 HPLC-Cartridge, LiChrospher 100 RP-10 (10µm), Lot No. 94035341 โดยมี Mobile phase เป็น 0.01%(v/v) H₃PO₄ : CH₃CN ทำ gradient elution ที่ Flow rate = 5 ml/minute

7. การศึกษา Linearity, limit of detection และ quantification ของ luteolin

เตรียมสารละลายมาตรฐาน luteolin ที่ความเข้มข้น 0.2, 10, 15, 20, 23 และ 30 µg/ml (ใช้ 70%MeOH เป็นตัวทำละลาย) นำสารละลายมาตรฐานที่เตรียมได้มาวิเคราะห์ด้วย HPLC ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ใช้เครื่องมือ High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) Agilent 1100 series โดยมี VWD detector เป็นดีเทคเตอร์ ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 280 nm และใช้ Column RP-18 (10 µm) Semi-preparative Merck, LiChroCART 250-10 HPLC-Cartridge, LiChrospher 100 RP-10 (10µm), Lot No. 94035341 โดยมี Mobile phase เป็น 0.01%(v/v) H₃PO₄ : CH₃CN ทำ gradient elution ที่ Flow rate = 5 ml/minute

8. การเปรียบเทียบสารสกัดลำพูที่ใช้ตัวทำละลายแตกต่างกัน

การเปรียบเทียบสารสกัดลำพูที่ใช้ตัวทำละลายแตกต่างกันเป็นการศึกษาปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ด้านออกซิเดชันของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของลำพู เริ่มจากการเก็บตัวอย่างลำพูจากจังหวัดนครปฐมในปี พ.ศ. 2550 และจัดเก็บตัวอย่างพืชแห้งไว้ที่คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร สกัดตัวอย่างพืชที่ทำแห้งแล้วด้วยตัวทำละลายเป็นน้ำ เมธานอล หรือเอธานอล นำสารสกัดที่ได้มาศึกษาปริมาณฟีนอลทั้งหมด (total phenolics) ตามวิธีของ Kumazawa และคณะ (2002) และศึกษาฤทธิ์ด้านออกซิเดชันด้วย TEAC assay ตามวิธีของ Re และคณะ (1999) และวิเคราะห์หาปริมาณ gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin ในสารสกัดด้วย HPLC (Agilent 110 series) โดยใช้ variable wavelength และ LiChroCART semipreparative column (Merck Co., Ltd, USA) วัฏภาคเคลื่อนที่ประกอบด้วย acetonitrile และ phosphoric acid เข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ การวิเคราะห์ทุกอย่างทำ 3 ซ้ำ

9. การศึกษาความแม่นยำ (precision) ของสารมาตรฐาน gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin

ความแม่นยำ (precision) หมายถึง การวิเคราะห์ตัวอย่างเดียวกันซ้ำ ๆ กัน แล้วให้ค่าใกล้เคียงกัน ในทางเคมีนิยมวิเคราะห์สารมาตรฐานชนิดเดียวกันหลาย ๆ ครั้งแล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหา %RSD หากค่าที่ได้ไม่เกินที่กำหนด แสดงว่าการวิเคราะห์นั้นมี precision ดี การประเมิน precision มีทั้ง intra-day precision และ inter-day precision ในที่นี้ทำการทดสอบความเที่ยงของวิธี (precision) ด้วยการหาค่า repeatability ซึ่งการศึกษา repeatability จะเตรียมสารละลายมาตรฐานทั้ง 3 ชนิดให้มีความเข้มข้นต่ำสุดและสูงสุดโดยสังเกตจากผลการทำ linearity ซึ่งได้กำหนดให้ gallic acid มีความเข้มข้นต่ำสุด 0.2 µg/ml และความเข้มข้นสูงสุด 25 µg/ml และ luteolin-7-O-glucoside มีความเข้มข้นต่ำสุด 1 µg/ml และความเข้มข้นสูงสุด 72 µg/ml ในขณะที่ luteolin มีความเข้มข้นต่ำสุด 0.2 µg/ml และความเข้มข้นสูงสุด 30 µg/ml ซึ่งสารละลายมาตรฐานทุกชนิดและทุกความเข้มข้นจะเจือจาง

ด้วย 70% MeOH นำสารละลายมาตรฐานที่เตรียมได้มาวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญด้วย HPLC ซึ่งสารละลายแต่ละชนิดจะวิเคราะห์ซ้ำ 5 ครั้ง โดยทำการวิเคราะห์ในวันเดียวกัน (intra-day) และวิเคราะห์ซ้ำอีกในอีก 3 วัน (inter-day) (วันที่ 4 หลังจากเริ่มทดลอง)

10. การศึกษาความถูกต้อง

ความถูกต้อง (accuracy) หมายถึง การที่วิธีวิเคราะห์สามารถวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้อง โดยค่าที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับค่าที่แท้จริง (true value) การประเมิน accuracy ทำได้โดยการศึกษา recovery ด้วยการวิเคราะห์สารในตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน (test sample) คำนวณหาปริมาณ standard ที่เติม (concentration recovered) และคำนวณหา % recovery ดังนี้

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{Conc.recovered} \times 100}{\text{Conc. added}}$$

การตรวจสอบความถูกต้องของผลวิเคราะห์ทำได้โดยการ spike สารมาตรฐานในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมลงในตัวอย่าง (sample) โดย spike ความเข้มข้นช่วง 50-150 % ของปริมาณที่คาดว่าจะพบในตัวอย่าง และรายงานผลด้วยค่า % recovery

$$\% \text{ Recovery} = (\text{spike} + \text{sample}) - \text{unspike sample} / \text{standard}$$

International conference on Harmonization แนะนำให้วิเคราะห์อย่างน้อย 3 ความเข้มข้นและแต่ละความเข้มข้นวิเคราะห์ 3 ครั้ง

วิธีการทดลอง

1. นำสารสกัดเมล็ดลำพูที่สกัดด้วย 70%MeOH มาละลายด้วย 100% MeOH ความเข้มข้นเริ่มต้น 10 mg/ml เจือจางเป็น 1 mg/ml แล้ววิเคราะห์ด้วย HPLC ทำ 3 ซ้ำ เพื่อเตรียมเป็น unspike sample
2. เลือกความเข้มข้นสารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิดโดยเริ่มที่ความเข้มข้นสูงสุดจากการทำ linearity แล้วลดลง 2 และ 5 เท่าของความเข้มข้นสูงสุด

โดย Gallic acid เลือกความเข้มข้นที่ 5, 12.5 และ 25 µg/ml

Luteolin -7-O-glucoside เลือกความเข้มข้นที่ 14.4, 36 และ 72 µg/ml

Luteolin เลือกความเข้มข้นที่ 6, 15 และ 30 µg/ml

วิเคราะห์สารมาตรฐานแต่ละชุดความเข้มข้นด้วย HPLC เพื่อเป็น standard

3. จากนั้น spike สารมาตรฐาน ลงในสารละลายสกัดเมล็ดลำพูที่สกัดด้วย 70% MeOH ซึ่งละลายด้วย 100% MeOH ความเข้มข้น 1 mg/ml แล้ววิเคราะห์ด้วย HPLC ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ เพื่อเป็น (spike + sample)
4. นำค่า peak area ที่ตรงกับสารมาตรฐานมาคำนวณหาค่า % recovery

การหาค่า % R.S.D.

$$\% \text{ R.S.D.} = (s \times 100) / x$$

s = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation)

x = ค่าเฉลี่ย (average)

11. การศึกษาความคงตัวของสารสกัดจากลำพู

จากการเตรียมสารสกัดเมล็ดลำพู โดยการสกัดด้วย 70% MeOH เป็นเวลานาน 30 นาที จากนั้นจึงนำมาระเหยตัวทำละลายออกไปด้วย rotatory evaporator จนได้สารสกัดที่แห้งและนำมาชั่งน้ำหนัก นำสารสกัดเมล็ดลำพูที่ได้มาศึกษาความคงตัวที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน ได้แก่ -80, 4, 25 และ 45 องศาเซลเซียส โดยเก็บไว้เป็น

เวลานาน 1, 2, 3, 4 และ 5 เดือน จากนั้นจึงนำสารสกัดเมล็ดลำพูที่เก็บไว้ในสภาวะต่าง ๆ กันมาวิเคราะห์หาปริมาณ gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin โดยเปรียบเทียบกับปริมาณของสารสำคัญ 3 ชนิด ดังกล่าวในสารสกัดที่เตรียมเสร็จใหม่ ๆ จากการทดลองแสดงความเข้มข้นของสารสำคัญ (gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin) ในสารสกัดเมล็ดลำพู (mg/g dried extract) หลังจากที่ได้เตรียมเสร็จทันที และที่เก็บไว้นาน 1, 2, 3, 4 และ 5 เดือน โดยเก็บไว้ที่ -80, 4, 25 และ 45 องศาเซลเซียส

12. การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของโลหะหนักในส่วนต่าง ๆ ของลำพู

การวิเคราะห์โลหะหนัก 11 ชนิด ได้แก่ อลูมิเนียม (Al) โครเมียม (Cr) แมงกานีส (Mn) เหล็ก (Fe) นิกเกิล (Ni) ทองแดง (Cu) สังกะสี (Zn) อาร์ซีนิก (As) แคดเมียม (Cd)ปรอท (Hg) และตะกั่ว (Pb) ในส่วนต่าง ๆ ของลำพู เช่น เมล็ด รากอากาศ เกสร กลีบเลี้ยง ใบ และผล ที่สุ่มเก็บตัวอย่างจากจังหวัดนครปฐม สมุทรสงคราม ฉะเชิงเทรา จันทบุรี สมุทรปราการ และนครศรีธรรมราช

วิธีวิเคราะห์หาความเข้มข้นของโลหะหนักในส่วนต่าง ๆ ของลำพู

1. นำส่วนต่าง ๆ ของพืชตัวอย่าง เช่นเมล็ด รากอากาศ เกสร กลีบเลี้ยง ใบ และผล มาล้างทำความสะอาดด้วย deionize water (ที่มีค่า 18×10^6 โอห์ม) จากนั้นนำตัวอย่างพืชมาอบแห้งใน hot air oven ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บดละเอียด และจัดเก็บในขวดแก้วปิดสนิท
2. นำตัวอย่างพืชในข้อ 1 มาชั่งให้มีน้ำหนักอย่างถูกต้องโดยประมาณ 100 มิลลิกรัม ใส่ในบีกเกอร์ เติมน้ำกรดไนตริกเข้มข้น 69-70% (J.T baker,U.S.A) จำนวน 10 มิลลิลิตร ปิดด้วยกระจกนาฬิกา ตั้งบน hot plate ในตู้ดูดควัน รอให้สารสกัดถูกย่อย (digest) จนกระทั่งสารสกัดในบีกเกอร์ เหลือปริมาณ 1-2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง What man No.1 ปรับปริมาตรด้วย deionize water (ที่มีค่า 18×10^6 โอห์ม) จนมีปริมาตร 10 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร
3. เครื่องแก้วหรืออุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์โลหะหนักต้องแช่ด้วยกรดไนตริกเข้มข้น 20 % เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นจึงล้างด้วย deionize water (ที่มีค่า 18×10^6 โอห์ม) จำนวน 3 ครั้ง แล้วผึ่งให้แห้งจึงจะนำมาใช้ในงานวิเคราะห์
4. เตรียมสารละลายมาตรฐานโลหะหนักที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน สำหรับทำ standard curve โดยนำสารละลายมาตรฐานของธาตุที่ผสมกันระหว่าง Al, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Cd, Hg และ Pb ซึ่งมีความเข้มข้นของแต่ละธาตุเท่ากับ 10,000 ppb มาเจือจางด้วยกรดไนตริกเข้มข้น 5% nitric acid จนมีความเข้มข้น 0, 1, 5, 10, 50, 100, 500 และ 1,000 ppb สารละลายมาตรฐานโลหะหนัก คือ Multi-Element 10 µg/ml calibration standard – 2A (Lot #6-108VY, Agilent, U.S.A) และSingle-Element standard 10 µg/ml mercury (Lot #3-12HG, Agilent, U.S.A)

13. การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของโลหะหนักในสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของลำพู

การวิเคราะห์โลหะหนัก 11 ชนิด ได้แก่ อลูมิเนียม (Al) โครเมียม (Cr) แมงกานีส (Mn) เหล็ก (Fe) นิกเกิล (Ni) ทองแดง (Cu) สังกะสี (Zn) อาร์ซีนิก (As) แคดเมียม (Cd)ปรอท (Hg) และตะกั่ว (Pb) ในสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของลำพู เช่น เมล็ด รากอากาศ เกสรตัวผู้ ที่หุ้มดอก ใบ ปีกผล และผล

วิธีวิเคราะห์หาความเข้มข้นของโลหะหนักในสารสกัดส่วนต่าง ๆ ของลำพู

1. นำตัวอย่างสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของลำพูมาชั่งให้มีน้ำหนักอย่างถูกต้องโดยประมาณ 100 มิลลิกรัม ใส่ในบีกเกอร์ เติมน้ำกรดไนตริกเข้มข้น 69-70% (J.T baker,U.S.A) จำนวน 10 มิลลิลิตร ปิดด้วยกระจกนาฬิกา ตั้งบน hot plate ในตู้ดูดควัน รอให้สารสกัดถูกย่อย (digest) จนกระทั่งสารสกัดในบีกเกอร์ เหลือ

ปริมาณ 1-2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง What man No.1 ปรับปริมาตรด้วย deionize water (ที่มีค่า 18×10^6 โอห์ม) จนมีปริมาตร 10 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร

2. เครื่องแก้วหรืออุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์โลหะหนักต้องแช่ด้วยกรดไนตริกเข้มข้น 20 % เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นจึงล้างด้วย deionize water (ที่มีค่า 18×10^6 โอห์ม) จำนวน 3 ครั้ง แล้วผึ่งให้แห้งจึงจะนำมาใช้ในงานวิเคราะห์
3. เตรียมสารละลายมาตรฐานโลหะหนักที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน สำหรับทำ standard curve โดยนำสารละลายมาตรฐานของธาตุที่ผสมกันระหว่าง Al, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Cd, Hg และ Pb ซึ่งมีความเข้มข้นของแต่ละธาตุเท่ากับ 10,000 ppb มาเจือจางด้วยกรดไนตริกเข้มข้น 5% nitric acid จนมีความเข้มข้น 0, 1, 5, 10, 50, 100, 500 และ 1,000 ppb สารละลายมาตรฐานโลหะหนัก คือ Multi-Element 10 $\mu\text{g/ml}$ calibration standard – 2A (Lot #6-108VY, Agilent, U.S.A) และ Single-Element standard 10 $\mu\text{g/ml}$ mercury (Lot #3-12HG, Agilent, U.S.A)

14. การศึกษา Chemical Fingerprint ของสารสำคัญในสารสกัดหยาบของลำพูด้วยเครื่อง ESI-MS โดยวิธี

Direct injection

การศึกษา chemical fingerprint ของสารสำคัญในสารสกัดหยาบใน methanol จากส่วนต่างของลำพู (*S. caseolaris*) ได้แก่ สารสกัดจากเกสร, สารสกัดจากใบ สารสกัดจากเมล็ด และสารสกัดที่หุ้มดอกลำพู ด้วยเครื่อง LC-MS ด้วยวิธีการฉีดแบบ direct injection วิธีนี้สารจะถูกฉีดเข้าสู่เครื่อง mass spectroscopy โดยไม่ผ่าน column ทำให้ใช้สารปริมาณน้อยในการวิเคราะห์ และ ใช้เวลาในการวิเคราะห์ลดลง ใช้วิธีนี้ในการ screen เบื้องต้นในการศึกษา chemical fingerprint ของสารสำคัญในสารสกัดหยาบของลำพู โดยใช้ตัวอย่างเป็นสารสกัดหยาบจากส่วนต่างของลำพู (*S. caseolaris*) ที่ละลายใน 0.6% formic acid ใน methanol ที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ โดยเลือกใช้ตัวตรวจวัด ชนิด negative ion mode ของเครื่อง mass spectroscopy เป็นตัวติดตามสารที่มีในสารสกัด ส่วนความดันของก๊าซ nitrogen ที่ใช้ในการทำให้เกิดละอองฝอย (nebulizer pressure) คือ 15 psi drying gas ที่ใช้มีอุณหภูมิ 325 องศาเซลเซียส และมีอัตราการไหล 5 ลิตร/นาที

15. การวิธีวิเคราะห์แยก galic acid Luteolin และ Luteolin –O-7-glycoside ซึ่งเป็นสารที่เป็น marker ในสารสกัดลำพู โดยเครื่องมือ LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry)

จากการใช้เครื่องมือ LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) โดยใช้ RP-18 analytical column (250 mm x 4.6 mm i.d.; 5 μm) เป็น stationary phase และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ประกอบด้วย 1% formic acid ในน้ำและ methanol ในอัตราส่วนต่างๆ โดยใช้เครื่องตรวจวัดสาร (detector) สองชนิดคือ อัลตราไวโอเลตสเปกโตรสโกปี (Ultraviolet spectroscopy) ที่ความยาวคลื่น 278 nm และ แมสสเปกโตรสโกปี (ESI-Mass spectroscopy) พบว่าการใช้ gradient ของ 1% formic acid ในน้ำและ methanol ในอัตราส่วนระหว่างน้ำ : methanol ตั้งแต่ 75 : 25 ถึง 60 : 40 เป็นเวลา 25 นาที ด้วยอัตราการไหล 0.4 ml/min

ผลการวิจัยและวิจารณ์

1. การเตรียม การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และองค์ประกอบทางเคมีของสกัดสารจากส่วนต่าง ๆ ของลำพู

สุมเก็บตัวอย่างส่วนต่างๆ ของต้นลำพู (*Sonneratia caseolaris* L.) คือ กลีบเลี้ยง เมล็ด เนื้อผล ปีกผล เกสร รากอากาศ นำมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น ทำตัวอย่างพืชให้แห้งด้วยการอบที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 72 ชั่วโมงหรือจนกว่าตัวอย่างพืชจะแห้งสนิท จากนั้นจึงนำตัวอย่างพืชที่แห้งแล้วมาบดย่อยขนาดด้วยเครื่อง cutting mill โดยใช้แรงขนาด 20 mesh เก็บตัวอย่างพืชที่บดแล้วไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สำหรับการนำมาศึกษาในขั้นตอนต่อไป นำตัวอย่างพืชแต่ละส่วนที่บดแล้วมาหมักด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ (เช่น เอทานอล เมทานอล และเอทิลอะซิเตต) เป็นเวลานาน 72 ชั่วโมง โดยใช้อัตราส่วนของผงพืชแห้ง : สารทำละลาย เท่ากับ 1:4 จากนั้นนำสารละลายที่ได้จากการสกัดมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 1 แล้วจึงระเหยตัวทำละลายออกไปภายใต้สุญญากาศด้วยเครื่อง rotary evaporator เก็บรักษาสารสกัดหยาบ (crude extract) ที่ได้ใน desiccator จนแห้งสนิท ชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้แล้วนำไปคำนวณหา %yield ทั้งนี้ได้เตรียมสารสกัดหยาบจากส่วนต่างๆ ของลำพูด้วยการต้มในน้ำและการเตรียมผ่านวิธี spray dry

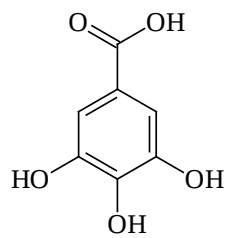
จากการศึกษาสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของลำพูที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ การต้มในน้ำ และ spray dry พบว่าสารสกัดเมทานอลจากกลีบเลี้ยงและเมล็ดมี % yield ค่อนข้างสูง และมี total phenolic compound ในปริมาณสูง ซึ่งสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (TEAC assay) ที่ดี จากการศึกษาร่องรอยทางเคมีของสารสกัดเมทานอลจากกลีบเลี้ยงและเมล็ดของลำพูด้วย proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (^1H NMR) พบสัญญาณโปรตอนของสารสำคัญ 3 ชนิด คือ gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมี ดังรูปที่ 1 นอกจากนี้ยังได้ทำการตรวจสอบเบื้องต้นทางพิษเคมีของสารสกัดเมทานอล พบว่าสารสกัดเมทานอลจากกลีบเลี้ยงของดอกลำพูประกอบด้วยสารในกลุ่ม flavonoids, alkaloids และ coumarins ในขณะที่สารสกัดเมทานอลจากเมล็ดลำพูประกอบด้วยสารในกลุ่ม flavonoids, cardiac glycosides, alkaloids และ coumarins สำหรับสารสกัดเมทานอลจากเกสรดอกลำพูประกอบด้วยสารในกลุ่ม flavonoids และ tannins

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดเมทานอลจากที่หุ้มดอกและเมล็ดลำพู ด้วยเทคนิค column chromatography และ thin layer chromatography รวมทั้งการแยกสารด้วยวิธี bioassay-guided fractionation โดยมี stationary phase เป็น silica gel (อาศัยหลักการแยกสารด้วยความมีขั้วที่แตกต่างกัน) และ Sephadex LH-20 (อาศัยหลักการแยกสารด้วยขนาดโมเลกุลที่แตกต่างกัน) พบว่าส่วนสกัด LPS-15-34 มีสัญญาณโปรตอนส่วนใหญ่ที่ upfield และพบสัญญาณขนาดใหญ่ของพันธะคู่ใน fatty acid ที่ 5.3 ppm คาดว่าส่วนสกัดนี้จะเป็นไขมันที่ไม่ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ส่วนสกัด LPS-74 พบสัญญาณโปรตอนอยู่ที่ 4.00-4.20 ppm มี splitting pattern เป็น doublet 2 คู่ ซึ่งเป็นสัญญาณของ glycerol หรือ triglyceride ส่วนสกัด LPS-75 พบสัญญาณโปรตอนอยู่ที่ 6-7.5 ppm และ 9-10 ppm คาดว่าเป็นสัญญาณโปรตอนของสารในกลุ่ม aromatic compound เมื่อนำมาแยกต่อไปให้บริสุทธิ์ได้สารที่มี ^1H NMR spectrum คล้ายกับ gallic acid และ luteolin นอกจากนี้ยังพบสารบริสุทธิ์ที่มีผลึกรูปเข็ม ที่มีลักษณะใส ไม่มีสี ซึ่งยังไม่สามารถสรุปโครงสร้างทางเคมีได้เพราะมีปริมาณสารน้อยมากและผลึกที่ได้ละลายยากจึงทำให้สังเกตสัญญาณของ NMR ได้ไม่ชัดเจน

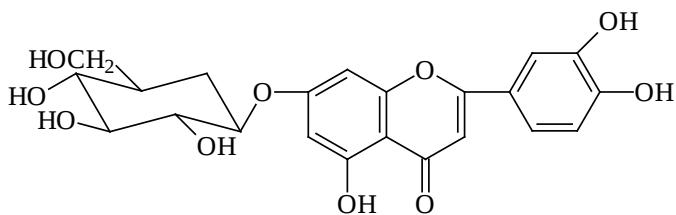
สรุปได้ว่าการสกัดส่วนต่างๆ ของลำพู เช่น กลีบเลี้ยง เมล็ด และเกสร ด้วยเมทานอล จะได้สารสกัดหยาบที่มีองค์ประกอบทางพิษเคมีเป็น phenolic compounds โดยเฉพาะสารในกลุ่ม flavonoids ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

2. การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากลำพูด้วย HPLC

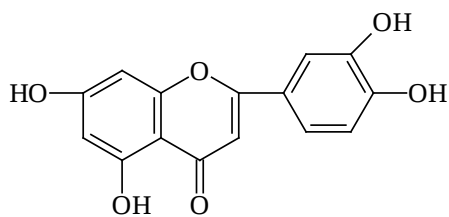
การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากกลีบเลี้ยงและเมล็ดของลำพูด้วย HPLC ซึ่งสารสำคัญ 3 ชนิดที่ใช้เป็น marker ได้แก่ gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin มีโครงสร้างทางเคมี ดังรูปที่ 1 การเตรียมสารสกัดจากกลีบเลี้ยงและเมล็ดของลำพูให้หมักผงพืชแห้งแต่ละชนิดด้วยเมธานอลเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาระเหยเมธานอลออกไปด้วย rotary evaporator จะได้สารสกัดเมธานอลจากกลีบเลี้ยงและเมล็ดของลำพู นำสารสกัดดังกล่าวมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานที่ประกอบด้วย gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin โดยใช้เทคนิค HPLC คอลัมน์ที่ใช้ คือ LiChroCART semipreparative column ซึ่งเป็น RP-18 semi-preparative column (250 mm x 4.6 mm i.d.; 10 μ m) ทำการแยกสารด้วยระบบ gradient ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ประกอบด้วย acetonitrile และ 0.01% (v/v) aqueous phosphoric acid มีอัตราเร็วในการไหล 5.0 มิลลิลิตร/นาที สารละลาย 2 ระบบที่ใช้ในการแยกสาร คือ (A) acetonitrile และ (B) 0.01% (v/v) aqueous phosphoric acid โดยมี gradient elution program ที่เริ่มจาก gradient elution 0-20% A ที่ 0-10 นาที ต่อมาทำ isocratic elution 20% A ที่ 10-20 นาที ตามด้วย gradient elution 20-60% A ที่ 20-30 นาที ตรวจวัดปริมาณสารที่แยกได้ด้วย VWD detector ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร retention time ของสารสำคัญ 3 ชนิด gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin คือ 7.96, 18.97 และ 28.38 ตามลำดับ ดังรูปที่ 2 วิธีวิเคราะห์เช่นนี้สามารถวิเคราะห์หาปริมาณของสารสำคัญ 3 ชนิด (gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin) ได้ในเวลาเดียวกัน สะดวกและรวดเร็วจึงเหมาะสมที่จะเป็นแนวทางในการควบคุมคุณภาพสารสกัดจากลำพู การวิเคราะห์หาสารในกลุ่ม phenolic compound ด้วยเทคนิค HPLC การเลือกใช้ Mobile phase เป็นสิ่งสำคัญ เนื่องจาก Mobile phase เป็นสารที่ใช้แยกสารสำคัญต่างๆออกจากกัน ซึ่งจะทำให้สามารถวิเคราะห์สารตัวอย่างได้ การวิเคราะห์มีการเลือกใช้ระบบ mobile phase ต่างๆ เช่น น้ำ-methanol มี phosphoric acid ผสมอยู่ จะสามารถทำการแยกสารออกมาได้เร็วกว่า mobile phase ที่ใช้น้ำ-acetonitrile ที่มี phosphoric acid หรือ acetic acid ผสมอยู่ ยกตัวอย่างเช่น gallic acid ซึ่งจะมีค่า elution time ประมาณ 2.5-3 นาที และจะทำการแยก gallic acid กับสารอื่นๆ ที่อยู่ใกล้เคียงกันออกจากกันได้ดี ทำให้สามารถวิเคราะห์หาปริมาณของ gallic acid ได้อย่างแม่นยำกว่าระบบ mobile phase อื่น ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Wang และคณะ (2003) ถึงแม้ว่าในระบบ mobile phase ที่ใช้น้ำ-acetonitrile ที่มี phosphoric acid หรือ acetic acid ผสมอยู่จะให้ค่า elution time ประมาณ 7-8 นาที แต่ก็สามารถทำการแยก gallic acid กับสารอื่นๆ ที่อยู่ใกล้เคียงกันออกจากกันได้ดี (Orkoula และคณะ, 2004; Zhang และคณะ, 2007) อย่างไรก็ตามขึ้นกับคอลัมน์ที่เลือกใช้ว่าเป็นชนิดใดและสภาวะต่างๆ ที่ใช้มาเป็นองค์ประกอบร่วมด้วย ซึ่งจะมีผลต่อการแยกของสารสำคัญต่าง ๆ ค่า pH มีผลต่อการเกิด ionization ของโมเลกุลสารต่างๆ ยกตัวอย่าง เช่น luteolin ในระบบที่มีค่า pH สูงๆ โมเลกุลจะมีประจุลบ มีผลทำให้ค่า UV adsorption ลดลงและค่า pH ที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์คือ pH 5 (Fu และคณะ, 2006) ดังนั้นจึงต้องมีเตรียม mobile phase ใหม่ๆ และควบคุมค่า pH อยู่เสมอ เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงค่า pH ซึ่งมีผลกระทบต่อการใช้วิเคราะห์



Gallic acid

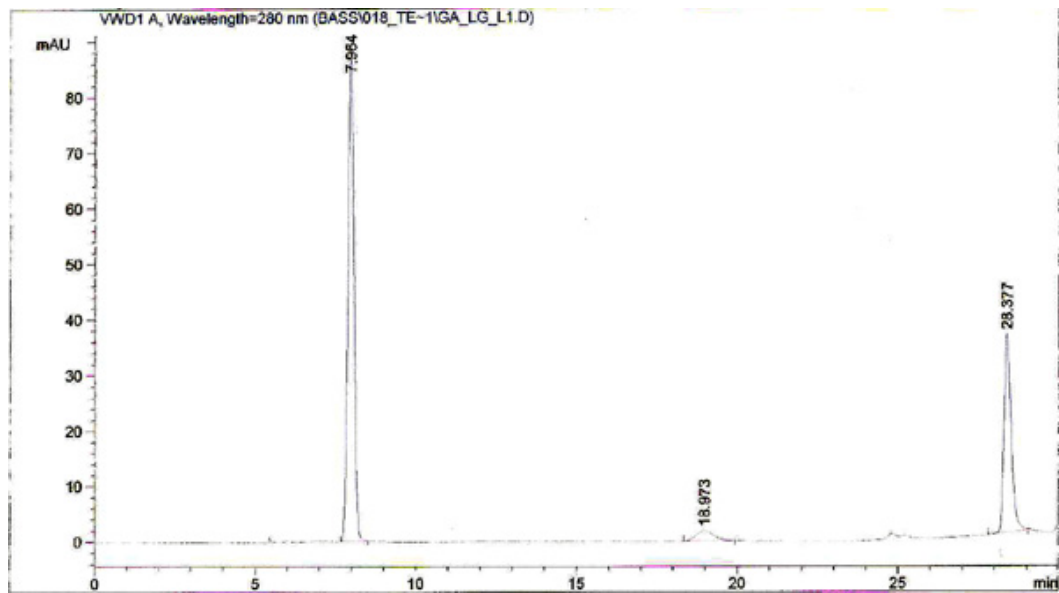


Luteolin-7-O-glucoside

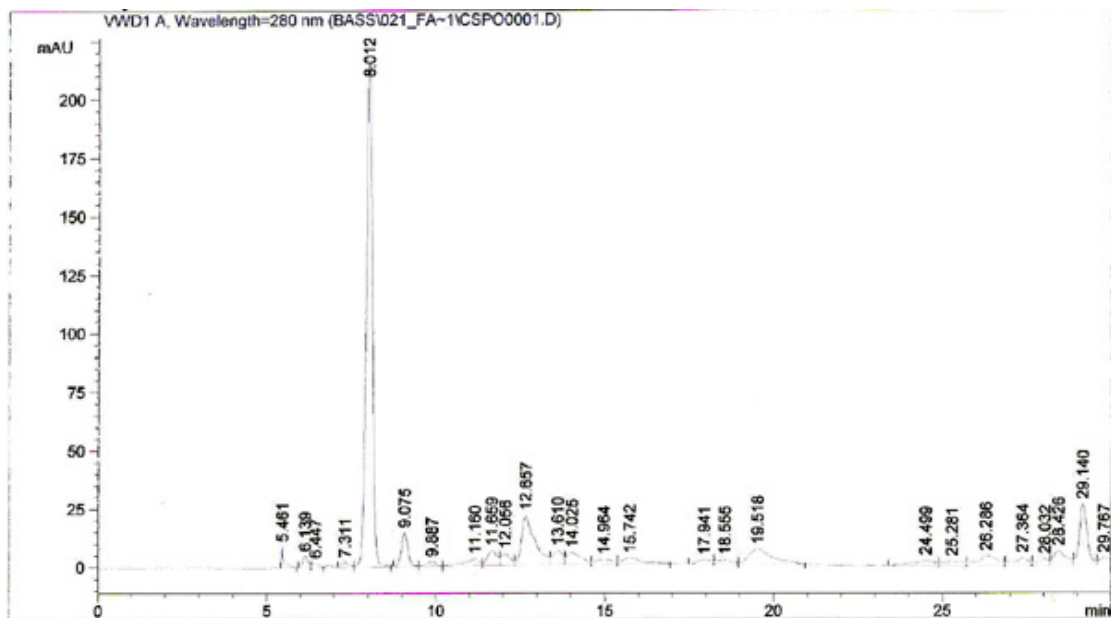


Luteolin

รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของ gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin



(A) HPLC chromatogram ของสารมาตรฐาน (gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin)



(B) HPLC chromatogram ของสารสกัดจากลำพู (*S. caseolaris* extract)

รูปที่ 2 HPLC chromatogram ของสารมาตรฐาน (A) และสารสกัดจากลำพู (B)

3. การวิเคราะห์หาปริมาณของ Gallic acid, Luteolin glycoside และ Luteolin ในสารสกัดลำพูสกัดด้วยการหมักด้วย Methanol ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography

ในการศึกษาปริมาณของ gallic acid, luteolin glycoside และ luteolin ในสารสกัดลำพู เป็นการนำสารสกัดลำพูแห้งน้ำหนัก 0.0500 g ปรับปริมาตรด้วย 100% MeOH จนได้ปริมาตร 10 ml (5 mg/ml) โดยใช้เครื่อง ultrasonicator เพื่อช่วยในการละลายสารสกัด แล้วเจือจางด้วย methanol ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.25 mg/ml ใช้ syringe ขนาด 1 ml ดูดสารกรองผ่าน syringe filter ขนาด 0.45 μm และฉีดเข้า HPLC ปริมาตร 20 μl สภาวะที่ใช้กับเครื่อง HPLC เป็นดังนี้

Mobile phase = 0.01%(v/v) H_3PO_4 : CH_3CN

Flow rate = 5 ml/minute

Column = RP-18 (10 μm) Semi-Preparative

Wavelength = 280 nm

Method = Gradient elution

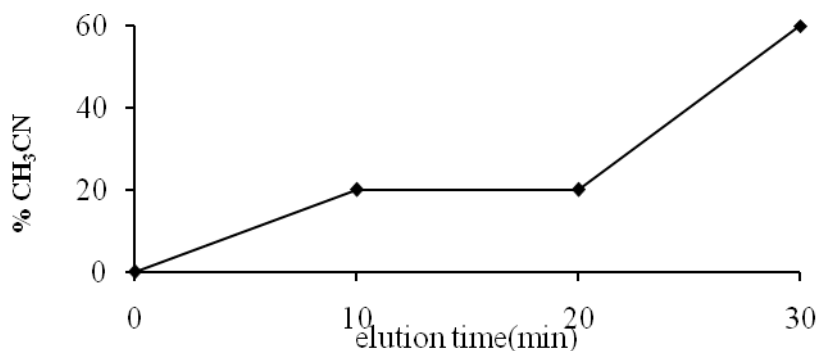
0-20 % CH_3CN เวลา 10 นาที

20 % CH_3CN เวลา 10-20 นาที

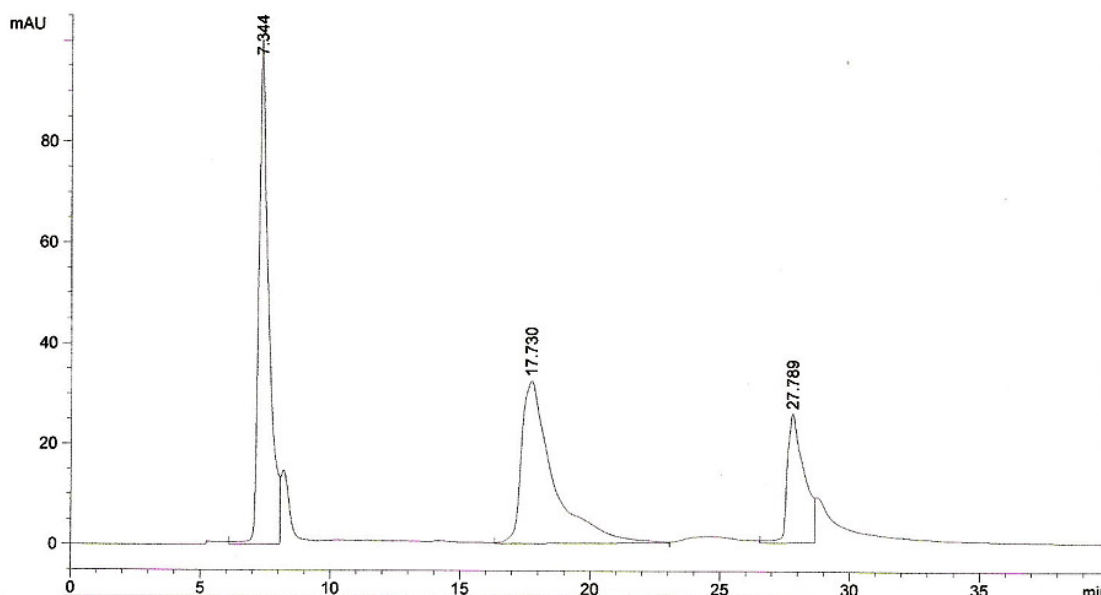
20-60 % CH_3CN เวลา 20-30 นาที

60 % CH_3CN เวลา 30-40 นาที

Gradient elution ที่ใช้กับการแยกสารทั้ง 3 ชนิด เป็นดังรูปที่ 3 สังเกต peak ที่มี retention time (T_R) ตรงกับสารมาตรฐาน 3 ชนิด (gallic acid, luteolin glycoside และ luteolin) ดังแสดงในโครมาโตแกรมรูปที่ 4 โดยทำการทดสอบ 3 ซ้ำ จากนั้นนำค่าพื้นที่ใต้พีคของสารแต่ละชนิดมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยและค่า SD



รูปที่ 3 กราฟแสดง gradient elution



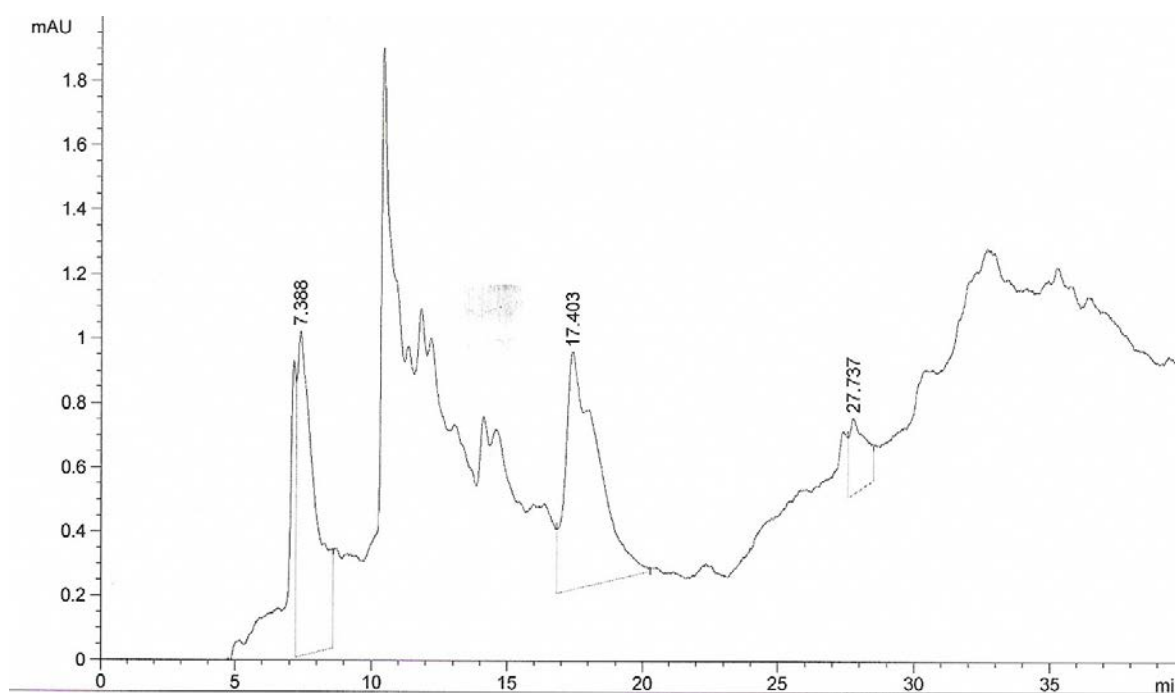
รูปที่ 4 โครมาโตแกรมแสดงสัญญาณของ gallic acid, luteolin glycoside และ luteolin ตามลำดับ

Gallic acid	ที่ T_R ประมาณ 7.344 นาที
Luteolin glycoside	ที่ T_R ประมาณ 17.730 นาที
Luteolin	ที่ T_R ประมาณ 27.789 นาที

จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าการเก็บสารที่อุณหภูมิห้อง (Wang และคณะ, 2003) Gallic acid จะสามารถคงตัวอยู่ได้ประมาณ 6 ชั่วโมง หลังจาก 8 ชั่วโมง gallic acid จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นประมาณ 10.1% เก็บใน freezer ที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส จะสามารถเก็บ gallic acid ได้ประมาณ 1 อาทิตย์และจะสลายตัวไปประมาณ 2% เมื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณ gallic acid ไม่ว่าจะเก็บไว้ในสภาวะใดก็ตาม ปริมาณของ gallic acid จะไม่ลดลงหลังจาก 8 ชั่วโมง ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่า gallic acid มีสภาพคงตัวที่ดี สามารถเก็บสารละลายของ luteolin ได้ประมาณ 3 เดือน ถ้าเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Zhang และคณะ, 2007) สารละลาย luteolin-7-O-glucoside นั้นสลายตัวได้ง่าย โดย luteolin-7-O-glucoside จะถูกไฮโดรลิซิสเป็น luteolin ในบางครั้งไม่สามารถวิเคราะห์ luteolin-7-O-glucoside ได้อย่างชัดเจนเนื่องจากมี glucuro-conjugates มาบดบัง luteolin-7-O-glucoside ไว้และเมื่อ glucuro-conjugates สลายตัวไป luteolin-7-O-glucoside ก็จะสามารถตรวจพบได้เช่นกัน จึงทำให้ luteolin มีปริมาณเพิ่มขึ้นได้ (Shimoi และคณะ, 1998) สารประกอบ phenolic สามารถคงตัวอยู่ได้ประมาณ 2 วันถ้าเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใน thermostated autoinjection และจะคงตัวอยู่ได้ประมาณ 6 เดือนถ้าเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสใน methanol และอยู่ในที่มืด (Abad-García และคณะ, 2007) ข้อดีของการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC มีหลายประการดังที่ทราบกัน แต่ก็มีข้อเสียคือเป็นวิธีวิเคราะห์ที่ทำลายตัวอย่าง ใช้เวลาในการวิเคราะห์นานและขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่ยุ่งยาก เมื่อเปรียบเทียบกับ Raman spectroscopy (Orkoula และคณะ, 2004)

เมื่อนำส่วนต่างๆ ของลำพูมาวิเคราะห์สาร marker ทั้งสามชนิด ได้แสดงลักษณะโครมาโตแกรมไว้ในรูปที่ 5-9 ส่วนค่า retention time และพื้นที่ใต้พีคแสดงไว้ในตารางที่ 1-10 ซึ่งจะพบว่า retention time ของสาร marker ทั้งสามชนิด แต่ละชนิดปรากฏค่า retention time ที่ใกล้เคียงกัน และมีพื้นที่ใต้พีคที่แตกต่างกันไป ซึ่งแสดงว่าแต่ละส่วนของลำพูมีสาร marker ในปริมาณที่ต่างกัน โดยสำหรับสาร gallic acid พบใน ที่หุ้มดอก > เกสร > ใบ > ผล > เมล็ด ส่วนสาร luteolin-7-O-glycoside พบว่ามีปริมาณใน ใบ > เกสร > ที่หุ้มดอก > เมล็ด > ผล และสำหรับปริมาณสาร luteolin พบใน เมล็ด > ผล > ที่หุ้มดอก > เกสร > ใบ ซึ่งข้อมูลการสรุปผลได้แสดงไว้ในตารางที่ 11

แสดงผลโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Gallic acid, Luteolin-7-O-glucoside และ Luteolin



รูปที่ 5 โครมาโตแกรมแสดงสัญญาณของ gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin ของสารสกัดใบลำพูที่สกัดด้วย methanol ที่ความเข้มข้น 0.25 mg/ml

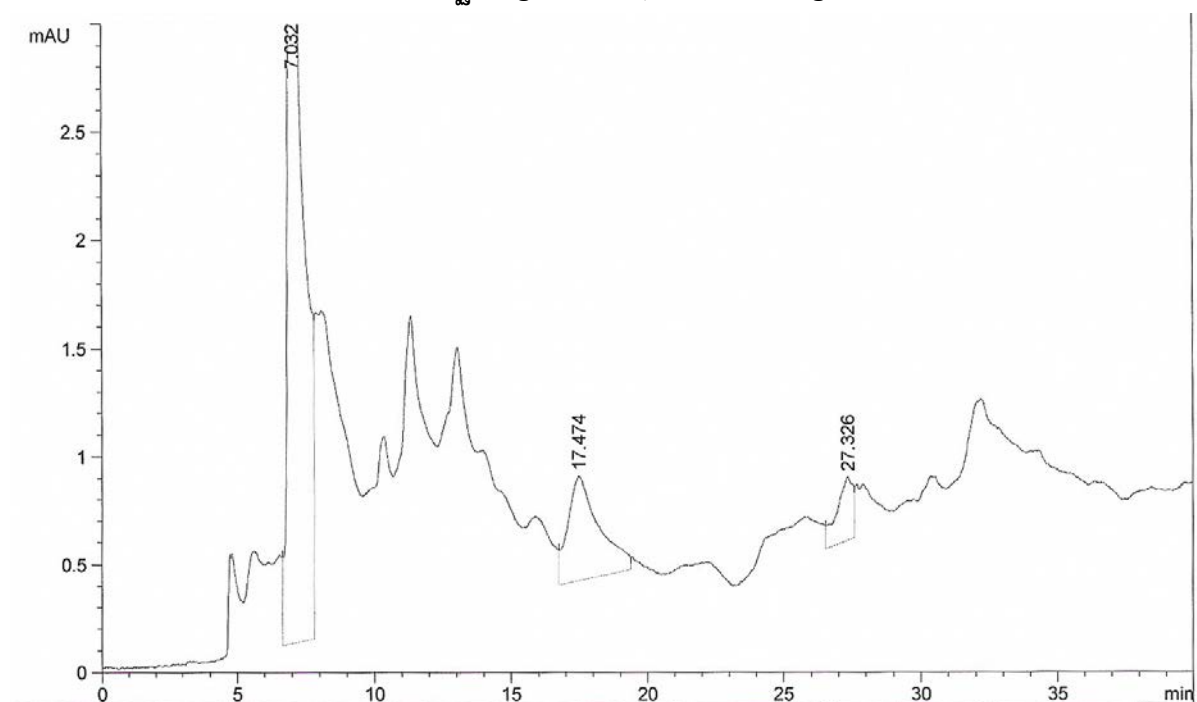
ตารางที่ 1 ตารางแสดงเวลาสัญญาณโครมาโตแกรม และพื้นที่ใต้กราฟของพีคจากสารสกัดใบลำพูที่สกัดด้วย methanol ที่ตรงกับสารมาตรฐาน

สารสกัดใบลำพูที่สกัดด้วย Methanol	เวลาสัญญาณโครมาโตแกรม T_R (min) ที่ตรงกับสารมาตรฐาน			พื้นที่ใต้กราฟของโครมาโตแกรมที่ตรงกับสารมาตรฐาน (mAU*s)		
	Gallic acid	Luteolin-7-O-glucoside	Luteolin	Gallic acid	Luteolin-7-O-glucoside	Luteolin
ตัวอย่าง ที่ 1	7.342	17.382	27.785	44.710	61.361	8.490
ตัวอย่าง ที่ 2	7.323	17.334	27.783	40.257	56.626	11.086
ตัวอย่าง ที่ 3	7.370	17.598	27.858	45.745	56.497	9.928
AVG	7.345	17.438	27.809	43.571	58.162	9.835
SD	0.024	0.141	0.043	2.916	2.772	1.301

ตารางที่ 2 ตารางการคำนวณหาค่าต่างๆ สารมาตรฐาน gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin จากสารสกัดใบลำพูที่สกัดด้วย methanol

ตัวอย่าง	Gallic acid (mAU*s)	mg/g dried extract	Luteolin-7-O-glucoside (mAU*s)	mg/g dried extract	Luteolin (mAU*s)	mg/g dried extract
1	44.710	7.265	61.361	15.604	8.490	4.374
2	40.257	6.944	56.626	14.370	11.086	4.550
3	45.745	7.340	56.497	14.336	9.928	4.472
AVG	43.571	7.183	58.162	14.770	9.835	4.465
SD	2.916	0.211	2.772	0.722	1.301	0.088

แสดงผลโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin



รูปที่ 6 โครมาโตแกรมแสดงสัญญาณของ gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin ของสารสกัดที่หุ้มดอก
ลำพูที่สกัดด้วย methanol ที่ความเข้มข้น 0.25 mg/ml

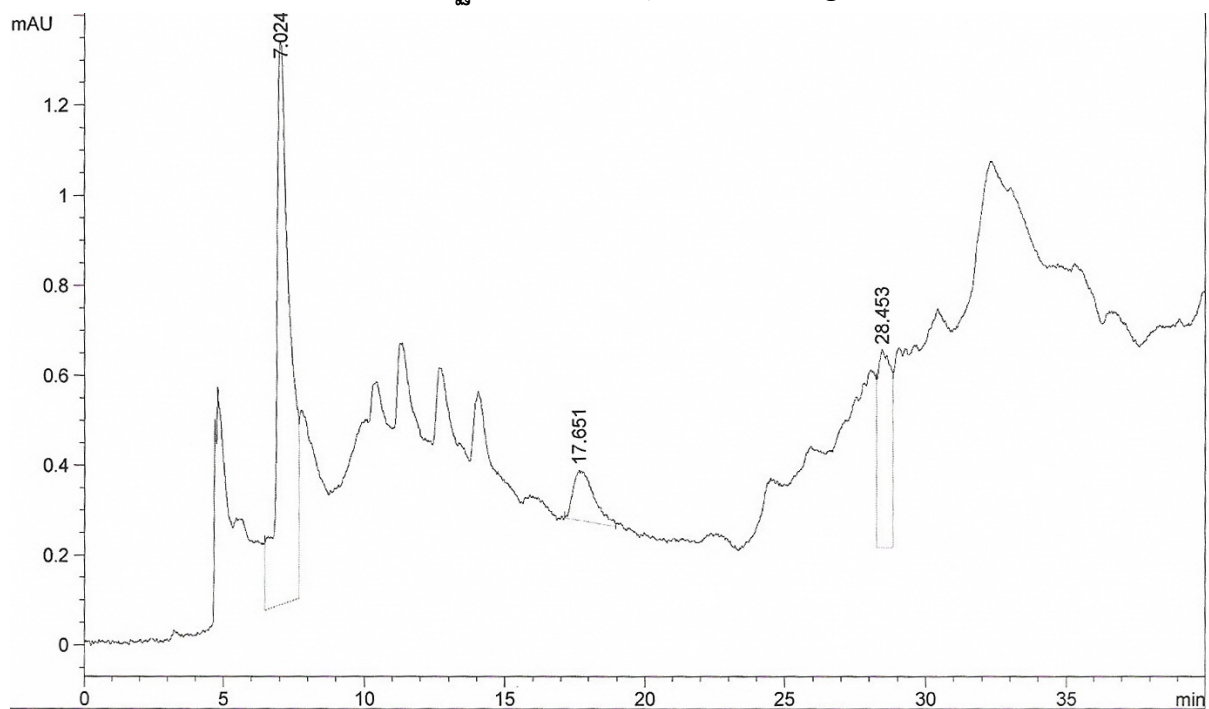
ตารางที่ 3 ตารางแสดงเวลาสัญญาณโครมาโตแกรม และพื้นที่ใต้กราฟของพีคจากสารสกัดที่หุ้มดอกลำพูที่สกัดด้วย Methanol ที่ตรงกับสารมาตรฐาน

สารสกัดที่หุ้มดอก ลำพูที่สกัดด้วย Methanol	เวลาสัญญาณ โครมาโตแกรม T_R (min) ที่ตรงกับสาร มาตรฐาน			พื้นที่ใต้กราฟของโครมาโตแกรมที่ตรงกับ สารมาตรฐาน (mAU*s)		
	Gallic acid	Luteolin-7-O- glucoside	Luteolin	Gallic acid	Luteolin-7-O- glucoside	Luteolin
ตัวอย่าง ที่ 1	7.012	17.562	27.695	169.653	34.085	14.048
ตัวอย่าง ที่ 2	7.085	17.680	27.555	172.801	38.565	11.482
ตัวอย่าง ที่ 3	7.033	17.547	27.766	179.262	33.993	11.782
AVG	7.043	17.596	27.672	173.905	35.548	12.437
SD	0.037	0.073	0.107	4.899	2.613	1.403

ตารางที่ 4 ตารางการคำนวณหาค่าต่างๆ สารมาตรฐาน gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin จากสารสกัดที่หุ้มดอกลำพูที่สกัดด้วย methanol

ตัวอย่าง	Gallic acid (mAU*s)	mg/g dried extract	Luteolin-7-O- glucoside (mAU*s)	mg/g dried extract	Luteolin (mAU*s)	mg/g dried extract
1	169.653	16.297	34.085	8.494	14.048	4.750
2	172.801	16.524	38.565	9.662	11.482	4.577
3	179.262	16.991	33.993	8.470	11.782	4.597
AVG	173.905	16.604	35.548	8.875	12.437	4.641
SD	4.899	0.354	2.613	0.681	1.403	0.095

แสดงผลโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Gallic acid, Luteolin-7-O-glucoside และ Luteolin



รูปที่ 7 โครมาโตแกรมแสดงสัญญาณของ gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin ของสารสกัดผลลำพูที่สกัดด้วย methanol ที่ความเข้มข้น 0.25 mg/ml

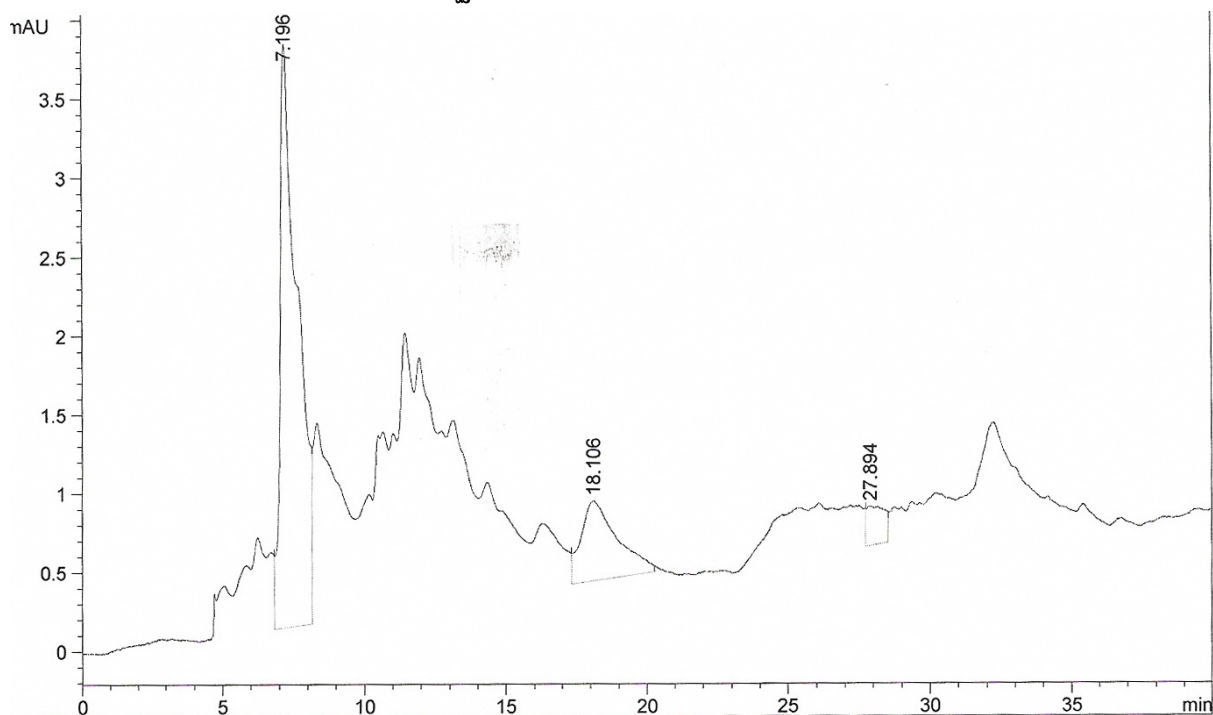
ตารางที่ 5 ตารางแสดงเวลาสัญญาณโครมาโตแกรม และพื้นที่ใต้กราฟของพีคจากสารสกัดที่ผลลำพูที่สกัดด้วย methanol ที่ตรงกับสารมาตรฐาน

สารสกัดผลลำพูที่สกัดด้วย Methanol	เวลาสัญญาณโครมาโตแกรม T_R (min) ที่ตรงกับสารมาตรฐาน			พื้นที่ใต้กราฟของโครมาโตแกรมที่ตรงกับสารมาตรฐาน (mAU*s)		
	Gallic acid	Luteolin-7-O-glucoside	Luteolin	Gallic acid	Luteolin-7-O-glucoside	Luteolin
ตัวอย่าง ที่ 1	7.013	17.702	28.449	42.384	6.446	14.552
ตัวอย่าง ที่ 2	7.004	17.606	28.179	41.943	5.825	12.256
ตัวอย่าง ที่ 3	6.867	17.154	27.890	43.928	5.766	12.320
AVG	6.961	17.487	28.173	42.752	6.012	13.043
SD	0.082	0.292	0.280	1.042	0.377	1.307

ตารางที่ 6 ตารางการคำนวณหาค่าต่างๆ สารมาตรฐาน gallic acid, Luteolin-7-O-glucoside และ luteolin จากสารสกัดที่ผลลำพูที่สกัดด้วย methanol

ตัวอย่าง	Gallic acid (mAU*s)	mg/g dried extract	Luteolin-7-O-glucoside (mAU*s)	mg/g dried extract	Luteolin (mAU*s)	mg/g dried extract
1	42.384	7.097	6.446	1.289	14.552	4.784
2	41.943	7.066	5.825	1.127	12.256	4.629
3	43.928	7.209	5.766	1.112	12.320	4.633
AVG	42.752	7.124	6.012	1.176	13.043	4.682
SD	1.042	0.075	0.377	0.098	1.307	0.088

แสดงผลโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Gallic acid, Luteolin-7-O-glucoside และ Luteolin



รูปที่ 8 โครมาโตแกรมแสดงสัญญาณของ gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin ของสารสกัดเกสรลำพู ที่สกัดด้วย methanol ที่ความเข้มข้น 0.25 mg/ml

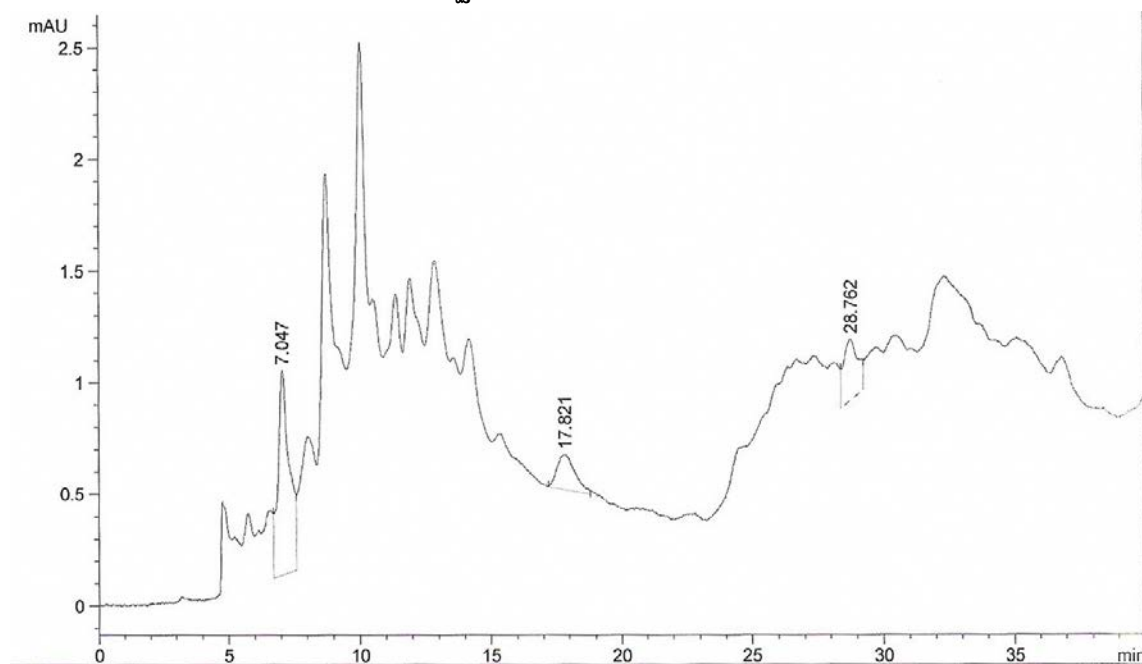
ตารางที่ 7 แสดงเวลาสัญญาณโครมาโตแกรม และพื้นที่ใต้กราฟของพีคจากสารสกัดที่เกสรลำพูที่สกัดด้วย Methanol ที่ตรงกับสารมาตรฐาน

สารสกัดเกสรลำพูที่สกัดด้วย Methanol	เวลาสัญญาณโครมาโตแกรม T_R (min) ที่ตรงกับสารมาตรฐาน			พื้นที่ใต้กราฟของโครมาโตแกรมที่ตรงกับสารมาตรฐาน (mAU*s)		
	Gallic acid	Luteolin-7-O-glucoside	Luteolin	Gallic acid	Luteolin-7-O-glucoside	Luteolin
ตัวอย่าง ที่ 1	7.070	17.517	28.094	149.432	51.288	11.281
ตัวอย่าง ที่ 2	7.019	17.301	27.095	145.982	52.724	11.383
ตัวอย่าง ที่ 3	6.983	17.153	27.148	141.966	53.036	10.960
AVG	7.024	17.323	27.446	145.793	52.349	11.208
SD	0.044	0.183	0.562	3.736	0.932	0.221

ตารางที่ 8 ตารางการคำนวณหาค่าต่างๆสารมาตรฐาน gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin จากสารสกัดที่เกสรลำพูที่สกัดด้วย methanol

ตัวอย่าง	Gallic acid (mAU*s)	mg/g dried extract	Luteolin-7-O-glucoside (mAU*s)	mg/g dried extract	Luteolin (mAU*s)	mg/g dried extract
1	149.432	14.835	51.288	12.978	11.281	4.563
2	145.982	14.586	52.724	13.353	11.383	4.570
3	141.966	14.295	53.036	13.434	10.960	4.541
AVG	145.793	14.572	52.349	13.255	11.208	4.558
SD	3.736	0.270	0.932	0.243	0.221	0.015

แสดงผลโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin



รูปที่ 9 โครมาโตแกรมแสดงสัญญาณของ gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin ของสารสกัดเมล็ดลำพู ที่สกัดด้วย methanol ที่ความเข้มข้น 0.25 mg/ml

ตารางที่ 9 ตารางแสดงเวลาสัญญาณโครมาโตแกรม และพื้นที่ใต้กราฟของพีคจากสารสกัดที่เกสรลำพูที่สกัดด้วย methanol ที่ตรงกับสารมาตรฐาน

สารสกัดเมล็ดลำพูที่สกัดด้วย Methanol	เวลาสัญญาณโครมาโตแกรม T_R (min) ที่ตรงกับสารมาตรฐาน			พื้นที่ใต้กราฟของโครมาโตแกรมที่ตรงกับสารมาตรฐาน (mAU*s)		
	Gallic acid	Luteolin-7-O-glucoside	Luteolin	Gallic acid	Luteolin-7-O-glucoside	Luteolin
ตัวอย่าง ที่ 1	7.028	17.769	28.757	24.925	7.975	10.878
ตัวอย่าง ที่ 2	6.969	17.522	28.701	23.438	7.801	14.142
ตัวอย่าง ที่ 3	6.838	16.967	28.510	25.587	7.542	15.343
AVG	6.945	17.419	28.656	24.650	7.772	13.454
SD	0.097	0.410	0.130	1.101	0.218	2.310

ตารางที่ 10 การคำนวณหาค่าต่างๆสารมาตรฐาน gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin จากสารสกัดที่เมล็ดลำพูที่สกัดด้วย methanol

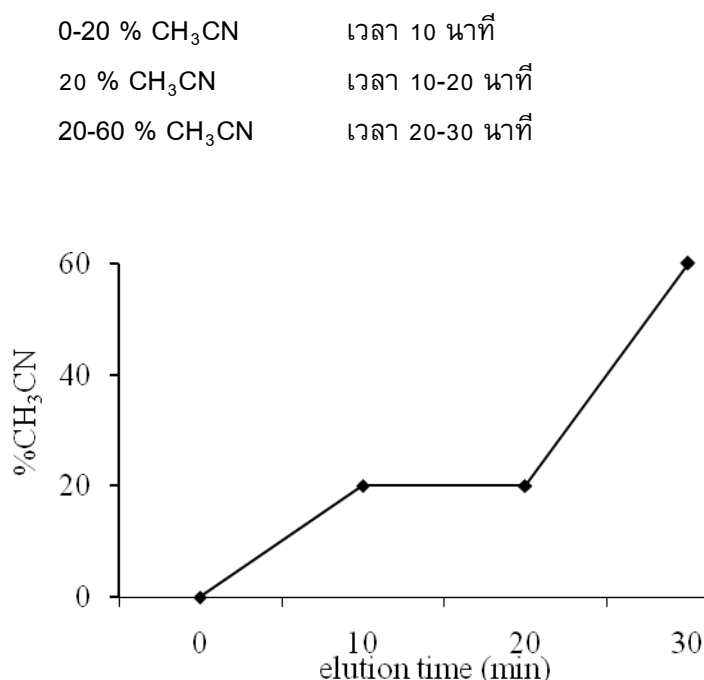
ตัวอย่าง	Gallic acid (mAU*s)	mg/g dried extract	Luteolin-7-O-glucoside (mAU*s)	mg/g dried extract	Luteolin (mAU*s)	mg/g dried extract
1	24.925	5.835	7.975	1.688	10.878	4.536
2	23.438	5.728	7.801	1.643	14.142	4.756
3	25.587	5.883	7.542	1.575	15.343	4.837
AVG	24.650	5.816	7.772	1.635	13.454	4.710
SD	1.101	0.080	0.218	0.057	2.310	0.156

ตารางที่ 11 ตารางการเปรียบเทียบสารมาตรฐาน gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin จากสารสกัด
ลำพูส่วนต่างๆ ที่สกัดด้วย methanol

ตัวอย่าง	Gallic acid (mAU*s)	mg/g dried extract	Luteolin-7-O- glucoside (mAU*s)	mg/g dried extract	Luteolin (mAU*s)	mg/g dried extract
ใบ	43.571	7.183	58.162	14.770	9.835	4.465
ที่หุ้มดอก	173.905	16.604	35.548	8.875	12.437	4.641
ผล	42.752	7.124	6.012	1.176	13.043	4.682
เกสร	145.793	14.572	52.349	13.255	11.208	4.558
เมล็ด	24.650	5.816	7.772	1.635	13.454	4.710

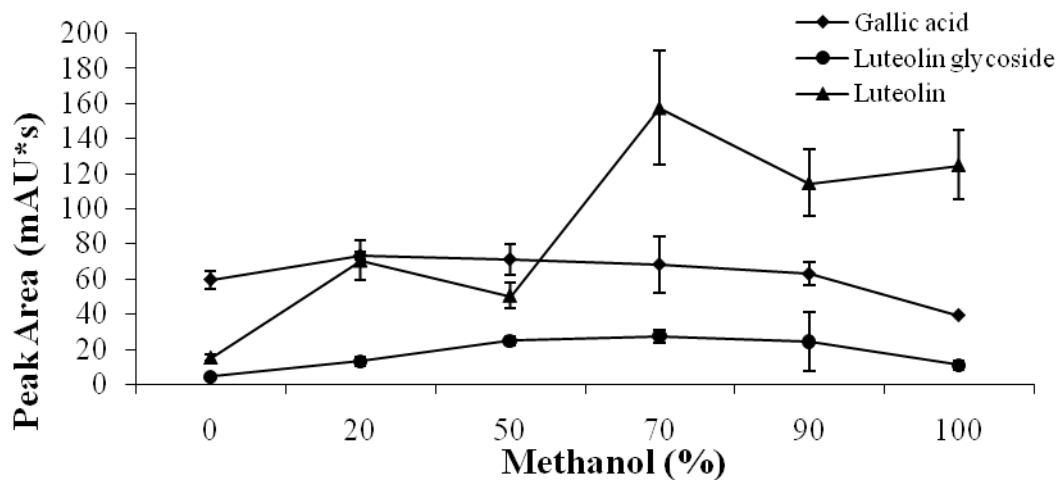
4. การศึกษาวิธีการสกัดที่เหมาะสม (Optimization of extraction procedure) สำหรับการเตรียมสารสกัดจากลำพู

การศึกษาวิธีการสกัดที่เหมาะสมเป็นการวิเคราะห์หาปริมาณ gallic acid, luteolin glycoside และ luteolin ในสารสกัดหยาบที่ได้จากเมล็ดลำพู โดยอาศัยเทคนิคการวิเคราะห์ด้วย HPLC เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการสกัดสารสำคัญ 3 ชนิด ดังกล่าว ออกจากผงพืชแห้ง ซึ่งเริ่มจากการสกัดผงพืชแห้งด้วยเมทานอลในน้ำที่มีความเข้มข้น 20, 50, 70, 90 และ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยผงพืชที่นำมาสกัดจะร่งผ่าน sieve No.20 mesh ก่อน จากนั้นจึงชั่งน้ำหนักผงพืชประมาณ 1 กรัม สกัดด้วยเมทานอล 30 มิลลิลิตร จำนวนครั้งที่สกัด คือ 1 ครั้ง สกัดด้วย sonicator เป็นเวลานาน 15, 30, 40 และ 60 นาที จากนั้นนำสารละลายที่สกัดได้มารองและระเหยแห้งด้วย rotary evaporator ทิ้งไว้ให้แห้งสนิทใน desiccator นำมาชั่งน้ำหนัก คำนวณหา % yield จากนั้นจึงนำสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ 3 ชนิด คือ gallic acid, luteolin glycoside และ luteolin ด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้คอลัมน์และสภาวะในการแยกสารสำคัญตามหัวข้อ 7.2.2 ดังกล่าวข้างต้น โดยมี gradient elution เป็นดังนี้ (รูปที่ 10)

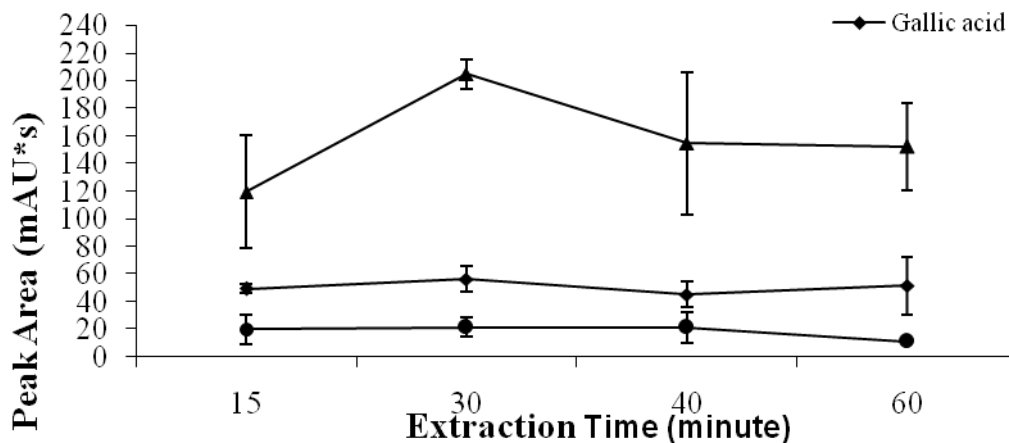


รูปที่ 10 Gradient elution ของการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในสารสกัดจากลำพู

จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ 3 ชนิด คือ gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin ในสารสกัดจากเมล็ดลำพูด้วยเมทานอลในน้ำที่มีความเข้มข้น 20, 50, 70, 90 และ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เทคนิค HPLC พบว่าการสกัดเมล็ดลำพูด้วยเมทานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลานาน 30 นาที จะให้ปริมาณสารสำคัญทั้ง 3 ชนิดสูงที่สุด ดังรูปที่ 11 และ 12 ตามลำดับ

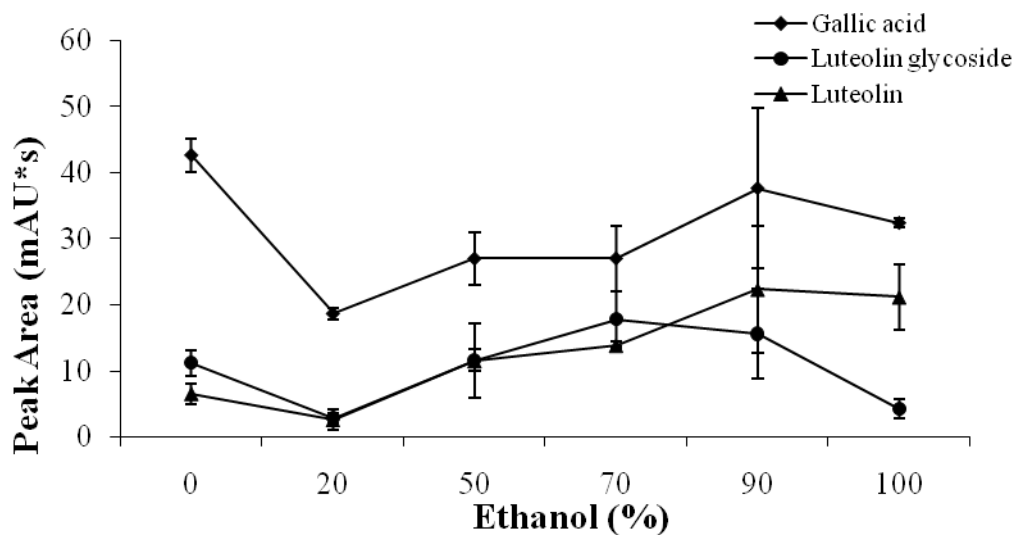


รูปที่ 11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเมทานอลในน้ำกับพื้นที่ใต้กราฟของสารสำคัญ

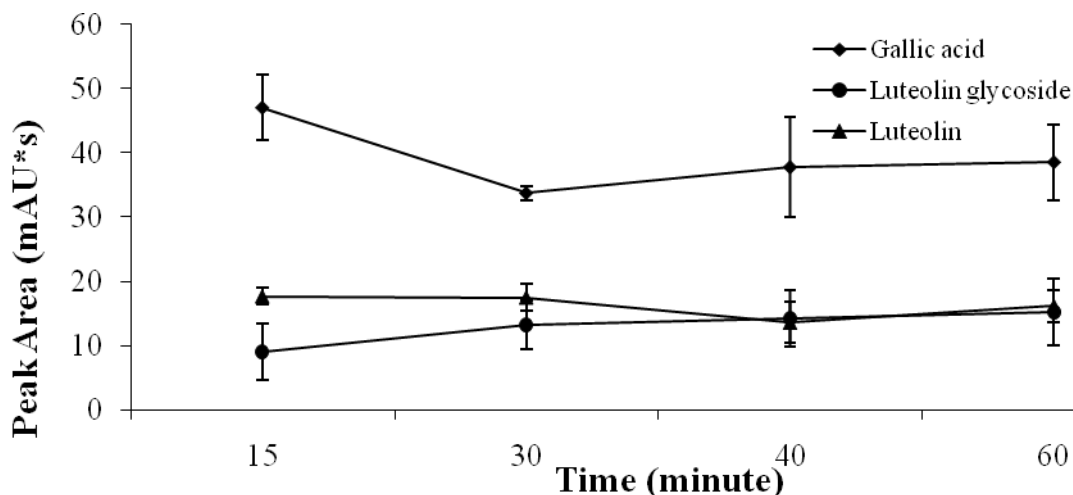


รูปที่ 12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดเมล็ดลำพูด้วยเมทานอลในน้ำที่มีความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ กับพื้นที่ใต้กราฟของสารสำคัญ

เนื่องจากเมทานอลมีความเป็นพิษต่อเซลล์และนำมาบริโภคไม่ได้ จึงได้ทำการศึกษาวิธีการสกัดที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมสารสกัดจากเมล็ดลำพูด้วยเอทานอลในน้ำ ที่มีความเข้มข้น 20, 50, 70, 90 และ 100 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ 3 ชนิด คือ gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin ด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้คอลัมน์และสภาวะในการแยกสารสำคัญตามหัวข้อ 2 ดังกล่าวข้างต้น โดยพบว่าการสกัดเมล็ดลำพูด้วยเอทานอลในน้ำที่มีความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ จะมีปริมาณของ gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin สูงขึ้น ในขณะที่การสกัดเมล็ดลำพูด้วยเอทานอลในน้ำที่มีความเข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์ จะมีปริมาณของ gallic acid และ luteolin สูงขึ้น แต่ปริมาณของ luteolin-7-O-glucoside ลดลง ดังรูปที่ 13 จากการศึกษาต่อมาโดยการสกัดเมล็ดลำพูด้วยเอทานอลในน้ำที่มีความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลาต่าง ๆ กัน พบว่าการสกัดเมล็ดลำพูด้วยเอทานอลในน้ำที่มีความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 30 นาที จะมีปริมาณของ gallic acid และ luteolin สูงขึ้น แต่ปริมาณของ luteolin-7-O-glucoside ลดลง ดังรูปที่ 14

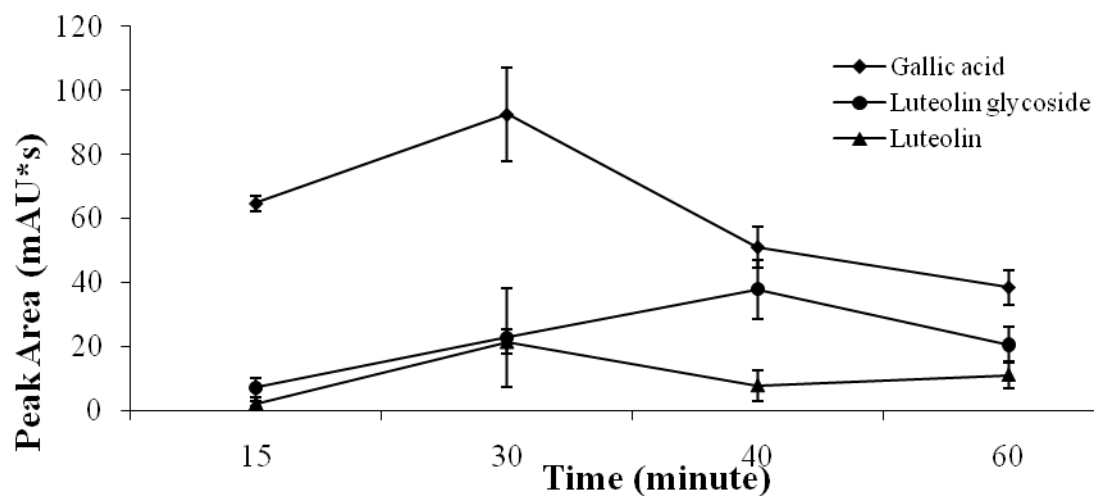


รูปที่ 13 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอทานอลในน้ำกับพื้นที่ใต้กราฟของสารสำคัญ



รูปที่ 14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดเมล็ดลำพูด้วยเอทานอลในน้ำที่มีความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ กับพื้นที่ใต้กราฟของสารสำคัญ

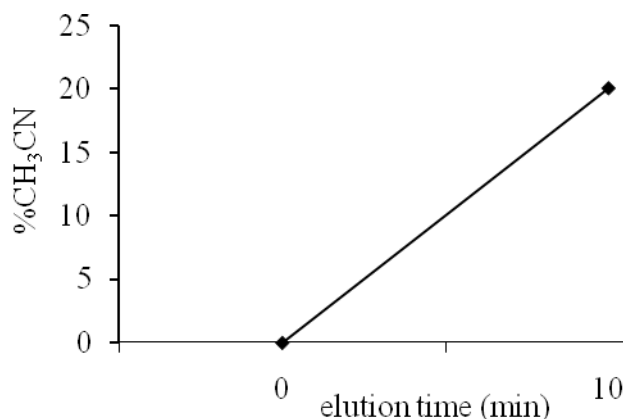
เนื่องจากตัวทำละลายที่เป็นน้ำมีความปลอดภัยสูงสุดต่อผู้บริโภค จึงได้ทำการศึกษาวิธีการสกัดที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมสารสกัดจากเมล็ดลำพูด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ 3 ชนิด คือ gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin ด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้คอลัมน์และสภาวะในการแยกสารสำคัญตามหัวข้อ 7.2.2 ดังกล่าวข้างต้น โดยพบว่าการสกัดเมล็ดลำพูด้วยน้ำจะมีปริมาณของ gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin สูงขึ้น ในเวลา 30 นาที ในขณะที่ปริมาณของ luteolin-7-O-glucoside จะเพิ่มขึ้นสูงสุดในเวลา 40 นาที ดังรูปที่ 15



รูปที่ 15 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดเมล็ดลำพูด้วยน้ำกลั่นกับพื้นที่ใต้กราฟของสารสำคัญ

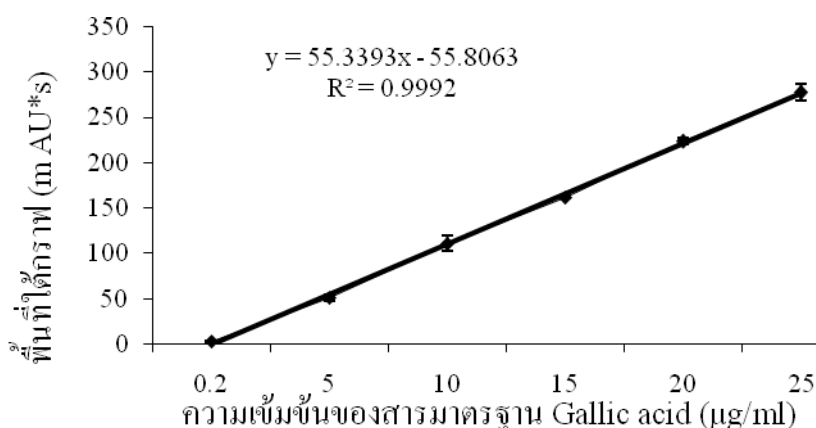
5. การศึกษา Linearity, limit of detection และ quantification ของ gallic acid

เตรียมสารละลายมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้น 0.2, 5, 10, 15, 20 และ 25 µg/ml (ใช้ 70%MeOH เป็นตัวทำละลาย) นำสารละลายมาตรฐานที่เตรียมได้มาวิเคราะห์ด้วย HPLC ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ใช้เครื่องมือ High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) Agilent 1100 series โดยมี VWD detector เป็นดีเทคเตอร์ ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 280 nm และใช้ Column RP-18 (10 µm) Semi-preparative Merck, LiChroCART 250-10 HPLC-Cartridge, LiChrospher 100 RP-10 (10µm), Lot No. 94035341 โดยมี mobile phase เป็น 0.01%(v/v) H₃PO₄ : CH₃CN ทำ gradient elution ที่ Flow rate = 5 ml/minute ดังรูปที่ 16



รูปที่ 16 Gradient elution สำหรับ gallic acid

รูปที่ 17 แสดง calibration curve ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid โดยกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟกับความเข้มข้นของ gallic acid เพื่อศึกษาค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์อย่างเป็นเส้นตรง (linear regression coefficients) และสมการเส้นตรง $y = mx + c$



รูปที่ 17 Calibration curve ของ gallic acid

การศึกษาปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบได้ (LOD) และปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวิเคราะห์ได้ (LOQ)

$$\text{ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบได้ (LOD)} = \frac{3.3 \times \text{ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าที่วัดได้}}{\text{ความชันกราฟมาตรฐาน}}$$

$$\text{ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวิเคราะห์ได้ (LOQ)} = \frac{10 \times \text{ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าที่วัดได้}}{\text{ความชันกราฟมาตรฐาน}}$$

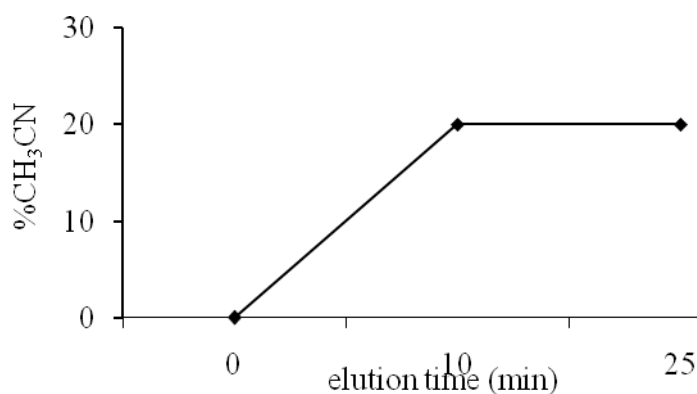
จาก linear regression coefficients ที่ได้เท่ากับ $y = 55.339x - 55.806$ คือ ความเข้มข้น y คือพื้นที่ใต้กราฟ มี R^2 เท่ากับ 0.9992

ตารางที่ 12 ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นและพื้นที่ใต้กราฟของ gallic acid

ความเข้มข้น μg/ml	พื้นที่ใต้กราฟ (m AU*s) เฉลี่ย	SD	ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบได้ (LOD)	ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวิเคราะห์ได้ (LOQ)
0.2	2.76	0.09	0.01	0.02
5	51.54	3.55	0.21	0.64
10	110.99	8.27	0.49	1.49
15	161.86	1.55	0.09	0.28
20	223.16	3.46	0.21	0.63
25	276.98	9.36	0.56	1.69

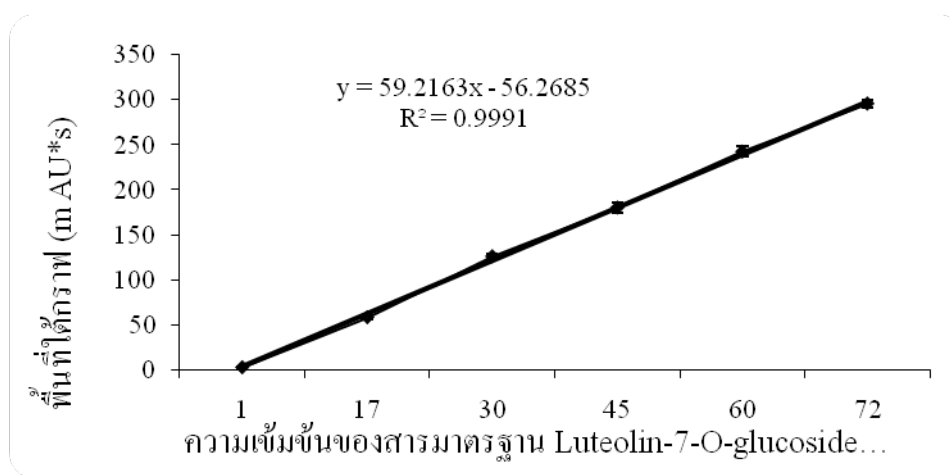
6. การศึกษา Linearity, limit of detection และ quantification ของ luteolin-7-O-glucoside

เตรียมสารละลายมาตรฐาน luteolin-7-O-glucoside ที่ความเข้มข้น 1, 17, 30, 45, 60 และ 72 µg/ml (ใช้ 70% MeOH เป็นตัวทำละลาย) นำสารละลายมาตรฐานที่เตรียมได้มาวิเคราะห์ด้วย HPLC ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ใช้เครื่องมือ HPLC (Agilent 1100 series) โดยมี VWD detector เป็นดีเทคเตอร์ ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 280 nm และใช้ Column RP-18 (10 µm) Semi-preparative Merck, LiChroCART 250-10 HPLC-Cartridge, LiChrospher 100 RP-10 (10µm), Lot No. 94035341 โดยมี mobile phase เป็น 0.01%(v/v) H₃PO₄ : CH₃CN ทำ gradient elution ที่ flow rate = 5 ml/minute ดังรูปที่ 18



รูปที่ 18 Gradient elution สำหรับ luteolin-7-O-glucoside

รูปที่ 19 แสดง calibration curve ของสารละลายมาตรฐาน luteolin glycoside โดยกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟกับความเข้มข้นของ luteolin glycoside เพื่อศึกษาค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์อย่างเป็นเส้นตรง (linear regression coefficients) และสมการเส้นตรง $y = mx + c$



รูปที่ 19 Calibration curve ของ luteolin-7-O-glucoside

การศึกษาปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบได้ (LOD) และปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวิเคราะห์ได้ (LOQ)

$$\text{ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบได้ (LOD)} = \frac{3.3 \times \text{ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าที่วัดได้}}{\text{ความชันกราฟมาตรฐาน}}$$

$$\text{ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวิเคราะห์ได้ (LOQ)} = \frac{10 \times \text{ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าที่วัดได้}}{\text{ความชันกราฟมาตรฐาน}}$$

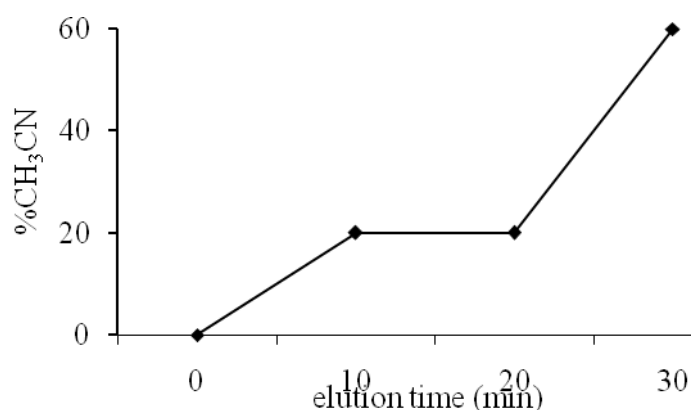
จาก linear regression coefficients ที่ได้เท่ากับ $y = 59.216x - 56.269$ คือ ความเข้มข้น y คือพื้นที่ใต้กราฟ มี R^2 เท่ากับ 0.9991

ตารางที่ 13 ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นและพื้นที่ใต้กราฟของ luteolin-7-O-glucoside

ความเข้มข้น µg/ml	พื้นที่ใต้กราฟ (m AU*s) เฉลี่ย	SD	ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบได้ (LOD)	ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจ วิเคราะห์ได้ (LOQ)
1	2.70	0.16	0.01	0.03
17	58.39	1.70	0.09	0.29
30	126.12	2.81	0.16	0.48
45	180.28	5.08	0.28	0.86
60	242.54	5.83	0.32	0.98
72	295.90	4.21	0.23	0.71

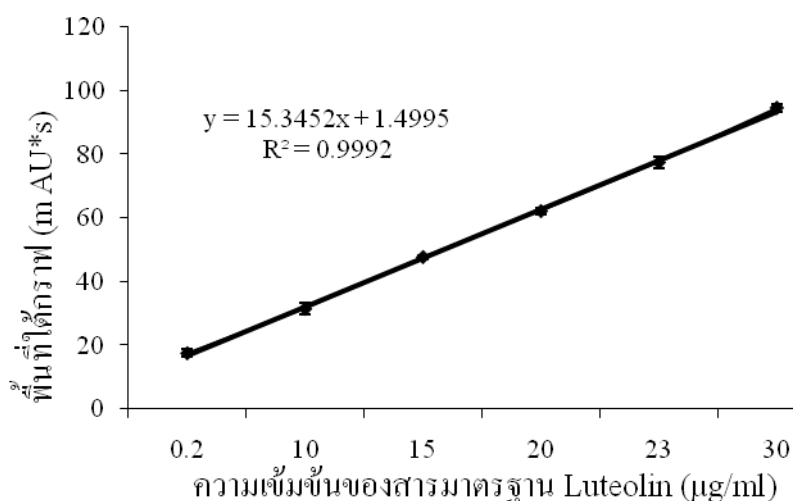
7. การศึกษา Linearity, limit of detection และ quantification ของ luteolin

เตรียมสารละลายมาตรฐาน luteolin ที่ความเข้มข้น 0.2, 10, 15, 20, 23 และ 30 $\mu\text{g/ml}$ (ใช้ 70%MeOH เป็นตัวทำละลาย) นำสารละลายมาตรฐานที่เตรียมได้มาวิเคราะห์ด้วย HPLC ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ใช้ เครื่องมือ HPLC (Agilent 1100 series) โดยมี VWD detector เป็นดีเทคเตอร์ ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 280 nm และใช้ Column RP-18 (10 μm) Semi-preparative Merck, LiChroCART 250-10 HPLC-Cartridge, LiChrospher 100 RP-10 (10 μm), Lot No. 94035341 โดยมี mobile phase เป็น 0.01%(v/v) H_3PO_4 : CH_3CN ทำ gradient elution ที่ flow rate = 5 ml/min ดังรูปที่ 20



รูปที่ 20 Gradient elution สำหรับ luteolin

รูปที่ 21 แสดง calibration curve ของสารละลายมาตรฐาน luteolin โดยกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟกับความเข้มข้นของ luteolin เพื่อศึกษาค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์อย่างเป็นเส้นตรง (linear regression coefficients) และสมการเส้นตรง $y = mx + c$



รูปที่ 21 Calibration curve ของ luteolin

การศึกษาปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบได้ (LOD) และปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวิเคราะห์ได้ (LOQ)

$$\text{ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบได้ (LOD)} = \frac{3.3 \times \text{ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าที่วัดได้}}{\text{ความชันกราฟมาตรฐาน}}$$

$$\text{ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวิเคราะห์ได้ (LOQ)} = \frac{10 \times \text{ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าที่วัดได้}}{\text{ความชันกราฟมาตรฐาน}}$$

จาก linear regression coefficients ที่ได้เท่ากับ $y = 15.345x + 1.4995$ เมื่อ x คือ ความเข้มข้น y คือ พื้นที่ใต้กราฟ มี R^2 เท่ากับ 0.9992

ตารางที่ 14 ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นและพื้นที่ใต้กราฟของ luteolin

ความเข้มข้น µg/ml	พื้นที่ใต้กราฟ (m AU*s) เฉลี่ย	SD	ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบได้ (LOD)	ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจ วิเคราะห์ได้ (LOQ)
0.2	17.62	1.23	0.27	0.80
10	31.56	1.68	0.36	1.10
15	47.79	0.64	0.14	0.42
20	62.21	0.86	0.18	0.56
23	77.48	1.71	0.37	1.12
30	94.60	1.35	0.29	0.88

8. การเปรียบเทียบสารสกัดลำพูที่ใช้ตัวทำละลายแตกต่างกัน

การเปรียบเทียบสารสกัดลำพูที่ใช้ตัวทำละลายแตกต่างกันเป็นการศึกษาปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของลำพู เริ่มจากการเก็บตัวอย่างลำพูจากจังหวัดนครปฐมในปี พ.ศ. 2550 และจัดเก็บตัวอย่างพืชแห้งไว้ที่คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร สกัดตัวอย่างพืชที่ทำแห้งแล้วด้วยตัวทำละลายเป็นน้ำ เมทานอล หรือเอทานอล นำสารสกัดที่ได้มาศึกษาปริมาณฟีนอลทั้งหมด (total phenolics) ตามวิธีของ Kumazawa และคณะ (2002) และศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วย TEAC assay ตามวิธีของ Re และคณะ (1999) และวิเคราะห์หาปริมาณ gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin ในสารสกัดด้วย HPLC (Agilent 110 series) โดยใช้ variable wavelength และ LiChroCART semipreparative column (Merck Co., Ltd, USA) วัฏภาคเคลื่อนที่ประกอบด้วย acetonitrile และ phosphoric acid เข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ การวิเคราะห์ทุกอย่างทำ 3 ซ้ำ

จากผลการวิเคราะห์พบว่าสารสกัดเมทานอลเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ จากกลีบเลี้ยงมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงที่สุด ที่สภาวะการสกัดที่เหมาะสม (30 นาที เมทานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำ) พบว่าปริมาณ gallic acid และ luteolin-7-O-glucoside ในสารสกัดด้วยเมทานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ จากเมล็ดมีค่าสูงกว่าในสารสกัดด้วยเอทานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดด้วยน้ำ 100 เปอร์เซ็นต์ ถึง 3 เท่า รวมทั้งมีปริมาณ luteolin สูงกว่าสารสกัดด้วยเอทานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดด้วยน้ำ 100 เปอร์เซ็นต์ ถึง 7 และ 11 เท่า ตามลำดับ ในการเปรียบเทียบสารสกัดด้วยน้ำพบว่าสารสกัดจากเกสรตัวผู้มีความเข้มข้นของ gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin สูงที่สุด ความแรงของฤทธิ์ต้านออกซิเดชันค่อนข้างสอดคล้องกับปริมาณของโพลีฟีนอล (polyphenols)

จากผลการทดลองสรุปได้ว่าสามารถใช้เมทานอล เอทานอล และน้ำ เป็นตัวทำละลายในการสกัดสารสำคัญ (gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin) ออกจากส่วนต่าง ๆ ของลำพูได้ โดยพบว่าการสกัดด้วยเมทานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำ จะให้ปริมาณของ gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin สูงที่สุดในขณะที่การสกัดด้วยน้ำพบว่าเกสรตัวผู้มีปริมาณสารสำคัญทั้งสามชนิดสูงที่สุด ซึ่งปริมาณของสารสำคัญทั้งสามชนิดนี้มีผลต่อการแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ดังแสดงในตารางที่ 15 และ 16

ตารางที่ 15 โพลีฟีนอลทั้งหมดและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัด

สารสกัด	โพลีฟีนอลทั้งหมด (กรัม/100 กรัมสารสกัด คำนวณในรูปของกรดแกลลิก)	ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (เปอร์เซ็นต์)	
		IC50 (μg/50μL)	TEAC
สารสกัดเมทานอล 100 เปอร์เซ็นต์			
เกสรตัวผู้	23.24 ± 1.87	14.34	0.64
เมล็ด	20.82 ± 0.64	15.70	0.61
กลีบเลี้ยง	16.78 ± 0.90	13.64	0.69
สารสกัดด้วยน้ำ			
เกสรตัวผู้	13.82 ± 0.11	21.96	0.42
เมล็ด	5.75 ± 0.04	95.48	0.10
กลีบเลี้ยง	15.71 ± 0.18	18.50	0.50

ตารางที่ 16 ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/กรัม) ของกรดแกลลิก ลูทีโอลินกลูโคไซด์ และลูทีโอลิน ในสารสกัดจากเมล็ด
 วงกليبเลียง และเกสรตัวผู้ ที่ใช้ตัวทำละลายแตกต่างกัน และวิเคราะห์หาปริมาณด้วย HPLC

ส่วนของพืช	ตัวทำละลาย	Contents (mg/g-dry weight of material)		
		Gallic acid	Luteolin-7-O-glucoside	Luteolin
เมล็ด	เมทานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์	0.179 ± 0.012	0.109 ± 0.036	0.370 ± 0.015
	เอทานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์	0.068 ± 0.004	0.033 ± 0.011	0.054 ± 0.002
	น้ำ	0.067 ± 0.007	0.035 ± 0.025	0.033 ± 0.002
กลีบเลี้ยง	น้ำ	0.133 ± 0.003	0.016 ± 0.001	0.039 ± 0.001
เกสรตัวผู้	น้ำ	0.420 ± 0.045	0.116 ± 0.047	0.074 ± 0.001

9. การศึกษาความแม่นยำ (precision) ของสารมาตรฐาน gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin

ความแม่นยำ (precision) หมายถึง การวิเคราะห์ตัวอย่างเดียวกันซ้ำ ๆ กัน แล้วให้ค่าใกล้เคียงกัน ในทางเคมีนิยมวิเคราะห์สารมาตรฐานชนิดเดียวกันหลาย ๆ ครั้งแล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหา %RSD หากค่าที่ได้ไม่เกินที่กำหนด แสดงว่าการวิเคราะห์นั้นมี precision ดี การประเมิน precision มีทั้ง intra-day precision และ inter-day precision ในที่นี้ทำการทดสอบความเที่ยงของวิธี (precision) ด้วยการหาค่า repeatability ซึ่งการศึกษา repeatability จะเตรียมสารละลายมาตรฐานทั้ง 3 ชนิดให้มีความเข้มข้นต่ำสุดและสูงสุดโดยสังเกตจากผลการทำ linearity ซึ่งได้กำหนดให้ gallic acid มีความเข้มข้นต่ำสุด 0.2 µg/ml และความเข้มข้นสูงสุด 25 µg/ml และ luteolin-7-O-glucoside มีความเข้มข้นต่ำสุด 1 µg/ml และความเข้มข้นสูงสุด 72 µg/ml ในขณะที่ luteolin มีความเข้มข้นต่ำสุด 0.2 µg/ml และความเข้มข้นสูงสุด 30 µg/ml ซึ่งสารละลายมาตรฐานทุกชนิดและความเข้มข้นจะเจือจางด้วย 70% MeOH นำสารละลายมาตรฐานที่เตรียมได้มาวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญด้วย HPLC ซึ่งสารละลายแต่ละชนิดจะวิเคราะห์ซ้ำ 5 ครั้ง โดยทำการวิเคราะห์ในวันเดียวกัน (intra-day) และวิเคราะห์ซ้ำอีกในอีก 3 วัน (inter-day) (วันที่ 4 หลังจากเริ่มทดลอง) ข้อมูลการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 17

ตารางที่ 17 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่ำสุดและสูงสุดของสารละลายมาตรฐาน 3 ชนิด (gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin) กับพื้นที่ใต้พีคและ retention time (ทำการวิเคราะห์ 5 ซ้ำ หรือ n = 5)

Compound	Concentration µg/ml	Intra-day precision		Inter-day precision	
		Peak area (% R.S.D.)	Retention time (% R.S.D.)	Peak area (% R.S.D.)	Retention time (% R.S.D.)
Gallic acid	0.2	0.31	0.39	0.26	0.61
	25	0.08	0.38	0.72	0.24
Luteolin -7-O-glucoside	1	0.40	0.13	0.75	0.44
	72	0.41	0.94	0.77	0.41
Luteolin	0.2	0.43	0.16	0.99	0.14
	30	0.85	0.14	0.22	0.09

การหาค่า % R.S.D.

$$\% \text{ R.S.D.} = (s \times 100) / x$$

s = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation)

x = ค่าเฉลี่ย (average)

ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ได้จากการทดสอบ repeatability ด้วยการวิเคราะห์ซ้ำ 5 ครั้ง (n = 5) พบว่าการวิเคราะห์ให้ผลแม่นยำดี มีค่า % RSD ของ intra-day precision ในช่วง 0.08-0.85 % และมีค่า % RSD ของ inter-day precision ในช่วง 0.22-0.99 %

10. การศึกษาความถูกต้อง

ความถูกต้อง (accuracy) หมายถึง การที่วิธีวิเคราะห์สามารถวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้อง โดยค่าที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับค่าที่แท้จริง (true value) การประเมิน accuracy ทำได้โดยการศึกษา recovery ด้วยการวิเคราะห์สารในตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน (test sample) คำนวณหาปริมาณ standard ที่เติม (concentration recovered) และคำนวณหา % recovery ดังนี้

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{Conc.recovered} \times 100}{\text{Conc. added}}$$

การตรวจสอบความถูกต้องของผลวิเคราะห์ทำได้โดยการ spike สารมาตรฐานในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมลงในตัวอย่าง (sample) โดย spike ความเข้มข้นช่วง 50-150 % ของปริมาณที่คาดว่าจะพบในตัวอย่าง และรายงานผลด้วยค่า % recovery

$$\% \text{ Recovery} = (\text{spike} + \text{sample}) - \text{unspike sample} / \text{standard}$$

International conference on Harmonization แนะนำให้วิเคราะห์อย่างน้อย 3 ความเข้มข้นและแต่ละความเข้มข้นวิเคราะห์ 3 ครั้ง

วิธีการทดลอง

1. นำสารสกัดเมล็ดลำพูที่สกัดด้วย 70% MeOH มาละลายด้วย 100% MeOH ความเข้มข้นเริ่มต้น 10 mg/ml เจือจางเป็น 1 mg/ml แล้ววิเคราะห์ด้วย HPLC ทำ 3 ซ้ำ เพื่อเตรียมเป็น unspike sample
2. เลือกความเข้มข้นสารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิดโดยเริ่มที่ความเข้มข้นสูงสุดจากการทำ linearity แล้วลดลง 2 และ 5 เท่าของความเข้มข้นสูงสุด

โดย Gallic acid	เลือกความเข้มข้นที่ 5, 12.5 และ 25 µg/ml
Luteolin -7-O-glucoside	เลือกความเข้มข้นที่ 14.4, 36 และ 72 µg/ml
Luteolin	เลือกความเข้มข้นที่ 6, 15 และ 30 µg/ml

วิเคราะห์สารมาตรฐานแต่ละชุดความเข้มข้นด้วย HPLC เพื่อเป็น standard

3. จากนั้น spike สารมาตรฐานและแต่ละความเข้มข้นแบ่งเป็นชุด ๆ ลงในสารละลายสกัดเมล็ดลำพูที่สกัดด้วย 70% MeOH ซึ่งละลายด้วย 100% MeOH ความเข้มข้น 1 mg/ml แล้ววิเคราะห์ด้วย HPLC ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ เพื่อเป็น (spike + sample)

4. นำค่า peak area ที่ตรงกับสารมาตรฐานมาคำนวณหาค่า % recovery

การหาค่า % R.S.D.

$$\% \text{ R.S.D.} = (s \times 100) / x$$

s = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation)

x = ค่าเฉลี่ย (average)

ผลการศึกษาความถูกต้องในสารสกัดเมล็ดลำพูที่สกัดด้วย 70% MeOH แสดงในตารางที่ 7 ผลการศึกษาความถูกต้องในสารสกัดเมล็ดลำพูที่สกัดด้วย 70% EtOH แสดงในตารางที่ 8 และผลการศึกษาความถูกต้องในสารสกัดเมล็ดลำพูที่สกัดด้วย 100% H₂O แสดงในตารางที่ 18

ตารางที่ 18 ผลการศึกษาความถูกต้องในสารสกัดเมล็ดลำพูที่สกัดด้วย 70% MeOH (n = 3)

Compound	Amount added µg/ml	<i>Sonneratia caseolaris</i> (Linn.)	
		Recovery (%)	R.S.D.(%)
Gallic acid	5	105.84	0.71
	12.5	106.57	0.80
	25	105.59	0.03
Luteolin -7-O-glucoside	14.4	106.30	0.46
	36	105.41	0.46
	72	105.64	0.23
Luteolin	6	105.81	0.79
	15	105.05	0.46
	30	106.58	0.45

ตารางที่ 19 ผลการศึกษาความถูกต้องในสารสกัดเมล็ดลำพูที่สกัดด้วย 70% EtOH (n = 3)

Compound	Amount added µg/ml	<i>Sonneratia caseolaris</i> (Linn.)	
		Recovery (%)	R.S.D.(%)
Gallic acid	5	106.24	0.35
	12.5	105.68	0.94
	25	106.17	0.19
Luteolin -7-O-glucoside	14.4	105.68	0.20
	36	105.35	0.35
	72	106.70	0.31
Luteolin	6	106.27	0.32
	15	105.92	0.68
	30	105.12	0.96

ตารางที่ 20 ผลการศึกษาความถูกต้องในสารสกัดเมล็ดลำพูที่สกัดด้วย 100% H₂O (n = 3)

Compound	Amount added µg/ml	<i>Sonneratia caseolaris</i> (Linn.)	
		Recovery (%)	R.S.D.(%)
Gallic acid	5	105.91	0.28
	12.5	106.17	0.80
	25	106.06	0.54
Luteolin -7-O-glucoside	14.4	105.26	0.51
	36	105.46	0.26
	72	105.93	0.16
Luteolin	6	106.89	0.66
	15	106.38	0.13
	30	106.32	0.33

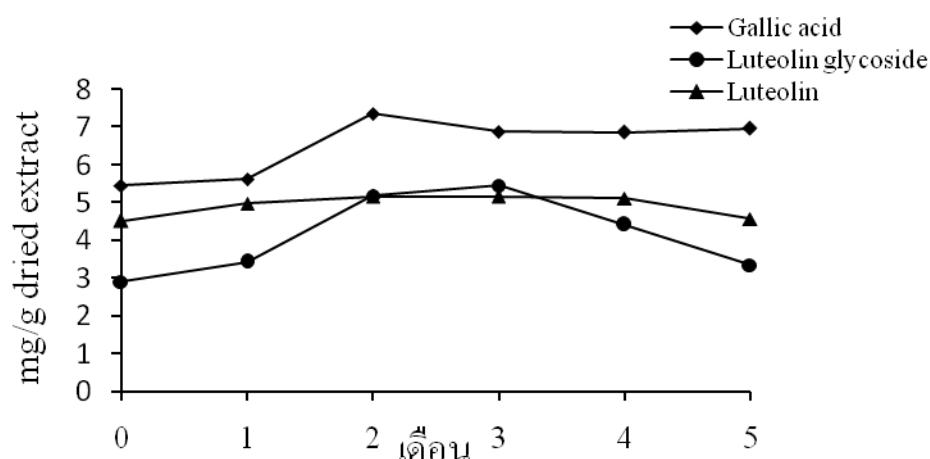
ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์คำนวณจาก % recovery ผลการศึกษาความถูกต้องในสารสกัดเมล็ดลำพูที่สกัดด้วย 70% MeOH (n = 3) (ตารางที่ 7) คำนวณ % recovery ได้ 105.05-106.58 % มีค่า % RSD เท่ากับ 0.03-0.80 ผลการศึกษาความถูกต้องในสารสกัดเมล็ดลำพูที่สกัดด้วย 70% EtOH (n = 3) (ตารางที่ 8) คำนวณ % recovery ได้ 105.12-106.70 % มีค่า % RSD เท่ากับ 0.19-0.94 และผลการศึกษาความถูกต้องในสารสกัดเมล็ดลำพูที่สกัดด้วย 100% H₂O (n = 3) (ตารางที่ 8) คำนวณ % recovery ได้ 105.26-106.89 % มีค่า % RSD เท่ากับ 0.13-0.80 แสดงว่าวิธีวิเคราะห์นี้ให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง

11. การศึกษาความคงตัวของสารสกัดจากลำพู

จากการเตรียมสารสกัดเมล็ดลำพู โดยการสกัดด้วย 70% MeOH เป็นระยะเวลานาน 30 นาที จากนั้นจึงนำมาระเหยตัวทำละลายออกไปด้วย rotary evaporator จนได้สารสกัดที่แห้งและนำมาชั่งน้ำหนัก นำสารสกัดเมล็ดลำพูที่ได้มาศึกษาความคงตัวที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน ได้แก่ -80, 4, 25 และ 45 องศาเซลเซียส โดยเก็บไว้เป็นเวลานาน 1, 2, 3, 4 และ 5 เดือน จากนั้นจึงนำสารสกัดเมล็ดลำพูที่เก็บไว้ในสภาวะต่าง ๆ กันมาวิเคราะห์หาปริมาณ gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin โดยเปรียบเทียบกับปริมาณของสารสำคัญ 3 ชนิดดังกล่าวในสารสกัดที่เตรียมเสร็จใหม่ ๆ จากการทดลองแสดงความเข้มข้นของสารสำคัญ (gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin) ในสารสกัดเมล็ดลำพู (mg/g dried extract) หลังจากที่ได้เตรียมเสร็จทันที และที่เก็บไว้ นาน 1, 2, 3, 4 และ 5 เดือน โดยเก็บไว้ที่ -80, 4, 25 และ 45 องศาเซลเซียส ดังตารางที่ 21-24 ทั้งนี้ได้แสดง ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสำคัญในสารสกัดเมล็ดลำพู ในสภาวะต่างๆ ดังรูปที่ 22-25

ตารางที่ 21 ความเข้มข้นของสารสำคัญ (mg/g dried extract) จำนวน 3 ชนิด คือ gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin ในสารสกัดเมล็ดลำพูที่สกัดด้วย 70% MeOH หลังจากที่ได้เตรียมเสร็จทันที และเก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1, 2, 3, 4 และ 5 เดือน

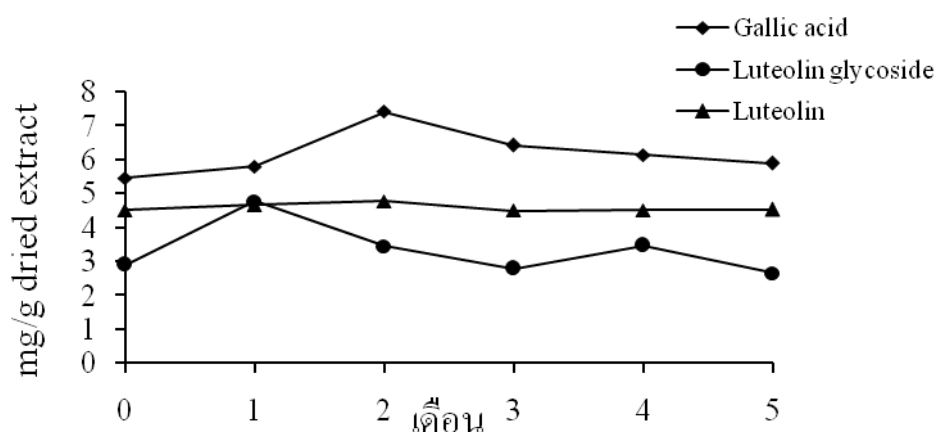
เดือน	ความเข้มข้นของสารสำคัญ (mg/g dried extract)					
	Gallic acid	SD	Luteolin-7-O-glucoside	SD	Luteolin	SD
0	5.46	0.40	2.91	0.40	4.51	0.05
1	5.62	0.35	3.43	0.23	4.98	0.02
2	7.35	0.30	5.18	0.31	5.17	0.07
3	6.89	0.51	5.46	0.38	5.16	0.17
4	6.87	0.16	4.42	0.61	5.11	0.07
5	6.97	0.44	3.35	0.50	4.58	0.04



รูปที่ 22 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสำคัญ (mg/g dried extract) จำนวน 3 ชนิด คือ gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin ในสารสกัดเมล็ดลำพูที่สกัดด้วย 70% MeOH หลังจากที่ได้เตรียมเสร็จทันที และเก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1, 2, 3, 4 และ 5 เดือน เมื่อ y คือความเข้มข้น (mg/g dried extract) ของ gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin และ x คือ ระยะเวลา (เดือน)

ตารางที่ 22 ความเข้มข้นของสารสำคัญ (mg/g dried extract) จำนวน 3 ชนิด คือ gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin ในสารสกัดเมล็ดลำพูที่สกัดด้วย 70% MeOH หลังจากที่ได้เตรียมเสร็จทันที และเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1, 2, 3, 4 และ 5 เดือน

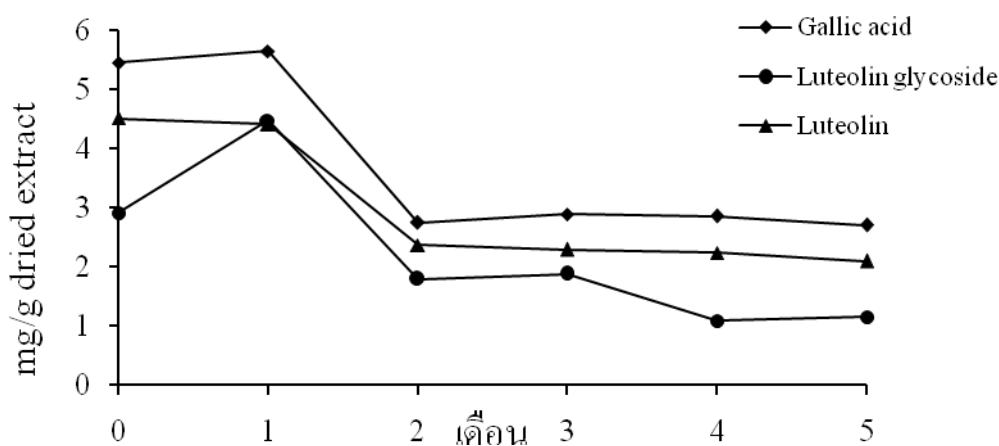
เดือน	ความเข้มข้นของสารสำคัญ (mg/g dried extract)					
	Gallic acid	SD	Luteolin-7-O-glucoside	SD	Luteolin	SD
0	5.46	0.40	2.91	0.40	4.51	0.05
1	5.81	0.24	4.79	0.65	4.66	0.09
2	7.42	0.35	3.46	0.23	4.78	0.06
3	6.44	0.22	2.80	0.46	4.50	0.04
4	6.14	0.16	3.48	0.09	4.51	0.07
5	5.89	0.32	2.66	0.81	4.54	0.08



รูปที่ 23 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสำคัญ (mg/g dried extract) จำนวน 3 ชนิด คือ gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin ในสารสกัดเมล็ดลำพูที่สกัดด้วย 70% MeOH หลังจากที่ได้เตรียมเสร็จทันที และเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1, 2, 3, 4 และ 5 เดือน เมื่อ y คือความเข้มข้น (mg/g dried extract) ของ gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin และ x คือ ระยะเวลา (เดือน)

ตารางที่ 23 ความเข้มข้นของสารสำคัญ (mg/g dried extract) จำนวน 3 ชนิด คือ gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin ในสารสกัดเมล็ดลำพูที่สกัดด้วย 70% MeOH หลังจากที่ได้เตรียมเสร็จทันที และเก็บไว้ที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1, 2, 3, 4 และ 5 เดือน

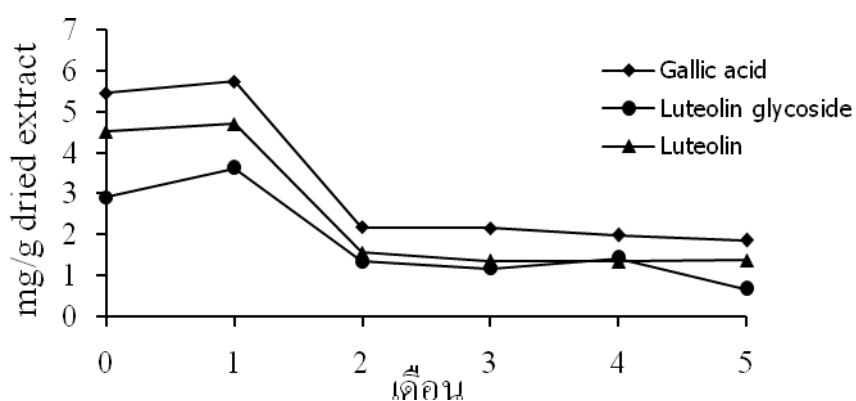
เดือน	ความเข้มข้นของสารสำคัญ (mg/g dried extract)					
	Gallic acid	SD	Luteolin-7-O-glucoside	SD	Luteolin	SD
0	5.46	0.40	2.91	0.40	4.51	0.05
1	5.65	0.13	4.48	0.79	4.41	0.10
2	2.74	0.03	1.79	0.13	2.37	0.02
3	2.89	0.09	1.88	0.05	2.29	0.08
4	2.86	0.10	1.08	0.03	2.23	0.02
5	2.70	0.03	1.15	0.21	2.10	0.03



รูปที่ 24 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสำคัญ (mg/g dried extract) จำนวน 3 ชนิด คือ gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin ในสารสกัดเมล็ดลำพูที่สกัดด้วย 70% MeOH หลังจากที่ได้เตรียมเสร็จทันที และเก็บไว้ที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1, 2, 3, 4 และ 5 เดือน เมื่อ y คือความเข้มข้น (mg/g dried extract) ของ gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin และ x คือ ระยะเวลา (เดือน)

ตารางที่ 24 ความเข้มข้นของสารสำคัญ (mg/g dried extract) จำนวน 3 ชนิด คือ gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin ในสารสกัดเมล็ดลำพูที่สกัดด้วย 70% MeOH หลังจากที่ได้เตรียมเสร็จทันที และเก็บไว้ที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1, 2, 3, 4 และ 5 เดือน

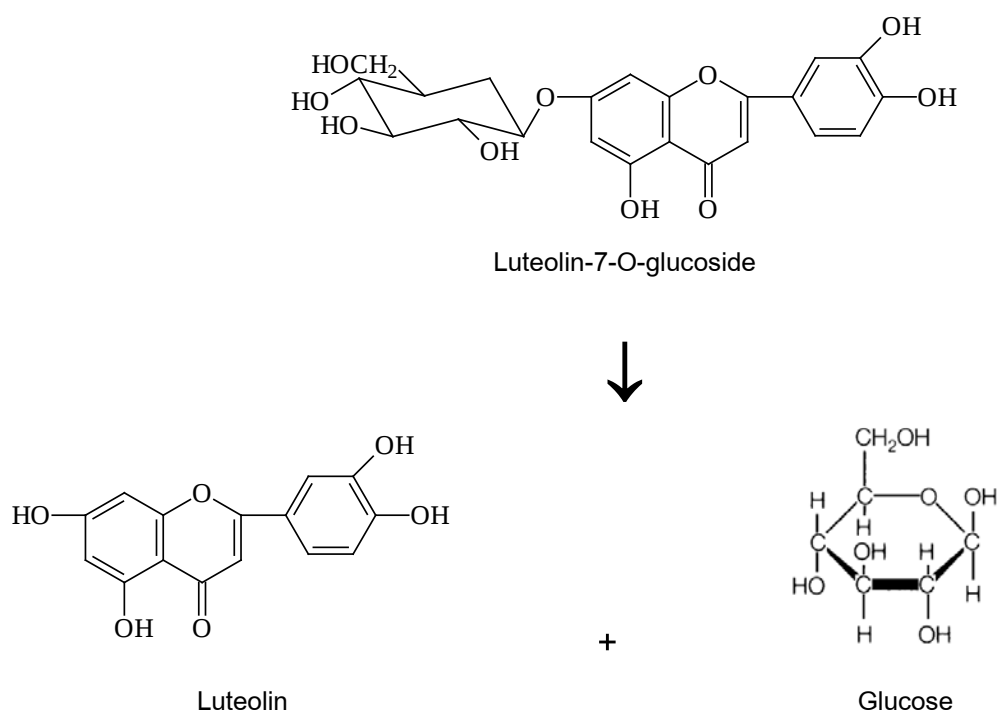
เดือน	ความเข้มข้นของสารสำคัญ (mg/g dried extract)					
	Gallic acid	SD	Luteolin-7-O-glucoside	SD	Luteolin	SD
0	5.46	0.40	2.91	0.40	4.51	0.05
1	5.74	0.20	4.25	0.41	4.62	0.18
2	2.18	0.01	1.35	0.13	1.57	0.03
3	2.16	0.05	1.18	0.13	1.37	0.01
4	1.99	0.02	1.43	0.04	1.35	0.01
5	1.75	0.01	1.39	0.11	1.37	0.02



รูปที่ 25 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสำคัญ (mg/g dried extract) จำนวน 3 ชนิด คือ gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin ในสารสกัดเมล็ดลำพูที่สกัดด้วย 70% MeOH หลังจากที่ได้เตรียมเสร็จทันที และเก็บไว้ที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1, 2, 3, 4 และ 5 เดือน เมื่อ y คือความเข้มข้น (mg/g dried extract) ของ gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin และ x คือ ระยะเวลา (เดือน)

จากรูปที่ 22-25 เป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสำคัญ (mg/g dried extract) จำนวน 3 ชนิด คือ gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin ในสารสกัดเมล็ดลำพูที่สกัดด้วย 70% MeOH หลังจากเตรียมเสร็จทันที และเก็บไว้เป็นระยะเวลา 1, 2, 3, 4 และ 5 เดือน ที่อุณหภูมิ -80, 4, 25 และ 45 องศาเซลเซียส เมื่อ y คือความเข้มข้น (mg/g dried extract) ของ gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin และ x คือ ระยะเวลา (เดือน) พบว่าในช่วงที่เตรียมสารสกัดเสร็จใหม่ ๆ ไปจนถึงการเก็บสารสกัดไว้เป็นระยะเวลานานถึง 5 เดือน ที่อุณหภูมิ -80, 4, 25 และ 45 องศาเซลเซียส มีความเข้มข้นของ gallic acid > luteolin > luteolin-7-O-glucoside ดังรูปที่ 22-25 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาการเก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิสูงคือ 25 และ 45 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อเก็บสารสกัดไว้นาน 2 เดือน ความเข้มข้นของสารสำคัญทั้ง 3 ชนิดจะลดลงอย่างเห็นได้ชัด ดังรูปที่ 24 และ 25 ตามลำดับ หลังจากนั้นเมื่อเก็บไว้นาน 3-5 เดือน ความเข้มข้นของสารสำคัญทั้ง 3 ชนิดจะไม่ค่อยเปลี่ยนแปลงหรือลดลง ดังรูปที่ 24 และ 25 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาการเก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิต่ำคือ -80 และ 4 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อเก็บสารสกัดไว้นาน 2 เดือน ความเข้มข้นของสารสำคัญทั้ง 3 ชนิดจะไม่ค่อยเปลี่ยนแปลง ดังรูปที่ 22 และ 23 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการเก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิต่ำ (-80 และ 4 องศาเซลเซียส) จะส่งผลให้สารสำคัญ 3 ชนิด คือ gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin ในสารสกัดเมล็ดลำพูมีความคงตัวดีกว่าการเก็บไว้ที่อุณหภูมิสูง (25 และ 45 องศาเซลเซียส)

เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างทางเคมีของสารสำคัญ 3 ชนิด คือ gallic acid, luteolin-7-O-glucoside และ luteolin ดังรูปที่ 1 และปฏิกิริยาการสลายตัวของ luteolin-7-O-glucoside ไปเป็น luteolin และ glucose ดังรูปที่ 26 จึงคาดได้ว่าความเข้มข้นที่ลดลงของ luteolin-7-O-glucoside อาจมีส่วนเพิ่มความเข้มข้นของ luteolin ในสารสกัดเมล็ดลำพูได้ จึงส่งผลให้ความเข้มข้นของ luteolin ในช่วงเดือนที่ 2-5 ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิสูง (25 และ 45 องศาเซลเซียส) มักไม่ค่อยมีการเปลี่ยนแปลง ดังรูปที่ 24 และ 25 ตามลำดับ ในขณะที่ความเข้มข้นของ luteolin-7-O-glucoside ในช่วงเดือนที่ 2-5 ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิสูง (25 และ 45 องศาเซลเซียส) มีแนวโน้มลดลงดังรูปที่ 24 และ 25 ตามลำดับ โดยเฉพาะในช่วงเดือนที่ 2-5 ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ดังรูปที่ 24 จะเห็นการลดลงของ luteolin-7-O-glucoside ได้อย่างชัดเจน ในขณะที่ความเข้มข้นของ luteolin ไม่ค่อยมีการเปลี่ยนแปลง



รูปที่ 26 ปฏิกิริยาการสลายตัวของ luteolin-7-O-glucoside ได้เป็น luteolin และ glucose

12. การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของโลหะหนักในส่วนต่าง ๆ ของลำพู

ทำการวิเคราะห์โลหะหนัก 11 ชนิด ได้แก่ อลูมิเนียม (Al) โครเมียม (Cr) แมงกานีส (Mn) เหล็ก (Fe) นิกเกิล (Ni) ทองแดง (Cu) สังกะสี (Zn) อาร์ซีนิก (As) แคดเมียม (Cd)ปรอท (Hg) และตะกั่ว (Pb) ในส่วนต่าง ๆ ของลำพู เช่น เมล็ด รากอากาศ เกสร กลีบเลี้ยง ใบ และผล ที่สุ่มเก็บตัวอย่างจากจังหวัดนครปฐม สมุทรสงคราม จะเชิงเตรา จันทบุรี สมุทรปราการ และนครศรีธรรมราช ผลการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของโลหะหนัก 11 ชนิด ได้แก่ อลูมิเนียม (Al) โครเมียม (Cr) แมงกานีส (Mn) เหล็ก (Fe) นิกเกิล (Ni) ทองแดง (Cu) สังกะสี (Zn) อาร์ซีนิก (As) แคดเมียม (Cd) ปรอท (Hg) และตะกั่ว (Pb) ในส่วนต่าง ๆ ของลำพู เช่นเมล็ด รากอากาศ เกสร กลีบเลี้ยง ใบ และผล แสดงไว้ในตารางที่ 25-35

ตารางที่ 25 ความเข้มข้นของโลหะหนักในเมล็ด รากอากาศ และเกสร ของลำพู จากจังหวัดนครปฐม

โลหะหนัก	เมล็ดลำพู (นครปฐม)		รากอากาศลำพู (นครปฐม)		เกสรลำพู (นครปฐม)	
	mg/kg	%RSD	mg/kg	%RSD	mg/kg	%RSD
Al	7.672	0.007	12.620	0.014	9.172	0.011
Cr	0.010	0.014	0.182	0.006	0.002	0.001
Mn	19.513	0.011	12.745	0.007	60.230	0.006
Fe	27.907	0.016	16.568	0.041	12.735	0.003
Ni	6.614	0.010	1.462	0.005	0.298	0.003
Cu	0.887	0.005	0.788	0.005	1.040	0.001
Zn	0.131	0.025	0.530	0.018	0.279	0.006
(100 mg/kg)	ต่ำกว่าเกณฑ์		ต่ำกว่าเกณฑ์		ต่ำกว่าเกณฑ์	
As	0.005	0.001	0.008	0.001	0.003	0.001
(4 mg/kg)	ต่ำกว่าเกณฑ์		ต่ำกว่าเกณฑ์		ต่ำกว่าเกณฑ์	
Cd	ND	ND	ND	ND	ND	ND
(0.3 mg/kg)	ต่ำกว่าเกณฑ์		ต่ำกว่าเกณฑ์		ต่ำกว่าเกณฑ์	
Hg	ND	ND	ND	ND	ND	ND
(0.5 mg/kg)	ต่ำกว่าเกณฑ์		ต่ำกว่าเกณฑ์		ต่ำกว่าเกณฑ์	
Pb	ND	ND	ND	ND	ND	ND
(10 mg/kg)	ต่ำกว่าเกณฑ์		ต่ำกว่าเกณฑ์		ต่ำกว่าเกณฑ์	

ND = Nondectected

ตารางที่ 26 ความเข้มข้นของโลหะหนักในกลีบเลี้ยง ใบ และผล ของลำพู จากจังหวัดนครปฐม

โลหะหนัก	กลีบเลี้ยงลำพู (นครปฐม)		ใบลำพู (นครปฐม)		ผลลำพู (นครปฐม)	
	mg/kg	%RSD	mg/kg	%RSD	mg/kg	%RSD
Al	14.847	0.005	36.971	0.003	9.806	0.003
Cr	0.017	0.010	0.054	0.001	0.006	0.002
Mn	12.086	0.003	50.167	0.015	54.819	0.003
Fe	26.410	0.009	35.721	0.008	16.351	0.004
Ni	0.282	0.005	0.250	0.004	0.120	0.015
Cu	0.696	0.005	0.493	0.009	0.828	0.013
Zn (100 mg/kg)	0.103 ต่ำกว่าเกณฑ์	0.002	0.364 ต่ำกว่าเกณฑ์	0.008	ND ต่ำกว่าเกณฑ์	ND
As (4 mg/kg)	0.003 ต่ำกว่าเกณฑ์	0.002	ND ต่ำกว่าเกณฑ์	ND	ND ต่ำกว่าเกณฑ์	ND
Cd (0.3 mg/kg)	ND ต่ำกว่าเกณฑ์	ND	ND ต่ำกว่าเกณฑ์	ND	ND ต่ำกว่าเกณฑ์	ND
Hg (0.5 mg/kg)	0.032 ต่ำกว่าเกณฑ์	0.005	0.064 ต่ำกว่าเกณฑ์	0.001	ND ต่ำกว่าเกณฑ์	ND
Pb (10 mg/kg)	ND ต่ำกว่าเกณฑ์	ND	ND ต่ำกว่าเกณฑ์	ND	ND ต่ำกว่าเกณฑ์	ND

ND = Nondectected

ตารางที่ 27 ความเข้มข้นของโลหะหนักในเมล็ด รากอากาศ และเกสร ของลำพู จากจังหวัดสมุทรสงคราม

โลหะหนัก	เมล็ดลำพู (สมุทรสงคราม)		รากอากาศลำพู (สมุทรสงคราม)		เกสรลำพู (สมุทรสงคราม)	
	mg/kg	%RSD	mg/kg	%RSD	mg/kg	%RSD
Al	20.077	0.007	67.891	0.010	43.266	0.008
Cr	0.050	0.004	0.243	0.002	0.065	0.005
Mn	94.961	0.074	88.209	0.009	64.651	0.015
Fe	58.391	0.007	49.848	0.004	61.596	0.017
Ni	1.763	0.016	2.683	0.012	0.988	0.010
Cu	1.233	0.005	0.499	0.004	0.896	0.019
Zn (100 mg/kg)	0.133 ต่ำกว่าเกณฑ์	0.016	0.293 ต่ำกว่าเกณฑ์	0.004	0.113 ต่ำกว่าเกณฑ์	0.019
As (4 mg/kg)	ND ต่ำกว่าเกณฑ์	ND	ND ต่ำกว่าเกณฑ์	ND	0.002 ต่ำกว่าเกณฑ์	0.001
Cd (0.3 mg/kg)	ND ต่ำกว่าเกณฑ์	ND	ND ต่ำกว่าเกณฑ์	ND	ND ต่ำกว่าเกณฑ์	ND
Hg (0.5 mg/kg)	ND ต่ำกว่าเกณฑ์	ND	0.028 ต่ำกว่าเกณฑ์	0.005	ND ต่ำกว่าเกณฑ์	ND
Pb (10 mg/kg)	ND ต่ำกว่าเกณฑ์	ND	ND ต่ำกว่าเกณฑ์	ND	ND ต่ำกว่าเกณฑ์	ND

ND = Non detected

ตารางที่ 28 ความเข้มข้นของโลหะหนักในใบ และผล ของลำพูจากจังหวัดสมุทรสงคราม

โลหะหนัก	ใบลำพู (สมุทรสงคราม)		ผลลำพู (สมุทรสงคราม)	
	mg/kg	%RSD	mg/kg	%RSD
Al	34.083	0.009	3.435	0.005
Cr	0.091	0.028	0.131	0.004
Mn	34.644	0.007	21.757	0.007
Fe	61.390	0.013	12.831	0.003
Ni	13.481	0.009	0.267	0.011
Cu	1.816	0.011	0.702	0.002
Zn (100 mg/kg)	ND ต่ำกว่าเกณฑ์	ND	0.101 ต่ำกว่าเกณฑ์	0.001
As (4 mg/kg)	0.003 ต่ำกว่าเกณฑ์	0.001	0.003 ต่ำกว่าเกณฑ์	0.004
Cd (0.3 mg/kg)	ND ต่ำกว่าเกณฑ์	ND	ND ต่ำกว่าเกณฑ์	ND
Hg (0.5 mg/kg)	0.053 ต่ำกว่าเกณฑ์	0.001	ND ต่ำกว่าเกณฑ์	ND
Pb (10 mg/kg)	ND ต่ำกว่าเกณฑ์	ND	ND ต่ำกว่าเกณฑ์	ND

ND = Nondectected

ตารางที่ 29 ความเข้มข้นของโลหะหนักในใบ เกสร และรากอากาศ ของลำพู จากจังหวัดฉะเชิงเทรา

โลหะหนัก	ใบลำพู (ฉะเชิงเทรา)		เกสรลำพู (ฉะเชิงเทรา)		รากอากาศลำพู (ฉะเชิงเทรา)	
	mg/kg	%RSD	mg/kg	%RSD	mg/kg	%RSD
Al	27.594	0.007	4.377	0.007	34.928	0.021
Cr	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Mn	9.641	0.008	24.103	0.007	16.725	0.006
Fe	25.707	0.008	20.857	0.004	24.389	0.009
Ni	0.816	0.008	25.398	0.002	0.270	0.023
Cu	0.428	0.002	0.512	0.006	0.261	0.005
Zn (100 mg/kg)	0.355 ต่ำกว่าเกณฑ์	0.001	0.518 ต่ำกว่าเกณฑ์	0.007	0.444 ต่ำกว่าเกณฑ์	0.006
As (4 mg/kg)	0.070 ต่ำกว่าเกณฑ์	0.010	0.059 ต่ำกว่าเกณฑ์	0.008	0.110 ต่ำกว่าเกณฑ์	0.024
Cd (0.3 mg/kg)	ND ต่ำกว่าเกณฑ์	ND	ND ต่ำกว่าเกณฑ์	ND	ND ต่ำกว่าเกณฑ์	ND
Hg (0.5 mg/kg)	0.040 ต่ำกว่าเกณฑ์	0.013	ND ต่ำกว่าเกณฑ์	ND	ND ต่ำกว่าเกณฑ์	ND
Pb (10 mg/kg)	ND ต่ำกว่าเกณฑ์	ND	ND ต่ำกว่าเกณฑ์	ND	ND ต่ำกว่าเกณฑ์	ND

ND = Non detected

ตารางที่ 30 ความเข้มข้นของโลหะหนักในกลีบเลี้ยงกับผลอ่อนของลำพู จากจังหวัดฉะเชิงเทรา

โลหะหนัก	กลีบเลี้ยงกับผลอ่อนของลำพู (ฉะเชิงเทรา)	
	mg/kg	%RSD
Al	9.936	0.010
Cr	ND	ND
Mn	85.456	0.015
Fe	8.789	0.012
Ni	3.944	0.005
Cu	0.495	0.005
Zn	0.379	0.008
(100 mg/kg)	ต่ำกว่าเกณฑ์	
As	0.005	0.001
(4 mg/kg)	ต่ำกว่าเกณฑ์	
Cd	ND	ND
(0.3 mg/kg)	ต่ำกว่าเกณฑ์	
Hg	ND	ND
(0.5 mg/kg)	ต่ำกว่าเกณฑ์	
Pb	ND	ND
(10 mg/kg)	ต่ำกว่าเกณฑ์	

ND = Non detected

ตารางที่ 31 ความเข้มข้นของโลหะหนักในใบ เกสร และรากอากาศ ของลำพู จากจังหวัดจันทบุรี

โลหะหนัก	ใบลำพู (จันทบุรี)		เกสรลำพู (จันทบุรี)		รากอากาศลำพู (จันทบุรี)	
	mg/kg	%RSD	mg/kg	%RSD	mg/kg	%RSD
Al	14.973	0.004	4.387	0.009	12.536	0.006
Cr	ND	ND	ND	ND	0.108	0.007
Mn	45.913	0.010	20.058	0.007	13.569	0.005
Fe	34.748	0.008	14.793	0.004	48.651	0.009
Ni	0.118	0.012	0.219	0.003	38.355	0.025
Cu	0.296	0.007	0.447	0.005	0.465	0.007
Zn (100 mg/kg)	0.241 ต่ำกว่าเกณฑ์	0.008	0.394 ต่ำกว่าเกณฑ์	0.016	0.318 ต่ำกว่าเกณฑ์	0.003
As (4 mg/kg)	0.217 ต่ำกว่าเกณฑ์	0.019	0.057 ต่ำกว่าเกณฑ์	0.002	0.008 ต่ำกว่าเกณฑ์	0.001
Cd (0.3 mg/kg)	ND ต่ำกว่าเกณฑ์	ND	ND ต่ำกว่าเกณฑ์	ND	ND ต่ำกว่าเกณฑ์	ND
Hg (0.5 mg/kg)	ND ต่ำกว่าเกณฑ์	ND	ND ต่ำกว่าเกณฑ์	ND	ND ต่ำกว่าเกณฑ์	ND
Pb (10 mg/kg)	ND ต่ำกว่าเกณฑ์	ND	ND ต่ำกว่าเกณฑ์	ND	ND ต่ำกว่าเกณฑ์	ND

ND = Nondectected

ตารางที่ 32 ความเข้มข้นของโลหะหนักในกลีบเลี้ยง และกลีบเลี้ยงกับผลอ่อน ของลำพู จากจังหวัดจันทบุรี

โลหะหนัก	กลีบเลี้ยงลำพู (จันทบุรี)		กลีบเลี้ยงกับผลอ่อนลำพู (จันทบุรี)	
	mg/kg	%RSD	mg/kg	%RSD
Al	5.468	0.013	42.265	0.013
Cr	ND	ND	ND	ND
Mn	14.385	0.017	39.306	0.002
Fe	26.663	0.011	46.200	0.006
Ni	7.123	0.010	15.673	0.015
Cu	0.491	0.004	0.284	0.004
Zn (100 mg/kg)	0.204	0.006	0.246	0.007
As (4 mg/kg)	0.085	0.017	0.004	0.001
Cd (0.3 mg/kg)	ND ต่ำกว่าเกณฑ์	ND	ND ต่ำกว่าเกณฑ์	ND
Hg (0.5 mg/kg)	ND ต่ำกว่าเกณฑ์	ND	ND ต่ำกว่าเกณฑ์	ND
Pb (10 mg/kg)	ND ต่ำกว่าเกณฑ์	ND	ND ต่ำกว่าเกณฑ์	ND

ND = Nondectected

ตารางที่ 33 ความเข้มข้นของโลหะหนักในเมล็ด และรากอากาศ ของลำพู จากจังหวัดสมุทรปราการ

โลหะหนัก	เมล็ดลำพู (สมุทรปราการ)		รากอากาศลำพู (สมุทรปราการ)	
	mg/kg	%RSD	mg/kg	%RSD
Al	7.964	0.006	13.225	0.008
Cr	0.090	0.015	ND	ND
Mn	47.509	0.008	20.890	0.025
Fe	25.164	0.005	30.207	0.005
Ni	0.975	0.012	2.089	0.006
Cu	0.415	0.018	0.215	0.003
Zn	0.333	0.005	0.221	0.003
(100 mg/kg)	ต่ำกว่าเกณฑ์		ต่ำกว่าเกณฑ์	
As	0.029	0.005	0.035	0.001
(4 mg/kg)	ต่ำกว่าเกณฑ์		ต่ำกว่าเกณฑ์	
Cd	ND	ND	ND	ND
(0.3 mg/kg)	ต่ำกว่าเกณฑ์		ต่ำกว่าเกณฑ์	
Hg	0.025	0.003	ND	ND
(0.5 mg/kg)	ต่ำกว่าเกณฑ์		ต่ำกว่าเกณฑ์	
Pb	ND	ND	ND	ND
(10 mg/kg)	ต่ำกว่าเกณฑ์		ต่ำกว่าเกณฑ์	

ND = Non detected

ตารางที่ 34 ความเข้มข้นของโลหะหนักในใบ และผลอ่อน ของลำพู จากจังหวัดสมุทรปราการ

โลหะหนัก	ใบลำพู (สมุทรปราการ)		ผลอ่อนลำพู (สมุทรปราการ)	
	mg/kg	%RSD	mg/kg	%RSD
Al	5.147	0.007	3.278	0.003
Cr	ND	ND	ND	ND
Mn	24.890	0.008	16.394	0.008
Fe	17.207	0.020	14.936	0.007
Ni	0.791	0.009	0.139	0.003
Cu	0.863	0.003	0.583	0.003
Zn	0.269	0.004	0.376	0.003
(100 mg/kg)	ต่ำกว่าเกณฑ์		ต่ำกว่าเกณฑ์	
As	0.012	0.002	0.015	0.003
(4 mg/kg)	ต่ำกว่าเกณฑ์		ต่ำกว่าเกณฑ์	
Cd	ND	ND	ND	ND
(0.3 mg/kg)	ต่ำกว่าเกณฑ์		ต่ำกว่าเกณฑ์	
Hg	ND	ND	ND	ND
(0.5 mg/kg)	ต่ำกว่าเกณฑ์		ต่ำกว่าเกณฑ์	
Pb	ND	ND	ND	ND
(10 mg/kg)	ต่ำกว่าเกณฑ์		ต่ำกว่าเกณฑ์	

ND = Nondectected

ตารางที่ 35 ความเข้มข้นของโลหะหนักในใบ และรากอากาศ ของลำพู จากจังหวัดนครศรีธรรมราช

โลหะหนัก	ใบลำพู (นครศรีธรรมราช)		รากอากาศลำพู (นครศรีธรรมราช)	
	mg/kg	%RSD	mg/kg	%RSD
Al	10.918	0.005	31.092	0.019
Cr	ND	ND	ND	ND
Mn	11.361	0.004	68.515	0.004
Fe	22.745	0.002	12.945	0.014
Ni	0.927	0.012	6.685	0.007
Cu	1.479	0.010	0.718	0.020
Zn	0.214	0.003	ND	ND
(100 mg/kg)			ต่ำกว่าเกณฑ์	
As	0.051	0.010	0.069	0.009
(4 mg/kg)	ต่ำกว่าเกณฑ์		ต่ำกว่าเกณฑ์	
Cd	ND	ND	ND	ND
(0.3 mg/kg)	ต่ำกว่าเกณฑ์		ต่ำกว่าเกณฑ์	
Hg	ND	ND	ND	ND
(0.5 mg/kg)	ต่ำกว่าเกณฑ์		ต่ำกว่าเกณฑ์	
Pb	ND	ND	ND	ND
(10 mg/kg)	ต่ำกว่าเกณฑ์		ต่ำกว่าเกณฑ์	

ND = Nondectected

จากเกณฑ์มาตรฐานโลหะหนักขององค์การอนามัยโลก (World Health Organization, WHO) ได้กำหนดปริมาณสูงสุดของธาตุที่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ในวัตถุดิบพืชสมุนไพร เช่น สารหนู (As) ตะกั่ว (Pb) และ แคดเมียม (Cd) ที่ระดับ 1.0, 10 และ 0.3 mg/kg ตามลำดับ สำหรับในประเทศไทยผลิตภัณฑ์สมุนไพรทั้งที่เป็นยาแผนโบราณ ยาทางเลือก ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร และเครื่องสำอาง ระบุปริมาณสูงสุดที่ยอมรับของโลหะหนัก 3 ชนิด คือ ตะกั่ว (Pb) แคดเมียม (Cd) และสารหนู (As) ไม่เกิน 10, 0.3 และ 20 mg/kg ของผลิตภัณฑ์ ซึ่งเป็นปริมาณสูงสุดที่มีโอกาสก่อผลเสียต่อร่างกายของมนุษย์ ทั้งนี้กระทรวงสาธารณสุขของประเทศไทยได้มีประกาศฉบับที่ 98 (พ.ศ. 2529) เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน กำหนดปริมาณสูงสุดของ สารหนู (As) ตะกั่ว (Pb)ปรอท (Hg) สังกะสี (Zn) และดีบุก (Sn) ในวัตถุดิบพืชสมุนไพรไว้ที่ 2.0, 1.0, 0.5, 100 และ 250 mg/kg จากคู่มือผลิตภัณฑ์ยาจากสมุนไพรเพื่อเศรษฐกิจชุมชน สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ.2543 หน้า 67 กล่าวว่า การปนเปื้อนโลหะหนักอาจมาจากโลหะหนักที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อม และจากสารพิษตกค้างซึ่งมีโลหะหนักเป็นส่วนประกอบ ปัจจุบันยังไม่มีตำราयाที่รัฐมนตรีกระทรวงสาธารณสุขประกาศฉบับใด กำหนดมาตรฐานการปนเปื้อนโลหะหนัก อย่างไรก็ตามตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทยได้แนะนำไว้ดังนี้ สารหนู (As) ตะกั่ว (Pb) และแคดเมียม (Cd) ที่ระดับ 4, 10 และ 0.3 mg/kg ตามลำดับ สรุปเกณฑ์ปริมาณโลหะหนักสูงสุดไม่ควรเกินเกณฑ์ดังนี้ สารหนู (As) ไม่เกิน 4 mg/kg ตะกั่ว (Pb) ไม่เกิน 10 mg/kg แคดเมียม (Cd) ไม่เกิน 0.3 mg/kg ปรอท (Hg) ไม่เกิน 0.5 mg/kg และสังกะสี (Zn) ไม่เกิน 100 mg/kg

จากตารางที่ 25-35 แสดงผลการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของโลหะหนัก 11 ธาตุ ได้แก่ อลูมิเนียม (Al) โครเมียม (Cr) แมงกานีส (Mn) เหล็ก (Fe) นิกเกิล (Ni) ทองแดง (Cu) สังกะสี (Zn) อาร์ซีนิก (As) แคดเมียม (Cd) ปรอท (Hg) และตะกั่ว (Pb) ในส่วนต่าง ๆ ของลำพู เช่น เมล็ด รากอากาศ เกสร กลีบเลี้ยง ใบ และผล ที่สุ่มเก็บตัวอย่างจากจังหวัดนครปฐม สมุทรสงคราม จะเชิงเทรา จันทบุรี สมุทรปราการ และนครศรีธรรมราช พบว่าทุกตัวอย่างมีความเข้มข้นของโลหะหนัก 5 ธาตุอันตราย ได้แก่ สารหนู (As) ตะกั่ว (Pb) แคดเมียม (Cd) ปรอท (Hg) และสังกะสี (Zn) ต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานกำหนด ($As < 4 \text{ mg/kg}$, $Pb < 10 \text{ mg/kg}$, $Cd < 0.3 \text{ mg/kg}$, $Hg < 0.5 \text{ mg/kg}$ และ $Zn < 100 \text{ mg/kg}$) จึงคาดว่าส่วนต่าง ๆ ของลำพูค่อนข้างปลอดภัยจากโลหะหนักที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพร่างกาย การตรวจโลหะหนักต่างๆ ในสมุนไพรมีความจำเป็นเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค โดยเฉพาะหากมีการใช้ในระยะยาว

13. การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของโลหะหนักในสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของลำพู

ทำการวิเคราะห์โลหะหนัก 11 ชนิด ได้แก่ อลูมิเนียม (Al) โครเมียม (Cr) แมงกานีส (Mn) เหล็ก (Fe) นิกเกิล (Ni) ทองแดง (Cu) สังกะสี (Zn) อาร์ซีนิก (As) แคดเมียม (Cd)ปรอท (Hg) และตะกั่ว (Pb) ในสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของลำพู เช่น เมล็ด รากอากาศ เกสรตัวผู้ ที่หุ้มดอก ใบ ปีกผล และผล ตารางที่ 36 แสดงผลการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของโลหะหนัก 11 ชนิด ในสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของลำพู

จากเกณฑ์มาตรฐานโลหะหนักขององค์การอนามัยโลก (World Health Organization, WHO) ได้กำหนดปริมาณสูงสุดของธาตุที่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ในวัตถุดิบพืชสมุนไพร เช่น สารหนู (As) ตะกั่ว (Pb) และ แคดเมียม (Cd) ที่ระดับ 1.0, 10 และ 0.3 mg/kg ตามลำดับ สำหรับในประเทศไทยผลิตภัณฑ์สมุนไพรทั้งที่เป็นยาแผนโบราณ ยาทางเลือก ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร และเครื่องสำอาง ระบุปริมาณสูงสุดที่ยอมรับของโลหะหนัก 3 ชนิด คือ ตะกั่ว (Pb) แคดเมียม (Cd) และสารหนู (As) ไม่เกิน 10, 0.3 และ 20 mg/kg ของผลิตภัณฑ์ ซึ่งเป็นปริมาณสูงสุดที่มีโอกาสก่อผลเสียต่อร่างกายของมนุษย์ ทั้งนี้กระทรวงสาธารณสุขของประเทศไทยได้มีประกาศฉบับที่ 98 (พ.ศ. 2529) เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน กำหนดปริมาณสูงสุดของ สารหนู (As) ตะกั่ว (Pb) ปรอท (Hg) สังกะสี (Zn) และดีบุก (Sn) ในวัตถุดิบพืชสมุนไพรไว้ที่ 2.0, 1.0, 0.5, 100 และ 250 mg/kg จากคู่มือผลิตภัณฑ์ยาจากสมุนไพรเพื่อเศรษฐกิจชุมชน สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ.2543 หน้า 67 กล่าวว่า การปนเปื้อนโลหะหนักอาจมาจากโลหะหนักที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อม และจากสารพิษตกค้างซึ่งมีโลหะหนักเป็นส่วนประกอบ ปัจจุบันยังไม่มีตำราว่าที่รัฐมนตรีกระทรวงสาธารณสุขประกาศฉบับใด กำหนดมาตรฐานการปนเปื้อนโลหะหนัก อย่างไรก็ตามตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทยได้แนะนำไว้ดังนี้ สารหนู (As) ตะกั่ว (Pb) และแคดเมียม (Cd) ที่ระดับ 4, 10 และ 0.3 mg/kg ตามลำดับ สรุปเกณฑ์ปริมาณโลหะหนักสูงสุดไม่ควรเกินเกณฑ์ดังนี้ สารหนู (As) ไม่เกิน 4 mg/kg ตะกั่ว (Pb) ไม่เกิน 10 mg/kg แคดเมียม (Cd) ไม่เกิน 0.3 mg/kg ปรอท (Hg) ไม่เกิน 0.5 mg/kg และสังกะสี (Zn) ไม่เกิน 100 mg/kg

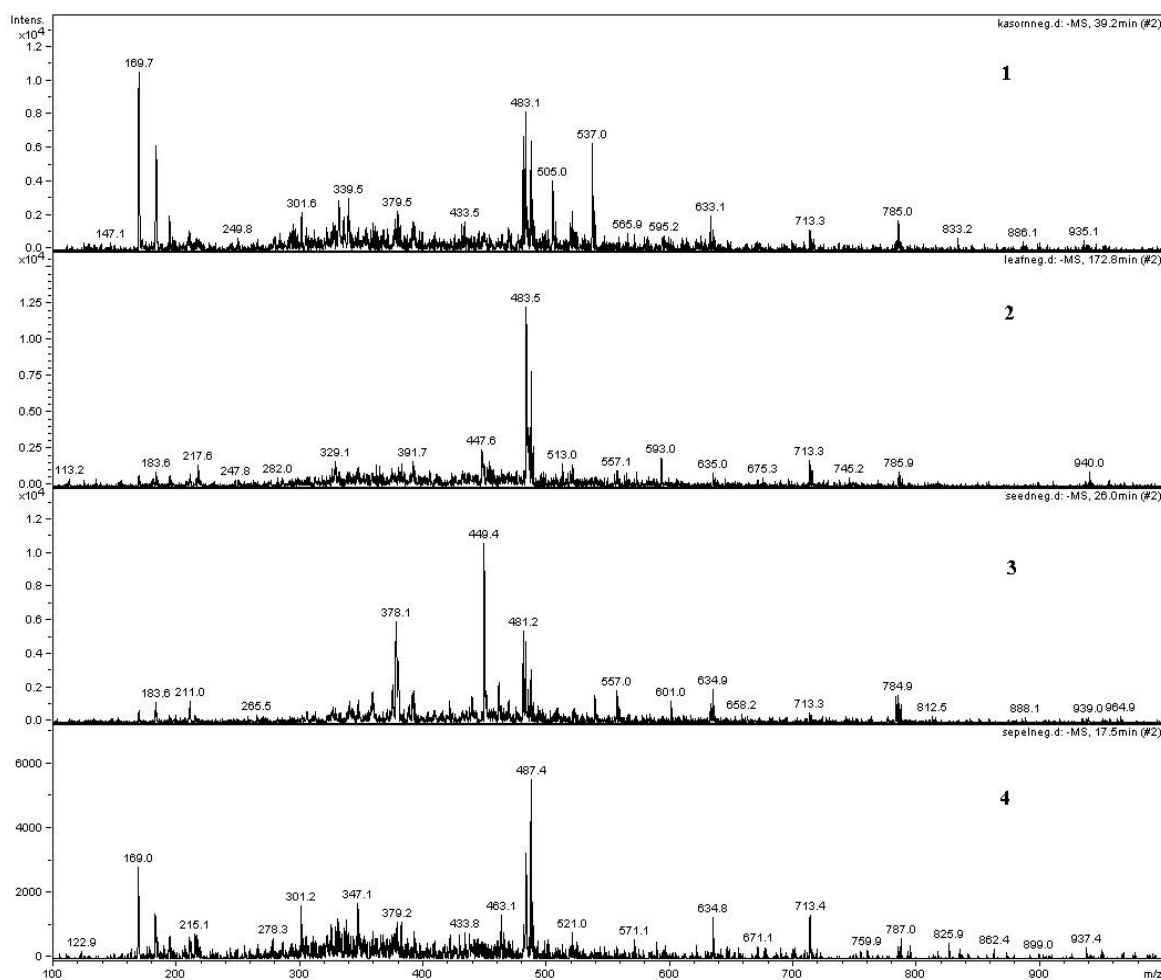
จากตารางที่ 36 แสดงผลการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของโลหะหนัก 11 ธาตุ ได้แก่ อลูมิเนียม (Al) โครเมียม (Cr) แมงกานีส (Mn) เหล็ก (Fe) นิกเกิล (Ni) ทองแดง (Cu) สังกะสี (Zn) อาร์ซีนิก (As) แคดเมียม (Cd) ปรอท (Hg) และตะกั่ว (Pb) ในสารสกัดส่วนต่าง ๆ ของลำพู ซึ่งจาก พบว่าทุกตัวอย่างมีความเข้มข้นของโลหะหนัก 5 ธาตุอันตราย ได้แก่ สารหนู (As) ตะกั่ว (Pb) แคดเมียม (Cd) ปรอท (Hg) และสังกะสี (Zn) ต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานกำหนด ($As < 4 \text{ mg/kg}$, $Pb < 10 \text{ mg/kg}$, $Cd < 0.3 \text{ mg/kg}$, $Hg < 0.5 \text{ mg/kg}$ และ $Zn < 100 \text{ mg/kg}$) จึงคาดว่าสารสกัดต่าง ๆ ของลำพูค่อนข้างปลอดภัยจากโลหะหนักที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพร่างกาย

ตารางที่ 36 ปริมาณโลหะหนักที่พบในสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของ ลำพู

สารสกัดต่างๆ จากส่วนต่างๆ ของ ลำพู	ความเข้มข้นธาตุต่างๆ (mg/kg)																					
	Al(27)		Cr(52)		Mn(55)		Fe(56)		Ni(58)		Cu(63)		Zn(66)		As(75)		Cd(111)		Hg(202)		Pb(208)	
	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าเฉลี่ย	SD
เกสรตัวผู้สกัดด้วยการต้มด้วยน้ำและ spray dry	11.1	0.2	0.0	0.1	50.7	3.4	102.1	18.2	3.1	0.4	14.3	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
เมล็ดสกัดด้วยการต้มด้วยน้ำและ spray dry	11.6	0.1	0.0	0.0	46.7	14.4	14.1	8.1	3.1	0.8	21.3	0.9	7.8	13.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
กลีบดอกสกัดด้วยการต้มด้วยน้ำและ spray dry	12.5	0.4	0.0	0.0	76.6	42.7	16.6	1.5	2.9	0.9	16.8	2.0	12.7	9.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
ใบสกัดด้วยการต้มด้วยน้ำและ spray dry	303.8	3.2	0.8	0.1	441.6	12.7	394.0	6.6	7.7	1.0	30.0	2.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	1.2	0.4
ผลสกัดด้วยการต้มด้วยน้ำและ spray dry	20.9	1.0	0.0	0.0	110.4	29.2	16.1	4.4	2.2	0.8	13.8	3.1	5.8	8.1	0.1	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
ปีกผลสกัดด้วยการต้มด้วยน้ำและ spray dry	16.0	0.1	0.0	0.0	29.6	1.0	23.6	0.3	2.5	0.6	20.4	0.8	22.0	1.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
รากอากาศสกัดด้วยการต้มด้วยน้ำและ spray dry	15.7	0.3	0.0	0.0	49.3	19.5	19.2	4.1	2.8	0.9	18.7	2.6	20.2	2.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
เกสรตัวผู้สกัดด้วย MeOH	64.1	12.9	0.6	0.6	48.7	6.1	63.3	42.8	9.6	7.1	5.6	7.0	0.0	0.0	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.5
เมล็ดสกัดด้วย MeOH	13.6	0.1	0.0	0.0	50.1	20.6	37.3	2.5	8.2	1.0	11.2	9.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.8
ที่หุ้มดอกสกัดด้วย MeOH	13.2	0.5	0.0	0.1	30.7	19.9	9.7	6.4	1.7	0.5	10.1	5.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
ใบสกัดด้วย MeOH	18.4	2.0	0.4	0.4	57.9	8.5	40.9	38.9	5.7	7.4	12.4	9.5	0.0	0.0	0.1	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.5
ผลสกัดด้วย MeOH	69.3	10.0	0.0	0.0	39.8	21.3	33.7	12.4	6.5	4.2	6.9	11.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.8	0.7
ปีกผลสกัดด้วย MeOH	44.7	0.6	0.1	0.1	20.8	24.2	7.0	8.0	1.8	0.5	7.2	6.1	4.7	8.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
รากอากาศสกัดด้วย MeOH	129.4	6.7	0.1	0.2	30.1	4.4	55.3	29.3	11.0	2.2	1.7	1.6	0.0	0.0	0.5	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.8
เกสรสกัดด้วย MeOH (soxhlet)	4.9	0.1	0.1	0.2	31.6	2.4	26.4	35.7	4.7	7.0	13.1	10.6	0.0	0.0	0.2	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.9
เมล็ดสกัดด้วย MeOH (soxhlet)	14.3	1.1	0.0	0.0	63.1	11.9	19.3	14.3	3.1	3.4	12.5	3.7	9.9	8.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
ที่หุ้มดอกสกัดด้วย MeOH (soxhlet)	5.6	0.7	0.0	0.0	37.4	9.8	9.8	5.6	0.9	0.3	17.7	3.1	4.7	8.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
ใบสกัดด้วย MeOH (soxhlet)	58.4	2.6	0.0	0.0	29.6	10.8	25.1	6.2	7.9	1.1	2.8	1.3	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.2
รากอากาศสกัดด้วย MeOH (soxhlet)	118.9	5.4	0.0	0.0	41.4	0.7	34.3	2.9	6.5	0.2	1.3	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0

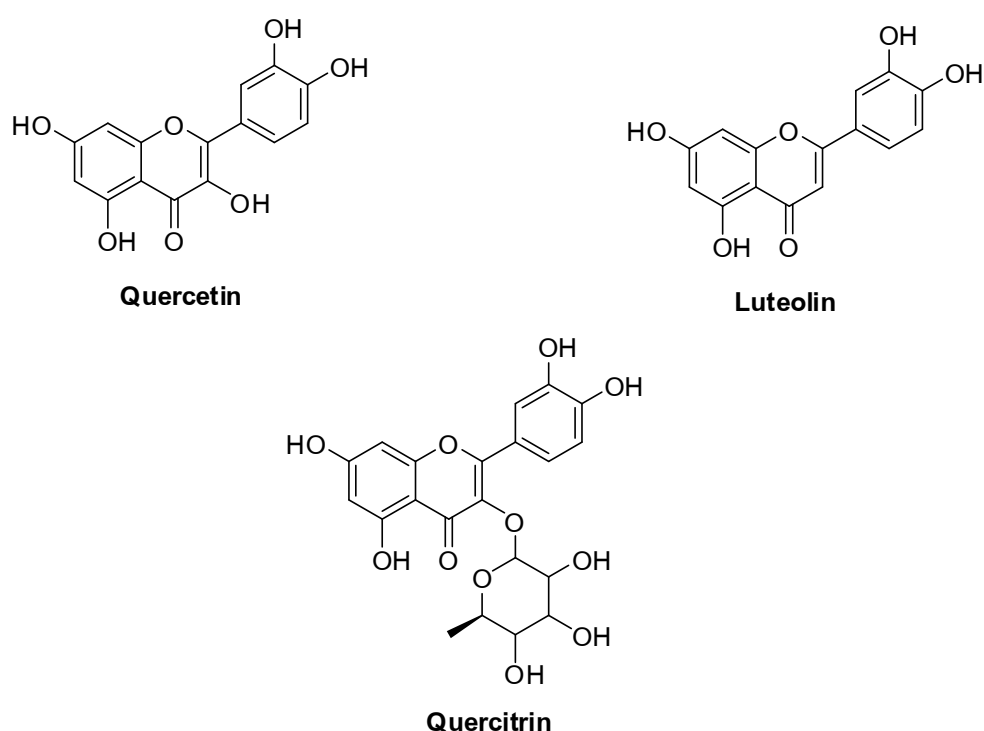
14. การศึกษา Chemical Fingerprint ของสารสำคัญในสารสกัดหยาบของลำพูด้วยเครื่อง ESI-MS โดยวิธี Direct injection

การศึกษา chemical fingerprint ของสารสำคัญในสารสกัดหยาบใน methanol จากส่วนต่างของลำพู (*S. caseolaris*) ได้แก่ สารสกัดจากเกสร, สารสกัดจากใบ สารสกัดจากเมล็ด และสารสกัดที่หุ้มดอกลำพู ด้วยเครื่อง LC-MS ด้วยวิธีการฉีดแบบ direct injection วิธีนี้สารจะถูกฉีดเข้าสู่เครื่อง mass spectroscopy โดยไม่ผ่าน column ทำให้ใช้สารปริมาณน้อยในการวิเคราะห์ และ ใช้เวลาในการวิเคราะห์ลดลง ใช้วิธีนี้ในการ screen เบื้องต้นในการศึกษา chemical fingerprint ของสารสำคัญในสารสกัดหยาบของลำพู โดยใช้ตัวอย่างเป็นสารสกัดหยาบจากส่วนต่างของลำพู (*S. caseolaris*) ที่ละลายใน 0.6% formic acid ใน methanol ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml โดยเลือกใช้ตัวตรวจวัด ชนิด negative ion mode ของเครื่อง mass spectroscopy เป็นตัวติดตามสารที่มีในสารสกัด ส่วนความดันของก๊าซ nitrogen ที่ใช้ในการทำให้เกิดละอองฝอย (nebulizer pressure) คือ 15 psi drying gas ที่ใช้มีอุณหภูมิ 325 องศาเซลเซียส และมีอัตราการไหล 5 ลิตร/นาที โดยโครมาโตแกรมแสดงการแยกของสารสกัดหยาบได้แสดงในรูปที่ 27



รูปที่ 27. Chromatograms จากเครื่อง ESI-LC-MS ของสารสกัดหยาบจากส่วนต่างของลำพู (*S. caseolaris*) ดังนี้ (1) สารสกัดจากเกสร, (2) สารสกัดจากใบ (3) สารสกัดจากเมล็ด (3) สารสกัดที่หุ้มดอกลำพู ที่เกิดจากการฉีดแบบ direct injection

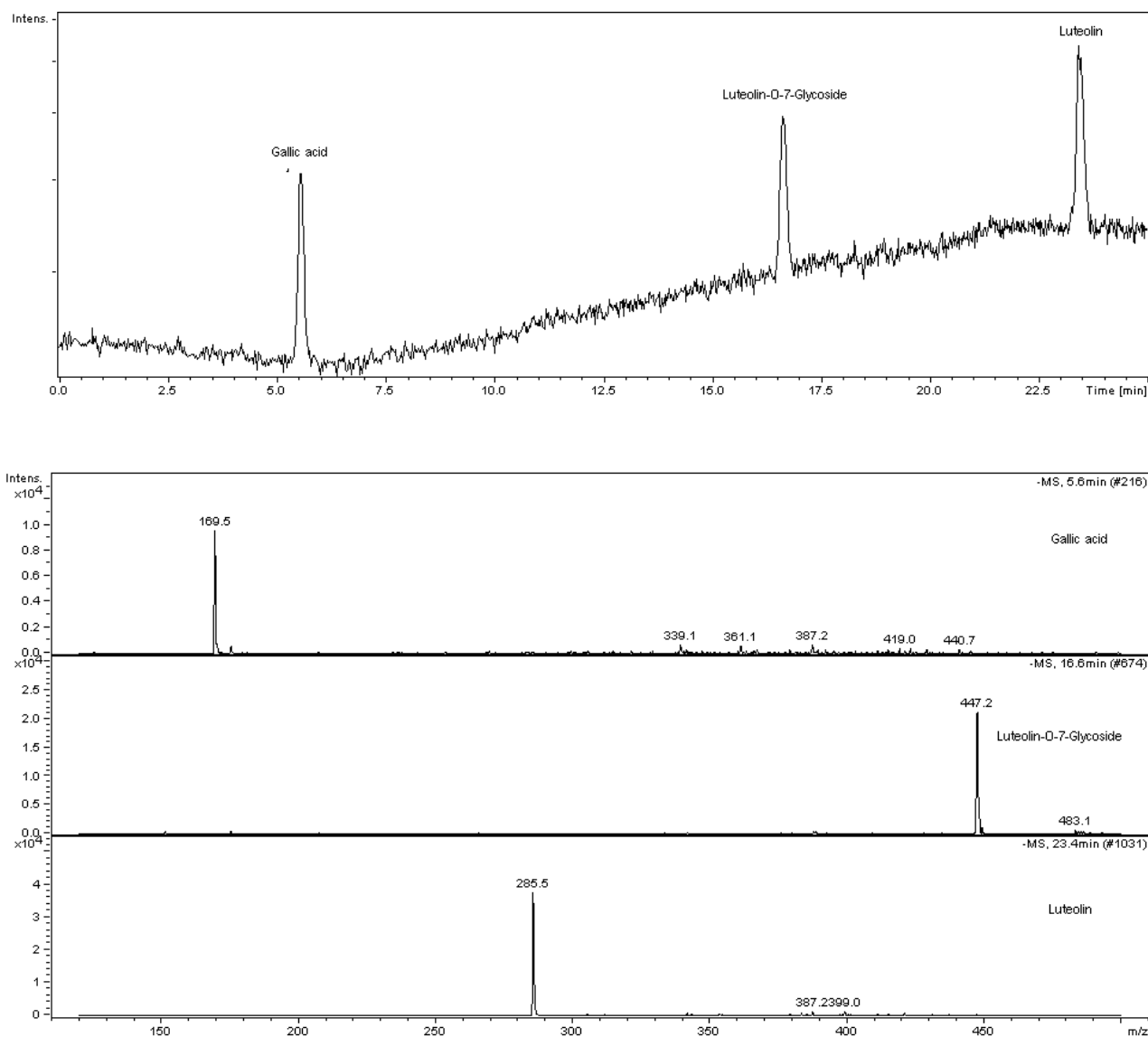
รูปที่ 27 เป็นโครมาโตแกรมที่ได้จากการฉีดสารสกัดจากส่วนต่างของลำพู (*S. caseolaris*) ได้แก่ สารสกัดจากเกสร, สารสกัดจากใบ สารสกัดจากเมล็ด และสารสกัดที่หุ้มดอกลำพู ในสภาวะที่ระบุข้างต้น หลังจากที่เราทราบค่ามวลของสารที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดของลำพูแต่ละส่วนและได้ทำ tandem MS หรือ MS/MS พบ Gallic acid และอนุพันธ์ของ gallic acid ในรูปของ Di-O-galloyl-hexiside ที่มีค่า m/z ของ $[M-H]^-$ 169.2 และ 483.0 ในสารสกัดทุกชนิด ในสัดส่วนที่ต่างกัน นอกจากอนุพันธ์ Di-O-galloyl-hexiside ยังพบอนุพันธ์ของ Gallic acid ที่อยู่ในรูปของ mono-O-galloyl-hexiside ซึ่งมีค่า m/z 331.0 ในสารสกัดจากเกสร นอกจากนี้ยังพบฟีดของสารที่มีค่า m/z ของ $[M-H]^-$ 301.0 ซึ่งคาดว่าจะจะเป็นฟีดของสาร quercetin ในสารสกัดจากเกสรและสารสกัดจากที่หุ้มดอกลำพู และพบฟีดของสารที่มีค่า m/z ของ $[M-H]^-$ 447.0 ในสารสกัดจากใบลำพู ซึ่งผลจากการทำ MS/MS คาดว่าเป็นฟีดของสาร quercitrin ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ quercetin (รูปที่ 28) แต่จากการศึกษาโดยวิธีนี้ไม่พบ luteolin และ luteolin-7-O-glucoside มีค่า m/z ของ $[M-H]^-$ 285 และ 447 ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเกิดจากการที่สารทั้งสองชนิดมีอยู่ในสารสกัดในปริมาณน้อยทำให้ถูกบดบังโดยฟีดของสารอื่น



รูปที่ 28 โครงสร้างทางเคมีของ quercetin, luteolin และ quercitrin

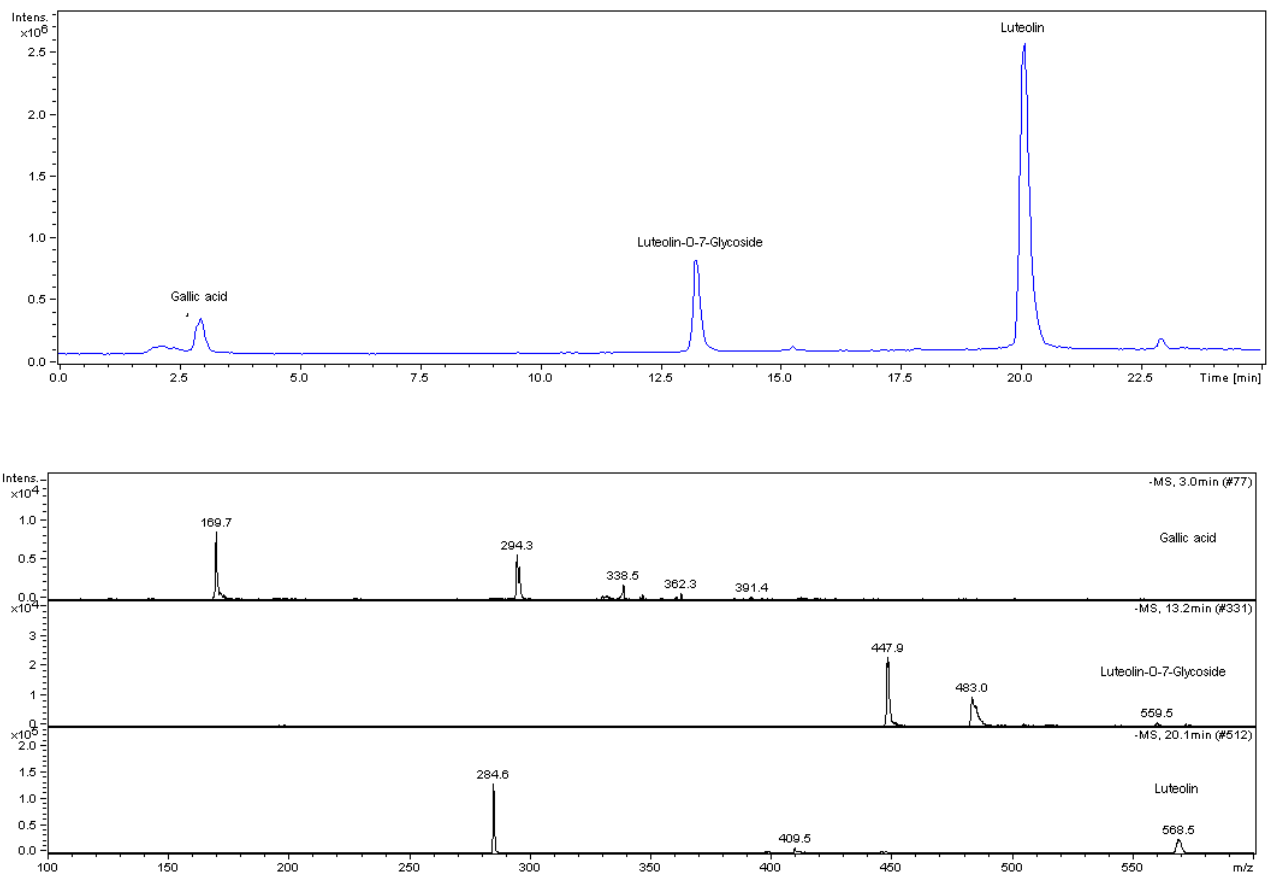
15. การวิธีวิเคราะห์แยก galic acid Luteolin และ Luteolin-7O-glycoside ซึ่งเป็นสารที่เป็น marker ในสารสกัดลำพู โดยเครื่องมือ LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry)

จากการใช้เครื่องมือ LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) โดยใช้ RP-18 analytical column (250 mm x 4.6 mm i.d.; 5 μ m) เป็น stationary phase และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ประกอบด้วย 1% formic acid ในน้ำและ methanol ในอัตราส่วนต่างๆ โดยใช้เครื่องตรวจวัดสาร (detector) สองชนิดคือ อัลตราไวโอเลตสเปกโตรสโกปี (Ultra Violet spectroscopy) ที่ความยาวคลื่น 278 nm และ แมสสเปกโตรสโกปี (ESI-Mass spectroscopy) พบว่าการใช้ gradient ของ 1% formic acid ในน้ำและ methanol ในอัตราส่วนของ น้ำ ต่อ methanol ตั้งแต่ 75 : 25 ถึง 60 : 40 เป็นเวลา 25 นาที ด้วยอัตราการไหล 0.4 ml/min สามารถแยกสารทั้งสามชนิดออกจากกันได้ดี โดย สาร galic acid luteolin-7-O-glycoside และ luteolin ซึ่งมีค่ามวลต่อประจุชนิดลบ หรือ $[M+H]^-$ เป็น 169.4 447.3 และ 285.6 ที่ถูกชะออกมาที่เวลา 5.3 23.4 และ 16.6 นาที ตามลำดับ (รูปที่ 29 และ 30) และเมื่อเปรียบเทียบความไวในการตรวจวิเคราะห์ของเครื่องตรวจวัดสาร (detector) พบว่าเทคนิคแมสสเปกโตรสโกปี (Mass spectroscopy) มีความไวที่สูงกว่า โดยสามารถตรวจวัดสารทั้งสามชนิดได้ที่ความเข้มข้น 5 μ g/ml โดยเฉพาะสาร galic acid และ luteolin-7-O-glycoside นั้น เมื่อวิเคราะห์ในเชิงปริมาณด้วยเครื่องแมสสเปกโตรสโกปีให้ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่าง จำนวน count ของสัญญาณ กับ ความเข้มข้นของสาร ในช่วง 5 ถึง 100 μ g/ml ด้วยค่า correlation coefficient (R^2) 0.9924 และ 0.9893 ตามลำดับ



รูปที่ 29 LC-MS chromatogram และ total ion counts ของสารละลายผสม เมื่อใช้แมสสเปกโตรสโกปีชนิดที่ใช้ประจุชนิดลบ เป็นเครื่องตรวจวัด โดยพีคของ gallic acid Luteolin–O-7-glucoside และ luteolin ปรากฏที่เวลา 5.6 16.6 และ 23.4 นาทีตามลำดับ

เนื่องจากเวลาที่ใช้ในการแยกวิเคราะห์โดยวิธีข้างต้นใช้เวลานานในการวิเคราะห์ (30 นาที ต่อตัวอย่าง) จึงได้เปลี่ยน column จาก RP-18 analytical column (250 mm x 4.6 mm i.d.; 5 μ m) ไปเป็น RP-18 column (150 mm x 4.6 mm i.d.; 3.5 μ m) ที่ช่วยลดระยะเวลาในการแยกสารจาก 35 นาที ต่อตัวอย่าง ไปเป็น 24 นาที ต่อตัวอย่าง (รูปที่ 23)

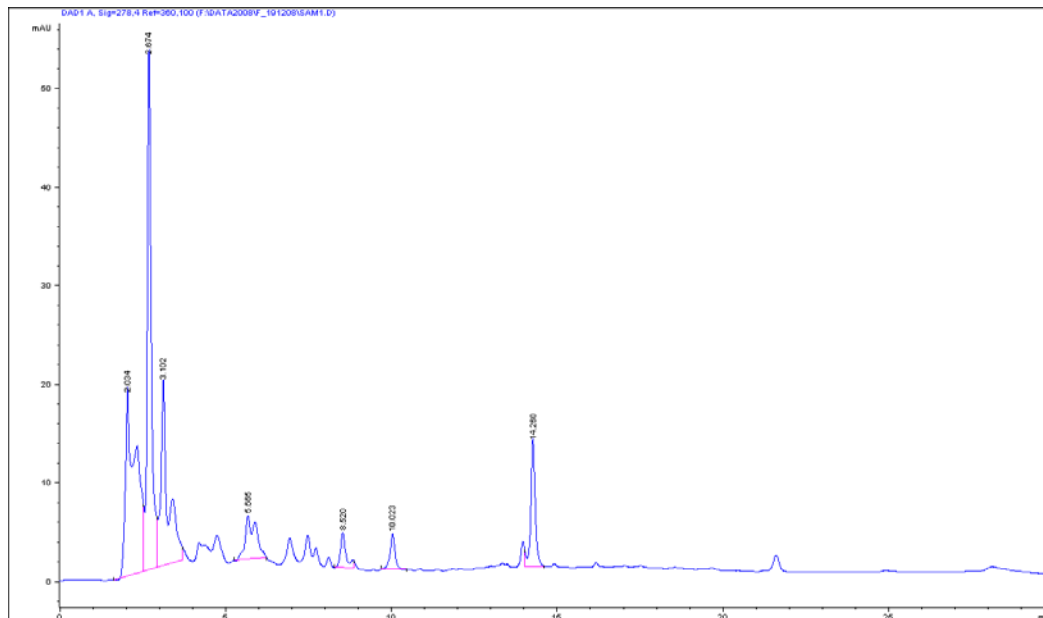


รูปที่ 30 LC-MS chromatogram และ total ion counts ของสารละลายผสมของของสารมาตรฐาน galic acid Luteolin–O-7-glycoside และ luteolin ใน methanol ที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 60 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ เมื่อใช้แมสสเปกโตรสโกปีชนิดที่ใช้ประจุชนิดลบเป็นเครื่องตรวจจับ โดยพีคของ galic acid, luteolin, luteolin และ luteolin–O-7-glucoside ปรากฏที่เวลา 3.0 13.2 และ 20.1 นาทีตามลำดับ

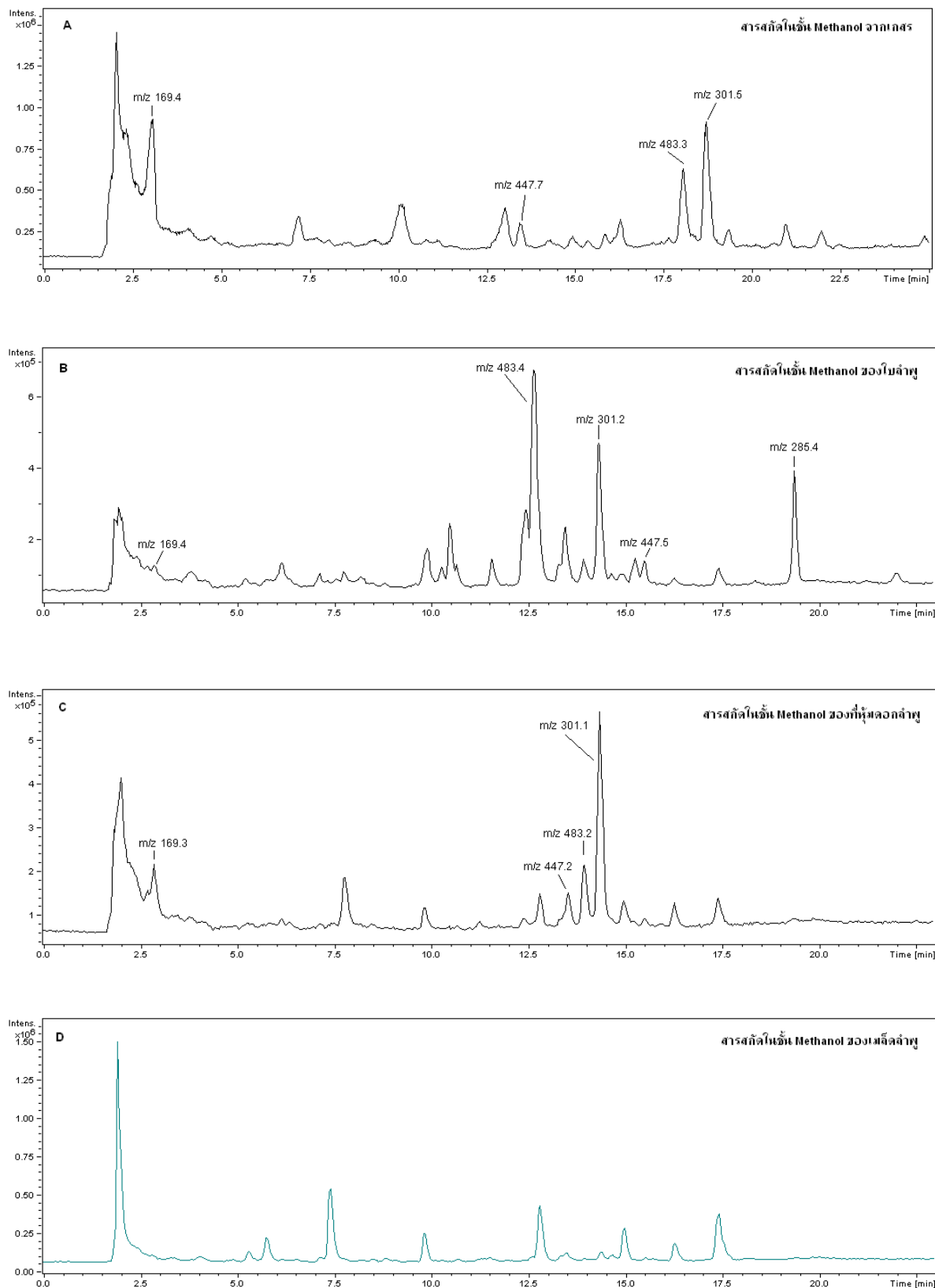
เมื่อนำสารสกัดในชั้น methanol จากส่วนต่างๆ ของลำพู (*S. caseolaris*) ได้แก่ สารสกัดจากเกสร, สารสกัดจากใบ สารสกัดจากเมล็ด และสารสกัดที่หุ้มดอกลำพู มาวิเคราะห์ด้วยวิธีข้างต้นมาใช้ได้ผลดังในรูปที่ 24 และ 25 จะเห็นว่า สารส่วนมากถูกชะออกมาในช่วงเวลา 10 นาทีแรก ทำให้การแยกของพีคของสารไม่ดี มีการซ้อนกันของพีค ดังจะเห็นได้จากการปรากฏของพีคของสารหลายชนิดที่มีค่า m/z แตกต่างกันไป ใน total ion counts ของ galic acid และ luteolin–O-7-glucoside ที่เวลา 2.7 และ 13.5 นาทีตามลำดับ ในขณะที่เดียวกันพีคของสารที่มีค่า m/z 301.1 ที่ปรากฏที่เวลา 14.3 นาที ก็น่าสนใจที่จะนำมาใช้เป็น maker สำหรับสารสกัดในชั้น methanol ของลำพู

เมื่อเปรียบเทียบโครมาโตแกรมของสารละลายผสมของของสารมาตรฐาน galic acid, luteolin-7-O-glycoside และ luteolin ใน methanol (รูปที่ 31) กับสารสกัดในชั้น methanol จากส่วนต่างๆ ของลำพู ได้แก่ สารสกัดจากเกสร สารสกัดจากใบ สารสกัดจากเมล็ด และสารสกัดที่หุ้มดอกลำพู (รูปที่ 32) พบพีค m/z 169 ที่เวลา 3.0 นาที ของ galic acid ในสารสกัดจากเกสรและสารสกัดที่หุ้มดอกลำพู สำหรับพีค m/z 447.2 และ m/z 285.4 ซึ่งปรากฏที่เวลา 13.5 และ 19.3 นาที เป็นของ luteolin-7-O-glucoside และ luteolin ตามลำดับ พบในสารสกัดจากใบ นอกจากพีคของสารดังกล่าวยังพบพีคที่มีค่า m/z เท่ากันแต่ปรากฏบนโครมาโตแกรมที่เวลาต่างๆ กัน เช่น พีคของสารที่มีค่า m/z 483 พบทั้งในสารสกัดจากเกสร สารสกัดจากใบและสารสกัดที่หุ้มดอกลำพู ซึ่งปรากฏขึ้นที่เวลาต่างๆ กัน โดย ในสารสกัดจากเกสร พบพีค m/z 483.3 ปรากฏที่เวลา 18.0 นาที สารสกัดจากใบพบพีคที่มีค่า

m/z ดังกล่าวที่เวลา 12.0 นาที ส่วนในสารสกัดที่หุ้มดอกลำพู พบพีค m/z 483.0 ปรากฏที่เวลา 18.0 นาที อีกพีคของสารที่น่าสนใจคือ พีคที่มีค่า m/z 301.2 ปรากฏที่เวลา 14.3 นาที ซึ่งพบในปริมาณสูงในสารสกัดจากใบและสารสกัดที่หุ้มดอกลำพู น่าจะใช้เป็นสารที่เป็น marker สำหรับสารสกัดจากลำพู จึงจำเป็นต้องมีการทำ ms/ms เพิ่มเติมเพื่อช่วยในการช่วย identify สารที่ปรากฏที่เวลาต่างๆ บนโครมาโตแกรม



รูปที่ 31 HPLC Chromatogram ของสารสกัดในชั้น methanol ของลำพู ความเข้มข้น 100 µg/ml โดยใช้เครื่องตรวจวัดสารชนิด ultraviolet spectroscopy) ที่ความยาวคลื่น 278 nm



รูปที่ 32 ESI-LC-MS chromatogram ของสารสกัดในชั้น methanol จากเกสร (A) สารสกัดจากใบ (B) สารสกัดที่หุ้มดอกจำรูญ (C) และ สารสกัดจากเมล็ด (D) ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อใช้แมสสเปกโตรสโกปีชนิดที่ใช้ประจุชนิดลบเป็นเครื่องตรวจวัด

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การวิเคราะห์หาสารในกลุ่ม phenolic compound ด้วยเทคนิค HPLC การเลือกใช้ mobile phase เป็นสิ่งที่สำคัญ ซึ่งจะทำให้สามารถวิเคราะห์สารตัวอย่างได้อย่างเหมาะสม การวิเคราะห์มีการเลือกใช้ระบบ mobile phase ต่างๆ เช่น น้ำ-methanol โดยมี phosphoric acid ผสมอยู่ เพื่อลดการแตกตัวของสารที่ต้องการแยก ทั้งนี้ mobile phase ดังกล่าวจะสามารถทำการแยกสารออกมาได้เร็วกว่า mobile phase ที่ประกอบด้วย น้ำ-acetonitrile ที่มี phosphoric acid หรือ acetic acid ผสมอยู่ ยกตัวอย่างเช่น gallic acid ซึ่งจะมีค่า elution time ประมาณ 2.5-3 นาที และจะทำการแยก gallic acid กับสารอื่นๆ ที่อยู่ใกล้เคียงกันออกจากกันได้ดี ทำให้สามารถวิเคราะห์หาปริมาณของ gallic acid ได้อย่างแม่นยำกว่าระบบ mobile phase อื่น ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Wang และคณะ (2003) ถึงแม้ว่าในระบบ mobile phase ที่ประกอบด้วยน้ำ-acetonitrile และ phosphoric acid หรือ acetic acid ผสมอยู่จะให้ค่า elution time ประมาณ 7-8 นาที แต่ก็สามารถทำการแยก gallic acid กับสารอื่นๆ ที่อยู่ใกล้เคียงกันออกจากกันได้ดี (Orkoulas และคณะ, 2004; Zhang และคณะ, 2007) อย่างไรก็ตามขึ้นอยู่กับคอลัมน์ที่เลือกใช้ว่าเป็นชนิดใดและ condition ต่างๆ ที่มาเป็นองค์ประกอบร่วมด้วย ซึ่งจะมีผลต่อการแยกของสารสำคัญต่างๆ

การเลือกสารละลายสำหรับการสกัดสารและเตรียมตัวอย่างส่วนใหญ่จะเลือกใช้น้ำ เนื่องจากไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพและสามารถแยกสารที่มีขั้วสูงออกมาได้เป็นจำนวนมาก แต่ก็มีข้อจำกัดในกรณีที่สารสำคัญเป็นสารที่ไม่มีขั้ว จึงได้ทำการเปรียบเทียบกับสารละลายระบบอื่นๆ เช่น สารละลาย ethanol, acetone, และ acetonitrile ซึ่งพบว่า ethanol, acetone และ acetonitrile เข้มข้น 15% (v/v) ในน้ำมีประสิทธิภาพที่ไม่แตกต่างจากการใช้น้ำ แต่ถ้าใช้ในปริมาณความเข้มข้นที่มากกว่า 15% จะส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการวิเคราะห์ได้ ยกตัวอย่างเช่น ethanol ที่มีความเข้มข้นสูงกว่า 15%(v/v) ถึงแม้ว่าจะทำให้สามารถสกัดสารได้ออกมาเป็นจำนวนมากก็ตาม แต่เมื่อทำการวิเคราะห์จะไม่สามารถแยกสารออกจากกันได้ เป็นผลมาจาก Injection solvent ซึ่ง ethanol นี้จะมีความแรงกว่า mobile phase ดังนั้นต้องเลือก Injection solvent ชนิดอื่นมาแทน ethanol เช่น น้ำ เพื่อให้มีความสามารถที่ใกล้เคียงกับ mobile phase (Wang และคณะ, 2003; Fu และคณะ, 2006)

ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) มีผลต่อการเกิด ionization ของโมเลกุลสารต่างๆ ยกตัวอย่าง เช่น luteolin ในระบบที่มีค่า pH สูงๆ โมเลกุลจะมีประจุลบ มีผลทำให้ค่า UV adsorption ลดลงและค่า pH ที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์คือ pH 5 (Fu และคณะ, 2006) ดังนั้นจึงต้องมีเตรียม mobile phase ใหม่ๆ และควบคุมค่าความเป็นกรดต่าง เพื่อลดผลกระทบต่อประสิทธิภาพการวิเคราะห์

ความคงตัวของสารละลายตัวอย่างในขณะที่ทำการวิเคราะห์ เก็บที่อุณหภูมิห้อง gallic acid จะสามารถคงตัวอยู่ได้ประมาณ 6 ชั่วโมง หลังจาก 8 ชั่วโมง gallic acid จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นประมาณ 10.1% โดยการเก็บใน freezer ที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส จะสามารถเก็บ gallic acid ได้ประมาณ 1 อาทิตย์และจะสลายตัวไปประมาณ 2% ทั้งนี้เมื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณ gallic acid ไม่ว่าจะเก็บไว้ที่ใดก็ตาม ปริมาณของ gallic acid จะไม่ลดลงแต่ยังมีปริมาณเพิ่มขึ้น 10 % หลังจาก 8 ชั่วโมง ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่า gallic acid มีความคงตัวที่ดี ขณะที่สามารถเก็บสารละลายของ luteolin ได้ประมาณ 3 เดือน ถ้าเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Zhang และคณะ, 2007; Wang และคณะ, 2003) สารละลาย luteolin glycoside นั้นสลายตัวได้ง่าย โดย luteolin glycoside จะถูกไฮโดรไลซ์ไปเป็น luteolin ในบางครั้งไม่สามารถวิเคราะห์ luteolin glycoside ได้ เนื่องจากมี glucuro-conjugates มาบดบัง luteolin glycoside ไว้และเมื่อ glucuro- conjugates สลายตัวไป luteolin glycoside จะสลายตัวไปด้วยเช่นกัน จึงทำให้ luteolin มีปริมาณเพิ่มขึ้นได้ (Shimoi และคณะ, 1998) สำหรับสารประกอบ phenolic สามารถคงตัวอยู่ได้

ประมาณ 2 วันถ้าเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใน thermostated autoinjection และจะคงตัวอยู่ได้ประมาณ 6 เดือนถ้าเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสใน Methanol และอยู่ในที่มืด (Abad-García และคณะ, 2007)

จากที่กล่าวมาจะเห็นถึงข้อดีของ HPLC สำหรับงานวิจัยนี้ได้แก่ ทำการวิเคราะห์ได้ง่าย มีความไวสูง มีค่า limits of detection และ quantitation ต่ำ เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ที่ต้องการความรวดเร็วและวิเคราะห์ซ้ำได้ (Wang และคณะ, 2003) อย่างไรก็ตามวิธีนี้ก็ยังมีข้อเสีย ดังนี้ เป็นวิธีวิเคราะห์ที่อาจทำลายสารตัวอย่างได้ ใช้เวลาในการวิเคราะห์ค่อนข้างนาน และขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่ยุ่งยาก เมื่อเปรียบเทียบกับ Raman spectroscopy (Orkoula และคณะ, 2004)

บรรณานุกรม

- จำนง ทองประเสริฐ ราชบัณฑิต จดหมายข่าวราชบัณฑิตยสถาน ปีที่ 7 ฉบับที่ 74, กรกฎาคม 2540.
- สมลธา หนูคาบแก้ว, ภูษนา รังคดิถ, จุฑามาต สัตยวิวัฒน์ การประเมินปริมาณธาตุในตัวอย่างผลิตภัณท์สมุนไพรในประเทศไทย 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, 18-20 ตุลาคม 2548.
- Abad-Garcia B, Berrueta LA, López-Márquez DM, Crespo-Ferrer I, Gallo B, Vicente F. Optimization and validation of a methodology based on solvent extraction and liquid chromatography for the simultaneous determination of several polyphenolic families in fruit juices. J. Chromatography A. 2007;1154:87-96.
- Audette RCS, Bolan J, Vijayanagar HM, Clark RB. Phytochemical investigation of manitoba plants: II. A gas-liquid chromatographic screening technique for the identification of the alkaloid of *phalaris* species. J. Chromatogr A. 1969;43:295-302.
- Azuma H, Toyota M, Asakawa Y, Tobe H. Floral scent chemistry of mangrove plants. J. Plant Res. 2002;115(1117):47-53.
- Bandaranayake WM. Bioactivities, bioactive compounds and chemical constituents of mangrove plants [on line]. Accessed Oct 2007. Available from <http://www.aims.gov.au/pages/research/mangroves/mangrove-biocom.html>.
- Bilia A, Bergozi M, Gallori S, Mizzi F, Vincieri F. Stability of the constituents of Calendula, Milk-thistle and Passionflower tincture by LC-DAD and LC-MS. J. Pharm. Biomed. Anal. 2002;30:613-24.
- Cadoni E, De Giorgi MR, Medda E, Poma G. Supercritical CO₂ extraction of lycopene and β -carotene from ripe tomatoes. Dyes and Pigments. 2000;44:27-32.
- Cannell R. Natural Products Isolation. Human Press, New Jersey, 1998.
- Carbone V, Montoro P, de Tommasi N, Pizza C. Analysis of flavonoids *Cyclanthera pedata* fruits by liquid chromatography/ electrospray mass spectroscopy. J. Pharm. Biomed. Anal. 2004;34:295-304.
- Cesar LMM, Mendes MA, Tormena CF, Marques MR, et al. Isolation and chemical characterization of PwTx-II: a novel alkaloid toxin from the venom of the spider *Parawixia bistriata* (Araneidae, Araneae). Toxicon. 2005;46:786-96.
- Chanma N, Deerasamee P. 1995. Chemical constituents of the flowers of *Sonneratia caseolaris* Engl. Senior Project. Faculty of Science, Chulalongkorn University.
- Chhabra SC, Uiso FC, Mshiu EN. Phytochemical screening of tanzanian medicinal plants. J. Ethnopharmacol. 1984;11:157-79.
- Chifundera K, Baluku B, Mashimango B. Phytochemical Screening and Molluscicidal Potency of Some Zairean Medicinal Plants. Pharmacol Res. 1993;28:333-40.
- Deeni YY, Sadiq NM. Antimicrobial properties and phytochemical constituents of the leaves of African mistletoe (*Tapinanthus dodoneifolius* (DC) Danser) (Loranthaceae): an ethnomedicinal plant of Hausaland, Northern Nigeria. J. Ethnopharmacol. 2002;83:235-40.
- Devi P, Solimabi W, D'Souza L, Sonak S, Kamat SY, Singbal SYS. Screening of some marine plants for activity against marine fouling bacteria. Botanica Marina. 1997;40(2):87-91.

- Devi P, Solimabi W, D'Souza L, Kamat SY. 1997. Toxic effects of coastal and marine plant extracts on mosquito larvae. *Bot. Mar.* 1997;40(6):533-35.
- Duez P, Livaditis A, Guissou PI, Sawadogo M, Hanocq M. Use of an *Amoeba proteus* model for in vitro cytotoxicity testing in phytochemical research. Application to *Euphorbia hirta* extracts. *J. Ethnopharmacol.* 1991;34:235-46.
- Duke JA, Wain KK. 1981. Medicinal plants of the world. Computer index with more than 85,000 entries. Vol.3.
- Duke JA. 1983. *Sonneratia caseolaris* (L.) Engl. Handbook of energy crops. Unpublished.
- Fu YJ, Zu YG, Liu W, Efferth T, Zhang, N, Liu XN, Kong Y. Optimization of luteolin separation from pigeonpr [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] leaves by macroporous resins. *J. Chromatography A.* 2006;1137:145-52.
- Ganguly SN, Sanyal T, Sircar PK, Sircar SM. A new gibberellin (A25) in the leaves of *Sonneratia apetala* ham. *Chem. Ind.* 1970;25:832-33.
- Ganguly SN, Sircar SM. Gibberelins from mangrove plants. *Phytochemistry* 1974;13(9):1911-1913.
- Gebrie E, Makonnen E, Debella A, Zerihun L. Phytochemical screening and pharmacological evaluations for the antifertility effect of the methanolic root extract of *Rumex steudelii*. *J. Ethnopharmacol.* 2005;96:139-43.
- Gritsanapan W, Mangmeesri P. Standardized *Senna alata* leaf extract. *J Health Res.* 2009;23(2):59-64.
- Kumazawa S, Taniguchi M, Suzuki Y, Shimura M, Kwon M-S, Nakayama T. Antioxidant activity of polyphenols in carob pods. *J. Agri. Food Chem.* 2002;50(2):373-377.
- Mutanyatta J, Bezabih M, Abegaz BM, Dreyer M, et al. The first 6'-O-sulfated phenylanthraquinones: isolation from *Bulbine frutescens*, structural elucidation, enantiomeric purity, and partial synthesis. *Tetrahedron.* 2005;61:8475-84.
- Nakanishi K. Terpene trilactones from *Ginkgo biloba*: from ancient times to the 21st century. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2005;13:4987-5000.
- Ng PK, Sivasothi N. Flowering plants. [online]. (Accessed 16/07/2005). Available from <http://mangrove.nus.edu.sg/guidebooks/text/1074.htm>.
- Orkoula MG, Kontoyannis CG, Markopoulou CK, Koundourellis JE. Determination of methodologies based on HPLC and Raman spectroscopy for monitoring the stability of lovastatin in solid state in the presence of gallic acid. *J. Pharmaceut Biomed.* 2004;35:1011-16.
- Pellati F, Benvenuti S, Melegari M. Enantioselective LC analysis of synephrine in natural products on a protein-based chiral stationary phase. *J. Pharmaceut Biomed.* 2005;37:839-49.
- Perry LM. 1980. Medicinal plants of east and southeast asia. MIT Press, Cambridge.
- Phillipson JD. Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry.* 2001;56:237-43.
- Pieters L, Vlietinck AJ. Bioguided isolation of pharmacologically active plant components, still a valuable strategy for the finding of new lead compounds?. *J. Ethnopharmacol.* 2005;100:57-60.
- Pyo S, Song B, Ju C, Han B, Choi H. Effects of absorbent treatment on the purification of paclitaxel from cell cultures of *Taxus chinensis* and yew tree. *Process Biochem.* 2005;40:1113-7.

- Reid KA, Jäger AK, Light ME, Mulholland DA, Van Staden J. Phytochemical and pharmacological screening of *Sterculiaceae* species and isolation of antibacterial compounds. *J. Ethnopharmacol.* 2005;97:285-91.
- Sandabe UK, Onyeyili PA, Chibuzo GA. Phytochemical screening and effect of aqueous extract of *Ficus sycomorus* L. (Moraceae) stem bark on muscular activity in laboratory animals. *J. Ethnopharmacol.* 2006;104:283-5.
- Sangdee P. Health and sanitation among mangrove dwellers in Thailand [on line]. Accessed Oct 2007. Available from <http://www.unu.edu/unupress/unupbooks/80607e/80607E08.htm>.
- Shaalán EA, Canyon D, Younes MW, Abdel-Wahab H, Mansour A. A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. *Environment International.* 2005;31:1149-66.
- Shimoi K, Okada H, Furugori M, Goda T, Takase S, Suzuki M, Hara Y, Yamamoto H, Kinae N. Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7-O- β -glucoside in rats and humans. *FEBS Letters* 1998;438:220-4.
- Simmons TL, McPhail KL, Ortega-Barria E, Mooberry SL, Gerwick WH. Belamide A, a new antimitotic tetrapeptide from a Panamanian marine cyanobacterium. *Tetrahedron Let.* 2006;47:3387-90.
- Skatsson J. Mangrove bark dulls the pain [on line]. Accessed Oct 2007. Available from <http://www.abc.net.au/science/news/stories/2004/1138407.htm>.
- Sparg SG, van Staden J, Jäger AK. Pharmacological and phytochemical screening of two *Hyacinthaceae* species: *Scilla natalensis* and *Ledebouria ovatifolia*. *J. Ethnopharmacol.* 2002;80:95-101.
- Sudjaroen Y, Haubner R, Wurtele G, Hull WE, et al. Isolation and structure elucidation of phenolic antioxidants from Tamarind (*Tamarindus indica* L.) seeds and pericarp. *Food and Chemical Toxicol.* 2005;43:1673-82.
- Tona L, Kambu K, Ngimbi N, Cimanga K, Vlietinck AK. Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 1998;61:57-65.
- Tanira MOM, Bashir AK, Dib R, Goodwin CS, Wasfi IA, Banna, NR. Antimicrobial and phytochemical screening of medicinal plants of the United Arab Emirates. *J. Ethnopharmacol.* 1994;41:201-5.
- Teo LE, Pachiape G, Chan KC, Hadi HA, Weber JF, Deverre JR, David B, Sévenet T. A new phytochemical survey of Malaysia V. Preliminary screening and plant chemical studies. *J. Ethnopharmacol.* 1990;28:63-101.
- Twaij HAA, Kery A, Al-Khazraji NK. Some pharmacological, toxicological and phytochemical investigations on *Centaurea phyllocephala*. *J. Ethnopharmacol.* 1983;9:299-314.
- Uguru MO, Evans F. Phytochemical and pharmacological studies on *Monechma ciliatum*. *J. Ethnopharmacol.* 2000;73:289-92.
- Verpoorte R. Some phytochemical aspects of medicinal plant research. *J. Ethnopharmacol.* 1989;25:43-59.
- Wang H, Provan GJ, Helliwell K. Determination of hamamelitannin, catechins and gallic acid in witch hazel bark, twig and leaf by HPLC. *J. Pharmaceut Biomed.* 2003;33:539-44.
- Wilbert W, Haiek G. Phytochemical screening of a Warao pharmacopoeia employed to treat gastrointestinal disorders. *J. Ethnopharmacol.* 1991;34:7-11.

- Wolfender J, Ndjoko K, Hostettmann K. Liquid chromatography with ultraviolet absorbance-mass spectrometric detection and with nuclear magnetic resonance spectroscopy: a powerful combination for the on-line structural investigation of plant metabolites. *J Chromatogr A*. 2003;1000:437-55.
- Xu J, Lin P, Meguro S, Kawachi S. Phytochemical research on mangrove plants I. lipids and carbohydrates in propagules of ten mangrove species of China. *J. of JPN Wood Res Soc*. 1997;43:875-81.
- Yoshioka S, Stella VJ. Stability of drugs and dosage forms. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2000.
- Zhang QL, Li J, Wang C, Sun W, Zhang ZT, Chang WM. A gradient HPLC method for the quality control of chlorogenic acid, linarin and luteolin in *Flos Chrysanthemi* Indici suppository. *J. Pharmaceut Biomed. Analysis*. 2006;43:753-7.

ประวัติและผลงานของผู้วิจัย

นางชุตินา ลิ้มมัทวาทิรต์

1. ชื่อ - สกุล (ภาษาไทย). นายชุตินา ลิ้มมัทวาทิรต์
(ภาษาอังกฤษ). Mrs. Chutima Limmatvapirat

2. วัน เดือน ปีเกิด 18 ตุลาคม 2511

3. ตำแหน่งทางวิชาการปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

4. หน่วยงานและที่อยู่ติดต่อได้

สถานที่ทำงาน ภาควิชาเภสัชเภสัชเคมี

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ นครปฐม 73000

โทรศัพท์: 034 253910-7 ต่อ 24310 โทรสาร: 034 255801

Email: chutima@su.ac.th

ที่อยู่ปัจจุบัน 241/1 ม.1 ถนนบ้านแพ้ว-พระประโทนเจดีย์

ตำบล ดอนยายหอม อำเภอ เมือง

จังหวัด นครปฐม 73000

โทรศัพท์: 034-299-349

5. ประวัติการศึกษา

ปริญญาเอก วิทยาศาสตร์ดุษฎีบัณฑิต (วท.ด.เภสัชศาสตร์) คณะเภสัชศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปริญญาโท -

ปริญญาตรี เภสัชศาสตรบัณฑิต (ภ.บ.) คณะเภสัชศาสตร์ (เกียรตินิยมอันดับ 2)
มหาวิทยาลัยศิลปากร

6. วิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษา (ชื่อเรื่อง/ปีที่ดำเนินการทั้งระดับปริญญาโทและปริญญาเอก)

- ระดับปริญญาโท -

- ระดับปริญญาเอก Bioactive constituents from marine *Bacillus* sp. ปีที่ดำเนินการเสร็จ พ.ศ. 2543

7. สาขาวิชาที่มีเชี่ยวชาญ

สาขาวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช ในด้าน

- Natural products
- Pharmaceutical analysis

8. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

8.1 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

- การศึกษาองค์ประกอบเคมีและสารออกฤทธิ์ชีวภาพในพืชไทย สันับสนุนจากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช) พ.ศ. 2545 (ผู้ร่วมโครงการ)
- การวิจัยสารต้านมะเร็งจากราเอนโดไฟท์ในพืชสมุนไพรไทย สันับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว) พ.ศ. 2547 (ผู้ร่วมโครงการ)
- การทดสอบฤทธิ์ชีวภาพและการใช้ประโยชน์ทางยาจากหมาก สันสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร พ.ศ. 2548 (ผู้ร่วมโครงการ)
- การวิเคราะห์โลหะหนักในเครื่องเทศ เครื่องปรุงอาหาร และผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ โดยใช้เทคนิคอินดักทีฟลี คับเบิล พลาสมา-แมสส์ สเปกโตรเมทรี (ไอซีพี-เอ็มเอส) สันสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช) พ.ศ. 2550 (หัวหน้าโครงการ)
- การหาปริมาณโลหะหนักในเหง้าหรือรากใต้ดินของพืชสมุนไพรไทยในวงศ์ Zingiberaceae โดยใช้เทคนิคอินดักทีฟลี คับเบิล พลาสมา-แมสส์ สเปกโตรเมทรี (ไอซีพี-เอ็มเอส) สันสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร พ.ศ. 2551 (หัวหน้าโครงการ)
- การตรวจสอบปริมาณโลหะหนักและสาเหตุของโลหะหนักปนเปื้อนในชาสมุนไพรและเครื่องแกง โดยใช้เทคนิคอินดักทีฟลี คับเบิล พลาสมา-แมสส์ สเปกโตรเมทรี (ไอซีพี-เอ็มเอส) สันสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช) พ.ศ. 2552 (หัวหน้าโครงการ)

8.2 Publications

- Chutima Limmatvapirat, Juree Charoenteeraboon, Sarawut Sukjindasathein, and Thawatchai Phaechemud. Determination of Three Components in *Sonneratia caseolaris* L. by High Performance Liquid Chromatography. 3rd Asian Pacific ISSX meeting, The Imperial Queen's Park Hotel, Bangkok, Thailand, May 10-12, 2009.
- Chutima Limmatvapirat, Juree Charoenteeraboon, Penpan Wetwitayaklung, Chanokporn Sukonpan, and Thawatchai Phaechemud. Stability and antioxidant activity of polyphenols in methanolic extracts of *Sonneratia caseolaris* seeds. Advanced Materials Research 2011; 146-147: 1062-1065.
- Chutima Limmatvapirat, Thawatchai Phaechemud, Juree Charoenteeraboon, Determination of Heavy Metals in Rhizomes of *Alpinia galanga* by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. Key Engineering Materials 2011; 486: 143-146.
- Chutima Limmatvapirat, Thawatchai Phaechemud, Juree Charoenteeraboon, Determination of Heavy Metals in Fruits of *Capsicum annuum* L. by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. Key Engineering Materials 2011; 486: 135-138.
- Sirikarn Pengon, Chutima Limmatvapirat, Sontaya Limmatvapirat, Design of nanoemulsions through combination of fixed-volatile oils. Key Engineering Materials 2011; 486: 123-126.
- Thawatchai Phaechemud, Kotchamon Yodkhum, Chutima Limmatvapirat and Penpan Wetwitayaklung, Morphology, Thermal and Antioxidative Properties of Water Extracts from

Sonneratia caseolaris (L.) Engl. Prepared with Freeze Drying and Spray Drying. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences (RES J PHARM BIOL CHEM SCI, RJPBC) January – March 2012 Volume 3 Issue 1, pp. 725-739.

- Chutima Limmatvapirat, Juree Charoenteeraboon, Thawatchai Phaechemud, Simultaneous Analysis of Eleven Heavy Metals in Extracts of *Sonneratia caseolaris* (L.) Engl. by ICP-MS. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences (RES J PHARM BIOL CHEM SCI, RJPBC) January – March 2012 Volume 3 Issue 1, pp. 744-750.
- Penpun Wetwitayaklung, Juree Charoenteeraboon, Chutima Limmatvapirat, and Thawatchai Phaechemud. Antioxidant Activities of Some Thai and Exotic Fruits Cultivated in Thailand. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences (RES J PHARM BIOL CHEM SCI, RJPBC) January – March 2012 Volume 3 Issue 1, pp. 12-21.

8.3 Presentations

- Chutima Limmatvapirat, Juree Charoenteeraboon, Penpan Wetwitayaklung, Chanokporn Sukonpan, and Thawatchai Phaechemud. Stability and antioxidant activity of polyphenols in methanolic extracts of *Sonneratia caseolaris* seeds. The 2010 International Conference on Advances in Materials and Manufacturing Processes (ICAMMP 2010), November 6-8, 2010. Shenzhen, China.
- Thawatchai Phaechemud and Chutima Limmatvapirat. Amount and release of total phenolic compound from *Sonneratia caseolaris* (L.) Engl. Extracted with hot water. The 3rd Annual Northeast Pharmacy Research Conference 2011, Integrated Pharmacy: from research to practice, Feb 12-13, 2011, organized by Faculty of Pharmaceutical Sciences and Ubon Ratchathani University.
- Thawatchai Phaechemud and Chutima Limmatvapirat. Process parameter affecting production of *Sonneratia caseolaris* (L.) Engl. Herbal tea. The third international conference on natural products for health and beauty, March 16-18, 2011.
- Sontaya Limmatvapirat, Piyapoom Piyawatakarn, Sugannika Tabtimsri, Pornsak Sriamornsak, Jurairat Nunthanid, Chutima Limmatvapirat, Design of Taste Masked Dextromethorphan through Incorporation into Shellac-based Matrix. The 2nd International Symposium on Mechanical Science and Technology (ISMST 2011) 20-21 December 2011 Guangzhou, China.
- Chutima Limmatvapirat, Thawatchai Phaechemud, Juree Charoenteeraboon, Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometric Determination of Heavy Metals in Cultivated Soils and Zingiberaceous Plant. The 2nd International Symposium on Mechanical Science and Technology (ISMST 2011) 20-21 December 2011 Guangzhou, China.

8.4 Invited Speaker

- ชุติมา ลิ้มมัทวาทิรต์ ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อความงาม โครงการการอบรมสวอยอย่างฉลาด เลือกรับบริโภคให้ปลอดภัย วันที่ 15 มิย 53 เวลา 10.30-12.00 น ณ ห้องกาสะลอง โรงแรมเวสเทิร์นแกรนด์ราชบุรี
- ชุติมา ลิ้มมัทวาทิรต์ การแยกและการทำให้บริสุทธิ์ โครงการสัมมนาและฝึกอบรม เรื่องความก้าวหน้าทางเภสัชเคมี: การพัฒนาและการวิเคราะห์เภสัชภัณฑ์และผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร 24 กรกฎาคม 2549 ณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
- ชุติมา ลิ้มมัทวาทิรต์ สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเล เสวนาอาศรมความคิด เรื่อง ยาจากสมุนไพร การแพทย์ทางเลือก วันที่ 22 กุมภาพันธ์ 2549 ห้องประชุม 221-222 ชั้น 2 อาคารสถาบัน 2 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- ชุติมา ลิ้มมัทวาทิรต์ การแยกและการทำให้บริสุทธิ์ โครงการสัมมนาและฝึกอบรม เรื่องความก้าวหน้าทางเภสัชเคมี: การพัฒนาและการวิเคราะห์เภสัชภัณฑ์และผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร 24 กรกฎาคม 2549.
- Chutima Limmatvapirat Drug from the sea "Current in Therapy and New Drug I", Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Thailand, 30th November-1st December, 2002.
- ชุติมา ลิ้มมัทวาทิรต์ การตรวจหา steroid ในผลิตภัณฑ์สมุนไพร โครงการสัมมนา เรื่องความก้าวหน้าทางเภสัชเคมี 2: การพัฒนาและการวิเคราะห์เภสัชภัณฑ์และผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (โครงการบริการวิชาการแก่ชุมชน ประจำปีงบประมาณ 2550) คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร 27 กรกฎาคม 2549
- ชุติมา ลิ้มมัทวาทิรต์ พิษภัยของโลหะหนักที่มาในอาหาร: ภัยใกล้ตัวที่ต้องระวัง (Heavy metal toxicity from food: the closet danger to be aware) ประชุมวิชาการจับกระแสการรักษาและยาใหม่ ครั้งที่ 4 วันที่ 7 พ.ค. 2553 เวลา 14.50-15.50 น. ณ โรงแรมนารายณ์
- Chutima Limmatvapirat. Determination of Heavy Metals in Rhizomes of *Alpinia galanga* by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. The 4th International Conference on Advanced Design and Manufacture (ADM2011) 21-23 September 2011, Kunming, China.
- Chutima Limmatvapirat . Determination of Heavy Metals in Fruits of *Capsicum annuum* L. by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. The 4th International Conference on Advanced Design and Manufacture (ADM2011) 21-23 September 2011, Kunming, China.
- Chutima Limmatvapirat. Determination of Heavy Metals in Cultivated Soils and Zingiberaceous Plant. The 2nd International Symposium on Mechanical Science and Technology (ISMST 2011) 20-21 December 2011, Guangzhou, China.
- ชุติมา ลิ้มมัทวาทิรต์ ความรู้ทั่วไปเรื่องผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ประโยชน์และความจำเป็นในการบริโภค ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร และปริมาณโลหะหนักในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและการควบคุมคุณภาพ โครงการอบรมเรื่องความจำเป็นของผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อสุขภาพในชีวิตประจำวัน คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วันที่ 16 มิถุนายน 2554 ณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

8.5 หนังสือ

- ชุติมา ลิ้มมัทวาทิรต์. (2545). ยาจากทะเล. อนุรักษ์ อนุรักษ์ (บรรณาธิการ) ใน การประชุมวิชาการเรื่องจับกระแสนการรักษายาและยาใหม่. หน้า 93-108. นครปฐม: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- ชุติมา ลิ้มมัทวาทิรต์, นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ สเปกโตรสโกปี, พิมพ์ครั้งที่ 1 นครปฐม: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร, 2546. ISBN 974-600-962-1 จำนวน 359 หน้า
- ชุติมา ลิ้มมัทวาทิรต์, สเปกโตรสโกปี, พิมพ์ครั้งที่ 1 นครปฐม: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร, 2547. ISBN 974-9624-03-3 จำนวน 272 หน้า
- ชุติมา ลิ้มมัทวาทิรต์ "ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร" ใน จันทนา เวสพันธ์ และระพีพรรณ ฉลองสุข (บรรณาธิการ) อาหารเพื่อสุขภาพ พิมพ์ครั้งที่ 2 นครปฐม: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร; มหาวิทยาลัยศิลปากร; 2547. หน้า 107-132.
- ชุติมา ลิ้มมัทวาทิรต์, นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ สเปกโตรสโกปี, พิมพ์ครั้งที่ 2 นครปฐม: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร, 2548. ISBN 974-600-962-1 จำนวน 359 หน้า
- ชุติมา ลิ้มมัทวาทิรต์, สเปกโตรสโกปี, พิมพ์ครั้งที่ 2 นครปฐม: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร, 2548. ISBN 974-9624-03-3 จำนวน 272 หน้า
- ชุติมา ลิ้มมัทวาทิรต์ 1. ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ระพีพรรณ ฉลองสุข อาหารเพื่อสุขภาพ พิมพ์ครั้งที่ 3 คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม 2549 ISBN 974-641-098-9 หน้า 133-163.
- ชุติมา ลิ้มมัทวาทิรต์ 1. ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร อาหารเพื่อสุขภาพ ฉบับพิมพ์ครั้งที่ 4 พ.ศ. 2551 หน้า 135-168
- สันทยา ลิ้มมัทวาทิรต์ และชุติมา ลิ้มมัทวาทิรต์ หนังสือประกอบการประชุมวิชาการ Technology diversity for pharmaceutical products development วันที่ 28-29 เมษายน 2554 จัดโดยคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ณ ห้องประชุม 1 ชั้น 5 อาคารหม่อมหลวงปิ่น มาลากุล สำนักหอสมุดกลาง หัวข้อเรื่อง Mechanochemical Process as Green Technology for Drug Development

8.7 รางวัลที่เคยได้รับ (เกี่ยวกับงานวิจัย)

- Limmatvapirat, C., Dolma, N. Analysis of dexamethasone and prednisolone in traditional medicines by thin layer chromatography using optimum mobile phase. The 1st Silpakorn University Research Fair, Silpakorn University, Nakhon Pathom, Thailand, November 22, 2007. (poster presentation)

8.8 งานอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง -

8.9 งานวิจัยที่กำลังทำ

- โครงการตรวจวิเคราะห์และทดสอบคุณภาพผลิตภัณฑ์สมุนไพรชุมชนเพื่อพัฒนามาตรฐานด้านความปลอดภัยแก่ผู้บริโภค สนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร (ผู้ร่วมโครงการ)
- โครงการผลของสารก่อเกล็ดต่อคุณสมบัติเอนเทอริกและความคงตัวของเซลล์ฟิล์ม สนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว) (ผู้ร่วมโครงการ)
- โครงการการวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักในสมุนไพรแห้งและเครื่องยาไทยที่จำหน่ายในท้องตลาด สนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร (ผู้ร่วมโครงการ)

ประวัติผู้ร่วมวิจัย
นายธวัชชัย แพชมัด

1. ชื่อ - สกุล (ภาษาไทย) นายธวัชชัย แพชมัด
(ภาษาอังกฤษ) Thawatchai Phaechamud

2. วัน เดือน ปีเกิด 27 เมษายน พ. ศ. 2511

3. ตำแหน่งทางวิชาการปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

4. หน่วยงานและที่อยู่ติดต่อได้

สถานที่ทำงาน ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ นครปฐม 73000
โทรศัพท์: 01-9414205, 034-255800 โทรสาร: 034-255801
Email: thawatchai@su.ac.th; thawatchaienator@gmail.com

ที่อยู่ปัจจุบัน 42 หมู่ 1 ต. หอมเกร็ด อ. สามพราน จ. นครปฐม 73100

5. ประวัติการศึกษา

ปริญญาเอก สาขาเภสัชกรรม Ph.D. (Pharmaceutics) 2542 คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปริญญาโท สาขา เภสัชอุตสาหกรรม M.Sc. (Manufacturing Pharmacy) 2538 คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปริญญาตรี 2533 เภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

6. วิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษา (ชื่อเรื่อง/ปีที่ดำเนินการทั้งระดับปริญญาโทและปริญญาเอก)

- ระดับปริญญาโท Effect of variables in chitosan film on propranolol hydrochloride coated tablets
- ระดับปริญญาเอก Film-coating of chitosan onto propranolol hydrochloride tablet: Approach to fast and extended drug release

7. สาขาวิชาที่มีเชี่ยวชาญ

สาขาวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช ด้านเภสัชกรรม เภสัชอุตสาหกรรม ในด้าน

- Kinetics of drug release
- Controlled drug delivery system
- Herbal preparation and development
- Polymeric film characterization
- Compatibility between dye and polymer

8. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

8.1 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

Variables affecting the release of propranolol hydrochloride from layered hydrophilic matrix tablets. 2003.
Silpakorn University Research & Development Institute (หัวหน้าโครงการวิจัย)

Enhancement of the aqueous solubility of curcuminoid with solid dispersion techniques. Preliminary study. Faculty of Pharmacy, Silpakorn University. (หัวหน้าโครงการวิจัย)

The control of drug release from capsule using polyelectrolyte complex system of chitosan and anionic polymers. 2005. Silpakorn University Research & Development Institute (หัวหน้าโครงการวิจัย)

IPUS 2005. Preparation of Risperidone Orodispersible Tablet. The Thai Research Fund, Thailand (หัวหน้าโครงการวิจัย)

New Researchers Grant 2004, The Thai Research Fund, Thailand (หัวหน้าโครงการวิจัย)

8.2 Publications

Thawatchai Phaechamud and Kotchamon Yodkhum. 2012. Characteristic of hydroxypropyl methyl cellulose gel comprising gallic acid dispersed in N-methyl pyrrolidone. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 3(1): 347-351.

Thawatchai Phaechamud, Kotchamon Yodkhum, Chutima Limmatvapirat and Penpan Wetwitayaklung. 2012. Morphology, thermal and antioxidative properties of water extracts from *Sonneratia caseolaris* (L.) Engl. prepared with freeze drying and spray drying. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 3(1): 725-739.

Thawatchai Phaechamud and Manisara Phiriyawirut. 2011. *In vitro* cytotoxicity and degradability tests of gallic acid-loaded cellulose acetate electrospun fiber. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 2(3): 85-98.

Manisara Phiriyawirut and Thawatchai Phaechamud. 2011. Suitable Electrospinning Condition for Gallic Acid-loaded Cellulose Acetate Fiber. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 2(3): 210-220.

Chutima Limmatvapirat, Juree Charoenteeraboon, Penpan Wetwitayaklung, Chanokporn Sukonpan and Thawatchai Phaechamud. 2011. Stability and antioxidant activity of polyphenols in methanolic extracts of *Sonneratia caseolaris* seeds. *Advanced Material Research* 146-147: 1062-5.

T. Phaechamud, W. Mueannoorn, S. Tuntarawongsa and S. Chitrattha. 2010. Preparation technique for coated valproic acid and sodium valproate sustained-release matrix tablet. *Indian Journal Pharmaceutical Sciences* 72(2): 30-40 (impact factor 0.455).

A. Mesnukul, K. Yodkhum, J. Mahadlek and **T. Phaechemud**. 2010. Characterization of Indomethacin Release from Polyethylene Glycol Tablet Fabricated With Mold Technique. *Indian Journal Pharmaceutical Sciences* 72(1): 92-100 (impact factor 0.455).

Kotchamon Yodkhum, Sumalee Wannachaiyasit and Thawatchai Phaechemud. 2010. Gallic thermosensitive gel. *Advanced Material Research* 93-94:433-438.

Anongnart Mesnukul, Kotchamon Yodkhum and **Thawatchai Phaechemud**. 2009. Solid dispersion matrix tablet comprising indomethacin-PEG-HPMC fabricated with fusion and mold technique. *Indian Journal Pharmaceutical Sciences* 71(4): 413-420.

Thawatchai Phaechemud, Juree Charoenteeraboon, Jongjan Mahadlek. 2009. Characterization and *in-vitro* drug release of a chitosan-magnesium stearate monolithic matrix system. *Asian J Pharmaceutical Science* 4(5): 265-276.

N. Hongstith, T. Chairuangst, T. Phaechemud and **S. Choopun**. 2009. Growth kinetic and characterization of tetrapod ZnO nanostructures. *Solid State Communications* 149: 1184-1187. (impact factor: 1.557)

Thawatchai Phaechemud, Photchanart Toprasri, and Chatchai Chinpaisal. 2009. Antioxidant activity of *Areca catechu* L. extracts in human hepatocarcinoma HepG2 cell lines. *Pharmaceutical Biology*. 47(3) March: 242-247. (Impact factor: 0.397).

Thawatchai Phaechemud and Garnpimol C. Ritthidej. 2008. Formulation variables influencing drug release from layered matrix system comprising chitosan and xanthan gum. *AAPS PharmSciTech* 9(3): 870-877. (impact factor 1.445)

Thawatchai Phaechemud and Juree Charoenteeraboon. 2008. Antibacterial activity and drug release of chitosan sponge containing doxycycline hyclate. *AAPS PharmSciTech* 9(3): 829-835. (impact factor 1.445)

Thawatchai Phaechemud, 2008. Variables Influencing Drug Release from Layered Matrix System Comprising Hydroxypropyl Methylcellulose. *AAPS PharmSciTech*. 9(2): 668-674. (impact factor 1.445)

Thawatchai Phaechemud and Garnpimol C. Ritthidej. 2007. Sustained-release from Layered Matrix System Comprising Chitosan and Xanthan Gum. *Drug Development Industrial Pharmacy* 33(6): 395-405. (Impact factor: 0.821)

Ritthidej, G. C., and Phaechemud, T. (2003) "Effect of anionic water-soluble dyes on film coating properties of chitosan acetate" *Drug Dev. Ind. Pharm.* 29(5): 585-594.

Ritthidej, G. C., Phaechemud, T. and Koizumi, T. (2002) "Moist heat treatment on physicochemical change of chitosan salt films" *Int. J. Pharm.* 232,11-22.

Koizumi, T., Ritthidej, G. C. and Phaechemud, T. (2001) "Mechanistic modeling of drug release from chitosan coated tablets" *J. Controlled Release* 70: 277-284.

Phaechamud, T., Koizumi, T. and Ritthidej, G. C. (2000) "Chitosan citrate as film former: compatibility with water-soluble anionic dyes and drug dissolution from coated tablet" *Int.J.Pharm.***198**, 97-111.

Ritthidej, G. C., **Phaechamud, T.** and Koizumi, T. (2000) "Additives in moist-heat-treated chitosan acetate films: a method to extend the release of propranolol hydrochloride-coated tablets" *STP. Pharma. Sci* 10(1), 112-119.

8.3 Presentations

ธวัชชัย แพชมัด และ จงจันทร์ มหาดเล็ก การประเมินลักษณะกายภาพเจลลุ่มสำหรับใช้รักษาโรคปริทันต์อักเสบ **The 3rd Annual Northeast Pharmacy Research Conference** คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี จังหวัดอุบลราชธานี, วันที่12-13 กุมภาพันธ์ 2554, หน้า 82-87

ธวัชชัย แพชมัด และ ศติประภา ชิตรัตตา โครงสร้างความพรุนสูงโคโตนที่ขึ้นรูปด้วยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง **The 3rd Annual Northeast Pharmacy Research Conference** คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี จังหวัดอุบลราชธานี, วันที่12-13 กุมภาพันธ์ 2554, หน้า 117-122.

ธวัชชัย แพชมัด อรุณี เชื้อแก้ว และ กษมน ยอดขำ ปริมาณสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกในชาชงจากส่วนต่างๆ ของลำพู (*Sonneratia caseolaris* (Linn.) Engl.) และผลของการทำแห้งด้วยเทคนิคต่างๆ ที่มีต่อปริมาณสารประกอบกลุ่มฟีนอลิก **The 3rd Annual Northeast Pharmacy Research Conference** คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี จังหวัดอุบลราชธานี, วันที่12-13 กุมภาพันธ์ 2554, หน้า 133-139.

ธวัชชัย แพชมัด และ ชุตติมา ลิ้มมัทวาทิธิ์ ปริมาณและการปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากลำพูที่สกัดด้วยน้ำร้อน **The 3rd Annual Northeast Pharmacy Research Conference** คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี จังหวัดอุบลราชธานี, วันที่12-13 กุมภาพันธ์ 2554, หน้า 42-45.

ปรัชญา เกตุวงศา และ ธวัชชัย แพชมัด การพัฒนาเจลกรดแกลลิก บทความวิจัย **การประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัย/และสร้างสรรค์ ศิลปการวิจัยครั้งที่ 4** ศูนย์ศิลปวัฒนธรรมเฉลิมพระเกียรติ 6 รอบ พระชนพรรษา มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ อ. เมือง จ. นครปฐม วันที่ 19-21 มกราคม 2554 หน้า P-331-P-334.

ชนกพรหม สุนทรพันธุ์, ชุตติมา ลิ้มมัทวาทิธิ์, จุรีย์ เจริญธีรบุรณ, ภัทราวดี เหลืองรูปราณี และ ธวัชชัย แพชมัด การศึกษาเครื่องหมายในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารสำคัญในสารสกัดหยาบในเมธานอลของลำพู (*S. caseolaris*) โดยใช้เทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี แมสสเปคโตรเมทรี บทความวิจัย **การประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัย/และสร้างสรรค์ ศิลปการวิจัยครั้งที่ 4** ศูนย์ศิลปวัฒนธรรมเฉลิมพระเกียรติ 6 รอบ พระชนพรรษา มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ อ. เมือง จ. นครปฐม วันที่ 19-21 มกราคม 2554 หน้า P-362-P-366.

ใจเอก ชลชีวะ และ ธวัชชัย แพชมัด การเปรียบเทียบการยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตต้นกล้าผักกาดหอมของสารสกัดจากเปลือก รากอากาศ และเมล็ดลำพู บทความวิจัย **การประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัย/และสร้างสรรค์ ศิลปการวิจัยครั้งที่ 4** ศูนย์ศิลปวัฒนธรรมเฉลิมพระเกียรติ 6 รอบ พระชนพรรษา มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ อ. เมือง จ. นครปฐม วันที่ 19-21 มกราคม 2554 หน้า P-318-P-321.

8.4 Invited Speaker

Updating the use of global nanomaterials in cosmetics: sunscreens, anti-aging treatments and hair cosmetics. In Cosmetics, skincare and fragrance 2010. The Asia Business Forum, 9-10 September 2010, Grand Millenium Sukhumvit, Bangkok, Thailand.

เทคโนโลยีการผลิตตำรับเครื่องสำอางจากสารธรรมชาติ การประชุมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง สมุนไพรเพื่อความงามและสุขภาพ (Herbals for Aesthetic and Health) คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ สมุทรปราการ 10 ต.ค. 2552

8.5 หนังสือ

รัชชัย แพชมัด การพัฒนายาเม็ดเมทริกซ์ชนิดรับประทาน หนังสือประชุมวิชาการ Technology diversity for pharmaceutical products development โดย ปราณีต โอปะณะโสภิต และคณะ, 2554

รัชชัย แพชมัด เทคโนโลยีการผลิตตำรับเครื่องสำอางจากธรรมชาติ 2552 มัณฑนา ภาณุมากรณ์ เครื่องสำอางเพื่อความงามและสุขภาพ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ สมุทรปราการ สำนักพิมพ์กรุงเทพเวชสาร เขตวัฒนา กรุงเทพมหานคร หน้า 185-198.

8.6 บทความทางวิชาการ

Sarun Tantarawongsa and Thawatchai Phaechemud. 2011. "Eutectic system in pharmaceutical applications" Thai Pharm. Health Sci. J. 6(1): 66-72. (*Thai version*)

8.7 รางวัลที่เคยได้รับ (เกี่ยวกับงานวิจัย)

- **First prize award (together with Manisara Phiriyawirut).** (Release mechanism of gallic acid-loaded cellulose acetate electrospun mat). **The Third International Conference on Natural Products for Health and Beauty.** Rungsit University 16-18 March 2011. The Emerale hotel, Bangkok, Thailand.
- **Third oral presentation award (together with Nin Prapongsena, and Juree Charoenteeraboon).** (Hepatoprotective effect of *Sonneratia caseolaris* methanolic seed extract, luteolin and luteolin-7-O- β -glycoside against ethanol in HepG2 cell). **The 3rd Annual Northeast Pharmacy Research Conference.** Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University, Thailand, February 21-26, 2011.
- **Best oral presentation award (together with Waraporn Kaewprayoon, Panee Srisa-ard and Suporn Charumanee).** (Development of colon-targeted drug delivery system using polysaccharaides from konjac). **The 3rd Annual Northeast Pharmacy Research Conference.** Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University, Thailand, February 21-26, 2011.
- **Poster Award, (together with Kotchamon Yodkhum and Sumalee Wannachaiyasit)(Gallic thermosensitive gel).****International Conference on Functionalized and sensing materials (FuSeM 2009),** 7-9 December 2009, Chulabhorn Convention Center, Bangkok, Thailand.
- **Senior Popular Vote Award, (together with Panida Sotanasomboon and Wattanaporn srirach) (Dog Mouth and Breath Smell Eradication Product).** **IPUS: Industrial Projects for Undergraduate Students.** 25-29th March, 2009, Siam Paragon, Bangkok Thailand.

- Senior Poster Award, (together with Jongjan Mahadlek, Supab Choopun and Juree Charoenteeraboon) (Characterization of Typical and Nano Zinc Oxide). **2st Silpakorn University Research Fair.** (18-19th December, 2008, Silpakorn University, Thapha, Bangkok Thailand. pp. 578-584)
- Alumni Award 2008, Silpakorn University Alumni, Silpakorn University, Thapha, Bangkok, Thailand, October 12, 2008.
- Senior Poster Award, (together with Taksin Srichan and Juree Charoenteeraboon) (Cytotoxic Activity of Edible Flower Extracts in Huh 7. **Current in Therapy and New Drug III: Natural sources & active compound discovery**, Asia hotel, Bangkok, Thailand, April 24-25, 2008. P-28)
- Good Poster Award, (together with Chutima Limmatvapirat, Juree Charoenteeraboon, Penpun Wetwitayaklung) (The Total Polyphenol Contents of Exuding Latex and Juice from Banana Flowers. **1st Silpakorn University Research Fair.** 22th November, 2007, Silpakorn University, Nakhon Pathom, Thailand. pp. 586-592)
- Good Poster Award, (together with **Juree Charoenteeraboon**) (Fabrication of chitosan sponge containing doxycycline hyclate. **The 5th National Conference on Biomedical Engineering (NCBME 2007).** Twin Tower Hotel, Bangkok, Thailand, 8th July, 2007. pp. 193-196.)
- Second Poster Award, (together with Photchanart Toprasri) (Hydrophobic Colloidal Silicon Dioxide As Gel Base for Controlled Drug Release. **Innovation: Applications of Nanotechnology in Pharmaceuticals, Cosmetics and Natural Products.** Lotus Hotel, Pang Suan Kaew, Chiangmai, Thailand. 9-11 August, 2006. pp: 281-282.)
- Best Poster Award in Session: Polymers, (together with Garmpimol C. Ritthidej) (Controlled Release of Propranolol HCl from Chitosan-Lactose-Xanthan Gum Matrix Tablets. **The Fourth Thailand Materials Science and Technology Conference.** Thailand Science Park, Patumthani, Thailand March 31- April 1, 2006. PP04, pp. 411-413.)
- Outstanding Poster Award, (together with Penpun Wetwitayaklung, Chutima Limmatvapirat, Thawatchai Phaechamud, Sindchai Keokitichai.) (The Study of Antioxidant Activities of *Musa sapientum* L. Flowers by Trolox Equivalent Antioxidant Capacity Assay. **The 2nd AASP Symposium and 2nd APEM Conference 2005: Regional Cooperation In Pharmacy Education, Research And Services.** Montein Riverside Bangkok, Thailand 14th-17th November 2005. PP N6, p. 149-152.)

8.8 งานอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง

- ไม่มี

8.9 งานวิจัยที่กำลังทำ

- ไม่มี

ประวัติผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ - สกุล (ภาษาไทย). นางสาวชนกพรหม์ สุกนธ์พันธุ์

(ภาษาอังกฤษ). Ms. Chanokporn Sukonpan

2. วัน เดือน ปีเกิด 28 ธันวาคม พ. ศ. 2507

3. ตำแหน่งทางวิชาการปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

4. หน่วยงานและที่อยู่ติดต่อได้

สถานที่ทำงาน ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์

มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์

อ. เมือง จ. นครปฐม 73000

โทรศัพท์ 034 255800 โทรสาร 034 255801

Email: sukonpan@su.ac.th

ที่อยู่ปัจจุบัน 904 หมู่ 2 ต. บางแคเหนือ อ.บางแค กทม. 10160

5. ประวัติการศึกษา

ปริญญาเอก Ph.D. (Pharmaceutical Sciences) 2545 University of Wisconsin-Madison, USA

ปริญญาโท M.Sc. (Pharmaceutical Sciences) 2542 University of Wisconsin-Madison, USA

ภ.ม. (เภสัชเคมี) 2535 คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปริญญาตรี ภ.บ. (เกียรตินิยม) 2531 คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

6. วิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษา (ชื่อเรื่อง/ปีที่ดำเนินการทั้งระดับปริญญาโทและปริญญาเอก)

- ระดับปริญญาโท

Influence of Cholic acid on Drug dissolution ปีที่ดำเนินการเสร็จ พ.ศ. 2535

- ระดับปริญญาเอก

Design and Assay of Inhibitors of Botulinum Neurotoxin Serotype A and B ปีที่ดำเนินการเสร็จ พ.ศ. 2545

7. สาขาวิชาที่มีเชี่ยวชาญ

สาขาวิทยาศาสตร์เคมีและเคมียา ในด้าน

- Protease inhibitor design
- Protein and peptide analysis
- Protein purification and identification
- Solid Phase peptide synthesis
- Enzyme Kinetics
- Bioassay
- Application of MALDI-TOF in Biomolecular analysis
- HPLC และ LC-MS

8. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

8.1 งานวิจัยที่สำเร็จแล้ว

- Anti microbial resistant compound from *Zanthoxylum limonella* Alston.
- Biological activity of Pinostrobin from *Boesenbergia pandurata*, a calcium signaling pathway inhibitor in *Saccharomyces cerevisiae*
- Resazurin microtitre plate method for screening of anti-microbial resistance from Thai medicinal plants
- Microbial population and quality of Sato: comparison between the use of Loogpang and the mixed pure cultures isolated from the Loogpang

8.2 Publications

1. ชนกพรหม์ สุกนธ์พันธุ์, อาวุธชีวภาพ Botulinum neurotoxin. *วารสารไทยโภชนาการ* 2548, 2(4), 1-10.
2. ชนกพรหม์ สุกนธ์พันธุ์, Botulinum neurotoxin ในการแพทย์. *วารสารไทยโภชนาการ* 2548, 2(5), 16-27.
3. **Sukonpan, C.**, Oost, T., Goodough, M., Tepp, W., Johnson, E.A and Rich, D.H., Synthesis of substrates and Inhibitors of botulinum neurotoxin type A metalloprotease, *J. Peptide Res.*, 2004,63(2),181-93
4. Oost, T., **Sukonpan, C.**, Brewer, M., Goodnough, M., Tepp, W., Johnson, E.A and Rich, D.H., Design and synthesis of substrate-based inhibitors of botulinum neurotoxin type B metalloprotease , *Biopolymers*, 2003,71(6),602-19.
5. Brewer, M., Oost, T., **Sukonpan, C.**, Pereckas, M. and Rich, D.H., Sequencing hydroxyethylamine-containing peptides, *Org. Lett.*, 2002,4, 3469-72.

8.3 Proceedings and Presentations

Rich DH; Oost TK; **Sukonpan C**, Solid-phase synthesis of hydroxyethylamine, alpha-hydroxyamide, and reduced amide isosteres: Novel substrate-based inhibitors of Botulinum neurotoxin A and B proteases, *Abstracts of papers of the American Chemical Society* 1999, Vol. 218, 344-orgn. **(Poster presentation)**

Oost, TK, **Sukonpan C** and Rich DH, *Peptides for the New Millennium* : Proceedings of the 16th American Peptide Symposium, June 26-July 1, 1999, Minneapolis, Minnesota, U.S.A, P615-orgn. **(Poster presentation)**

Oost, TK, **Sukonpan C** and Rich DH, Design and Synthesis of Inhibitors of Botulinum Neurotoxin A and B protease, *Abstracts of papers of the American Chemical Society* 2000, Vol. 220, pp 362-orgn. **(Poster presentation)**

Rich DH, Brewer M, **Sukonpan C**, Oost, TK, Goodnough M, Tepp, W.and Johnson EA, Design and Synthesis of Inhibitors of Botulinum Toxin Metalloprotease, *Abstracts of papers of the American Chemical Society* 2003, Vol. 225, pp U203-orgn. **(Poster presentation)**

8.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

การเพิ่มการดูดซึมเคอร์คูมินผ่านเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้โดยพัฒนาในรูปแบบเคอร์คูมิน-กรดอะมิโน (ผู้ร่วมวิจัย)

