



บทความวิจัย

## การพัฒนาและการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบในการวิเคราะห์สาร Demethylwedelolactone และสาร Wedelolactone (in *Eclipta prostrata*) ด้วยเทคนิค HPLC – PDA

ประดัด มีสวัสดิ์<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>หน่วยเครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี กทม. 10400

\*Email: pradup.mes@mahidol.ac.th

รับบทความ: 23 ธันวาคม 2564 แก้ไขบทความ: 20 มีนาคม 2565 ยอมรับตีพิมพ์: 27 เมษายน 2565

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สำหรับสารดีเมทิลวีดีโลแลคโตน และสารวีดีโลแลคโตน ด้วยเทคนิค HPLC – PDA ของสารสกัดจากต้นกะเม็งด้วยวิธีการสกัดที่ต่างกัน ผลการทดลองเลือกสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารดีเมทิลวีดีโลแลคโตน และสารวีดีโลแลคโตน คือ เฟสเคลื่อนที่ที่มีส่วนผสมของเมทานอลและสารละลายกรดฟอร์มิก 0.05% (โดยปริมาตร) อัตราส่วน 95:5 (โดยปริมาตร) กำหนดอัตราการไหลเท่ากับ 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้การชะแบบแกรเดียนท์ จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบในการวิเคราะห์สารดีเมทิลวีดีโลแลคโตน และสารวีดีโลแลคโตน พบว่ามีค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด เท่ากับ  $0.41 \mu\text{g L}^{-1}$  และ  $0.004 \mu\text{g L}^{-1}$  ตามลำดับ ขีดจำกัดต่ำสุดของการหาปริมาณ เท่ากับ  $1.37 \mu\text{g L}^{-1}$  และ  $0.013 \mu\text{g L}^{-1}$  ตามลำดับ ศึกษาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของสารดีเมทิลวีดีโลแลคโตน พบว่ามีช่วงความเข้มข้น  $5.0 - 25 \mu\text{g L}^{-1}$  มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.998 และสารวีดีโลแลคโตน มีช่วงความเข้มข้น  $1.0 - 25 \mu\text{g L}^{-1}$  มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.999 ตรวจสอบความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ จากผลการทดลองซ้ำในวันเดียวกันโดยศึกษาร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ สารดีเมทิลวีดีโลแลคโตนมีค่าอยู่ในช่วง 0.38 – 1.61 และสารวีดีโลแลคโตนอยู่ในช่วง 1.18 – 1.46 และผลการทดลองซ้ำในแต่ละวันของสารดีเมทิลวีดีโลแลคโตนอยู่ในช่วง 0.34 – 0.47 และสารวีดีโลแลคโตนอยู่ในช่วง 0.59 – 1.20 ตรวจสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ โดยวิธี spiked placebo recovery method พบว่า ร้อยละการกลับคืนของสารดีเมทิลวีดีโลแลคโตนอยู่ในช่วง 89.21 – 97.00% และสารวีดีโลแลคโตนอยู่ในช่วง 100.52 – 100.81 และโดยวิธี standard addition method พบว่า ร้อยละการกลับคืนของสารดีเมทิลวีดีโลแลคโตนอยู่ในช่วง 103.01 – 104.93 และสารวีดีโลแลคโตนอยู่ในช่วง 89.69 – 105.94 อยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้ทั้ง 2 วิธี ผลการศึกษาวิธีการสกัดสารดีเมทิลวีดีโลแลคโตน และสารวีดีโลแลคโตน จากต้นกะเม็งด้วยวิธีแช่หมัก วิธีใช้คลื่นเหนือเสียงช่วยและวิธีการต้ม พบสารดีเมทิลวีดีโลแลคโตน มีปริมาณที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทั้ง 3 วิธี ส่วนสารวีดีโลแลคโตน พบเฉพาะในวิธีแช่หมักและวิธีใช้คลื่นเหนือเสียงช่วย

คำสำคัญ: ดีเมทิลวีดีโลแลคโตน วีดีโลแลคโตน เอชพีแอลซี – พีดีเอ

### อ้างอิงบทความนี้

ประดัด มีสวัสดิ์. (2565). การพัฒนาและการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบในการวิเคราะห์สาร Demethylwedelolactone และสาร Wedelolactone (in *Eclipta prostrata*) ด้วยเทคนิค HPLC – PDA. วารสารวิทยาศาสตร์และวิทยาศาสตร์ศึกษา, 5(1), 85-96.

## Development of demethylwedelolactone and wedelolactone (in *Eclipta prostrata*) analysis by HPLC – PDA and method validation

Pradup Mesawat<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Central Instrument Facility, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, 10400 Thailand

\*Email: pradup.mes@mahidol.ac.th

Received <23 December 2021>; Revised <20 March 2022>; Accepted <27 April 2022>

---

### Abstract

This research aimed to develop and validate the method for the analysis of demethylwedelolactone and wedelolactone in extracted Kameng samples by HPLC – PDA. Various types of Kameng extractions were examined. The optimum condition for separation of demethylwedelolactone and wedelolactone was 99.9% (v/v) methanol and 0.05% (v/v) formic acid at the ratio 95:5 (v/v) as mobile phase. The mode of operation was gradient elution. The results of method validation to analyze demethylwedelolactone and wedelolactone were found as follows: the limit of detection (LOD) 0.41 µg L<sup>-1</sup> and 0.004 µg L<sup>-1</sup>, respectively, and the limit of quantification (LOQ) 1.37 µg L<sup>-1</sup> and 0.013 µg L<sup>-1</sup> respectively. The linearity of demethylwedelolactone in the working range was 5.0 – 25 µg L<sup>-1</sup> (r<sup>2</sup>=0.998), and wedelolactone in the working range was 1.0 – 25 µg L<sup>-1</sup> (r<sup>2</sup>=0.999). The method validation of precision for intraday precision of demethylwedelolactone and wedelolactone were found as 0.38 – 1.61 and 1.18 – 1.46, respectively. The intraday precision of demethylwedelolactone and wedelolactone were found as 0.34 – 0.47 and 0.59 – 1.20 respectively. The percentage of relative standard deviation (%RSD) and accuracy was performed by the spiked standard method. The recovery of demethylwedelolactone and wedelolactone were found as 89.21 – 97.00% and 100.52 – 100.81% respectively. For standard addition method, the recovery of demethylwedelolactone and wedelolactone were found as 103.01 – 104.93% and 89.69 – 105.94% respectively. The recovery of demethylwedelolactone and wedelolactone from both methods was acceptable. Optimum extraction condition of demethylwedelolactone and wedelolactone from Kameng were investigated using maceration, ultrasound-assisted extraction and decoction. The results show that contents of demethylwedelolactone obtained from the three extraction methods were not significantly different, whereas wedelolactone was found only in maceration and ultrasound-assisted methods.

**Keywords:** Demethylwedelolactone, Wedelolactone, High performance liquid chromatography – PDA

---

#### Cite this article:

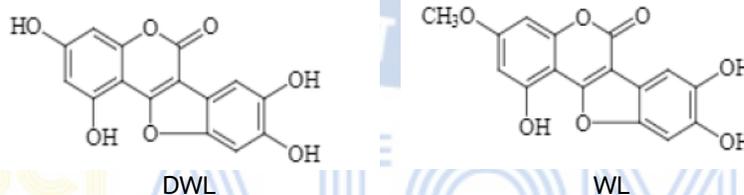
Mesawat, P. (2022). Development of demethylwedelolactone and wedelolactone (in *Eclipta prostrata*) analysis by HPLC–PDA and method validation (in Thai). *Journal of Science and Science Education*, 5(1), 85-96.

## บทนำ

การหาปริมาณวิเคราะห์ควรมีการควบคุมคุณภาพและการประเมินความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์เพื่อให้ได้ผลลัพธ์ที่ถูกต้องแม่นยำมีความจำเพาะต่อสารที่ต้องการวิเคราะห์เกิดความเชื่อมั่นจึงจำเป็นต้องทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (method validation) ด้วยเทคนิค HPLC – PDA เพื่อยืนยันคุณลักษณะเฉพาะของวิธีวิเคราะห์ด้วยวิธีทางสถิติโดยการหาพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้อง เช่น การวิเคราะห์ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (limit of detection, LOD) ขีดจำกัดต่ำสุดของการหาปริมาณ (limit of quantification, LOQ) ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (accuracy) ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (precision) การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linearity) (Chansuvarn, 2021)

สารดีเมทิลเวดีโลแลคโตน (demethylwedelolactone) และสารเวดีโลแลคโตน (wedelolactone) เป็นสารในกลุ่ม coumestans ที่พบในต้นกะเม็ง (*Eclipta prostrata*) มีโครงสร้างทางเคมีดังภาพที่ 1 มีฤทธิ์ต้านไวรัส ต้านอักเสบ ลดระดับไขมันในเลือด ปกป้องตับ ต้านมะเร็งและมีฤทธิ์ปกป้องระบบประสาทกระตุ้นการสร้างรากผม (Jaisin, 2016; Sasidharan *et al.*, 2011) มีรายงานว่าวิธีการสกัดทั้งแบบดั้งเดิม เช่น วิธีแช่หมัก (maceration) การแช่ (percolation) การต้ม (decoction) การตุ๋น (digestion) หรือใช้เทคโนโลยีเข้ามาช่วย เช่น สกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟ (microwave extraction) สกัดสารโดยวิธีใช้คลื่นเหนือเสียงช่วย ultrasound-assisted extraction หรือ sonication extraction และชนิดของตัวทำละลายมีผลต่อชนิดและปริมาณของสารสำคัญ จากการศึกษาของ Aderogba *et al.* (2007) พบว่าสารสกัดจากสมุนไพรในตัวทำละลายที่มีขั้วมากมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าสารสกัดสมุนไพรที่ได้จากตัวทำละลายที่มีขั้วน้อย การศึกษาของ Kumar and Dhanani (2013) พบว่าตัวทำละลายที่มีขั้วมาก เช่น เอ็น – บิวทานอล (n-butanol) เอทิลอะซิเตต (ethylacetate) และ เมทานอล (methanol) พบปริมาณสาร wedelolactone สูงกว่าตัวทำละลายที่มีขั้วน้อย เช่น เฮกเซน (hexane) คลอโรฟอร์ม (chloroform) ส่วนการศึกษาปริมาณของสารทั้งสองชนิดโดยเทคนิค HPLC ที่มีความแม่นยำสูง ดังแสดงใน ตารางที่ 4

สารสกัดจากสมุนไพรนิยมเพื่อใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์นั้นต้องมีความปลอดภัยตามมาตรฐานองค์การอาหารและยา กำหนด ดังนั้นตัวทำละลายจึงมีส่วนสำคัญในการนำมาใช้ในการสกัดสารสำคัญจากพืช ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาและการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบในการวิเคราะห์สาร demethylwedelolactone และสาร wedelolactone ด้วยเทคนิค HPLC – PDA ของสารสกัดจากต้นกะเม็งด้วยวิธีการสกัดและชนิดของตัวทำละลายที่มีความปลอดภัยสูงในสัดส่วนความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เพื่อใช้เป็นแนวทางให้ได้สารสำคัญทั้งสองชนิดที่ปลอดภัยสำหรับใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ต่อไป



ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของสาร demethylwedelolactone (DWL) และสาร wedelolactone (WL) (Mendes *et al.*, 2014)

## วิธีดำเนินการวิจัย

### สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมี : Ethanol AR grade  $\geq 95\%$ , Methanol HPLC grade  $\geq 99\%$ , Acetonitrile HPLC grade  $\geq 98\%$ , Formic acid LC-MS grade  $\geq 98\%$ , Acetic acid HPLC grade  $\geq 98\%$ , Demethylwedelolactone AR grade (CAS No; 6458-55-9)  $\geq 98\%$ , wedelolactone AR grade (CAS No; 524-12-9)  $\geq 98\%$

## อุปกรณ์และเครื่องมือ

**อุปกรณ์และเครื่องมือ** : เครื่อง HPLC ยี่ห้อ Waters รุ่น Waters 717 คอลัมน์ ยี่ห้อ Waters รุ่น Reliant™ C18, pump ยี่ห้อ Waters รุ่น Waters 600 pump/controller, ส่วนตรวจวัด ยี่ห้อ Waters รุ่น Waters™ PDA 996 เครื่อง ultrasonic ยี่ห้อ Elma Schmidbauer GmbH รุ่น Elmasonic P 180 H เครื่อง rotary evaporator ยี่ห้อ Buchi รุ่น R205 เครื่อง freeze dryer ยี่ห้อ Christ รุ่น Alpha1-2LD

### การสกัดสารจากต้นกะเม็ง

วิธีที่ 1 วิธีการแช่หมัก ชั่งผงกะเม็งแห้ง 50 g เติมลงในเอทานอลเข้มข้น 95% (v/v) ปริมาตร 500 mL ในขวดสีชา ปิดฝาขวดให้สนิท เขย่าให้เข้ากัน วางไว้บนเครื่อง shaker เปิดเขย่าเบา ๆ เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิห้อง นำน้ำหมักเอทานอลมารองผ่านกระดาษกรอง Whatman no.1 แล้วนำกากตัวอย่างที่ผ่านการหมักรอบแรกมาเติมเอทานอลเพื่อหมักต่อไป อีก 2 ครั้ง นำน้ำหมักเอทานอลที่กรองได้ไปรวมกับที่กรองได้ครั้งแรก นำไประเหยเอทานอลออกด้วยเครื่อง rotary evaporator (Sasidharan *et al.*, 2011)

วิธีที่ 2 วิธีใช้คลื่นเหนือเสียงช่วย ชั่งผงกะเม็งแห้ง 50 g เติมลงในเอทานอลเข้มข้น 70% (v/v) ปริมาตร 500 mL นำไปสกัดด้วยเครื่อง ultrasonic กำหนดคลื่นความถี่ 120 kHz อุณหภูมิ 80 °C เวลา 8 ชั่วโมง ตั้งไว้ให้เย็น กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman no.1 นำไประเหยเอทานอลออกด้วยเครื่อง rotary evaporator จากนั้นนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze dryer (Lee, 2017)

วิธีที่ 3 การสกัดด้วยวิธีการต้ม นำผงกะเม็งแห้งปริมาณ 50 g เติมลงในน้ำเดือด ปริมาตร 500 mL ต้มต่อไป 5 นาที ตั้งไว้ให้เย็นแล้วนำมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman no.1 นำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze dryer เก็บตัวอย่างที่แห้งในถุงสีชาแช่ในตู้เย็นเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป (Chumark *et al.*, 2008)

ซึ่งสารสกัดจากทั้ง 3 วิธี ขนาด 20 มิลลิกรัม ละลายในเมทานอล 20 mL มีความเข้มข้น  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  จากนั้นทำการกรองด้วย filter membrane ชนิด nylon ขนาด 0.45 ไมครอน ปีเปตสารสกัดปริมาตร 1,000  $\mu\text{L}$  เจือจางด้วยสารละลายเมทานอลปริมาตร 10 mL จะได้ความเข้มข้น  $100 \text{ mg L}^{-1}$

### การเตรียมสารละลายมาตรฐาน demethylwedelolactone และ wedelolactone

เตรียมสารละลายเมทานอลลงในขวดบรรจุสารมาตรฐาน demethylwedelolactone ขนาด 20 mg และสารละลายมาตรฐาน wedelolactone ขนาด 20 mg ขวดละ 1,000  $\mu\text{L}$  ได้สารละลายมาตรฐานเข้มข้น  $20 \text{ mg mL}^{-1}$  กรองด้วย filter membrane ชนิด nylon ขนาด 0.45 ไมครอน เก็บในตู้เย็น  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  ใช้เป็น stock standard solution

เตรียมสารละลายมาตรฐานสำหรับช่วงการวิเคราะห์ (working range) โดยปีเปตสารละลายมาตรฐานจาก stock standard solution ปริมาตร 250  $\mu\text{L}$  ปรับปริมาตรด้วยเมทานอลเป็น 50 mL จะได้ความเข้มข้น  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  จากนั้นปีเปตสารมาตรฐานความเข้มข้น  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  ปริมาตร 125  $\mu\text{L}$  ปรับปริมาตรด้วยเมทานอลเป็น 50 mL จะได้ความเข้มข้น  $250 \mu\text{g L}^{-1}$  จากนั้นปีเปตสารมาตรฐานความเข้มข้น  $250 \mu\text{g L}^{-1}$  ปริมาตร 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mL ปรับปริมาตรด้วยเมทานอลเป็น 25 mL จะได้ความเข้มข้น 0, 1.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0 และ  $25.0 \mu\text{g L}^{-1}$  ตามลำดับ

### การวิเคราะห์สาร demethylwedelolactone และสาร wedelolactone ด้วยเทคนิค HPLC – PDA

เทคนิค HPLC – PDA ปรับปรุงจากวิธีของ Mendes *et al.* (2014) โดยวิเคราะห์หาปริมาณ สาร demethylwedelolactone และสาร wedelolactone ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) บริษัท Waters (USA) รุ่น Waters 717, Waters 600 pump/controller ตรวจวัดสัญญาณด้วย photo diode array (PDA) detector กำหนดความยาวคลื่นที่ 352 นาโนเมตร ใช้คอลัมน์ Reliant™ C18 reverse phase ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4.6 mm ความยาว 250 mm ขนาดอนุภาค 5  $\mu\text{m}$  อัตราการไหล  $0.6 \text{ mL min}^{-1}$  ปริมาตรของสารที่ฉีด 10  $\mu\text{L}$  ระยะเวลาที่ใช้วิเคราะห์ (run time) 15 min โดยศึกษาความแตกต่างของเฟสเคลื่อนที่ทั้งหมด 6 สภาวะ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสาร demethylwedelolactone และสาร wedelolactone ออกจากกัน ดังตารางที่ 1

**ตารางที่ 1** การศึกษาสภาวะสำหรับ HPLC ในการตรวจวิเคราะห์ demethylwedelolactone และ wedelolactone

Conditions	Mobile phase formula	Ratio (v/v)
Gradient	1 A: Methanol, B: 0.05% Acetic acid	0 min, (5%) B
	2 A: Methanol, B: 0.05% Formic acid	3 min, (50%) B
	3 A: Methanol, B: Acetonitrile	8 min, (20%) B 9 - 15 min, (5%) B
Isocratic	4 A: Methanol, B: 0.05% Acetic acid	5% B
	5 A: Methanol, B: 0.05% Formic acid	5% B
	6 A: Methanol, B: Acetonitrile	30% B

**การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (Method validation)**

การกำหนดขอบเขตในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบได้ตรวจสอบตามวิธีของ Chansavarn (2021) โดยการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (ตอนที่ 2) คุณลักษณะเฉพาะที่แสดงคุณสมบัติของวิธีโดยศึกษาพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้อง ดังนี้

- ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (LOD) และขีดจำกัดต่ำสุดของการหาปริมาณ (LOQ) โดยวิธี based on signal to noise โดยการฉีดสารละลายเมทานอล (blank) จำนวน 10 ซ้ำ ทำการวิเคราะห์สัญญาณวัดได้จาก blank เปรียบเทียบกับสัญญาณของสาร demethylwedelolactone และสาร wedelolactone โดย LOD กำหนดจากค่าความเข้มข้นของสาร demethylwedelolactone และสาร wedelolactone ที่เครื่องมือวิเคราะห์สามารถตรวจวัดสัญญาณได้ ค่าที่ยอมรับคือ 3 ต่อ 1 ส่วน LOQ กำหนดจากปริมาณต่ำสุดของสาร demethylwedelolactone และสาร wedelolactone ที่เครื่องมือวิเคราะห์สามารถตรวจวัดสัญญาณได้ ค่าที่ยอมรับคือ 10 ต่อ 1

ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linearity) เตรียมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 1.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0 และ 25.0  $\mu\text{g L}^{-1}$  วิเคราะห์ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างสัญญาณกับความเข้มข้นสารมาตรฐานโดยวิเคราะห์พิสัยของเส้นตรง (linear range) โดยการเติมสารมาตรฐานความเข้มข้น 0.00, 0.75, 1.50 และ 7.50  $\mu\text{g L}^{-1}$  ในตัวอย่างที่สกัดด้วยวิธีแช่หมัก โดยวิเคราะห์ความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ คำนวณหาค่าเฉลี่ย และ %recovery ที่แต่ละความเข้มข้น เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกับความเข้มข้น (ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟกับความเข้มข้น)

- ความเที่ยงของวิเคราะห์ (precision) โดยการ spiked samples ด้วยสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 7.50  $\mu\text{g L}^{-1}$  ทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ นำค่าที่ได้มาคำนวณหา %RSD จากสูตร

$$\text{The percent relative standard deviation (\%RSD)} = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$$

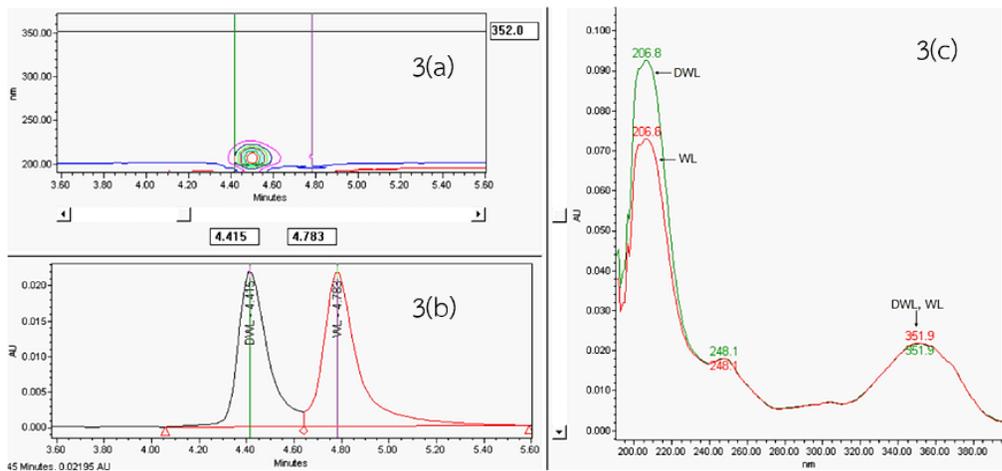
- ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (accuracy) โดยการ spiked samples ด้วยสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 7.50  $\mu\text{g L}^{-1}$  ทำการวิเคราะห์ 9 ซ้ำ นำค่าที่ได้มาคำนวณหา %Recovery จากสูตร

$$\text{The percent recovery} = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100$$

กำหนดให้  $C_1$  = ปริมาณสาร DWL และ WL ในตัวอย่างสารสกัด ที่เติมด้วยสารมาตรฐาน DWL และ WL  
 $C_2$  = ปริมาณสาร DWL และ WL ในตัวอย่างสารสกัด  
 $C_3$  = ปริมาณสารมาตรฐาน DWL และ WL ที่เติมลงในตัวอย่างสารสกัด

## ผลการวิจัยและอภิปรายผล

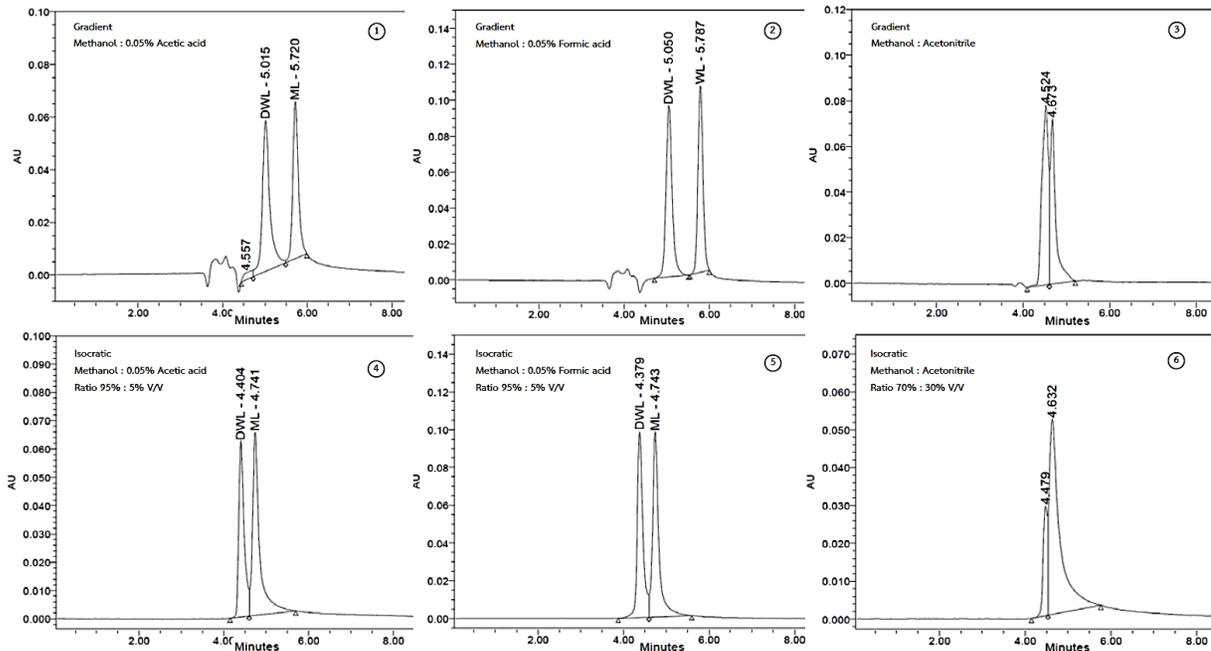
การตรวจสอบช่วงคลื่นแสงที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ demethylwedelolactone และ wedelolactone โดยพิจารณาจากช่วงคลื่นแสงที่สามารถดูดกลืนแสงได้อยู่ระหว่าง 190 นาโนเมตร ถึง 400 นาโนเมตร สเปกตรัมที่แสดงค่าการดูดกลืนสูงสุด ( $\lambda_{max}$ ) ที่ความยาวคลื่น 206.8 นาโนเมตร และ 351.9 นาโนเมตร (ภาพที่ 3c) เมื่อพิจารณาความยาวคลื่นต่ำสุดที่ดูดกลืนรังสี (UV cut off) ของตัวทำละลายต้องมีค่าน้อยกว่าความยาวคลื่นสูงสุดของสารที่ต้องการวิเคราะห์พบว่าความยาวคลื่นต่ำสุดที่ดูดกลืนรังสีของเมทานอลเท่ากับ 205 นาโนเมตร ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับความยาวคลื่นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ คือ 206 นาโนเมตร อาจทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการวิเคราะห์ ประกอบกับผล PDA contour plot spectrum (3a) เมื่อ extract โครมาโทแกรมที่มีความยาวคลื่น 352 นาโนเมตร พบว่า ลักษณะของ contour plot ของสารทั้ง 2 ชนิดสามารถแยกออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์มีค่า retention time มากกว่า 0.3 min แสดงว่าสเปกตรัมที่ได้มีความบริสุทธิ์ โดยยืนยันค่าการดูดกลืนแสงและ peak purity จาก Chromatogram Plot (3b) ที่ช่วงคลื่น 352 นาโนเมตร มีความจำเพาะของสารทั้ง 2 ชนิด ดังนั้นช่วงคลื่นที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์สาร demethylwedelolactone และสาร wedelolactone ที่ทำละลายด้วยเมทานอลคือช่วงคลื่น 352 นาโนเมตร (Snyder et al, 1997)



ภาพที่ 2 การตรวจวัดสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ demethylwedelolactone และ wedelolactone ด้วย HPLC-PDA (a) Contour Plot Spectrum โดย extract โครมาโทแกรม (b) peak purity จาก Chromatogram Plot และ (c) การสแกนสเปกตรัมที่ความยาวคลื่น 352 นาโนเมตรของ demethylwedelolactone และสาร wedelolactone

จากการศึกษาการแยกสาร demethylwedelolactone และสาร wedelolactone โดยกำหนดการไหลของเฟสเคลื่อนที่และสัดส่วนที่เหมาะสมต่อการแยกของสารทั้งสองชนิดจากทั้ง 2 ระบบ คือ ระบบ gradient ในสภาวะที่ 1 ถึง 3 และระบบ isocratic ในสภาวะที่ 4 ถึง 6 ที่ปรากฏให้เห็นในโครมาโทแกรม (ภาพที่ 4) พบว่าระบบ isocratic ทั้ง 3 สภาวะ peak ของสาร demethylwedelolactone และสาร wedelolactone ไม่สามารถแยกออกจากกัน จึงเปลี่ยนมาใช้ระบบ gradient ตามการศึกษา Morel et al. (2017) พบว่า ในระบบ gradient สภาวะที่ 3 เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายกลุ่มไม่มีขั้ว peak ของสารทั้งสองชนิดไม่สามารถแยกออกจากกันได้ ส่วนในสภาวะที่ 1 peak ของสารทั้งสองชนิดแยกออกจากกันได้ แต่ปรากฏเส้นฐานยกขึ้น (base line drift) ในขณะที่ ระบบ gradient สภาวะที่ 2 ซึ่งเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยเมทานอลเข้มข้น 99.9% (v/v) และกรดฟอร์มิกเข้มข้น 0.05% (v/v) กำหนดการไหลของเฟสเคลื่อนที่แบบ gradient (ตารางที่ 1) พิจารณาโครมาโทแกรมพบว่า peak ของสาร demethylwedelolactone และสาร wedelolactone แยกออกจากอย่างชัดเจน อาจเกิดจากโครงสร้างของสารทั้งสองชนิดคล้ายกัน แตกต่างกันตรงหมู่ Methyl group ของสาร wedelolactone และหมู่ Hydroxyl group ของสาร demethylwedelolactone การใช้เฟสคงที่เป็น reversed phase ซึ่งเป็นเฟสที่ไม่มีขั้ว (nonpolar) จะสามารถหน่วงสารที่ไม่มีขั้วไว้และชะสารที่มีขั้วออกมาก่อน จากผลการศึกษาพบว่าสาร

demethylwedelolactone จะถูกชะออกมาก่อน แสดงว่าสาร demethylwedelolactone มีขั้วมากกว่าสาร wedelolactone การลดสัดส่วนสารละลาย B (กรด) เป็นการลดความมีขั้วในเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมที่จะทำให้สาร wedelolactone ที่มีขั้วน้อยกว่าถูกชะออกมาในที่สุด มีรายงานการวิจัยว่าการเติมกรดฟอร์มิกในเฟสเคลื่อนที่ทำให้โครมาโทแกรมมี resolution สูงขึ้น และมีพีค sharp ขึ้น (Phale *et al.*, 2010) ดังนั้นจึงทำการตรวจความใช้ได้ของวิธีทดสอบของสาร demethylwedelolactone และสาร wedelolactone ในระบบ gradient ในสภาวะที่ 2



ภาพที่ 3 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานสาร demethylwedelolactone และสาร wedelolactone ความเข้มข้น  $250 \mu\text{g L}^{-1}$  จากความแตกต่างของสภาวะเฟสเคลื่อนที่

ผลการตรวจความใช้ได้ของวิธีทดสอบของสาร demethylwedelolactone และสาร wedelolactone (ตารางที่ 2) พบว่ามีขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (LOD) เท่ากับ  $0.41 \mu\text{g L}^{-1}$  และ  $0.004 \mu\text{g L}^{-1}$  ตามลำดับ ขีดจำกัดต่ำสุดของการหาปริมาณ (LOQ) เท่ากับ  $1.37 \mu\text{g L}^{-1}$  และ  $0.013 \mu\text{g L}^{-1}$  ตามลำดับ

ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linearity) ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟกับความเข้มข้นของสาร demethylwedelolactone ในช่วงความเข้มข้น  $5.0 - 25 \mu\text{g L}^{-1}$  ค่า  $r^2$  เท่ากับ 0.998 และสาร wedelolactone ในช่วงความเข้มข้น  $1.0 - 25 \mu\text{g L}^{-1}$  มีค่า  $r^2$  เท่ากับ 0.999 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้คือ  $\geq 0.995$

การตรวจสอบความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (precision) โดยคำนวณจากร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (%RSD) พบว่า ผลการทดลองซ้ำในวันเดียวกัน (intraday precision) ค่า %RSD ของสาร demethylwedelolactone อยู่ในช่วง 0.38 – 1.61 และสาร wedelolactone อยู่ในช่วง 1.18 – 1.46 ส่วน %RSD ของผลการทดลองซ้ำในแต่ละวัน (interday precision) ของสาร demethylwedelolactone อยู่ในช่วง 0.34 – 0.47 และสาร wedelolactone อยู่ในช่วง 0.59 – 1.20 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ตามมาตรฐานที่กำหนดคือค่า %RSD  $\leq 2$  โดยทำการทดลองซ้ำในแต่ละวันจำนวน 2 วัน

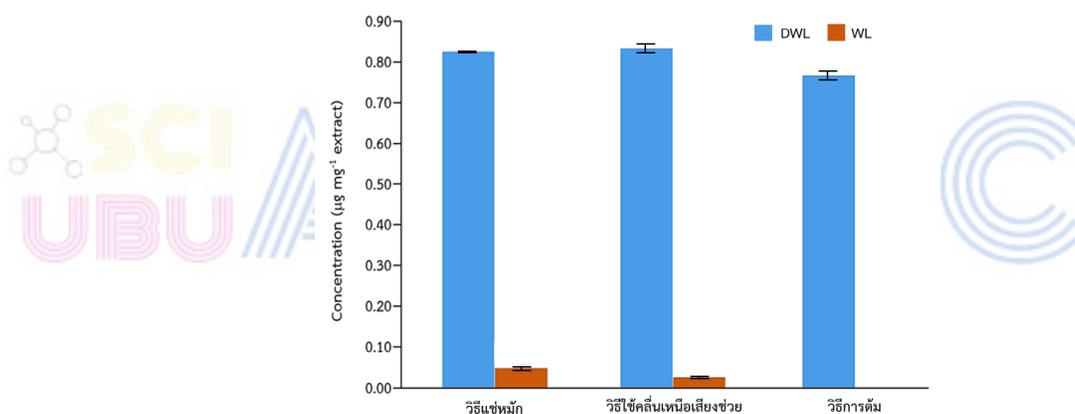
ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (accuracy) พิจารณาจากร้อยละของการกลับคืน (%Recovery) ของสารมาตรฐานที่เติมลงในตัวอย่างที่สกัดด้วยวิธีการแช่หมักโดยวิธี spiked placebo recovery method พบว่า %recovery ของสาร demethylwedelolactone อยู่ในช่วง 89.21 – 97.00% และสาร wedelolactone อยู่ในช่วง 100.52 – 100.81% และโดยวิธี standard addition method จำนวน 3 ความเข้มข้นคือ 0.75, 1.50 และ  $7.50 \mu\text{g L}^{-1}$  พบว่า %recovery ของสาร

demethylwedelolactone อยู่ในช่วง 103.01 – 104.93% และสาร wedelolactone อยู่ในช่วง 89.69 – 105.94% อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้คือระหว่าง 80 - 110% ตามเกณฑ์ที่มาตรฐานกำหนด

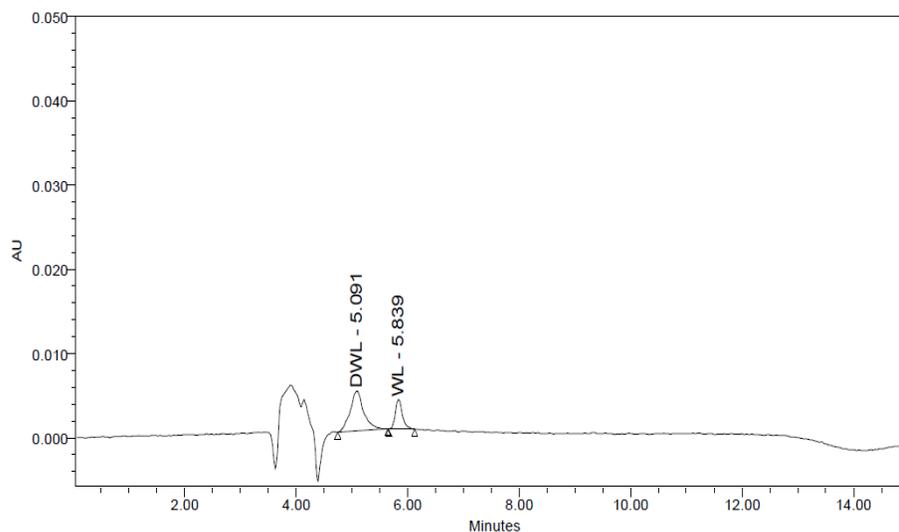
ตารางที่ 2 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพของคุณลักษณะเฉพาะ

Parameters	Information	Demethylwedelolactone	Wedelolactone
LOD	(3:1)	0.41 $\mu\text{g L}^{-1}$	0.004 $\mu\text{g L}^{-1}$
LOQ	(10:1)	1.37 $\mu\text{g L}^{-1}$	0.013 $\mu\text{g L}^{-1}$
Linearity	Range	5 – 25 $\mu\text{g L}^{-1}$	1 – 25 $\mu\text{g L}^{-1}$
	$r^2$	0.998	0.999
	Equation	$Y = 4216.8x + 47184$	$Y = 3860.8x + 3520.8$
Precision (%RSD)	Intraday precision (n = 7)	0.38 – 1.61	1.18 – 1.46
	Interday precision (n $\geq$ 10)	0.34 – 0.47	0.59 – 1.20
Accuracy (%Recovery)	Spiked placebo recovery method	89.21 – 97.00%	100.52 – 100.81%
	Standard addition method	103.01 – 104.93%	89.69 – 105.94%

การวิเคราะห์ปริมาณสาร demethylwedelolactone และ สาร wedelolactone ด้วยเครื่อง HPLC-PDA ตัวอย่างโครมาโทแกรมดังแสดงในภาพที่ 6 ของสารสกัดจากต้นกะเม็งจากวิธีการสกัด 3 วิธี ประกอบด้วย วิธีแช่หมัก วิธีใช้คลื่นเหนือเสียงช่วยและวิธีการต้ม พบปริมาณสาร demethylwedelolactone เท่ากับ 0.79, 0.78 และ 0.73  $\mu\text{g mg}^{-1}$  ของสารสกัดตามลำดับ ซึ่งปริมาณสาร demethylwedelolactone จากวิธีการสกัดทั้ง 3 วิธีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่สาร wedelolactone พบในการสกัดด้วยวิธีแช่หมักและการใช้คลื่นเหนือเสียงช่วยมีปริมาณเท่ากับ 0.04 และ 0.02  $\mu\text{g mg}^{-1}$  ของสารสกัดตามลำดับ แต่ไม่พบในวิธีการต้ม (ภาพที่ 5) ซึ่งน่าจะเกิดจากคุณสมบัติการมีขี้ผึ้งของตัวทำละลายที่ส่งผลต่อปริมาณสารทั้งสองชนิด โดยพิจารณาคุณสมบัติการมีขี้ผึ้งจากลำดับการถูกชะผ่านเฟสคงที่ชนิด reversed phase พบว่าสาร demethylwedelolactone มีขี้ผึ้งมากกว่า ทำให้พบในวิธีการสกัดที่ใช้ตัวทำละลายที่มีขี้ผึ้งน้อยจนถึงมีขี้ผึ้งมาก ในขณะที่สาร wedelolactone ซึ่งมีขี้ผึ้งน้อยกว่าจะพบในตัวทำละลายที่มีขี้ผึ้งน้อยเช่น เอทานอล แต่ไม่พบในตัวทำละลายชนิดน้ำซึ่งมีขี้ผึ้งมาก (Nawaz *et al.*, 2020; Siramon and Weanukul, 2020; Akeyothinwong *et al.*, 2020)



ภาพที่ 4 ปริมาณสาร demethylwedelolactone และสาร wedelolactone ในสารสกัดจากต้นกะเม็ง ด้วยวิธีแช่หมัก วิธีการใช้คลื่นเหนือเสียงช่วย และวิธีการต้ม



ภาพที่ 5 โครมาโทแกรมของสาร demethylwedelolactone และ wedelolactone ในการสกัดจากต้นกะเม็งด้วยวิธีใช้คลื่นเหนือแสงช่วย

จากการตรวจสอบความแม่นยำและความเที่ยงของการวิเคราะห์ปริมาณสาร demethylwedelolactone และสาร wedelolactone ในสารสกัดทั้ง 3 วิธี พบว่า %RSD และ %Recovery (ตารางที่ 3) อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้

ตารางที่ 3 ความแม่นยำและความเที่ยงของสาร demethylwedelolactone และสาร wedelolactone จากต้นกะเม็งที่สกัดด้วยวิธีที่แตกต่างกัน

Spiking of the extracts	Demethylwedelolactone				Wedelolactone			
	Conc. Ext ( $\mu\text{g mg}^{-1}$ )	Conc. Spike ( $\mu\text{g mg}^{-1}$ )	%RSD	%Recovery	Conc. Ext ( $\mu\text{g mg}^{-1}$ )	Conc. Spike ( $\mu\text{g mg}^{-1}$ )	%RSD	%Recovery
วิธีแช่หมัก	$0.79 \pm 0.00$	$1.28 \pm 0.02$	1.85	97.00	$0.04 \pm 0.01$	$0.50 \pm 0.01$	2.11	91.22
วิธีใช้คลื่นเหนือแสงช่วย	$0.78 \pm 0.02$	$1.23 \pm 0.02$	1.53	89.21	$0.02 \pm 0.00$	$0.54 \pm 0.01$	2.02	101.25
วิธีการต้ม	$0.73 \pm 0.02$	$1.19 \pm 0.01$	1.10	91.80	$0.00 \pm 0.00$	$0.44 \pm 0.01$	1.38	87.72

หมายเหตุ สารสกัดทั้ง 3 วิธี เติมสารมาตรฐาน demethylwedelolactone และ wedelolactone ความเข้มข้น  $7.5 \mu\text{g L}^{-1}$

\*Conc. Ext ความเข้มข้นที่วัดได้ของสาร demethylwedelolactone และสาร wedelolactone ก่อนทำการ spike

\*\*Conc. Spike ความเข้มข้นที่วัดได้ของสาร demethylwedelolactone และสาร wedelolactone หลังทำการ spiked

ตารางที่ 4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์หาสาร demethylwedelolactone และสาร wedelolactone ในสารสกัดจากต้นกะเม็ง (*Eclipta prostrata*)

Plant Parts	Extraction/Solvent	HPLC Conditions	Method validation	Ref.
Roots Stems leaves	Maceration/ 30% Ethanol Soxhlet extraction/ Methanol Ethylacetate	Column; C18 Mobile phase: gradient A; ACN with 1% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> B; DW with 1% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> Wavelength; 351 nm	Demethylwedelolactone: LOD; 0.048 µg mL <sup>-1</sup> LOQ; 0.16 µg mL <sup>-1</sup> Range; 0.07 – 0.7 mg mL <sup>-1</sup> R <sup>2</sup> ; 0.9999 Equation; Y=0.000152X-0.001 Wedelolactone: LOD; 0.15 µg mL <sup>-1</sup> LOQ; 0.51 µg mL <sup>-1</sup> Range; 0.14 – 1.4 mg mL <sup>-1</sup> R <sup>2</sup> ; 0.9999 Equation; Y=0.000152X -0.003	Mendes et al., 2014
Whole plants	Maceration/ Methanol	Column; C8 Mobile phase: isocratic ACN with 0.1% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> Wavelength; 254 nm	- - -	Murali et al., 2002
Whole plants	Maceration/ Methanol	Column; C18 Mobile phase; gradient A; 0.1% C <sub>2</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> B; ACN Wavelength; 355 nm	Demethylwedelolactone: Range; 0.1 – 1.0 mg mL <sup>-1</sup> R <sup>2</sup> ; 0.9908 Equation; Y=0.001372X+250215 Wedelolactone: Range; 0.05 – 0.5 mg mL <sup>-1</sup> R <sup>2</sup> ; 0.9804 Equation; Y=3E-84497X+0.6	Morel et al., 2017
Whole plants	Maceration/ Methanol	Column; C18 Mobile phase; isocratic MeOH with 0.04% C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> Wavelength; 352 nm	Wedelolactone: LOD; 2 µg mL <sup>-1</sup> LOQ; 5 µg mL <sup>-1</sup> Range; 5 – 100 µg mL <sup>-1</sup> R <sup>2</sup> ; 0.998 Equation; Y=86558X- 125096	Kumar, 2013
Whole plants	Ultrasound Extraction/ 70% Ethanol	Column; C18 Mobile phase; isocratic MeOH with 0.5% C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> Wavelength; 352 nm	- - -	Lee, 2017

## สรุปผลการวิจัย

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณสาร demethylwedelolactone และสาร wedelolactone จากต้นกะเม็ง มีความแม่นยำและความเที่ยงสูง ทำการตรวจสอบความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (precision) โดยการวิเคราะห์ intraday precision และ interday precision ผลการวิเคราะห์อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับตามมาตรฐานมีค่า %RSD  $\leq 2$  ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (accuracy) อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ช่วง 80 - 110% ตามเกณฑ์ที่มาตรฐานกำหนด และจากผลการศึกษาวิธีการสกัดที่แตกต่างกัน 3 วิธี ประกอบด้วยวิธีแช่หมัก วิธีใช้คลื่นเหนือเสียงช่วยและวิธีการต้ม พบปริมาณสาร wedelolactone ที่สกัดด้วยวิธีแช่หมักและวิธีใช้คลื่นเหนือเสียงช่วยแต่ไม่พบในวิธีการต้ม ในขณะที่ปริมาณสาร demethylwedelolactone พบในสารสกัดจากทั้ง 3 วิธี ซึ่งน่าจะเกิดจากคุณสมบัติการมีขี้ของสาร demethylwedelolactone ที่สูงกว่าและสาร wedelolactone ส่งผลให้ละลายได้ในตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด แต่เมื่อพิจารณาด้านปริมาณสารที่พบและเวลาที่ใช้ในการสกัด วิธีใช้คลื่นเหนือเสียงช่วย น่าจะเป็นวิธีที่ดีที่สุดเนื่องจากพบทั้งปริมาณ สาร wedelolactone และสาร demethylwedelolactone และใช้เวลาในการสกัดน้อยกว่า

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ยามารัตติ จัยสิน อาจารย์ประจำภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่อนุเคราะห์สารมาตรฐาน คุณชลธิชา นิवासประภคฤติ สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ที่อนุเคราะห์พืชสมุนไพร คุณปิยานี รัตนชำนอง นักวิทยาศาสตร์ (ผู้ชำนาญการพิเศษ) ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ปรึกษาการวิจัย

## เอกสารอ้างอิง

- Aderogba, M.A., McGaw, L.J., Ogundaini, A.O. and Eloff, J.N. (2007). Antioxidant activity and cytotoxicity study of the flavonol glycosides from *Bauhinia galpinii*. **Natural Product Research**, 21, 591-599.
- Akeyothinwong, K., Sakkayawong, N., Damrianant, S. and Nakbanpote, W. (2020). Antioxidant activity and bioactive compounds of Kameng (*Eclipta prostrata* Linn.) extracts (in Thai). **Thai Journal of Science and Technology**, 9(1), 45-57.
- Chansuvarn, W. (2021). Method validation. Retrieved 15 February 2022 from [https://web.rmutp.ac.th/woravith/?page\\_id=8366](https://web.rmutp.ac.th/woravith/?page_id=8366)
- Chumark, P., Khunawat, P., Sanvarinda, Y., Phornchirasilp, S., Morales, N.P., Phivthong-ngam, L., Ratanachamngong, P., Srisawat, S. and Pongrapeeporn, Ku.S. (2008). The in vitro and ex vivo antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of *Moringa oleifera* Lam. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, 116(3), 439-446.
- Jaisin, Y. (2016). Ka-meng (in Thai). **Thai Journal of Pharmacology**, 38(2), 40-47.
- Kumar, S. and Dhanani, T. (2013). Development and validation of a rapid high performance liquid chromatography – photodiode array detection method for estimation of a bioactive compound wedelolactone in extracts of *Eclipta alba*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. 49(1), 57-63.
- Lee, H. Y. (2017). Enhancement of skin anti – inflammatory activities of *Eclipta prostrata* l. from the ultrasonic extraction process. **Applied Sciences**, 7, 1227.

- Mendes, F.N.P., Morais, S.M.D., Silva, M.G.V., Vieira, I.R., Rodrigues, P.A.S., Belizáridiniz, D. and Vieira. Í.G.P. (2014). Determination of wedelolactone and demethylwedelolactone in *Eclipta alba* (L) hassk by hplc. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, 6(10), 403-406.
- Morel, L.J.F., Azevedo, B.C., Carmona, F., Contini, S.H.T., Teles, A.M., Ramalho, F.S., Bertoni, B.W., Franca, S.C., Borges, M.C. and Pereira, A.M.S. (2017). A standardized methanol extract of *Eclipta prostrata* (L.) L. (Asteraceae) reduces bronchial hyperresponsiveness and production of Th2 cytokines in a murine model of asthma. **Journal of Ethnopharmacology**, 198, 226-234.
- Murali, B., Amit, A., Anand, M. S. and Samiulla, D. S. (2002). Estimation of wedelolactone and demethylwedelolactone in *Eclipta alba* Hassk. By improved chromatographic analysis. **Journal of Natural Remedies**, 2(1), 99-101.
- Nawaz, H., Shad, M.A., Rehman, N., Andaleeb, H. and Ullah, N. (2020). Effect of solvent polarity on extraction yield and antioxidant properties of phytochemicals from bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 56, e17129.
- Phale, M.D., Hamrapurkar, P.D., Chachad, M.A., Patil, P.S. and Pawar, S.B. (2010). Precise and sensitive HPTLC method for quantitative estimation of wedelolactone in *Eclipta alba* hassk. **Pharmacophore**, 1(2), 103-111.
- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K.M. and Latha, L.Y. (2011). Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plant's extracts. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, 8(1), 1-10.
- Siramon, P. and Weanukul, R. (2020). Using ultrasound-assisted solvent extraction of phenolic compounds from *Curcuma aromatica* Salisb Rhizomes (in Thai). **Journal of Science and Technology, Ubon Ratchathani University**, 22(1), 40-44.
- Snyder, L.R., Kirkland J.J. and Glajch J.L. (1997). Appendix II: Properties of Solvents Used in HPLC. In book: *Practical HPLC Method Development*, Second Edition.

