รายงานการวิจัย

การศึกษาเพื่อกำหนดมาตรฐาน ของสมุนไพรบัวบก และสิ่งสารสกัดที่มีฤทธิ์ทางยา

Establishment of specification of *Centella asiatica* and its bioactive extracts

ผู้ช่วยศาสดราจารย์ ดร. ชำนาญ ภัตรพานิช

(Assistant Professor Dr. Chamnan Patarapanich)

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ สุวรรณา เหลืองชลธาร

(Associate Professor Suwanna Laungchonlatan)

ผู้วิจัย

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของชุดโครงการ การวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ยาและเครื่องสำอางที่มีมาตรฐานจากสมุนไพรบัวบกสู่การผลิตระดับอุตสาหกรรม

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน

ปีงบประมาณ 2546-2548

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของแผนงานวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ยาและเครื่องสำอางที่มีมาตรฐานจากสมุนไพรบัวบกสู่การผลิตระดับอุดสาหกรรม โดยได้รับความสนับสนุนงบประมาณจาก ทุนอุดหนุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2546 – 2548

ผู้วิจัยขอขอบคุณ นางสาวบังอร กงทอง และนายปฐม สมวงศ์ นิสิตบัณฑิตศึกษา ภาควิชาเภสัชเคมี ที่ได้มีส่วนร่วมและดำเนินการวิจัยอันเป็นส่วนหนึ่งของงานวิทยานิพนธ์ด้วยความอดทนและมานะพยายาม จนได้ผลงานที่ดียิ่ง

ผู้วิจัยขอขอบคุณ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความสนับสนุนแผนงานวิจัยนี้

ผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสดร์และเทคโนโลยี แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ได้ให้บริการการใช้เครื่องมือวิจัย

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ดร. ปิยะ เฉลิมกลิ่น และทีมนิสิตบัณฑิตศึกษาของ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (ว.ว.) ที่ได้กรุณาจัดเตรียมตัวอย่างพืชบัวบก 12 สายพันธ์เพื่อการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณจิราพร ศรีทองกุล คุณนิยม ช่วยเกิด นางยอย สังข์เงิน และนางสมร (ไม่ทราบนามสกุล) ที่ได้ให้ความร่วมมือในการจัดเก็บตัวอย่างพืชบัวบก ตามสภาวะที่ได้กำหนดไว้แล้วจากแหล่งปลูกบัวบก ที่จังหวัดอุบลราชธานี นครศรีธรรมราช และนครปฐม

ผู้วิจัยขอขอบคุณองค์การเภสัชกรรม ที่ได้เอื้อเฟื้อบริจาคสารมาตรฐานใช้งาน Madecassoside และ Asiaticoside

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มิตร ปทีปวณิช หัวหน้าภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ ที่ให้การสนับสนุนงานวิจัยนี้อย่างดียิ่ง

ท้ายที่สุดขอขอบคุณบุคลากรแห่งภาควิชาเภสัชเคมี ที่ได้ให้การสนับสนุน ช่วยเหลือและให้กำลังใจด้วยความจริงใจ

บทคัดย่อภาษาไทย

งานวิจัยนี้มุ่งศึกษาข้อมูลพื้นฐานของสมุนไพรบัวบกเพื่อใช้กำหนดคุณลักษณะของพืช และสิ่งสกัดบัวบกที่มีสารสำคัญ triterpene glycoside, Madecassoside (MS) และ Asiaticoside (AS) เพื่อการควบคุมคุณภาพ การศึกษาแบ่งเป็น 2 ส่วนหลัก ได้แก่การศึกษาคุณลักษณะของพืชบัวบกที่เป็นวัตถุดิบ และการศึกษาข้อมูลพื้นฐานที่มีผลต่อคุณลักษณะของสารสกัดบัวบก

ได้ใช้เกณฑ์มาตรฐานสมุนไพรของกลุ่มประเทศอาเซียนเป็นแนวทางในการศึกษาคุณลักษณะของพืชบัวบก ได้แก่ (1) การตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเภสัชเวททั้งวิธีทางมหทรรศ์และจุลทรรศ์สำหรับพืชสดและผงพืชแห้ง (2) การตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีซึ่งประกอบด้วยวิธีทดสอบ saponin การทดสอบ Liebermann-Burchard และการทดสอบ tannin (3) การทดสอบด้วย TLC (4) การทดสอบทางกายภาพ ซึ่งประกอบด้วยการตรวจปริมาณสารปนปลอม ปริมาณน้ำหนักที่หายเมื่อทำให้แห้ง ปริมาณเถ้ารวม ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายกรด ปริมาณความชื้น ปริมาณสารสกัดที่ละลายน้ำ ปริมาณสารสกัดที่ละลายเอทธิลแอลกอฮอล์ ปริมาณตะกั่ว และปริมาณเหล็ก ตัวอย่างพืชที่นำมาทดสอบเก็บจากแปลงปลูกบัวบกเพื่อการพาณิชย์ 2 แปลงในจังหวัดนครปฐมโดยเก็บทุกเดือนเป็นเวลา 1 ปี (เก็บเกี่ยวตัวอย่างเมื่อ พฤศจิกายน 2545 – ตุลาคม 2546) พบว่าทุกตัวอย่างที่ทดสอบในทุกหัวข้อการทดสอบผ่านเกณฑ์มาตรฐานสมุนไพรของกลุ่มประเทศอาเซียน

ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์สารสำคัญเป้าหมายด้วย HPLC และ TLC เพื่อใช้สำหรับหาปริมาณ และควบคุมคุณภาพทั้งในพืชบัวบกและสารสกัดบัวบก วิธี HPLC ที่ได้พัฒนาประกอบด้วย C18 column และมีสารละลายผสมของ acetonitrile : phosphate buffer pH 7.1 (29 : 71) อัตราเร็ว 1 มิลลิลิตรต่อนาทีเป็น mobile phase และวัดการดูดกลืนแสง UV ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร โดยใช้ Prednisolone เป็นสารมาตรฐานภายใน

สำหรับวิธี TLC ที่พัฒนาประกอบด้วย แผ่น silica gel สารละลายผสมระหว่าง chloroform-methanol-water ในสัดส่วน 30:15:2 เป็น mobile phase ได้พัฒนาการเกิดสีของจุดสารเป้าหมายโดยการพ่นด้วยสาร Anthrone และวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Densitometer

ได้ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี HPLC และ TLC ที่พัฒนาซึ่งผ่านเกณฑ์ของ ICH ในทุกหัวข้อการทดสอบ

ได้พัฒนาวิธีทำให้ตัวอย่างสารสกัดบัวบกให้สะอาดและเหมาะสมกับวิธี HPLC โดยใช้การสกัดด้วย C18 solid phase ทำให้สามารถลดการรบกวนจากสารอื่นๆได้

ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ ในตัวอย่างพืชบัวบกที่เก็บจาก 12 จังหวัด ได้แก่ นครปฐม ปราจีนบุรี นครศรีธรรมราช อุบลราชธานี ตราด ระยอง ชลบุรี นครราชสีมา สุโขทัย เชียงใหม่ พิษณุโลก พบว่าปริมาณ glycoside รวมมีค่าระหว่าง 3.46% – 8.93% มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 6.80% $\pm$ 1.66% ตัวอย่างที่มีปริมาณ glycoside รวมมากกว่า 7% พบจากพืชที่เก็บจากจังหวัดปราจีนบุรี ตราด ระยอง ชลบุรี พิษณุโลก และเชียงใหม่

ได้เก็บตัวอย่างจากอีก 2 แหล่งปลูกเพื่อการพาณิชย์ คือ จังหวัดอุบลราชธานี และนครศรีธรรมราช เป็นเวลารอบ 1 ปี ได้ผลปริมาณสารสอดคล้องกับผลของตัวอย่างที่เก็บจากจังหวัดนครปฐม คือพบปริมาณ glycoside สูงในช่วงเดือน มีนาคม – กันยายน และมีปริมาณต่ำสุดเดือนกุมภาพันธ์

โดยทั่วไปพบ MS มากกว่า AS และพบสัดส่วนของ MS ; AS มีค่าระหว่าง 1.30 – 2.15 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.65 ± 0.30 และได้พบว่าส่วนใบมีปริมาณสารสำคัญมากกว่าส่วนก้านใบประมาณ 10 เท่า และอายุใบมากกว่า 20 วัน จะมีปริมาณสารสำคัญมากพอสำหรับทำการสกัด และพบว่าบัวบกที่ปลูกภายใต้ปริมาณแสงแดดที่ลดลงมีผลทำให้ปริมาณสารสำคัญลดลง

ได้ทำการวิเคราะห์สารสกัดบัวบกที่ผลิตภายใต้โครงการวิจัยที่ 1 พบว่าสารสกัดมีปริมาณ glycoside ไม่น้อยกว่า 80% เมื่อทำการทดสอบความคงตัวแบบเร่งของสารสกัดและพบมีอายุการใช้งานได้ไม่น้อยกว่า 2 ปี

ข้อมูลพื้นฐานที่ได้เป็นประโยชน์ต่อการกำหนดคุณลักษณะของทั้งพืชวัตถุดิบและสารสกัดโดยหน่วยงานที่มีหน้าที่กำหนดคุณลักษณะหรือผู้ผลิตสารสกัดบัวบกต่อไป

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

The objective of this research is to study the basic information of *Centella asiatica* (CA) needed for specification setting of herb and/or its extract which contains major active triterpene glycosides, Madecassoside (MS) and Asiaticoside (AS). The research contains two main parts, characterization study of *Centella asiatica* herb as raw material, and the basic information effecting the specification of the herbal extract.

The Standard of ASIAN Herbal Medicines was used as the guideline procedures in this study for examining the fresh and dried herbs. Items tested composed of (1) The microscopic and macroscopic Identification of fresh and dried herb, (2) The chemical identification tests which including the Saponin test, the Liebermann-Burchard test and the Tannin test, (3) TLC test, (4) The physical characterization test which including foreign matter, loss on drying, total ash, acid insoluble content, moisture content, water soluble content, ethanol soluble content, lead content and iron content determinations. The herbal samples were monthly collected from two commercially planting gardens in Nakornpathom province for one year (during November 2002 – October 2003) and the samples pass all criteria of items tested.

The HPLC and TLC methods for the quantitative determination of four major triterpenes of CA containing in herb or extract were developed as the quality control assay. The HPLC developed comprise of C18 column, a mixture of acetonitrile : phosphate buffer, pH 7.1 as the mobile phase (29 : 71) with 1 ml/min flow rate, detection with the UV absorbance at wavelength 210 nm. and using prednisolone as internal standard.

The TLC developed method comprise the Silica gel plate, a mixture of chloroform : methanol : water (30 : 15 : 2) as the mobile phase, the analyte's spots were sprayed with the Anthrone solution and the color formed were detected with a densitometer.

Method validation of both developed HPLC and TLC assay according to ICH guideline were performed and the method pass all criteria required.

Sample cleaning procedure was also developed base on the Solid Phase extraction technique. SPE with a C18 cartridge worked well for the CA sample cleanup prior to the HPLC injection in order to minimize the interference during chromatographing.

Additional twelve herbal samples collected from various provinces in Thailand including Nakornpathom, Prachinburi, Nakornsritammarach, Ubonrashathani, Trad, Rayong, Chonburi, Nakornrashsima, Sukothai, Chaingmai and Pisanuloke were subjected to the active constituent analysis using the developed assay methods. The total triterpene glycoside content was found between 3.46% - 8.93% with the average of 6.80% $\pm$ 1.66%. Herbal samples which contain the total triterpene glycoside more than 7% were found in those samples from Prachinburi, Trad, Rayong, Chonburi and Chaingmai.

Sample of two additional commercially planting gardens were also annually collected and were subjected to the analysis of its active constituents. The content profile were similar to those of sample obtained from Nakornpathom of which show the high glycoside content during March – September period while the low content found in February.

Generally, the MS content is higher than the AS content in all sample examined, the MS : AS ratio were found between 1.30 – 2.15 with the average of 1.65 $\pm$ 0.30. In addition, the glycoside content in the leaf was found 10 times more than those in the petriole, young leafs with the age of more than 20 days contain high enough active constituents for performing the extraction. Finally, reduction of sunlight intensity exposure toward the herb during plantation also reduced the triterpene contents.

The glycoside extract from the 1st research project was subjected to the analysis of active constituents, MS and AS, and the content was found to be more than 80%. Within the accelerated stability testing, the extract exhibited more than 2 year shelf life.

The basic information obtained in this research will be beneficial for the specification setting of this herb and /or its extract by any authority or production agency.

สารบัญเรื่อง

เรื่องที่	รายการ	หน้า
1	กิตติกรรมประกาศ	ii
2	บทคัดย่อภาษาไทย	iii – iv
3	บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	v – vi
4	สารบัญเรื่อง	vii
5	สารบัญตาราง	viii – ix
6	สารบัญรูป	x
7	สารบัญแผนภูมิ	xi
8	คำย่อที่ใช้	xii
9	บทนำ	1 - 5
10	วิธีดำเนินการวิจัย	6 - 27
11	ผลการทดลองและอภิปราย	28 – 90
12	สรุปและเสนอแนะ	91 - 94
13	บรรณานุกรม	95
14	ภาคผนวก	96-100

สารบัญตาราง

ตารางที่	รายการ	หน้า
1.1	การกำหนดรหัสของตัวอย่างที่เก็บจากจังหวัดนครปฐม	6
1.2	แสดงผลการตรวจสอบเบื้องต้นด้วย Chemical Test ตัวอย่างผงพืชบัวบก	35
1.3	แสดงผลการตรวจสอบยืนยันด้วย TLC Test (Confirmatory Test) ตัวอย่างผงพืชบัวบกโดยการสเปรย์ด้วย Liebermann-Burchard Reagent แล้วดูด้วยตาเปล่า	36
1.4	แสดงผลการตรวจสอบยืนยันด้วย TLC Test (Confirmatory Test) ในตัวอย่างผงพืชบัวบกโดยการสเปรย์ด้วย Liebermann-Burchard Reagent แล้วดูที่ UV 366 nm	39
1.5	แสดงผลการตรวจสอบยืนยันด้วย TLC Test (Confirmatory Test) สารมาตรฐาน Asiaticoside , Madecassoside , Asiatic acid และ Madecassic acid	41
1.6	แสดงค่า hR_f สารสกัดผงพืชบัวบกตัวอย่าง	41
1.7	แสดงปริมาณสิ่งปลอมปน (Foreign Matter) โดยการดูผง100 กรัมในตัวอย่างผงพืช	43
1.8	แสดงปริมาณน้ำหนักที่หายไปเมื่อทำให้แห้ง (Loss on drying) ปริมาณเถ้ารวม (Total Ash) และปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (Acid-Insoluble Ash) ในตัวอย่างผงพืชน้ำหนัก 2 กรัม	44
1.9	แสดงปริมาณน้ำหนักที่หายไปเมื่อทำให้แห้ง (Loss on drying) ปริมาณเถ้ารวม (Total Ash) และปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (Acid-Insoluble Ash) ในตัวอย่างผงพืชน้ำหนัก 3 กรัม	46
1.10	แสดงปริมาณน้ำหนักที่หายไปเมื่อทำให้แห้ง (Loss on drying) ปริมาณเถ้ารวม (Total Ash) และปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (Acid-Insoluble Ash) ในตัวอย่างผงน้ำหนัก 4 กรัม	48
1.11	แสดงปริมาณน้ำในตัวอย่างผงพืชบัวบก โดยวิธีการกลั่นแบบอะซีโอโทรปิก	50
1.12	แสดงปริมาณสิ่งสกัด (Extractive value) ในตัวอย่างผงพืชบัวบก	51
1.13	แสดงปริมาณการปนเปื้อนด้วยโลหะหนัก (Heavy Metal Contamination) โดยวิธี Atomic Absorption ในตัวอย่างผงพืชบัวบก	52
1.14	สรุปผลวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพของตัวอย่างผงพืชบัวบกเทียบกับมาตรฐาน	58

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	รายการ	หน้า
2.1	แสดงรหัสตัวอย่างพืชบัวบกที่เก็บจาก 12 จังหวัดและช่วงเวลาเก็บตัวอย่าง	15
2.2	ตารางแสดงความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานสำหรับการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี HPLC	20
2.3	ตารางแสดงความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมลงในสารละลายตัวอย่าง	21
2.4	การเตรียมตัวอย่างสำหรับการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี TLC	24
2.5	แสดงความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC	26
2.6	แสดงผลของอัตราส่วนของ organic solvent และ pH ต่อค่า capacity Factor (k')	73
2.7	แสดงข้อมูลของการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดลองโดย HPLC	76
2.8	แสดงข้อมูลของการตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ	80
2.9	แสดงข้อมูลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ด้วย TLC	82
2.10	แสดงผลการทดสอบความคงตัวของผงสารสกัดที่ซึ่งเก็บอยู่ในตู้ทดสอบความคงตัวที่ 50 °C และ75%RH ในแต่ละเดือน	83
2.11	แสดงค่าสัดส่วนของ Madecassoside / Asiaticoside ตรวจพบจากพืช 12 จังหวัด	87
2.12	แสดงการเปรียบเทียบปริมาณสารในใบและก้านใบพืชบัวบก	88
2.13	แสดงผลของอายุใบต่อปริมาณสารสำคัญของพืชบัวบก	89
2.14	แสดงผลของปริมาณแสงแดดต่อการผลิตสารสำคัญของพืชบัวบก	90

สารบัญรูป

รูปที่	รายการ	หน้า
1.1	แสดงลักษณะแหล่งปลูกบัวบกที่จังหวัดนครปฐม	9
1.2	แสดงรูปพืชบัวบกสด	28
1.3	แสดงรูปผงพืชบัวบกแห้ง	29
1.4	แสดงรูป Upper epidermis ของใบพืชบัวบกสด	30
1.5	แสดงรูป Lower epidermis ของใบพืชบัวบกสด	30
1.6	แสดงส่วนประกอบและรูปตัดขวาง Lamina and Midrib ของใบพืชบัวบกสด	31
1.7	แสดงรูปตัดขวางก้านใบ (Petiole) ของพืชบัวบกสด	31
1.8	แสดงรูปตัดขวางรากของพืชบัวบกสด	32
1.9	แสดงรูป Parenchyma ของผงพืชบัวบก	32
1.10	แสดงรูป Unicellular trichome ของผงพืชบัวบก	33
1.11	แสดงรูป Vascular bundles ของผงพืชบัวบก	33
1.12	แสดงรูป Upper epidermis ของผงพืชบัวบก	34
1.13	แสดงรูป Lower epidermis ของผงพืชบัวบก	34
1.14	TLC Chromatogram การตรวจเอกลักษณ์สารสำคัญในผงพืชบัวบก	42
1.15	แสดงเครื่องแก้วสำหรับการหาน้ำด้วยวิธีการกลั่นแบบอะซีโอโทรปิก	13
2.1	TLC Chromatogram การตรวจเอกลักษณ์สารสำคัญในผงพืชบัวบก	61
2.2	HPLC chromatogram ของสารมาตรฐานเทียบกับสารที่เตรียมได้	62
2.3	IR Spectrum ของสารที่สกัดได้	63
2.4	^{1}H-NMR ของสารที่เตรียมได้	66
2.5	^{13}C-NMR ของสารที่เตรียมได้	67
2.6	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ใช้ในการ reflux กับปริมาณสาร	69
2.7	HPLC chromatogram ของสารสกัดที่ผ่าน SPE และไม่ผ่าน SPE	70
2.8	HPLC chromatogram ของสารมาตรฐานใน Phenyl column	72
2.9	HPLC chromatogram ของสารมาตรฐานใน C-18 column	72
2.10	TLC chromatogram ของสารสกัดแสดงพีกของ Madecassoside และ Asiaticoside	74

สารบัญแผนภูมิ

แผนภูมิที่	รายการ	หน้า
1	แสดง % Foreign Matter ของผงพืชบัวบกตัวอย่าง	53
2	แสดง % Loss on Drying ของผงพืชบัวบกตัวอย่าง 3 กรัม	53
3	แสดง % Total Ash ของผงพืชบัวบกตัวอย่าง 3 กรัม	54
4	แสดง % Acid Insoluble Ash ของผงพืชบัวบกตัวอย่าง 3 กรัม	55
5	แสดง % Moisture Content ของผงพืชบัวบกตัวอย่าง	55
6	แสดง % Water Soluble Extraction ของผงพืชบัวบกตัวอย่าง	56
7	แสดง % Ethanol Soluble Extraction ของผงพืชบัวบกตัวอย่าง	56
8	แสดงปริมาณตะกั่ว (ppm) ของผงพืชบัวบกตัวอย่าง	57
9	แสดงปริมาณเหล็ก (ppm) ของผงพืชบัวบกตัวอย่าง	57

คำย่อที่ใช้

AS	Asiaticoside
^{0}C	degree Celsius
CA	Centella asiatica (Linn) Urban
cm	centrimeter
g	gram
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IR	Infrared spectroscopy
MA	Madecassoside
mM	Millimolar
min	Minute
mp	Melting point
MS	Madecassoside
MW	Molecular weight
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
nm	Nanometer
NO	Number
RH	Relative humidity
RS	Resolution
RSD	Relative standard deviation
SD	Standard deviation
Sec.	Second
SPE	Solid phase extraction
ppm	Part per million
%R	Percentage recovery
TLC	Thin layer chromatography
t_r	Retention time
UV	Ultraviolet
δ	Chemical shift

บทที่1
บทนำ

สังคมไทยมีการใช้สมุนไพรรักษาโรคมาเป็นเวลานาน และปัจจุบันก็ยังมีการสนับสนุนให้มีการใช้สมุนไพรอย่างแพร่หลาย แต่การใช้สมุนไพรดังกล่าวมักใช้ตามคำบอกเล่าต่อๆกันมา โดยไม่มีการศึกษาอย่างเป็นวิทยาศาสตร์ที่เป็นระบบ ขาดการพิสูจน์ตรวจสอบฤทธิ์และประสิทธิภาพสมุนไพร ขาดการวิจัยและพัฒนา และขาดการควบคุมคุณภาพมาตรฐานของสมุนไพร ซึ่งแตกต่างจากประเทศในซีกโลกตะวันตก เช่น ฝรั่งเศส และเยอรมัน ที่มีการตรวจพิสูจน์ประสิทธิภาพ มีการแยกสกัดสารออกฤทธิ์ พัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์และควบคุมคุณภาพมาตรฐานของสมุนไพรจนได้รับการอนุมัติให้เป็นยา และเป็นที่เชื่อมั่นของผู้บริโภค

การวิจัยสมุนไพรเพื่อการกำหนดคุณลักษณะมีความยากลำบาก อันเนื่องจากสมุนไพรเป็นสารธรรมชาติ ซึ่งมักมีความแปรปรวน ขึ้นกับปัจจัยต่างๆที่หลากหลาย เช่น สภาพภูมิศาสตร์ ภูมิอากาศ ฤดูกาล ปริมาณน้ำ แร่ธาตุและสารอาหาร ตลอดจนกรรมวิธี และเวลาการเก็บเกี่ยว ซึ่งจากปัญหาต่าง ๆดังกล่าวจึงควรมีการศึกษาเพื่อหาข้อกำหนดในการควบคุมคุณภาพมาตรฐานสมุนไพรตามระบบสากล

สมุนไพรบัวบก *Centella asiatica* (L.) Urban แม้ว่าจะมีเภสัชผลิตภัณฑ์ออกจำหน่ายในท้องตลาดจำนวนมาก อีกทั้งมีการวิจัยสมุนไพรบัวบกมากมาย แต่ในประเทศไทยก็ยังไม่มีข้อกำหนดมาตรฐาน (Specification) ของสมุนไพรบัวบกไว้ใน Thai Herbal Pharmacopoiea (vol1, 2) อย่างไรก็ตาม ประเทศต่าง ๆในกลุ่มประเทศสมาชิกอาเซียนได้ร่วมกันกำหนดมาตรฐานสมุนไพรบัวบกไว้ใน Standard of Asian Herbal Medicine ที่เป็นการตั้งข้อกำหนดตามเอกสารมิใช่การทดลองพิสูจน์ที่แท้จริง

ดังนั้นประเทศไทยเองควรมีการจัดทำข้อกำหนดมาตรฐานของผงยาสมุนไพรบัวบกที่เป็นระบบสากล ในลักษณะทางวิทยาศาสตร์ที่พิสูจน์ทดลองได้ เพื่อเป็นประโยชน์ในการคัดเลือกผงยาสมุนไพรบัวบกที่มีคุณภาพ มีปริมาณและความสม่ำเสมอของสารสำคัญออกฤทธิ์เพื่อใช้ในการศึกษาวิจัย และเพื่อการผลิตตัวยาและเภสัชผลิตภัณฑ์ที่มีมาตรฐาน และสามารถประกันคุณภาพและความปลอดภัยให้เป็นที่น่าเชื่อถือในผลการวิจัย และในเภสัชผลิตภัณฑ์ที่ผลิตออกจำหน่ายด้วย

รูปแบบหนึ่งของการวิจัยและพัฒนายาสมุนไพรที่ได้รับความสนใจคือ การแยกสกัดเฉพาะสารสำคัญออกฤทธิ์จากสภาพตามธรรมชาติให้เป็นสารบริสุทธิ์หรือกึ่งบริสุทธิ์ ทั้งนี้เพื่อให้ได้มาซึ่งองค์ประกอบที่มีคุณสมบัติทางเคมี หรือทางกายภาพที่เหมาะสมมากขึ้น ยกตัวอย่างเช่น สารสำคัญ

ออกฤทธิ์หากมีอยู่ในส่วนใบ สีเขียวของใบอันเนื่องจาก chlorophyll อาจทำให้ลักษณะทางกายภาพไม่เหมาะในการประยุกต์ใช้บางลักษณะ เช่นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางเป็นต้น นอกจากนี้การพิสูจน์ประสิทธิภาพสารสำคัญออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพรต้องใช้สารที่บริสุทธิ์หรือมีปริมาณที่คงที่แน่นอน

นอกจากนี้แล้วสถานการณ์ตลาดการค้ายาและสมุนไพรโลกให้ความสำคัญต่อสารสำคัญออกฤทธิ์ที่ความบริสุทธิ์สูง สมบัติทางกายภาพเคมีที่ดีกว่า หากประเทศไทยหวังพึ่งการส่งออกของสมุนไพร จำเป็นต้องเพิ่มมูลค่าสมุนไพร โดยการพัฒนาสารสกัดสารสำคัญออกฤทธิ์ที่มีคุณภาพมากกว่าการส่งออกเพียงพืชสมุนไพรที่มีราคาต่ำ

ในการสร้างข้อกำหนดมาตรฐานจำเป็นต้องมีวิธีควบคุมและตรวจวิเคราะห์สารสำคัญออกฤทธิ์ที่ดี และจำเป็นต้องตรวจสอบวัตถุดิบ (พืชสมุนไพร) ที่มีการเพาะปลูกจริงในเชิงพาณิชย์ว่าแต่ละแหล่งผลิตมีคุณภาพของสมุนไพรเป็นอย่างไร ข้อมูลที่ได้สามารถใช้ในการสร้างข้อกำหนดได้

สารเคมีที่สำคัญที่พบในพืชบัวบกมีหลายชนิด แต่ที่สำคัญและเชื่อว่าเป็นสารออกฤทธิ์เป็นสารกลุ่ม triterpene ทั้งชนิด glycoside (Madecassoside, Asiaticoside) และ aglycone (Madecassic acid, Asiatic acid) จึงพบเสมอว่ามีการศึกษาเกี่ยวกับสารทั้ง 4 ชนิดในฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากมายเช่น ฤทธิ์รักษาแผล (Shukla A et al., 1999), ฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบ (Dunstan C.A. et al. 1997), ฤทธิ์ต้านระบบประสาท (Bradwein J., et al. 2000) เป็นต้น ในงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการศึกษาสารสกัดทั้ง 4 ชนิด

มีรายงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการวิเคราะห์หาปริมาณสาร triterpene glycoside ของบัวบกหลายบทความดังต่อไปนี้

Inamdar และคณะ (1996) ได้พัฒนาวิธี HPLC ในการวิเคราะห์สาร Asiaticoside, Madecassoside, Asiatic acid และ Madecassic acid โดยใช้ C18 column และใช้สารละลายน้ำ acetonitrile แบบ gradient elution

British Pharmacopoeia (2002) ได้เสนอวิธี TLC สำหรับการบอกเอกลักษณ์ของ Asiaticoside ในบัวบกโดยใช้ silica gel G plate และสารละลายผสมของ กรด acetic, กรด formic,
น้ำ และ ethyl acetate (11:11;27:100) เป็น mobile phase พ่นแผ่น TLC ด้วยสารละลาย anisaldehyde เพื่อทำให้เกิดสีสำหรับการตรวจสอบ นอกจากนี้ยังมีวิธี HPLC สำหรับการตรวจวัดปริมาณสาร 4 ชนิด โดยใช้ C18 column และสารละลายผสมน้ำ acetonitrile ที่มี 0.3% phosphoric acid เป็น mobile phase และตรวจวัดการดูดกลืนแสง UV ที่ 200 nm.

Schaneberg และคณะ (2003) ได้ปรับปรุงวิธีหาปริมาณของสาร triterpene 6 ชนิด ของบัวบกที่มีในพืชวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์ วิธีดังกล่าวใช้ C18 column และใช้สารละลายผสมน้ำ acetonitrile และมี methyl tert-butyl ether เป็น gradient mobile phase มีการตรวจวัดการกลืนแสง UV ที่ 206 nm. วิธีนี้ใช้เวลาในการวิเคราะห์นานถึง 50 นาทีต่อการฉีด 1 ครั้ง

Aziz และคณะ (2007) ได้รายงานการกระจายตัวของสาร Asiaticoside และ Madecassoside ในบัวบก 2 ชนิด (ชนิดขอบใบยัก และ ขอบใบเรียบ) ในประเทศมาเลเซีย การวิเคราะห์สารในรายงานนี้ใช้สารละลายผสม น้ำ acetonitrile แบบ gradient elution

Schieffer และคณะ (2005) ได้รายงานการใช้ SPE สำหรับการแก้ปัญหาการรบกวนของสารปนเปื้อนในการวิเคราะห์ด้วย HPLC การใช้ SPE ชนิด anion exchange ในการกำจัดสารรบกวนใน triterpene glycoside ของบัวบก ในงานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาต่อจากวิธีใน British Pharmacopoeia (2002)

วิธีวิเคราะห์ HPLC ที่ได้รายงานดังกล่าวข้างต้นส่วนใหญ่เป็นแบบ gradient elution ซึ่งเทคนิคนี้มีข้อจำกัดในเรื่องความไม่คงที่ของ baseline ระหว่างการชะ column ฉะนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้มุ่งแก้ปัญหาความไม่คงที่ของ baseline โดยการใช้ isocratic elution แทน อย่างไรก็ตามวิธี isocratic elution นี้อาจส่งผลให้เวลาที่ใช้ในกาวิเคราะห์ยาวนานมากขึ้น ดังนั้นจึงได้พัฒนาสารละลาย mobile phase โดยอาศัยหลักการของ ionization ของสารกลุ่ม triterpene aglycone acid ด้วยการปรับ pH ของสารละลาย mobile phase ให้มากขึ้น ด้วยหลักการของวิธีนี้สามารถทำให้เวลาในการวิเคราะห์เหมาะสมขึ้น

นอกจากวิธี HPLC ที่กำหนดว่าจะพัฒนาแล้ว ยังจะพัฒนาวิธีวิเคราะห์ TLC-Densitometry ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย ใช้เวลาน้อย ประหยัด แต่อาจมีความถูกต้องแม่นยำน้อยกว่าวิธี HPLC ในงานพัฒนาวิธี TLC-Densitometry นี้ ได้เปลี่ยนแปลงสารละลายที่ใช้ในการพ่น spot จาก anisaldehyde เป็น สาร anthrone ซึ่งให้ความคงตัวของสีที่เกิดขึ้นดีกว่า การตรวจวัดสีที่เกิดวัดที่ความยาวคลื่น 525 nm.

วิธีที่ได้พัฒนาแล้วทั้ง 2 วิธีต้องทำการประเมินความใช้ได้ (Method Validation) ตามข้อแนะนำของ ICH ซึ่งเป็นมาตรฐานสากลที่เป็นที่ยอมรับในงานวิเคราะห์ทางเภสัชกรรมและ/หรือวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง ทั้งนี้เพื่อให้ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์มีความถูกต้อง และเชื่อถือได้มากที่สุด

การวิจัยนี้ได้ร่วมมือกับ ดร. ปิยะ เฉลิมกลิ่น แห่งสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ซึ่งกำลังวิจัยเกี่ยวกับบัวบกในแง่ของการเป็นผักที่เป็นอาหาร โดยมีวัตถุประสงค์ในการคัดเลือกพันธ์บัวบกที่เหมาะสมในการเป็นผักอาหาร มุ่งพิจารณาจาก morphology และลักษณะที่เหมาะสมในการเป็นอาหาร ในขณะที่งานวิจัยนี้มีเป้าหมายในการศึกษาสารสำคัญที่พืชสร้างเพื่อพัฒนาเป็นยาต่อไป ดังนั้นตัวอย่างพืชใน 2 โครงการดังกล่าวจึงสอดคล้องกัน และในการนี้ได้พยายามเก็บตัวอย่างพืชบัวบกที่กระจายทั่วประเทศเท่าที่ทำได้เพื่อค้นหาพันธ์พืชที่เหมาะสม

มีการปลูกพืชบัวบกเพื่อการค้าในประเทศหลายแหล่ง ซึ่งส่วนใหญ่ของแหล่งดังกล่าวมุ่งส่งผลผลิตเป็นผัก ไม่มีแหล่งใดที่มุ่งผลิตเพื่อการสกัดสารเป็นยาหรือเครื่องสำอางเลย ทั้งที่มีการใช้สารดังกล่าวอย่างแพร่หลายและเปิดเผยในอุตสาหกรรมวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง วัตถุดิบที่ใช้ดังกล่าวส่วนใหญ่นำสั่งจากต่างประเทศในรูปสารสกัดบริสุทธิ์ หรือกึ่งบริสุทธิ์ สารสกัดเหล่านี้มีลักษณะทางกายที่เหมาะสมกับการทำผลิตภัณฑ์ มีความแน่นอน (คุณภาพ) ทางเคมีระดับหนึ่ง ในขณะที่ประเทศไทยมีการปลูกพืชบัวบกกระจายทั่วประเทศ บางแหล่งผลิตส่งออกไปยังประเทศเพื่อนบ้านในรูปวัตถุดิบที่มีราคาต่ำ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งมองถึงการเพิ่มมูลค่าของพืชบัวบก ซึ่งมีศักย์ภาพสูงในการใช้เป็นยาหรืออาหารเสริมและเครื่องสำอาง ข้อมูลพื้นฐานจึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่งในการพัฒนาตามเป้าหมายดังกล่าว

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาข้อมูลพื้นฐานของพืชบัวบกในประเทศที่ได้ดำเนินการมานานแต่ขาดการพัฒนาและขาดข้อมูลเชิงคุณภาพและมาตรฐาน ในการกำหนดมาตรฐานของผลิตภัณฑ์ใดๆ ข้อมูลวัตถุดิบ ตลอดจนกระบวนการผลิตที่เกี่ยวข้อง รวมทั้งการเพาะปลูกพืชวัตถุดิบจึงเป็นจุดเริ่มต้นที่ต้องศึกษาอย่างยิ่ง

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาข้อมูลพื้นฐานสำหรับการกำหนดมาตรฐานของสมุนไพรบัวบก ให้สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบ ในการสกัดและผลิตสารสำคัญออกฤทธิ์ของพืชสมุนไพรบัวบก และเภสัชผลิตภัณฑ์และการกำหนดมาตรฐานสารสกัดสารสำคัญออกฤทธิ์ที่มีองค์ประกอบใกล้เคียงกับสารที่มีอยู่จริงตามธรรมชาติ

ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาข้อมูลเพื่อใช้ในการกำหนดคุณลักษณะมาตรฐานของผงสมุนไพรบัวบก *Centella asiatica* (L.) Urban ซึ่งประกอบด้วยการตรวจสอบเอกลักษณ์ (Identification) และการตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพ การศึกษาทั้งหมดจะศึกษาจากตัวอย่างผง

สมุนไพรบัวบก *Centella asiatica* (L.) Urban ที่เก็บเกี่ยวในช่วง 1 รอบปี ได้แก่ มกราคม กุมภาพันธ์ มีนาคม พฤษภาคม มิถุนายน กรกฎาคม สิงหาคม กันยายน ตุลาคม พฤศจิกายน และธันวาคม จากแหล่งปลูก 2 แหล่งในจังหวัดนครปฐม แล้วนำผลการศึกษามาเป็นข้อมูลพื้นฐานใช้ในการกำหนดคุณลักษณะมาตรฐานของผงสมุนไพรบัวบก นอกจากนี้จะใช้กำหนดมาตรฐานสารสกัดสารสำคัญออกฤทธิ์ที่ได้พัฒนาให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นและมีองค์ประกอบใกล้เคียงกับสารที่มีอยู่จริงตามธรรมชาติ

ในการคัดเลือกพันธ์สมุนไพรที่มีสารสำคัญสูง ได้ศึกษาเปรียบเทียบตัวอย่างพืชจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่เก็บจาก 12 แหล่ง (จังหวัด) และยังศึกษาเพิ่มเติมปริมาณสารสำคัญในบัวบกที่เก็บจากแหล่งปลูกจริงเพื่อการค้า 2 จังหวัด (อุบลราชธานี และนครศรีธรรมราช) เปรียบเทียบผลกับตัวอย่างที่เก็บจากจังหวัดนครปฐม เป็นดำเนินการเป็นเวลา 2 รอบปี

งานวิจัยนี้ยังศึกษาเปรียบเทียบปริมาณสารสำคัญที่มีในใบ และก้านใบ เปรียบเทียบอายุของใบ (1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์) และเปรียบเทียบปริมาณแสงแดดในแปลงปลูก เพื่อเป็นเงื่อนไขของการผลิตวัตถุดิบเพื่อการสกัดสารสำคัญ

งานวิจัยนี้ยังศึกษาหาปริมาณสาระสำคัญในสิ่งสกัดที่ผลิตได้จากงานวิจัยในโครงการที่ 1 พร้อมศึกษาความคงตัวของสิ่งสกัดนั้นในสภาวะเร่ง ตามมาตรฐานสากล

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ข้อมูลพื้นฐานสำหรับการกำหนดมาตรฐานของสมุนไพรบัวบก *Centella asiatica* (L.) Urban สิ่งสกัดบัวบก อย่างเป็นระบบสากล ในลักษณะทางวิทยาศาสตร์ เพื่อเป็นประโยชน์ในการตรวจพิสูจน์และตรวจสอบผงสมุนไพรบัวบกที่จะนำมาใช้เป็นยาหรือการผลิตตัวยาและเภสัชผลิตภัณฑ์อย่างมีมาตรฐาน จนสามารถประกันคุณภาพและความปลอดภัยให้เป็นที่น่าเชื่อถือ

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1. สมุนไพรบัวบกสด *Centella asiatica* (L.) Urban เก็บจากไร่ ในซอยพัฒนา 6 หมู่ 5 ตำบลหนองดินแดง อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม 2 แห่ง คือ ไร่นางยอย สังข์เงิน และไร่นางสมร (ไม่ทราบนามสกุล) โดยเก็บพืชทุกสัปดาห์ที่ 2 ของทุกเดือนในรอบ 1 ปี (เก็บเกี่ยวตัวอย่างระหว่างเดือน พฤศจิกายน 2545 – ตุลาคม 2546 ยกเว้นเดือนเมษายน เนื่องจากเจ้าของไม่ได้เตรียมเก็บไว้ให้) ได้กำหนดรหัสของตัวอย่าง ดังตารางที่ 1.1

ตารางที่ 1.1 การกำหนดรหัสของตัวอย่างที่เก็บจากจังหวัดนครปฐม

เดือนที่เก็บ	ไร่นางยอย (A)	ไร่นางสมร (B)
มกราคม	1A	1B
กุมภาพันธ์	2A	2B
มีนาคม	3A	3B
พฤษภาคม	4A	4B
มิถุนายน	5A	5B
กรกฎาคม	6A	6B
สิงหาคม	7A	7B
กันยายน	8A	8B
ตุลาคม	9A	9B
พฤศจิกายน	10A	10B
ธันวาคม	11A	11B

1.2. กระดาษกรอง (ชนิด Ashless)

1.3. กล้องจุลทรรศน์ที่สามารถถ่ายภาพได้

1.4. กล้องถ่ายรูปและฟิล์ม

1.5. Slide และกระจกปิด (cover glass)

1.6. Stage micrometer

2. สารเคมี

2.1. สารมาตรฐาน (ได้รับความอนุเคราะห์จากองค์การเภสัชกรรม)

- Asiaticoside (90.0%)
- Asiatic acid (95.0%)
- Madecassoside (95.0%)
- Madecassic acid (95.0%)

2.2. เคมีภัณฑ์

Acetic anhydride AR grade บริษัท LAB Guard

Chloroform Lot 4440 KJJG AR grade บริษัท LAB Guard

Hydrochloric acid AR grade บริษัท LAB Guard

Nitric acid AR grade บริษัท LAB SCAN

Sulfuric acid AR grade บริษัท LAB SCAN

Ethanol AR grade บริษัท LAB SCAN

Ferric chloride AR grade บริษัท LAB SCAN

Methanol AR grade บริษัท LAB SCAN

Purified water

Sulfuric acid 96% Batch 03 04 1066 AR grade บริษัท LAB SCAN

TLC Plastic Sheet Silica Gel 60 F254 บริษัท Merk

Toluene (pro analysis grade) บริษัท Merk

3. เครื่องแก้ว

Crucible พร้อม ฝา

หลอดทดลอง

กรวยกรอง

บีกเกอร์

Volumemetric Flask

Desicator

Water bath

Apparatus for Determination of Water by the Azeotropic Distillation Method

TLC Tank

Appendrop tube

4. เครื่องมือ

เครื่อง HPLC (Shimadzu)

Pump : System module LC-10ADvp

Autosampler : SIL-10ADVP

Degasser : DGU-14A

Detector : Diode-array detector SPD-M10Avp

Controller : System controller SCL-10Avp

Software : Class VP

เครื่อง Densitometer : Shimadzu CS9301PC

เครื่อง pH meter : Metrohm

เครื่อง Ultrasonic Bath : Bandelin Sonorex digital 10P

เครื่องชั่ง Oertling NA 264

เครื่องชั่ง Sartorius Basic 0110-36

ตู้อบสาร Binder ED 53#02-42366

ตู้เผาสาร Muffle Furnace: Gallenhamp size 2 รหัส 05-06-134/32-3

เครื่อง Atomic Absorption Spectrometer : Varian Spectra-300

ระเบียบวิธีวิจัย (Method)

1 การศึกษาคุณลักษณะและมาตรฐานของพืชสมุนไพรบัวบก

1.1. การเก็บตัวอย่าง

บัวบกถูกเก็บมาจากไร่บัวบก 2 ไร่ใน ต. หนองดินแดง อ. เมือง จ. นครปฐม ซึ่งจะทำการเก็บตัวอย่างในช่วงสัปดาห์ที่ 2 ของแต่ละเดือนเป็นเวลา 1 ปี (ตั้งแต่เดือนมกราคม-ธันวาคม ปี 2546) โดยทางไร่ต้องงดฉีดยาฆ่าแมลงอย่างน้อย 1 สัปดาห์ก่อนทำการเก็บตัวอย่าง

บัวบกจะถูกตัดเหนือจากพื้นขึ้นมาประมาณ 2 นิ้วในปริมาณอย่างน้อย 10 กิโลกรัมต่อการเก็บในแต่ละครั้ง

รูปที่ 1.1 แสดงลักษณะแหล่งปลูกบัวบกที่จังหวัดนครปฐม

1.2. การเตรียมผงพืชแห้งและเก็บรักษาตัวอย่างผง

บัวบกที่เก็บมาจะต้องผ่านการล้างให้สะอาดด้วยน้ำก่อน แล้วจึงนำไปผึ่งลมให้แห้งเป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บัวบกที่ถูกอบจนแห้งจะถูกนำมาบดให้ละเอียด แล้วบรรจุในถุงพลาสติก 3 ชั้น เก็บในที่แห้ง

1.3. การตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเภสัชเวท (Pharmacognostic Characteristics)

1.3.1 วิธีวิจัยจากพืชสด

1.3.1.1. เลือกส่วนของพืชสดที่เหมาะสมที่จะทำการส่องกล้องจุลทรรศน์

1.3.1.2. ตัดชิ้นส่วนของพืชสดให้มีความหนาประมาณ 10-20 ไมโครเมตร โดยใช้ใบมีดโกนเฉือน

1.3.1.3. นำชิ้นส่วนนั้นวางบน Slide ที่สะอาดแล้วหยดน้ำที่พืชแล้วปิดด้วย cover slide

1.3.1.4. นำ Slide ไปดูส่วนต่าง ๆของพืชและบันทึกภาพ

1.3.2. วิธีวิจัยจากผงพืชแห้ง

1.3.2.1. เลือกส่วนของผงแห้งที่เหมาะสมที่จะทำการส่องกล้องจุลทรรศน์

1.3.2.2. นำผงแห้งวางบน Slide ที่สะอาดแล้วหยดน้ำที่พืชแล้วปิดด้วย cover slide

1.3.2.3. นำ Slide ไปดูส่วนต่าง ๆของพืชและบันทึกภาพ

1.3.3. การศึกษาทางมหทรรศน์ โดยดูจากลักษณะภายนอกของบัวบกและผงแห้งและบันทึกภาพ ดังแสดงในรูปที่ 1.2 และ 1.3

1.3.4. การศึกษาทางจุลทรรศน์ โดยดูจากลักษณะภายในของบัวบกและผงแห้งและบันทึกภาพ ดังแสดงในรูปที่ 1.4 – 1.11

1.4. การตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมี (Chemical Characteristics)

1.4.1. การตรวจสอบเบื้องต้นด้วย Chemical Test (Preliminary Test)

1.4.1.1. Saponin Test

ชั่งผงยา 0.5 กรัมเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เขย่าจนเกิดฟองที่คงที่ วัดความสูงของฟองที่เกิดขึ้น (หน่วยเซนติเมตร) และจับเวลาการคงอยู่ของฟอง (นาที) ดังแสดงในตารางที่ 1.2

1.4.1.2. Liebermann-Burchard Test

ชั่งผงยา 0.5 กรัมเติม Acetic anhydride 2 มิลลิลิตร อุ่นบน Water bath นาน 2 นาที กรองแล้วนำสารละลายใส เติม Sulfuric Acid เข้มข้น 1 มิลลิลิตร อย่างระมัดระวัง สังเกตสารละลายแยกชั้นและสี Brownish red ตรงรอยต่อ ดังแสดงในตารางที่ 1.2

1.4.1.3. Tannin Test

ต้ม 0.5 กรัมของผงยาด้วยน้ำกลั่น10 มิลลิลิตร กรอง นำสารละลายใสมา 2 มิลลิลิตร เติม 1% Ferric chloride T.S. 2-3 หยด ดูตะกอนสีเขียวที่เกิดขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 1.2

1.4.2. การตรวจสอบเพื่อยืนยันด้วย Thin-Layer Chromatography Test (Confirmatory Test)

1.4.2.1. การเตรียมสารสกัดผงยาสมุนไพรบัวบก

ชั่งผงยามาประมาณ 1.0 กรัม เติม Methanol 10 มิลลิลิตร แล้วนำไป Reflux บน Water bath นาน 20 นาที กรอง แล้วนำสารละลายใสไประเหยแห้ง จากนั้นนำส่วนที่ระเหยแห้งไปเติม Methanol 2 มิลลิลิตร

1.4.2.2. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ชั่งสารมาตรฐาน Asiaticoside, Madecassoside, Asiatic acid และ Madecassic acid มาอย่างละ 2.5 มิลลิกรัม ใส่ลงใน Appendrop Tube เติม methanol 1 มิลลิลิตรลงไป เขย่าจนได้สารละลายใส

1.4.2.3. การทำ Thin-Layer Chromatography มีรายละเอียดดังนี้

ขนาดเพลต	: 10 x 20 เซนติเมตร
ขนาดตัวอย่าง	: 10 ไมโครลิตร
ระบบ mobile phase	: Chloroform-Methanol-Water (15 : 7 : 1)
ระยะทาง	: ประมาณ 10 เซนติเมตร
สารตรวจหา	: Acetic anhydride-sulfuric acid reagent (Liebermann-Burchard Reagent)

หยดสารละลายของสารสกัดผงยาสมุนไพรบัวบกและสารละ ลายมาตรฐาน ลงบนแผ่น TLC Plastic Sheet Silica Gel 60 F254 ตำแหน่งละ 10 ไมโครลิตร ด้วย Capillary tube แล้วนำไปวาง ใน TLC tank ที่ทำให้อิ่มตัวด้วยสารละลาย mobile phase Chloroform-Methanol-Water (15 : 7 : 1) โดยมีระยะทางสูงประมาณ 10 เซนติเมตร จึงนำมาผึ่งให้แห้ง สเปรย์ด้วยสารละลาย Liebermann-Burchard นำไปทำให้ร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 15 นาที อ่านผลดูด้วยตาเปล่ากับดูด้วย UV ที่ 366 นาโนเมตร แล้วหาค่า hR_f และสีที่เกิดขึ้น เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ดังแสดงผลในตารางที่ 1.3 – 1.6 และรูปที่ 1.12

1.5. การตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพ

1.5.1. การหาปริมาณสิ่งปลอมปน (Foreign Matter)

ชั่งผงยา 100 กรัม ทำการแผ่กระจายบนแผ่นกระดาษสีขาวบางขนาด 50 x 50 เซนติเมตร (thin layer) ตรวจสอบสิ่งปลอมปนด้วยสายตาแล้วคัดแยกออกมา นำผงยาที่เหลือไปชั่งน้ำหนักแล้วนำไปหักลบกับน้ำหนักตั้งต้น คำนวณเป็นร้อยละของสิ่งปลอมปน ดังแสดงผลในตารางที่ 1.7 และแผนภูมิที่ 1.1

1.5.2. การหาน้ำหนักที่หายไปเมื่อทำให้แห้ง (Loss on drying)

เผา Porcelain Crucible พร้อมฝาที่ 450-500 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นใส่ใน Desiccator ชั่งจนได้น้ำหนักคงที่ (ผลต่างไม่เกิน 0.0005 กรัม)

ชั่งผงยาประมาณ 2-6 กรัม ใส่ใน Crucible ที่เผาจนน้ำหนักคงที่แล้ว ชั่งน้ำหนักไว้ ทำให้แห้งด้วยการอบที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ทำให้เย็นโดยใส่ Desiccator ที่มี silica gel แห้ง ชั่งอีกครั้ง แล้วนำไปอบที่ 105 องศาเซลเซียสอีกเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมาทำซ้ำเดิม และชั่งอีกจนได้น้ำหนักคงที่

ทำการชั่งโดยเตรียมผงยา ที่ 4 กรัม ในทุกตัวอย่าง ตัวอย่างละ 2 Crucible และเตรียมที่ 3 กรัมและ 2 กรัม ตามลำดับ เพื่อหาช่วงน้ำหนักที่เหมาะสม ในการ

วิเคราะห์บันทึกค่าน้ำหนักแล้วเก็บผงยาไว้วิเคราะห์หัวข้อถัดไป ดังแสดงผลในตารางที่ 1.8 – 1.10 และแผนภูมิที่ 1.2 – 1.4

1.5.3. ปริมาณเถ้ารวม (Total Ash)

เผาผงยาที่เหลือจากการหาน้ำหนักที่หายไปเมื่อทำให้แห้ง (Loss on drying) จนได้ตะกอนดำบน Hot Plate โดยแง้มฝา Crucible

นำ Crucible ที่มีตะกอนดำของผงยาไปเผาที่ 450-500 องศาเซลเซียสจนตะกอนดำหมดไปเป็นเวลา 4 ชั่วโมง

หากตะกอนดำไม่หมด (ไม่ได้ free carbon) ให้ใช้ ethanol จำนวน 15 มิลลิลิตรเติมลงไปและใช้แท่งแก้วบี้ให้เศษเถ้าแตกให้หมดจนเหลือแต่ขี้เถ้า แล้วนำไปเผาต่อที่ 450–500 องศาเซลเซียสจนหมดตะกอนดำเป็นเวลา4ชั่วโมง จนได้น้ำหนักคงที่ ทำให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก

นำค่าน้ำหนักที่ได้มาหักลบน้ำหนัก Crucible จะได้ Total Ash คำนวณน้ำหนักเถ้าเป็นร้อยละปริมาณเถ้ารวม บันทึกค่า แล้วเก็บผงเถ้าไว้วิเคราะห์หัวข้อถัดไป ดังแสดงผลในตารางที่ 1.8 – 1.10 และแผนภูมิที่ 1.2 – 1.4

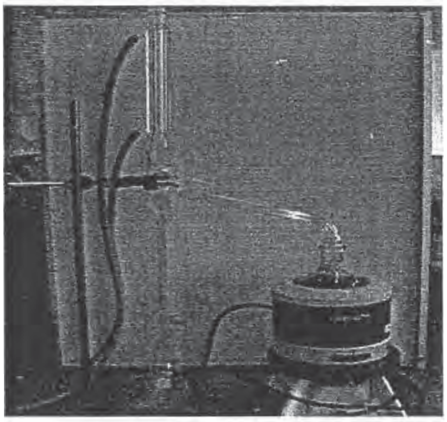
1.5.4. ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (Acid-Insoluble Ash)

นำ Total Ash ที่ได้ต้มด้วย Diluted Hydrochloric acid จำนวน 25 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที กรอง Insoluble matter ด้วยกระดาษกรองไร้เถ้า ล้างด้วยน้ำร้อนจนเป็นกลาง เผาที่ 450-500 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่ ทำให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก คำนวณปริมาณที่เหลือเป็นร้อยละของ Acid Insoluble Ash ดังแสดงผลในตารางที่ 1.8 – 1.10 และแผนภูมิที่ 1.2 – 1.4

หมายเหตุ ผงยาน้ำหนัก 3 กรัมทำการชะด้วย Diluted Nitric acid จำนวน 10 มิลลิลิตรก่อนต้มด้วย Dilute Hydrochloric acid จำนวน 25 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณการปนเปื้อนด้วยโลหะหนัก (Heavy Metal Contamination) โดยวิธี Atomic Absorption ต่อไป

1.5.5. การวัดปริมาณน้ำในผงพืชแห้ง (Moisture content) โดยวิธี Azeotropic distillation

ติดตั้งเครื่องแก้วสำหรับการตรวจหาน้ำด้วยวิธีการกลั่นแบบอะซีโอโทรป



รูปที่1.15 แสดงเครื่องแก้วสำหรับการหาน้ำด้วยวิธีการกลั่นแบบอะซีโอโทรปิก

ใส่ Toluene 200 มิลลิลิตรและน้ำ 2 มิลลิลิตร ใน flask ก้นกลม กลั่น 2 ชั่วโมง ทำให้เย็น อ่านปริมาณน้ำที่กลั่นได้ (n) จดบันทึกไว้

ชั่งผงพืชแห้งที่คาดว่าจะมีน้ำประมาณ 2-3 มิลลิลิตร ใส่ใน flask ก้นกลม เติม glass bead เพื่อป้องกันการ bumping (จากการทดลอง พบว่าใช้ผงยาบัวบก ประมาณ 30 กรัม จะได้ปริมาตรน้ำประมาณ 2 มิลลิลิตร) ต้มเบาๆ ประมาณ 15 นาที จน Toluene เริ่มเดือด ควบคุมให้มีการกลั่นออกมาโดยหยดประมาณ 2 หยดต่อวินาที จนกระทั่ง คาดว่าน้ำหมด แล้วเพิ่มอัตราเร็วขึ้น เป็น 4 หยดต่อวินาที ต่อไปอีกระยะหนึ่ง ล้าง condensor ด้วย Toluene ต้มต่อไปอีก 5 นาที ทำให้เย็น ชั้นน้ำและ Toluene จะแยกชั้นโดยน้ำจะอยู่ชั้นล่าง อ่านปริมาณน้ำที่กลั่นได้ (n') จดบันทึกไว้ คำนวณปริมาณน้ำเป็นร้อยละโดยใช้สูตร

$$\frac{100(n'-n)}{P}$$

เมื่อ P = น้ำหนักของผงพืชแห้งเป็นกรัม

n = ปริมาตรน้ำที่วัดได้จากการกลั่นครั้งแรก หน่วยเป็นมิลลิลิตร

n' = ปริมาตรที่วัดได้จากการกลั่นครั้งหลัง (เป็น 2 ครั้งรวมกัน) หน่วยเป็นมิลลิลิตร

ทำทุกตัวอย่าง ตัวอย่างละ 1 ครั้ง (เนื่องจาก Toluene ไม่เพียงพอ) บันทึกค่า ดังแสดงผลในตารางที่ 1.11 และแผนภูมิที่ 1.5

1.5.6. ปริมาณสิ่งสกัด (Extractive value)

1.5.6.1. ปริมาณสิ่งสกัดที่ละลายในน้ำ

ชั่งผงพืช 5 กรัม สกัดด้วย chloroform water 100 มิลลิลิตร ใน flask เขย่าเป็นระยะ ๆนาน 8 ชั่วโมง และทิ้งไว้อีก 16 ชั่วโมง กรองโดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 1 แบ่งมา 20 มิลลิลิตร ระเหยแห้ง บนเครื่องอังไอน้ำ อบที่ 105 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง น้ำหนักที่ได้เป็นน้ำหนักสิ่งสกัดด้วยน้ำ ดังแสดงผลในตารางตารางที่ 1.12 และแผนภูมิที่ 1.6

1.5.6.2. ปริมาณสิ่งสกัดที่ละลายในแอลกอฮอล์

ชั่งผงพืช 5 กรัม สกัดด้วย Ethanol 100 มิลลิลิตร ใน flask เขย่าเป็นระยะๆนาน 8 ชั่วโมง และตั้งทิ้งไว้อีก 16 ชั่วโมง กรองโดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 1 แบ่งมา 20 มิลลิลิตร ระเหยแห้ง บนเครื่องอังไอน้ำ อบที่ 105 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง น้ำหนักที่ได้เป็นน้ำหนักสิ่งสกัดด้วย แอลกอฮอล์ ดังแสดงผลในตารางที่ 1.12 และแผนภูมิที่ 1.7

1.5.7. ปริมาณการปนเปื้อนด้วยโลหะหนัก (Heavy Metal Contamination) โดยวิธี Atomic Absorption

เตรียมตัวอย่าง โดยใช้ Diluted Nitric acid จำนวน 10 มิลลิลิตร ซะเถ้ารวมที่ได้จากการหาปริมาณเถ้ารวม (Total Ash) นำไปส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ด้วยวิธี Atomic Absorption โดยวิเคราะห์ปริมาณ เหล็กและตะกั่วแล้วนำมาคำนวณกลับเป็นหน่วย ppm ต่อน้ำหนักผงพืช 1 กรัม ดังแสดงผลในตารางที่ 1.13 และแผนภูมิที่ 1.8 – 1.9

ตารางที่ 1.14 เป็นการสรุปผลการทดลองในส่วนการหามาตรฐานของพืชสมุนไพรบัวบก

2 การศึกษาคุณลักษณะและมาตรฐานของสารสกัดจากบัวบก

2.1 การเก็บตัวอย่างพืชและการเก็บรักษา

ได้ดำเนินการตามหัวข้อ 1.1 และ 1.2

ได้ทำการเก็บตัวอย่างพืชบัวบกอีก 12 แหล่ง โดยร่วมมือกับ ดร. ปิยะ เฉลิมกลิ่น แห่งสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี พืชตัวอย่างที่เก็บได้ทำการขยายพันธุ์ และปลูกที่แปลงปลูกของ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี รหัส ตัวอย่างพืชแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แสดงรหัสตัวอย่างพืชบัวบกที่เก็บจาก 12 จังหวัดและช่วงเวลาเก็บ

รหัสตัวอย่าง	จังหวัดที่เก็บ	ช่วงเวลาเก็บเพื่อการวิเคราะห์
CA1	ปราจีนบุรี	กรกฎาคม
CA2	นครศรีธรรมราช (ต.บ่อล้อ)	กันยายน
CA3	อุบลราชธานี	กรกฎาคม
CA4	ตราด	พฤศจิกายน
CA5	นครศรีธรรมราช (ตลาดบ่อล้อ)	กรกฎาคม
CA6	ระยอง	กรกฎาคม
CA7	ชลบุรี	กรกฎาคม
CA8	นครราชสีมา	กันยายน
CA9	สุโขทัย	กันยายน
CA10	เชียงใหม่ (ก้านเขียว)	พฤศจิกายน
CA11	พิษณุโลก	พฤศจิกายน
CA12	เชียงใหม่	กรกฎาคม

2.2 การสกัดและการแยกสาร triterpene glycoside

หมักผงบัวบกแห้ง 300 กรัมใน methanol 70% จำนวน 3 ลิตร เป็นเวลา 3 วัน แล้วจึงนำสารละลายที่ได้จากการสกัดมากรองเพื่อแยกกาก กากที่เหลือจากการสกัดนำมาหมักต่อตามกระบวนการข้างต้นอีกประมาณ 2 ครั้ง ส่วนสารละลายที่ได้จากการกรองนำมารวมกัน แล้วนำมาสกัดต่อด้วย dichloromethane และ *n*-butanol ตามลำดับ เก็บชั้น *n*-butanol ที่ได้จากการสกัดมารวมกัน แล้วสกัดแยกต่อด้วยสารละลายด่าง (0.2 N sodium carbonate) และน้ำตามลำดับ หลังจากนั้นจึงนำชั้น *n*-butnaol ที่ได้มาระเหยแห้งโดยการกลั่นลดความดันที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เพื่อทำให้มีความเข้มข้นขึ้น แล้วจึงเติม ethyl acetate ลงไปเพื่อตกตะกอน triterpene glycoside (ตะกอน A)

2.3 การเตรียม Asiaticoside, Madecassoside, Asiatica acid และ Madecassic acid เพื่อใช้เป็นสารมาตรฐาน

2.3.1 การเตรียม Asiaticoside และ Madecassoside

นำตะกอน A 100 มิลลิกรัม มาทำการแยกด้วยซิลิกาคอลัมน์ โดยให้ตัวทำละลายผสมระหว่าง dichloromethane และ methanol ในอัตราส่วนต่างๆ เป็นตัวชะสาร เพื่อแยก Asiaticoside และ Madecasssoside

Asiaticoside และ Madecassoside ที่ได้จากการแยกจะถูกทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น โดยการตกผลึกซ้ำด้วย methanol และ methanol-acetone ตามลำดับ

2.3.2 การเตรียม Asiatic acid และ Madecassic acid

ละลายตะกอน A 2.5 กรัม ใน methanol 50 มิลลิลิตร แล้วจึงเติมสารละลายด่าง 5% potassium hydroxide 283 มิลลิลิตร หลังจากนั้นตั้ง reflux สารละลายผสมที่ได้ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วจึงตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเย็นเท่าอุณหภูมิห้อง ปรับสารละลายให้เป็นกลางโดยการเติมกรด glacial acetic acid ทำการแยก aglycone ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาโดยการสกัดด้วย dichloromethane 100 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง ชั้น dichloromethane ที่ได้จากการสกัดถูกนำมาระเหยแห้งภายใต้การลดความดันจะได้เป็นตะกอน B

นำตะกอน B 100 มิลลิกรัม มาทำการแยกด้วยซิลิกาคอลัมน์ โดยให้ตัวทำละลายผสมระหว่าง dichloromethane และ methanol ในอัตราส่วน 9:1 เป็นตัวชะสาร เพื่อแยก asiatic acid และ madecassic acid Asiatic acid และ madecassic acid ที่ได้จากการแยกจะถูกทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น โดยการตกผลึกซ้ำด้วย methanol

2.4 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ triterpene glycoside และ aglycone

2.4.1 TLC method

ละลายสารแต่ละตัวใน methanol แล้วนำไปวิเคราะห์บน TLC plate เปรียบเทียบค่า Rf ของสารที่ได้จากการสกัดกับสารมาตรฐานแต่ละตัว

2.4.2 HPLC method

ละลาย 10 มิลลิกรัมของสารแต่ละตัวใน methanol 100 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร) แล้วนำไปฉีดเข้า HPLC เปรียบเทียบค่า retention time ของสารที่ได้จากการสกัดกับสารมาตรฐานแต่ละตัว

สภาวะของ HPLC

Column	Hi-Q Sil C18, 4.6 x 150 mm, 5 ไมครอน
Mobile phase	Acetonitrile : phosphate buffer (10mM), pH 7.1 (29:71)
Flow rate	1 มิลลิลิตรต่อนาที
Detector	Photo-Diode Array at 210 นาโนเมตร
Injection volume	20 ไมโครลิตร

2.4.3 IR method

บดผสมสาร 2-3 มลลิกรัมกับ dried potassium bromide 50 มิลลิกรัมจนเข้ากัน แล้วนำไปตอกจนเป็นแผ่นบาง นำแผ่นที่ได้ไปสแกนด้วยเครื่อง IR

2.4.4 NMR method

ละลายสาร 10 มิลลิกรัมด้วย Deuterated DMSO ใส่ในหลอด NMR แล้วนำไปวัดด้วยเครื่อง NMR

2.4.5 Melting point

นำสารประมาณ 1 มิลลิกรัม ใส่ใน capillary melting point แล้วนำไปหา melting point ด้วยเครื่องวัด melting point

2.5 การหาความบริสุทธิ์ของ Asiaitcoside, Madecassoside, Asiatic acid และ Madecassic acid ที่ได้จากการแยกเพื่อใช้เป็นสารมาตรฐานใช้งาน

2.5.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานอ้างอิง

ชั่งสารมาตรฐานอ้างอิงมาอย่างถูกต้องแม่นยำประมาณ 10 มิลลิกรัม ละลายใน 50% methanol แล้วปรับปริมาตรจนครบ 50 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร)

2.5.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานใช้งาน

ชั่งสารมาตรฐานใช้งานมาอย่างถูกต้องแม่นยำประมาณ 10 มิลลิกรัม ละลายใน 50% methanol แล้วปรับปริมาตรจนครบ 50 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร)

2.5.3 การวิเคราะห์และการคำนวณ

ฉีดสารละลายแต่ละตัวเข้า HPLC แล้วคำนวณหาความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐานใช้งานแต่ละตัวโดยการเปรียบเทียบ peak area ratio กับสารมาตรฐานอ้างอิงแต่ละตัว โดยใช้สูตรการคำนวณดังนี้

$$\%\ purity = \frac{Au \times Ws \times \%purity\ of\ reference\ standard}{As \times Wu}$$

เมื่อ

Au = Peak area of sample solution

As = Peak area of standard solution

Wu = Weight of sample (mg)

Ws = Weight of standard (mg)

Purity of reference AS standard = 90.0 %

Purity of reference AA standard	=	95.0 %
Purity of reference MS standard	=	95.0 %
Purity of reference MA standard	=	95.0 %

2.6 การพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่าง

2.6.1 การพัฒนาวิธีการสกัดสารออกจากตัวอย่าง

ผงบัวบกแห้ง 5 กรัมถูกนำมา reflux กับตัวทำละลายผสม 60, 70 และ 80% methanol ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วจึงนำมากรองเพื่อแยกกาก ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร แล้วจึงฉีดเข้า HPLC เพื่อคำนวณหาตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สามารถสกัดสารออกมาได้มากที่สุด

ผงบัวบกแห้ง 5 กรัมถูกนำมา reflux กับตัวทำละลายผสม 80% methanol ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0.25, 0.50, 0.75, 1, 1.5 และ 2 ชั่วโมงตามลำดับแล้วจึงนำมากรองเพื่อแยกกาก ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร แล้วจึงฉีดเข้า HPLC เพื่อคำนวณหาเวลาที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการสกัดสาร

2.6.2 การพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วย Solid Phase Extraction (SPE)

ดูดสารละลายตัวอย่าง 2 มิลลิลิตรใส่ใน SPE cartridge, C18 500 มิลลิกรัม ที่ได้ผ่าน methanol และน้ำอย่างละ 2 มิลลิลิตร มาแล้วตามลำดับ แล้วจึงหาตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับการชะสารเจือปนออกจากตัวอย่างซึ่งในที่นี้ได้ทดลองใช้น้ำ, 10 และ 15% acetonitrile ในน้ำในปริมาตร 3 มิลลิลิตร เป็นตัวชะสารเจือปน นำตัวทำละลายแต่ละตัวไปฉีดเข้า HPLC เพื่อหาว่า ตัวทำละลายใดสามารถชะสิ่งเจือปนออกมาได้มากที่สุด แต่ไม่ชะสารที่สนใจออกมาจากตัวอย่าง

หลังจากนั้นจึงใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง acetonitrile กับ phosphate buffer, 10 mM pH 7.1 อัตราส่วน 45:55 เป็นตัวชะสารที่สนใจออกมาจาก SPE cartidge โดยใช้ปริมาตรในการชะแต่ละครั้ง 1 ml เป็นจำนวน 4 ครั้ง และครั้งละ 3 ml 1 ครั้ง นำตัวทำละลายแต่ละส่วนฉีดเข้า HPLC เพื่อหาปริมาตรที่เหมาะสมสำหรับการชะสาร

2.7 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สำหรับหาปริมาณ Asiaticoside, Madecassoside, Asiatic acid และ Madecassic acid โดย High Performance Liquid Chromatography

2.7.1 ข้อกำหนดสำหรับการพัฒนาวิธีวิเคราะห์

ในการศึกษาครั้งนี้อิงตามข้อกำหนดของ ICH guideline สำหรับการวิเคราะห์เภสัชภัณฑ์ กล่าวคือ

ค่า Resolution ระหว่าง peak มากกว่าหรือเท่ากับ 1.5

ค่า Tailing Factor ของแต่ละ peak น้อยกว่าหรือเท่ากับ 2.0

Number of Theoretical Plate ควรมากกว่า 2000

อย่างไรก็ตามตัวทำละลายหรือชนิดของบัฟเฟอร์ที่ใช้ใน mobile phase ไม่ควรรบกวน detector ณ ความยาวคลื่นที่ใช้ ซึ่งในที่นี้คือ 210 nm

2.7.2 ผลของ stationary phase

Octadecylsilyl (C18)-column และ phenyl-column ถูกใช้เป็น stationary phase ในการศึกษาครั้งนี้โดยทำการฉีดสารละลายของสารมาตรฐานใช้งาน

2.7.3 ผลของอัตราส่วน acetonitrile ใน mobile phase

หาอัตราส่วนของ acetonitrile ใน mobile phase ที่เหมาะสมในการชะสารออกมาจากคอลัมน์ ตั้งแต่ 25-30%

2.7.4 ผลของความเข้มข้นและ พีเอช ของบัฟเฟอร์ใน mobile phase

ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 10 และ 20 mM pH 7.1 และความ เข้มข้นของบัฟเฟอร์ 10 mM ที่ pH 7.0 และ 7.1 ผสมอยู่กับ acetonitrile ในอัตราส่วน 29:71 ถูกใช้เป็น mobile phase เพื่อหา ค ว า ม เข้มข้นและพีเอชของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม

2.7.5 การหาสารมาตรฐานภายใน (internal standard)

หลักเกณฑ์สำหรับการหาสารมาตรฐานภายใน (internal standard) ที่เหมาะสม คือ จะต้องเป็นสารที่มีความคงตัวดี ไม่ทำ ปฏิกริยากับสารที่สนใจ สามารถทำการตรวจวัด ณ ความยาวคลื่นที่ ต้องการได้ (210 nm) และไม่ถูกรบกวนโดยสารอื่นๆในตัวอย่างได้ โดยในการศึกษาครั้งนี้ได้ทดลองใช้ prednisolone, betametasone, dexametasone, hydrocortisone hemisuccinate, 18β-glycyrhetic acid, oleanolic acid, dipotassium glycyrhezinate, fluocinolone acetate และpropyl paraben.

2.8 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สำหรับหาปริมาณ Asiaticoside, Madecassoside, Asiatic acid และ Madecassic acid โดย Thin Layer Chromatography (TLC)

ในการศึกษานี้ได้ใช้ แผ่น TLC silica gel ในขนาด 20x10 เซนติเมตร เป็น stationary phase และ สารละลายผสมระหว่าง chloroform : methanol : water ในอัตราส่วน 30:15:2 เป็น developing solvent ซึ่งได้มีการเปรียบเทียบคุณสมบัติของ Anthrone reagent และ Liebermann Burchard reagent ในการเป็นตัวตรวจวัดเพื่อหาปริมาณสาร โดยการนำแผ่น TLC ที่ผ่านการพัฒนาใน developing solvent มาฉีดพ่น reagent แต่ละชนิด แล้วอบที่ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นจึงนำมาทำการตรวจวัดความเข้มของสีด้วย densitometer ที่ความยาวคลื่น 525 nm ทุกๆ ช่วงเวลา 15 นาที นำผลที่ได้มาแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับความเข้มของสีที่ปรากฏ เพื่อหา reagent ที่เหมาะสมในการเป็นตัวตรวจวัด

2.9 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี High Performance Liquid Chromatography

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ในการศึกษานี้ มีการอ้างอิงตามข้อกำหนดของ ICH guideline ในหัวข้อ ความถูกต้อง (Accuracy), ความแม่นยำ (Precision), ความจำเพาะเจาะจง (Specificity), ปริมาณสารต่ำสุดที่สามารถใช้หาปริมาณได้อย่างถูกต้อง (Quantitation limit), และช่วงที่ให้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง (Linearity and Range)

2.9.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐานให้มีความเข้มข้นตามตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ตารางแสดงความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานสำหรับการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี HPLC

สารมาตรฐาน	**ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)**				
	S_1	**S_2**	**S_3**	**S_4**	**S_5**
MS	0.070	0.130	0.270	0.330	0.400
AS	0.050	0.100	0.200	0.250	0.300
MA	0.008	0.016	0.032	0.040	0.048
AA	0.004	0.008	0.016	0.020	0.024
Prednisolone	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044

2.9.2 การสกัดสารออกจากตัวอย่างด้วยวิธี reflux

ตั้ง reflux apparatus ใส่ผงพืชบัวบก 5 กรัม เติม 80% methanol 90 มิลลิลิตร reflux เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำมากรองเพื่อแยกกาก ตั้งสารละลายที่ได้ให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง แล้วจึงปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร

2.9.3 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ดูดสารละลายที่ได้จากการสกัดข้างต้นมา 5 มิลลิลิตร แล้วเติมสารมาตรฐานลงไป หลังจากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 10 มิลลิลิตร โดยความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมลงไปดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ตารางแสดงความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมลงในสารละลายตัวอย่าง

สารมาตรฐาน	ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติม (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)					
	E_0	E_1	E_2	E_3	E_4	E_5
Prednisolone	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044
MS	-	0.070	0.130	0.270	0.330	0.400
AS	-	0.050	0.100	0.200	0.250	0.300
MA	-	0.008	0.016	0.032	0.040	0.048
AA	-	0.004	0.008	0.016	0.020	0.024

2.9.4 การทำความสะอาดตัวอย่างด้วย Solid Phase Extraction (SPE)

ดูดสารละลายตัวอย่างมา 2 มิลลิลิตร ใส่ใน SPE cartridge (500 มิลลิกรัม) ที่ผ่านการเตรียมด้วย methanol และน้ำ อย่างละ 2 มิลลิลิตร ตามลำดับ แล้วล้างสิ่งเจือปนออกจาก SPE ด้วย acetonitrile : methanol อัตราส่วน 1:9 ในปริมาตร 3 มิลลิลิตร และตามด้วย acetonitrile : phosphate buffer, 10mM pH 7.1 อัตราส่วน 45:55 ในปริมาตรครั้งละ 1 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง เพื่อชะสารออกมาจาก SPE แล้วเก็บสารละลายที่ได้มารวมกัน กรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมครอน ก่อนฉีดเข้า HPLC

2.9.5 การตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy test)

ทดสอบโดยการเตรียมสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ 6 ซ้ำ แล้วคำนวณหา %recovery (%R) ตามสมการข้างล่างนี้

$$\%R = \frac{[XE_i - XE_0] \times 100}{WS_I}$$

เมื่อ

XE_i = ความเข้มข้นของสารที่ได้จากการวิเคราะห์

XE_0 = ความเข้มข้นของสารที่ได้จากการวิเคราะห์ E_0

WS_I = ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่ใส่เข้าไปในตัวอย่าง

2.9.6 การตรวจสอบความแม่นยำ (Precision test)

ทดสอบโดยเตรียมตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ 5 ซ้ำแล้วคำนวณหาค่าความเบี่ยงเบนสัมพัทธ์ (%RSD) ภายในวันเดียวกัน หรือเรียกว่า repeatability precision และเตรียมตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ 2 ซ้ำ เป็นเวลา 3 วัน เพื่อคำนวณหาค่าความเบี่ยงเบนสัมพัทธ์ ระหว่างวัน หรือเรียกว่า intermediate precision

$$\%RSD = [SD / \bar{X}] \times 100$$

เมื่อ

SD = ความเบี่ยงเบนของ %R

$\bar{X}$ = ค่าเฉลี่ยของ %R

2.9.7 การหาความสัมพันธ์เส้นตรงและช่วงที่ให้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง (linearity and range)

ทดสอบโดยการเตรียมตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ 3 ซ้ำ แล้วหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้กับความเข้มข้นจริงที่เติมลงในตัวอย่างของแต่ละตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ ออกมาเป็น coefficient of determination (r^2)

ส่วนช่วงที่ให้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง ให้พิจารณาจาก %recovery อยู่ในช่วง 96-104, %RSD ไม่มากกว่า 3 และ r^2 ของสมการเส้นตรงมากกว่า 0.99

2.9.8 การตรวจสอบความจำเพาะเจาะจง (specificity test)

เปรียบเทียบ spectrum ของพีกสารแต่ละตัวในตัวอย่างกับ spectrum ของสารมาตรฐาน โดยใช้ photodiode array detector เพื่อแสดงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์

2.9.9 การหาปริมาณต่ำสุดในการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณสาร (quantitation limit)

ฉีดตัวทำละลายเข้าไปเพื่อหาความสูงของ noise ในบริเวณที่สาร ออกมา หลังจากนั้นจึงฉีดสารละลายมาตรฐานแต่ละตัวที่ความเข้มข้นต่างๆ จนได้ความสูงของพีกมากกว่าความสูงของ noise 10 เท่า ณ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่ให้ความสูงของพีกมากกว่าความสูงของ noise 10 เท่า คือ ค่า quantitation limit และทำการฉีดสารละลายมาตรฐาน ณ ความเข้มข้นดังกล่าวซ้ำๆ กัน 5 ครั้ง เพื่อคำนวณหาความแม่นยำในการคำนวณหาพื้นที่ใต้พีก (peak area) โดย %RSD ไม่ควรเกิน 3

2.9.10 การตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ (system suitability test)

ในการตรวจสอบความเหมาะสมของระบบสามารถทำได้โดยการฉีดสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 3 (S_3) ซ้ำๆ กัน 5 ครั้ง แล้วคำนวณหา ความแม่นยำ (precision), number of theoretical plates (N), ความสมมาตรของพีก (tailing factor) และ ความสามารถในการแยกของพีก (resolution) ของสารมาตรฐานแต่ละตัว

2.10 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี Thin Layer Chromatography

2.10.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

การเตรียมสารมาตรฐาน AS และ MS ใน methanol ให้มีความเข้มข้น 0.19 และ 0.25 mg/ml ตามลำดับ

2.10.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

เตรียมสารละลายตัวอย่างจาก extract powder (ประกอบด้วย AS และ MS ในอัตราส่วน 35.23% และ 49.46 % ตามลำดับ) ใน methanol ให้ความเข้มข้นดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี TLC

สาร	**ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)**				
	1	**2**	**3**	**4**	**5**
Extract powder	1.00	2.00	10.0	15.0	20.0
AS	0.35	0.70	3.52	5.28	7.05
MS	0.49	0.99	4.95	7.42	9.89

2.10.3 การเตรียม anthrone reagent

ชั่ง anthrone มาอย่างถูกต้องแม่นยำ 100 mg ละลายในกรดซัลฟูริกเข้มข้น 5 ml แล้วเติม absolute ethanol 50 ml

2.10.4 สภาวะการทดลอง

นำแผ่น TLC ที่เตรียมไว้มา spot สารละลายตัวอย่างตามสภาวะข้างล่างนี้

Stationary phase silica gel plate GF_{254} 10 x 20 cm

Developing solvent chloroform : methanol : water (30 : 15 : 2)

Applied 2 ไมโครลิตร

Densitometer parameter

Photo mode Reflection

Scan mode Linear

Set zero mode At start

Beam size 0.4 x 1.0 mm.

Wavelength 525 nm.

นำแผ่น TLC ที่ผ่านการพัฒนาแล้วมาฉีดพ่นด้วย Anthrone reagent แล้วนำไปอบที่ 110 ^{o}C เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นจึงนำมาทิ้งไว้จนเย็นเท่าอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำมาตรวจสอบความเข้มของสีด้วยเครื่อง densitometer ที่ความยาวคลื่น 525 nm เปรียบเทียบพื้นที่ใต้พีกของตัวอย่างกับสารมาตรฐาน

2.10.5 การตรวจสอบความถูกต้อง(accuracy test)

เตรียมสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ ซ้ำๆ กัน 6 ครั้ง แล้วคำนวณหาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ในรูปแบบของ %recovery (%R) ตามสมการข้างล่าง

%R = [ปริมาณที่วิเคราะห์ได้ / ปริมาณที่เติมเข้าไป] x 100

2.10.6 การตรวจสอบความแม่นยำ (precision test)

เตรียมสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ ซ้ำๆ กัน 6 ครั้ง แล้วคำนวณหาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ในรูปแบบของความเบี่ยงเบนสัมพัทธ์ (%RSD) ของ %recovery

2.10.7 การหาความสัมพันธ์เส้นตรงและช่วงที่ให้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง (linearity and range)

หาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้กับความเข้มข้นจริงที่อยู่ในตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ 5 ความเข้มข้น โดยเตรียมความเข้มข้นละ 3 ชุด ออกมาเป็นสมการเส้นตรงและค่า coefficient of determination (r^2) และช่วงที่ให้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง ให้พิจารณาจาก %recovery อยู่ในช่วง 96-104, %RSD ไม่มากกว่า 3 และ r^2 ของสมการเส้นตรงมากกว่า 0.99

2.11ารวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณ Madecassoside, Asiaticoside, Madecassic acid และ Asiatic acid ในผงบัวบกโดยวิธี HPLC

2.11.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐานให้มีความเข้มข้นตามตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 ตารางแสดงความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

สารมาตรฐาน	ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)		
	S_1	S_2	S_3
MS	0.070	0.270	0.400
AS	0.050	0.200	0.300
MA	0.008	0.032	0.048
AA	0.004	0.016	0.024
Prednisolone	0.044	0.044	0.044

2.11.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานภายใน

ชั่ง prednisolone มาอย่างถูกต้องแม่นยำ 10 มิลลิกรัม ละลายใน methanol แล้วปรับปริมาตรจนครบ 25 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นเท่ากับ 0.4 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร)

2.11.3 การสกัดสารออกมาจากตัวอย่างด้วยการ reflux

ตั้ง reflux ผงบัวบก 5 กรัม ใน 80%methanol 90 มิลลิลิตร บน water bath เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง แล้วจึงนำมากรองเก็บสารละลาย รอจนกระทั่งเย็นเท่าอุณหภูมิห้อง จึงปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร

2.11.4 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ดูดสารละลายที่ได้จากการสกัดข้างต้นมา 5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายมาตรฐานภายใน 1 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 10 มิลลิลิตร

ดูดสารละลายตัวอย่างมา 2 มิลลิลิตรใส่ใน SPE cartridge (500 มิลลิกรัม) ที่ผ่านการเตรียมด้วย methanol และน้ำ อย่างละ 2 มิลลิลิตร ตามลำดับ แล้วล้างสิ่งเจือปนออกจาก SPE ด้วย acetonitrile : methanol อัตราส่วน 1:9 ในปริมาตร 3 มิลลิลิตรและตามด้วย acetonitrile : phosphate buffer, 10mM pH 7.1 อัตราส่วน 45:55 ในปริมาตรครั้งละ 1 มิลลิลิตรจำนวน 3 ครั้ง เพื่อชะสารออกมาจาก SPE แล้วเก็บสารละลายที่ได้มารวมกัน กรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมครอน ก่อนฉีดเข้า HPLC

2.11.5 การเตรียมสารละลายตัวอย่างจากผงสารสกัดบัวบก

ชั่งตัวอย่างมาอย่างถูกต้องแม่นยำ 20 มิลลิกรัม ละลายใน mobile phase 50 มิลลิลิตรเติมสารละลายมาตรฐานภายใน 10 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตรด้วย mobile phase

2.11.6 การศึกษาความคงตัวของผงสารสกัดบัวบก

ชั่งผงสารสกัดบัวบกมาประมาณ 200 มิลลิกรัม ใส่ในขวดสีชา แล้วนำไปเก็บเข้าตู้ทดสอบความคงตัวที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75% เป็นเวลา 3 เดือน โดยสุ่มตัวอย่างออกมาวิเคราะห์ทุกๆ เดือนจนครบ 3 เดือน

2.12 การวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณ Madecassoside และ Asiaticosideในผงบัวบกโดยวิธี TLC

2.12.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ชั่งสารมาตรฐานใช้งานให้มีปริมาณของ Madecassoside และ Asiaticoside อย่างละ 10 และ 20 มิลลิกรัม ละลายใน methanol 10 มิลลิลิตร

2.12.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ดูดสารละลายที่ได้จากการสกัดมา 5 มิลลิลิตรแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 10 มิลลิลิตร

2.12.3 การทำความสะอาดสารละลายตัวอย่างด้วย SPE

ดูดสารละลายตัวอย่างมา 2 มิลลิลิตรใส่ใน SPE cartridge (500 มิลลิกรัม) ที่ผ่านการเตรียมด้วย methanol และน้ำ อย่างละ 2 มิลลิลิตร ตามลำดับ แล้วล้างสิ่งเจือปนออกจาก SPE ด้วย acetonitrile : methanol อัตราส่วน 1 : 9 ในปริมาตร 3 มิลลิลิตรและตามด้วย methanol ครั้งละ 1 มิลลิลิตรจำนวน 3 ครั้ง แล้วนำ methanol ที่ได้ไปประเหยให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน หลังจากนั้นละลายกลับด้วย methanol 200 ไมโครลิตร

บทที่ 3

ผลการทดลองและอภิปรายผล

ในการวิจัยนี้ได้แบ่งการศึกษาเป็นสองส่วนคือส่วนที่เกี่ยวข้องกับคุณลักษณะของพืชสมุนไพรบัวบกซึ่งเป็นวัตถุดิบในการผลิตสารสกัดบัวบก และส่วนที่เกี่ยวข้องกับปริมาณสารสำคัญในพืชบัวบกและสารสกัดบัวบก โดยการศึกษามุ่งหวังที่จะได้ข้อมูลพื้นฐานสำหรับใช้เป็นหลักในการกำหนดมาตรฐานของพืชบัวบกและสารสกัด

เนื่องจากเมื่อเริ่มการวิจัย ประเทศไทยยังไม่มีการกำหนดมาตรฐานของพืชสมุนไพรบัวบก หากแต่ประเทศในกลุ่มเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ได้ร่วมกันกำหนดมาตรฐานสมุนไพรบัวบกไว้ใน Standard of Asian Herbal Medicine ดังนั้นในการวิจัยส่วนแรกซึ่งเกี่ยวข้องกับการตรวจสอบคุณลักษณะและการทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพเคมี จึงยึดเกณฑ์ของ Standard of Asian Herbal Medicine เป็นแนวทาง เพื่อให้มั่นใจว่า พืชสมุนไพรที่นำมาศึกษาอย่างน้อยมีมาตรฐานกำหนดไว้ และเพื่อดูว่าตัวอย่างสมุนไพรตลอดจนวิธีการเก็บรักษาตัวอย่างในประเทศไทยเหมาะสมหรือไม่ และควรมีข้อกำหนดอื่นๆเพิ่มเติมจากเกณฑ์ของอาเซียน และหวังว่าข้อมูลที่ได้สามารถนำมาใช้เป็นหลักต่อไป สำหรับหน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับการกำหนดมาตรฐานสมุนไพร การทดลองในแต่ละหัวข้อการศึกษาได้ผลดังต่อไปนี้

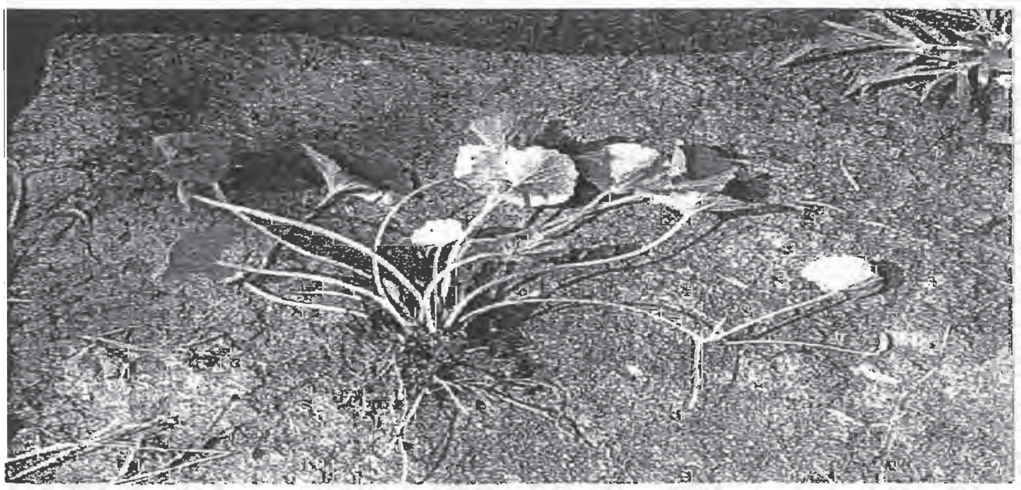
1 การตรวจสอบคุณลักษณะของพืชสมุนไพรบัวบก

1.1. การตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเภสัชเวท (Pharmacognostic Characteristics)

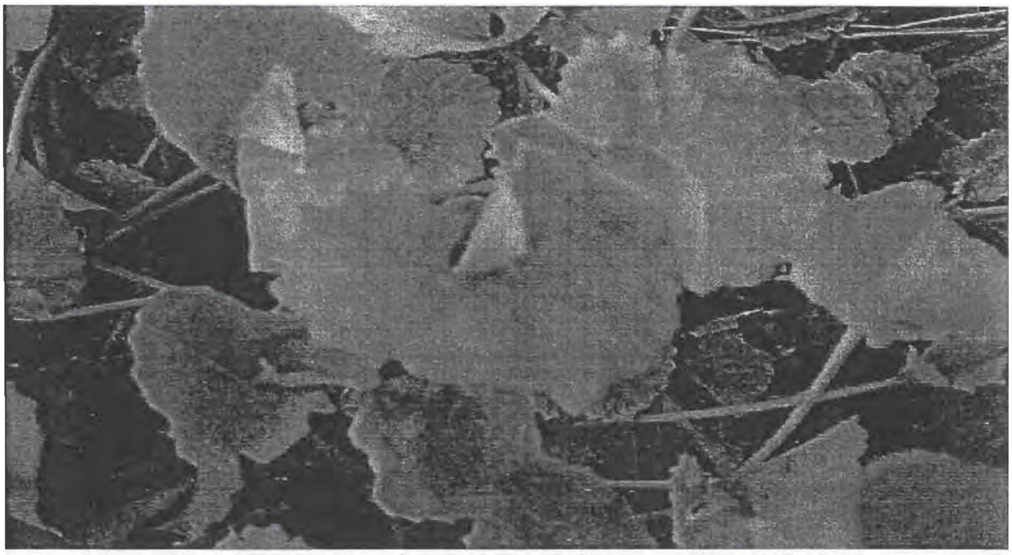
1.1.1. การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางมหทรรศน์ (macroscopic identification) จากพืชสด

บัวบกเป็นพืชเลื้อย สูงประมาณ 20 เซนติเมตร มีรากงอกออกมาตามข้อของลำต้น ก้านใบยาวงอกตรงจากดิน ขึ้นเป็นกอติดกัน ใบเป็นใบเดียวสีเขียว รูปไตกลมรีเล็กน้อย ขอบใบเป็นคลื่นดังแสดงในรูปที่ 1.2 (a,b)

(a)



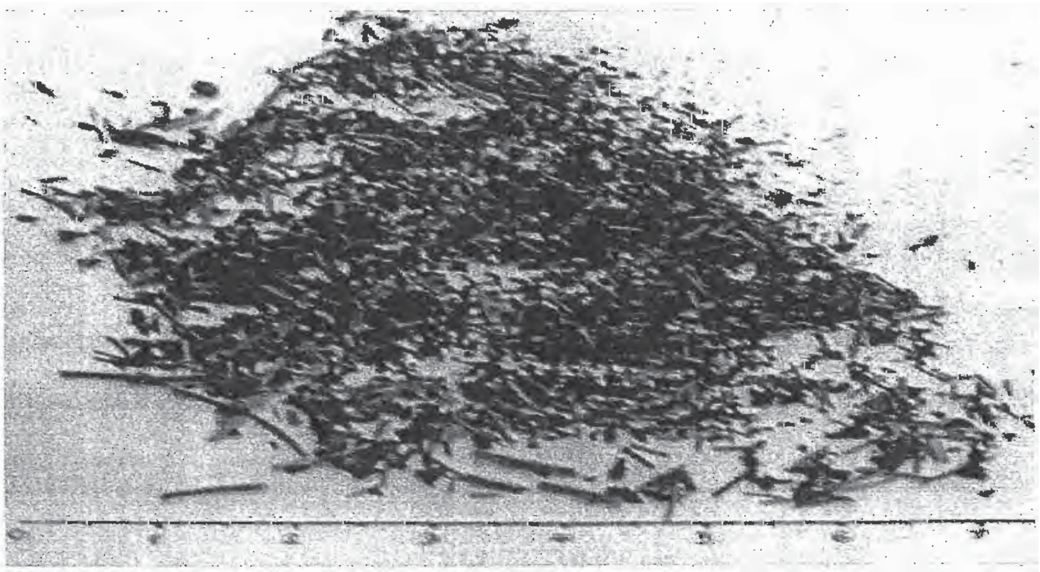
(b)



รูปที่ 1.2 แสดงรูปพืชบัวบกสด

1.1.2. การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางมหทรรศน์ (macroscopic identification) จากผงบัวบก

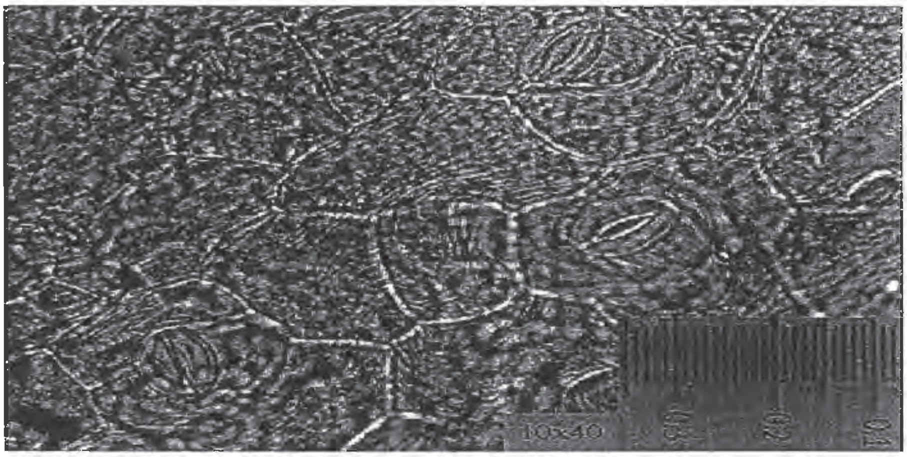
ผงบัวบกแห้งจากก้านใบและใบของบัวบก มีสีเขียวปนน้ำตาล หยาบเปราะ ก้านใบแห้งค่อนข้างแข็ง เรียว โค้งมีกลิ่นเฉพาะตัว รสขมปนฝาด ดังแสดงในรูปที่ 1.3



รูปที่ 1.3 แสดงรูปผงพืชบัวบกแห้ง

1.1.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางจุลทรรศน์ (microscopic identification) จากพืชสดบัวบก

Upper epidermis เป็นเนื้อเยื่อผิวใบผิวใบชั้นบนสุด มีผิวชั้นบนที่หนา เป็นเซลล์ใส พบปากใบเป็นแบบ anisocytic บางครั้งอาจพบเป็นแบบ paracytic และพบเป็นแบบ anomocytic น้อยมาก ดังแสดง ในรูปที่ 1.4

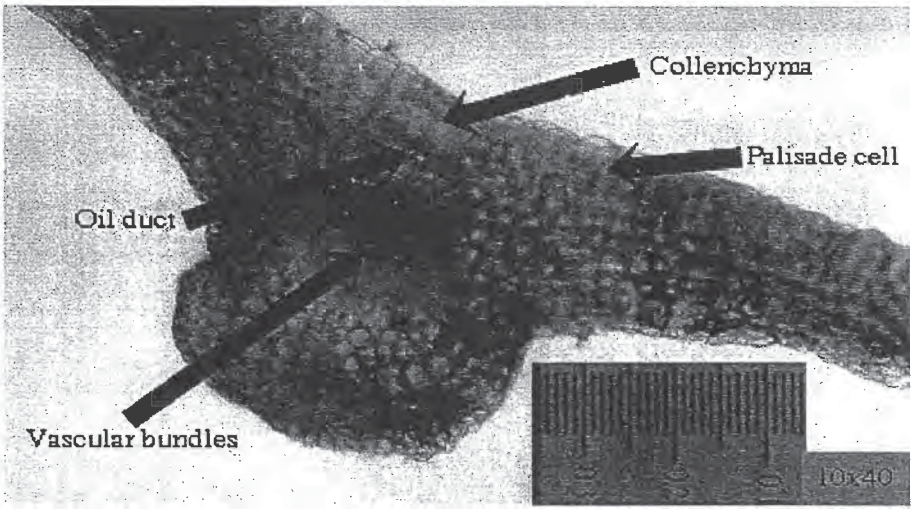


รูปที่ 1.4 แสดงรูป Upper epidermis ของใบพืชบัวบกสด

Lower epidermis เป็นเนื้อเยื่อผิวใบชั้นล่าง จะพบส่วนของปากใบเป็นแบบ anomocytic, paracytic, anisocytic ได้ทั้ง 3 แบบ ดังแสดง ในรูปที่ 1.5

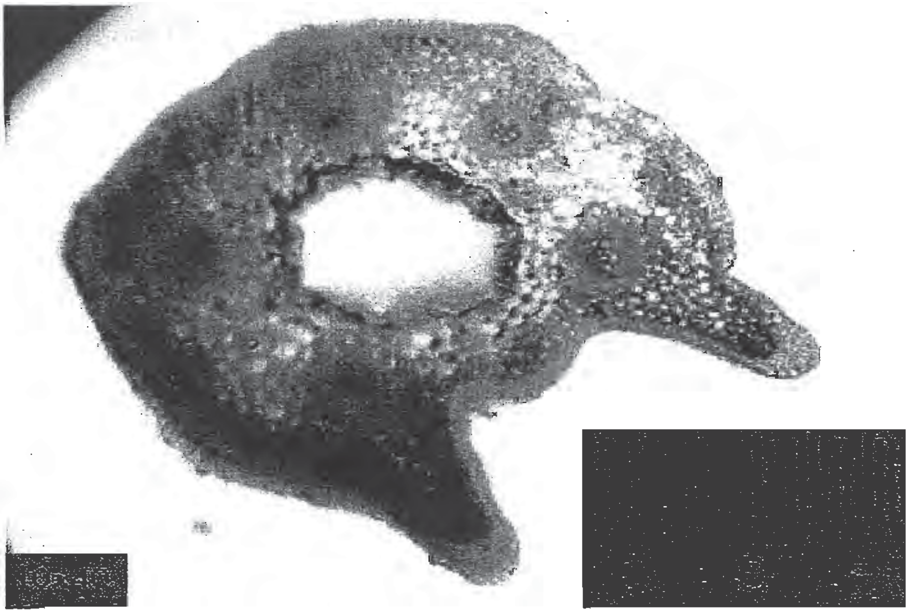
รูปที่ 1.5 แสดงรูป Lower epidermis ของใบพืชบัวบกสด

Lamina and midrib เป็นส่วนของกลางใบและบริเวณที่ไม่ผ่านกลางใบซึ่งแสดงให้เห็นชั้นเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของบัวบกสดดังแสดงในรูปที่ 1.6



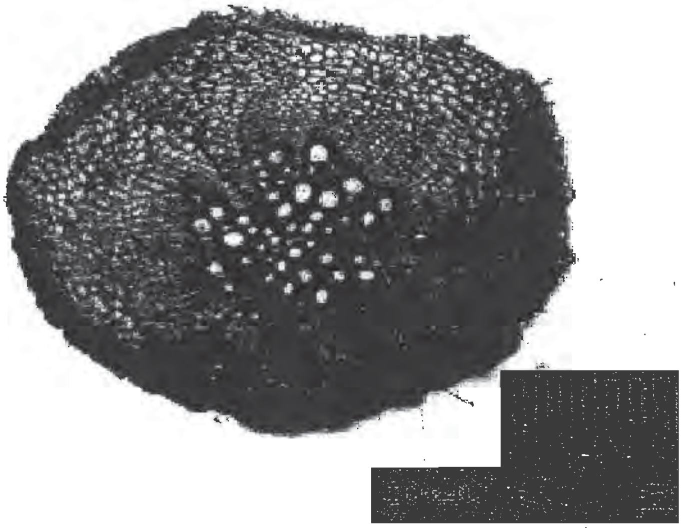
รูปที่ 1.6 แสดงส่วนประกอบและรูปตัดขวาง Lamina and midrib ของใบพืชบัวบกสด

ก้านใบ (petiole) มีลักษณะค่อนข้างกลมและมีบริเวณหนึ่งมีลักษณะเว้าเล็กน้อยซึ่งเป็นลักษณะเด่นของบัวบกสด ดังแสดง ในรูปที่ 1.7



รูปที่ 1.7 แสดงรูปตัดขวางก้านใบ (Petiole) ของพืชบัวบกสด

รากมีลักษณะกลมดังแสดงในรูปที่ 1.8

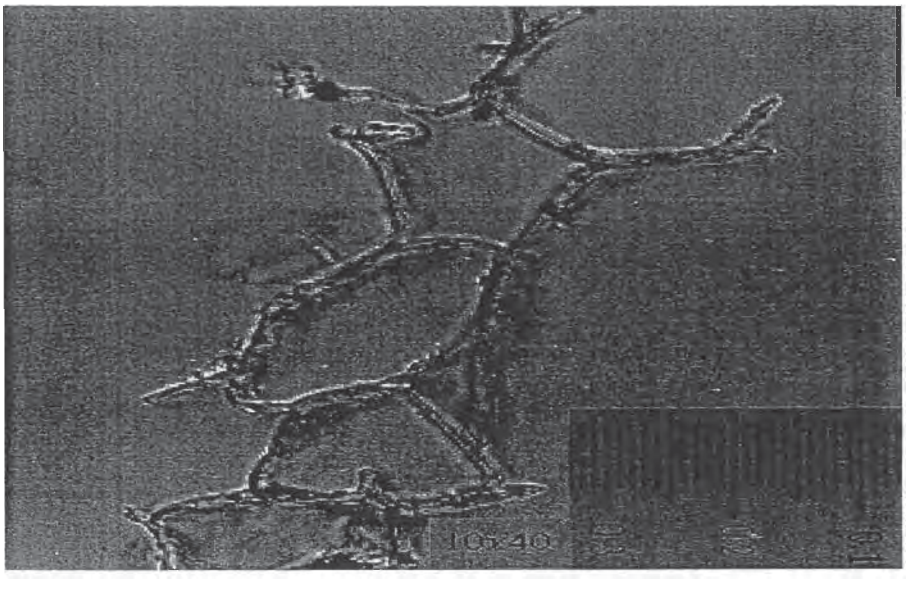


รูปที่ 1.8 แสดงรูปตัดขวางของรากของพืชบัวบกสด

1.1.4 การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางจุลทรรศน์ (microscopic identification) ของผงบัวบก

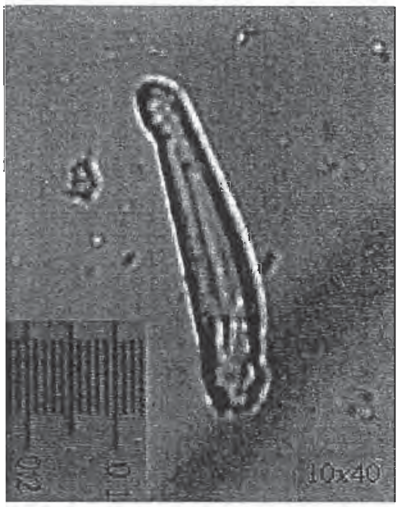
เมื่อตรวจสอบเอกลักษณ์ทางจุลทรรศน์ของผงบัวบกสามารถพบส่วนต่าง ๆ ดังนี้

Parenchyma เป็นเนื้อเยื่อที่สามารถเห็นได้อย่างชัดเจนมีลักษณะเป็นเหลี่ยมดังแสดงในรูปที่ 1.9



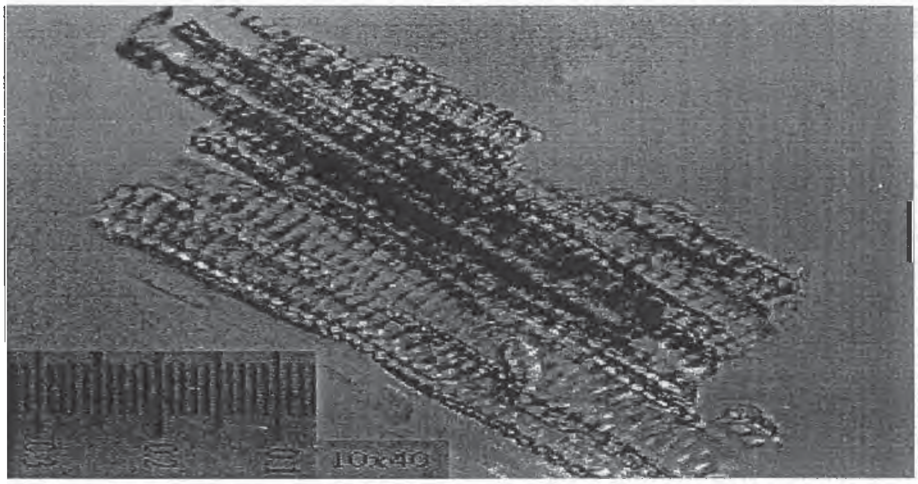
รูปที่ 1.9 แสดงรูป Parenchyma ของผงพืชบัวบก

Trichome เป็นส่วนที่ยื่นออกมาจากผิวใบด้านบน (upper epidermis) ซึ่งเราจะพบเป็นแบบ unicellular trichome เป็นส่วนใหญ่ดังแสดงในรูปที่ 1.10



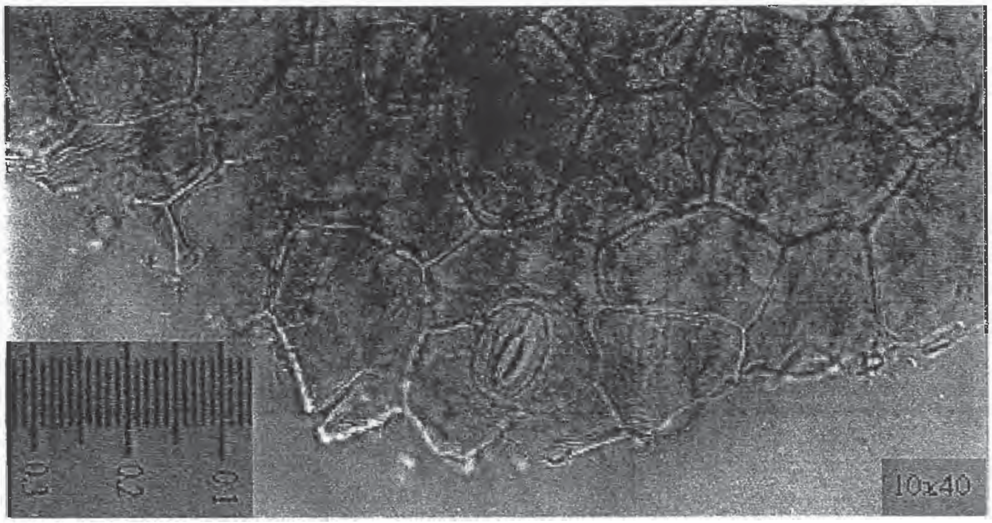
รูปที่ 1.10 แสดงรูป unicellular trichome ของผงพืชบัวบก

Vascular bundles เป็นส่วนของเนื้อเยื่อลำเลียงดังแสดงในรูปที่ 1.11



รูปที่ 1.11 แสดงรูป vascular bundles ของผงพืชบัวบก

Upper epidermis ดังแสดงในรูปที่ 1.12



รูปที่ 1.12 แสดงรูป Upper epidermis ของผงพืชบัวบก

Lower epidermis ดังแสดงในรูปที่ 1.13

รูปที่ 1.13 แสดงรูป lower epidermis ของผงพืชบัวบก

1.2 ผลการตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมี (Chemical Characteristics)

1.2.1. ผลการตรวจสอบเบื้องต้นด้วย Chemical Test (Preliminary Test)

ตารางที่ 1.2 แสดงผลการตรวจสอบเบื้องต้นด้วย Chemical Test ตัวอย่างผงพืชบัวบก

สาร	Saponin Test		Liebermann-Burchard Test	Tannin Test
	ความสูงของฟอง (cm)	ระยะเวลาคงอยู่ของฟอง(นาที)	ผล Positive (+)ให้วงแหวนสี Brownish Red	ผล Positive(+) ให้ Green Precipitate
1A (a)	0.8	9	+	+
1A (b)	0.8	9	+	+
2A (a)	1.0	9	+	+
2A (b)	0.9	9	+	+
3A (a)	1.3	12	+	+
3A (b)	1.3	12	+	+
4A (a)	0.7	8	+	+
4A (b)	0.8	8	+	+
5A (a)	1.1	8	+	+
5A (b)	1.1	8	+	+
6A (a)	0.9	8	+	+
6A (b)	0.9	8	+	+
7A (a)	1.3	10	+	+
7A (b)	1.3	10	+	+
8A (a)	0.9	9	+	+
8A (b)	0.9	9	+	+
9A (a)	0.9	8	+	+
9A (b)	0.9	8	+	+
10A (a)	0.8	10	+	+
10A (b)	0.8	10	+	+
11A (a)	1.1	9	+	+
11A (b)	1.1	9	+	+

สาร	Saponin Test		Liebermann-Burchard Test	TanninTest
	ความสูงของฟอง (cm)	ระยะเวลาคงอยู่ของฟอง(นาที)	ผล Positive (+)ให้วงแหวนสี Brownish Red	ผล Positive(+) ให้ Green Precipitate
1B (a)	0.7	9	+	+
1B (b)	0.7	9	+	+
2B (a)	1.0	8	+	+
2B (b)	1.0	8	+	+
3B (a)	1.2	12	+	+
3B (b)	1.2	12	+	+
4B (a)	0.9	9	+	+
4B (b)	0.9	9	+	+
5B (a)	0.9	8	+	+
5B (b)	0.9	8	+	+
6B (a)	0.8	9	+	+
6B (b)	0.9	9	+	+
7B (a)	1.3	10	+	+
7B (b)	1.3	10	+	+
8B (a)	0.8	8	+	+
8B (b)	0.8	8	+	+
9B (a)	0.8	9	+	+
9B (b)	0.8	9	+	+
10B (a)	1.1	10	+	+
10B (b)	1.1	10	+	+
11B (a)	1.2	11	+	+
11B(b)	1.2	11	+	+
เฉลี่ย	0.98	9.2		
SD	0.19	1.2		

1.2.2. ผลการตรวจสอบยืนยันด้วย TLC Test (Confirmatory Test)

ตารางที่ 1.3 แสดงผลการตรวจสอบยืนยันด้วย TLC Test (Confirmatory Test) ตัวอย่างผงพืชบัวบกโดยการสเปรย์ด้วย Liebermann-Burchard Reagent แล้วดูด้วยตาเปล่า

สารสกัดบัวบก	spot ที่ 1			spot ที่ 2			spot ที่ 3		
	S(cm)	S'(cm)	R_f	S(cm)	S'(cm)	R_f	S(cm)	S'(cm)	R_f
1A	1.32	8.50	0.16	6.20	8.50	0.73	7.20	8.50	0.85
2A	1.50	8.50	0.18	6.40	8.50	0.75	7.20	8.50	0.85
3A	1.40	8.50	0.16	6.20	8.50	0.73	7.18	8.50	0.84
4A	1.30	8.50	0.15	6.28	8.50	0.74	7.10	8.50	0.84
5A	1.35	8.50	0.16	6.35	8.50	0.75	7.10	8.50	0.84
6A	1.45	8.50	0.17	6.38	8.50	0.75	7.00	8.50	0.82
7A	1.30	8.50	0.15	6.20	8.50	0.73	7.00	8.50	0.82
8A	1.45	8.50	0.17	6.25	8.50	0.74	7.00	8.50	0.82
9A	1.40	8.50	0.16	6.08	8.50	0.72	7.00	8.50	0.82
10A	1.50	8.50	0.18	6.12	8.50	0.72	7.00	8.50	0.82
11A	1.42	8.50	0.17	6.10	8.50	0.72	6.95	8.50	0.82
1B	1.40	8.50	0.16	6.20	8.50	0.73	7.20	8.50	0.85
2B	1.60	8.50	0.19	6.20	8.50	0.73	7.20	8.50	0.85
3B	1.50	8.50	0.18	6.30	8.50	0.74	7.10	8.50	0.84
4B	1.50	8.50	0.18	6.35	8.50	0.75	7.10	8.50	0.84
5B	1.52	8.50	0.18	6.35	8.50	0.75	7.00	8.50	0.82
6B	1.48	8.50	0.17	6.20	8.50	0.73	7.00	8.50	0.82
7B	1.55	8.50	0.18	6.30	8.50	0.74	7.00	8.50	0.82
8B	1.40	8.50	0.16	6.10	8.50	0.72	6.90	8.50	0.81
9B	1.35	8.50	0.16	6.00	8.50	0.71	7.00	8.50	0.82
10B	1.44	8.50	0.17	6.18	8.50	0.73	7.00	8.50	0.82
11B	1.22	8.50	0.14	6.10	8.50	0.72	7.00	8.50	0.82
ค่าเฉลี่ย	**1.43**	**8.50**	**0.17**	**6.22**	**8.50**	**0.73**	**7.06**	**8.50**	**0.83**

ตารางที่ 1.3 (ต่อ) แสดงผลการตรวจสอบยืนยันด้วย TLC Test (Confirmatory Test) ตัวอย่างผงพืชบัวบกโดยการสเปรย์ด้วย Liebermann-Burchard Reagent แล้วดูด้วยตาเปล่า

สารสกัดบัวบก	spot ที่ 4			spot ที่ 5		
	S(cm)	S'(cm)	R_f	S(cm)	S'(cm)	R_f
1A	7.90	8.50	0.93	8.35	8.50	0.98
2A	7.80	8.50	0.92	8.30	8.50	0.98
3A	7.90	8.50	0.93	8.25	8.50	0.97
4A	7.77	8.50	0.91	8.20	8.50	0.96
5A	7.75	8.50	0.91	8.18	8.50	0.96
6A	7.70	8.50	0.91	8.20	8.50	0.96
7A	7.70	8.50	0.91	8.20	8.50	0.96
8A	7.75	8.50	0.91	8.20	8.50	0.96
9A	7.75	8.50	0.91	8.15	8.50	0.96
10A	7.70	8.50	0.91	8.20	8.50	0.96
11A	7.80	8.50	0.92	8.20	8.50	0.96
1B	7.90	8.50	0.93	8.30	8.50	0.98
2B	7.89	8.50	0.93	8.23	8.50	0.97
3B	7.77	8.50	0.91	8.20	8.50	0.96
4B	7.75	8.50	0.91	8.20	8.50	0.96
5B	7.72	8.50	0.91	8.15	8.50	0.96
6B	7.70	8.50	0.91	8.20	8.50	0.96
7B	7.70	8.50	0.91	8.20	8.50	0.96
8B	7.71	8.50	0.91	8.20	8.50	0.96
9B	7.70	8.50	0.91	8.20	8.50	0.96
10B	7.75	8.50	0.91	8.20	8.50	0.96
11B	7.72	8.50	0.91	8.20	8.50	0.96
ค่าเฉลี่ย	**7.77**	**8.50**	**0.91**	**8.21**	**8.50**	**0.97**

S คือ ระยะทางที่สารสกัดในบัวบกเคลื่อนที่ไปบนแผ่น TLC (เซนติเมตร)

S' คือ ระยะทางที่ mobile phase เคลื่อนที่ไปบนแผ่น TLC (เซนติเมตร)

ตารางที่ 1.4 แสดงผลการตรวจสอบยืนยันด้วย TLC Test (Confirmatory Test) ในตัวอย่างผงพืชบัวบกโดยการสเปรย์ด้วย Liebermann-Burchard Reagent แล้วดูที่ UV 366 nm

สารสกัดบัวบก	spot ที่ 1			spot ที่ 2			spot ที่ 3		
	S(cm)	S'(cm)	R_f	S(cm)	S'(cm)	R_f	S(cm)	S'(cm)	R_f
1A	1.10	8.60	0.13	2.40	8.60	0.28	3.75	8.60	0.44
2A	1.00	8.60	0.12	2.20	8.60	0.26	3.30	8.60	0.38
3A	1.00	8.60	0.12	2.20	8.60	0.26	3.30	8.60	0.38
4A	1.00	8.60	0.12	2.20	8.60	0.26	3.30	8.60	0.38
5A	1.00	8.60	0.12	2.15	8.60	0.25	3.40	8.60	0.40
6A	1.05	8.60	0.12	2.25	8.60	0.26	3.50	8.60	0.41
7A	1.02	8.60	0.12	2.30	8.60	0.27	3.55	8.60	0.41
8A	1.00	8.60	0.12	2.25	8.60	0.26	3.45	8.60	0.40
9A	0.95	8.60	0.11	2.15	8.60	0.25	3.35	8.60	0.39
10A	1.10	8.60	0.13	2.32	8.60	0.27	3.40	8.60	0.40
11A	1.00	8.60	0.12	2.22	8.60	0.26	3.40	8.60	0.40
1B	1.10	8.60	0.13	2.35	8.60	0.27	3.60	8.60	0.42
2B	1.00	8.60	0.12	2.10	8.60	0.24	3.00	8.60	0.35
3B	1.00	8.60	0.12	2.25	8.60	0.26	3.30	8.60	0.38
4B	1.00	8.60	0.12	2.20	8.60	0.26	3.20	8.60	0.37
5B	1.10	8.60	0.13	2.25	8.60	0.26	3.50	8.60	0.41
6B	1.05	8.60	0.12	2.22	8.60	0.26	3.40	8.60	0.40
7B	1.00	8.60	0.12	2.25	8.60	0.26	3.45	8.60	0.40
8B	1.10	8.60	0.13	2.22	8.60	0.26	3.65	8.60	0.42
9B	1.00	8.60	0.12	2.25	8.60	0.26	3.50	8.60	0.41
10B	1.00	8.60	0.12	2.22	8.60	0.26	3.60	8.60	0.42
11B	1.05	8.60	0.12	2.40	8.60	0.28	3.70	8.60	0.43
ค่าเฉลี่ย	**1.03**	**8.60**	**0.12**	**2.24**	**8.60**	**0.26**	**3.44**	**8.60**	**0.40**

ตารางที่ 1.4 (ต่อ) แสดงผลการตรวจสอบยืนยันด้วย TLC Test (Confirmatory Test) ตัวอย่างผงพืชบัวบกโดยการสเปรย์ด้วย Liebermann-Burchard Reagent แล้วดูที่UV 366 nm

สารสกัดบัวบก	spot ที่ 4			spot ที่ 5			spot ที่ 6		
	S(cm)	S'(cm)	R_f	S(cm)	S'(cm)	R_f	S(cm)	S'(cm)	R_f
1A	6.30	8.60	0.73	7.60	8.60	0.88	8.40	8.60	0.98
2A	6.20	8.60	0.72	7.60	8.60	0.88	8.25	8.60	0.96
3A	6.30	8.60	0.73	7.40	8.60	0.86	8.25	8.60	0.96
4A	6.10	8.60	0.71	7.50	8.60	0.87	8.30	8.60	0.97
5A	6.28	8.60	0.73	7.50	8.60	0.87	8.25	8.60	0.96
6A	6.40	8.60	0.74	7.60	8.60	0.88	8.20	8.60	0.95
7A	6.30	8.60	0.73	7.70	8.60	0.90	8.30	8.60	0.97
8A	6.40	8.60	0.74	7.65	8.60	0.89	8.25	8.60	0.96
9A	6.20	8.60	0.72	7.60	8.60	0.88	8.25	8.60	0.96
10A	6.25	8.60	0.73	7.67	8.60	0.89	8.30	8.60	0.97
11A	6.30	8.60	0.73	7.50	8.60	0.87	8.30	8.60	0.97
1B	6.35	8.60	0.74	7.50	8.60	0.87	8.40	8.60	0.98
2B	5.95	8.60	0.69	7.20	8.60	0.84	8.25	8.60	0.96
3B	6.20	8.60	0.72	7.20	8.60	0.84	8.25	8.60	0.96
4B	6.20	8.60	0.72	7.40	8.60	0.86	8.25	8.60	0.96
5B	6.35	8.60	0.74	7.50	8.60	0.87	8.25	8.60	0.96
6B	6.30	8.60	0.73	7.60	8.60	0.88	8.20	8.60	0.95
7B	6.40	8.60	0.74	7.60	8.60	0.88	8.30	8.60	0.97
8B	6.35	8.60	0.74	7.70	8.60	0.90	8.30	8.60	0.97
9B	6.35	8.60	0.74	7.70	8.60	0.90	8.20	8.60	0.95
10B	6.35	8.60	0.74	7.65	8.60	0.89	8.30	8.60	0.97
11B	6.30	8.60	0.73	7.60	8.60	0.88	8.30	8.60	0.97
ค่าเฉลี่ย	**6.28**	**8.60**	**0.73**	**7.54**	**8.60**	**0.88**	**8.28**	**8.60**	**0.96**

ตารางที่ 1.5 แสดงผลการตรวจสอบยืนยันด้วย TLC Test (Confirmatory Test) สารมาตรฐาน Asiaticoside , Madecassoside , Asiatic acid และ Madecassic acid

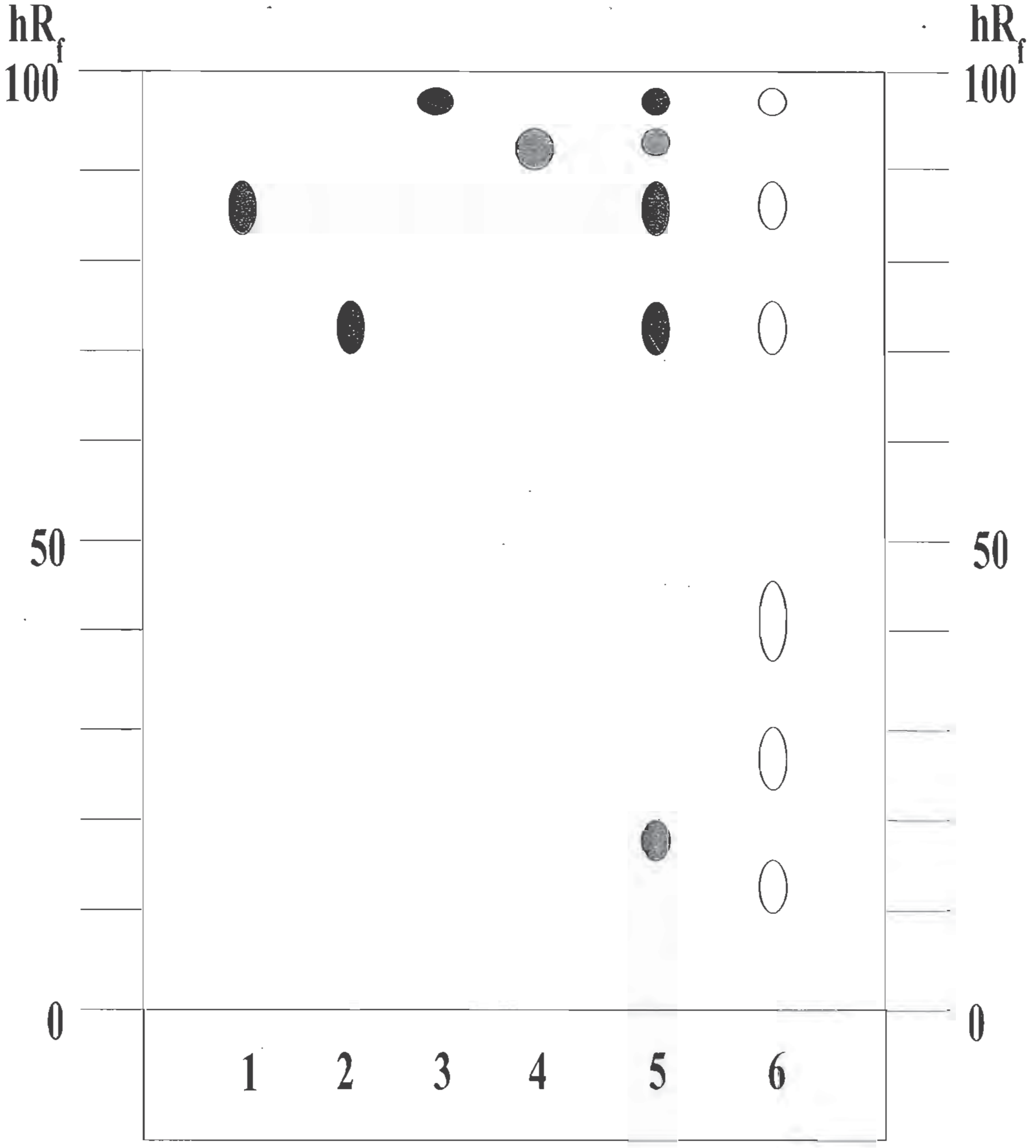
สารมาตรฐาน	**ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (เซนติเมตร)**	**ระยะทางที่ mobile phase เคลื่อนที่ (เซนติเมตร)**	**Rf**	**hRf**
Asiaticoside	7.50	8.50	0.88	88.24
Madecassoside	6.30	8.50	0.74	74.12
Asiatic acid	8.30	8.50	0.98	97.65
Madecassic acid	7.70	8.50	0.91	90.59

ตารางที่ 1.6 แสดงค่า hR_f สารสกัดผงพืชบัวบกตัวอย่าง

Spot	**ค่า hR_f**	**การตรวจสอบผล TLC ด้วย**	
		Liebermann-Burchard reagent แล้วดูด้วยตาเปล่า	**Liebermann-Burchard reagent แล้วดูด้วย UV-366**
1	11-13	-	เรืองแสง
2	16-18	สีน้ำตาลอ่อน	-
3	24-28	-	เรืองแสง
4	35-44	-	เรืองแสง
5*	69-75	สีดำ	เรืองแสง
6**	81-90	สีเขียว	เรืองแสง
7***	91-93	สีม่วง	-
8****	95-98	สีน้ำตาล	เรืองแสง

* Madecassoside ** Asiaticoside *** Madecassic acid **** Asiatic acid

รูปที่ 1.14 TLC Chromatogram การตรวจเอกลักษณ์สารสำคัญในผงพืชบัวบก



หมายเลข 1 คือ สารละลายมาตรฐาน Asiaticoside

หมายเลข 2 คือ สารละลายมาตรฐาน Madecassoside

หมายเลข 3 คือ สารละลายมาตรฐาน Asiatic acid

หมายเลข 4 คือ สารละลายมาตรฐาน Madecassic acid

หมายเลข 5 คือ สารสกัดผงพืชบัวบกที่ดูด้วยตาเปล่า

หมายเลข 6 คือ สารสกัดผงพืชบัวบกที่ดูด้วย UV 336 nm

1.3 การตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพ

1.3.1 การหาปริมาณสิ่งปลอมปน (Foreign Matter)

ตารางที่ 1.7 แสดงปริมาณสิ่งปลอมปน (Foreign Matter) โดยดูผง100 กรัมในตัวอย่างผงพืช

	น.น.(g) เริ่มต้น	**น.น.(g) สุดท้าย**	**Foreign Matter (g)**	**% Foreign Matter**
สาร 1A	100.0023	99.2065	0.7958	0.7958
สาร 2A	100.0025	99.2327	0.7698	0.7698
สาร 3A	100.0032	99.2511	0.7521	0.7521
สาร 4A	100.0024	99.1703	0.8321	0.8321
สาร 5A	100.0000	99.1735	0.8265	0.8265
สาร 6A	100.0012	99.2027	0.7985	0.7985
สาร 7A	100.0021	99.2652	0.7369	0.7369
สาร 8A	100.0034	99.2076	0.7958	0.7958
สาร 9A	100.0024	99.2426	0.7598	0.7598
สาร 10A	100.0032	99.2334	0.7698	0.7698
สาร 11A	100.0016	99.2121	0.7895	0.7895
สาร 1B	100.0024	99.1568	0.8456	0.8456
สาร 2B	100.0035	99.1779	0.8256	0.8256
สาร 3B	100.0036	99.1541	0.8495	0.8495
สาร 4B	100.0024	99.1788	0.8236	0.8236
สาร 5B	100.0019	99.2421	0.7598	0.7598
สาร 6B	100.0028	99.2133	0.7895	0.7895
สาร 7B	100.0000	99.1846	0.8154	0.8154
สาร 8B	100.0046	99.2500	0.7546	0.7546
สาร 9B	100.0035	99.2709	0.7326	0.7326
สาร 10B	100.0035	99.2489	0.7546	0.7546
สาร 11B	100.0035	99.2670	0.7365	0.7365
ค่ามากที่สุด	**100.0046**	**99.2709**	**0.8495**	**0.8495**
ค่าน้อยที่สุด	**100.0000**	**99.1541**	**0.7326**	**0.7326**
ค่าเฉลี่ย	**100.0025**	**99.2156**	**0.7870**	**0.7870**
S.D.	**0.0011**	**0.0371**	**0.0367**	**0.0367**

1.3.2 การหาน้ำหนักที่หายไปเมื่อทำให้แห้ง (Loss on drying)

1.3.3 ปริมาณเถ้ารวม (Total Ash)

1.3.4 ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (Acid-Insoluble Ash)

ตารางที่ 1.8 แสดงปริมาณน้ำหนักที่หายไปเมื่อทำให้แห้ง (Loss on drying) ปริมาณเถ้ารวม (Total Ash) และปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (Acid-Insoluble Ash) ในตัวอย่างผงพืชน้ำหนัก 2 กรัม

สาร	น้ำหนัก (g)	Loss on Drying (g)	Total ash (g)	Acid Insol. Ash (g)	%Loss on Drying	%Total Ash	%Acid Insol. Ash
สาร 1A (a)	2.0920	0.1718	0.2133	0.0246	8.2124	10.1946	1.1759
สาร 1A (b)	2.0585	0.1732	0.2147	0.0242	8.4137	10.4313	1.1756
สาร 2A (a)	2.0074	0.1767	0.2520	0.0211	8.8008	12.5522	1.0495
สาร 2A (b)	2.0095	0.1769	0.2523	0.0213	8.8017	12.5576	1.0583
สาร 3A (a)	2.0292	0.1747	0.2066	0.0214	8.6077	10.1814	1.0546
สาร 3A (b)	2.0434	0.1756	0.2087	0.0213	8.5935	10.2150	1.0407
สาร 4A (a)	2.0176	0.1788	0.2024	0.0193	8.8620	10.0317	0.9549
สาร 4A (b)	2.0097	0.1778	0.2016	0.0190	8.8472	10.0315	0.9454
สาร 5A (a)	2.0467	0.1792	0.2070	0.0191	8.7554	10.1137	0.9348
สาร 5A (b)	2.0439	0.1784	0.2069	0.0194	8.7286	10.1213	0.9492
สาร 6A (a)	2.1067	0.1863	0.2132	0.0231	8.8418	10.1203	1.0949
สาร 6A (b)	2.1065	0.1843	0.2129	0.0226	8.7506	10.1082	1.0729
สาร 7A (a)	2.0141	0.1713	0.2103	0.0219	8.5035	10.4399	1.0890
สาร 7A (b)	2.0170	0.1709	0.2103	0.0221	8.4713	10.4280	1.0940
สาร 8A (a)	2.0174	0.1740	0.2087	0.0223	8.6250	10.3467	1.1070
สาร 8A (b)	2.0186	0.1741	0.2089	0.0225	8.6231	10.3504	1.1130
สาร 9A (a)	2.0165	0.1793	0.2034	0.0217	8.8901	10.0870	1.0778
สาร 9A (b)	2.0208	0.1780	0.2041	0.0216	8.8077	10.0983	1.0689
สาร 10A (a)	2.0645	0.1792	0.2093	0.0205	8.6799	10.1395	0.9913
สาร 10A (b)	2.0659	0.1793	0.2095	0.0206	8.6776	10.1394	0.9972
สาร 11A (a)	2.0296	0.1770	0.2091	0.0202	8.7209	10.3042	0.9953
สาร 11A (b)	2.0306	0.1772	0.2093	0.0202	8.7265	10.3057	0.9948

ตารางที่ 1.8 (ต่อ) แสดงปริมาณน้ำหนักที่หายไปเมื่อทำให้แห้ง (Loss on drying) ปริมาณเถ้ารวม (Total Ash) และปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (Acid-Insoluble Ash) ในผงพืชน้ำหนัก 2 กรัม

สาร	น้ำหนัก (g)	Loss on Drying (g)	Total Ash (g)	Acid Insol. Ash (g)	% Loss on Drying	%Total Ash	%Acid Insol. Ash
สาร 1B (a)	2.0100	0.1743	0.2152	0.0223	8.6733	10.7065	1.1118
สาร 1B (b)	2.0140	0.1746	0.2156	0.0224	8.6693	10.7051	1.1122
สาร 2B (a)	2.0244	0.1748	0.2534	0.0218	8.6347	12.5173	1.0769
สาร 2B (b)	2.0281	0.1756	0.2539	0.0219	8.6585	12.5177	1.0815
สาร 3B (a)	2.0417	0.1756	0.2083	0.0210	8.6008	10.2008	1.0286
สาร 3B (b)	2.0373	0.1747	0.2081	0.0209	8.5769	10.2130	1.0275
สาร 4B (a)	2.0201	0.1785	0.2026	0.0209	8.8380	10.0294	1.0330
สาร4B (b)	2.0274	0.1799	0.2034	0.0209	8.8718	10.0326	1.0292
สาร5B (a)	2.0625	0.1813	0.2085	0.0194	8.7921	10.1076	0.9395
สาร 5B (b)	2.0586	0.1802	0.2083	0.0193	8.7535	10.1169	0.9391
สาร 6B (a)	2.1420	0.1891	0.2147	0.0209	8.8298	10.0218	0.9742
สาร 6B (b)	2.1437	0.1892	0.2148	0.0206	8.8279	10.0199	0.9609
สาร 7B (a)	2.1195	0.1872	0.2135	0.0221	8.8324	10.0717	1.0411
สาร 7B (b)	2.1266	0.1875	0.2143	0.0221	8.8153	10.0787	1.0408
สาร 8B (a)	2.1227	0.1857	0.2165	0.0218	8.7466	10.1975	1.0270
สาร 8B (b)	2.1214	0.1859	0.2161	0.0217	8.7615	10.1851	1.0213
สาร 9B (a)	2.0108	0.1693	0.2084	0.0219	8.4179	10.3640	1.0908
สาร 9B (b)	2.0140	0.1699	0.2094	0.0218	8.4376	10.3972	1.0824
สาร 10B (a)	2.0051	0.1749	0.2085	0.0205	8.7212	10.3970	1.0241
สาร 10B (b)	2.0056	0.1751	0.2083	0.0206	8.7289	10.3876	1.0271
สาร 11B (a)	2.0034	0.1746	0.2081	0.0205	8.7152	10.3857	1.0216
สาร 11B(b)	2.0032	0.1745	0.2080	0.0205	8.7127	10.3834	1.0217
ค่ามากที่สุด	**2.1437**	**0.1892**	**0.2539**	**0.0246**	**8.8901**	**12.5576**	**1.1759**
ค่าน้อยที่สุด	**2.0032**	**0.1693**	**0.2016**	**0.0190**	**8.2124**	**10.0199**	**0.9348**
ค่าเฉลี่ย	**2.0456**	**0.1779**	**0.2135**	**0.0213**	**8.6945**	**10.4394**	**1.0397**
S.D.	**0.0424**	**0.0051**	**0.0132**	**0.0012**	**0.1445**	**0.6912**	**0.0597**

ตารางที่ 1.9 แสดงปริมาณน้ำหนักที่หายไปเมื่อทำให้แห้ง (Loss on drying)ปริมาณเถ้ารวม(Total Ash) และปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (Acid-Insoluble Ash) ในตัวอย่างผงพืชน้ำหนัก 3 กรัม

สาร	น้ำหนัก (g)	Loss on Drying (g)	Total ash (g)	Acid Insol. Ash (g)	% Loss on Drying	%Total Ash	%Acid Insol. Ash
สาร 1A (a)	2.9885	0.2577	0.3199	0.0369	8.6231	10.7044	1.2347
สาร 1A (b)	3.0125	0.2598	0.3221	0.0363	8.6241	10.6921	1.2050
สาร 2A (a)	3.0111	0.2650	0.3791	0.0316	8.8008	12.5901	1.0495
สาร 2A (b)	3.0142	0.2653	0.3801	0.0319	8.8017	12.6103	1.0583
สาร 3A (a)	3.0438	0.2620	0.3099	0.0321	8.6077	10.1814	1.0546
สาร 3A (b)	3.0651	0.2634	0.3131	0.0319	8.5935	10.2150	1.0407
สาร 4A (a)	3.0264	0.2682	0.3036	0.0289	8.8620	10.0317	0.9549
สาร 4A (b)	3.0145	0.2667	0.3024	0.0285	8.8472	10.0315	0.9454
สาร 5A (a)	3.0701	0.2688	0.3105	0.0287	8.7554	10.1137	0.9348
สาร 5A (b)	3.0658	0.2676	0.3103	0.0291	8.7286	10.1213	0.9492
สาร 6A (a)	3.1795	0.2794	0.3183	0.0346	8.7875	10.0110	1.0882
สาร 6A (b)	3.1598	0.2765	0.3164	0.0339	8.7506	10.0133	1.0729
สาร 7A (a)	3.0211	0.2569	0.3154	0.0329	8.5035	10.4399	1.0890
สาร 7A (b)	3.0255	0.2563	0.3155	0.0331	8.4713	10.4280	1.0940
สาร 8A (a)	3.0261	0.2610	0.3131	0.0335	8.6250	10.3467	1.1070
สาร 8A (b)	3.0279	0.2611	0.3134	0.0337	8.6231	10.3504	1.1130
สาร 9A (a)	3.0247	0.2689	0.3051	0.0326	8.8901	10.0870	1.0778
สาร 9A (b)	3.0312	0.2698	0.3061	0.0324	8.9008	10.0983	1.0689
สาร 10A (a)	3.0968	0.2688	0.3140	0.0307	8.6799	10.1395	0.9913
สาร 10A (b)	3.0988	0.2689	0.3142	0.0309	8.6776	10.1394	0.9972
สาร 11A (a)	3.0444	0.2655	0.3137	0.0303	8.7209	10.3042	0.9953
สาร 11A (b)	3.0459	0.2658	0.3139	0.0303	8.7265	10.3057	0.9948

ตารางที่ 1.9 (ต่อ) แสดงปริมาณน้ำหนักที่หายเมื่อทำให้แห้ง (Loss on drying) ปริมาณเถ้ารวม (Total Ash) และปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (Acid-Insoluble Ash) ตัวอย่างผงพืชน้ำหนัก 3 กรัม

สาร	น้ำหนัก (g)	Loss on Drying (g)	Total ash (g)	Acid Insol. Ash (g)	% Loss on Drying	%Total ash	%Acid Insol. Ash
สาร 1B (a)	3.0150	0.2615	0.3228	0.0367	8.6733	10.7065	1.2172
สาร 1B (b)	3.0210	0.2619	0.3234	0.0372	8.6693	10.7051	1.2314
สาร 2B (a)	3.0366	0.2622	0.3801	0.0327	8.6347	12.5173	1.0769
สาร 2B (b)	3.0421	0.2634	0.3808	0.0329	8.6585	12.5177	1.0815
สาร 3B (a)	3.0625	0.2634	0.3124	0.0315	8.6008	10.2008	1.0286
สาร 3B (b)	3.0559	0.2621	0.3121	0.0314	8.5769	10.2130	1.0275
สาร 4B (a)	3.0301	0.2678	0.3039	0.0313	8.8380	10.0294	1.0330
สาร4B (b)	3.0411	0.2698	0.3051	0.0313	8.8718	10.0326	1.0292
สาร5B (a)	3.0937	0.2720	0.3127	0.0289	8.7921	10.1076	0.9342
สาร 5B (b)	3.0879	0.2703	0.3124	0.0287	8.7535	10.1169	0.9294
สาร 6B (a)	3.2130	0.2870	0.3220	0.0313	8.9325	10.0218	0.9742
สาร 6B (b)	3.2156	0.2887	0.3222	0.0309	8.9781	10.0199	0.9609
สาร 7B (a)	3.1792	0.2808	0.3202	0.0331	8.8324	10.0717	1.0411
สาร 7B (b)	3.1899	0.2812	0.3215	0.0332	8.8153	10.0787	1.0408
สาร 8B (a)	3.1841	0.2785	0.3247	0.0327	8.7466	10.1975	1.0270
สาร 8B (b)	3.1821	0.2788	0.3241	0.0325	8.7615	10.1851	1.0213
สาร 9B (a)	3.0162	0.2539	0.3126	0.0329	8.4179	10.3640	1.0908
สาร 9B (b)	3.0210	0.2549	0.3141	0.0327	8.4376	10.3972	1.0824
สาร 10B (a)	3.0076	0.2623	0.3127	0.0308	8.7212	10.3970	1.0241
สาร 10B (b)	3.0084	0.2626	0.3125	0.0309	8.7289	10.3876	1.0271
สาร 11B (a)	3.0051	0.2619	0.3121	0.0307	8.7152	10.3857	1.0216
สาร 11B(b)	3.0048	0.2618	0.3120	0.0307	8.7127	10.3834	1.0217
ค่ามากที่สุด	**3.2156**	**0.2887**	**0.3808**	**0.0372**	**8.9781**	**12.6103**	**1.2347**
ค่าน้อยที่สุด	**2.9885**	**0.2539**	**0.3024**	**0.0285**	**8.4179**	**10.0110**	**0.9294**
ค่าเฉลี่ย	**3.0638**	**0.2670**	**0.3201**	**0.0320**	**8.7152**	**10.4543**	**1.0463**
S.D.	**0.0649**	**0.0082**	**0.0200**	**0.0021**	**0.1272**	**0.7013**	**0.0747**

ตารางที่ 1.10 แสดงปริมาณน้ำหนักที่หายไปเมื่อทำให้แห้ง (Loss on drying) ปริมาณเถ้ารวม (Total Ash) และปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (Acid-Insoluble Ash) ในตัวอย่างผงน้ำหนัก 4 กรัม

สาร	น้ำหนัก (g)	Loss on Drying (g)	Total ash (g)	Acid Insol. Ash (g)	% Loss on Drying	%Total Ash	%Acid Insol. Ash
สาร 1A (a)	3.6883	0.3316	0.4377	0.0386	8.9899	11.8673	1.0466
สาร 1A (b)	3.7736	0.3343	0.4515	0.0406	8.8583	11.9647	1.0759
สาร 2A (a)	3.9045	0.3410	0.5539	0.0602	8.7327	14.1862	1.5418
สาร 2A (b)	3.9928	0.3414	0.5698	0.0628	8.5492	14.2707	1.5728
สาร 3A (a)	3.9842	0.3371	0.4547	0.0427	8.4611	11.4126	1.0717
สาร 3A (b)	3.9778	0.3389	0.4524	0.0421	8.5200	11.3731	1.0584
สาร 4A (a)	3.9969	0.3451	0.4106	0.0376	8.6338	10.2730	0.9407
สาร 4A (b)	3.9715	0.3432	0.4152	0.0369	8.6404	10.4545	0.9291
สาร 5A (a)	3.9891	0.3459	0.4298	0.0355	8.6700	10.7744	0.8899
สาร 5A (b)	3.8605	0.3443	0.4135	0.0333	8.9188	10.7110	0.8626
สาร 6A (a)	3.8452	0.3595	0.4410	0.0481	9.3492	11.4688	1.2509
สาร 6A (b)	3.8901	0.3558	0.4475	0.0485	9.1454	11.5036	1.2468
สาร 7A (a)	3.8975	0.3305	0.4454	0.0439	8.4809	11.4278	1.1264
สาร 7A (b)	3.8981	0.3298	0.4451	0.0441	8.4598	11.4184	1.1322
สาร 8A (a)	3.8769	0.3358	0.4362	0.0441	8.6621	11.2513	1.1384
สาร 8A (b)	3.8772	0.3359	0.4326	0.0438	8.6647	11.1575	1.1297
สาร 9A (a)	3.9820	0.3460	0.4381	0.0398	8.6887	11.0020	1.0005
สาร 9A (b)	3.9826	0.3471	0.4385	0.0396	8.7165	11.0104	0.9943
สาร 10A (a)	3.8976	0.3459	0.4375	0.0390	8.8736	11.2249	0.9998
สาร 10A (b)	3.8981	0.3460	0.4372	0.0384	8.8757	11.2157	0.9851
สาร 11A (a)	3.7698	0.3416	0.4261	0.0399	9.0618	11.3030	1.0576
สาร 11A (b)	3.7687	0.3420	0.4259	0.0398	9.0746	11.3010	1.0561

ตารางที่ 1.10 (ต่อ) แสดงปริมาณน้ำหนักที่หายเมื่อทำให้แห้ง (Loss on drying) ปริมาณเถ้ารวม (Total Ash) และปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (Acid-Insoluble Ash)ในตัวอย่างผงน้ำหนัก 4 กรัม

สาร	น้ำหนัก (g)	Loss on Drying (g)	Total ash (g)	Acid Insol. Ash (g)	% Loss on Drying	%Total ash	%Acid Insol. Ash
สาร 1B (a)	3.6084	0.3365	0.4466	0.0694	9.3244	12.3767	1.9233
สาร 1B (b)	3.8282	0.3370	0.4774	0.0729	8.8025	12.4706	1.9043
สาร 2B (a)	3.9981	0.3374	0.5845	0.0694	8.4381	14.6194	1.7358
สาร 2B (b)	3.9985	0.3389	0.5835	0.0702	8.4759	14.5930	1.7557
สาร 3B (a)	4.0000	0.3389	0.4773	0.0517	8.4727	11.9325	1.2925
สาร 3B (b)	3.9986	0.3372	0.4800	0.0511	8.4338	12.0042	1.2779
สาร 4B (a)	3.9843	0.3446	0.4239	0.0418	8.6482	10.6393	1.0491
สาร4B (b)	3.9683	0.3471	0.4189	0.0413	8.7479	10.5562	1.0407
สาร5B (a)	3.9993	0.3500	0.4232	0.0378	8.7509	10.5819	0.9452
สาร 5B (b)	3.9983	0.3478	0.4262	0.0366	8.6983	10.6595	0.9154
สาร 6B (a)	3.9931	0.3693	0.4377	0.0418	9.2478	10.9614	1.0468
สาร 6B (b)	3.9926	0.3586	0.4349	0.0409	8.9815	10.8927	1.0244
สาร 7B (a)	3.9740	0.3510	0.4269	0.0414	8.8324	10.7432	1.0411
สาร 7B (b)	3.9874	0.3515	0.4287	0.0415	8.8153	10.7506	1.0408
สาร 8B (a)	3.9801	0.3481	0.4329	0.0409	8.7466	10.8774	1.0270
สาร 8B (b)	3.9776	0.3485	0.4321	0.0406	8.7615	10.8641	1.0213
สาร 9B (a)	3.9211	0.3174	0.4168	0.0411	8.0941	10.6298	1.0488
สาร 9B (b)	3.9273	0.3186	0.4188	0.0409	8.1131	10.6638	1.0408
สาร 10B (a)	3.9099	0.3279	0.4169	0.0385	8.3858	10.6636	0.9847
สาร 10B (b)	3.9109	0.3283	0.4167	0.0386	8.3932	10.6539	0.9876
สาร 11B (a)	3.9066	0.3274	0.4161	0.0384	8.3800	10.6520	0.9823
สาร 11B(b)	3.9062	0.3273	0.4160	0.0384	8.3776	10.6496	0.9824
ค่ามากที่สุด	**4.0000**	**0.3693**	**0.5845**	**0.0729**	**9.3492**	**14.6194**	**1.9233**
ค่าน้อยที่สุด	**3.6084**	**0.3174**	**0.4106**	**0.0333**	**8.0941**	**10.2730**	**0.8626**
ค่าเฉลี่ย	**3.9203**	**0.3411**	**0.4472**	**0.0446**	**8.7034**	**11.4092**	**1.1403**
SD	**0.0896**	**0.0104**	**0.0436**	**0.0100**	**0.2859**	**1.0901**	**0.2634**

1.3.5 การวัดปริมาณความชื้นในบัวบก (Moisture content) โดยวิธีการกลั่นแบบ Azeotropic

ตารางที่ 1.11 แสดงปริมาณน้ำในตัวอย่างผงพืชบัวบก โดยวิธีการกลั่นแบบ Azeotropic

	น.น.ผง (g)	**ปริมาณน้ำที่ n'**	**ปริมาณน้ำที่ n**	**ปริมาณน้ำในผง**	**% ปริมาณความชื้น**
สาร 1A	30.0623	2.81	0.35	2.46	8.183
สาร 2A	30.0165	2.78	0.32	2.46	8.195
สาร 3A	30.0125	2.63	0.36	2.27	7.564
สาร 4A	30.0125	2.61	0.32	2.29	7.630
สาร 5A	30.0215	2.61	0.35	2.26	7.528
สาร 6A	30.0254	2.68	0.35	2.33	7.760
สาร 7A	30.0265	2.73	0.37	2.36	7.860
สาร 8A	30.0198	2.97	0.31	2.66	8.861
สาร 9A	30.0541	2.85	0.36	2.49	8.285
สาร 10A	30.0743	2.86	0.32	2.54	8.446
สาร 11A	30.0121	2.86	0.36	2.50	8.330
สาร 1B	30.0145	2.84	0.32	2.52	8.396
สาร 2B	30.0112	2.76	0.38	2.38	7.930
สาร 3B	30.0125	2.64	0.29	2.35	7.830
สาร 4B	30.0165	2.63	0.30	2.33	7.762
สาร 5B	30.0214	2.62	0.32	2.30	7.661
สาร 6B	30.0215	2.70	0.31	2.39	7.961
สาร 7B	30.0312	2.75	0.35	2.40	7.992
สาร 8B	30.0123	2.98	0.35	2.63	8.763
สาร 9B	30.0152	2.87	0.34	2.53	8.429
สาร 10B	30.0213	2.88	0.35	2.53	8.427
สาร 11B	30.0320	2.85	0.32	2.53	8.424
ค่ามากที่สุด	**30.0743**	**2.9800**	**0.3800**	**2.6600**	**8.8608**
ค่าน้อยที่สุด	**30.0112**	**2.6100**	**0.2900**	**2.2600**	**7.5279**
ค่าเฉลี่ย	**30.0249**	**2.7686**	**0.3364**	**2.4323**	**8.1008**
SD	**0.0171**	**0.1168**	**0.0242**	**0.1156**	**0.3841**

1.3.6 ปริมาณสิ่งสกัด (Extractive value)

ตารางที่ 1.12 แสดงปริมาณสิ่งสกัด (Extractive value) ในตัวอย่างผงพืชบัวบก

	น้ำหนักผง(g)	Water Soluble Extraction (g)	%Water Soluble Extraction	น้ำหนักผงยา(g)	Ethanol Sol. Extraction (g)	%Ethanol Sol. Extraction
สาร 1A	5.0021	1.3245	26.4789	5.0012	0.8243	16.4820
สาร 2A	5.0012	1.3265	26.5236	5.0014	0.8126	16.2475
สาร 3A	5.0065	1.3568	27.1008	5.0012	0.8542	17.0799
สาร 4A	5.0026	1.3254	26.4942	5.0042	0.8213	16.4122
สาร 5A	5.0014	1.3265	26.5226	5.0012	0.8236	16.4680
สาร 6A	5.0012	1.3314	26.6216	5.0032	0.8254	16.4974
สาร 7A	5.0036	1.3324	26.6288	5.0030	0.8263	16.5161
สาร 8A	5.0098	1.3201	26.3504	5.0041	0.8215	16.4165
สาร 9A	5.0021	1.3256	26.5009	5.0051	0.8246	16.4752
สาร 10A	5.0047	1.3650	27.2744	5.0032	0.8231	16.4515
สาร 11A	5.0094	1.3250	26.4503	5.0061	0.8223	16.4260
สาร 1B	5.0014	1.3254	26.5006	5.0032	0.8264	16.5174
สาร 2B	5.0062	1.3246	26.4592	5.0043	0.8325	16.6357
สาร 3B	5.0032	1.3254	26.4910	5.0042	0.8265	16.5161
สาร 4B	5.0012	1.3250	26.4936	5.0012	0.8275	16.5460
สาร 5B	5.0021	1.3025	26.0391	5.0023	0.8235	16.4624
สาร 6B	5.0064	1.3243	26.4521	5.0021	0.8216	16.4251
สาร 7B	5.0012	1.3250	26.4936	5.0036	0.8356	16.7000
สาร 8B	5.0036	1.3264	26.5089	5.0042	0.8216	16.4182
สาร 9B	5.0043	1.3258	26.4932	5.0032	0.8245	16.4795
สาร 10B	5.0041	1.3320	26.6184	5.0062	0.8225	16.4296
สาร 11B	5.0012	1.3199	26.3909	5.0014	0.8264	16.5240
ค่ามากที่สุด	**5.0098**	**1.3650**	**27.2744**	**5.0062**	**0.8542**	**17.0799**
ค่าน้อยที่สุด	**5.0012**	**1.3025**	**26.0391**	**5.0012**	**0.8126**	**16.2475**
ค่าเฉลี่ย	**5.0036**	**1.3280**	**26.5403**	**5.0032**	**0.8258**	**16.5057**
S.D.	**0.0026**	**0.0122**	**0.2415**	**0.0016**	**0.0077**	**0.1550**

1.3.7 ปริมาณการปนเปื้อนด้วยโลหะหนัก (Heavy Metal Contamination) โดยวิธี Atomic Absorption

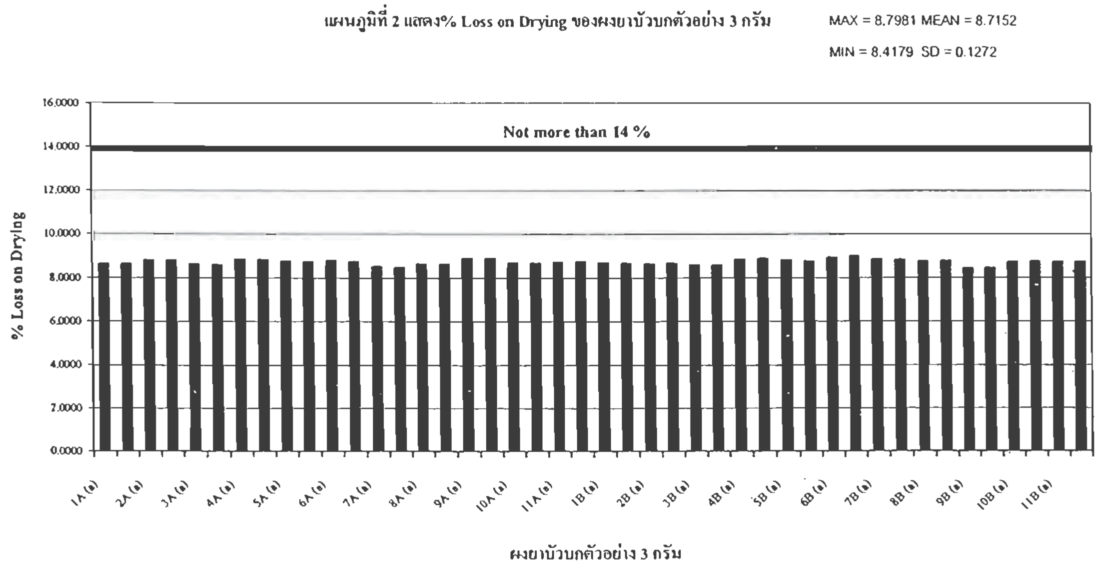
ตารางที่ 1.13 แสดงปริมาณการปนเปื้อนด้วยโลหะหนัก (Heavy Metal Contamination) โดยวิธี Atomic Absorption ในตัวอย่างผงพืชบัวบก

	น้ำหนักผง (g)	Lead content (ppm)	Iron content (ppm)
สาร 1A	2.9885	0.612	89.84
สาร 2A	3.0111	4.377	227.36
สาร 3A	3.0438	5.112	40.05
สาร 4A	3.0264	0.823	63.05
สาร 5A	3.0701	1.681	52.96
สาร 6A	3.1795	0.255	58.15
สาร 7A	3.0211	0.659	124.39
สาร 8A	3.0261	0.668	32.05
สาร 9A	3.0247	1.246	59.97
สาร 10A	3.0968	0.488	70.69
สาร 1B	3.0150	0.431	35.36
สาร 2B	3.0366	1.324	80.12
สาร 3B	3.0625	0.790	22.69
สาร 4B	3.0301	0.620	61.98
สาร 5B	3.0937	1.063	41.96
สาร 6B	3.2130	1.292	82.01
สาร 7B	3.1792	0.390	47.78
สาร 8B	3.1841	1.018	62.62
สาร 9B	3.0162	0.935	96.05
สาร 10B	3.0076	1.503	55.23
ค่ามากที่สุด	**3.2130**	**5.112**	**227.36**
ค่าน้อยที่สุด	**2.9885**	**0.255**	**22.69**
ค่าเฉลี่ย	**3.0663**	**1.264**	**70.22**
S.D.	**0.0688**	**1.257**	**44.14**

ผลการตรวจสอบปริมาณสิ่งปลอมปน ตามตารางที่ 1.7 พบว่าตัวอย่างที่นำมาศึกษาจำนวน 22 ตัวอย่าง ได้ค่าเฉลี่ยปริมาณสิ่งปลอมปนเท่ากับ 0.7870 ± 0.0367 โดยมีค่าสูงสุด 0.8495 และค่าต่ำสุด 0.7326 ผลการตรวจสอบได้ค่าต่ำกว่าเกณฑ์ (ไม่มากกว่า 2%) ตามแผนภูมิที่ 1 การมีสิ่งปลอมปนต่ำอาจเนื่องจากในการนำตัวอย่างมาศึกษาได้มีขั้นตอนการทำความสะอาด และมีการควบคุมสิ่งแวดล้อมระหว่างการทำล้างและอบแห้ง

แผนภูมิที่ 1 แสดง % Foreign Matter ของผงยาบัวบกตัวอย่าง

แผนภูมิที่ 2 แสดง% Loss on Drying ของผงยาบัวบกตัวอย่าง 3 กรัม



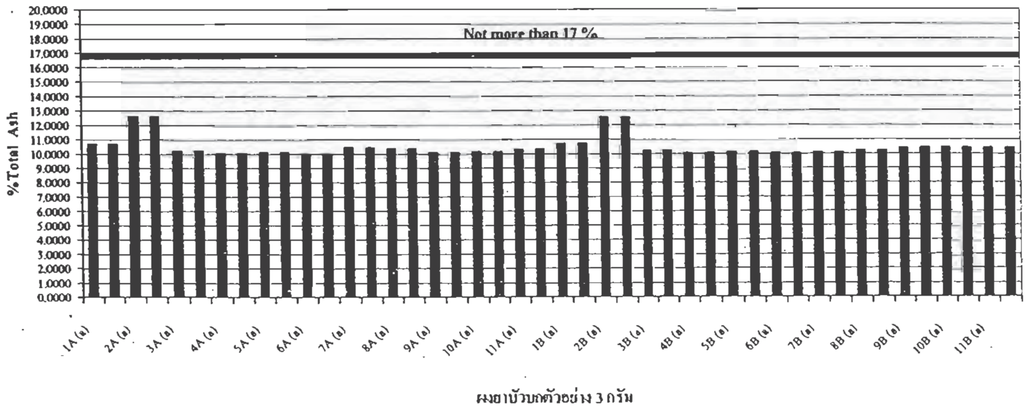
ผลการตรวจสอบน้ำหนักที่หายไปเมื่อทำให้แห้ง (%Loss on Drying) ตามตารางที่ 1.8 พบว่าตัวอย่างที่นำมาศึกษาจำนวน 22 ตัวอย่าง ได้ค่าเฉลี่ย 8.7152 ± 0.1272 มีค่าสูงสุด 8.7961 ค่าต่ำสุด 8.4179 เกณฑ์มาตรฐานกำหนดที่ ไม่เกิน 14% ดังแสดงในแผนภูมิ 2

ผลการตรวจสอบปริมาณเถ้ารวม (% Total Ash) ตามตารางที่ 1.8 พบว่าตัวอย่างที่นำมาศึกษาจำนวน 22 ตัวอย่าง ได้ค่าเฉลี่ยปริมาณ 10.4543 ± 0.7013 และมีค่าสูงสุด 12.6103 ค่าต่ำสุด 10.0110 เกณฑ์มาตรฐาน ไม่เกิน 17% ดังแสดงในแผนภูมิ 3

แผนภูมิที่ 3 แสดง%Total Ash ของผงยาบัวบกตัวอย่าง 3 กรัม

MAX = 12.6103 MEAN = 10.4543

MIN = 10.0110 SD = 0.7013

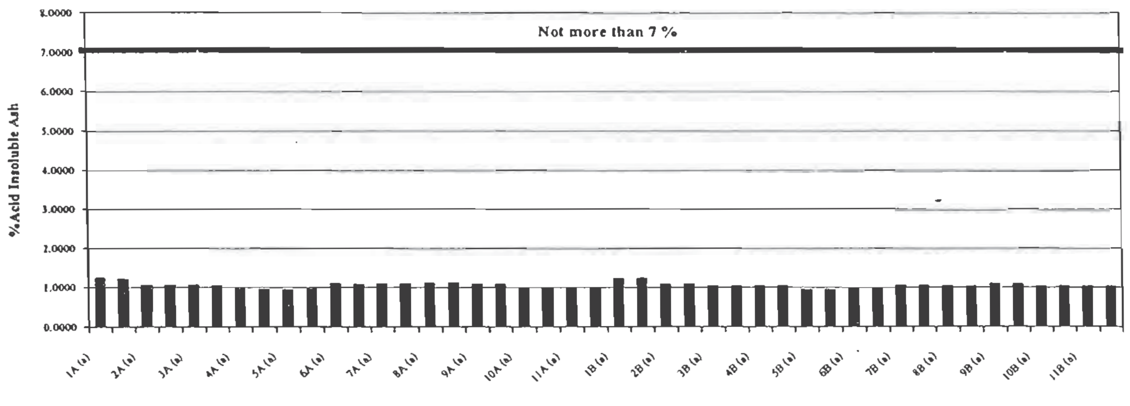


ผลการตรวจสอบปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (%Acid Insoluble Ash) ตามตารางที่ 1.8 พบว่าตัวอย่างที่นำมาศึกษาจำนวน 22 ตัวอย่าง ได้ค่าเฉลี่ยปริมาณ 1.0483 ± 0.0747 ค่าสูงสุด 1.2347 ค่าต่ำสุด 0.9194 เกณฑ์มาตรฐาน ไม่เกิน 7% ดังแสดงในแผนภูมิ 4

แผนภูมิที่ 4 แสดง%Acid Insoluble Asb ของผงยาบัวบกตัวอย่าง 3 กรัม

MAX = 1.2347 MEAN = 1.0463

MIN = 0.9294 SD = 0.0747

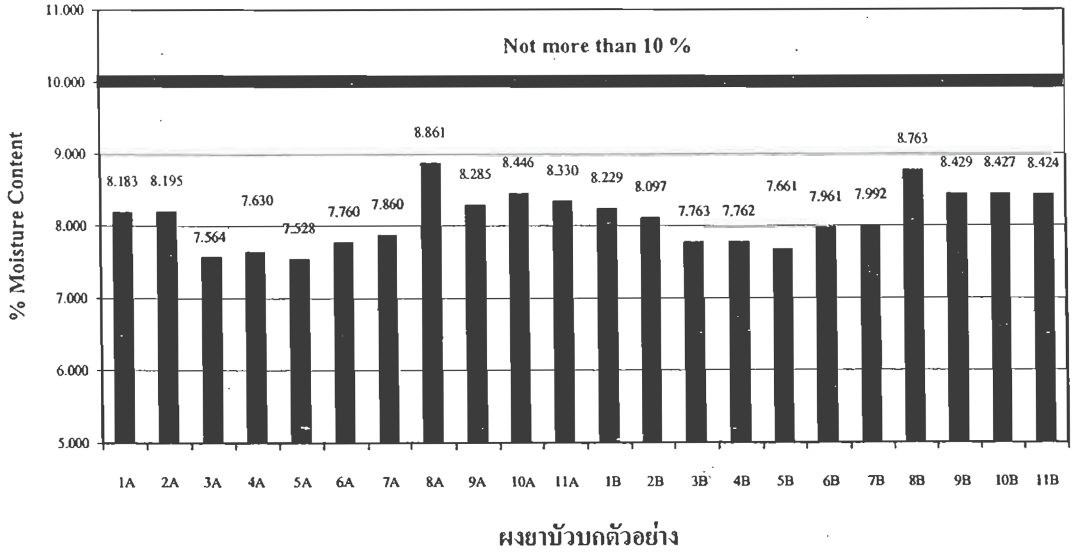


ผลการตรวจสอบปริมาณความชื้น (% Moisture Content) ตามตารางที่ 1.11 พบว่าตัวอย่างที่นำมาศึกษาจำนวน 22 ตัวอย่าง ได้ค่าเฉลี่ย 8.098 ± 0.3804 เกณฑ์มาตรฐานกำหนดไม่เกิน 10% ดังแสดงในแผนภูมิ 5 ซึ่งแสดงว่าวิธีการอบแห้งตัวอย่างเหมาะสมดี

แผนภูมิที่ 5 แสดง % Moisture Content ของผงยาบัวบกตัวอย่าง

MEAN = 8.098

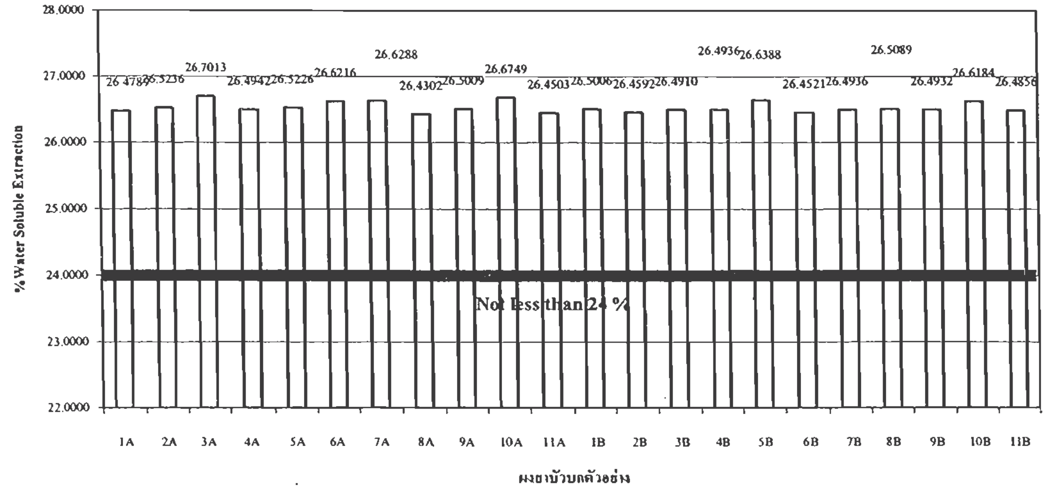
SD = 0.3804



แผนภูมิที่ 6 แสดง %Water Soluble Extraction ของผงยาบัวบกตัวอย่าง

MEAN = 26.5301

SD = 0.0784

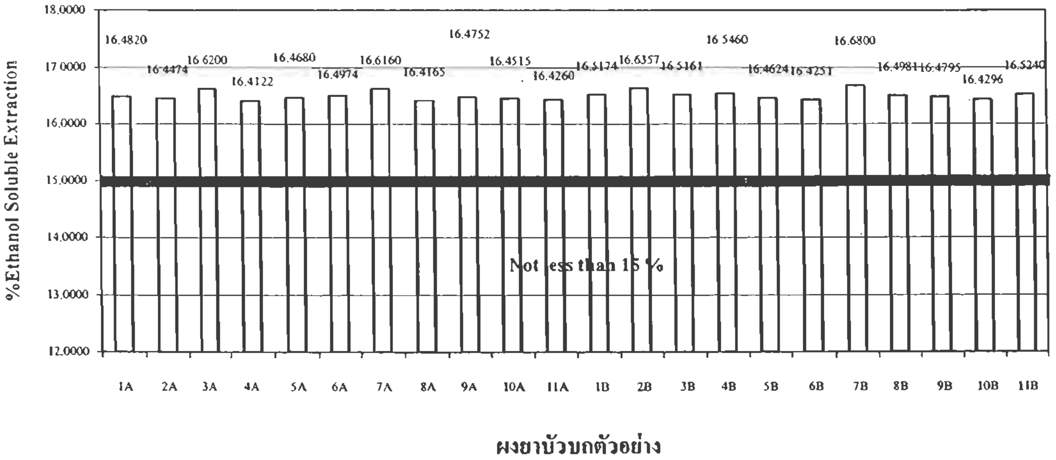


ผลการตรวจสอบปริมาณสารสกัดที่ละลายน้ำ (%Water Soluble Extraction) ตามตารางที่ 1.12 พบว่าตัวอย่างที่นำมาศึกษาจำนวน 22 ตัวอย่าง ได้ค่าเฉลี่ย 26.5301 ± 0.0784 เกณฑ์มาตรฐานกำหนด ไม่น้อยกว่า 24% ดังแสดงในแผนภูมิ 6

แผนภูมิที่ 7 แสดง %Ethanol Soluble Extraction ของผงยาบัวบกตัวอย่าง

MEAN = 16.5012

SD = 0.0761

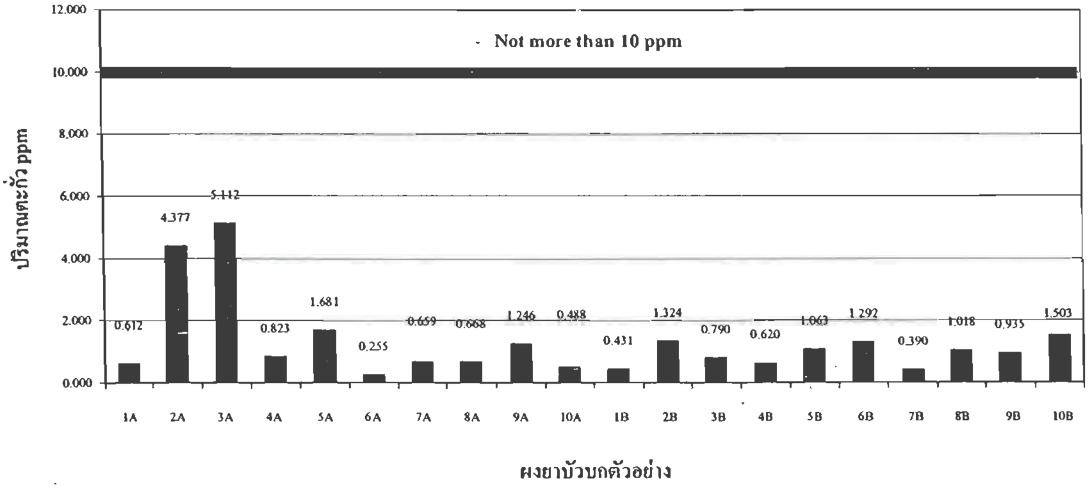


ผลการตรวจสอบปริมาณสารสกัดที่ละลายethanol (%Ethanol Soluble Extract) ตามตารางที่ 1.12 พบว่าตัวอย่างที่นำมาศึกษาจำนวน 22 ตัวอย่าง ได้ค่าเฉลี่ย 16.5012 ± 0.0761 เกณฑ์มาตรฐานกำหนด ไม่น้อยกว่า 15% ดังแสดงในแผนภูมิ 7

แผนภูมิที่ 8 แสดงปริมาณตะกั่ว ppm ของผงยาบัวบกตัวอย่าง

MEAN = 1.264

SD = 1.2566

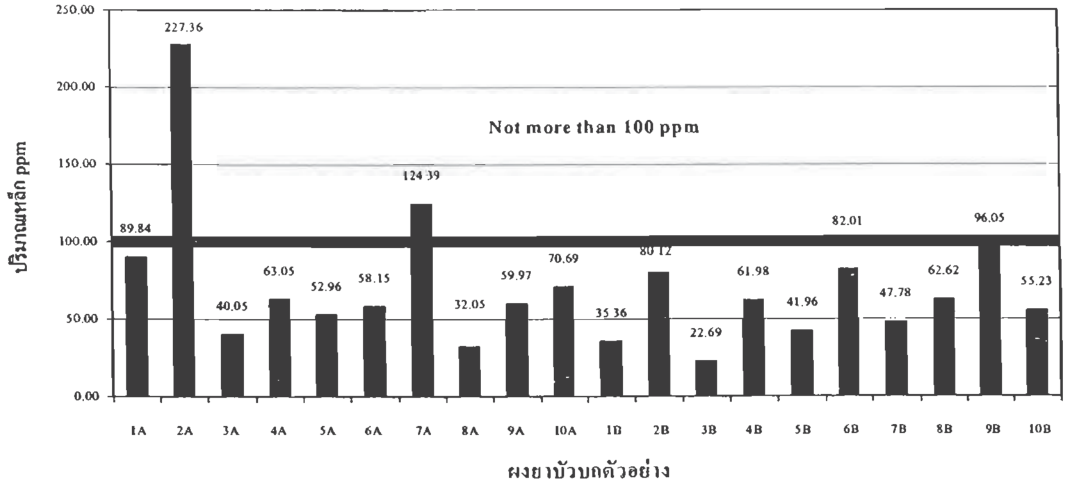


ผลการตรวจสอบปริมาณสารตะกั่ว (Lead Limit) ตามตารางที่ 1.13 พบว่าตัวอย่างที่นำมาศึกษาจำนวน 22 ตัวอย่าง ได้ค่าเฉลี่ย 1.264 $\pm$ 1.2566 ppm เกณฑ์มาตรฐานกำหนด ไม่เกิน 10 ppm ดังแสดงในแผนภูมิ 8

แผนภูมิที่ 9 แสดงปริมาณเหล็ก ppm ของผงยาบัวบกตัวอย่าง

MEAN = 70.2157

SD = 44.1353



ผลการตรวจสอบปริมาณสารเหล็ก (Iron Limit) ตามตารางที่ 1.13 พบว่าตัวอย่างที่นำมาศึกษาจำนวน 22 ตัวอย่าง ได้ค่าเฉลี่ย 70.2157 $\pm$ 44.1353 เกณฑ์มาตรฐานกำหนด ไม่เกิน 100 ppm ดังแสดงในแผนภูมิ 9 พบว่ามีตัวอย่างบางตัวอย่างมีปริมาณเหล็กเกินเกณฑ์ คาดว่าอาจมาจากการปนเปื้อนจากน้ำบาดาลที่ใช้ในการปลูก

ตารางที่ 1.14 สรุปผลวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพของตัวอย่างผงพืชบัวบกเทียบกับมาตรฐาน

สรุปผลการวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพ						
หัวข้อการวิเคราะห์	**ค่าสูงสุด**	**ค่าต่ำสุด**	**ค่าเฉลี่ย**	**S.D.**	**เกณฑ์มาตรฐาน**	**ผล**
% Foreign Matter	0.8495	0.7326	0.7870	0.0367	ไม่มากกว่า 2% (1)	ตามมาตรฐาน
% Loss on Drying	8.9781	8.4179	8.7152	0.1272	ไม่มากกว่า 14% (1)	ตามมาตรฐาน
%Total Ash	12.6103	10.0110	10.4543	0.7013	ไม่มากกว่า 17% (1)	ตามมาตรฐาน
%Acid insoluble Ash	1.2347	0.9294	1.0463	0.0747	ไม่มากกว่า 7% (1)	ตามมาตรฐาน
% Moisture content	8.8608	7.5279	8.0978	0.3804	ไม่ได้กำหนด (3)	ควรไม่เกิน 10%
%Water soluble Extraction	26.7013	26.4302	26.5301	0.0784	ไม่น้อยกว่า 15% (1)	ตามมาตรฐาน
%Ethanol soluble Extraction	16.6800	16.4122	16.5012	0.0761	ไม่น้อยกว่า 24% (1)	ตามมาตรฐาน
Lead content (ppm)	5.112	0.255	1.264	1.257	ไม่มากกว่า 10 ppm (2)	ตามมาตรฐาน
Iron content (ppm)	227.36	22.69	70.22	44.14	ไม่ได้กำหนด (3)	ควรไม่เกิน 100 ppm

(1) Standard of Herbal Medicine,Vol 1 Published by Asean Countries

(2) Thai Herbal Pharmacopoeia ,Vol 1-2

(3) ไม่มีกำหนดทั้ง Standard of Herbal Medicine,Vol 1 Pubished by Asean Countries และThai Herbal Pharmacopoeia ,Vol 1-2

2 การศึกษาข้อมูลพื้นฐานที่มีผลต่อคุณลักษณะของสารสกัดบัวบก

การศึกษาสารสกัดบัวบกเพื่อให้มีสารสำคัญในการออกฤทธิ์ที่มีมาตรฐานคงที่จำเป็นต้องศึกษาข้อมูลพื้นฐานของพืช เช่นพันธ์พืช ฤดูการเก็บเกี่ยว ส่วนของพืชที่มีสารสำคัญ อายุของส่วนพืชที่เก็บเกี่ยว ผลของปริมาณแสงแดด เป็นต้น นอกจากนั้นยังต้องศึกษาขบวนการสกัดและทำให้บริสุทธิ์ หรือกึ่งบริสุทธิ์ (ในประเด็นหลังนี้ได้รับการศึกษาในโครงการวิจัยที่ 1)

ในการศึกษาดังกล่าวข้างต้นนั้น เครื่องมือที่สำคัญที่สุดคือ วิธีการตรวจวิเคราะห์สารสำคัญต้องเป็นวิธีที่มีความถูกต้อง และสามารถตรวจหาสารสำคัญได้ทั้งในพืชสดหรือสารสกัด กระบวนการควบคุมคุณภาพที่ถูกต้องจึงจำเป็นสำหรับการหาข้อมูลพื้นฐาน

วิธีการตรวจวิเคราะห์สารสำคัญที่เป็นที่นิยมใช้ในปัจจุบันมักเป็นวิธีที่สามารถศึกษาความคงตัวของผลิตภัณฑ์ได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งพัฒนาวิธีวิเคราะห์ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) และยังได้คิดพัฒนาอีกวิธีที่ง่ายและรวดเร็วกว่าแต่ความถูกต้องแม่นยำต่ำกว่า นั่นคือวิธี Thin Layer Cromatographic Densitometry (TLC-Densitometry) วิธีวิเคราะห์ทั้งสองจะต้องผ่านการพิสูจน์ความใช้ได้ตามเกณฑ์แนะนำมาตรฐานของ International Conference in Harmonization (ICH)

จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญซึ่งได้กำหนดให้ตรวจหาสาร triterpene 4 ชนิด ตามที่ได้ทำการวิจัยในส่วนของโครงการด้านเภสัชวิทยา และ พิษวิทยา ตลอดจนด้านการพัฒนาเภสัชภัณฑ์ สารสำคัญที่มุ่งตรวจหาในงานวิจัยนี้คือ Madecassoside, Asiaticoside, Madecassic Acid และ Asiatic Acid.

ในงานวิเคราะห์ จำเป็นต้องพัฒนาสารมาตรฐานใช้งาน (Working Standard) ซึ่งโดยทั่วไปสารมาตรฐานมักมีราคาสูง ในงานวิจัยนี้จึงมุ่งพัฒนาวิธีเตรียมสารมาตรฐานใช้งานเอง โดยกรณีของสาร Madecassoside และ Asiaticoside สามารถเตรียมได้ด้วยการทำ Preparative Chromatography และตามด้วยการตกผลึก ในขณะที่ Madecassic Acid และ Asiatic Acid เตรียมได้โดยวิธีการสังเคราะห์ทางเคมี สารมาตรฐานทุกตัวที่เตรียมได้ต้องผ่านการตรวจพิสูจน์สูตรโครงสร้าง โดยใช้เทคนิคทาง ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, IR และตรวจยืนยันซ้ำด้วยวิธีทาง HPLC และ TLC เทียบกับสารมาตรฐานปฐมภูมิ

กรณีที่วิเคราะห์สารสกัดจากพืช เนื่องจากมีสารปนเปื้อนต่างๆมาก จึงได้พัฒนาวิธีเตรียมตัวอย่างให้สะอาดมากขึ้น ทั้งนี้เพื่อยืดอายุการใช้งานของ column การพัฒนาได้ใช้ solid phase extraction และพัฒนาสารละลายที่ชะสารปนเปื้อน และสารละลายที่ชะสารสำคัญ วิธีการทำสารตัวอย่างให้สะอาดช่วยทำให้ผลการวิเคราะห์ถูกต้องมากขึ้น

ในงานวิจัยนี้ได้รับความร่วมมือจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (ว.ว.) โดยมี ดร. ปิยะ เฉลิมกลิ่น ในการจัดหาพันธุ์บัวบกต่างๆจาก 12 แหล่ง และทำการเพาะปลูกในแปลงปลูกที่สถาบันฯ ทั้งนี้เพื่อจำกัดตัวแปรต่างๆให้น้อยหรือใกล้เคียงกันในแต่ละพันธุ์ ดังนั้นการปลูกพืชตัวอย่างแต่ละพันธุ์จึงได้ปลูกในสภาวะคล้ายกันเก็บเกี่ยวในเวลาที่ใกล้เคียงกัน

เพื่อให้งานวิจัยนี้ได้ข้อมูลพื้นฐานที่เหมาะสมต่อการพัฒนาในระดับอุตสาหกรรม จึงได้ทำการศึกษาหาปริมาณสาระสำคัญในบัวบกที่ได้มีการเพาะปลูกเพื่อการพาณิชย์เป็นจำนวน 3 แหล่ง คือ ที่จังหวัดนครปฐม อุบลราชธานี และนครศรีธรรมราช โดยทำการตรวจหาปริมาณสารสำคัญตลอดเวลา 1 ปี ทั้งนี้เพื่อให้ทราบช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยว

นอกจากนี้ได้ศึกษาเปรียบเทียบปริมาณสารในใบและก้านใบ เปรียบเทียบผลของแสงแดดต่อปริมาณสาร และได้ศึกษาถึงความคงตัวของสารสกัดในสภาวะเร่งซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานการทดสอบความคงตัวเบื้องต้น

การทดลองต่าง ๆที่ได้ทำการตรวจสอบมีผลดังต่อไปนี้

2.1 การเก็บและการเก็บรักษาตัวอย่าง

ตัวอย่างพืชจะถูกเก็บทุก ๆ สัปดาห์ที่ 2 ของเดือน ตั้งแต่เดือนมกราคม ถึงธันวาคม ปี พ.ศ. 2546 (ยกเว้นในเดือนเมษายน เนื่องจากทางแหล่งปลูกหยุดทำการ) จาก 2 แหล่งปลูกในจังหวัดนครปฐม โดยเก็บตัวอย่างพืชสดครั้งละประมาณ 10 กิโลกรัม ซึ่งเมื่อนำมาอบให้แห้งแล้วจะเหลือน้ำหนักประมาณ 1 กิโลกรัม เก็บอยู่ในถุงพลาสติก 3 ชั้นเพื่อป้องกันตัวมอด

ตัวอย่างพืชที่ได้รับจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีได้เก็บจากจังหวัดต่อไปนี้ ปราจีน (CA1) นครศรธรรมราช (CA2) อุบลราวธานี (CA3) ตราด (CA4) นครศรีธรรมราช ตลาด (CA5) ระยอง (CA6) ชลบุรี (CA7) นครราชสีมา (CA8) สุโขทัย (CA9) เชียงใหม่ ก้านเขียว (CA10) พิษณุโลก (CA11) และ เชียงใหม่ (CA12)

2.2 การสกัดและการแยกสาร triterpenoid glycoside

เมื่อสกัดผงบัวบก 300 กรัม ด้วย 70% methanol ตามขั้นตอนการทดลอง จะได้ตะกอนของ triterpene glycoside 4.936 กรัม (ผลผลิต 1.65%)

2.3 การเตรียม Madecassoside, Asiaticoside, Madecassic acid และ Asiatic acid เป็นสารมาตรฐานใช้งาน

2.3.1 การเตรียม Madecassoside และ Asiaticoside

ตะกอนของ triterpene glycoside 100 มิลลิกรัม สามารถแยกออกมาเป็น Asiaticoside 22 มิลลิกรัม (ผลผลิด 22%) และ Madecassoside 25 มิลลิกรัม (ผลผลิต 25%) โดยใช้คอลัมน์ที่บรรจุด้วย silica gel ในการแยกสารแต่ละตัวและชะด้วย dichloromethane และ methanol ในสัดส่วนที่เหมาะสม

2.3.2 การเตรียม Madecassic acid และ Asiatic acid

เนื่องมาจากในธรรมชาติ บัวบกมีปริมาณ aglycone น้อย ดังนั้นในการเตรียม aglycone เพื่อใช้เป็นสารมาตรฐานใช้งาน จึงเตรียมจากการเปลี่ยน glycoside เป็น aglycone โดยใช้ปฏิกริยา alkaline hydrolysis

ตะกอนของ triterpene glycoside 2.5 กรัม เมื่อถูก hydrolysis ด้วยด่างแล้วให้เป็นตะกอนของ aglycone 1.4 กรัม (ผลผลิต 56%) ซึ่งเมื่อแยกตะกอนของ

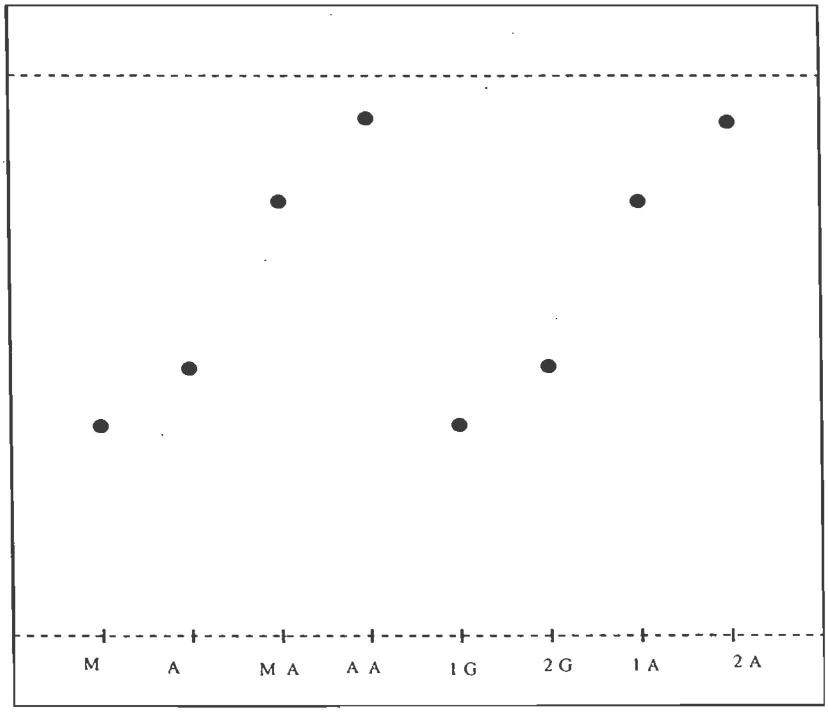
aglycone 100 มิลลิกรัม โดยใช้คอลัมน์ที่บรรจุด้วย silica gel ได้เป็น Asiatic acid 22 มิลลิกรัม (ผลผลิต22%) และ Madecassic acid 25 มิลลิกรัม (ผลผลิต 25%)

2.4 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ triterpene glycoside และ aglycone

Triterpene glycosides และ aglycones ที่แยกได้สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์โดยวิธีทาง chromatography (TLC รูปที่ 2.1 และ HPLC รูปที่ 2.2) และ spectrophotometry (IR รูปที่ 2.3 และ NMR รูปที่ 2.4 และ รูปที่ 2.5)

2.4.1 TLC methods

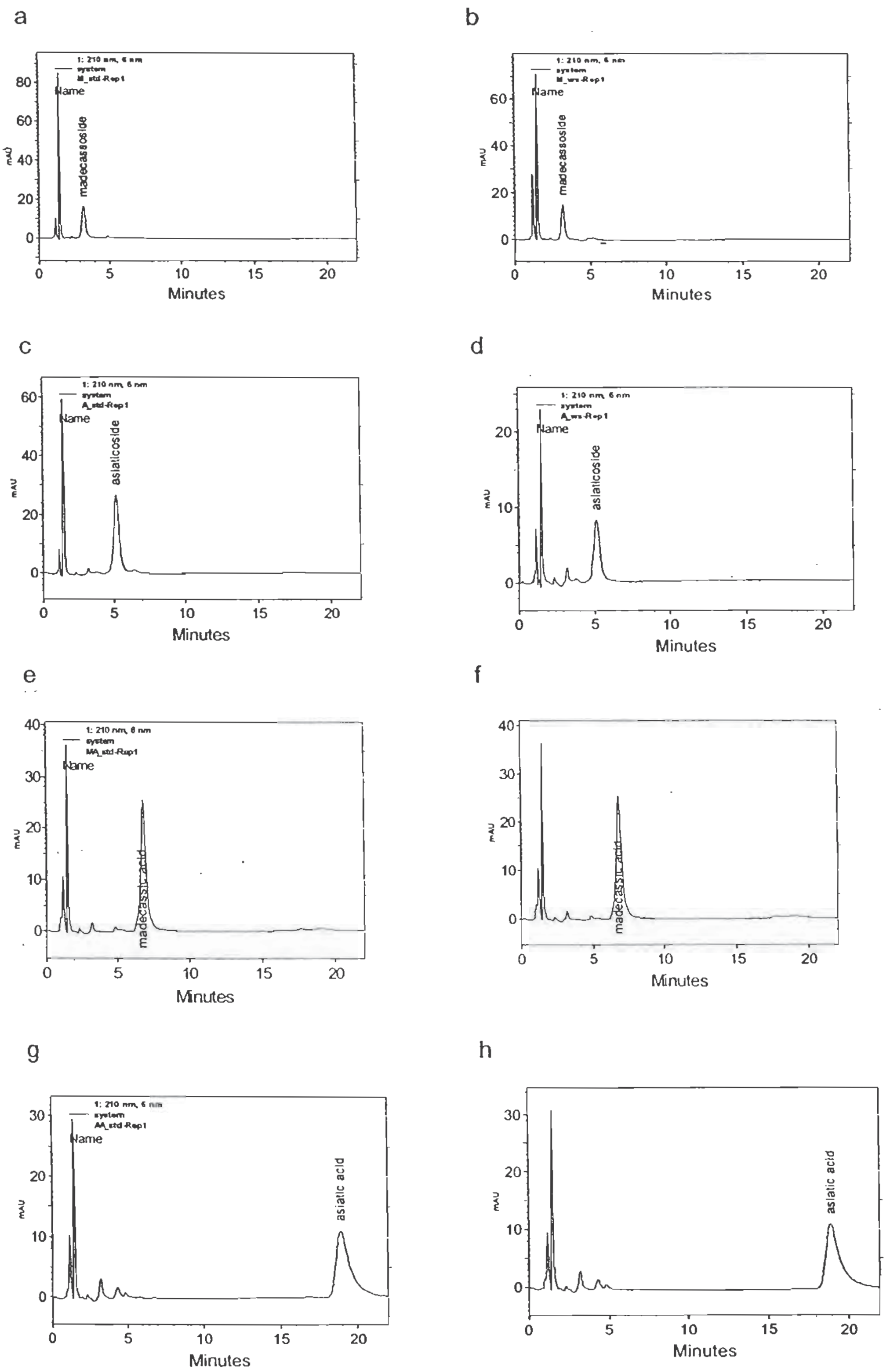
ค่า Rf ของ Madecassoside, Asiaticoside, Madecassic acid และ Asiatic acid ที่แยกได้เท่ากับ 0.37, 0.48, 0.77 และ 0.92 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับสารมาตรฐาน ดังรูปที่ 2.1



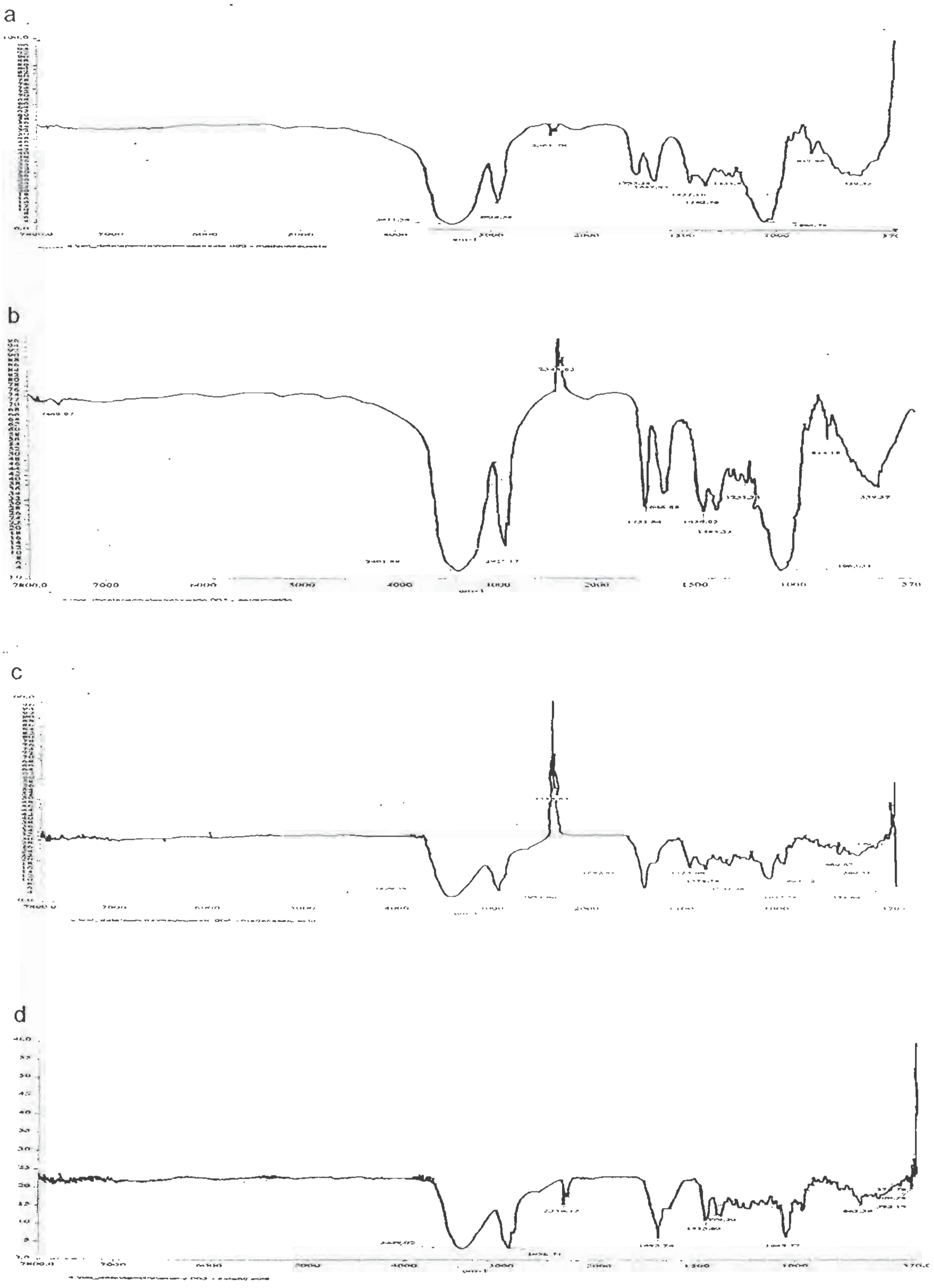
รูปที่ 2.1 TLC chromatogram ของสารมาตรฐาน Madecassoside (M), Asiaticoside (A), Madecassic acid (MA), Asiatic acid (AA) และสารที่ได้จากการแยก Madecassoside (1G), Asiaticoside (2G), Madecassic acid (1A), Asiatic acid (2A)

2.4.2 HPLC methods

ค่า retention time ของ Madecassoside, Asiaticoside, Madecassic acid และ Asiatic acid ที่แยกได้เท่ากับ 3.4, 5.4, 6.3 และ 18.2 นาที ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับสารมาตรฐาน ดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 HPLC chromatogram ของสารมาตรฐาน madecassoside (a), asiaticoside (c), Madecassic acid (e), Asiatic acid (g) และสารที่แยกได้ Madecassoside (b), Asiaticoside (d), Madecassic acid (f), Asiatic acid (h)



รูปที่ 2.3 IR spectrum ของสารที่แยกได้ Madecassoside (a), Asiaticoside (b), Madecassic acid (c) และ Asiatic acid (d)

2.4.3 IR method

รูปที่ 2.3 แสดง IR spectrum ของสาร triterpene glycosides และ aglycones ของสารที่แยกได้

IR spectrum (รูป a และ b) ของ triterpene glycosides ทั้ง 2 ชนิด (Madecassoside และ Asiaticoside) มี broad band ที่ 3411 cm^{-1} สำหรับ OH stretching, 1735 cm^{-1} สำหรับ ester carbonyl stretching, 1647 cm^{-1} สำหรับ C=C stretching , และ1064 cm^{-1} สำหรับ C-O stretching

IR spectrum (รูป c และ d) ของ aglycones ทั้ง 2 ชนิด (Madecassic acid และ Asiatic acid) มี broad band ที่ 3429 cm^{-1} สำหรับOH stretching, 1692 cm^{-1} สำหรับ carboxylic carbonyl stretching, 1035 cm^{-1} สำหรับ C-O stretching

2.4.4 NMR method

รูปที่ 2.4 และ 2.5 แสดง ^{1}H-NMR spectrum และ ^{13}C-NMR spectrum ของสารที่แยกได้ตามลำดับ

สำหรับ ^{1}H-NMR spectrum (500 MHz) ของ Asiaticoside ที่แยกได้แสดงสัญญาณในช่วง 0.5-1.2 (4 s และ 2 d ของ 6 methyl group), 5.14 (t, 1H-12) และ 2.10 (d, J = 10.98 Hz, 1H-18) ซึ่งทั้งหมดแสดงว่ามี Δ^{12}-ursene skeleton ในส่วนของน้ำตาลแสดง ^{1}H-NMR spectrum แสดง 3 doublet ของ anomeric protons (σ 5.18, J = 5.8 Hz; 5.16, J = 8.24 Hz; 4.84, J = 4.88 Hz) สำหรับ ^{1}H-NMR spectrum (500 MHz) ของ Madecassoside ที่แยกได้แสดงสัญญาณในช่วง 0.7-1.2 (4 s และ 2 d ของ 6 methyl group), 5.14 (t, 1H) และ 2.10 (d, J = 10.98 Hz, 1H) ซึ่งทั้งหมดแสดงว่ามี Δ^{12}-ursene skeleton ในส่วนของน้ำตาลแสดง ^{1}H-NMR spectrum ของ 3 doublet ของ anomeric protons (σ 5.15, J = 5.8 Hz; 4.25, J = 7.93 Hz; 4.85, J = 4.87 Hz) นอกจากนี้ใน ^{1}H-NMR spectrum ยังแสดงสัญญาณที่ 4.04 ของ –C<u>H</u>OH- (dd, 1H)

สำหรับ ^{13}C-NMR spectrum ของ Madecassoside และ Asiaticoside ที่แยกได้แสดงสัญญาณที่ 175 (-COOR), 137 และ 124 (-C=C), 60- 100 (17 C ของ sugar and C-2 and C-23 ของ ursene skeleton)

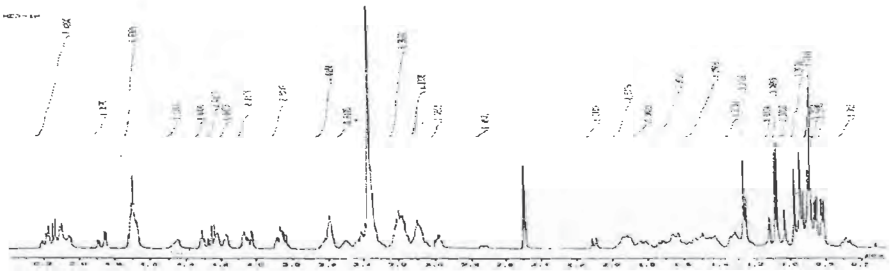
สำหรับ ^{1}H-NMR spectrum (300 MHz)ของ Asiatic acid ที่แยกได้แสดงสัญญาณในช่วง 0.7-1.2 (4 s และ 2 d ของ 6 methyl group), 5.18 (t, 1H) และ 2.12 (d, J = 10.98 Hz, 1H) ซึ่งทั้งหมดแสดงว่ามี Δ^{12}-ursene skeleton

สำหรับ ^{1}H-NMR spectrum (300 MHz) ของ Madecassic acid ที่แยกได้แสดงสัญญาณในช่วง 0.7-1.2 (4 s และ 2 d ของ 6 methyl group), 5.18 (t, 1H) และ 2.10 (d, J = 10.98 Hz, 1H) ซึ่งทั้งหมดแสดงว่ามี Δ^{12}-ursene skeleton. นอกจากนี้ใน ^{1}H-NMR spectrum ยังแสดงสัญญาณที่ 4.04 ของ –C<u>H</u>OH-(dd, 1H)

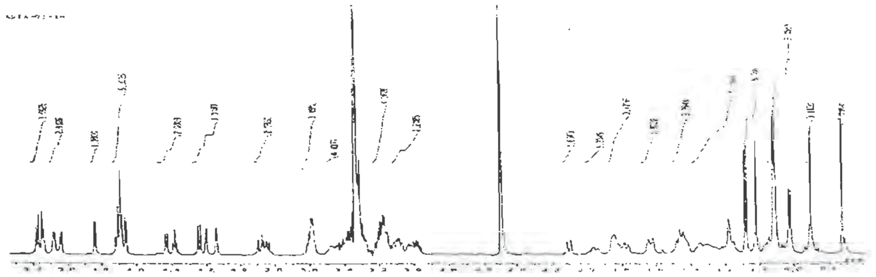
สำหรับ ^{13}C-NMR spectrum ของ Asiatic acid และ Madecassic acid ที่แยกได้แสดงสัญญาณที่ 175 (-COOR), 137 และ 124 (-C=C), 76 (<u>C</u>-C=0), 60-70 (3C-O)

ข้อมูลที่ได้ทั้ง TLC และ HPLC ยืนยันว่า สารทั้งสี่ที่เตรียมได้ตรงกับสารมาตรฐาน และข้อมูลจาก IR, ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR ยืนยันได้เช่นกันว่าเป็นสาร Madecassoside, Asiaticoside, Madecassic acid และ Asiatic acid

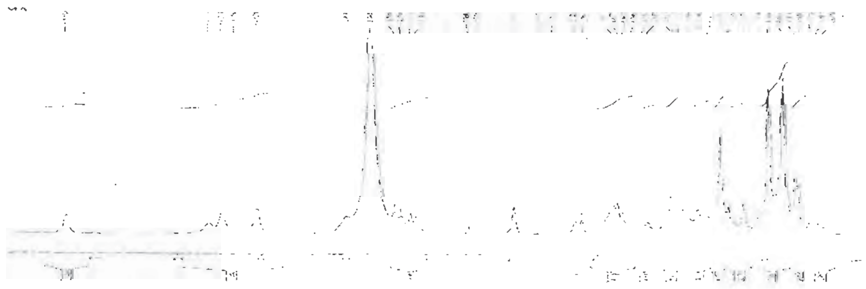
a



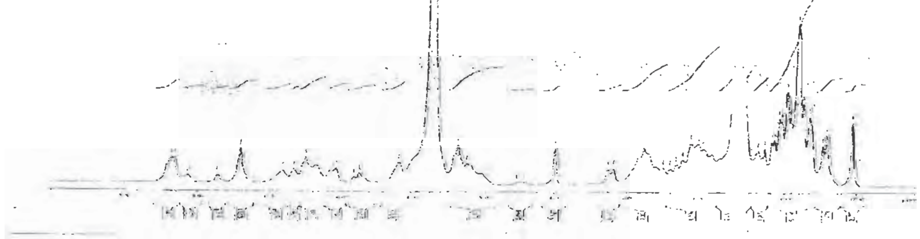
b



c

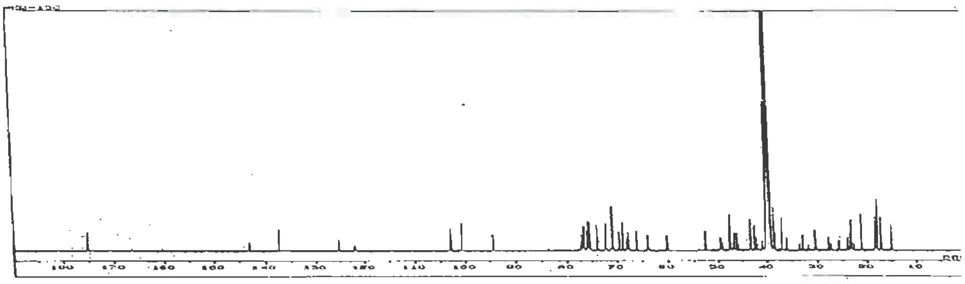


d

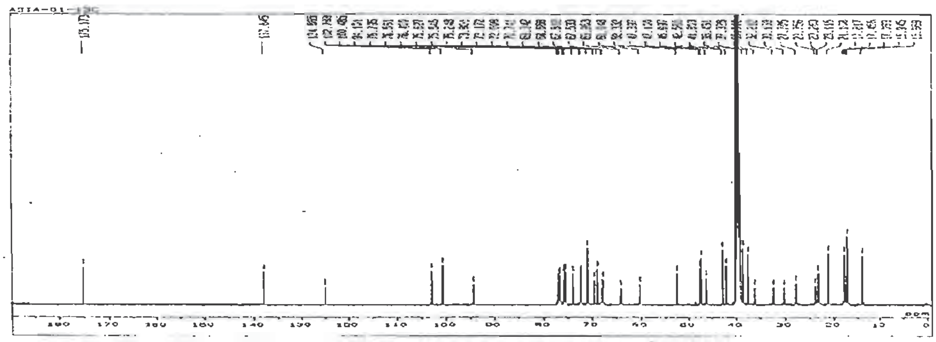


รูปที่ 2.4 ^{1}H-NMR spectrum ของ Madecassoside (a), Asiaticoside (b), Madecassic acid (c) และ Asiatic acid (d)

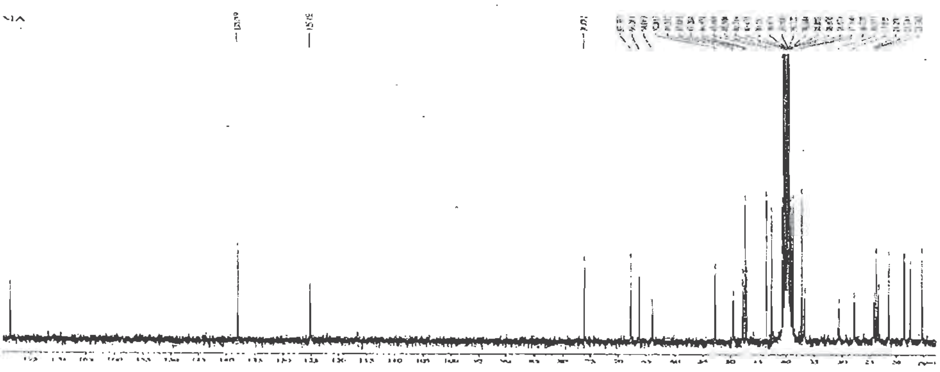
a



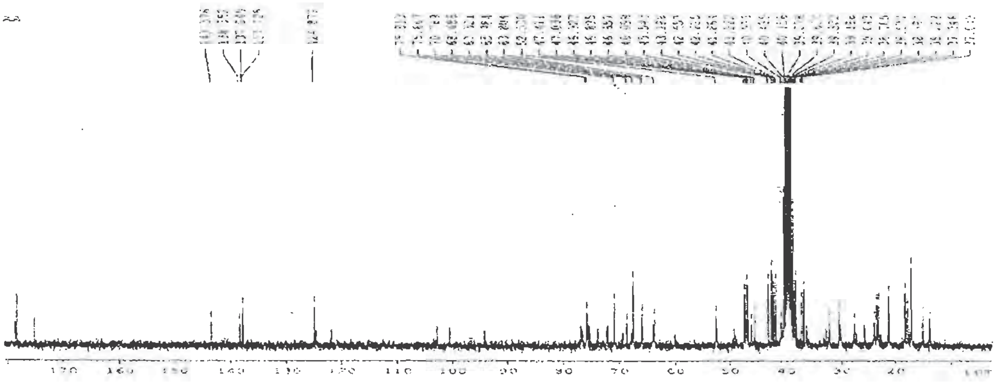
b



c



d



รูปที่ 2.5 ^{13}C-NMR spectrum ของ Madecassoside (a), Asiaticoside (b), Madecassic acid (c) และ Asiatic acid (d)

2.4.5 คุณสมบัติทางกายภาพ

ช่วงหลอมเหลวของ Madecassoside, Asiaticoside, Madecassic acid และ Asiatic acid ที่แยกได้คือ 215-217, 231-232, 266-268 และ 305-307 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

2.5 การหาความบริสุทธิ์ของ Madecassoside, Asiaticoside, Madecassic acid และ Asiatic acid เพื่อใช้เป็นสารมาตรฐานใช้งาน (working standard)

เมื่อคำนวณพื้นที่ใต้พีกของสารมาตรฐานใช้งานเทียบกับสารมาตรฐานอ้างอิง พบว่า Madecassoside, Asiaticoside, Madecassic acid และ Asiatic acid ที่ใช้เป็นสารมาตรฐานใช้งานมีค่าความบริสุทธิ์เท่ากับ 95.55%, 101.3%, 98.98% และ 98.09 % ตามลำดับ

2.6 การพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่าง

2.6.1 การพัฒนาวิธีการสกัดสารออกจากตัวอย่างพืช

ในการสกัดสารออกจากตัวอย่างพืชด้วยวิธี reflux ด้วย 60%, 70% และ 80% methanol เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่า 80% methanol มีความสามารถในการสกัดสารออกมามากที่สุด แต่เนื่องจากยิ่งอัตราส่วนของ methanol ยิ่งสูงยิ่งทำให้มี chlorophyll และสารปนเปื้อนอื่นๆ ออกมาในสารสกัดมากทำให้เราจึงเลือกใช้แค่ 80% methanol ในการสกัดสาร

นอกจากนี้เรายังได้มีการหาเวลาที่เหมาะสมในการสกัดสารออกมาจากตัวอย่าง พบว่า ปริมาณสารที่ออกมาในสารสกัดเพิ่มขึ้นตามเวลาที่ใช้ในการสกัด จนกระทั่งเวลามากกว่า 90 นาที หรือ 1.5 ชั่วโมง ปริมาณของสารในสารสกัดไม่แปรผันตามเวลา คือ ปริมาณค่อนข้างคงที่ดังแสดงในรูปที่ 2.6

ดังนั้นในการสกัดสารออกจากตัวอย่าง จึงทำโดยการ reflux ผงบัวบก 5 gm ด้วย 80% methanol เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง

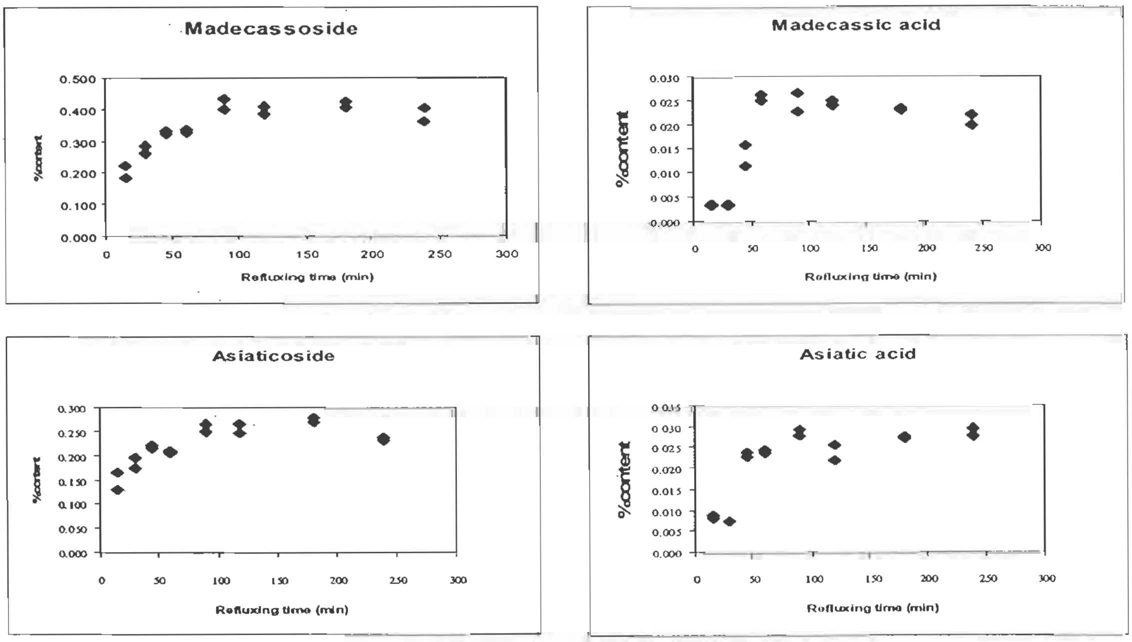
2.6.2 การพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วย Solid Phase Extraction (SPE)

เนื่องมาจากตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์เป็นสารสกัดจากธรรมชาติ ทำให้ต้องทำความสะอาดตัวอย่างด้วยเทคนิคทาง SPE ก่อนทำการวิเคราะห์ด้วย HPLC เพื่อยืดอายุการใช้งานของ column ในขั้นแรกได้หาตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับการชะล้างสิ่งเจือปนออกมาจากตัวอย่างก่อน ซึ่งพบว่า 10% acetonitrile ในน้ำเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมเนื่องมาจากสามารถชะล้าง

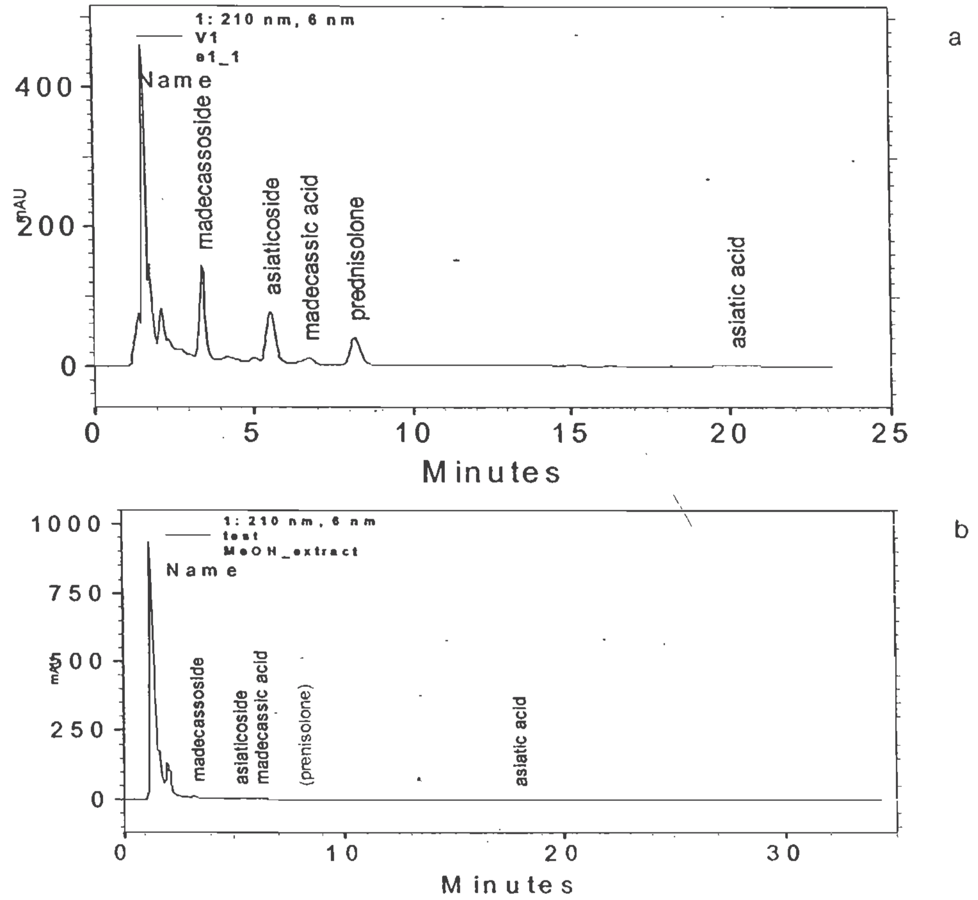
สิ่งเจือปนออกมาจากตัวอย่างได้ดีกว่าน้ำ และไม่ชะล้างสารที่สนใจออกมาจาก SPE cartridge

หลังจากนั้นหาตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับการชะสารที่ต้องการออกมาจาก SPE cartridge ซึ่งพบว่า 45% acetonitrile ใน phosphate buffer เป็นตัวทำละลายที่สามารถชะสารที่ต้องการออกมาจาก SPE cartridge ได้ดี (97-103% recovery) โดยในการชะสารแต่ละครั้ง ถ้าใช้ตัวทำละลายครั้งละ 1 ml จำนวน 3 ครั้ง จะให้ประสิทธิภาพในการชะดีกว่าการใช้ตัวทำละลาย 3 ml ในครั้งเดียว

รูปที่ 2.7 แสดง HPLC chromatogram ของสารสกัดเมื่อผ่าน SPE cartridge เทียบกับ HPLC chromatogram ของสารสกัดที่ไม่ได้ผ่าน SPE cartridge



รูปที่ 2.6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ใช้ในการสกัดด้วยการ reflux กับปริมาณสาร



รูปที่ 2.7 HPLC chromatogram ของสารสกัดที่ผ่าน SPE cartridge (a) และ ไม่ผ่าน SPE cartridge (b)

2.7 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สำหรับหาปริมาณ Asiaticoside, Madecassoside, Asiatic acid และ Madecassic acid โดย HPLC

2.7.1 เกณฑ์ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์

สารละลายผสมระหว่าง acetonitrile กับ phosphate buffer ถูกเลือกใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ เนื่องมาจากมีค่า UV cutoff ต่ำกว่า 200 nm ซึ่งไม่อยู่ในช่วง UV ที่ใช้ในการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณสาร

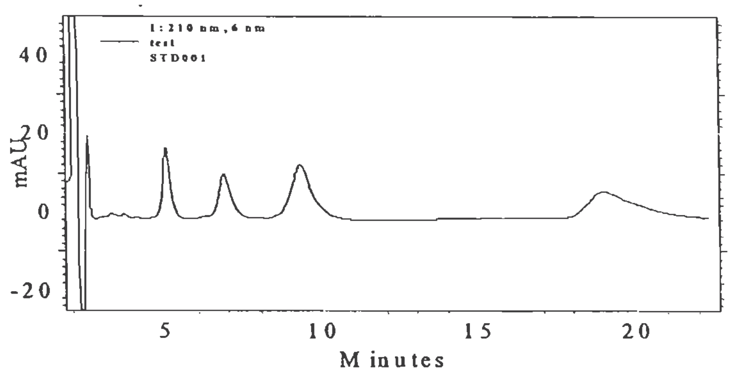
ในการแยกสารที่สนใจทั้ง 4 ตัว (MS, AS, MA และ AA) ออกจากกัน พบว่า ระบบที่เหมาะสมสำหรับการแยก คือ Reversed phase C-18 column โดยมีสารละลายผสมระหว่าง acetonitrile กับ 10 mM phosphate buffer ที่ pH 7.1 ในอัตราส่วน 29:71 เป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่ ซึ่งไหลในอัตราความเร็ว 1 ml ต่อนาที

ค่า resolution ซึ่งแสดงความสามารถในการแยกของแต่ละพีกสารที่สนใจ มีค่ามากกว่า 2 โดย resolution ของ MS, AS, MA, PL และ AA เท่ากับ 3.63, 5.59, 2.11, 3.86 และ 11.44 ตามลำดับ ในขณะที่ค่า tailing factor ของพีกสาร MS, AS, MA, PL และ AA เท่ากับ 1.39, 1.46, 1.32, 1.67 และ 1.13 ตามลำดับซึ่งมีค่าน้อยกว่า 2

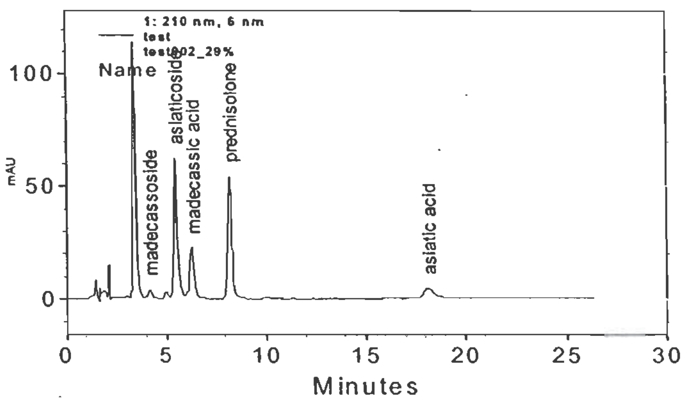
2.7.2 ผลของเฟสคงที่ (Effect of stationary phase)

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาในเฟสคงที่ 2 ชนิด คือ phenyl column และ C-18 column โดยสารละลายผสมระหว่าง acetonitrile กับ 10 mM phosphate buffer ที่ pH 6.21 ในอัตราส่วน 23:77 เป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่ที่เหมาะสมสำหรับการแยกใน phenyl column ดังแสดงในรูปที่ 2.8 และ สารละลายผสมระหว่าง acetonitrile กับ 10 mM phosphate buffer ที่ pH 7.1 ในอัตราส่วน 29:71 เป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่ที่เหมาะสมสำหรับการแยกใน C-18 column ดังแสดงในรูปที่ 2.9

C-18 column ถูกเลือกใช้ในการศึกษาต่อไป เนื่องมาจาก C-18 column เป็นที่นิยมใช้มากกว่าและมีความทนทานต่อการใช้งานมากกว่า phenyl column



รูปที่ 2.8 HPLC chromatogram ของสารมาตรฐานใน phenyl column



รูปที่ 2.9 HPLC chromatogram ของสารมาตรฐานใน C-18 column

2.7.3 ผลของอัตราส่วน acetonitrile ใน mobile phase

ในการศึกษาผลของอัตราส่วน acetonitrile ใน mobile phase กระทำโดยการเพิ่มอัตราส่วนของ acetonitrile จาก 28:72 เป็น 29:71 ซึ่งได้แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มขึ้นเพียง 1% acetonitrile มีผลอย่างมากต่อค่า retention time ของสารแต่ละตัว โดยค่า capacitity factor (k') ของ MA (ซึ่งเป็นสารที่มีขั้วมากกว่า AA) ลดลงมากกว่าค่า k' ของ AA ซึ่งถ้ามีการเพิ่มขึ้นของ % acetonitrile มากกว่า 29% จะทำให้พีกของ MA และ AS แยกออกจากกันได้ไม่ดี ดังแสดงในตารางที่ 2.6

จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า การควบคุมปริมาณของ acetonitrile ในเฟสเคลื่อนที่เป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง ถ้าปริมาณของ acetonitrile ในเฟสเคลื่อนที่น้อยเกินไปจะทำให้เสียเวลาในการวิเคราะห์นาน แต่ถ้ามีในปริมาณมากเกินไปจะทำให้พีกของ MA และ AS แยกออกจากกันได้ไม่ดี

2.7.4 ผลของความเข้มข้นและ พีเอชของบัฟเฟอร์ใน mobile phase

จากการเปลี่ยนแปลง pH ของบัฟเฟอร์จาก 7.0 เป็น 7.1 พบว่าการเปลี่ยนแปลง pH ของบัฟเฟอร์ มีผลต่อ k' ของ MA มากกว่า k' ของ AA ดังแสดงในตารางที่ 2.6 และจากการทดลองแสดงให้เห็นว่า pH ของบัฟเฟอร์มีผลต่อการแยกของสารค่อนข้างมาก pH ของบัฟเฟอร์ที่น้อยกว่า 7.0 จะทำให้เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์นานมากขึ้น ในขณะที่ pH ของบัฟเฟอร์มากกว่า 7.1 จะทำให้การแยกของพีก MA และ AS เกิดขึ้นได้ไม่ดี และยิ่ง pH ของบัฟเฟอร์เพิ่มขึ้นมากเท่าใด ก็จะทำให้ column เสียเร็วมากขึ้นเท่านั้น เนื่องมาจาก alkaline hydrolysis

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของบัฟเฟอร์จาก 10 mM เป็น 20 mM พบว่าความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ไม่มีผลต่อค่า retention time ของสารแต่ละตัวที่ทำการวิเคราะห์

ดังนั้นในการวิเคราะห์จึงเลือกบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 10 mM ที่ pH 7.1 ผสมอยู่กับ acetonitrile ในอัตราส่วน 71 : 29 เป็นเฟสเคลื่อนที่

ตารางที่ 2.6 แสดงผลของอัตราส่วนของ organic solvent และ pH ต่อค่า capacity factor (k')

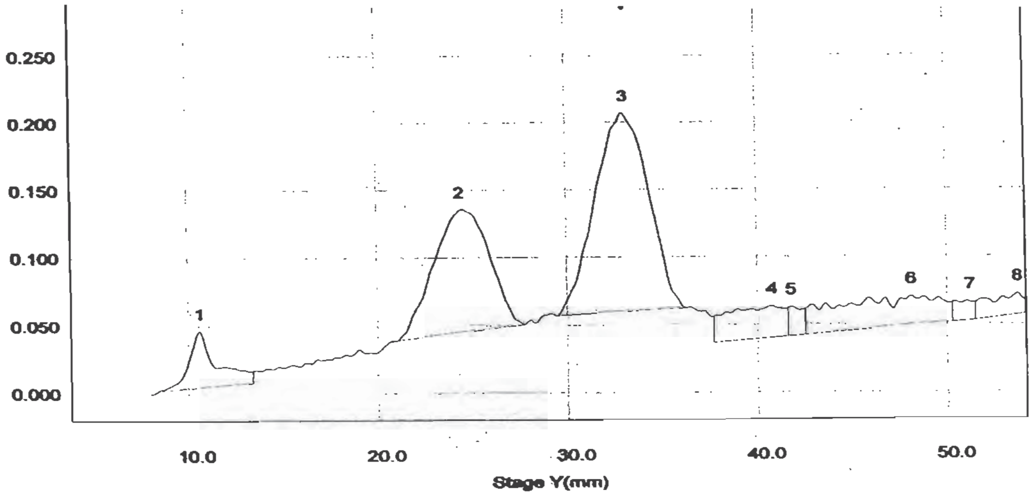
สารบัญ	อัตราส่วนของ organic solvent				ค่า pH			
	29% ACN		28% ACN		pH 7.1		pH 7.0	
	t_R	k'	t_R	k'	t_R	k'	t_R	k'
Madecassoside	3.4	1.3	3.4	1.3	3.4	1.3	4	1.7
Asiaticoside	5.4	2.6	5.4	2.6	5.4	2.6	6.8	3.5
Madecassic acid	6.3	3.2	6.3	3.2	6.3	3.2	7.5	4.0
Asiatic acid	18.2	11.1	18.2	11.1	18.2	11.1	22.0	13.7
Prednisolone	8.2	4.5	8.2	4.5	8.2	4.5	9.5	5.3

2.7.5 การหาสารมาตรฐานภายใน (internal standard)

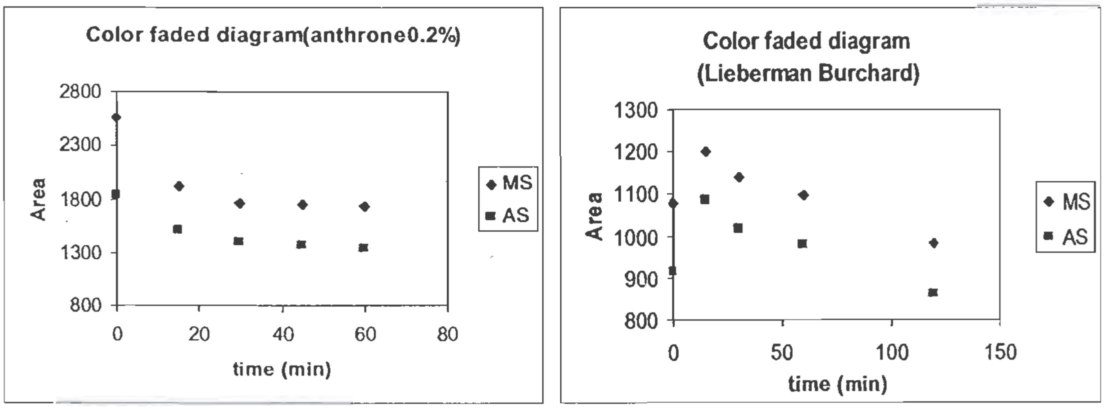
ในการศึกษาสารทั้ง 10 ชนิดเพื่อที่จะใช้เป็นสารมาตรฐานในการทดลองครั้งนี้พบว่า prednisolone เป็นสารที่เหมาะสมที่สุดในการทดลองครั้งนี้ เนื่องจากให้สัญญาณระหว่างพีกของ MA และ AA โดยไม่ถูกรบกวนโดยสารอื่นๆในตัวอย่าง

2.8 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สำหรับหาปริมาณ asiaticoside (AS) และ Madecassoside, Asiatic acid และ Madecassic acid โดย Thin-Layer Chromatography

TLC ร่วมกับ densitometer ถูกใช้ในการหาปริมาณ AS และ MS ในตัวอย่าง โดยใช้ chloroform-methanol-water ในอัตราส่วน 30:15:2 เป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่บน silica plate ดังแสดงรูป chromatogram ในรูปที่ 2.10 แล้วเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ 0.2% Anthrone reagent กับ Lieberman Burchard's reagent ในการเป็นสารตรวจวัด พบว่าความเข้มของสีอันเนื่องมากจาก 0.2% Anthrone reagent มีความคงตัวมากกว่าความเข้มของสีจาก Lieberman Burchard's reagent เมื่อทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาทีหลังจากอบที่ 110 °C เป็นเวลา 10 นาที ดังแสดงในรูปที่ 2.11



รูปที่ 2.10 TLC chromatogram ของสารสกัดแสดงพีกของ Madecassoside (2) และ Asiaticoside (3)



รูปที่ 2.11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ตั้งทิ้งไว้หลังการอบที่ 110 °C กับพื้นที่ใต้พีกของ 0.2% Anthrone reagent (a) และ Leibermann-Burchard (b)

2.9 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี High Performance Liquid Chromatography

2.9.1 การตรวจสอบความถูกต้อง (accuracy test)

ในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สามารถทำได้หลายวิธี เช่นการเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ที่ได้กับผลวิเคราะห์จากวิธีมาตรฐาน หรือเปรียบเทียบผลที่ได้จากการวิเคราะห์กับความเข้มข้นจริงที่มีอยู่ในตัวอย่างจาก synthetic formula แต่ในกรณีที่ไม่มี placebo ให้ทำโดยการเติมสารที่สนใจลงไปในตัวอย่าง ซึ่งเป็นวิธีที่ถูกเลือกใช้ในการศึกษานี้ เนื่องมาจากไม่มี placebo

ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สามารถทำการทดสอบได้โดยในรูปของ%recovery โดยการเติมสารที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงในตัวอย่าง แล้ววิเคราะห์หาปริมาณสารที่เติมลงไป โดยพบว่า %recovery ของ MS อยู่ในช่วง 99.12-102.3 (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 100.2), %recovery ของ AS อยู่ในช่วง 100.1-101.8 (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 100.6), %recovery ของ MA อยู่ในช่วง 98.97-100.2 (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 99.68), %recovery ของ AA อยู่ในช่วง 99.29-101.3 (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 100.1) ซึ่ง %recovery ของสารทั้งหมดอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้คือ 96.00-104.0 ดังนั้นวิธีวิเคราะห์จึงให้ความถูกต้องที่ยอมรับได้ ดังแสดงในตารางที่ 2.7

2.9.2 การตรวจสอบความแม่นยำ (precision test)

ในการตรวจสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์สามารถแสดงออกมาในรูปของความแปรผัน, ความเบี่ยงเบนสัมพัทธ์ หรือสัมประสิทธิ์ของความแปรผันของช่วงในการวิเคราะห์ ซึ่งได้พิจารณาใน 2 ระดับ คือ ความแม่นยำในช่วงเวลาเดียวกัน (repeatability) และความแม่นยำในระหว่างวัน (intermediate precision) ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ความแม่นยำในช่วงเวลาเดียวกัน (repeatability) คำนวณได้มาจากการเตรียมตัวอย่างซ้ำกัน 5 ครั้งในช่วงเวลาเดียวกัน พบว่าค่าความเบี่ยงเบนสัมพัทธ์ของ MS, AS, MA และ AA อยู่ในช่วง 0.38-1.79, 0.54-1.19, 1.41-2.04 และ 0.86-1.78 ตามลำดับ หรือมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.60, 1.21, 1.75 และ 1.51 ตามลำดับ

ความแม่นยำในระหว่างวัน (intermediate precision)คำนวณได้มาจากการเตรียมตัวอย่างซ้ำกัน 3 ครั้งในแต่ละวัน เป็นเวลา 3 วันพบว่าค่าความเบี่ยงเบนสัมพัทธ์ของ MS, AS, MA และ AA อยู่ในช่วง 0.68-1.42, 0.33-1.52, 0.80-1.81 และ 0.57-1.12 ตามลำดับ หรือมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.51, 1.35, 1.76 และ 1.50 ตามลำดับ

ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ทั้ง 2 แบบอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้คือ มีค่าความเบี่ยงเบนสัมพัทธ์น้อยกว่า 2.0

ตารางที่ 2.7 แสดงข้อมูลของการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดลองโดย HPLC

	Madecassoside	**Asiaticoside**	**Madecassic acid**	**Asiatic acid**
Accuracy (%RV)	100.16	100.64	99.68	100.14
Mean				
Range	97.15-102.79	97.72-100.96	97.12-102.78	97.64-102.97
Precision (%RSD)				
intra-day	1.60	1.21	1.75	1.51
inter-day	1.51	1.35	1.76	1.50
Range (mg/ml)	0.06-0.40	0.05-0.33	0.008-0.048	0.004-0.024
Linearity				
R^2	0.9997	1.000	0.9999	0.9999
Slope	1.011	1.010	0.9957	1.000
Intercept	-0.001	-0.005	2.00E-05	0
LOQ (µg/ml)	5.97	1.84	2.11	2.32

2.9.3 การหาความสัมพันธ์เส้นตรงและช่วงที่ให้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง (linearity and range)

ในการประเมินความสัมพันธ์เชิงเส้นดรงสามารถทำได้โดยการหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้กับความเข้มข้นจริงในด้วอย่าง ซึ่งได้เป็นสมการเส้นดรงดังนี้ y = 1.011x-0.0013 สำหรับ MS, y = 1.01x-0.005 สำหรับ AS, y = 0.9957x+2E-05 สำหรับ MA และ = x สำหรับ AA ดามลำดับ โดยสัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์ (coefficient of determination, r^2) ของตัวแปรทั้งสองของ MS, AS, MA และ AA เท่ากับ 0.9997, 1.000, 0.9999 และ 0.9999 ดามลำดับ

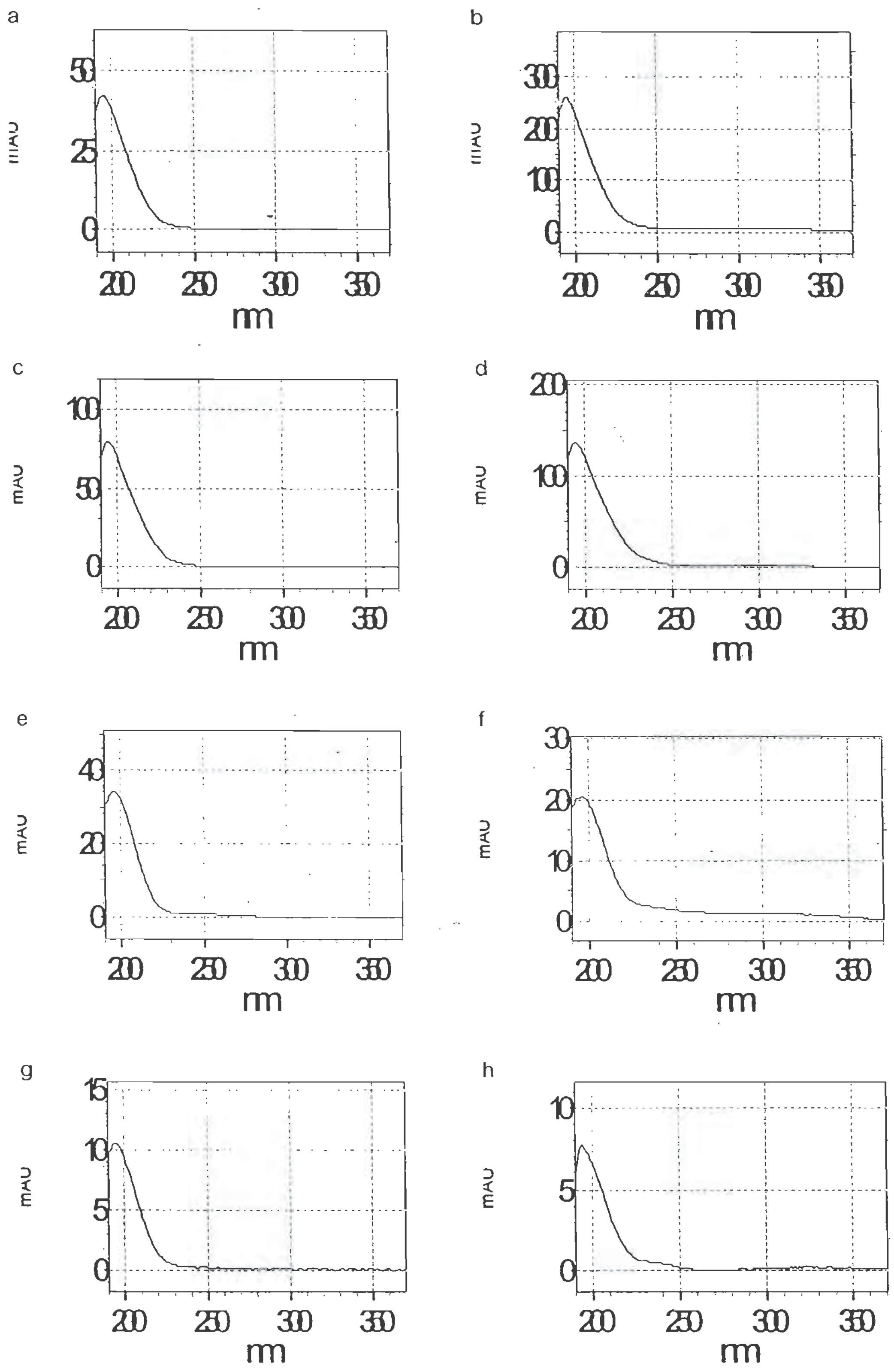
ช่วงความเข้มข้นของ MS, AS, MA และ AA ที่ให้ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับสัญญาณเป็นเส้นดรงมีความถูกต้องและแม่นยำในการวิเคราะห์อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ (96-104 % R และ %RSD □ 2) คือ 0.06-0.40, 0.05-0.33, 0.008-0.048 และ 0.004-0.024 mg/ml ดามลำดับ

2.9.4 การตรวจสอบความจำเพาะเจาะจง (specificity test)

เนื่องมาจากไม่มีแบลงค์ของตัวอย่าง ในการดรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์จึงทำโดยการเปรียบเทียบ spectrum ของสารมาดรฐานกับสารที่มีอยู่ในด้วอย่างโดยใช้ photo-diode array detector ซึ่งพบว่า spectrum ของพีกของสารที่มีอยู่ในด้วอย่างเหมือนกับสารมาดรฐานของมัน ดังแสดงในรูปที่ 2.12 และรูปที่ 2.13 แสดง 3D chromatogram ของสารละลายมาตรฐานและสารสกัด

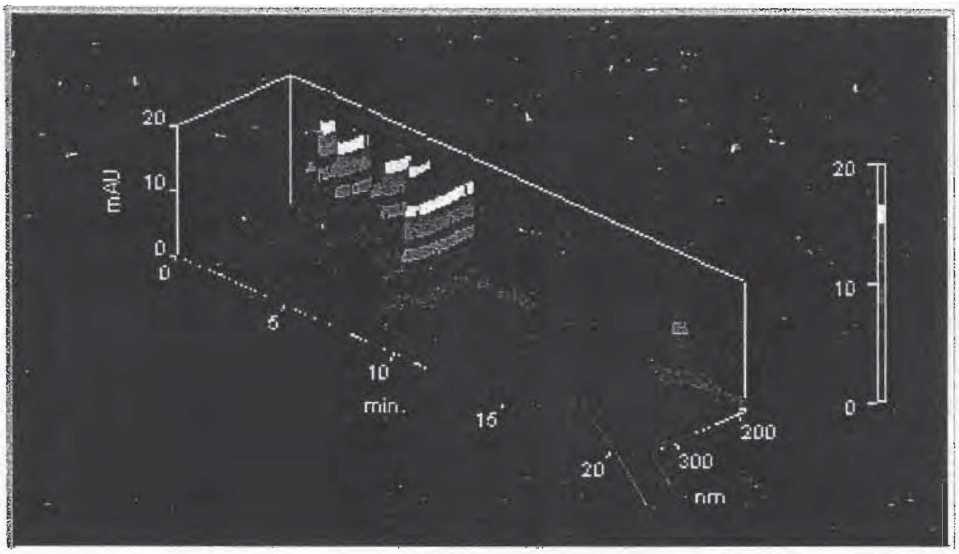
2.9.5 การหาปริมาณต่ำสุดในการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณสาร (quantitation limit)

ความเข้มข้นต่ำสุดในการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณสารของ MS, AS, MA และ AA คือ 5.97, 1.84, 2.11 และ 2.32 ไมโครกรัม / มิลลิลิดร ดามลำดับ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ให้สัญญาณของการดูดกลืนแสงมากกว่าสัญญาณรบกวนอย่างน้อย 10 เท่า และค่าความเบี่ยงเบนสัมพัทธ์ของการดรวจวัดจากการฉีดปริมาณสารซ้ำๆ กัน 5 ครั้งน้อยกว่า 3

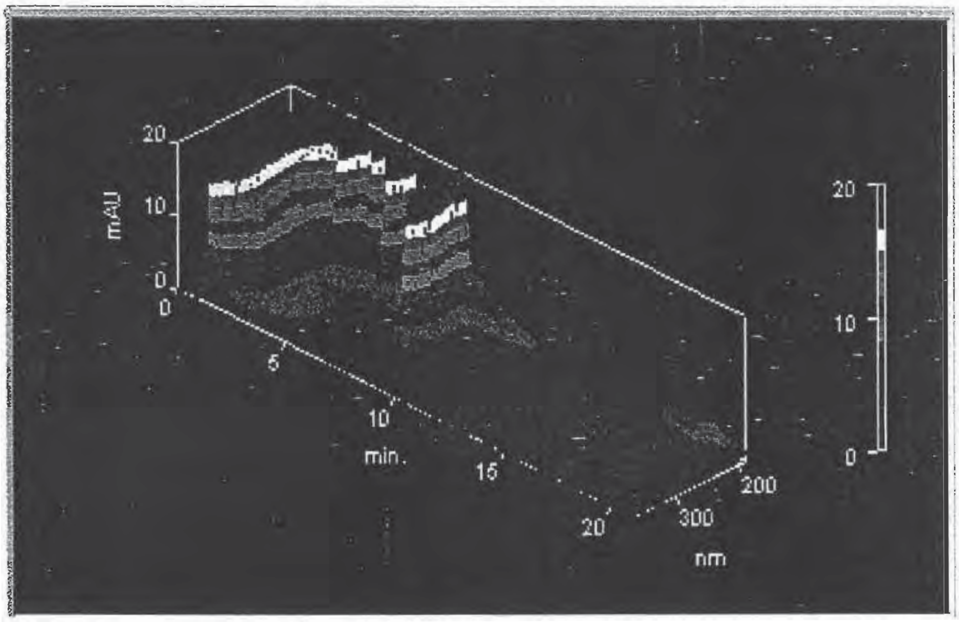


รูปที่ 2.12 UV spectrum ของสารมาตรฐาน Madecassoside (a), Asiaticoside (c), Madecassic acid (e), Asiatic acid (g) และสารที่แยกได้ Madecassoside (b), Asiaticoside (d), Madecassic acid (f), Asiatic acid (h)

a



b



รูปที่ 2.13 3D-spectrum จาก Photo Diode-Array Detector ของสารละลายมาตรฐาน (a) และสารสกัด (b)

2.9.6 การตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ (system suitability test)

ในการตรวจสอบความเหมาะสมของระบบสามารถพิจารณาได้โดยการตรวจสอบพารามิเตอร์ 4 ตัว คือ ความแม่นยำ (precision), number of theoretical plates (N), ความสมมาตรของพีก (tailing factor) และความสามารถในการแยกของพีก (resolution) ของสารมาตรฐานแต่ละตัว ดังแสดงในตารางที่ 2.8

ความแม่นยำของระบบในการฉีดสารซ้ำๆ กัน 5 ครั้ง พบว่ามีค่าความเบี่ยงเบนสัมพัทธ์ของ MS, AS, MA, PL และ AA เท่ากับ 0.89, 0.63, 1.75, 1.34 และ 0.87 ตามลำดับ ซึ่งค่าความเบี่ยงเบนสัมพัทธ์อยู่ในช่วงยอมรับได้คือน้อยกว่าหรือเท่ากับ 2.00

ค่าเฉลี่ยของ number of theoretical plates ของ MS, AS, MA, PL และ AA เท่ากับ 2026, 2717, 4445, 4434 และ 4750 ตามลำดับ ซึ่งค่า number of theoretical plates อยู่ในช่วงยอมรับได้คือ มากกว่าหรือเท่ากับ 2000

ความสมมาตรของพีก MS, AS, MA, PL และ AA เท่ากับ 1.39, 1.46, 1.32, 1.67 และ 1.13 ตามลำดับ ซึ่งค่าความสมมาตรของพีกอยู่ในช่วงยอมรับได้คือ น้อยกว่าหรือเท่ากับ 2.00

ความสามารถในการแยกของพีก MS, AS, MA, PL และ AA เท่ากับ 3.63, 5.59, 2.11, 3.86 และ 11.44 ตามลำดับ ซึ่งค่าความสามารถในการแยกของพีกอยู่ในช่วงยอมรับได้คือ มากกว่าหรือเท่ากับ 2.00

ตารางที่ 2.8 แสดงข้อมูลของการตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ

	Retention time (t_R)	**Precision (%RSD)**	**theoretical plates**	**Tailing Factor**	**Resolution (R_s)**
Madecassoside	3.4	0.89	2026	1.39	3.63
Asiaticoside	5.4	0.63	2717	1.46	5.58
Madecassic acid	6.3	1.75	4445	1.32	2.11
Prednisolone	8.2	1.34	4434	1.67	3.86
Asiatic acid	18.2	0.87	4750	1.13	11.24

2.10 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี thin layer chromatography

2.10.1 การตรวจสอบความถูกต้อง (accuracy test)

ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สามารถทำการทดสอบได้โดยในรูปของ%recovery โดยการเติมสารที่ปริมาณต่างๆ ลงในตัวอย่าง แล้ววิเคราะห์หาปริมาณสารที่เติมลงไป โดยพบว่า %recovery ของ MS อยู่ในช่วง 98.35-100.8 (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 99.81) และ %recovery ของ AS อยู่ในช่วง 96.19-101.3 (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 99.18) ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ของ %recovery คือ 96-104 ดังแสดงในตารางที่ 2.9

2.10.2 การตรวจสอบความแม่นยำ (precision test)

ความแม่นยำในช่วงเวลาเดียวกัน (repeatability) คำนวณได้มาจากการหยดสารซ้ำๆ กัน 5 จุดบน silica gel plate แผ่นเดียวกัน พบว่าค่าความเบี่ยงเบนสัมพัทธ์ของ MS และ AS อยู่ในช่วง 0.79-1.47 และ 0.70-1.43 หรือมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.07 และ 1.18 ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้คือ มีค่าความเบี่ยงเบนสัมพัทธ์น้อยกว่า 2.0 ดังแสดงในตารางที่ 2.8

2.10.3 การหาความสัมพันธ์เส้นตรงและช่วงที่ให้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง (linearity and range)

ในการประเมินความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงสามารถทำได้โดยการหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้กับความเข้มข้นจริงในตัวอย่าง ซึ่งได้เป็นสมการเส้นตรงดังนี้ $y = 0.9809x+0.1106$ สำหรับ MS และ $y = 0.9721x+0.0604$ สำหรับ AS โดยสัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์ (coefficient of determination, r^2) ของตัวแปรทั้งสองของ MS และ AS เท่ากับ 0.9995 และ 0.9997 ดังแสดงในตารางที่ 2.9

ช่วงความเข้มข้นของ MS และ AS ที่ให้ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับสัญญาณเป็นเส้นตรง มีความถูกต้องและแม่นยำในการวิเคราะห์อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ (96-104 %Rและ %RSD □ 2) คือ 1.08 - 21.60 และ 0.78 - 15.60 μg

ตารางที่ 2.9 แสดงข้อมูลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ด้วย TLC

	MS	AS
Accuracy		
%recovery	97.11-104.07 (99.81)	95.20-102.92 (99.18)
Precision		
%RSD	0.79-1.47 (1.07)	0.70-1.63(1.18)
Linearity and range		
Slope (A)	0.9809	0.9721
Intercept (B)	0.1106	0.0604
r^2	0.9995	0.9997
Range (mcg)	1.08-21.60	0.78-15.60

2.11 การวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณ Madecassoside, Asiaticoside, Madecassic acid และ Asiatic acid ในผงบัวบกโดยวิธี HPLC (รูปที่ 27)

MS ในแหล่งผลิต A จะพบปริมาณสารอยู่ในช่วง 0.313 – 1.664 % ของตัวอย่างแห้ง หรือมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 0.950 % โดยเดือนที่พบในปริมาณมากที่สุด คือ มิถุนายน และเดือนที่พบในปริมาณน้อยที่สุด คือ กุมภาพันธ์ ส่วนในแหล่งผลิต B จะพบปริมาณสารอยู่ในช่วง 0.149 – 1.941 % ของตัวอย่างแห้ง หรือมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 1.031 % โดยเดือนที่พบในปริมาณมากที่สุด คือ พฤษภาคม และเดือนที่พบในปริมาณน้อยที่สุดคือ กุมภาพันธ์

AS ในแหล่งผลิต A จะพบปริมาณสารอยู่ในช่วง 0.291 – 1.742 % ของตัวอย่างแห้ง หรือมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 0.889 % โดยเดือนที่พบในปริมาณมากที่สุด คือ พฤษภาคม และเดือนที่พบในปริมาณน้อยที่สุด คือ กุมภาพันธ์ ส่วนในแหล่งผลิต B จะพบปริมาณสารอยู่ในช่วง 0.140–1.341 % ของตัวอย่างแห้ง หรือมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 0.745 % โดยเดือนที่พบในปริมาณมากที่สุด คือ กรกฎาคม และเดือนที่พบในปริมาณน้อยที่สุดคือ กุมภาพันธ์

MA ในแหล่งผลิต A จะพบปริมาณสารอยู่ในช่วง 0.007– 0.411 % ของตัวอย่างแห้ง หรือมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 0.149 % โดยเดือนที่พบในปริมาณมากที่สุด คือ กุมภาพันธ์ และเดือนที่พบในปริมาณน้อยที่สุด คือ มกราคม ส่วนในแหล่งผลิต B จะพบปริมาณสารอยู่ในช่วง 0.005 – 0.260 % ของตัวอย่างแห้ง หรือมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 0.109 % โดยเดือนที่พบในปริมาณมากที่สุด คือ กุมภาพันธ์ และเดือนที่พบในปริมาณน้อยที่สุดคือ ธันวาคม

AA ในแหล่งผลิต A จะพบปริมาณสารอยู่ในช่วง 0.013 – 0.336 % ของตัวอย่างแห้ง หรือมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 0.115 % โดยเดือนที่พบในปริมาณมากที่สุด คือ

พฤศจิกายน และเดือนที่พบในปริมาณน้อยที่สุด คือ มกราคม ส่วนในแหล่งผลิต B จะพบปริมาณสารอยู่ในช่วง 0.014 – 0.164 mg % ของตัวอย่างแห้ง หรือมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 0.065 % โดยเดือนที่พบในปริมาณมากที่สุด คือ กุมภาพันธ์ และเดือนที่พบในปริมาณน้อยที่สุดคือ มกราคม

ในการหาปริมาณสารที่สนใจโดยเปรียบเทียบระหว่างในส่วนของใบและลำต้น พบว่า ในใบจะมีปริมาณสารทั้ง 4 ตัวมากกว่าในลำต้นประมาณ 7-24 เท่า โดยในใบพบปริมาณของ MS, AS, MA และ AA อยู่ในช่วง 0.919-1.552%, 0.712-1.006%, 0.027-0.309% และ 0.120-0.455% ตามลำดับ ส่วนในลำค้นพบปริมาณของ MS, AS, MA และ AA อยู่ในช่วง 0.029-0.062%, 0.069-0.098%, 0.007-0.010% และ 0.008-0.058% ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังได้มีการวิเคราะห์เพื่อดูความคงตัวของผงสกัดบัวบกซึ่งเก็บอยู่ในตู้ทดสอบความคงตัวที่ 50 °C และ75%RH เป็นเวลา 3 เดือน พบว่าปริมาณของ MS และ AS ในช่วงเวลาต่างๆไม่ค่อยมีความแตกต่างกัน คือ 42.61 $\pm$ 0.65 และ 46.71 $\pm$ 0.69 ซึ่งสามารถกำหนดอายุใช้งานชั่วคราวได้ 2 ปี ดังแสดงในตารางที่ 2.10

ตารางที่ 2.10 แสดงผลการทดสอบความคงตัวของผงสารสกัดที่ซึ่งเก็บอยู่ในตู้ทดสอบความคงตัวที่ 50 °C และ75% RH ในแต่ละเดือน

Months	%Content (Lot 1)		%Content (Lot 2)	
	MS	AS	MS	AS
0	42.27	46.82	42.75	47.78
1	43.09	45.98	42.88	47.56
2	43.21	47.61	38.90	43.85
3	41.86	46.41	42.13	47.29

2.12 การวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณ Madecassoside และ Asiaticosideในผงบัวบกโดยวิธี TLC

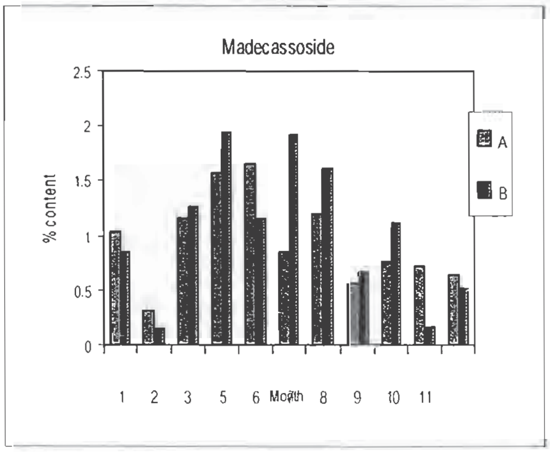
MS ในแหล่งผลิต A จะพบปริมาณสารอยู่ในช่วง 0.321 – 1.660% ของตัวอย่างแห้ง หรือมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 0.876 % โดยเดือนที่พบในปริมาณมากที่สุด คือ มิถุนายน และเดือนที่พบในปริมาณน้อยที่สุด คือ กุมภาพันธ์ ส่วนในแหล่งผลิต B จะพบปริมาณสารอยู่ในช่วง 0.258 – 1.678% ของตัวอย่างแห้ง หรือมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 0.759 % โดยเดือนที่พบในปริมาณมากที่สุด คือ พฤษภาคม และเดือนที่พบในปริมาณน้อยที่สุดคือ กุมภาพันธ์

AS ในแหล่งผลิต A จะพบปริมาณสารอยู่ในช่วง 0.241 – 1.541% ของตัวอย่างแห้ง หรือมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 0.965 % โดยเดือนที่พบในปริมาณมากที่สุด คือ

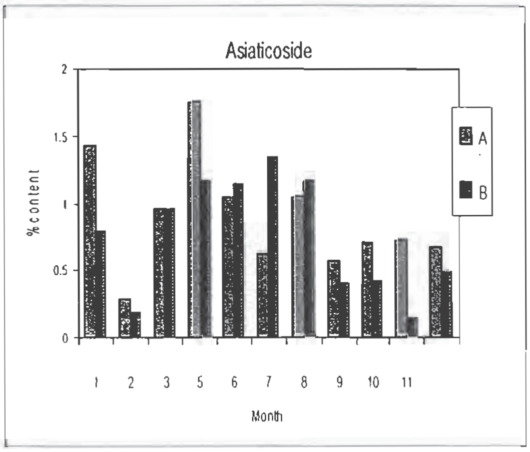
พฤษภาคม และเดือนที่พบในปริมาณน้อยที่สุด คือ กุมภาพันธ์ ส่วนในแหล่งผลิต B จะพบปริมาณสารอยู่ในช่วง 0.205 – 1.239% ของตัวอย่างแห้ง หรือมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 0.733 % โดยเดือนที่พบในปริมาณมากที่สุด คือ กรกฎาคม และเดือนที่พบในปริมาณน้อยที่สุดคือ กุมภาพันธ์ ดังแสดงในรูปที่ 28

โดยค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย TLC เมื่อเทียบกับผลที่ได้จาก HPLC แล้วพบว่าปริมาณสารที่พบทั้งสองวิธีมีความสอดคล้องกันมากกว่า 85% จากการหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างปริมาณที่ได้จากทั้ง 2 วิธี ดังนั้นวิธี TLC อาจใช้เป็นทางเลือกในการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณ MS และ AS ได้ แม้นวิธีนี้จะให้ความถูกต้องแม่นยำ และความไวน้อยกว่า HPLC แต่ก็เป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็วกว่า ดังแสดงในรูปที่ 2.16

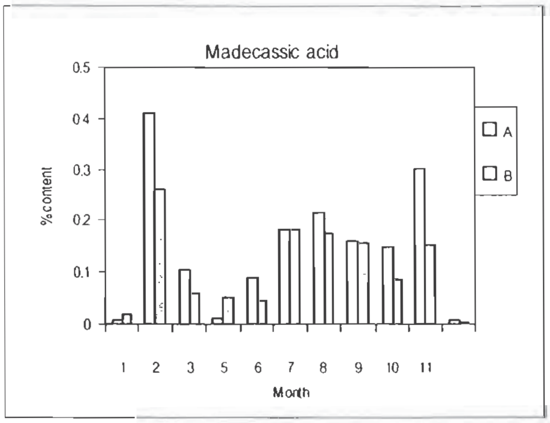
a



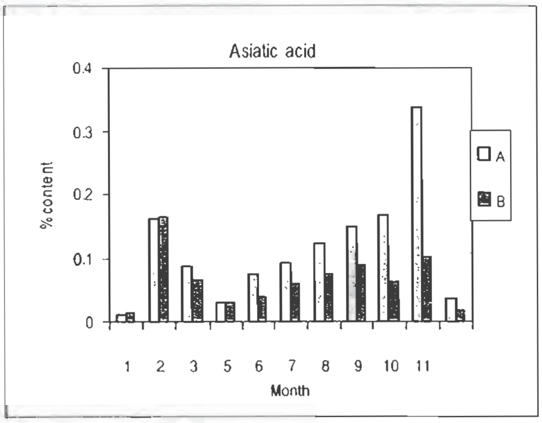
b



c

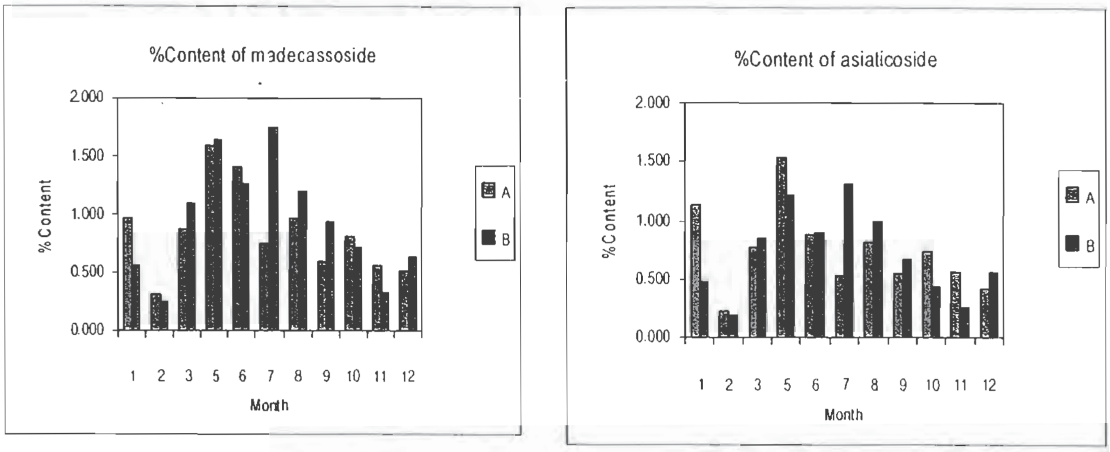


d

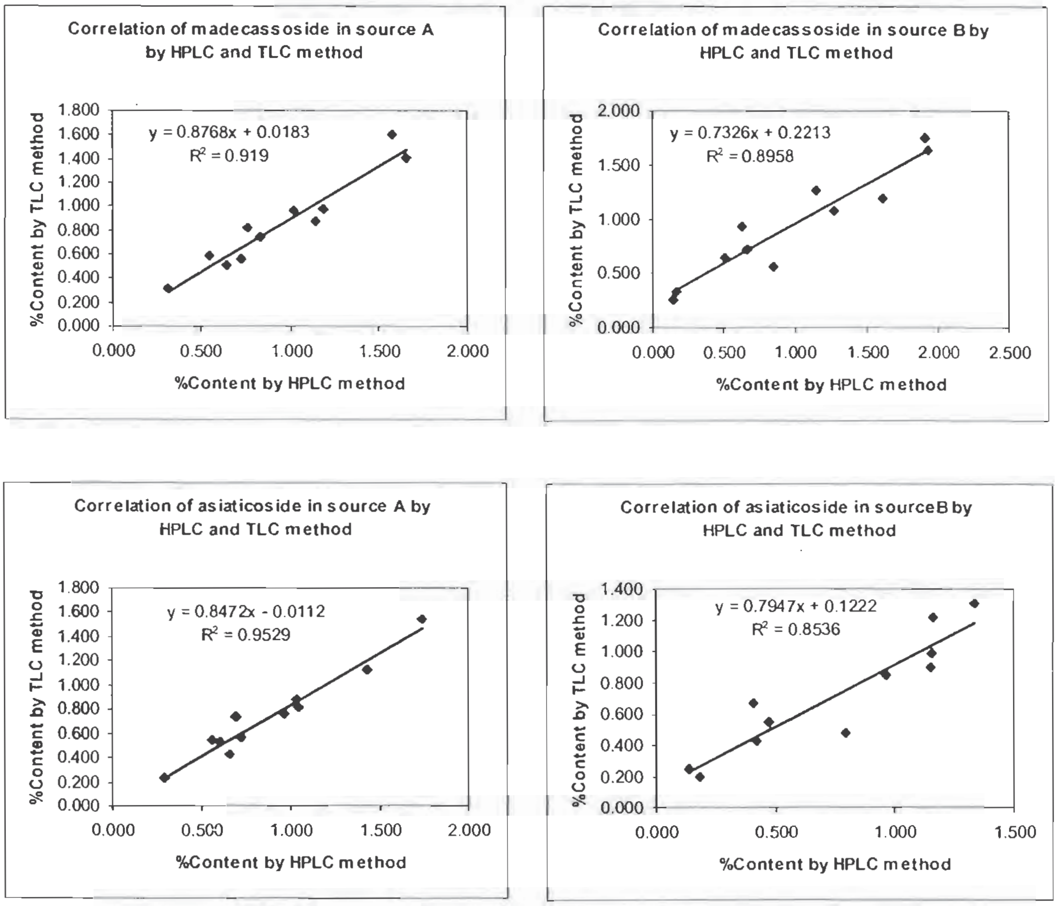


รูปที่ 2.14 กราฟแสดงปริมาณของสารในช่วงเวลาต่าง ๆภายใน 1 ปี โดยวิธี HPLC; Madecassoside (a), Asiaticoside (b), Madecassic acid (c) และ Asiatic acid (d)

a b



รูปที่ 2.15 กราฟแสดงปริมาณของสารสกัดในช่วงเวลาต่างๆ ภายใน 1 ปี โดยวิธี TLC; Madecassoside (a) และ Asiaticoside (b)



รูปที่ 2.16 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของผลวิเคราะห์ปริมาณสารสกัดในรอบปีด้วยวิธี HPLC และTLC

2.13 การหาสัดส่วนของ Madecassoside / Asiaticoside ที่พบในพืชต่างพันธุ์

ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสาร Madecassoside และ Asiaticoside ที่มีอยู่ในตัวอย่างพืชบัวบกที่เก็บจากแหล่งต่างๆใน 12 จังหวัด แต่นำมาปลูกที่แปลงปลูกของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และทำการเก็บเกี่ยวในเวลาที่ใกล้เคียงกัน พบว่าพืชแต่ละสายพันธุ์มีปริมาณสารในสัดส่วนและปริมาณที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.11

ได้ทำการคำนวณสัดส่วนของสาร Madecassoside / Asiaticoside ที่ตรวจพบในแต่ละสายพันธุ์ เพื่อใช้เป็นหลักเกณฑ์ในการกำหนดมาตรฐานสารสกัด เพื่อให้มีสัดส่วนสารทั้งสองชนิดให้ใกล้เคียงกับค่าเฉลี่ยที่คำนวณได้ซึ่งมีค่า 1.6532 ± 0.2953 % สัดส่วนที่พบตัวอย่างจากจังหวัดเชียงใหม่มีค่าสูงที่ 2.1571 และจากจังหวัดปราจีนบุรีมีค่าต่ำสุด 1.3045

เมื่อคำนวณร้อยละของปริมาณ glycoside รวมของตัวอย่างพืชบัวบกจาก 12 แหล่งมีค่าเฉลี่ย 6.7972 ± 1.6564 โดยตัวอย่างจากจังหวัดระยอง มีค่าสูงสุด 8.9349% และจากจังหวัดนครศรีธรรมราช (ตำบลบ่อล้อ) มีค่าต่ำสุด 3.4593%

เมื่อพิจารณาจากร้อยละของปริมาณ glycoside รวมที่มีค่ามากกว่า 7% เป็นตัวอย่างจากจังหวัดปราจีนบุรี ตราด ระยอง ชลบุรี พิษณุโลก และเชียงใหม่

เมื่อพิจารณาจากปริมาณ Madecassoside พบว่าตัวอย่างจากจังหวัดระยองมีค่าสูงสุด 5.4606% และจากจังหวัดนครศรธรรมราชมีค่าต่ำสุด 1.9882% ในขณะที่ตัวอย่างจากจังหวัดระยองมี Asiaticoside สูงสุด 3.4743% และจากจังหวัดนครศรีธรรมราชมีค่าต่ำสุด 1.4711%

2.14 การหาศึกษาเปรียบเทียบปริมาณสารในใบและก้านใบของพืชตัวอย่าง

ได้ศึกษาเปรียบเทียบปริมาณของสาร glycoside ในใบและก้านใบจากพืชตัวอย่าง 2 แหล่งโดยเก็บตัวอย่างในเดือนกันยายน และ ธันวาคมดังแสดงใน ตาราง 2.12 และพบว่าปริมาณ Madecassoside ในใบมีมากกว่าในก้านใบถึงมากกว่า 20 เท่า ในขณะที่ปริมาณ Asiaticoside ในใบมากกว่าในก้านใน 9 – 12 เท่า

ตารางที่ 2.11 แสดงค่าสัดส่วนของ Madecassoside / Asiaticoside พบจากพืช 12 แหล่ง

รหัสแหล่ง	**%MS ที่พบ**	**%AS ที่พบ**	**สัดส่วน MS/AS**	**% glycoside รวม**
CA1	4.3704	3.3503	1.3045	7.7207
CA2	1.9882	1.4711	1.3515	3.4593
CA3	3.3936	2.4666	1.3758	5.8602
CA4	4.7837	3.3201	1.4408	8.1038
CA5	3.2624	2.2324	1.4614	5.4948
CA6	5.4606	3.4743	1.5717	8.9349
CA7	5.4111	3.2861	1.6467	8.6972
CA8	4.1064	2.4864	1.6515	6.5928
CA9	3.8881	2.1378	1.8187	6.0259
CA10	3.3516	1.7289	1.9386	5.0805
CA11	5.4766	2.5832	2.1201	8.0598
CA12	5.1493	2.3871	2.1571	7.5364
		ค่าเฉลี่ย =	**1.6532**	**6.7972**
		SD =	**0.2953**	**1.6564**
		ค่าสูงสุด =	2.1571	8.9349
		ค่าต่ำสุด =	1.3045	3.4593

ตารางที่ 2.12 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณสารในใบและก้านใบของพืชบัวบก

แหล่งเก็บ	เดือนที่เก็บ	ปริมาณร้อยละ			
		MS		AS	
		ใบ	ก้านใบ	.ใบ	ก้านใบ
B	กันยายน	1.553	0.039	1.028	0.073
		1.578	0.039	1.013	0.070
		1.524	0.038	0.977	0.073
	ค่าเฉลี่ย	1.552	0.039	1.006	0.072
	%RSD	1.742	1.493	2.605	2.406
	ธันวาคม	0.936	0.050	0.725	0.066
		0.911	0.050	0.701	0.068
		0.943	0.054	0.710	0.073
	ค่าเฉลี่ย	**0.930**	**0.051**	**0.712**	**0.069**
	%RSD	1.809	4.499	1.703	5.225
ปริมาณเฉลี่ย		**1.241**	**0.045**	**0.859**	**0.071**
สัดส่วนในใบต่อก้านใบ		27.58		12.10	
A	กันยายน	0.987	0.028	0.826	0.076
		1.040	0.029	0.874	0.078
		0.984	0.029	0.805	0.076
	ค่าเฉลี่ย	1.004	0.029	0.835	0.077
	%RSD	3.139	2.014	4.236	1.506
	ธันวาคม	0.936	0.061	0.759	0.095
		0.893	0.066	0.700	0.104
		0.929	0.060	0.715	0.094
	ค่าเฉลี่ย	**0.919**	**0.062**	**0.725**	**0.098**
	%RSD	2.510	5.157	4.232	5.639
ปริมาณเฉลี่ย		**0.962**	**0.046**	**0.780**	**0.087**
สัดส่วนในใบต่อก้านใบ		**20.91**		**8.97**	

2.15 การศึกษาเปรียบเทียบผลของอายุใบต่อปริมาณสารสำคัญ

ได้ศึกษาเปรียบเทียบอายุใบ (เมื่อเก็บตัวอย่างในวันที่ใบมีอายุ 7, 14, 20 และ 28 วัน) ต่อปริมาณสารสำคัญ โดยเก็บจากตัวอย่างพืชจากจังหวัดอุบลราชธานี. นครศรีธรรมราช และระยอง ดังแสดงในตารางที่ 2.13 พบว่าใบจะให้สาระสำคัญมาก เมื่อมีอายุใบตั้งแต่ 20 วันขึ้นไป

ตารางที่ 2.13 แสดงผลของอายุใบต่อปริมาณสารสำคัญของพืชบัวบก

วันที่เก็บตัวอย่าง	% ปริมาณสาร (ตัวอย่างจากอุบลราชธานี)			
	MS	AS	MA	AA
7	2.1445 ± 0.11	2.7326 ± 0.26	0.3199 ± 0.00	0.2409 ± 0.02
14	3.0099 ± 0.04	4.0360 ± 0.03	0.1613 ± 0.01	0.1373 ± 0.01
20	3.8926 ± 0.10	4.6553 ± 0.19	0.3287 ± 0.01	0.2100 ± 0.03
28	3.5607 ± 0.08	4.3198 ± 0.04	0.3232 ± 0.01	0.1633 ± 0.01

วันที่เก็บตัวอย่าง	% ปริมาณสาร (ตัวอย่างจากนครศรีธรรมราช)			
	MS	AS	MA	AA
7	3.6355 ± 0.05	3.5067 ± 0.03	0.2114 ± 0.02	0.1434 ± 0.00
14	4.2949 ± 0.12	3.6557 ± 0.06	0.3838 ± 0.01	0.1886 ± 0.01
20	4.1360 ± 0.02	3.3998 ± 0.02	0.4440 ± 0.01	0.1791 ± 0.02
28	4.8266 ± 0.16	3.8487 ± 0.11	0.3968 ± 0.01	0.1948 ± 0.04

วันที่เก็บตัวอย่าง	% ปริมาณสาร (ตัวอย่างจากระยอง)			
	MS	AS	MA	AA
7	3.2329 ± 0.25	3.2516 ± 0.12	0.1201 ± 0.01	0.1073 ± 0.01
14	2.9441 ± 0.10	3.0259 ± 0.06	0.2102 ± 0.02	0.1182 ± 0.04
20	3.0346 ± 0.22	3.2422 ± 0.19	0.2617 ± 0.05	0.1330 ± 0.03
28	3.1628 ± 0.08	3.5097 ± 0.08	0.2487 ± 0.03	0.1445 ± 0.07

2.16 การศึกษาเปรียบเทียบผลของปริมาณแสงแดดต่อปริมาณสารสำคัญ

ในการศึกษาถึงผลของแสงแดดต่อการปริมาณสารสำคัญที่พืชบัวบกสร้าง พบว่า การปลูกพืชโดยไม่บังแสงแดด (แสง 100%) พืชให้สารสำคัญมากที่สุดเมื่อเทียบกับการลด

แสงเหลือ 50% และ 20% ดังแสดงในตารางที่ 2.14

ตาราง 2.14 แสดงผลของปริมาณแสงแดดต่อการผลิตสารสำคัญของพืชบัวบก

พืชจากจังหวัด / ปริมาณแสง	**%MS**	**%AS**	**%MA**	**%AA**
ระยอง แสง 20%	1.2190	1.2094	0.4088	0.2602
ระยอง แสง 50%	1.0795	1.2611	0.7721	0.7358
ระยอง แสง 100%	2.8162	2.8061	0.4471	0.2956
นครศรีฯ แสง 20%	1.7118	1.8347	0.6565	0.3438
นครศรีฯ แสง 50%	2.0468	2.7709	0.5813	0.3407
นครศรีฯ แสง100%	2.7315	2.3619	0.5055	0.1541
อุบลฯ แสง 20%	1.6339	2.0374	0.5479	0.3439
อุบลฯ แสง 50%	2.2680	2.8150	0.4353	0.1722
อุบลฯ แสง 100%	3.3034	3.5085	0.4279	0.1263

บทที่ 4
สรุปผลการวิจัย

การตรวจสอบคุณลักษณะของพืชสมุนไพรบัวบก

สามารถตรวจสอบได้โดย

1.การตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเภสัชเวทโดยใช้วิธีทางมหทรรศ์และจุลทรรศ์สำหรับพืชสดและผงพืชแห้ง

2. การตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมี (Chemical Test) โดยใช้ การทดสอบ Saponin (โดยวัดความสูงของฟองที่เกิดเมื่อเขย่าผงพืชในน้ำ), การทดสอบ Liebermann-Burchard (เกิดวงแหวนสีน้ำตาล), และ การทดสอบ Tannin (เกิดตะกอนเขียว) นอกจากนี้ใช้วิธี TLC เพื่อยืนยันโดยดูจุดบนแผ่น TLC ที่พ่นด้วยสารละลาย Liebermann-Burchard หรือ ดูภายใต้แสง UV

3. สารมาตรฐาน Madecassoside, Asiaticoside, Madecassic acid และ Asiatic acid มีค่า Rf ในระบบ TLC ค่า 0.74, 0.88, 0.91 และ 0.98 ตามลำดับ

4. การตรวจสอบคุณลักษณะทางกายภาพ ดังหัวข้อต่อไปนี้เหมาะสม

4.1 ปริมาณสารปลอมปน (% Foreign Matter) เกณฑ์ไม่เกิน 2%

4.2 ปริมาณน้ำหนักที่หายเมื่อทำให้แห้ง (% Loss on Drying) เกณฑ์ไม่เกิน 14%

4.3 ปริมาณเถ้ารวม (% Total Ash) เกณฑ์ไม่เกิน 17%

4.4 ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายกรด (% Acid Insoluble Ash) เกณฑ์ไม่เกิน 7%

4.5 ปริมาณความชื้น (%Moisture Content) เกณฑ์ไม่เกิน 10%

4.6 ปริมาณสารสกัดที่ละลายน้ำ (Water Soluble Extract) เกณฑ์ไม่น้อยกว่า 15%

4.7 ปริมาณสารสกัดที่ละลายเอทานอล (Ethanol Soluble Extract) เกณฑ์ไม่น้อยกว่า 24%

4.8 ปริมาณตะกั่ว (Lead Content) เกณฑ์ไม่เกิน 10 ppm

4.9 ปริมาณเหล็ก (Iron Content) เกณฑ์ไม่เกิน 100 ppm

การศึกษาข้อมูลพื้นฐานที่มีผลต่อคุณลักษณะสารสกัดบัวบก

1. ได้เตรียมสารมาตรฐานใช้งาน Madecassoside และ Asiaticoside โดยใช้เทคนิค column chromatography และ การตกผลึกซ้ำ สารมีความบริสุทธิ์ 95.55% และ 101.3% ตามลำดับ

2. ได้เตรียมสารมาตรฐานใช้งาน Madecassic acid และ Asiatic acid โดยการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสในด่างของสาร glycoside และทำการตกผลึกซ้ำ สารที่ได้มีความบริสุทธิ์ 98.98% และ 98.09% ตามลำดับ
3. ได้พิสูจน์เอกลักษณ์สารมาตรฐานใช้งานที่เตรียมได้โดยใช้เทคนิค IR, ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR และยืนยันซ้ำด้วยวิธี HPLC และ TLC โดยสอบเทียบกับสารมาตรฐานปฐมภูมิ
4. ได้พัฒนาวิธีทำตัวอย่างสารสกัดบัวบกให้สะอาดโดยใช้เทคนิค SPE โดยชะสิ่งปนเปื้อนด้วย 10% Acetonitrile และชะสารที่ต้องการวิเคราะห์ด้วย 45% Acetonitrile
5. ได้พัฒนาวิธี HPLC สำหรับการวิเคราะห์สาร Madecassoside, Asiaticoside, Madecassic acid และ Asiatic acid ในครั้งเดียวกันโดยใช้ column C18 ใช้สารละลายผสมระหว่าง acetonitrile กับ 10 mM phosphate buffer ที่ pH 7.1 ในอัตราส่วน 29:71 เป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่ ซึ่งไหลในอัตราความเร็ว 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดปริมาณปริมาณสารด้วย UV 210 nm. ค่า t_R 3.4, 5.4 6.3, 18.2 นาที โดยใช้ prednisolone เป็นสารมาตรฐานภายใน ด้วยค่า t_R 8.2 นาที
6. ได้ทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี HPLC
   6.1 หัวข้อ accuracy ในรูป % recovery ของ Madecassoside, Asiaticoside, Madecassic acid, Asiatic acid มีค่า 100.2, 100.6, 99.68 และ 100.1 ตามลำดับ
   6.2 หัวข้อ repeatability แสดงด้วยค่า SD ของ Madecassoside, Asiaticoside, Madecassic acid, Asiatic acid มีค่าเฉลี่ย 1.60, 1.21, 1.75 และ 1.51 ตามลำดับ
   6.3 หัวข้อ intermediate precision แสดงด้วยค่า SD ของ Madecassoside, Asiaticoside, Madecassic acid, Asiatic acid มีค่าเฉลี่ย 1.51, 1.35, 1.76 และ 1.50 ตามลำดับ
   6.4 หัวข้อความสัมพันธ์เส้นตรงและช่วงที่ให้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง (Linearity, Range) ของ Madecassoside, Asiaticoside, Madecassic acid, Asiatic acid ได้ค่าสัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์ (coefficient of determination, r^2) เท่ากับ 0.9997, 1.000, 0.9999 และ 0.9999 ตามลำดับ และมีช่วงความเข้มข้นที่ 0.06-0.40, 0.05-0.33, 0.008-0.048 และ 0.004-0.024 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ
   6.5 หัวข้อปริมาณต่ำสุดในการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณสาร (quantitation limit) ของ Madecassoside, Asiaticoside, Madecassic acid, Asiatic acid มีค่า 5.97, 1.84, 2.11 และ 2.32 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

6.6 ได้ตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ (system suitability test) ในหัวข้อความแม่นยำ (precision) ได้ค่า 0.89, 0.63, 1.75, 1.34 และ 0.87 ตามลำดับ number of theoretical plates (N) มีค่า 2026, 2717, 4445, 4434 และ 4750 ตามลำดับ ความสมมาตรของพีก (tailing factor) 1.39, 1.46, 1.32, 1.67 และ 1.13 ตามลำดับและ ความสามารถในการแยกของพีก (resolution) ของสารมาตรฐานแต่ละตัว 3.63, 5.59, 2.11, 3.86 และ 11.44 ตามลำดับ

7. ได้พัฒนาวิธี TLC-Densitometry สำหรับการวิเคราะห์สาร Madecassoside, Asiaticoside โดยใช้ chloroform-methanol-water ในอัตราส่วน 30:15:2 เป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่ และใช้แผ่น silica gel plate เป็น stationary phase และพ่นด้วย 0.2% Anthrone เพื่อให้เกิดสีที่ตรวจวัดด้วยเครื่อง Densitometer

8. ได้ทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี TLC

    8.1 หัวข้อ accuracy ในรูป %recovery ของ Madecassoside, Asiaticoside ค่าเฉลี่ย 99.81 และ 99.18 ตามลำดับ

    8.2 หัวข้อ repeatability แสดงด้วยค่า SD ของ Madecassoside, Asiaticoside เท่ากับ 1.07 และ 1.18 ตามลำดับ

    8.3 หัวข้อความสัมพันธ์เส้นตรงและช่วงที่ให้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง (Linearity, Range) ของ Madecassoside, Asiaticoside, ได้ค่าสัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์ (coefficient of determination, r^2) เท่ากับ 0.9995 และ 0.9997 ที่ช่วงความเข้มข้น 1.08 - 21.60 และ 0.78 - 15.60 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

9. ได้วิเคราะห์หาปริมาณสาร Madecassoside, Asiaticoside, Madecassic acid และ Asiatic acid จากตัวอย่างบัวบกที่เก็บจาก 12 แหล่ง แล้วนำมาปลูกในแปลงเดียวกัน พบว่ามีสารในปริมาณที่แตกต่างกันดังนี้

    9.1 glycoside รวมมีค่าระหว่าง 3.46% – 8.93% มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 6.80% $\pm$ 1.66%

    9.2 glycoside มีปริมาณมากกว่า aglycone

    9.3 ตัวอย่างที่มีปริมาณ glycoside รวม มากกว่า 7% พบในตัวอย่างมาจากจังหวัดปราจีนบุรี ตราด ระยอง ชลบุรี พิษณุโลก และเชียงใหม่ ในขณะที่ตัวอย่างจากนครศรีธรรมราช มีปริมาณ glycoside รวมเพียง 3.46%

    9.4 โดยทั่วไป Madecassoside มีมากกว่า Asiaticoside

    9.5 พบสัดส่วน Madecassoside ต่อ Asiaticoside มีค่าระหว่าง 1.30 – 2.15 และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.65 $\pm$ 0.30

    9.6 ในใบมีปริมาณ glycoside มากกว่าในก้านใบ

9.7 พบ glycoside มากเมื่ออายุใบมากกว่า 20 วันขึ้นไป

9.8 ในรอบปี พบปริมาณ glycoside สูงในช่วงเดือน มีนาคม – กันยายน และมีปริมาณต่ำสุดเดือนกุมภาพันธ์

9.9 ในการปลูกที่มีแสงแดดมากให้สาร glycoside มากกว่าเมื่อลดความเข้มของแสงแดดลง

10 ได้ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ Madecassoide และ Asiaticoside ในสารสกัดจากโครงการวิจัยที่ 1 ได้ผลดังนี้

10.1 สารสกัดมีสีขาว ถึงขาวปนเหลืองอ่อน

10.2 มีปริมาณ glycoside รวม ไม่น้อยกว่า 80%

10.3 เมื่อทดสอบความคงตัวในสภาวะเร่งที่ 50 องศาเซลเซียส 75%RH สารสกัดมีอายุความคงตัวมากกว่า 2 ปี

10.4 สารสกัดที่เตรียมได้มีลักษณะทางกายภาพที่ดี เหมาะสมกับการเตรียมผลิตภัณฑ์ยา หรือ เครื่องสำอาง

11 ข้อเสนอแนะสำหรับการกำหนดคุณลักษณะของสารสกัดจำเป็นต้องทำ process validation ก่อนในระดับการผลิตที่ใหญ่ขึ้น และควรกำหนดให้มีสารสำคัญ glycoside ในสัดส่วนที่ใกล้เคียงกับสัดส่วนที่มีตามธรรมชาติ

12 ข้อมูลพื้นฐานที่ได้จากการศึกษาเป็นประโยชน์ในการกำหนดคุณลักษณะของพืชบัวบกและ/หรือสารสกัดโดยหน่วยงานรัฐหรือผู้ผลิตสารสกัด

บรรณานุกรม

1. Aziz, Z.A., Davey,M.R., Power,J.B., Smith,R.M. and Lowe,K.C. Production of Asiaticoside and Madecassoside in *Centella asiatica in vitro* and *in vivo*. Biologia Plantarum 51(1) (2007): 34-42
2. Bradwein J., Zhou Y., Koszycki D. and Shlik J., A Double-Blind Placebo Controlled Study on the Effect of Gotu Kola (Centella asiatica) on Acoustic Startle Response in Healthy Subjecys. J. Clin. Psychopharmacol. 20(6) (2000) 680-684
3. British Pharmacopoeia, Bournemmouth: Megaron Press, 2002
4. Dunstan C.A., Noreen Y., Serrano G., Cox P.A., Perera P. and Bohlin L., Evaluation of Samoan and Peruvian Medicinal Plants by Prostaglandin Biosynthesis and Rat Ear Oedema Assays. J. Ethnopharmacol 57 (1997):35-56
5. Inamdar, P.K., Yeole, R.D., Ghogare, A.B. and De Souza, N.J., Determination of Biologically Active Constituents in *Centella asiatica*, J. Chromatogr. A 742 (1996): 127 -130
6. Schaneberg, B.T., Mikell, J.R., Bedir, E. and Khan,I.A., An Improved HPLC Method for Quantitative Determination of Six Triterpenes in Centella asiatica extracts and Comercial Products., Pharmazie, 58 (2003):381
7. Schieffer,G.W., Use of Solid-Phase Extraction for Improving HPKC Assays of Triterpene Glycosides in Gotu Kola (*Centella asiatica*), Parthenolide in Feverfew (*Tanacetum parthenium*) and Valerenic acids in Valerian (*Valeriana officinalis*). Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies 28(2005): 581-592.
8. Shukla A., Rasik A.M., Dhawan B.N., Asiaticoside-Induced Elevation of Antioxidant Levels in Healing Wounds. Phytotherapy Research 13(1) (1999):50
9. Standard of Herbal Medicine, volume 1, Jakata, Indonsia, Asian Country, 1993
10. Thai Herbal Pharmacopoeia, volume 1, Bangkok, Prachachon Co.Ltd, 1995
11. Thai Herbal Pharmacopoeia, volume 2, Bangkok, Prachachon Co.Ltd, 1995

Appendix I

Oral Presentation I

The 20th Federation Asian Pharmaceutical Association Congress, Bangkok, November 30- December 3, 2004

A SIMULTANEOUS DETERMINATION OF MADECASSOSIDE, ASIATICOSIDE, MADECASSIC ACID AND ASIATIC ACID IN *CENTELLA ASIATICA* LINN. BY RP-HPLC METHOD

Chamnan Patarapanich*, Bungorn Kongthong and Suwanna Laungchonlatan

Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

Centella asiatica Linn. (CA), a well known medicinal herb, has been widely used for chronic venous insufficiency, varicose vein, wound healing and memory impairment patients. The plant contains several natural compounds including the triterpenoid glycosides, madecassoside (MS), asiaticoside (AS) and their aglycones, madecassic acid (MA) and asiatic acid (AA) which are considered to be the active principles of CA.

A HPLC method was developed to determine MS, AS, MA and AA simultaneously. The system comprises of a Hi-Q sil column (C18, 4.6x150 mm, 5 micron) as stationary phase, a 29:71 mixture of acetonitrile : phosphate buffer (10mM, pH 7.1) as mobile phase (flow rate 1.0 ml/min), prednisolone (PL) as an internal standard with a photodiode array detector at wavelength 210 nm. The retention time were found at 3.4 (MS), 5.4 (AS), 6.3 (MA), 8.2 (PL) and 18.2 min. (AA) respectively. Each analyte samples from CA extract were cleaned up by using the solid phase extraction techniques prior to injection to the system.

The system was validated and found to conform to all the ICH guideline's criteria. Linearity (r^2) and range (mg/ml) of the standard curve for each standard compounds were found to be 0.9997 and (0.06-0.40) (MS); 1.000 and (0.05-0.33) (AS); 0.9999 and (0.008-0.048) (MA) and 0.9999 and (0.004-0.024) (AA). The accuracy measured as % recovery were found to be 100.16 (MS), 100.64 (AS), 99.68 (MA) and 100.14 (AA). The intra-day and inter-day precisions measured as %RSD were found to be 1.60, 1.51 (MS); 1.21, 1.35 (AS); 1.75, 1.76 (MA) and 1.51, 1.50 (AA) respectively.

The system is applicable for quantitative analysis of MS, AS, MA and AA in CA extract.

Appendix II

Poster Presentation I

The 21st Annual Conferences in Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok, December 23-24, 2004.

A TLC Method Determination of Active Constituents, Madecassoside and Asiaticoside from *Centella asiatica*, Linn. in various seasons in Thailand

Suwanna Laungchonlatan*, Bungon Kongthong and Chamnan Patarapanich

Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

The quantitative determination of two triterpenoid glycosides, Madecassoside (MS) and Asiaticoside (AS) from the extract of Centella asiatica, Linn. (CA) has been studied by using thin layer chromatography (TLC) technique. The TLC condition was as following, stationary phase (TLC plate: silicagel 60 F254, 10 X 20 cm.), developing solvent mixture of chloroform : methanol : water (30 :15 :2), spray reagent (0.2% anthrone in 10% sulfuric acid in ethanol), temperature (110 °C. for 10 min.), scanning with a densiometer detected at wavelength 525 nm. The Rh value was found to be 0.24 (MS) and 0.29 (AS) respectively.

The method validation was performed base on the USP criteria. The accuracy measured as percentage recovery were found to be 99.81 (MS) and 99.18 (AS), the precision measured as %RSD were found to be 1.07 (MS) and 1.18 (AS). The Linearity (r^2) of the standard curve for MS was 0.9995 by the linear equation of $y = 0.9809x + 0.1106$ in the range of 1.08 – 21.60 mcg. while for AS was 0.9997 by the linear equation of $y = 0.9721x + 0.0604$ in the range of 0.78 – 15.60 mcg.

The TLC method was applied to determine the content of MS and AS in CA, collected every months in one year cycle from two locations (I and II) in Nakornpatom province, the results were as following: The average %w/w content in eleven months of MS in location I and II were 0.827 ± 0.353 and 0.869±0.401, while the results of AS in location I and II were 0.712± 0.275 and 0.663 ± 0.299 respectively. The content of MS and AS from CA in two locations showed no significant difference ($p<0.05$).

The highest MS content was found at 1.660 ± 0.352 % w/w (I) in June and 1.678 ± 0.183 % w/w (II) in May, while the lowest MS content found at 0.321 ± 0.039 %w/w (I) and 0.258 ± 0.024 %w/w (II) in the same month of February. The highest AS content was found at 1.052 ± 0.234 % w/w (I) in June and 1.221 ±0.098 % w/w (II) in May, while the lowest AS content found at 0.241 ± 0.028 %w/w (I) and 0.205 ± 0.031 %w/w (II) in the same month of February. Conclusively, the highest content of MS and AS in CA was found in May to June, and the lowest in February.

Appendix III

Poster Presentation II

The 21st Annual Conferences in Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok, December 23-24, 2004

A HPLC Method for Determination of Asiaticoside, Madecassoside, Asiatic Acid and Madecassic Acid in the Extract of *Centella asiatica* Linn.: Development, Validation and Application

Chamnan Patarapanich*, Bungorn Kongthong and Suwanna Laungchonlatan

Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

The triterpene, Asiaticoside (AS), Madecassoside (MS), Asiatic Acid (AA) and Madecassic Acid (MA) have been isolated from the well known medicinal plant, *Centella asiatica* Linn. (CA). The plant's main pharmacological action, wound healing and memory enhancing effect are believed to relate to these triterpene compounds. We are interested in developing an isocratic HPLC method which can simultaneously determine these four compounds present in its natural extract or its finished products.

The developed method comprise of a Hi-Q Sil column (C_{18}, 4.6x150 mm, 5 micron) as stationary phase, a 29:71 mixture of acetonitrile : phosphate buffer (10mM, pH 7.1) as mobile phase (isocratic elution with flow rate 1.0 ml/min), prednisolone (PL) as an internal standard and with a photodiode array detector at wavelength 210 nm. The retention time were found at 3.4 (MS), 5.4 (AS), 6.3 (MA), 8.2 (PL) and 18.2 min. (AA) respectively. Each analyte sample from CA extract was cleaned up by using the solid phase extraction technique prior to apply to the system in order to improve satisfactory percentage recovery parameter.

The system was validated and found to conform to all the ICH guideline's criteria. Linearity (r^2) and range (mg/ml) of the standard curve for each standard compound was found to be 0.9997 and 0.06-0.40 (MS); 1.000 and 0.05-0.33 (AS); 0.9999 and 0.008-0.048 (MA) and 0.9999 and 0.004-0.024 (AA). The accuracy measured as % recovery were found to be 100.16 (MS), 100.64 (AS), 99.68 (MA) and 100.14 (AA). The intra-day and inter-day precisions measured as % RSD were found to be 1.60, 1.51 (MS); 1.21, 1.35 (AS); 1.75, 1.76 (MA) and 1.51, 1.50 (AA) respectively.

Application of the developed system to analyze four triterpene compounds in the plant samples which collected from different time period during one year cycle were also performed with satisfaction. The content of compounds in the leaf and stem of the plant were also determined and compared. It was found that leaf contains much more triterpene than in stem.

Appendix IV

Poster Presentation III

The 23rd Annual Conference in Pharmaceutical Sciences & JSPS 1st Medicinal Chemistry Seminar of Asia/Africa Science Platform Program, Bangkok, December 14-15, 2006.

CONTENT OF ASIATICOSIDE, MADECASSOSIDE, ASIATIC ACID AND MADECASSIC ACID IN *CENTELLA ASIATICA* (L.) URBAN COLLECTED FROM VARIOUS LOCATIONS IN THAILAND

Pathom Somwong[1], Bungon Kongthong[2], Suwanna Laungchonlatan[1] and Chamnan Patarapanich[1]

[1]Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalonkorn University, Bangkok 10330, Thailand
[2]SGS (Thailand) Limited, Bangkok 10120, Thailand

Centella asiatica (L.) Urban (CA) grows under a wide range of climatic conditions and has a widespread distribution all over Thailand. In this study, 13 accessions of CA, collected from different geographical locations of Thailand were evaluated for percentage content of four principle triterpenes (asiaticoside, madecassoside, asiatic acid and madecassic acid). The fresh collecting plant was dried, ground and extracted using methanol : water (8:2, v/v). Chemical analysis was performed to quantify the content of triterpenes using isocratic HPLC with an Altech Alltima column (C18, 4.6x150 mm, 5 µm) as stationary phase, a mixture of acetonitrile : 10mM phosphate buffer pH 7.1 (29:71) as mobile phase (flow rate 1 ml/min), a photodiode array at wavelength 210 nm as detector. All assessions of CA exhibited chemical variations in percentage content of each triterpene. The maximum contents were obtained as followed: asiaticoside 3.47% w/w (Rayong province), madecassoside 5.48% w/w (Phisanulok province), Asiatic acid 0.39% w/w (Trat province), and madecassic acid 0.91% w/w (Chiangmai province). Furthermore, a comparative study of triterpene content profile in CA, collected monthly from a commercial crop in Nakornpathom province during the year 2003 and 2006 were also evaluated. Similar maximum content of both glycosides was observed from sample collected in May, however, percentage variation in aglycone content was also noted. Information obtained may utilized as criteria for plant variety selection and commercial cultivars of high triterpenes content for further isolation of pure triterpenes.

Appendix V

Poster Presentation IV

The 24th Annual Conferences in Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok, December 12, 2007.

A COMPARATIVE STUDY OF THREE EXTRACTION TECHNIQUES FOR THE BIOACTIVE PRINCIPLES FROM *CENTELLA ASIATICA* (L.) URBAN

Pathom Somwong[1], Suwanna Laungchonlatan[2] and Chamnan Patarapanich[2]

[1]Faculty of Pharmacy, Rangsit University, Patumthani 12000, Thailand
[2]Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

---

Three extraction methods, heat-refluxing extraction (HRE), ultrasonic-assisted extraction (UAE) and microwave-assisted extraction (MAE) were comparatively studied and the content of asiaticoside (AS), madecassoside (MS), asiatic acid (AA) and madecassic acid (MA) from the aerial part of *Centella asiatica* (L.) URBAN (CA) were analyzed. The extraction solvent used was a mixture of 80% methanolic aqueous solution while the temperature of medium was controlled at 70°C during the extractive operation. The filtrate of each extracts was subjected to the high performance liquid chromatography (HPLC) analysis which results show that higher percentage content of AS, MS, AA and MA from CA sample and shorter extraction time were noted in sample from UAE and MAE techniques than from the conventional HRE method. Maximum percentage content of AS (2.93%, w/w) and MS (3.34%, w/w) were obtained by MAE and UAE techniques, respectively. In addition, UAE and MAE was also required only within 3 minutes operation whereas the HRE technique was required more than 60 minutes to reach the exhausted extraction with the highest percentage content of AS, MS, AA and MA. The present results confirm that extraction efficiency and considerable time saving by UAE and MAE were more competent than the conventional HRE technique.