



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง การเปรียบเทียบทางพฤกษเคมี และการหาปริมาณสารสำคัญในไฟล

สายพันธุ์ต่างๆ ในประเทศไทย

โดย ดร.ประสาน ตั้งยืนยงวัฒนา

15 มิถุนายน 2555

สัญญาเลขที่ MRG5380015

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง การเปรียบเทียบทางพฤกษเคมี และการหาปริมาณสารสำคัญในไฟลสาย
พันธุ์ต่างๆ ในประเทศไทย

คณะผู้วิจัย

ดร.ประสาน ตั้งยืนยงวัฒนา สาขาพืชไทยพัฒนา คณะการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต

สนับสนุนโดยทบวงมหาวิทยาลัย และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย ทบวงฯ และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

ชื่อโครงการ การเปรียบเทียบทางพฤกษเคมี และการหาปริมาณสารสำคัญในไพลสายพันธุ์ต่างๆ ใน
ประเทศไทย

คณะผู้ทำการวิจัย ดร.ประสาน ตั้งยืนยงวัฒนา

หน่วยงานที่สังกัด สาขาพืชไทยพัฒนา คณะการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต

บทคัดย่อ

ไพล (*Zingiber cassumunar* Roxb.) จัดเป็นหนึ่งในสมุนไพรที่ใช้ในการรักษาโรคตามหลักการการแพทย์แผนไทย และได้รับการบรรจุอยู่ในบัญชียาหลักแห่งชาติประเภทยาสมุนไพร ไพลเป็นส่วนประกอบในตำรับยาสมุนไพรหลายตำรับ โดยเฉพาะตำรับด้านการต้านการอักเสบของกล้ามเนื้อกระดูก และยังใช้ในโรคโลหิตสตรีที่ไม่ปกติ เช่น ตำรับยาประสะไพล ไพลเป็นสมุนไพรที่มีการศึกษาองค์ประกอบสารเคมีและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอย่างกว้างขวาง อย่างไรก็ตามยังคงมีไพลอีกหลายสายพันธุ์ที่พบได้ในแต่ละภูมิภาค มีความแตกต่างทางด้านรูปร่างของใบ ดอก และ ลำต้นใต้ดิน โดย รศ.ดร. วิเชียร กิรตินิจกาล แห่งภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตร มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ ได้ทำการวิจัยความหลากหลายทางพันธุกรรมของไพลในประเทศไทย พบว่ามีความแตกต่างมากกว่า 30 สายพันธุ์ และสามารถแบ่งเป็นกลุ่มได้ 4 กลุ่ม ซึ่งผู้วิจัยมีความสนใจในสารสำคัญในไพลแต่ละกลุ่มโดยจะนำมาศึกษาปริมาณสารสำคัญ เช่น (*E*)-4-(3',4'-dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol (compound D), (*E*)-1-(3',4'-dimethoxy-phenyl)butadiene (DMPBD), และ curcumin โดยไพลกลุ่มที่ 1 มีค่าเฉลี่ยของปริมาณสาร compound D, DMPBD และ curcumin เท่ากับ 0.64 ± 0.23 , 0.21 ± 0.11 และ 0.12 ± 0.03 %W/W ตามลำดับ ไพลกลุ่มที่ 2 มีค่าเฉลี่ยของปริมาณสาร compound D, DMPBD และ curcumin เท่ากับ 0.81 ± 0.22 , 0.33 ± 0.17 และ 0.09 ± 0.02 %W/W ตามลำดับ ไพลกลุ่มที่ 3 มีค่าเฉลี่ยของปริมาณสาร compound D, DMPBD และ curcumin เท่ากับ 0.25 ± 0.06 , 0.31 ± 0.12 และ 0.20 ± 0.10 %W/W ตามลำดับ ไพลกลุ่มที่ 4 มีค่าเฉลี่ยของปริมาณสาร compound D, DMPBD และ curcumin เท่ากับ 0.92 ± 0.14 , 0.34 ± 0.12 และ 0.20 ± 0.03 %W/W ตามลำดับ จากผลทาง TLC fingerprints พบว่าไม่มีความ

แตกต่างกันในลักษณะ pattern มากนักในไฟลแต่ละกลุ่ม แต่จะแตกต่างกันด้านปริมาณเป็นหลัก จากผลการศึกษาปริมาณสารสำคัญพบว่าไฟลกลุ่มที่ 1 สายพันธุ์หมายเลข 90 และ 110 เป็นไฟลที่มีปริมาณของสาร compound D และ DMPBD สูงกว่าสายพันธุ์อื่นในกลุ่ม ส่วนไฟลกลุ่มที่ 2 ทุกตัวอย่างยกเว้นหมายเลข 89 มีปริมาณ compound D สูง โดยเฉพาะหมายเลข 43 และ 48 มีปริมาณของสาร compound D, DMPBD และ curcumin สูง ไฟลกลุ่มที่ 3 พบว่าทุกตัวอย่างจะมีปริมาณ compound D ต่ำกว่าไฟลกลุ่มอื่น ๆ แต่พบปริมาณ DMPBD มีปริมาณที่ใกล้เคียงไฟลกลุ่มที่ 1 และ 2 ยกเว้นหมายเลข 39 และ 111 ไฟลกลุ่มที่ 4 ทุกตัวอย่าง มีปริมาณ compound D, DMPBD และ curcumin สูง โดยหมายเลข 115 มีปริมาณสารทั้งสามชนิดสูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบระหว่างไฟลกลุ่มที่ 1, 2, 3 และกลุ่มที่ 4 พบว่า กลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มที่มีปริมาณสารสำคัญส่วนใหญ่สูงกว่ากลุ่มอื่น โดยเฉพาะสาร compound D มีปริมาณสูงโดยเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 3 โดยสรุปไฟลหมายเลข 20, 27, 36, 40, 43, 48, 90, 103, 110 และ 115 เป็นพันธุ์ไฟลที่น่าสนใจ เพราะมีปริมาณสารสำคัญสูง

Abstract

Plai or *Zingiber cassumunar* Roxb. is a well-known and widely used herb in Thailand especially in Thai traditional medicine. *Z. cassumunar* is included in the Thai traditional common house hold drug list. *Z. cassumunar* has also been mixed in various traditional formulations especially in the anti-inflammatory of muscle and bone formulations. This herb is also used for dysmenorrheal in Prasaplai formulation. *Z. cassumunar* has been widely studied in the chemical compositions and pharmacological activities. However, there are various varieties of *Z. cassumunar* found in many parts of Thailand which have some degree of diversity in leave, flower and rhizome. Assoc.Prof.Vichien Keeratinijakal who works at Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University reports the genetic relationship among *Z. cassumunar* in Thailand. This report shows that there are more than 30 varieties of *Z. cassumunar* and they can be divided into 4 groups. We are interesting in determination of the major active compounds in each group. The active compounds compose of (*E*)-4-(3',4'-dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol (compound D), (*E*)-1-(3',4'-dimethoxy-phenyl)butadiene (DMPBD) and curcumin. For the group 1, the average amount of compound D, DMPBD and curcumin were 0.64 ± 0.23 , 0.21 ± 0.11 and 0.12 ± 0.03 %W/W, respectively. For the group 2, the average amount of compound D, DMPBD and curcumin were 0.81 ± 0.22 , 0.33 ± 0.17 and 0.09 ± 0.02 %W/W, respectively. For the group 3, the average amount of compound D, DMPBD and curcumin were 0.25 ± 0.06 , 0.31 ± 0.12 and 0.20 ± 0.10 %W/W, respectively. For the group 4, the average amount of compound D, DMPBD and curcumin were 0.92 ± 0.14 , 0.34 ± 0.12 and 0.20 ± 0.03 %W/W, respectively. For the TLC fingerprint results, there were not much different in chromatogram pattern among the groups of *Z. cassumunar*. The major different was the amount of each active compound in some groups. After evaluation the analysis results, we found that sample number 90 and 110 from group 1 showed the high amount of compound D and DMPBD. In group 2, sample number 43 and 48 showed the high amount of

compound D, DMPBD and curcumin. For group 3, all sample had low amount of compound D when compared to other groups but the amount of compound D were closed to group 1 and 2, except sample number 39 and 111. Group 4, all sample showed the high amount of compound D, DMPBD and curcumin especially number 115. When the amounts of active compounds among the groups were compared, group 2 and 4 showed the higher amount of active compounds than other groups especially compound D. In conclusion, sample number 20, 27, 36, 40, 43, 48, 90, 103, 110 and 115 are the interesting varieties which have a high amount of active ingredients.

Executive Summary

การเปรียบเทียบทางพฤกษเคมี และการหาปริมาณสารสำคัญในไพล สายพันธุ์ต่างๆในประเทศไทย

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ประเทศไทยมีการศึกษาและพัฒนาจากพืชสมุนไพรหลากหลายชนิด หนึ่งในจำนวนพืชดังกล่าวได้แก่ไพล (*Zingiber cassumunar* Roxb.) ไพลเป็นสมุนไพรที่มีการศึกษาองค์ประกอบสารเคมีและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอย่างกว้างขวาง ไพลและตำรับยาประสระไพลได้รับการบรรจุอยู่ในบัญชียาหลักแห่งชาติ ซึ่งมีความสำคัญต่อการใช้ไพลในการรักษาอาการโรคโดยเฉพาะโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ อย่างไรก็ตามยังคงมีไพลอีกหลายสายพันธุ์ที่พบได้ในแต่ละภูมิภาค มีความแตกต่างทางด้านรูปร่างของใบ ดอก และ ลำต้นใต้ดิน โดย รศ.ดร.วิเชียร กิรตินิจกาล แห่งภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ได้ทำการวิจัยความหลากหลายทางพันธุกรรมของไพลในประเทศไทย พบว่ามีความแตกต่างมากกว่า 30 สายพันธุ์ และสามารถแบ่งเป็นกลุ่มได้ 4 กลุ่ม ซึ่งผู้วิจัยมีความสนใจในสารสำคัญในไพลแต่ละกลุ่มโดยจะนำมาศึกษาปริมาณสารสำคัญเปรียบเทียบกับไพลพันธุ์พื้นเมือง ซึ่งเป็นไพลที่ใช้ในการทำยาแผนโบราณในปัจจุบัน ข้อมูลทางด้านลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ได้รับการดำเนินการโดย รศ.ดร.วิเชียร กิรตินิจกาล ใกล้เสร็จสิ้นโครงการแล้ว แต่ยังคงขาดข้อมูลทางด้านพฤกษเคมี ซึ่งจะช่วยให้ทราบว่าไพลสายพันธุ์ใดที่ให้สารสำคัญเช่น (*E*)-4-(3',4'-dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol (compound D), (*E*)-1-(3',4'-dimethoxy-phenyl)butadiene (DMPBD), *cis*-3-(2',4',5'-trimethoxyphenyl)-4-[(*E*)-2'',4'',5''-trimethoxystyryl]-cyclohex-1-ene, และ curcumin ในปริมาณเท่าใด สารเหล่านี้เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ด้านการอักเสบ (anti-inflammation) ของไพล เนื่องจากไพลได้รับการผลักดันและสนับสนุนจากหลายหน่วยงานของรัฐให้เป็นพืชสมุนไพรหลัก แต่ยังคงขาดข้อมูลของพันธุ์ไพลที่ดีที่สุดที่จะให้สารสำคัญในปริมาณสูง งานวิจัยนี้จะให้ข้อมูลสำคัญที่จะมีผลต่อการใช้ไพลเป็นยารักษา

การปลูกไพลของเกษตรกร และเป็นการลดการนำเข้ายาแผนปัจจุบันที่ใช้รักษาอาการอักเสบ ซึ่งจะช่วยให้ชาติประหยัดเงินได้มาก

2. วัตถุประสงค์

2.1. ศึกษาปริมาณสารสำคัญในสารสกัด methanol ของไพลทั้ง 30 ชนิด โดยเทคนิค High

Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)

2.2. เปรียบเทียบ chromatographic fingerprint ของสารสกัดไพลแต่ละชนิด เพื่อดูสารที่

แตกต่างจากไพลพื้นเมือง จากนั้นทำการแยกสกัดสารดังกล่าวและหาสูตรโครงสร้างโดยวิธีทางสเปกโตรสโคปี

3. ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 เก็บตัวอย่างไพลทั้ง 30 ชนิดจากสถานทดลองปลูก ไร่สุวรรณ อำเภอปากช่อง จังหวัด

นครราชสีมา ซึ่งอยู่ภายใต้การดูแลของ รศ.ดร.วิเชียร กิริณินิจกุล

3.2 นำตัวอย่างแต่ละชนิดมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ และอบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 60

องศาเซนเซียส จากนั้นนำมาบดเป็นผงละเอียดและเก็บไว้เพื่อรอการสกัด

3.3 นำตัวอย่างผงยาจำนวน 1.5 กรัม ใส่ลงใน flask ขนาด 50 มล. แล้วเติม methanol จำนวน 25

มล. แล้วปิดฝา จากนั้นทำการสกัดด้วยวิธี sonication เป็นเวลา 15 นาที ถ่ายสารละลายเก็บ

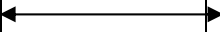
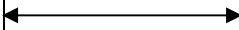
ใน flask พร้อมทั้งเติมตัวทำละลายจำนวนเท่าเดิม ทำการสกัดในลักษณะเดิมจนกระทั่งไม่พบสารสำคัญในตัวทำละลาย ติดตามผลการสกัดโดยใช้ Thin Layer Chromatography

(TLC) พงยาแต่ละตัวอย่างจะทำซ้ำ 3 ครั้ง ($n = 3$)

3.4 นำสารสกัดที่ได้แต่ละตัวอย่างมาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPTLC โดยแต่ละตัวอย่างจะนำมา spot ลงบน precoated silica gel 60 F₂₅₄ HPTLC plate จำนวน 3 แถว (triplicate). จากนั้น TLC plate จะถูกนำมาแช่ในตัวทำละลายของ dichloromethane : methanol (98 : 2) ใน CAMAG twin trough chamber โดยระยะทางที่ตัวทำละลายจะซาร์จะเท่ากับ 8 ซม. หลังจากเสร็จสิ้นการแยก TLC plate จะถูกทิ้งให้แห้งในอากาศ และนำไป scanned ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร โดยใช้ absorbance reflectance mode ของเครื่อง CAMAG Scanner. โดยที่ calibration curves ของ marker ทั้ง 4 ชนิด ซึ่งได้แก่ (*E*)-4-(3',4'-dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol (compound D), (*E*)-1-(3',4'-dimethoxy-phenyl)butadiene (DMPBD), cis-3-(2',4',5'-trimethoxyphenyl)-4-[(*E*)-2'',4'',5''-trimethoxystyryl]-cyclohex-1-ene, และ curcumin ได้รับการเตรียมโดย plot peak area กับ ความเข้มข้นของ marker แต่ละชนิดและทำการ validate วิธีวิเคราะห์ไว้แล้ว Chromatographic fingerprint ของสารสกัดแต่ละชนิดจะถูกบันทึกไว้พร้อมคำนวณปริมาณสารสำคัญ โดยเปรียบเทียบกับ markers ที่เตรียมไว้ข้างต้น

3.5 ทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบ chromatographic fingerprint ของสารสกัดโพลแต่ละชนิด แยกจัดเป็นกลุ่มพร้อมทั้งเลือกสารสกัดที่มี spot ที่แตกต่างจากโพลพื้นเมือง มาทำการแยกสกัดและหาสูตรโครงสร้างทางเคมีโดยวิธีทางสเปกโตรสโคปี

4. แผนการดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการในแต่ละช่วง 6 เดือน

	ปี 2553-2554		ปี 2554-2555	
กิจกรรม	พ.ค. – ต.ค.	พ.ย. – เม.ย.	พ.ค. – ต.ค.	พ.ย. – เม.ย.
1. เก็บตัวอย่างไพล 30 สายพันธุ์ พร้อมนำมาทำให้แห้งและบด				
	Output: ได้ผงยาตัวอย่างของ 30 สายพันธุ์			
2. ทำการสกัดจนหมดจด (exhaust extraction) ด้วย methanol โดยวิธี sonication				
	Output: ได้สารสกัดทั้ง 30 สายพันธุ์	Output: ได้ chromatographic fingerprints ของแต่ละสายพันธุ์ พร้อมปริมาณสารสำคัญ	Output: ได้ chromatographic fingerprints ของแต่ละสายพันธุ์ พร้อมปริมาณสารสำคัญครบทุกตัวอย่าง	
3. ทำการสกัดแยกสารมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ด้วย HPTLC				
		Output: ได้สารมาตรฐานและวิธีวิเคราะห์ HPTLC ที่ validation แล้ว		
4. ศึกษาสายพันธุ์ที่มี spot บน TLC ที่แตกต่างจากสายพันธุ์พื้นเมือง พร้อมแยกสาร				
			Output: ได้ทราบสูตรโครงสร้างของสาร พร้อม	

ดังกล่าวเพื่อหา สูตรโครงสร้าง			เปรียบเทียบกับสาร ที่เคยมีการรายงาน มาก่อนแล้ว	
5.ศึกษาสูตร โครงสร้างของสาร ใหม่โดยเทคนิค ทางสเปกโตรสโค ปี				Output: ได้ สูตรโครงสร้าง ของสารใหม่
				Output: รวบรวมข้อมูล ทั้งหมด จัดทำ เป็นรายงาน และส่ง บทความลง วารสารที่ เกี่ยวข้อง

5. ผลงานที่คาดว่าจะส่งตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติในแต่ละปี

ปีที่ 1 ชื่อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์ : High-performance thin-layer chromatographic fingerprints of active chemical constituents for distinguishning varieties of *Zingiber cassumunar* in Thailand.

Tangyuenyongwatana P, Keeratinijakal V, and Gritsanapan W.

ชื่อวารสารที่คาดว่าจะตีพิมพ์ : Chem Pharm Bull, impact factor = 1.623 จาก ISI 2008)

ปีที่ 2 ชื่อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์ : New chemical constituents from some varieties of *Zingiber cassumunar* in Thailand.

Tangyuenyongwatana P, Keeratinijakal V, and Gritsanapan W.

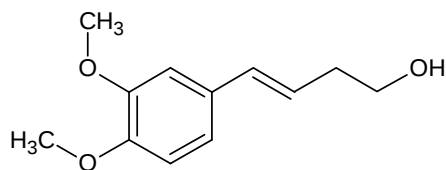
ชื่อวารสารที่คาดว่าจะตีพิมพ์ : Chem Pharm Bull, impact factor = 1.623 จาก ISI 2008)

บทนำ

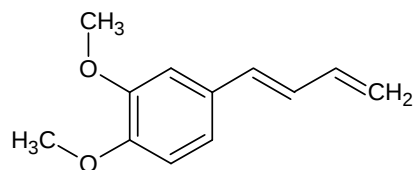
1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ประเทศไทยมีการศึกษาและพัฒนาจากพืชสมุนไพรหลากหลายชนิด หนึ่งในจำนวนพืชดังกล่าวได้แก่ไพล (*Zingiber cassumunar* Roxb.) ซึ่งเป็นพืชในวงศ์ Zingiberaceae ไพลมีชื่อท้องถิ่นอื่นๆ อีก เช่น ปุลอย ปุเลย ว่านไฟ มีชื่อพ้องทางวิทยาศาสตร์ (scientific synonym) ได้แก่ *Zingiber purpureum* Roscoe. *Z. montanum* (Koenig) Link ex Dietr. ลักษณะทั่วไป เป็นพืชล้มลุก มีเหง้าใต้ดิน ขึ้นเป็นกอ สูงพุ่มดินขึ้นมา 80-150 เซนติเมตร ดอกสีขาว ดอกรวมกันเป็นช่อ ผลกลมแข็ง ขนาดประมาณ 1-1.5 เซนติเมตร ไพลพบในภูมิภาคเอเชียเขตร้อน ในประเทศไทยปลูกได้ทุกภาค ส่วนที่ใช้ทางยาคือ เหง้า

ไพลเป็นสมุนไพรที่มีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอย่างกว้างขวาง องค์ประกอบทางเคมีได้แก่ สารกลุ่ม **phenylbutanoids** ได้แก่ (*E*)-4-(3',4'-dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol (compound D), (*E*)-1-(3',4'-dimethoxyphenyl)butadiene (DMPBD)

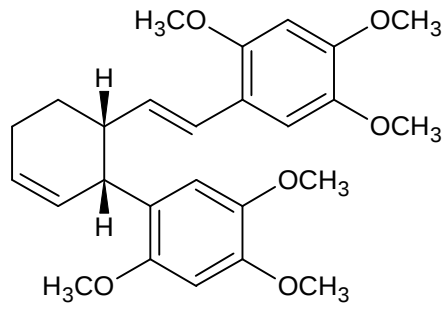


Compound D

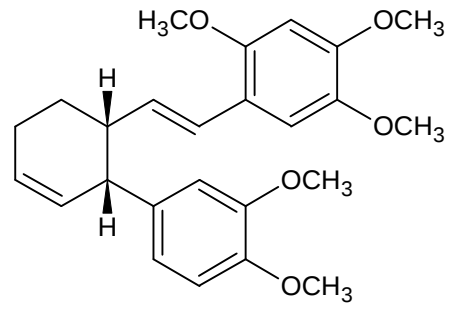


DMPBD

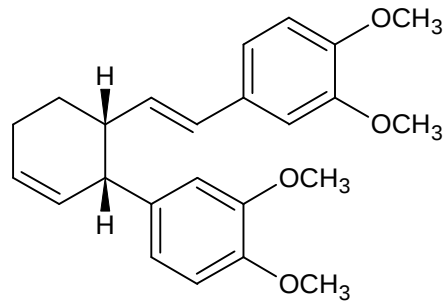
สารกลุ่ม **cyclohexane derivatives** ได้แก่ cis-3-(2',4',5'-trimethoxyphenyl)-4-[(*E*)-2'',4'',5''-trimethoxystyryl]-cyclohex-1-ene (1), cis-3-(3',4'-trimethoxyphenyl)-4-[(*E*)-2'',4'',5''-trimethoxystyryl]-cyclohex-1-ene (2) และ cis-3-(3',4'-trimethoxyphenyl)-4-[(*E*)-3',4',-trimethoxystyryl]-cyclohex-1-ene (3).



(1)

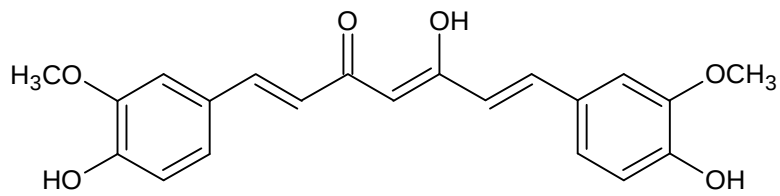


(2)

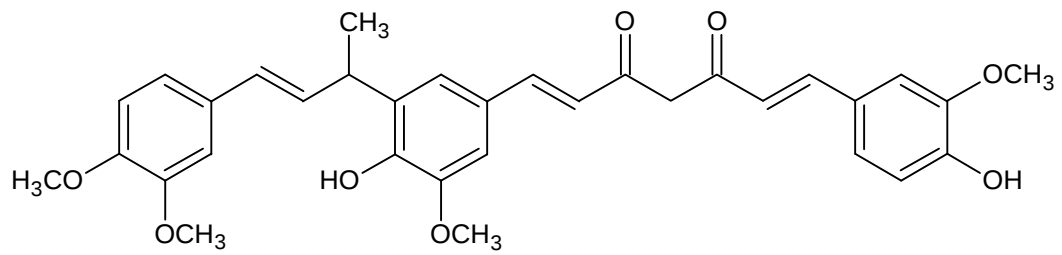


(3)

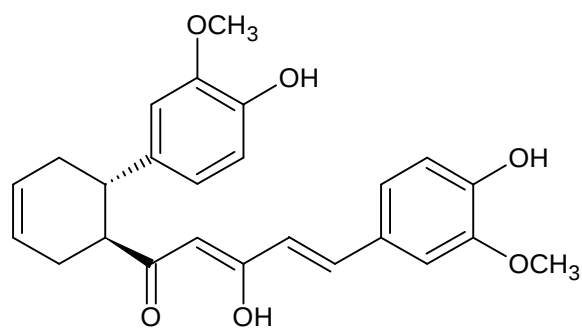
สารกลุ่ม **curcuminoids** ได้แก่ curcumin, cassumunins และ cassumunarin



Curcumin

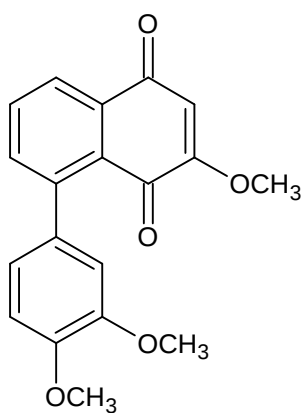


Cassumunin A

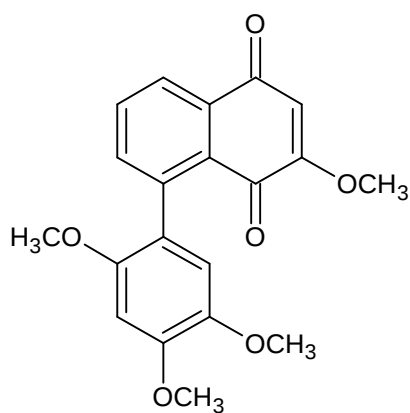


Cassumunarins

สารกลุ่ม **naphthoquinones** ได้แก่ cassumunaquinone 1 และ cassumunaquinone 2

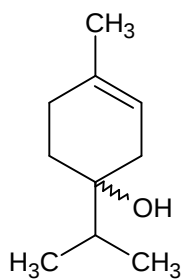


Cassumunaquinone 1

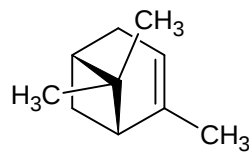


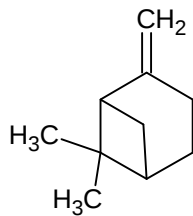
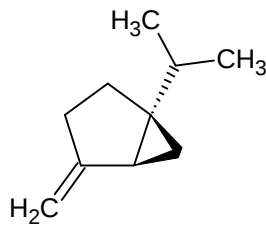
Cassumunaquinone 2

สารกลุ่ม **monoterpenoids** ได้แก่ terpinen-4-ol, α -pinene, β -pinene, sabinene และ myrcene

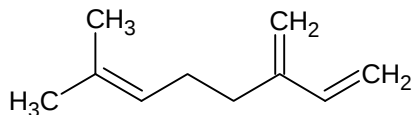


terpinen-4-ol

 α -pinene

 β -pinene

Sabinene



Myrcene

ฤทธิ์ทางเภสัชทางเภสัชวิทยาของไพล จุดเด่นคือฤทธิ์การต้านการอักเสบ โดยจากการศึกษาพบว่า สารในเหง้าไพลหลายชนิดมีคุณสมบัติในการต้านอาการอักเสบ ได้แก่

1. สารในกลุ่ม phenylbutanoids 4 ชนิด คือ

1.1 (*E*)-4-(3',4'-dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol (compound D)

1.2 (*E*)-1-(3',4'-dimethoxyphenyl)butadiene (DMPBD)

1.3 (*E*)-4-(3',4'-dimethoxyphenyl)but-1-ene

1.4 (*E*)-4-(3',4'-dimethoxyphenyl)but-3-en-1-yl-acetate

2. สารในกลุ่ม cyclohexane derivatives 3 ชนิด คือ

2.1 cis-3-(2',4',5'-trimethoxyphenyl)-4-[(*E*)-2'',4'',5''-trimethoxystyryl]-cyclohex-1-ene

2.2 cis-3-(3',4'-trimethoxyphenyl)-4-[(*E*)-2'',4'',5''-trimethoxystyryl]-cyclohex-1-ene

2.3 cis-3-(3',4'-trimethoxyphenyl)-4-[(*E*)-3',4',-trimethoxystyryl]-cyclohex-1-ene.

3. สารในกลุ่ม curcuminoids 4 ชนิด คือ

3.1 Curcumin

3.2 Cassumunin A

3.3 Cassumunin B

3.4 Cassumunin C

สารที่มีฤทธิ์ต่อกล้ามเนื้อเรียบ ได้แก่สารกลุ่ม phenylbutanoids 2 ชนิด คือ (*E*)-4-(3',4'-dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol (compound D) และ (*E*)-4-(3',4'-dimethoxyphenyl)but-3-en-1-yl-acetate⁽¹⁻⁵⁾

ไพลและตำรับยาประสระไพลได้รับการบรรจุอยู่ในบัญชียาหลักแห่งชาติ ซึ่งมีความสำคัญต่อการใช้ไพลในการรักษาอาการโรค โดยเฉพาะโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ⁽⁶⁻¹³⁾ อย่างไรก็ตามยังคงมีไพลอีกหลายสายพันธุ์ที่พบได้ในแต่ละภูมิภาค มีความแตกต่างทางด้านรูปร่างของใบ ดอก และ ลำต้นใต้ดิน โดย รศ.ดร.วิเชียร กิรตินิจกาล แห่งภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ได้ทำการวิจัยความหลากหลายทางพันธุกรรมของไพลในประเทศไทย พบว่ามีความแตกต่างมากกว่า 30 สายพันธุ์ และสามารถแบ่งเป็นกลุ่มใหญ่ได้ 4 กลุ่ม ซึ่งผู้วิจัยมีความสนใจเกี่ยวกับสารสำคัญในไพลแต่ละกลุ่ม โดยนำมาศึกษาปริมาณสารสำคัญเปรียบเทียบกับไพลพันธุ์พื้นเมือง ซึ่งเป็นไพลที่ใช้ในการทำยาแผนโบราณในปัจจุบัน ข้อมูลทางด้านลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ได้รับการดำเนินการโดย รศ.ดร.วิเชียร กิรตินิจกาล โดยใช้เทคนิค amplified fragment length polymorphism (AFLP) มีการใช้ AFLP primer 12 ชนิด ทำให้ได้ชิ้นส่วนทั้งหมด 309 ชิ้น โดยมี 242 bands ที่เป็น polymorphic ด้วยค่าเฉลี่ย 20.2 bands ต่อ primer ข้อมูลด้าน genetic similarities ประมวลผลด้วย Jaccard similarity coefficient และ phylogenetic tree ประมวลด้วยวิธี UPGMA clustering method⁽¹⁴⁾

ข้อมูลทางด้านพฤกษเคมีของไพลในกลุ่มต่างๆดังกล่าวข้างต้นยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน ซึ่งจากการวิจัยจะทำให้ทราบว่าไพลสายพันธุ์ใดที่ให้สารสำคัญเช่น (*E*)-4-(3',4'-dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol (compound D), (*E*)-1-(3',4'-dimethoxyphenyl)butadiene (DMPBD), cis-3-(2',4',5'-trimethoxyphenyl)-4-[(*E*)-2'',4'',5''-trimethoxystyryl]-cyclohex-1-ene, และ curcumin ในปริมาณสูง สารเหล่านี้เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ด้านการอักเสบ (anti-inflammation) ของไพล เนื่องจากไพลได้รับการผลักดัน และสนับสนุนจากหลายหน่วยงานของรัฐบาลให้เป็นพืชสมุนไพรหลัก แต่ยังขาดข้อมูลของพันธุ์ไพลที่ดีที่สุดที่จะให้สารสำคัญในปริมาณสูง งานวิจัยนี้จะให้ข้อมูลสำคัญที่จะมีผลต่อการคัดเลือกไพลเพื่อใช้เป็นยาแก้อักเสบ การปลูกไพลของเกษตรกร และจะเป็นการช่วยลดการนำเข้ายาแผนปัจจุบันที่ใช้รักษาอาการอักเสบ ซึ่งจะช่วยให้ชาติประหยัดเงินได้มาก

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาปริมาณสารสำคัญ คือ (*E*)-4-(3',4'-dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol (compound D), (*E*)-1-(3',4'-dimethoxy-phenyl)butadiene (DMPBD), และ curcumin ในสารสกัด methanol ของไพลทั้ง 30 สายพันธุ์โดยเทคนิค High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)
2. เปรียบเทียบ chromatographic fingerprint ของสารสกัดไพลแต่ละชนิด เพื่อดูสารที่แตกต่างจากไพลพื้นเมือง จากนั้นทำการแยกสกัดสารดังกล่าวและหาสูตรโครงสร้างโดยวิธีทางสเปกโตรสโกปี

วิธีการทดลอง

1. ตัวอย่างไฟล 30 สายพันธุ์

ได้รับจาก รศ.ดร.วิเชียร กิรตินิจกาล แห่งภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ซึ่งเก็บตัวอย่างไฟลสายพันธุ์ต่างๆ จากแหล่งต่างๆทั่วทุกภาคของประเทศไทย แล้วนำมาปลูกไว้ที่ไร่วรรณ จังหวัดนครราชสีมาในสภาพแวดล้อมเดียวกัน โดยตัวอย่างทั้งหมดถูกจัดแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่

ตัวอย่างกลุ่มที่ 1 ได้แก่ตัวอย่างหมายเลข 23, 29, 32, 42, 87, 90, 110

ตัวอย่างกลุ่มที่ 2 ได้แก่ตัวอย่างหมายเลข 8, 10, 27, 43, 48, 89

ตัวอย่างกลุ่มที่ 3 ได้แก่ตัวอย่างหมายเลข 9, 21, 24, 26, 39, 44, 45, 84, 98, 99,
111

ตัวอย่างกลุ่มที่ 4 ได้แก่ตัวอย่างหมายเลข 20, 31, 36, 40, 103, 115

ตัวอย่างทั้งหมดได้ถูกนำมาล้างให้สะอาด หั่นเป็นชิ้นบางๆ แล้วอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60°C หลังจากนั้นจะนำมาบดให้เป็นผงละเอียด แล้วร่งผ่านร่งเบอร์ 60 ผงยาที่ผ่านการร่งจะถูกบรรจุใส่ขวด และเก็บไว้ในที่ปราศจากแสง

2. การสกัดสารสกัดหยาบอย่างหมดจด (exhaust extraction) ด้วยตัวทำละลาย methanol โดยวิธี sonication

ชั่งผงไฟลแต่ละตัวอย่าง 1.5 กรัม ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มล. แล้วเติม methanol จำนวน 50 มล. จากนั้นทำการสกัดโดยวิธี sonication เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำการถ่ายตัวทำละลายออกใส่ใน Erlenmeyer flask ขนาด 500 มล. เติม methanol จำนวน 50 มล. ลงใน volumetric flask ใบเดิม แล้วทำการ sonication เป็นเวลา 15 นาที สกัดเช่นนี้จนสกัดสารได้หมดจด โดยสารสกัดครั้งสุดท้ายไม่พบ spot ของสารใดๆ เมื่อทดสอบด้วย TLC (silica gel GF₂₅₄, hexane:ethyl acetate (60:40)) นำสารสกัดที่ได้ของไฟลแต่ละตัวอย่าง มาระเหยแห้งด้วย rotary evaporator ซึ่งน้ำหนักของสารสกัดที่ได้ คำนวณหา % yield

3. Chromatographic fingerprints ของสารสกัดแต่ละสายพันธุ์

เตรียมสารสกัดของไฟลแต่ละตัวอย่างในแต่ละกลุ่มให้มีความเข้มข้น 12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แล้ว spot บนแผ่น TLC (Silica gel 60 F₂₅₄, Merck) ขนาด 10 x 20 ซม. ด้วยเครื่อง Linomat 5 (Camag, Switzerland) โดยมีแถบความยาวของ band เท่ากับ 8 มิลลิเมตร โดยมีสาร

curcumin และ DMPBD เป็น marker แผ่น TLC จะถูกนำมา develop ใน twin trough glass chamber (Camag Switzerland) โดยใช้ระบบตัวทำละลาย (solvent system) เป็น hexane : ethyl acetate (60 : 40) โดยมีระยะของ solvent front เท่ากับ 8 ซม. หลังจากตัวทำละลายระเหยออกจากแผ่น TLC หมดแล้ว ทำการ develop ซ้ำอีกครั้งหนึ่งเพื่อให้การแยกดีขึ้น หลังจากตัวทำละลายระเหยออกจากแผ่น TLC แล้ว แผ่น TLC จะถูกนำมาบันทึกภาพ chromatographic fingerprints ภายใตแสง UV ที่ 254 นาโนเมตร หลังจากนั้นจะทำการ scan แต่ละตัวอย่างด้วยเครื่อง densitometer (Camag TLC scanner 3, Switzerland) ที่ 254 นาโนเมตร

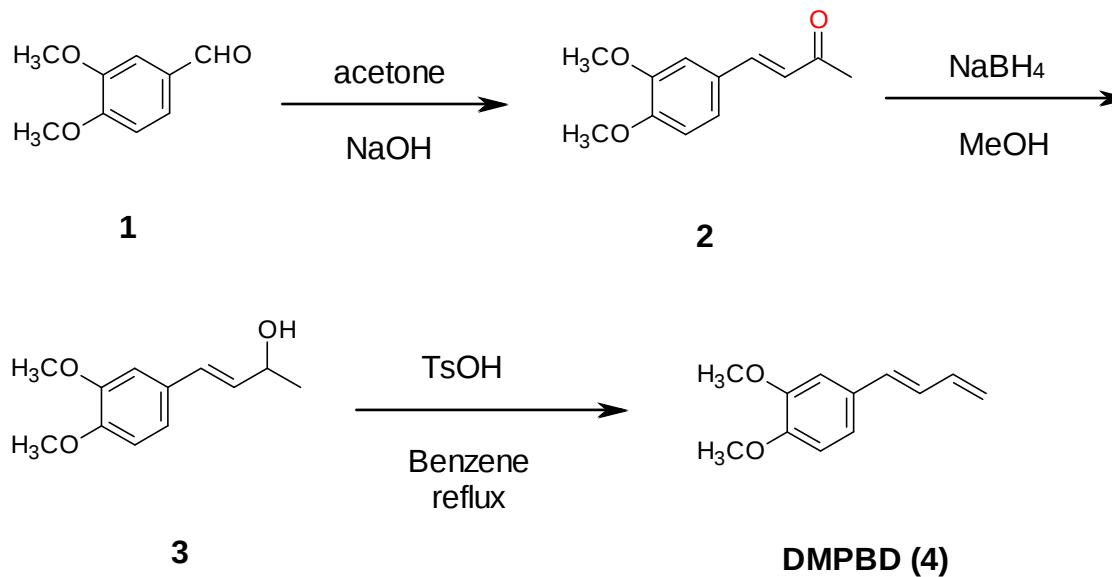
4. การเตรียมสารมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ด้วย HPTLC

4.1 การเตรียมสารบริสุทธิ์ curcumin

นำผงของไหล (Zingiber cassumunar)หนัก 500 กรัมมาหมักกับ hexane 2 ลิตร เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นกรองและเก็บสารสกัดไว้ นำกากที่เหลือจากการกรองมาหมักกับ hexane จำนวน 2 ลิตร เป็นเวลา 2 วันแล้วกรอง นำสารสกัดมารวมกับสารสกัดครั้งแรก ตัวทำละลายออกโดย rotary evaporator ได้สารสกัดหยาบ สารสกัดดังกล่าวได้ถูกนำมาแยกต่อด้วยเทคนิค column chromatography (silica gel 60, 0.063-0.200) โดยมีตัวทำละลายเป็น hexane-ethyl acetate เก็บ fractions ต่างๆ จะได้ pure curcumin ซึ่งนำมา identify โดยวิธี spectroscopy

4.2 การเตรียมสารมาตรฐาน DMPBD (Dimethoxyphenylbutadiene)

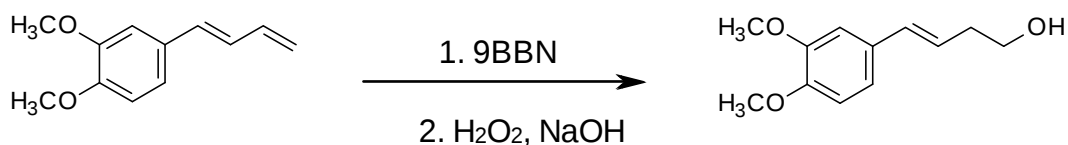
การเตรียมสารมาตรฐาน DMPBD จะใช้วิธีเคมีสังเคราะห์ทั้งหมด 3 ขั้นตอน โดยขั้นตอนที่ 1 และ 2 จะเป็นการเตรียมสาร (E)-4-(3',4'-dimethoxyphenyl)butane-2-ol (3) จากนั้นทำปฏิกิริยาการขจัด (elimination reaction) ได้เป็นสาร DMPBD (4) ดังแผนภูมิที่ 1



แผนภูมิที่ 1 การเตรียมสารมาตรฐาน DMPBD

4.3 การเตรียมสารมาตรฐาน compound D

ใช้สารละลายของ DMPBD มิลลิกรัม ทำปฏิกิริยา hydroboration-oxidation ได้สาร compound D 147 มิลลิกรัม ดังแผนภูมิที่ 2



แผนภูมิที่ 2 การเตรียมสารมาตรฐาน compound D

5. การ validate วิธีวิเคราะห์โดย HPTLC

5.1 การ validate วิธีวิเคราะห์สาร DMPBD

5.1.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน (preparation of standard solution) : ชั่งสาร DMPBD 3.6 มิลลิกรัมใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol จากนั้นนำมา spot บนแผ่น TLC ในปริมาณ 1, 2, 3, 4, และ 5 μL เพื่อให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 144, 288, 432, 576, และ 720 ng/spot ตามลำดับ

5.1.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่างไหล (preparation of sample solution) : ชั่งผงยาไหล 1.5 กรัมใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร เติม methanol 50 มิลลิลิตร แล้วนำมาสกัดโดยวิธี sonication ใน ultrasonic bath และทำการ sonicate เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นรินสารละลายเก็บไว้ และเติม methanol อีก 50 มิลลิลิตรลงใน flask ที่มีผงยาเหลืออยู่ แล้วนำมาสกัดเช่นเดิม รินสารละลายเก็บรวมกันไว้ ทำต่อเนื่องไปจนสกัดสารได้หมดจด ซึ่งจะทดสอบได้โดยใช้ TLC นำสารละลายที่ได้มาระเหยเอาตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่อง rotary evaporator สารสกัดที่ได้จะนำมาชั่งหาน้ำหนัก แล้วละลายด้วย methanol ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตรและปรับปริมาตร จากนั้นเปิดสารละลายมา 1.0 มิลลิลิตร ใส่ลงใน volumetric flask 10 มิลลิลิตรและปรับปริมาตรด้วย methanol

5.1.3 Linearity ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างพื้นที่ใต้ peak กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน ทำโดยการ spot สารมาตรฐานบนแผ่น TLC 1, 2, 3, 4, และ 5 μL ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 144, 288, 432, 576, และ 720 ng/spot จากนั้นนำไปแช่ใน TLC twin-trough glass chamber ที่มี n-hexane : dichloromethane (60 : 40) เป็น mobile phase ให้มีระยะทางเคลื่อนที่ของตัวทำละลายเท่ากับ 8 เซนติเมตร โดยในกรณีนี้จะทำ double development เพื่อให้การแยกของสารดีที่สุด จากนั้นนำแผ่น TLC มาเป่าให้แห้ง และนำมาตรวจด้วย TLC scanner 3 แล้วหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างพื้นที่ใต้ peak กับความเข้มข้นของสารมาตรฐานโดยใช้โปรแกรม winCATS ใน reflectance-absorbance mode ที่ 289 นาโนเมตร

5.1.4 Precision ค่า repeatability และ intermediate precision ของวิธีวิเคราะห์จะแสดงด้วยค่า relative standard deviation (RSD) ของพื้นที่ใต้ peak ค่า intraday precision จะทำโดยการวิเคราะห์สารมาตรฐานที่สามความเข้มข้น (178, 356, 534 ng/spot) ในวันเดียวกัน ส่วน intraday precision จะทำโดยการวิเคราะห์สารมาตรฐานที่สามความเข้มข้นเดิมเป็นเวลาสามวัน

5.1.5 Accuracy ค่าความถูกต้องของการวิเคราะห์จะหาโดยการทำการหาค่า recovery โดยการเติมสารมาตรฐานที่รู้ปริมาณแน่นอนอนสามความเข้มข้น (156, 288, 361 ng/spot) ลงในสารตัวอย่าง แล้วทำการ spot บนแผ่น TLC โดยใช้ condition ตามข้อ 5.1.3

5.1.6 Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantitation

(LOQ) ทำโดยการ scan ค่า noise ของ blank methanol spot จากนั้นทำการ spot สารมาตรฐาน DMPBD ในปริมาณ 10 – 100 ng/spot บนแผ่น TLC โดยใช้ condition ตามข้อ 5.1.3 โดยค่า signal to noise ratio เท่ากับ 3: 1 คือค่า LOD และค่า signal to noise ratio เท่ากับ 10 : 1 คือค่า LOQ

5.1.7 Robustness การทดสอบ robustness ของวิธีวิเคราะห์ ทำโดยการ

เปลี่ยนแปลง chromatographic parameters ซึ่งได้แก่ องค์ประกอบของตัวทำละลาย (composition of mobile phase) ปริมาณของ mobile phase อุณหภูมิ (temperature) และระยะเวลาของการอิ่มตัวของ chamber (chamber saturation time) โดยจะเปลี่ยนแปลง $\pm 5\%$ และเก็บข้อมูลเพื่อนำมาประมวลผล

5.2 การ validate วิธีวิเคราะห์สาร compound D

5.2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน (preparation of standard

solution) : ชั่งสาร compound D 21.0 มิลลิกรัมใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol จากนั้นปิเปตมา 1.0 มิลลิลิตรใส่ลงใน volumetric flask 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย methanol นำมา spot บนแผ่น TLC 1, 2, 3, 4, และ 5 μL ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 84, 168, 252, 336, และ 420 ng/spot ตามลำดับ

5.2.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่างไฟล (preparation of sample

solution) : เตรียมเหมือนข้อ 5.1.2

5.2.3 Linearity ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างพื้นที่ใต้ peak กับความ

เข้มข้นของสารมาตรฐาน ทำโดยการ spot สารมาตรฐานบนแผ่น TLC 1, 2, 3, 4, และ 5 μL ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 84, 168, 252, 336, และ 420 ng/spot จากนั้นนำไปแช่ใน TLC twin-trough glass chamber ที่มี dichloromethane : methanol (98 : 2) เป็น mobile phase ให้มีระยะทางเคลื่อนที่ของตัวทำละลายเท่ากับ 8 เซนติเมตร จากนั้นนำแผ่น TLC มาเป่าให้แห้ง และนำมาตรวจด้วย TLC scanner 3 แล้วหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างพื้นที่ใต้ peak กับความเข้มข้นของสารมาตรฐานโดยใช้โปรแกรม winCATS ใน reflectance-absorbance mode ที่ 254 นาโนเมตร

5.2.4 Precision ค่า repeatability และ intermediate precision ของวิธีวิเคราะห์จะแสดงด้วยค่า relative standard deviation (RSD) ของพื้นที่ใต้ peak ค่า intraday precision จะทำโดยการวิเคราะห์สารมาตรฐานที่สามความเข้มข้น (168, 252, 336 ng/spot) ในวันเดียวกัน ส่วน intraday precision จะทำโดยการวิเคราะห์สารมาตรฐานที่สามความเข้มข้นเดิมเป็นเวลาสามวัน

5.2.5 Accuracy ค่าความถูกต้องของการวิเคราะห์จะหาโดยการทำการหาค่า recovery โดยการเติมสารมาตรฐานที่รู้ปริมาณแน่นอนสามความเข้มข้น (84, 168, 210 ng/spot) ลงในสารตัวอย่าง แล้วทำการ spot บนแผ่น TLC โดยใช้ condition ตามข้อ 5.2.3

5.2.6 Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantitation (LOQ) ทำโดยการ scan ค่า noise ของ blank methanol spot จากนั้นทำการ spot สารมาตรฐาน compound D ในปริมาณ 10 – 100 ng/spot บนแผ่น TLC โดยใช้ condition ตามข้อ 5.2.3 โดยค่า signal to noise ratio เท่ากับ 3: 1 คือค่า LOD และค่า signal to noise ratio เท่ากับ 10 : 1 คือค่า LOQ

5.2.7 Robustness การทดสอบ robustness ของวิธีวิเคราะห์ ทำโดยการเปลี่ยนแปลง chromatographic parameters ซึ่งได้แก่ องค์ประกอบของตัวทำละลาย (composition of mobile phase) ปริมาณของ mobile phase อุณหภูมิ (temperature) และระยะเวลาของการอิ่มตัวของ chamber (chamber saturation time) โดยจะเปลี่ยนแปลง $\pm 5\%$ และเก็บข้อมูลเพื่อนำมาประมวลผล.

5.3 การ validate วิธีวิเคราะห์สาร curcumin

5.3.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน (preparation of standard solution) : ชั่งสาร curcumin 8.1 มิลลิกรัมใส่ลงใน volumetric flask 25 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol จากนั้นปิเปตมา 1.0 มิลลิลิตรใส่ลงใน volumetric flask 10 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol นำมา spot บนแผ่น TLC 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 μL เพื่อให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 32, 64, 96, 128, 160 และ 192 ng/spot

5.3.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่างไฟล (preparation of sample solution) : เตรียมเหมือนข้อ 5.1.2

5.3.3 Linearity ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างพื้นที่ใต้ peak กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน ทำโดยการ spot สารมาตรฐานบนแผ่น TLC 3, 4, 5, 6 และ 7 μL ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 96, 128, 160, 192 และ 224 ng/spot จากนั้นนำไปแช่ใน TLC twin-trough glass chamber ที่มี dichloromethane : methanol (98 : 2) เป็น mobile phase ให้มีระยะทางเคลื่อนที่ของตัวทำละลายเท่ากับ 8 เซนติเมตร จากนั้นนำแผ่น TLC มาเป่าให้แห้ง และนำมาตรวจด้วย TLC scanner 3 แล้วหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างพื้นที่ใต้ peak กับความเข้มข้นของสารมาตรฐานโดยใช้โปรแกรม winCATS ใน reflectance-absorbance mode ที่ 420 นาโนเมตร

5.3.4 Precision ค่า repeatability และ intermediate precision ของวิธีวิเคราะห์จะแสดงด้วยค่า relative standard deviation (RSD) ของพื้นที่ใต้ peak ค่า intraday precision จะทำโดยการวิเคราะห์สารมาตรฐานที่สามความเข้มข้น (96, 128, 160 ng/spot) ในวันเดียวกัน ส่วน intraday precision จะทำโดยการวิเคราะห์สารมาตรฐานที่สามความเข้มข้นเดิมเป็นเวลาสามวัน

5.3.5 Accuracy ค่าความถูกต้องของการวิเคราะห์จะหาโดยการทำการหาค่า recovery โดยการเติมสารมาตรฐานที่รู้ปริมาณแน่นอนสามความเข้มข้น (34, 85, 102 ng/spot) ลงในสารตัวอย่าง แล้วทำการ spot บนแผ่น TLC โดยใช้ condition ตามข้อ 5.3.3

5.3.6 Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantitation (LOQ) ทำโดยการ scan ค่า noise ของ blank methanol spot จากนั้นทำการ spot สารมาตรฐาน curcumin ในปริมาณ 10 – 100 ng/spot บนแผ่น TLC โดยใช้ condition ตามข้อ 5.3.3 โดยค่า signal to noise ratio เท่ากับ 3 : 1 คือค่า LOD และค่า signal to noise ratio เท่ากับ 10 : 1 คือค่า LOQ

5.3.7 Robustness การทดสอบ robustness ของวิธีวิเคราะห์ ทำโดยการเปลี่ยนแปลง chromatographic parameters ซึ่งได้แก่ องค์ประกอบของตัวทำละลาย (composition of mobile phase) ปริมาณของ mobile phase อุณหภูมิ (temperature) และระยะเวลาของการอิ่มตัวของ chamber (chamber saturation time) โดยจะเปลี่ยนแปลง $\pm 5\%$ และเก็บข้อมูลเพื่อนำมาประมวลผล

6. การวิเคราะห์สาร DMPBD ในตัวอย่างไฟลกลุ่มที่ 1, 2, 3 และ กลุ่มที่ 4

6.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน (preparation of standard solution) :

ซังสาร DMPBD 3.6 มิลลิกรัมใส่ลงใน volumetric flask 25 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol

6.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่างไฟล (preparation of sample solution) :

ซังผงยาไฟล 1.5 กรัมใส่ลงใน volumetric flask 100 มิลลิลิตร เติม methanol 50 มิลลิลิตร แล้วนำมาสกัดด้วย ultrasonic bath และทำการ sonicate เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นรินสารละลายเก็บไว้ และเติม methanol อีก 50 มิลลิลิตรลงใน flask ที่มีผงยาเหลืออยู่ แล้วนำมาสกัดใน ultrasonic bath และทำการ sonicate เป็นเวลา 15 นาที รินสารละลายเก็บรวมกันไว้ ทำต่อเนื่องไปจนสกัดสารได้หมดจด ซึ่งจะติดตามผลการสกัดโดยใช้ TLC นำสารละลายที่ได้มาระเหยเอาตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่อง rotary evaporator สารสกัดที่ได้จะนำมาซังหาน้ำหนัก แล้วละลายด้วย methanol ใส่ลงใน volumetric flask 25 มิลลิลิตรและปรับปริมาตร จากนั้นปิเปตสารละลายมา 1.0 มิลลิลิตร ใส่ลงใน volumetric flask 10 มิลลิลิตรและปรับปริมาตรด้วย methanol

6.3 การวิเคราะห์หาปริมาณ DMPBD ด้วยเครื่อง HPTLC ทำโดยการ

spot สารมาตรฐานบนแผ่น TLC 1, 2, 3, 4, และ 5 μL ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 144, 288, 432, 576, และ 720 ng/spot ต่อด้วยการ spot สารละลายตัวอย่างไฟลกลุ่มที่ 1, 2, 3 และ 4 จำนวน 2 μL จากนั้นนำไปแช่ใน TLC twin-trough glass chamber ที่มี n-hexane : dichloromethane (60 : 40) เป็น mobile phase ให้มีระยะทางเคลื่อนที่ของตัวทำละลายเท่ากับ 8 เซนติเมตร โดยในกรณีนี้จะทำ double development เพื่อให้การแยกของสารดีที่สุด จากนั้นนำแผ่น TLC มาเป่าให้แห้ง และนำมาตรวจด้วย TLC scanner 3 แล้วหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างพื้นที่ใต้ peak กับความเข้มข้นของสารมาตรฐานโดยใช้โปรแกรม winCATS ใน reflectance-absorbance mode ที่ 289 นาโนเมตร

7. การวิเคราะห์สาร compound D ในตัวอย่างไฟล กลุ่มที่ 1, 2, 3 และ กลุ่มที่ 4

7.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน (preparation of standard solution) :

compound D 21.0 มิลลิกรัมใส่ลงใน volumetric flask 25 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol จากนั้นปิเปตมา 1.0 มิลลิลิตรใส่ลงใน volumetric flask 10 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol

7.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่างโพล (preparation of sample solution) : ชั่งผง ยาโพล 1.5 กรัมใส่ลงใน volumetric flask 100 มิลลิลิตร เติม methanol 50 มิลลิลิตร แล้วนำมา สกัดด้วยวิธี sonication ใน ultrasonic bath และทำการ sonicate เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นริน สารละลายเก็บไว้ และเติม methanol อีก 50 มิลลิลิตรลงใน flask ที่มีผงยาเหลืออยู่ แล้วนำมาสกัดใน ultrasonic bath และทำการ sonicate เป็นเวลา 15 นาที รินสารละลายเก็บรวมกันไว้ ทำต่อเนื่องไป จนสกัดสารได้หมดจด ซึ่งทดสอบผลการสกัดโดยใช้ TLC นำสารละลายที่ได้มาระเหยเอาตัวทำ ละลายออกโดยใช้เครื่อง rotary evaporator สารสกัดที่ได้จะนำมาชั่งหาน้ำหนัก แล้วละลายด้วย methanol ใส่ลงใน volumetric flask 25 มิลลิลิตรและปรับปริมาตร

7.3 การวิเคราะห์หาปริมาณ compound D ด้วยเครื่อง HPTLC
spot สารมาตรฐานบนแผ่น TLC 1, 2, 3, 4, และ 5 μL ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 84, 168, 252, 336, และ 420 ng/spot และ spot สารละลายตัวอย่างโพลกลุ่มที่ 1, 2, 3 และ 4 จำนวน 2 μL จากนั้น นำไปแช่ใน TLC twin-trough glass chamber ที่มี dichloromethane : methanol (98 : 2) เป็น mobile phase ให้มีระยะทางเคลื่อนที่ของตัวทำละลายเท่ากับ 8 เซนติเมตร จากนั้นนำแผ่น TLC มา เป่าให้แห้ง และนำมาตรวจด้วย TLC scanner 3 แล้วหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างพื้นที่ใต้ peak กับความเข้มข้นของสารมาตรฐานโดยใช้โปรแกรม winCATS ใน reflectance-absorbance mode ที่ 254 นาโนเมตร

8. การวิเคราะห์สาร curcumin ในตัวอย่างโพลกลุ่มที่ 1, 2, 3 และกลุ่มที่ 4

8.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน (preparation of standard solution) : ชั่งสาร curcumin 8.1 มิลลิกรัมใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol จากนั้นปิเปตมา 1.0 มิลลิลิตรใส่ลงใน volumetric flask 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย methanol

8.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่างโพล (preparation of sample solution) : ชั่งผง ยาโพล 1.5 กรัมใส่ลงใน volumetric flask 100 มิลลิลิตร เติม methanol 50 มิลลิลิตร แล้วนำมา สกัดด้วย ultrasonic bath และทำการ sonicate เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นรินสารละลายเก็บไว้ และ เติม methanol อีก 50 มิลลิลิตรลงใน flask ที่มีผงยาเหลืออยู่ แล้วนำมาสกัดด้วย ultrasonic bath และ ทำการ sonicate เป็นเวลา 15 นาที รินสารละลายเก็บรวมกันไว้ ทำต่อเนื่องไปจนสกัดสารได้หมดจด

ซึ่งจะติดตามผลการสกัดโดยใช้ TLC นำสารละลายที่ได้มาระเหยเอาตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่อง rotary evaporator สารสกัดที่ได้จะนำมาชั่งหาน้ำหนัก แล้วละลายด้วย methanol ใส่ลงใน volumetric flask 25 มิลลิลิตรและปรับปริมาตร

8.3 การวิเคราะห์หาปริมาณ curcumin ด้วยเครื่อง HPTLC spot สารมาตรฐาน บนแผ่น TLC 3, 4, 5, 6 และ 7 μL ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 96, 128, 160, 192 และ 224 ng/spot และ spot ตัวอย่างโพลกลุ่มที่ 1, 2, 3 และ 4 จำนวน 3 μL จากนั้นนำไปแช่ใน TLC twin-trough glass chamber ที่มี dichloromethane : methanol (98 : 2) เป็น mobile phase ให้มีระยะทางเคลื่อนที่ของตัวทำละลายเท่ากับ 8 เซนติเมตร จากนั้นนำแผ่น TLC มาเป่าให้แห้ง และนำมาตรวจด้วย TLC scanner 3 แล้วหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างพื้นที่ใต้ peak กับความเข้มข้นของสารมาตรฐานโดยใช้โปรแกรม winCATS ใน reflectance-absorbance mode ที่ 420 นาโนเมตร

ผลการทดลอง

1. เก็บตัวอย่างไพล 30 สายพันธุ์ ที่นำมาทำให้แห้ง และบดเป็นผงละเอียด (Sieve no 60)



รูปที่ 1 ตัวอย่างผงยาไพลกลุ่มที่ 1



รูปที่ 2 ตัวอย่างผงยาไพลกลุ่มที่ 2

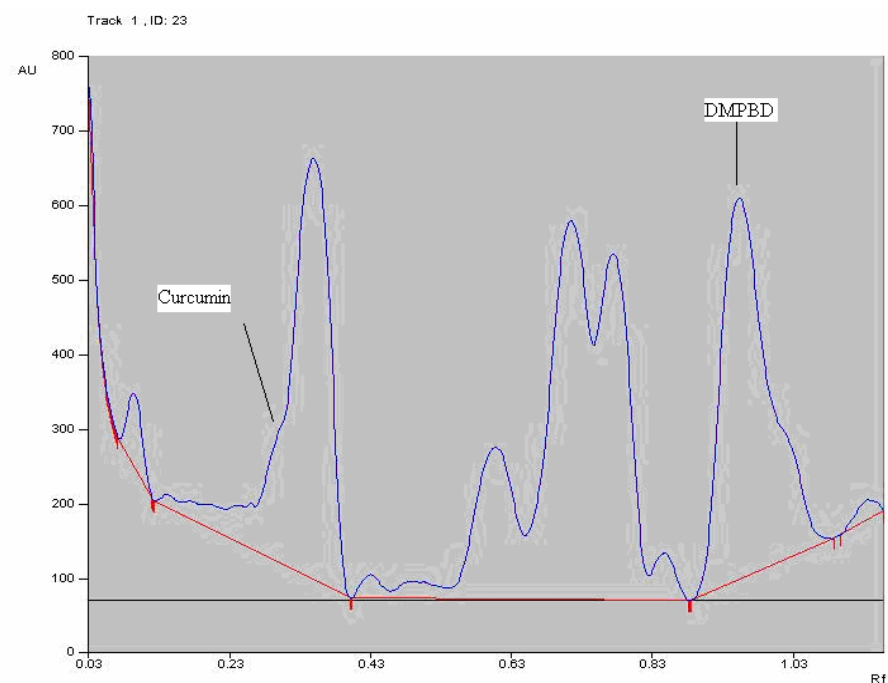


รูปที่ 3 ตัวอย่างผงยาไพพลกลุ่มที่ 3

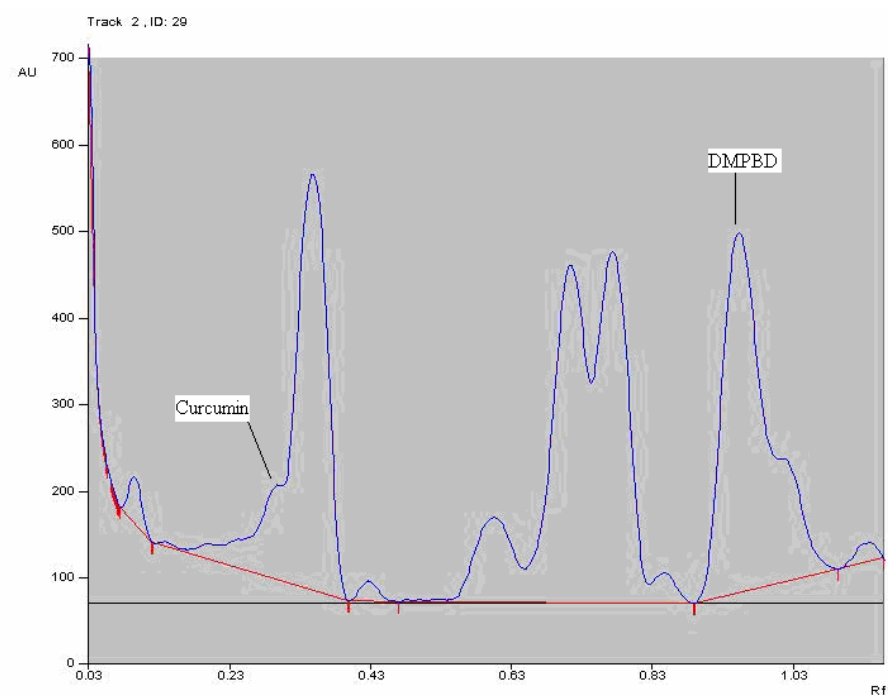


รูปที่ 4 ตัวอย่างผงยาไพพลกลุ่มที่ 4

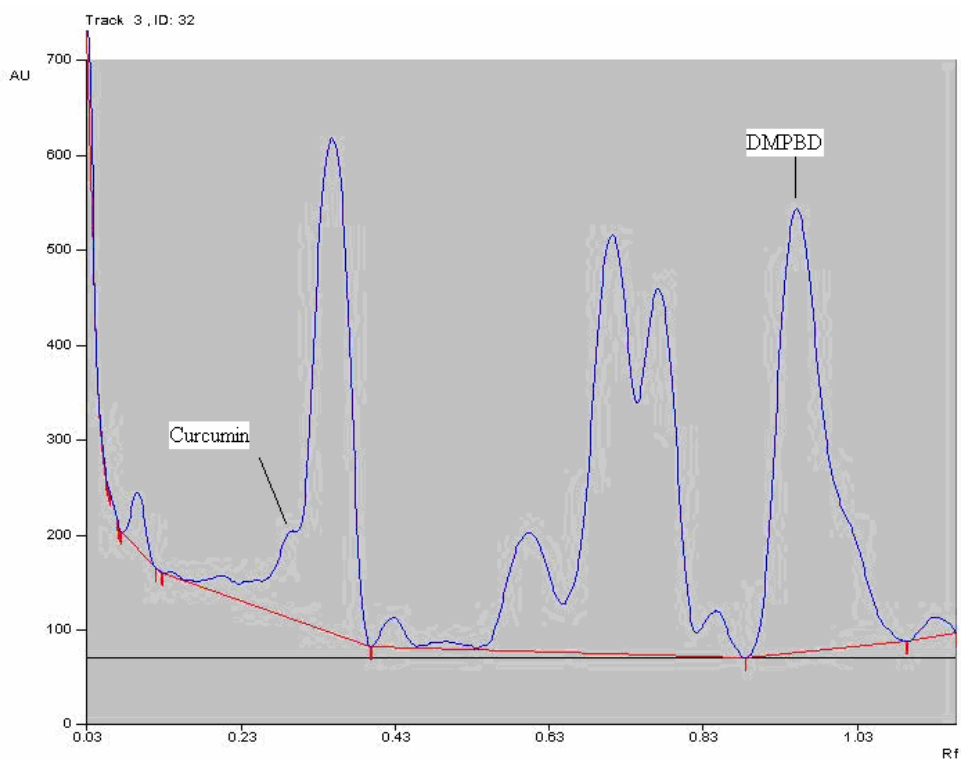
2. Chromatographic fingerprints ของการสกัดสารสกัดหยาบอย่างหมดจด (exhaust extraction) ด้วยตัวทำละลาย methanol โดยวิธี Sonication



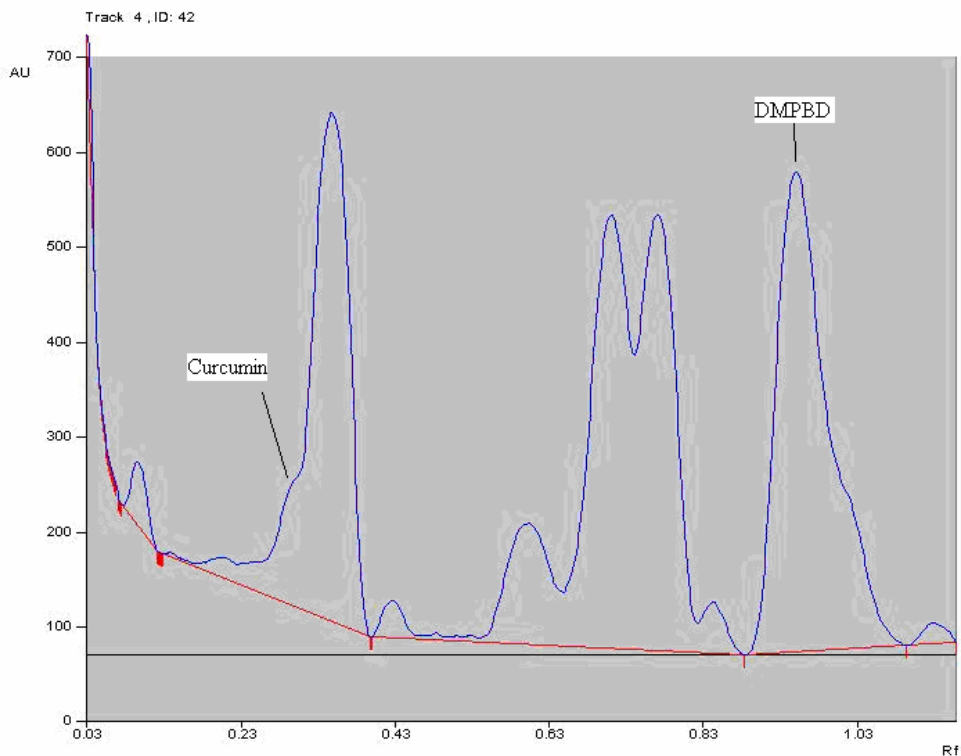
รูปที่ 5 TLC fingerprint ของตัวอย่างกลุ่มที่ 1 หมายเลข 23 ที่ 254 nm



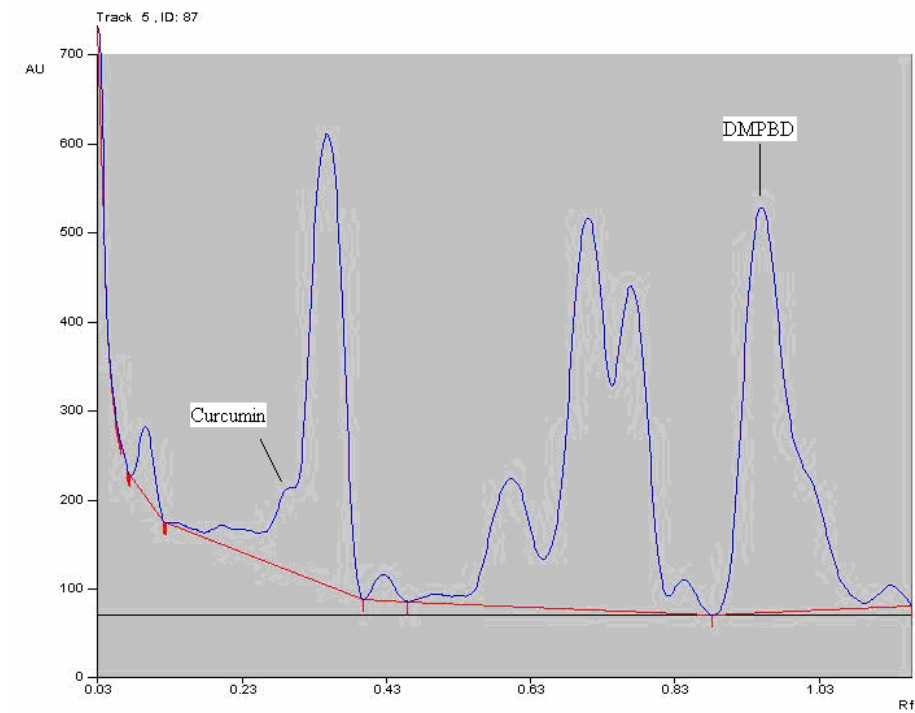
รูปที่ 6 TLC fingerprint ของตัวอย่างกลุ่มที่ 1 หมายเลข 29 ที่ 254 nm



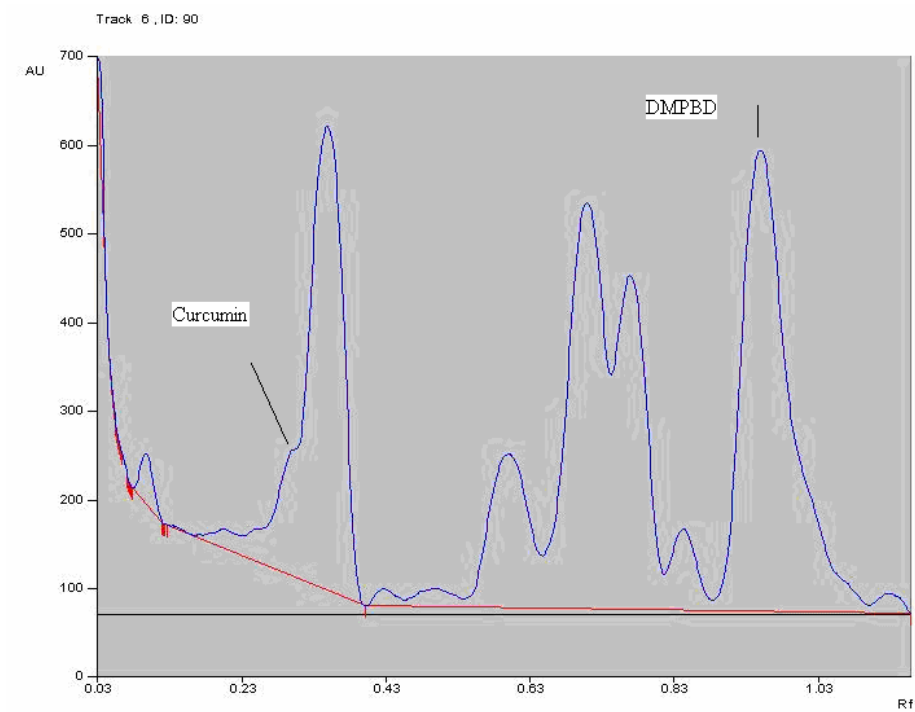
รูปที่ 7 TLC fingerprint ของตัวอย่างกลุ่มที่ 1 หมายเลข 32 ที่ 254 nm



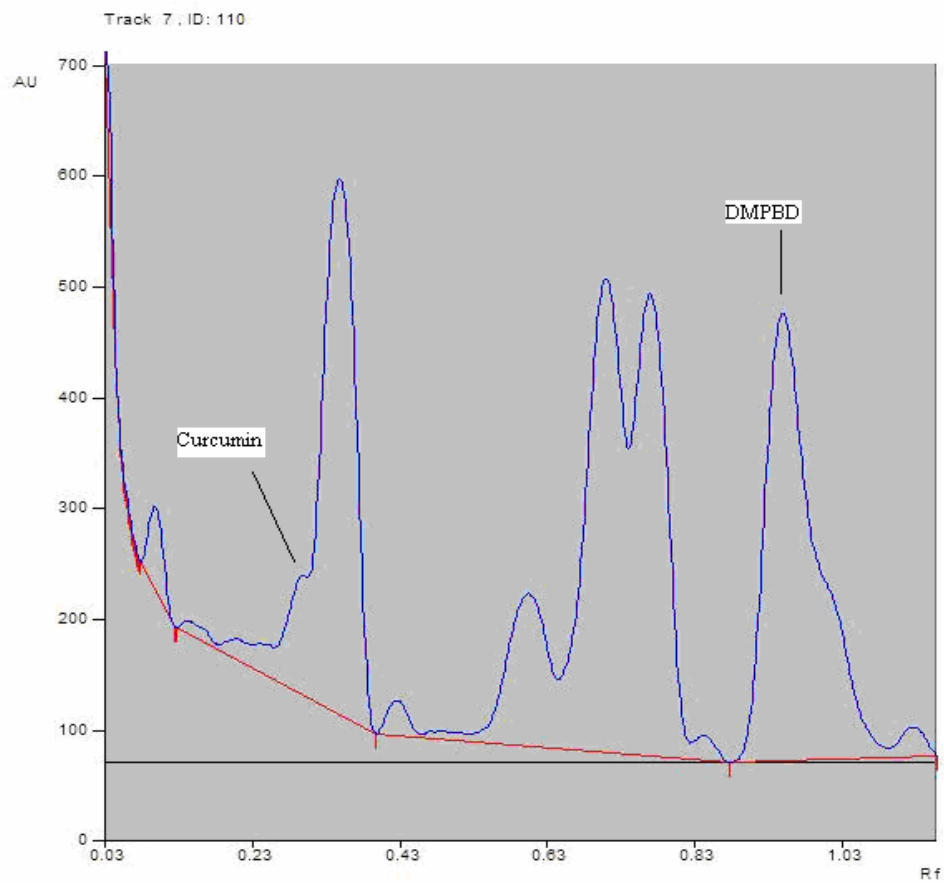
รูปที่ 8 TLC fingerprint ของตัวอย่างกลุ่มที่ 1 หมายเลข 42 ที่ 254 nm



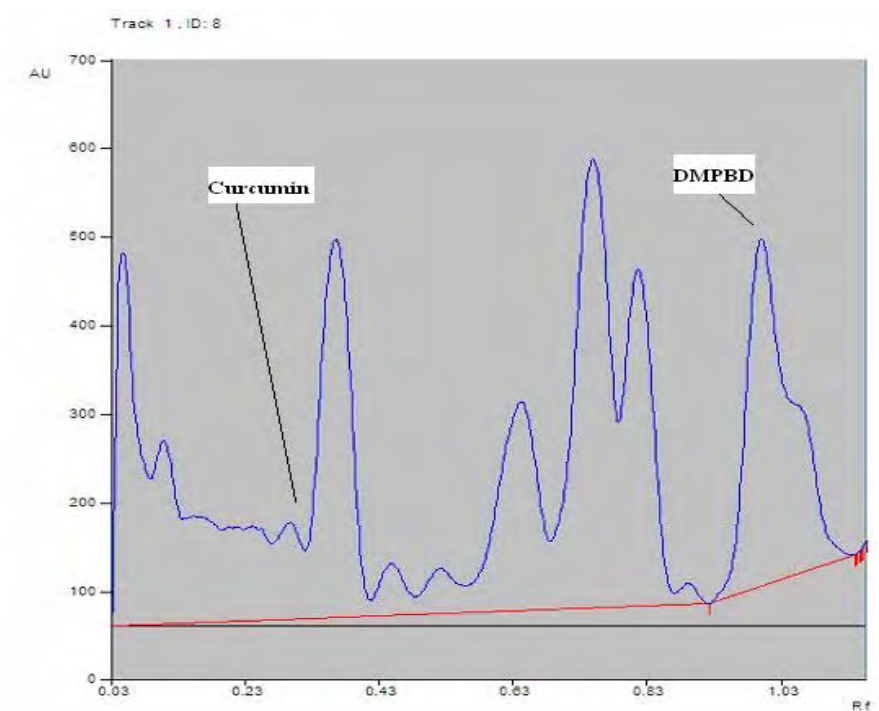
รูปที่ 9 TLC fingerprint ของตัวอย่างกลุ่มที่ 1 หมายเลข 87 ที่ 254 nm



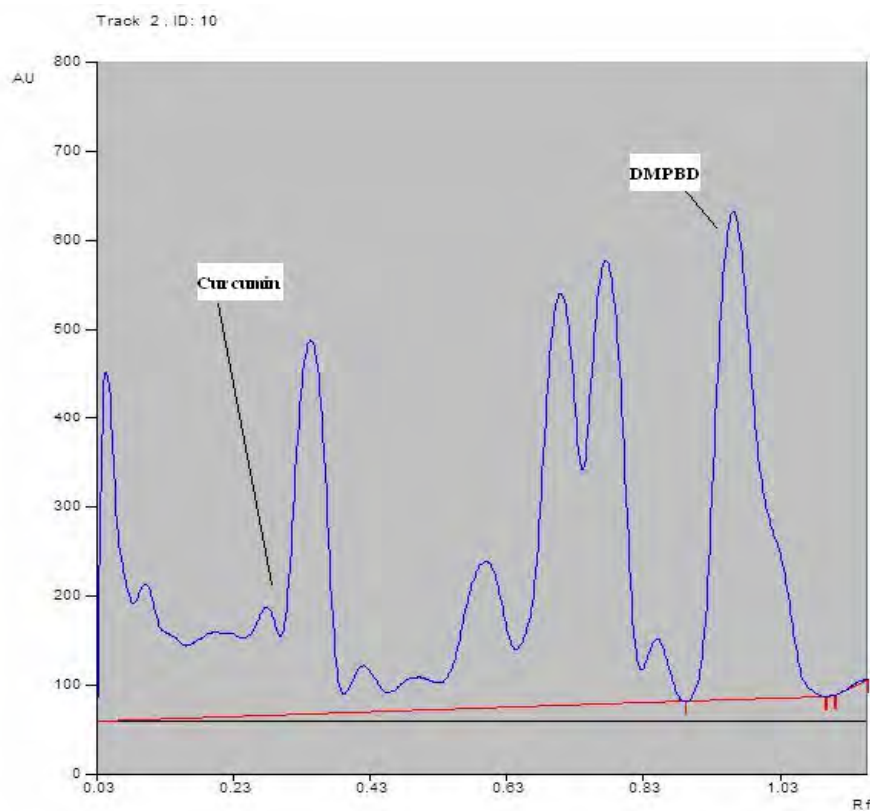
รูปที่ 10 TLC fingerprint ของตัวอย่างกลุ่มที่ 1 หมายเลข 90 ที่ 254 nm



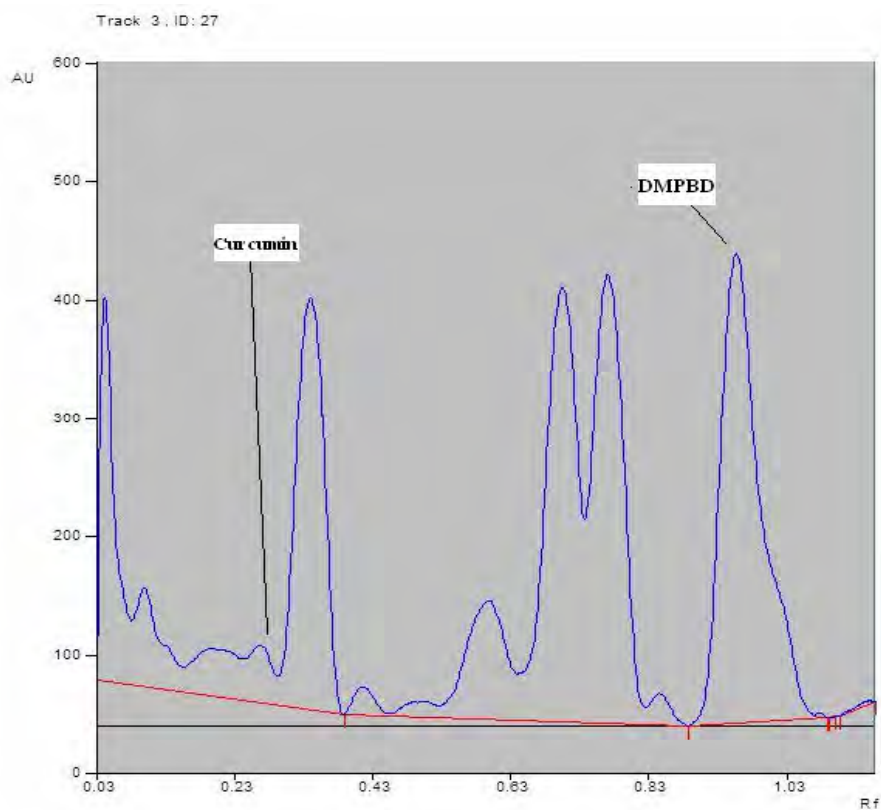
รูปที่ 11 TLC fingerprint ของตัวอย่างกลุ่มที่ 1 หมายเลข 110 ที่ 254 nm



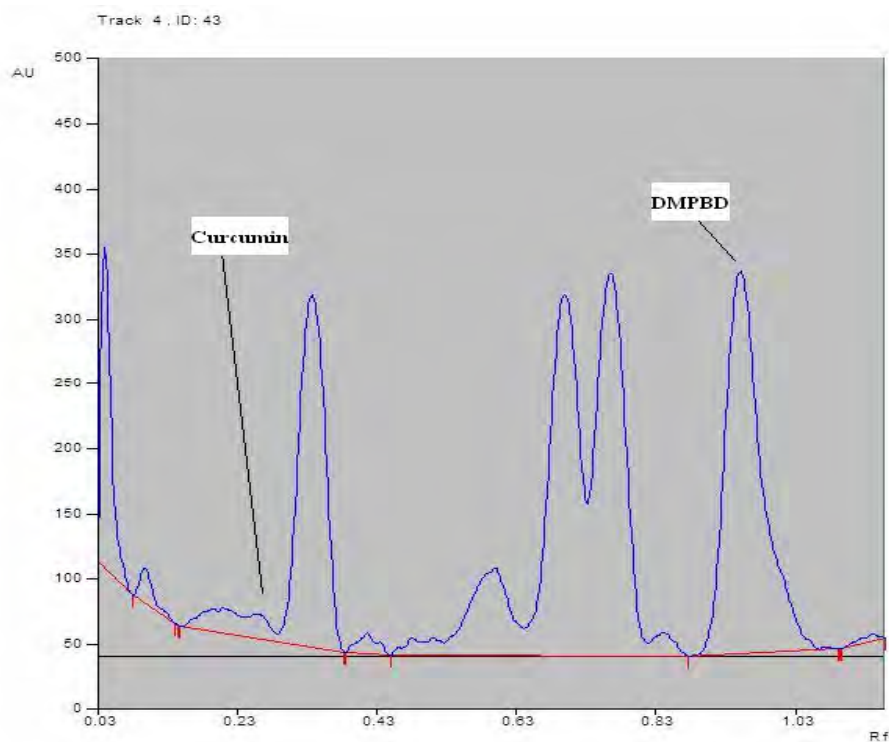
รูปที่ 12 TLC fingerprint ของตัวอย่างกลุ่มที่ 2 หมายเลข 8 ที่ 254 nm



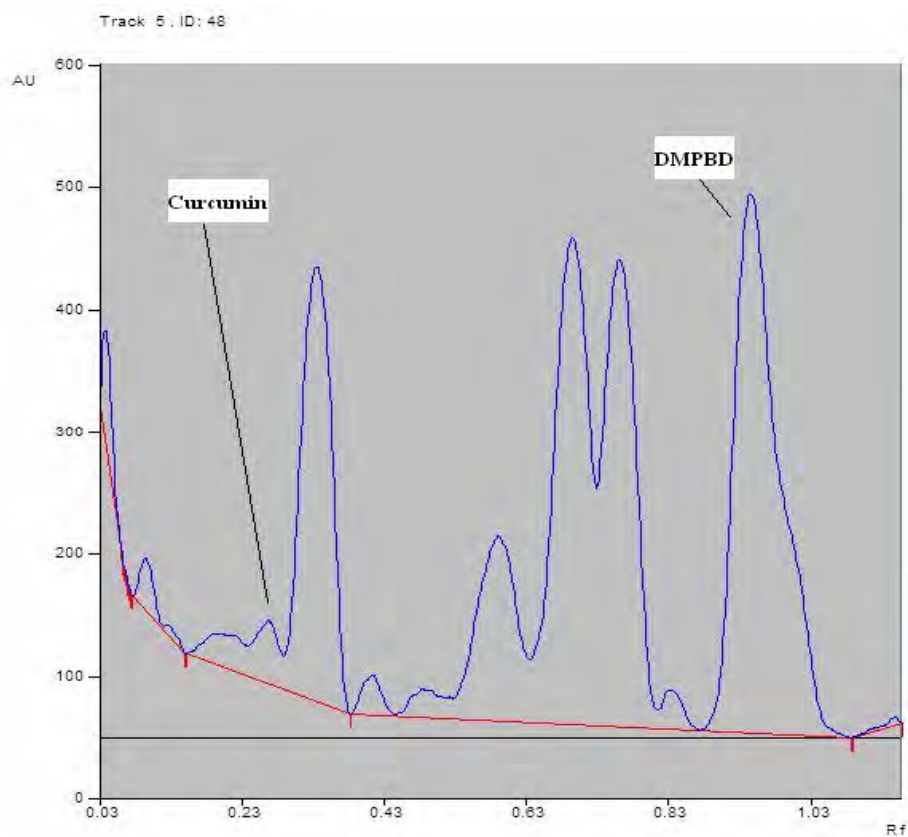
รูปที่ 13 TLC fingerprint ของตัวอย่างกลุ่มที่ 2 หมายเลข 10 ที่ 254 nm



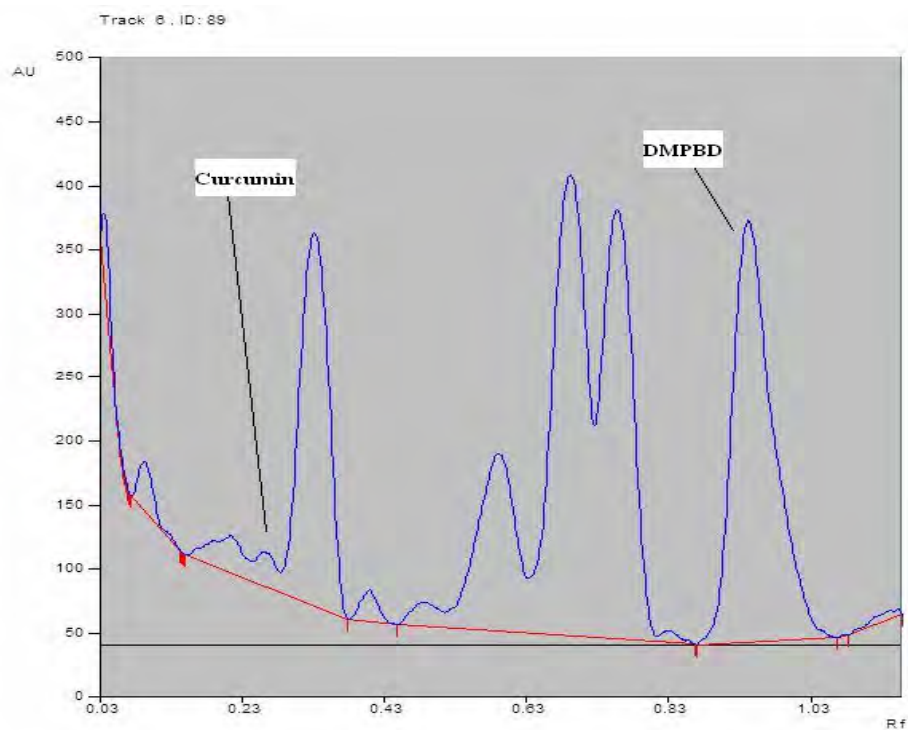
รูปที่ 14 TLC fingerprint ของตัวอย่างกลุ่มที่ 2 หมายเลข 27 ที่ 254 nm



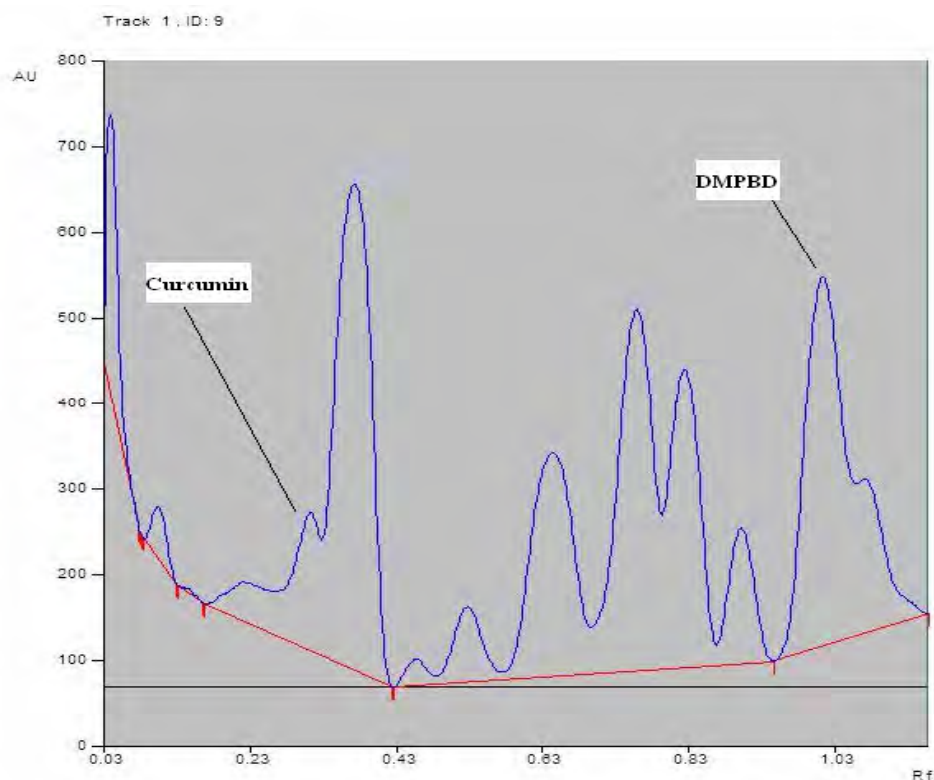
รูปที่ 15 TLC fingerprint ของตัวอย่างกลุ่มที่ 2 หมายเลข 43 ที่ 254 nm



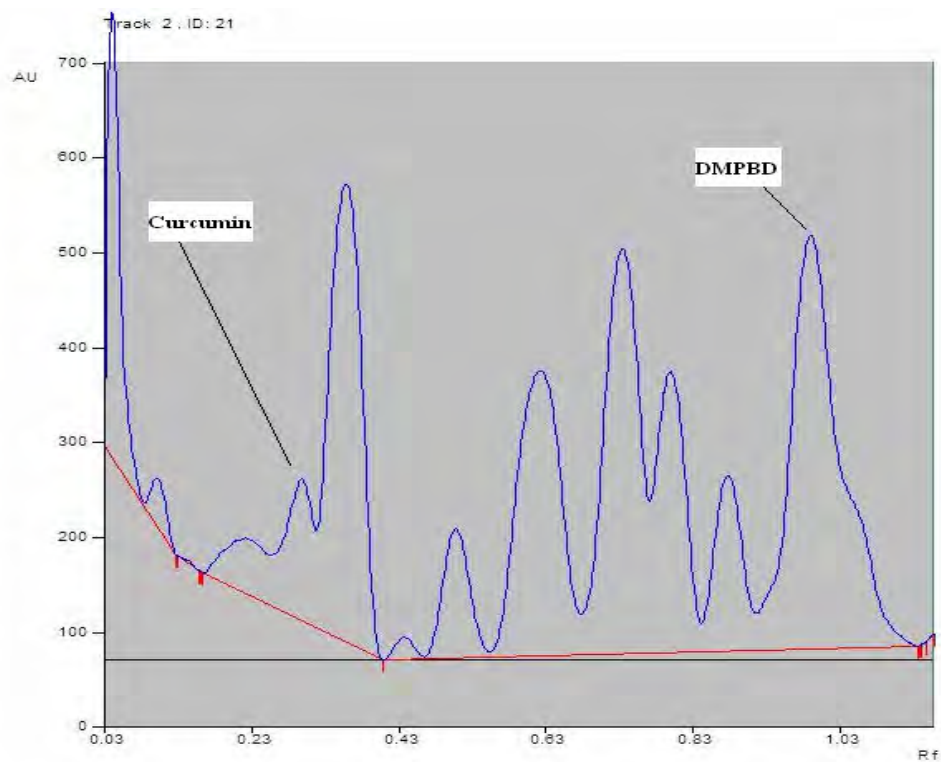
รูปที่ 16 TLC fingerprint ของตัวอย่างกลุ่มที่ 2 หมายเลข 48 ที่ 254 nm



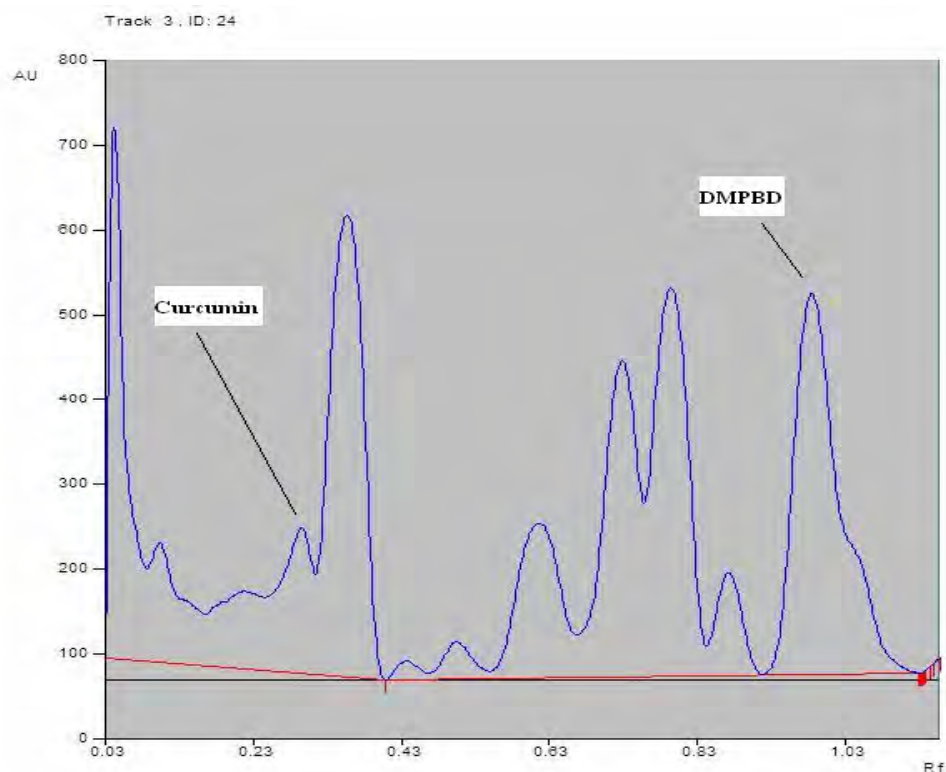
รูปที่ 17 TLC fingerprint ของตัวอย่างกลุ่มที่ 2 หมายเลข 89 ที่ 254 nm



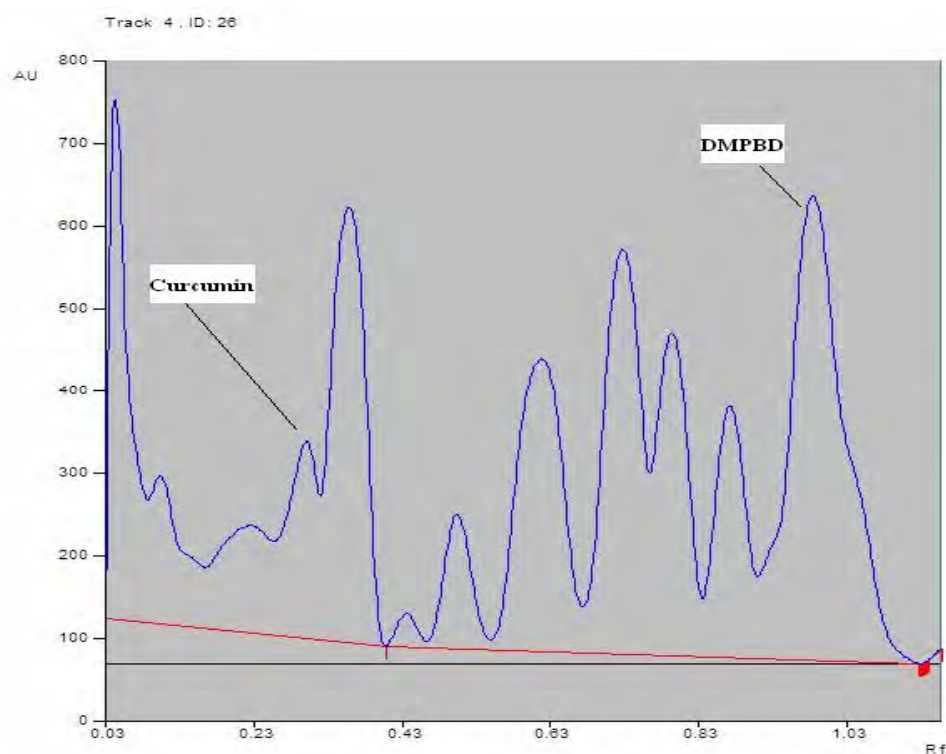
รูปที่ 18 TLC fingerprint ของตัวอย่างกลุ่มที่ 3 หมายเลข 9 ที่ 254 nm



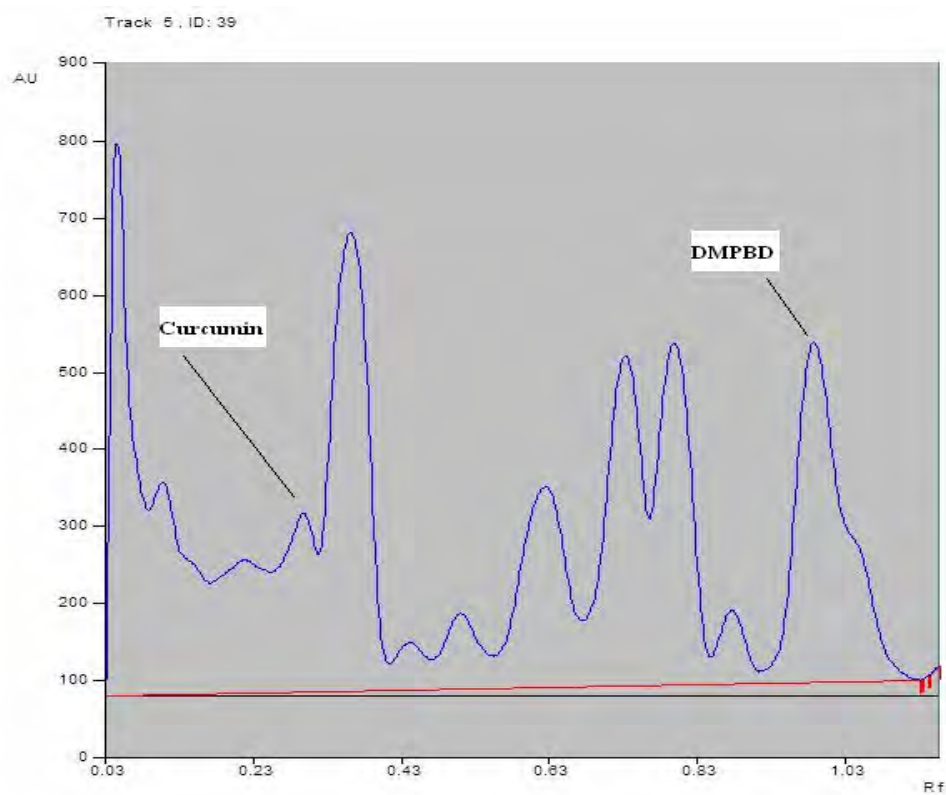
รูปที่ 19 TLC fingerprint ของตัวอย่างกลุ่มที่ 3 หมายเลข 21 ที่ 254 nm



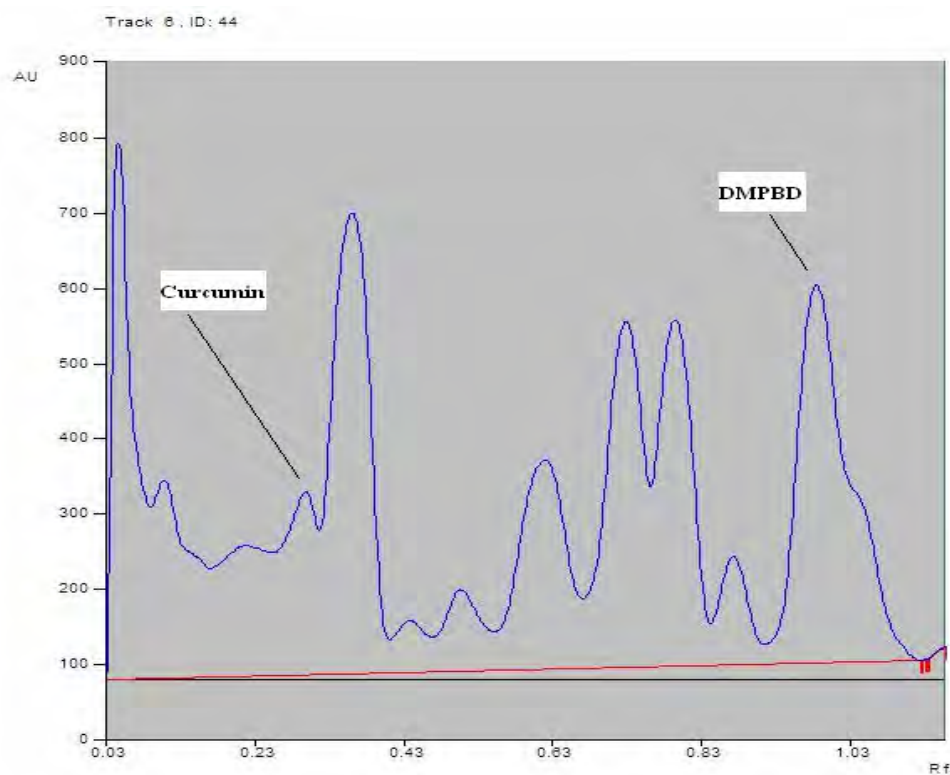
รูปที่ 20 TLC fingerprint ของตัวอย่างกลุ่มที่ 3 หมายเลข 24 ที่ 254 nm



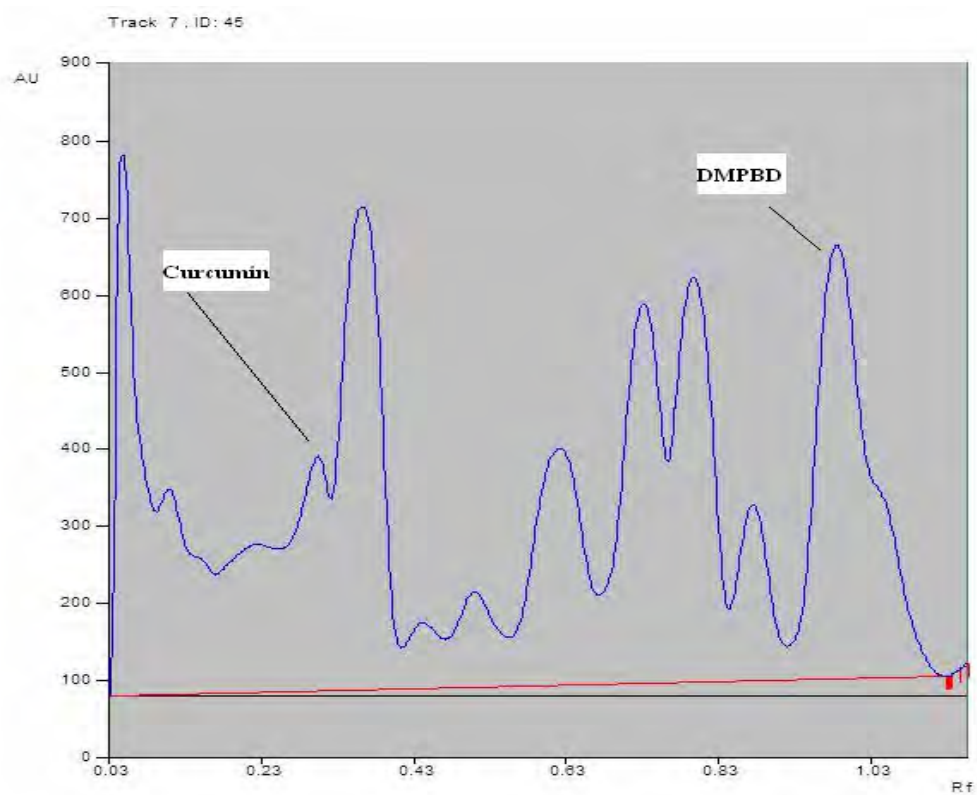
รูปที่ 21 TLC fingerprint ของตัวอย่างกลุ่มที่ 3 หมายเลข 26 ที่ 254 nm



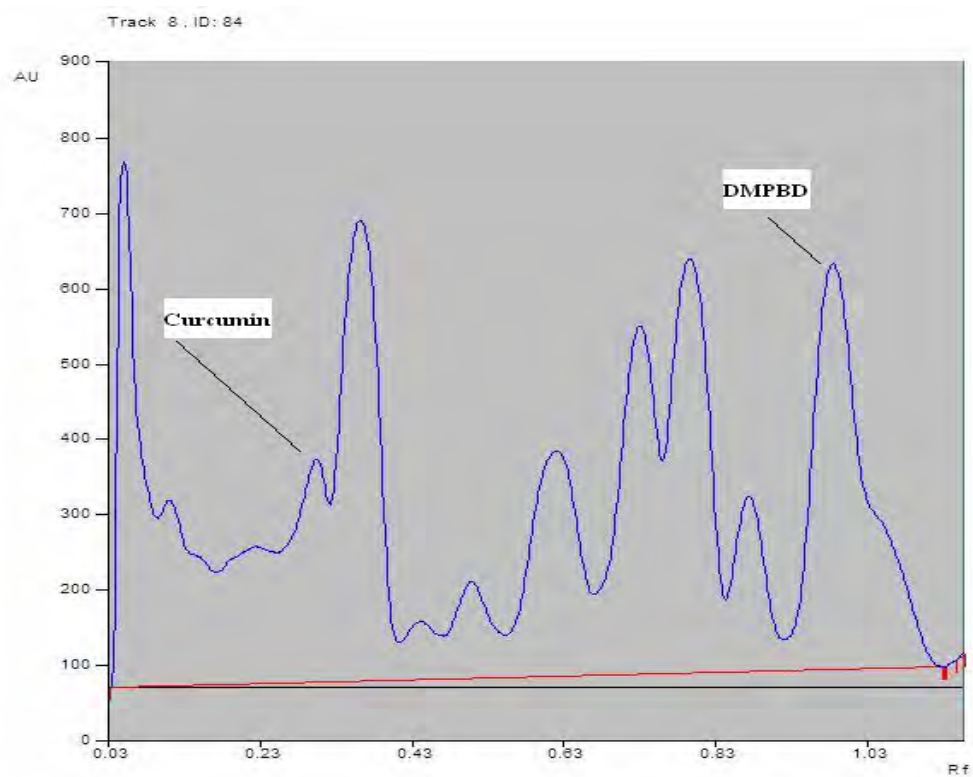
รูปที่ 22 TLC fingerprint ของตัวอย่างกลุ่มที่ 3 หมายเลข 39 ที่ 254 nm



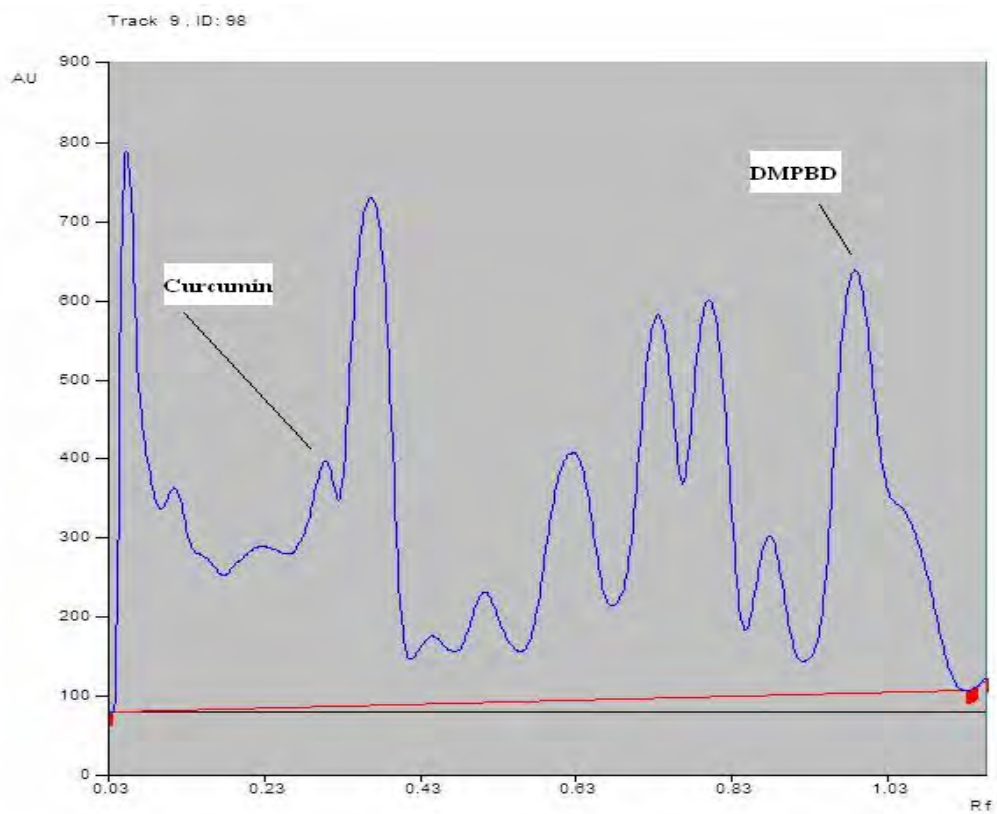
รูปที่ 23 TLC fingerprint ของตัวอย่างกลุ่มที่ 3 หมายเลข 44 ที่ 254 nm



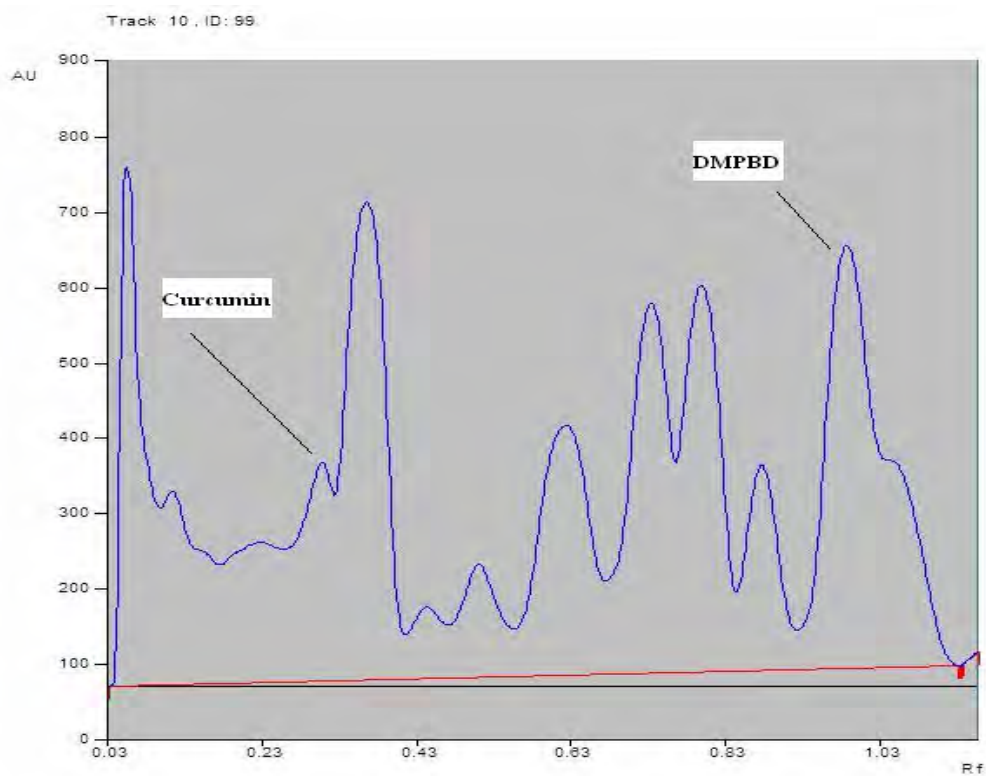
รูปที่ 24 TLC fingerprint ของตัวอย่างกลุ่มที่ 3 หมายเลข 45 ที่ 254 nm



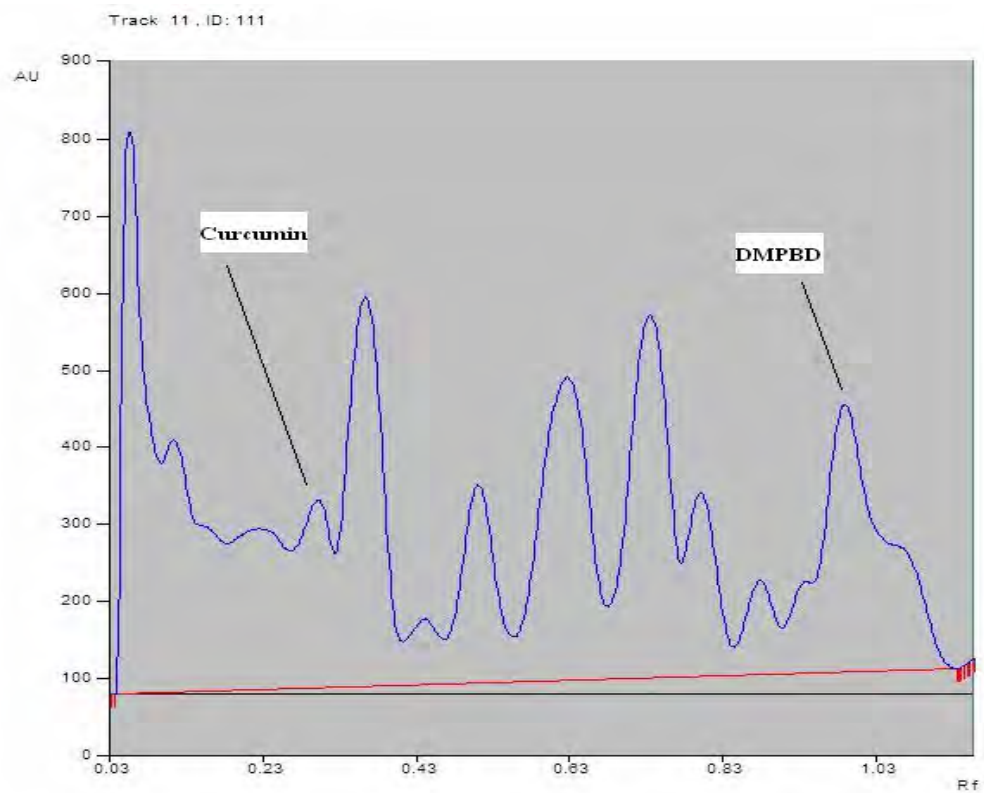
รูปที่ 25 TLC fingerprint ของตัวอย่างกลุ่มที่ 3 หมายเลข 84 ที่ 254 nm



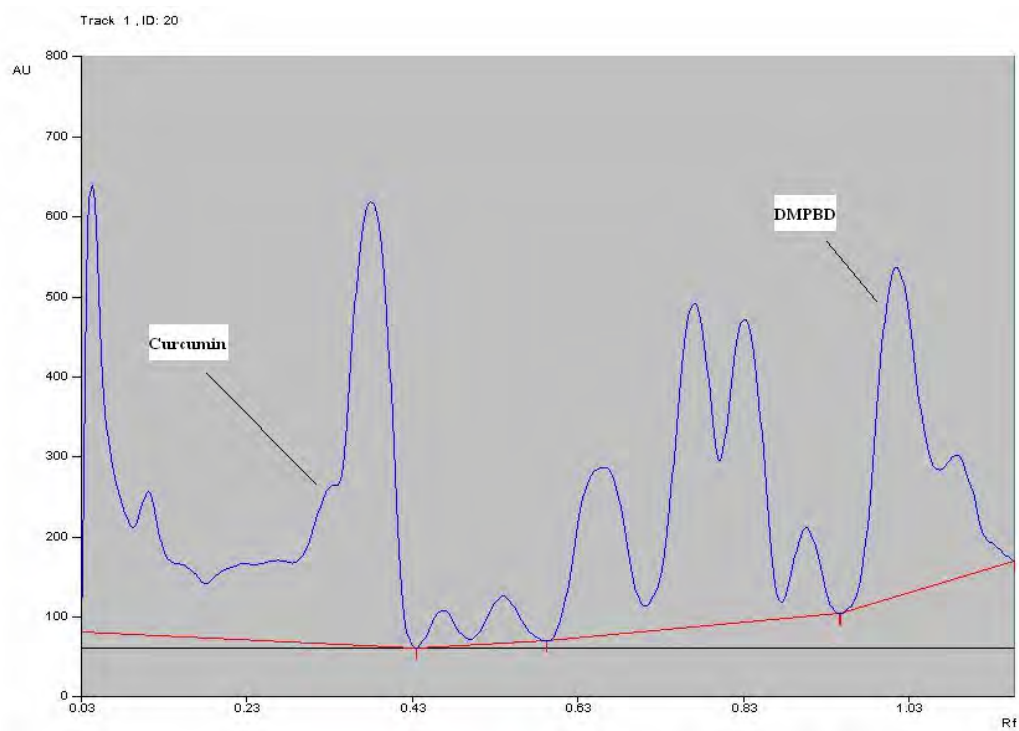
รูปที่ 26 TLC fingerprint ของตัวอย่างกลุ่มที่ 3 หมายเลข 98 ที่ 254 nm



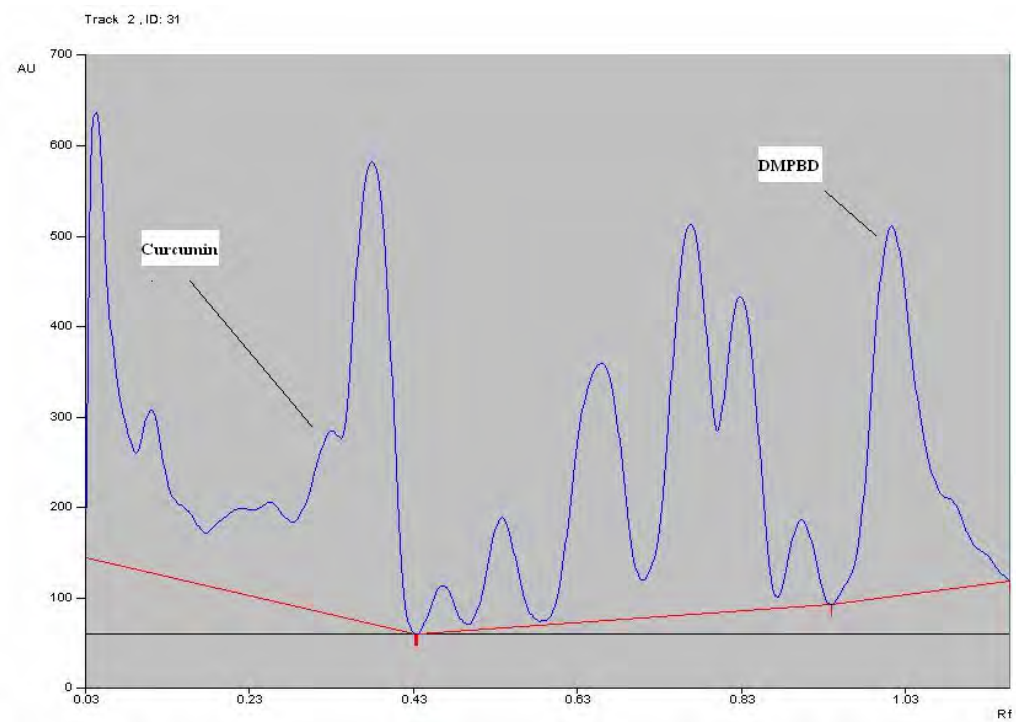
รูปที่ 27 TLC fingerprint ของตัวอย่างกลุ่มที่ 3 หมายเลข 99 ที่ 254 nm



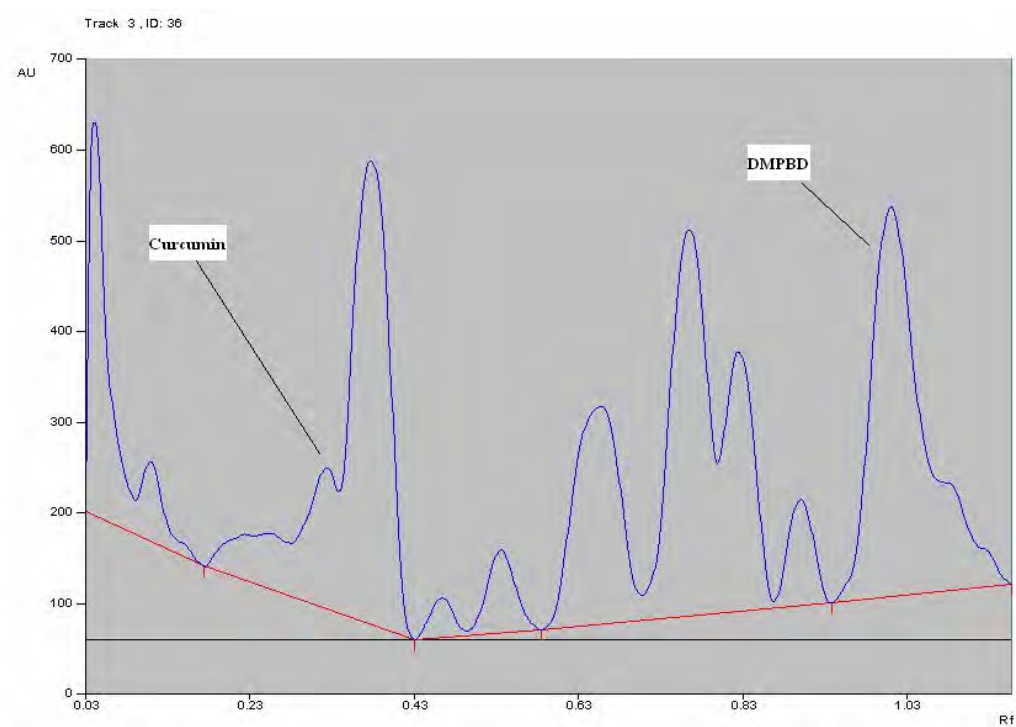
รูปที่ 28 TLC fingerprint ของตัวอย่างกลุ่มที่ 3 หมายเลข 111 ที่ 254 nm



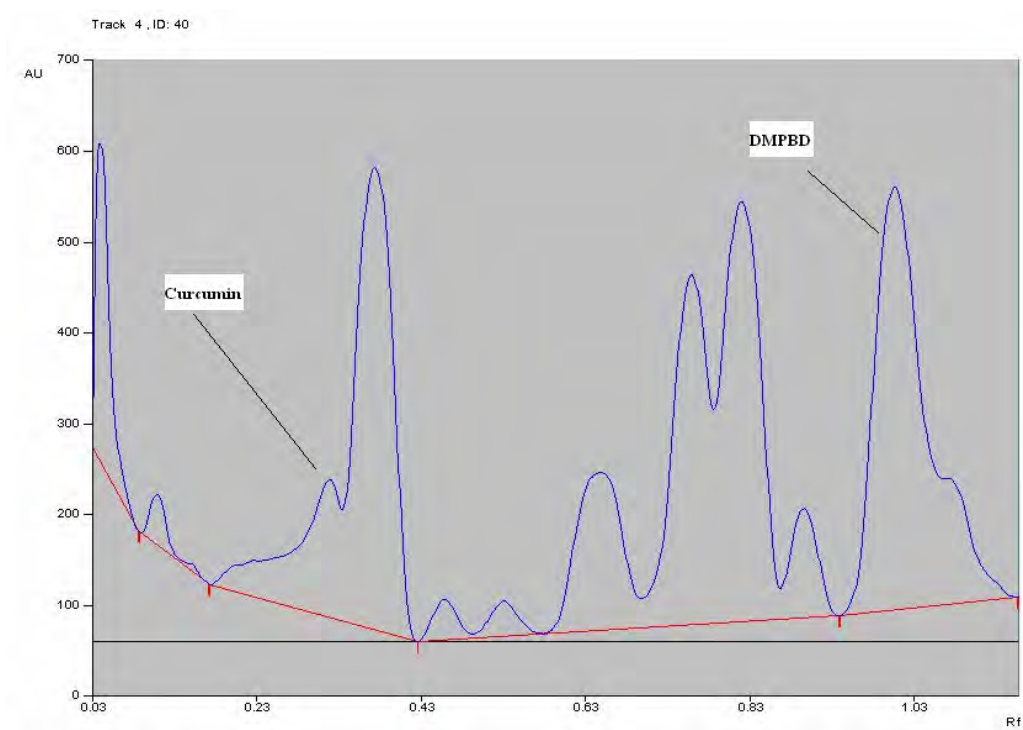
รูปที่ 29 TLC fingerprint ของตัวอย่างกลุ่มที่ 4 หมายเลข 20 ที่ 254 nm



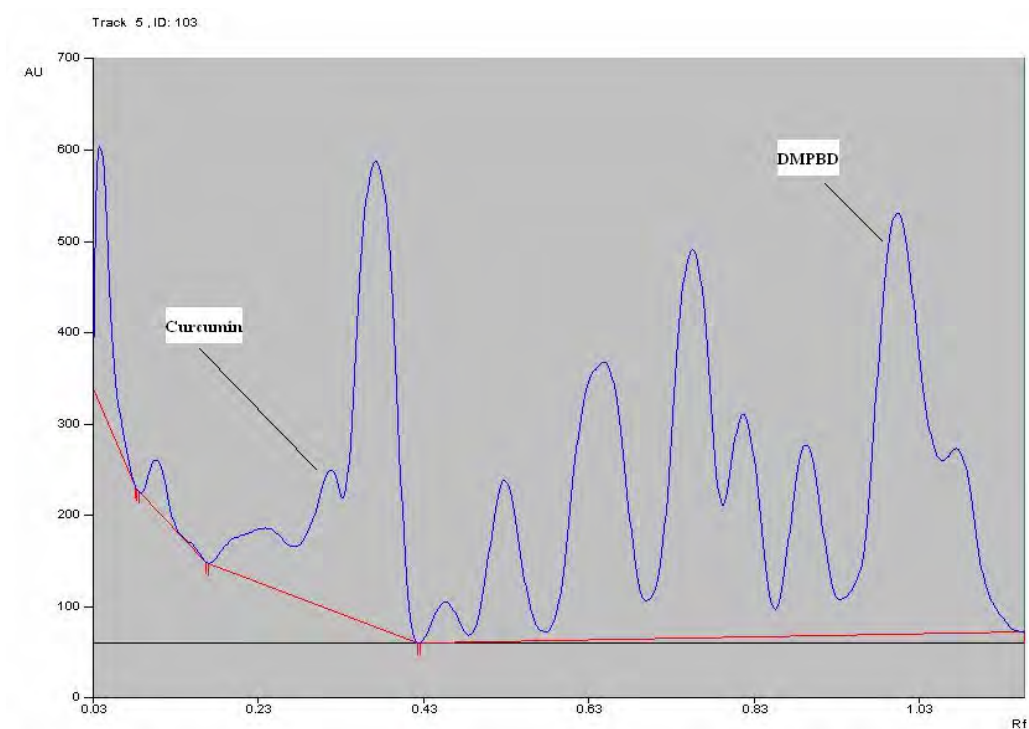
รูปที่ 30 TLC fingerprint ของตัวอย่างกลุ่มที่ 4 หมายเลข 31 ที่ 254 nm



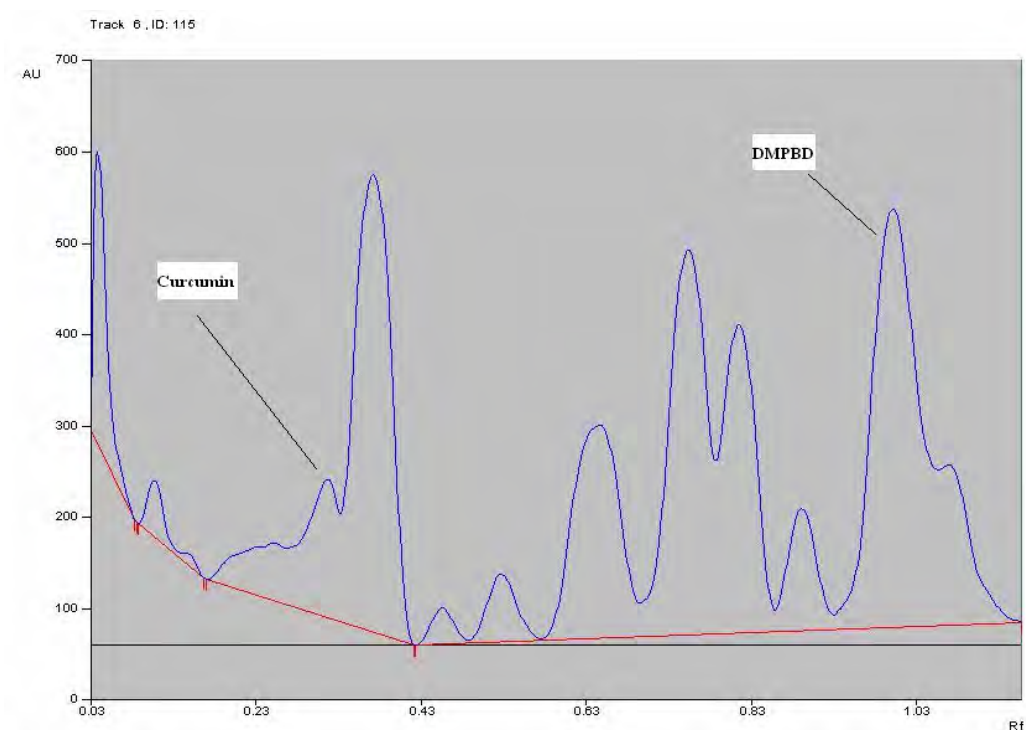
รูปที่ 31 TLC fingerprint ของตัวอย่างกลุ่มที่ 4 หมายเลข 36 ที่ 254 nm



รูปที่ 32 TLC fingerprint ของตัวอย่างกลุ่มที่ 4 หมายเลข 40 ที่ 254 nm



รูปที่ 33 TLC fingerprint ของตัวอย่างกลุ่มที่ 4 หมายเลข 103 ที่ 254 nm



รูปที่ 34 TLC fingerprint ของตัวอย่างกลุ่มที่ 4 หมายเลข 115 ที่ 254 nm

3. การเตรียมสารมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ด้วย HPTLC

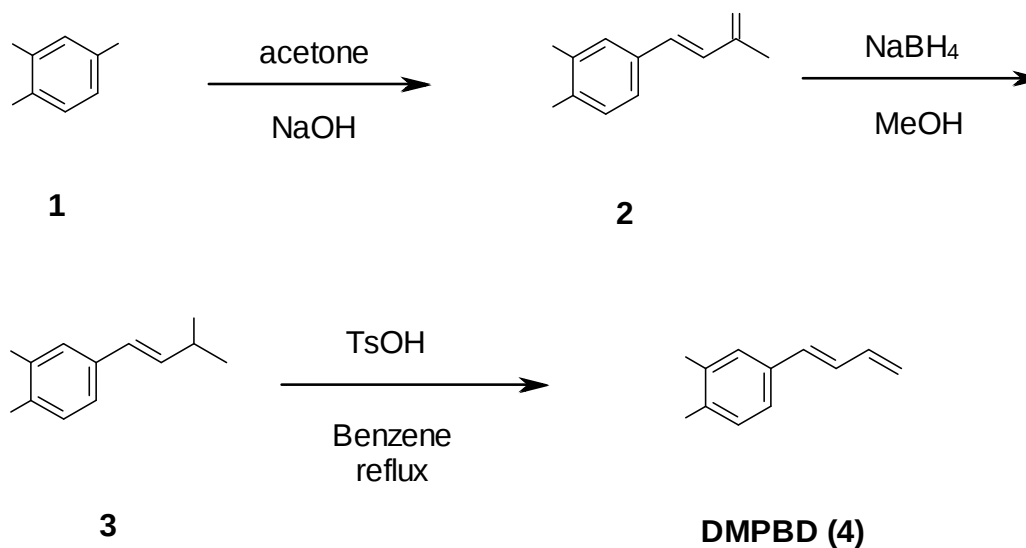
3.1 การเตรียมสารมาตรฐาน curcumin

จากการนำผงของไพล (*Zingiber cassumunar*)หนัก 500 กรัมมาหมักกับ hexane 2 ลิตรเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นกรองและเก็บสารสกัดไว้ นำกากที่เหลือจากการกรองมาหมักกับ hexane จำนวน 2 ลิตร เป็นเวลา 2 วันแล้วกรอง นำสารสกัดมารวมกับสารสกัดครั้งแรก นำไประเหยเอาตัวทำละลายออกโดย rotary evaporator ได้สารสกัดหยาบ (crude hexane extract) 21.1 กรัม สารสกัดดังกล่าวได้ถูกนำมาแยกต่อยด้วยเทคนิค column chromatography (silica gel 60, 0.063-0.200) โดยมีตัวทำละลายเป็น hexane-ethyl acetate (60:40) สามารถแยกสารสีส้ม ได้ 151 มิลลิกรัม มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 186-188 °C และได้เปรียบเทียบกับข้อมูล NMR จากวารสาร พบว่า ตรงกับสาร curcumin

3.2 การเตรียมสารมาตรฐาน DMPBD (Dimethoxyphenylbutadiene)

การสังเคราะห์จะใช้ 3 ขั้นตอนดังนี้ ปฏิกิริยาแรกคือการทำปฏิกิริยา aldol condensation ระหว่าง 3,4-dimethoxybenzaldehyde กับ acetone ในด่าง ได้เป็นสาร enone (2)

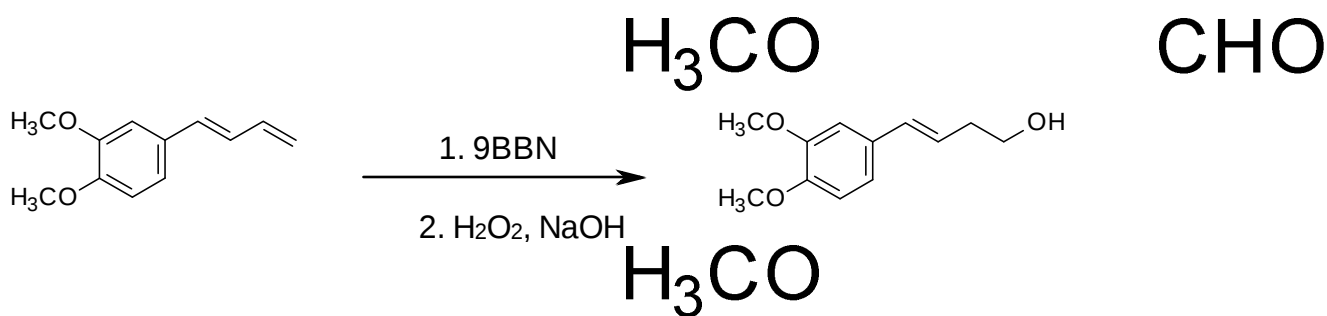
ซึ่งหมู่คีโตนจะถูกเปลี่ยนไปเป็นหมู่แอลกอฮอล์ ได้เป็นสาร (*E*)-4-(3',4'-dimethoxyphenyl) butane-2-ol (3) จากนั้น alcohol (3) จะถูกเปลี่ยนไปเป็น diene (4) หรือสาร DMPBD โดยใช้ปฏิกิริยาการขจัด (elimination) ได้เป็นสาร DMPBD (4) จำนวน 300 มิลลิกรัม ดังแผนภูมิที่ 3



แผนภูมิที่ 3 การเตรียมสารมาตรฐาน DMPBD

3.3 การเตรียมสารมาตรฐาน compound D

ขั้นตอนการสังเคราะห์คือการเติมหมู่ไฮดรอกซิลลงตรงปลายของพันธะคู่ ซึ่งต้องอาศัยปฏิกิริยา hydroboration โดยใช้ 9-BBN และออกซิไดซ์ด้วย H_2O_2 ในด่าง จะทำให้ได้สาร D หรือ compound D ในการเตรียมใช้สารละลายของ DMPBD 220 มิลลิกรัม ทำปฏิกิริยา hydroboration-oxidation ได้สาร compound D 147 มิลลิกรัม ดังแผนภูมิที่ 4



แผนภูมิที่ 4 การเตรียมสารมาตรฐาน compound D

4. การ validate วิธีวิเคราะห์

4.1 การ validate วิธีวิเคราะห์สาร DMPBD

4.1.1 Linearity

พบว่าสาร DMPBD มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงระหว่างความเข้มข้น กับ พื้นที่ใต้พีคในช่วง 144 - 576 ng/spot และมีสมการเส้นตรงเป็น $y = 7.729x + 677.5$ โดยมีค่า Correlation coefficient (r^2) เท่ากับ 0.9978

4.1.2 Precision

จากการทดลองพบว่า ค่า intraday precision ที่ความเข้มข้น 178, 356, 534 ng/spot มีค่าเท่ากับ 1.78, 0.87 และ 0.37% ตามลำดับ ค่า interday precision ที่ความเข้มข้น 178, 356, 534 ng/spot มีค่าเท่ากับ 1.72, 0.30 และ 0.39% ตามลำดับ

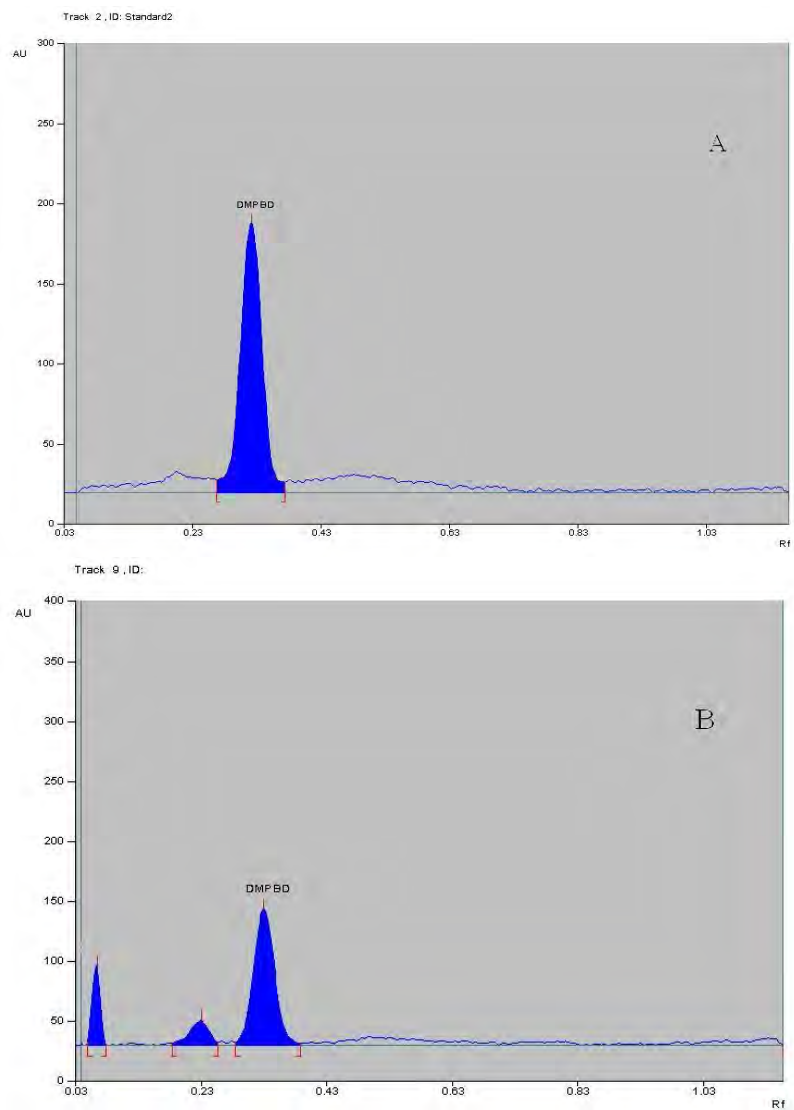
4.1.3 Accuracy

จากการทดลองพบว่า % recovery โดยการทำ standard addition ที่ 3 ระดับความเข้มข้น มีค่า % recovery เฉลี่ยเท่ากับ 103.1%

4.1.4 Limit of detection and Limit of quantitation

จากการทดลองพบว่า Limit of detection (LOD) และ Limit of quantitation (LOQ) มีค่าเท่ากับ 10 และ 40 ng

4.1.5 Robustness จากการทดลองพบว่า การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของตัวทำละลาย (composition of mobile phase) มีค่า 1.34 %RSD การเปลี่ยนแปลงปริมาณของ mobile phase มีค่า 0.94 %RSD การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (temperature) มีค่า 0.89 %RSD และการเปลี่ยนแปลงระยะเวลาของการอิ่มตัวของ chamber (chamber saturation time) มีค่า 0.67 %RSD



รูปที่ 35. Densitograms ของ DMPBD standard (A) และ *Z. cassumunar* extracts (B)

ตารางที่ 1 สรุปผลของ method validation parameters ของ DMPBD โดยวิธี TLC-densitometric method

Parameter	Result
Linear range	144-576 ng/spot
Linear regression equation	$y = 7.729x + 677.5^a$
Correlation coefficient (r^2)	0.9978
Limit of quantitation, ng	40
Limit of detection, ng	10
Specificity	specific

^a x คือปริมาณของ DMPBD ในหน่วย ng, y คือ peak area ที่ 289 nm

ตารางที่ 2 Intraday และ interday precision ของ DMPBD^a

Concentration ng/spot	Intraday precision, %	Interday precision, %
178	1.78	1.72
356	0.87	0.30
534	0.37	0.39

^a RSD, % (n=3)

ตารางที่ 3 Recovery study ของ DMPBD

Serial No	Amount present in the extract, ng	Amount added, ng	Amount found ^a , ng	Recovery ^{a,b} , %
1	142.66	156.3	160.75 ± 2.30	102.8 ± 1.45
2	210.85	288.0	300.51 ± 0.96	104.3 ± 0.34
3	210.85	361.0	369.29 ± 8.63	102.3 ± 2.42

^a Expressed as mean standard deviation (SD, n = 3)

^b Average recovery = 103.1%

ตารางที่ 4 Robustness ของ DMPBD

Parameter	RSD % in peak area DMPBD
Mobile phase composition	1.34
Amount of mobile phase	0.94
Temperature	0.86
Chamber saturation time	0.67

4.2 การ validate วิเคราะห์สาร compound D

4.2.1 Linearity

พบว่าสาร compound D มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีคในช่วง 84-420 ng/spot และมีสมการเส้นตรงเป็น $y = 7.798x + 2530.968$ โดยมีค่า Correlation coefficient (r^2) เท่ากับ 0.9958

4.2.2 Precision

จากการทดลองพบว่า ค่า intraday precision ที่ความเข้มข้น 168, 252, 336 ng/spot มีค่าเท่ากับ 0.44, 0.21 และ 0.65% ตามลำดับ ค่า interday precision ที่ความเข้มข้น 168, 252, 336 ng/spot มีค่าเท่ากับ 1.45, 2.07 และ 0.79% ตามลำดับ

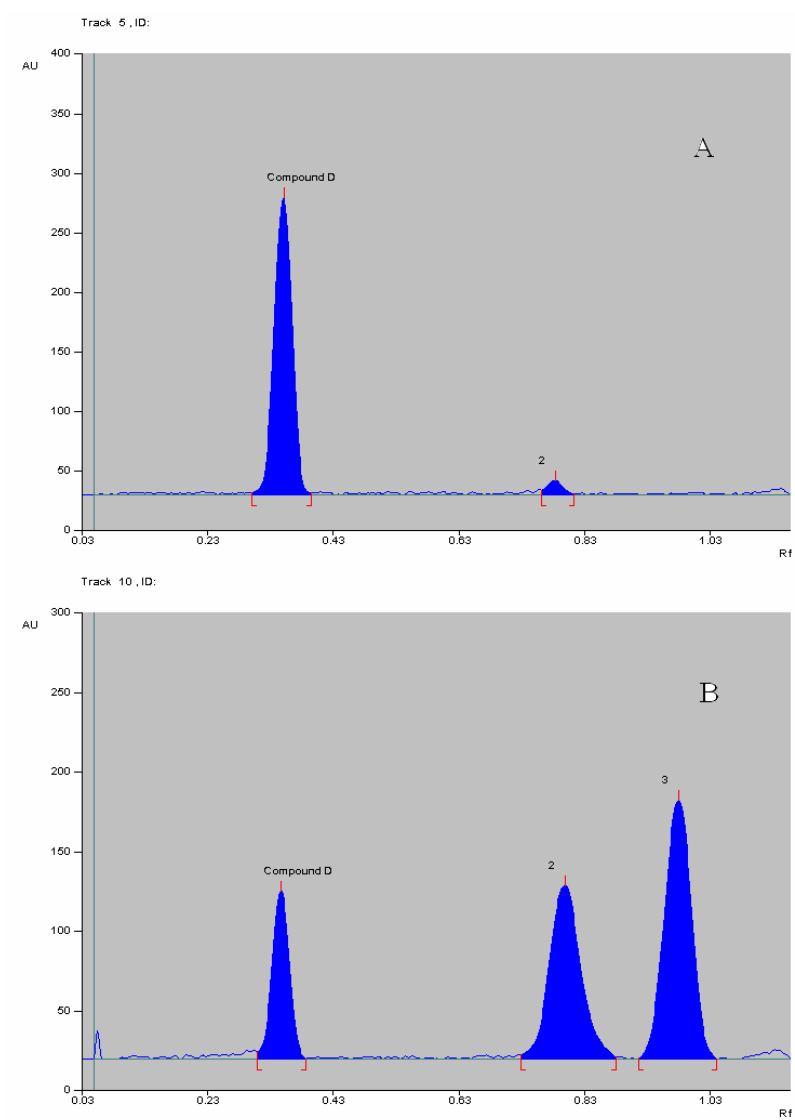
4.2.3 Accuracy

จากการทดลองพบว่า % recovery โดยการทำ standard addition ที่ 3 ระดับความเข้มข้น มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 98.31%

4.2.4 Limit of detection and Limit of quantitation

จากการทดลองพบว่า Limit of detection (LOD) และ Limit of quantitation (LOQ) มีค่าเท่ากับ 10 และ 40 ng

4.2.5 Robustness จากการทดลองพบว่า การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของตัวทำละลาย (composition of mobile phase) มีค่า 1.46 %RSD การเปลี่ยนแปลงปริมาณของ mobile phase มีค่า 1.69 %RSD การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (temperature) มีค่า 1.34 %RSD และการเปลี่ยนแปลงระยะเวลาของการอิ่มตัวของ chamber (chamber saturation time) มีค่า 0.56 % RSD



รูปที่ 36. Densitograms ของ compound D standard (A) และ *Z. cassumunar* extracts (B)

ตารางที่ 4 สรุปผลของ method validation parameters ของ compound D โดยวิธี TLC-densitometric method

Parameter	Result
Linear range	84-420 ng/spot
Linear regression equation	$y = 7.798x + 2530.968^a$
Correlation coefficient (r^2)	0.9958
Limit of quantitation, ng	40
Limit of detection, ng	10
Specificity	specific

^a x คือปริมาณของ compound D ในหน่วย ng, y คือ peak area ที่ 254 nm

ตารางที่ 5 Intraday และ interday precision ของ compound D^a

Concentration ng/spot	Intraday precision, %	Interday precision, %
168	0.44	1.45
252	0.21	2.07
336	0.65	0.79

^a RSD, % (n=3)

ตารางที่ 6 Recovery study ของ compound D

Serial No	Amount present in the extract, ng	Amount added, ng	Amount found ^a , ng	Recovery ^{a,b} , %
1	142.3	84.0	83.05 ± 0.86	98.85 ± 1.04
2	142.3	168.0	164.31 ± 0.96	97.89 ± 1.64
3	137.0	210.0	206.22 ± 0.41	98.19 ± 0.20

^a Expressed as mean standard deviation (SD, n = 3)

^b Average recovery = 98.31%

ตารางที่ 7 Robustness ของ compound D

Parameter	RSD % in peak area DMPBD
Mobile phase composition	1.46
Amount of mobile phase	1.69
Temperature	1.34
Chamber saturation time	0.56

4.3 การ validate วิเคราะห์สาร curcumin

4.3.1 Linearity

พบว่าสาร curcumin มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงระหว่างความเข้มข้น กับ พื้นที่ใต้พีคในช่วง 96-224 ng/spot และมีสมการเส้นตรงเป็น $y = -55.47 + 143.53x$ โดยมีค่า Correlation coefficient (r^2) เท่ากับ 0.9926

4.3.2 Precision

จากการทดลองพบว่า ค่า intraday precision ที่ความเข้มข้น 96, 128, 160 ng/spot มีค่าเท่ากับ 0.49, 1.51 และ 1.43% ตามลำดับ ค่า interday precision ที่ความเข้มข้น 96, 128, 160 ng/spot มีค่าเท่ากับ 0.44, 2.29 และ 0.78% ตามลำดับ

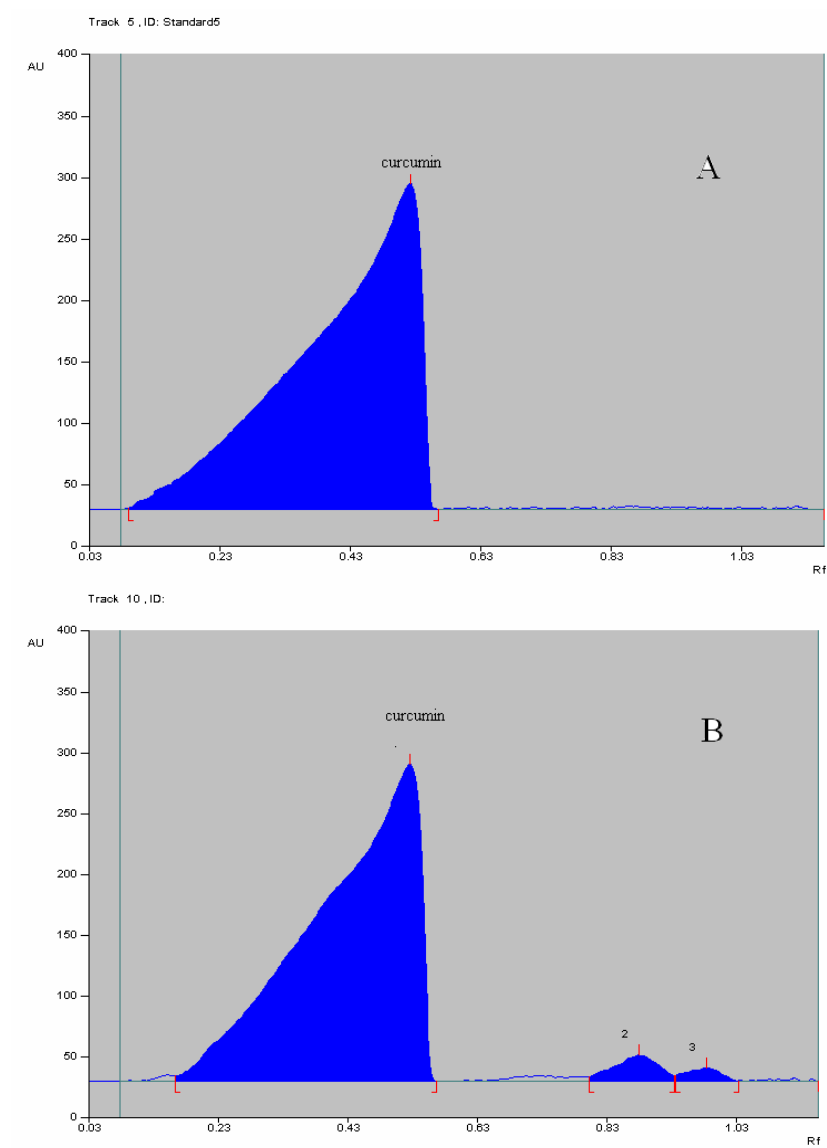
4.3.3 Accuracy

จากการทดลองพบว่า % recovery โดยการทำ standard addition ที่ 3 ระดับความเข้มข้น มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 101.2%

4.3.4 Limit of detection and Limit of quantitation

จากการทดลองพบว่า Limit of detection (LOD) และ Limit of quantitation (LOQ) มีค่าเท่ากับ 20 และ 70 ng

4.3.5 Robustness จากการทดลองพบว่า การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบ ของตัวทำละลาย (composition of mobile phase) มีค่า 0.68 %RSD การเปลี่ยนแปลงปริมาณของ mobile phase มีค่า 1.68 %RSD การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (temperature) มีค่า 0.79 %RSD และการเปลี่ยนแปลงระยะเวลาของการอิ่มตัวของ chamber (chamber saturation time) มีค่า 1.48 %RSD



รูปที่ 37. Densitograms ของ curcumin standard (A) และ *Z. cassumunar* extracts (B)

ตารางที่ 8 สรุปผลของ **method validation parameters** ของ **curcumin** โดยวิธี **TLC-densitometric method**

Parameter	Result
Linear range	96-224 ng/spot
Linear regression equation	$y = -55.47 + 143.53x^a$
Correlation coefficient (r^2)	0.9926
Limit of quantitation, ng	70
Limit of detection, ng	20
Specificity	specific

^a x คือปริมาณของ curcumin ในหน่วย ng, y คือ peak area ที่ 420 nm

ตารางที่ 9 Intraday และ interday precision ของ curcumin^a

Concentration ng/spot	Intraday precision, %	Interday precision, %
96	0.49	0.44
128	1.51	2.29
160	1.43	0.78

^a RSD, % (n=3)

ตารางที่ 10 Recovery study ของ curcumin

Serial No	Amount present in the extract, ng	Amount added, ng	Amount found ^a , ng	Recovery ^{a,b} , %
1	185.67	34.0	34.88 ± 0.95	102.6 ± 2.76
2	185.67	85.0	85.79 ± 1.19	101.0 ± 1.42
3	148.39	102.0	102.16 ± 5.2	100.1 ± 5.06

^a Expressed as mean standard deviation (SD, n = 3)

^b Average recovery = 101.2%

ตารางที่ 11 Robustness ของ curcumin

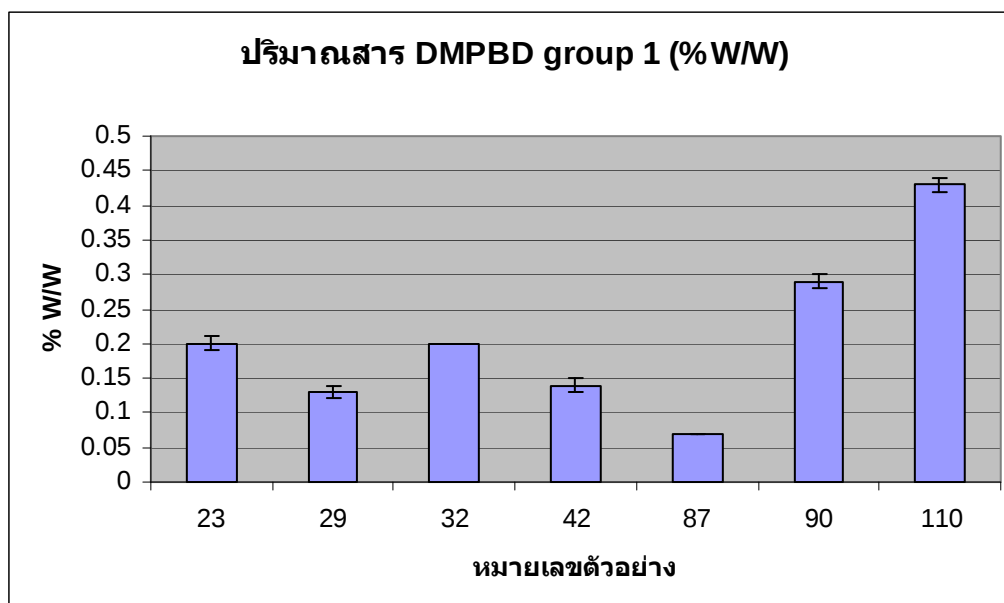
Parameter	RSD % in peak area DMPBD
Mobile phase composition	0.68
Amount of mobile phase	1.68
Temperature	0.79
Chamber saturation time	1.48

5. ผลการวิเคราะห์

5.1.1 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ DMPBD ในตัวอย่างไฟลกลุ่มที่ 1 ด้วยเครื่อง HPTLC

ตัวอย่าง กลุ่มที่ 1 หมายเลข	ปริมาณสารสกัด (%W/W)*	ปริมาณ DMPBD (%W/W in dried powder)*	ปริมาณ DMPBD (%W/W in dried powder) ค่าเฉลี่ย*
23	10.82 ± 0.11	0.20 ± 0.01	0.21 ± 0.11
29	5.17 ± 0.03	0.13 ± 0.01	
32	10.88 ± 0.24	0.20 ± 0.00	
42	11.10 ± 0.18	0.14 ± 0.01	
87	11.86 ± 1.67	0.07 ± 0.00	
90	12.11 ± 0.36	0.29 ± 0.01	
110	11.02 ± 0.32	0.43 ± 0.01	

* ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SD (n = 3)

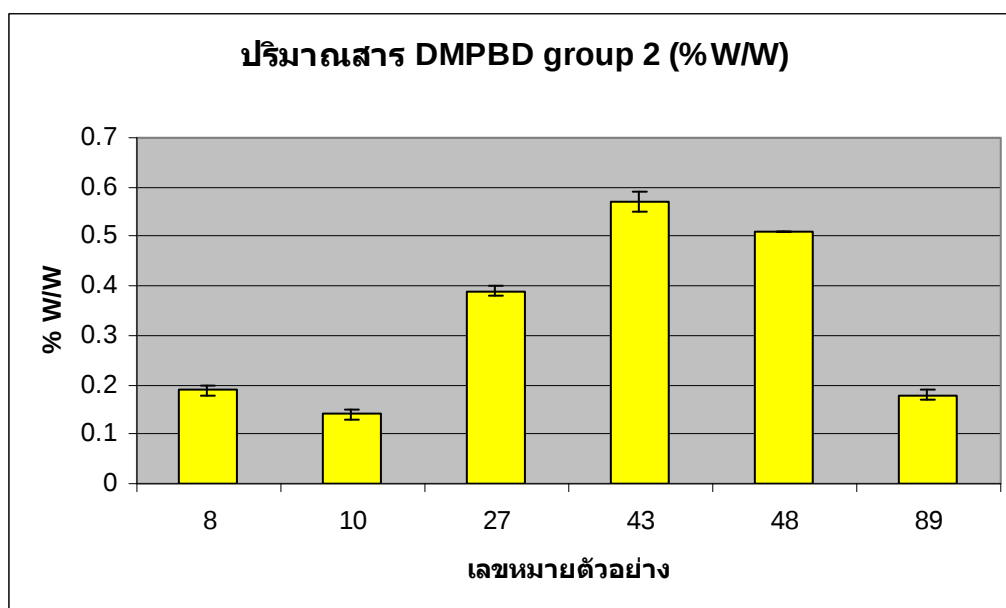


กราฟรูปที่ 1 กราฟแสดงปริมาณของสาร DMPBD ในตัวอย่างไฟลกลุ่มที่ 1

5.1.2 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ DMPBD ในตัวอย่างไฟลกลุ่มที่ 2 ด้วยเครื่อง HPTLC

ตัวอย่าง กลุ่มที่ 2	ปริมาณสารสกัด (%W/W)*	ปริมาณ DMPBD (%W/W in dried powder)*	ปริมาณ DMPBD (%W/W in dried powder) ค่าเฉลี่ย*
8	8.65 ± 0.19	0.19 ± 0.01	0.33 ± 0.17
10	7.84 ± 0.23	0.14 ± 0.01	
27	8.32 ± 0.22	0.39 ± 0.00	
43	8.98 ± 0.16	0.57 ± 0.01	
48	9.20 ± 0.11	0.51 ± 0.00	
89	8.95 ± 0.07	0.18 ± 0.01	

* ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SD (n = 3)

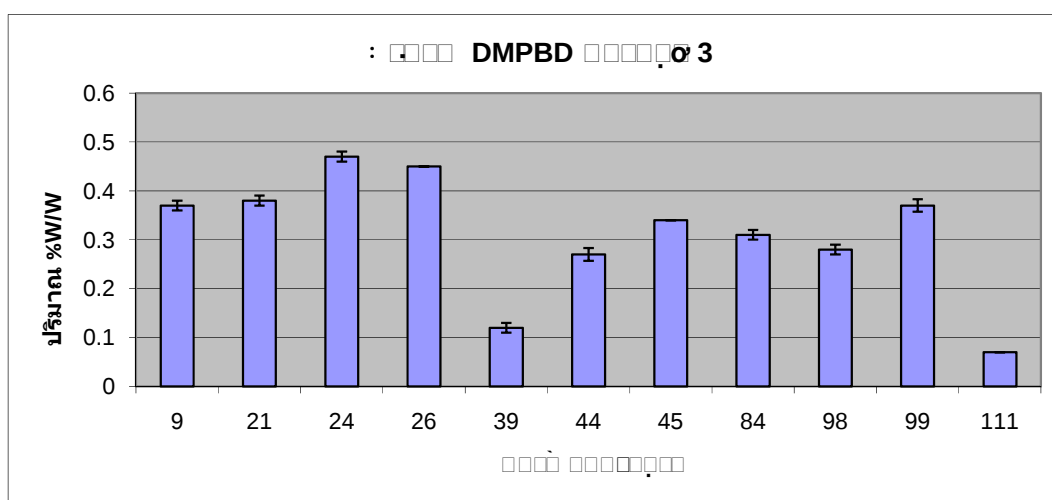


กราฟรูปที่ 2 กราฟแสดงปริมาณของสาร DMPBD ในตัวอย่างไฟลกลุ่มที่ 2

5.1.3 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ DMPBD ในตัวอย่างไฟลกลุ่มที่ 3 ด้วยเครื่อง HPTLC

ตัวอย่าง กลุ่มที่ 2	ปริมาณสารสกัด (%W/W)*	ปริมาณ DMPBD (%W/W in dried powder)*	ปริมาณ DMPBD (%W/W in dried powder) ค่าเฉลี่ย*
9	6.68 ± 0.31	0.37 ± 0.01	0.31 ± 0.12
21	4.49 ± 0.28	0.38 ± 0.01	
24	5.41 ± 0.24	0.47 ± 0.01	
26	4.13 ± 0.07	0.45 ± 0.00	
39	3.81 ± 0.16	0.12 ± 0.01	
44	3.17 ± 0.15	0.27 ± 0.01	
45	5.60 ± 0.15	0.34 ± 0.00	
84	4.38 ± 0.14	0.31 ± 0.01	
98	6.26 ± 0.14	0.28 ± 0.01	
99	4.14 ± 0.12	0.37 ± 0.01	
111	3.18 ± 0.08	0.07 ± 0.00	

* ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SD (n = 3)

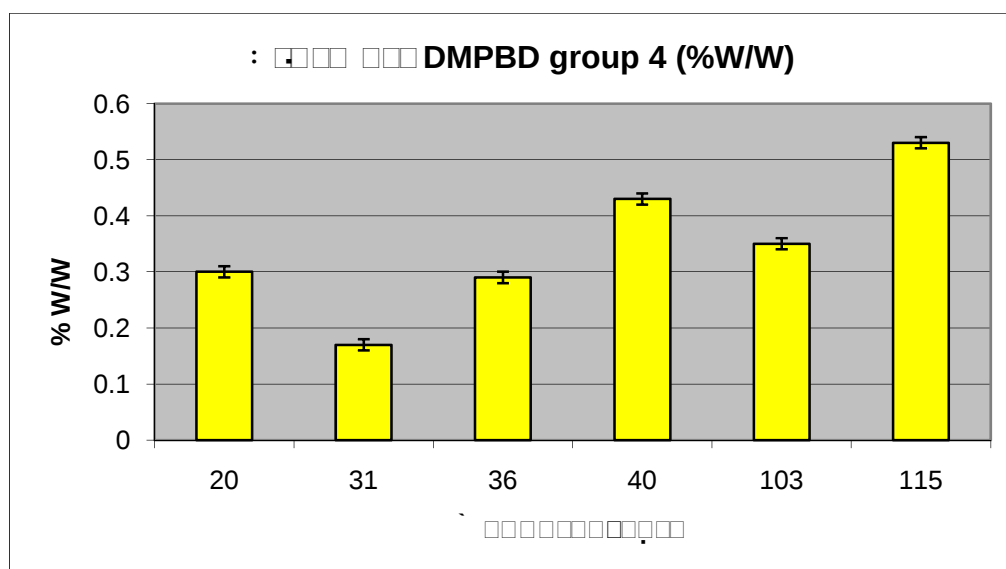


กราฟรูปที่ 3 กราฟแสดงปริมาณของสาร DMPBD ในตัวอย่างไฟลกลุ่มที่ 3

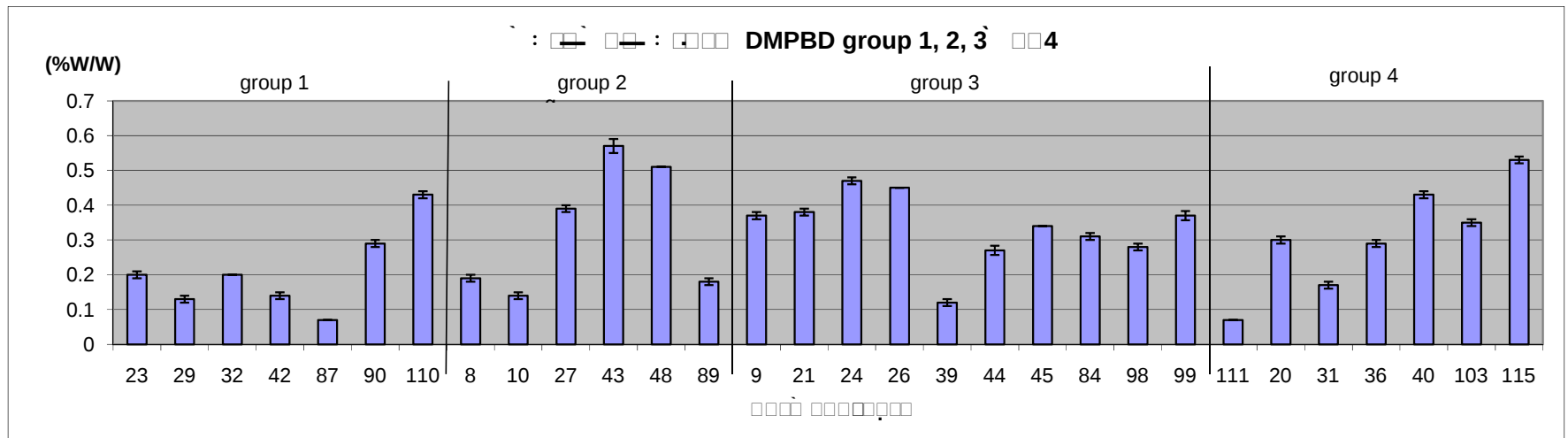
5.1.4 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ DMPBD ในตัวอย่างไฟลกลุ่มที่ 4 ด้วยเครื่อง HPTLC

ตัวอย่าง กลุ่มที่ 2	ปริมาณสารสกัด (%W/W)*	ปริมาณ DMPBD (%W/W in dried powder)*	ปริมาณ DMPBD (%W/W in dried powder) ค่าเฉลี่ย*
20	9.86 ± 0.16	0.30 ± 0.01	0.34 ± 0.12
31	6.23 ± 0.12	0.17 ± 0.01	
36	8.38 ± 0.13	0.29 ± 0.01	
40	10.35 ± 0.11	0.43 ± 0.01	
103	8.65 ± 0.08	0.35 ± 0.01	
115	8.56 ± 0.14	0.53 ± 0.01	

* ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SD (n = 3)



กราฟรูปที่ 4 กราฟแสดงปริมาณของสาร DMPBD ในตัวอย่างไฟลกลุ่มที่ 4



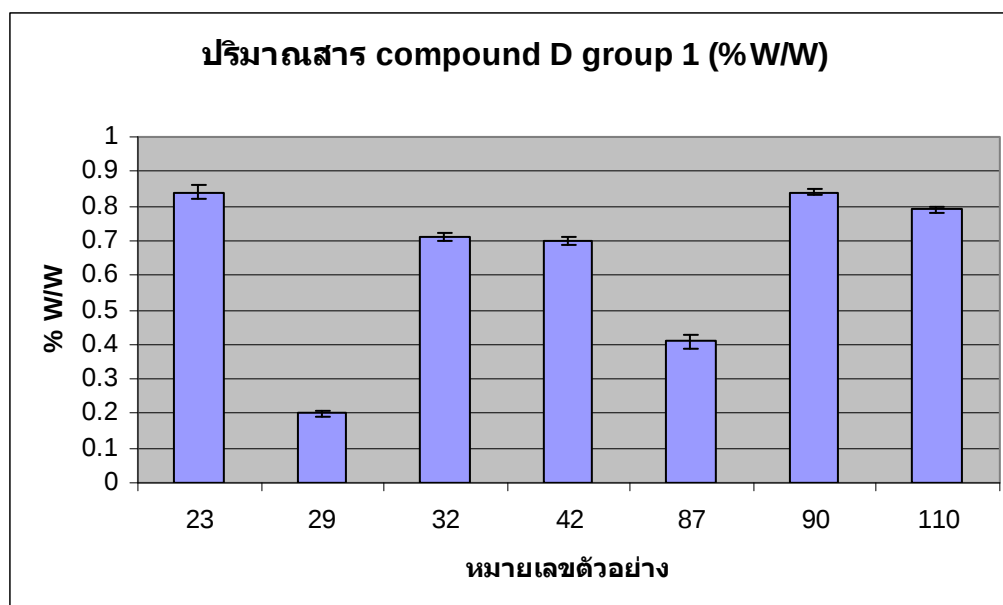
กราฟรูปที่ 5 กราฟแสดงปริมาณของสาร DMPBD ในตัวอย่างไฟลกลุ่มที่ 1, 2, 3 และ 4

สำหรับสาร DMPBD ในไฟลกลุ่มที่ 1 พบปริมาณสาร DMPBD อยู่ในช่วง 0.13 – 0.43 % W/W ของผงไฟล และมีค่าเฉลี่ยที่ 0.21 ± 0.11 %W/W โดยจะพบปริมาณของ DMPBD สูงในตัวอย่างหมายเลข 90 และ 110 สำหรับไฟลในกลุ่มที่ 2 พบปริมาณสาร DMPBD ในช่วง 0.14 – 0.57 %W/W ของผงไฟล และมีค่าเฉลี่ยที่ 0.33 ± 0.17 %W/W จะพบปริมาณของ DMPBD สูงในตัวอย่างส่วนใหญ่โดยเฉพาะหมายเลข 43 และ 48 สำหรับไฟลในกลุ่มที่ 3 พบปริมาณสาร DMPBD ในช่วง 0.07 – 0.47 %W/W ของผงไฟล และมีค่าเฉลี่ยที่ 0.31 ± 0.12 %W/W จะพบปริมาณของ DMPBD สูงในตัวอย่างส่วนใหญ่โดยเฉพาะหมายเลข 24 และ 26 สำหรับไฟลในกลุ่มที่ 4 พบปริมาณสาร DMPBD ในช่วง 0.17 – 0.53 %W/W ของผงไฟล และมีค่าเฉลี่ยที่ 0.34 ± 0.12 %W/W จะพบปริมาณของ DMPBD สูงในตัวอย่างส่วนใหญ่โดยเฉพาะหมายเลข 40 และ 115

5.2.1 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ compound D ในตัวอย่างไฟลกลุ่มที่ 1 ด้วยเครื่อง HPTLC

ตัวอย่าง กลุ่มที่ 1	ปริมาณสารสกัด (%W/W)*	ปริมาณ compound D (%W/W in dried powder)*	ปริมาณ compound D (%W/W in dried powder) ค่าเฉลี่ย*
23	10.82 ± 0.11	0.84 ± 0.02	0.64 ± 0.23
29	5.17 ± 0.03	0.20 ± 0.01	
32	10.88 ± 0.24	0.71 ± 0.00	
42	11.10 ± 0.18	0.70 ± 0.01	
87	11.86 ± 1.67	0.41 ± 0.02	
90	12.11 ± 0.36	0.84 ± 0.01	
110	11.02 ± 0.32	0.79 ± 0.01	

* ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SD (n = 3)

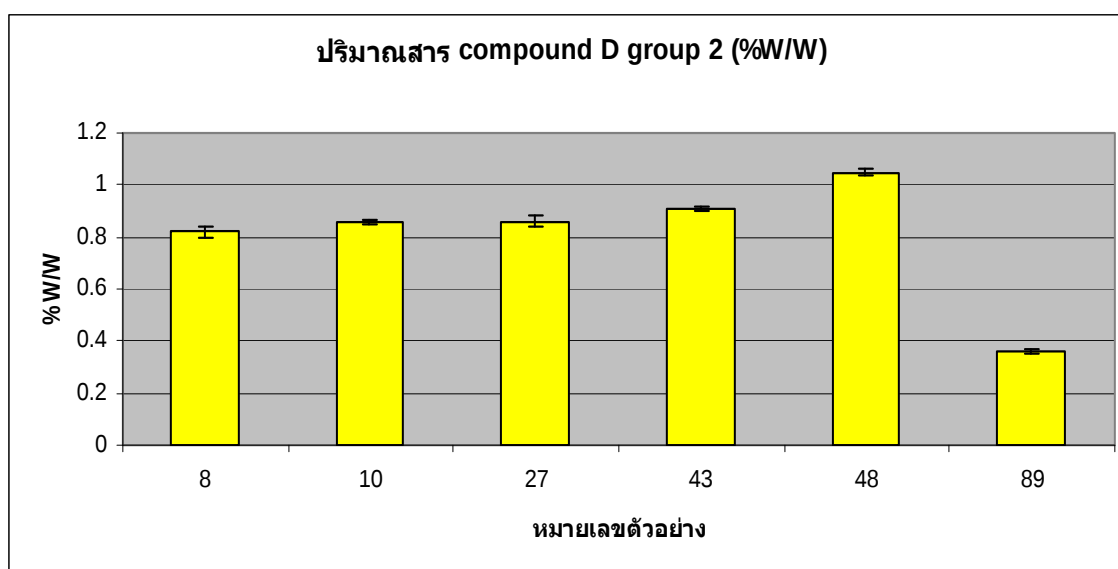


กราฟรูปที่ 6 กราฟแสดงปริมาณของสาร compound D ในตัวอย่างไฟลกลุ่มที่ 1

5.2.2 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ compound D ในตัวอย่างไฟลกลุ่มที่ 2 ด้วยเครื่อง HPTLC

ตัวอย่าง กลุ่มที่ 2	ปริมาณสารสกัด (%W/W)*	ปริมาณ compound D (%W/W in dried powder)*	ปริมาณ compound D (%W/W in dried powder) ค่าเฉลี่ย*
8	8.65 ± 0.19	0.82 ± 0.02	0.81 ± 0.22
10	7.84 ± 0.23	0.86 ± 0.01	
27	8.32 ± 0.22	0.86 ± 0.02	
43	8.98 ± 0.16	0.91 ± 0.01	
48	9.20 ± 0.11	1.05 ± 0.01	
89	8.95 ± 0.07	0.36 ± 0.01	

* ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SD (n = 3)

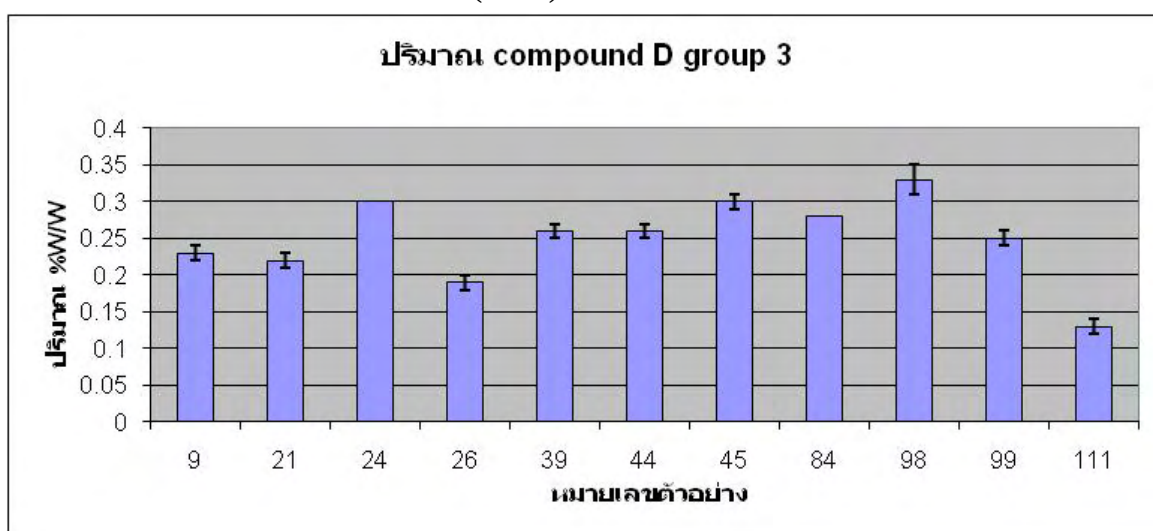


กราฟรูปที่ 7 กราฟแสดงปริมาณของสาร compound D ในตัวอย่างไฟลกลุ่มที่ 2

5.2.3 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ compound D ในตัวอย่างไฟลกลุ่มที่ 3 ด้วยเครื่อง HPTLC

ตัวอย่าง กลุ่มที่ 2	ปริมาณสารสกัด (%W/W)*	ปริมาณ compound D (%W/W in dried powder)*	ปริมาณ compound D (%W/W in dried powder) ค่าเฉลี่ย*
9	6.68 ± 0.31	0.23 ± 0.01	0.25 ± 0.06
21	4.49 ± 0.28	0.22 ± 0.01	
24	5.41 ± 0.24	0.30 ± 0.01	
26	4.13 ± 0.07	0.19 ± 0.01	
39	3.81 ± 0.16	0.26 ± 0.11	
44	3.17 ± 0.15	0.26 ± 0.01	
45	5.60 ± 0.15	0.30 ± 0.00	
84	4.38 ± 0.14	0.28 ± 0.01	
98	6.26 ± 0.14	0.33 ± 0.02	
99	4.14 ± 0.12	0.25 ± 0.01	
111	3.18 ± 0.08	0.13 ± 0.00	

* ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SD (n = 3)

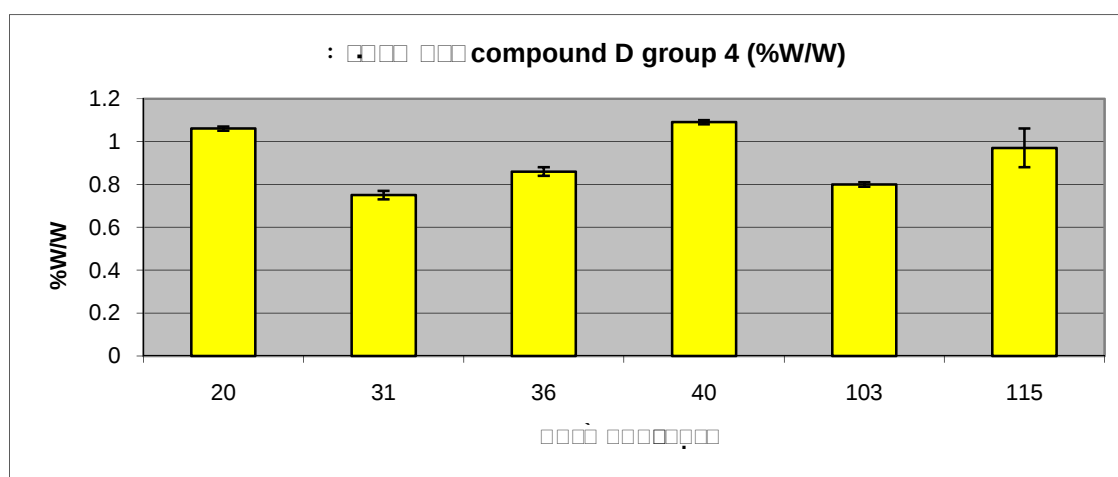


กราฟรูปที่ 8 กราฟแสดงปริมาณของสาร compound D ในตัวอย่างไฟลกลุ่มที่ 3

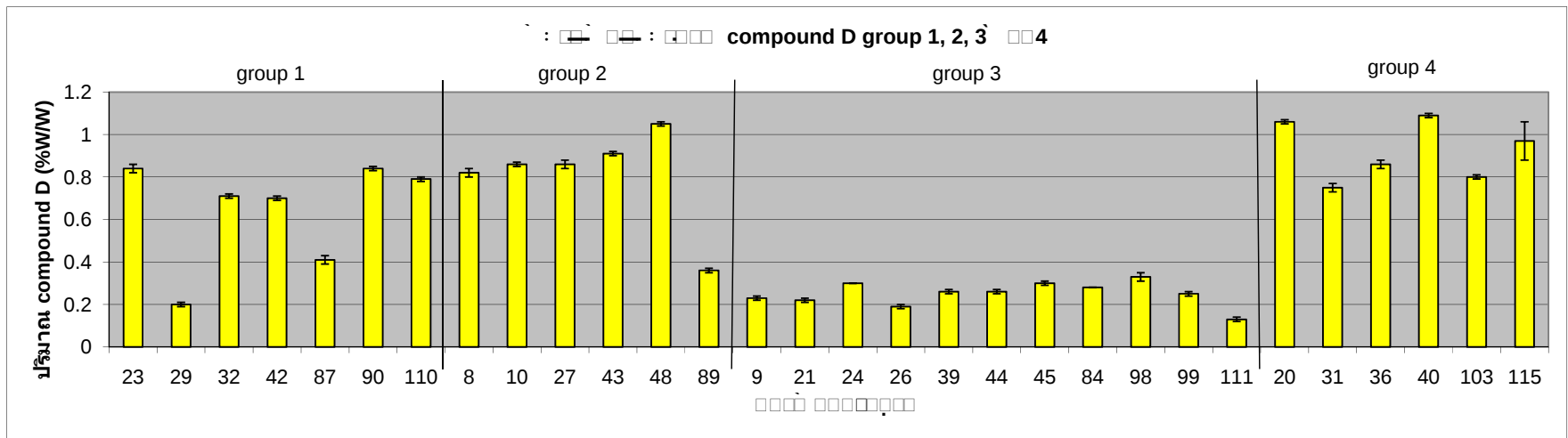
5.2.4 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ compound D ในตัวอย่างไฟลกลุ่มที่ 4 ด้วยเครื่อง HPTLC

ตัวอย่าง กลุ่มที่ 2	ปริมาณสารสกัด (%W/W)*	ปริมาณ compound D (%W/W in dried powder)*	ปริมาณ compound D (%W/W in dried powder) ค่าเฉลี่ย*
20	9.86 ± 0.16	1.06 ± 0.01	0.92 ± 0.14
31	6.23 ± 0.12	0.75 ± 0.02	
36	8.38 ± 0.13	0.86 ± 0.02	
40	10.35 ± 0.11	1.09 ± 0.01	
103	8.65 ± 0.08	0.80 ± 0.01	
115	8.56 ± 0.14	0.97 ± 0.09	

* ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SD (n = 3)



กราฟรูปที่ 9 กราฟแสดงปริมาณของสาร compound D ในตัวอย่างไฟลกลุ่มที่ 4



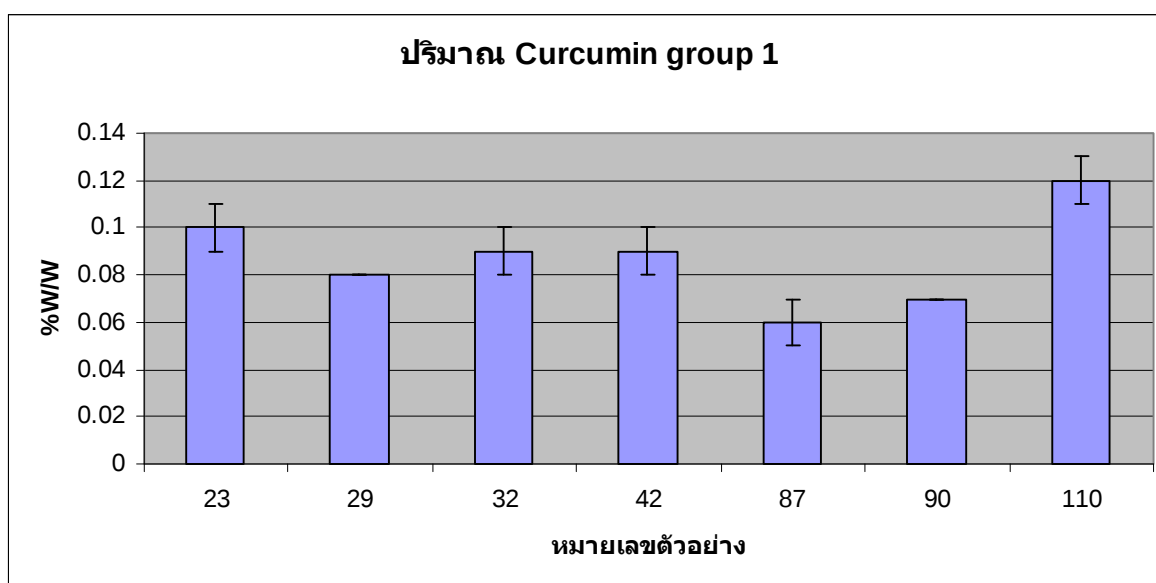
กราฟรูปที่ 10 กราฟแสดงปริมาณของสาร compound D ในตัวอย่างไฟลกลุ่มที่ 1, 2, 3 และ 4

ไพลในกลุ่มที่ 1 พบปริมาณสาร compound D ในช่วง 0.20 – 0.84 %W/W ของผงไพล และมีค่าเฉลี่ยที่ 0.64 ± 0.23 %W/W จะพบปริมาณของ compound D สูงในตัวอย่างหมายเลข 23, 90 และ 110 สำหรับไพลในกลุ่มที่ 2 พบปริมาณสาร compound D ในช่วง 0.36 – 1.05 %W/W ของผงไพล และมีค่าเฉลี่ยที่ 0.81 ± 0.22 %W/W จะพบปริมาณของ compound D สูงในตัวอย่างหมายเลข 43 และ 48 สำหรับไพลในกลุ่มที่ 3 พบปริมาณสาร compound D ในช่วง 0.13 – 0.33 %W/W ของผงไพล และมีค่าเฉลี่ยที่ 0.25 ± 0.06 %W/W จะพบปริมาณของ compound D สูงในตัวอย่างหมายเลข 24, 45 และ 98 สำหรับไพลในกลุ่มที่ 4 พบปริมาณสาร compound D ในช่วง 0.75 – 1.09 %W/W ของผงไพล และมีค่าเฉลี่ยที่ 0.92 ± 0.14 %W/W จะพบปริมาณของ compound D สูงในตัวอย่างหมายเลข 20, 40 และ 115

5.3.1 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ curcumin ในตัวอย่างไฟลกลุ่มที่ 1 ด้วยเครื่อง HPTLC

ตัวอย่าง กลุ่มที่ 1	ปริมาณสารสกัด (%W/W)*	ปริมาณ curcumin (%W/W in dried powder)*	ปริมาณ curcumin (%W/W in dried powder) ค่าเฉลี่ย*
23	10.82 ± 0.11	0.10 ± 0.01	0.09 ± 0.02
29	5.17 ± 0.03	0.08 ± 0.00	
32	10.88 ± 0.24	0.09 ± 0.01	
42	11.10 ± 0.18	0.09 ± 0.01	
87	11.86 ± 1.67	0.06 ± 0.01	
90	12.11 ± 0.36	0.07 ± 0.00	
110	11.02 ± 0.32	0.12 ± 0.01	

* ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SD (n = 3)

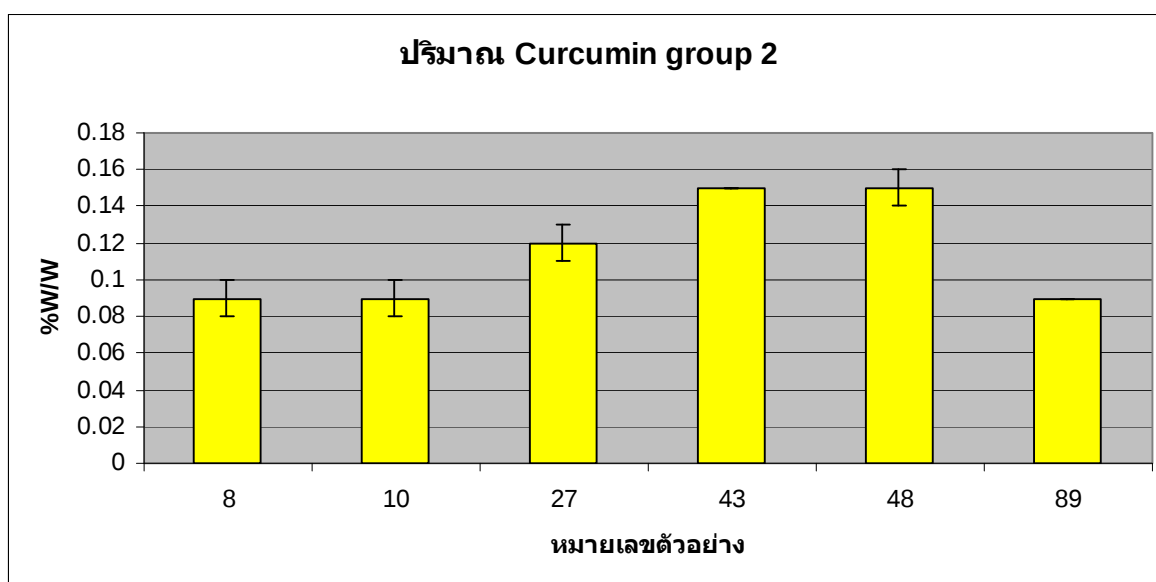


กราฟรูปที่ 11 กราฟแสดงปริมาณของสาร curcumin ในตัวอย่างไฟลกลุ่มที่ 1

5.3.2 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ curcumin ในตัวอย่างไฟลกลุ่มที่ 2 ด้วยเครื่อง HPTLC

ตัวอย่าง กลุ่มที่ 2	ปริมาณสารสกัด (%W/W)*	ปริมาณ curcumin (%W/W in dried powder)*	ปริมาณ curcumin (%W/W in dried powder) ค่าเฉลี่ย*
8	8.65 ± 0.19	0.09 ± 0.01	0.12 ± 0.03
10	7.84 ± 0.23	0.09 ± 0.01	
27	8.32 ± 0.22	0.12 ± 0.01	
43	8.98 ± 0.16	0.15 ± 0.00	
48	9.20 ± 0.11	0.15 ± 0.01	
89	8.95 ± 0.07	0.09 ± 0.00	

* ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SD (n = 3)

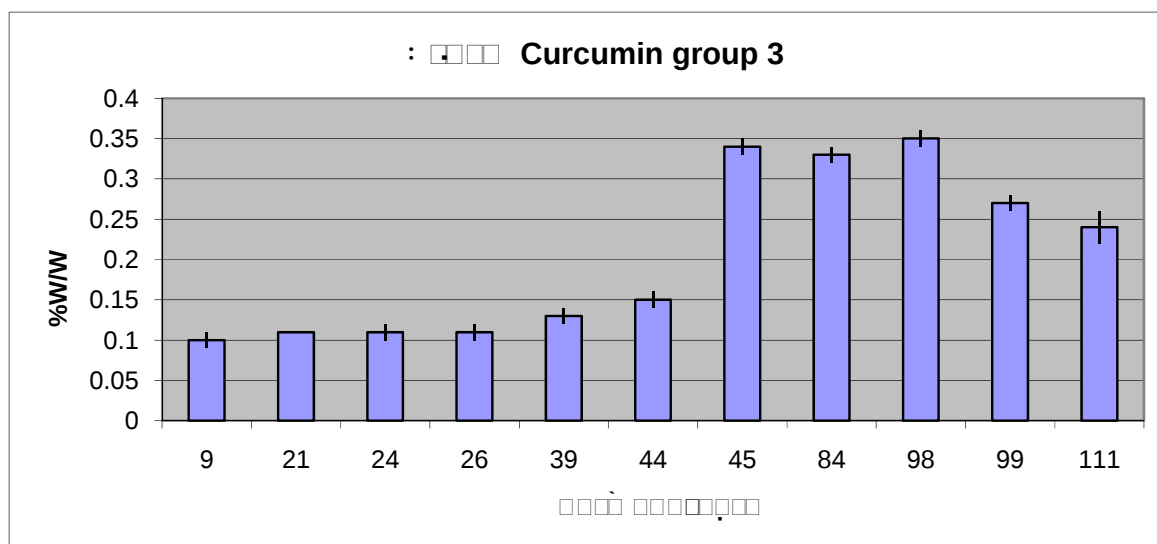


กราฟรูปที่ 12 กราฟแสดงปริมาณของสาร curcumin ในตัวอย่างไฟลกลุ่มที่ 2

5.3.3 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ curcumin ในตัวอย่างไฟลกลุ่มที่ 3 ด้วยเครื่อง HPTLC

ตัวอย่าง กลุ่มที่ 2	ปริมาณสารสกัด (%W/W)*	ปริมาณ curcumin (%W/W in dried powder)*	ปริมาณ curcumin (%W/W in dried powder) ค่าเฉลี่ย*
9	6.68 ± 0.31	0.10 ± 0.01	0.20 ± 0.10
21	4.49 ± 0.28	0.11 ± 0.00	
24	5.41 ± 0.24	0.11 ± 0.01	
26	4.13 ± 0.07	0.11 ± 0.01	
39	3.81 ± 0.16	0.13 ± 0.01	
44	3.17 ± 0.15	0.15 ± 0.01	
45	5.60 ± 0.15	0.34 ± 0.01	
84	4.38 ± 0.14	0.33 ± 0.01	
98	6.26 ± 0.14	0.35 ± 0.01	
99	4.14 ± 0.12	0.27 ± 0.01	
111	3.18 ± 0.08	0.24 ± 0.01	

* ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SD (n = 3)

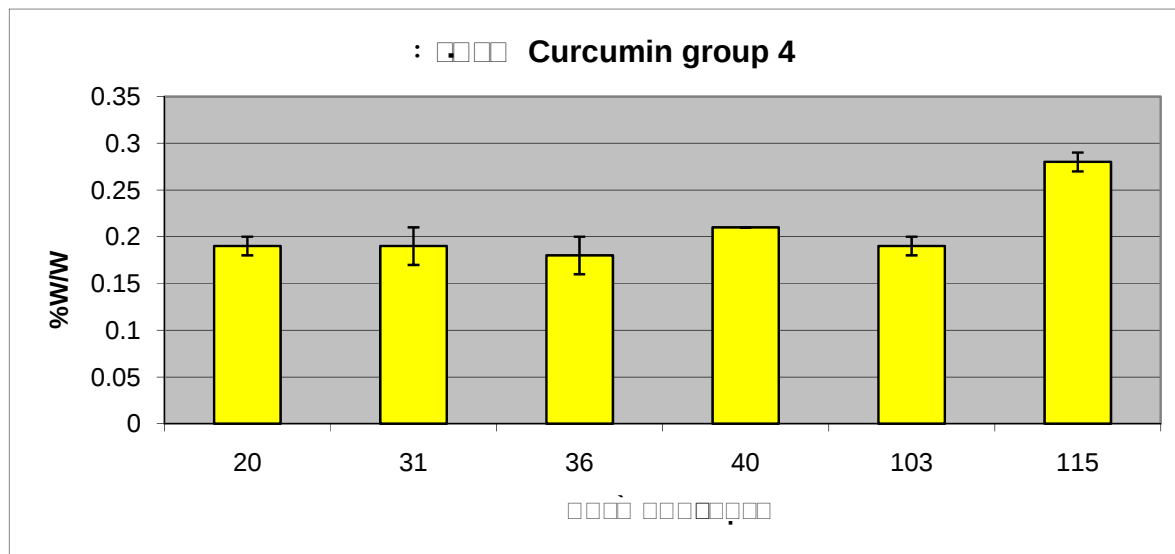


กราฟรูปที่ 13 กราฟแสดงปริมาณของสาร curcumin ในตัวอย่างไฟลกลุ่มที่ 3

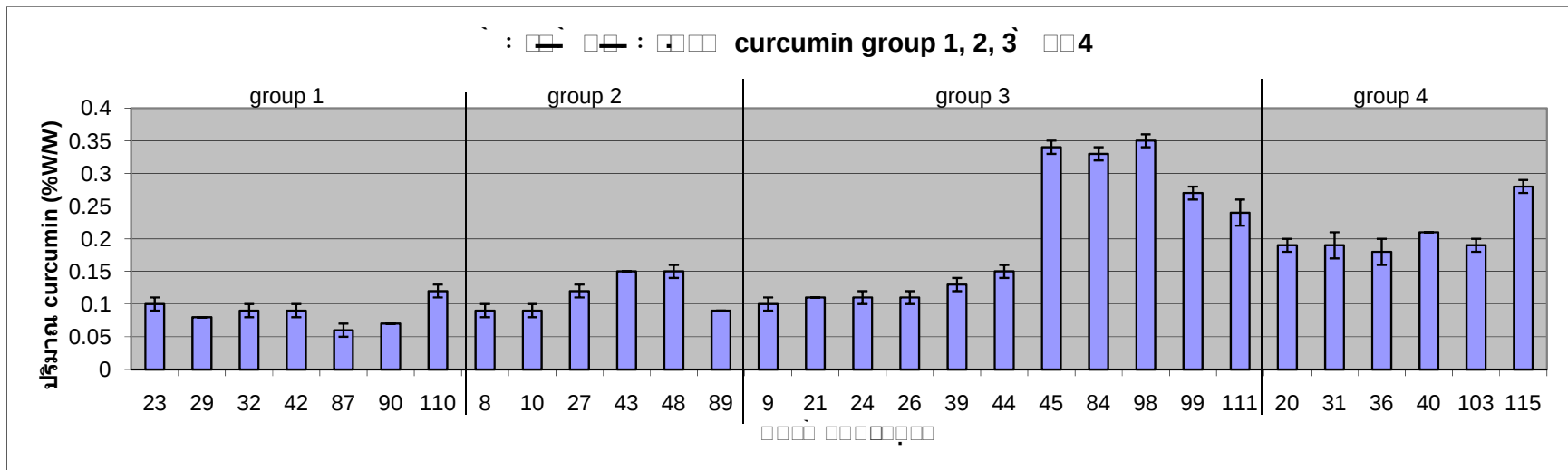
5.3.4 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ curcumin ในตัวอย่างไฟลกลุ่มที่ 4 ด้วยเครื่อง HPTLC

ตัวอย่าง กลุ่มที่ 2	ปริมาณสารสกัด (%W/W)*	ปริมาณ curcumin (%W/W in dried powder)*	ปริมาณ curcumin (%W/W in dried powder) ค่าเฉลี่ย*
20	9.86 ± 0.16	0.19 ± 0.01	0.20 ± 0.03
31	6.23 ± 0.12	0.19 ± 0.01	
36	8.38 ± 0.13	0.18 ± 0.01	
40	10.35 ± 0.11	0.21 ± 0.00	
103	8.65 ± 0.08	0.19 ± 0.01	
115	8.56 ± 0.14	0.28 ± 0.00	

* ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SD (n = 3)

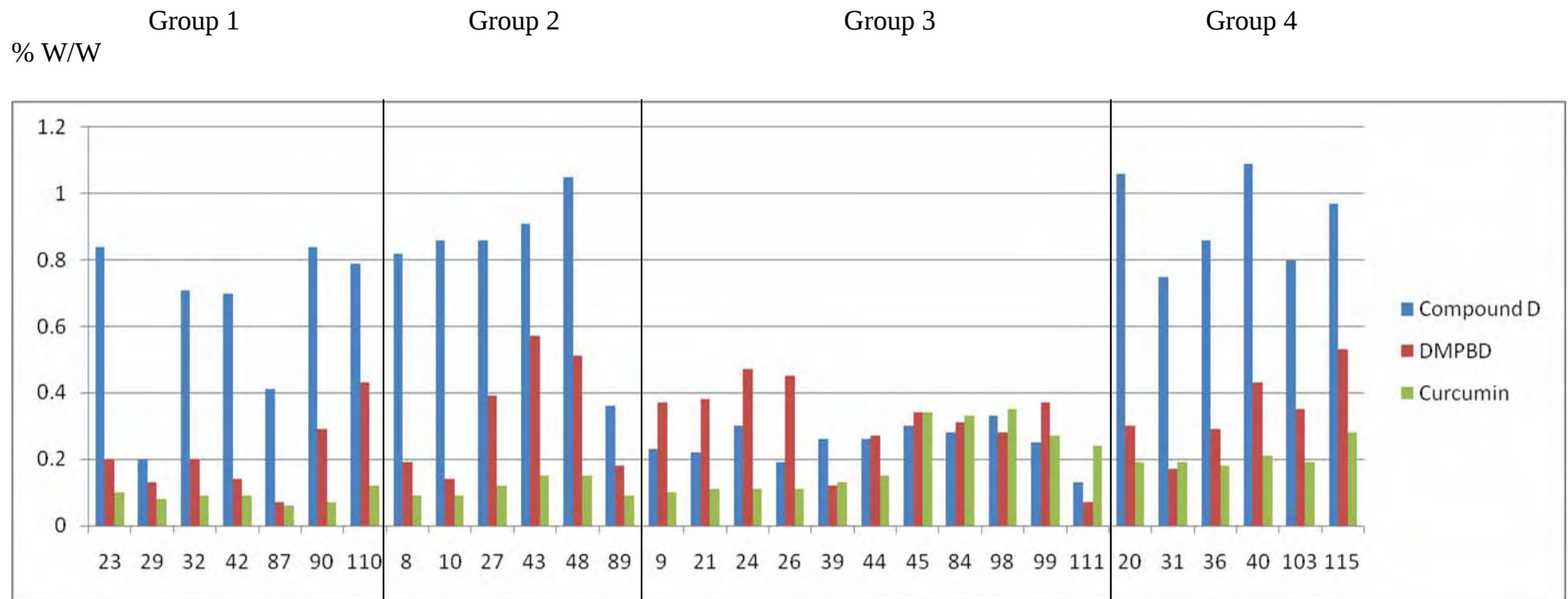


กราฟรูปที่ 14 กราฟแสดงปริมาณของสาร curcumin ในตัวอย่างไฟลกลุ่มที่ 4



กราฟรูปที่ 15 กราฟแสดงปริมาณของสาร curcumin ในตัวอย่างไฟลกลุ่มที่ 1, 2, 3 และ 4

สำหรับสาร curcumin ในไพลกลุ่มที่ 1 พบปริมาณสาร curcumin ในช่วง 0.06 – 0.12 % W/W และมีค่าเฉลี่ยที่ 0.09 ± 0.02 %W/W ของผงไพล จะพบปริมาณของ curcumin สูงในตัวอย่าง หมายเลข 23 และ 110 สำหรับไพลในกลุ่มที่ 2 พบปริมาณสาร curcumin ในช่วง 0.09 – 0.15 % W/W และมีค่าเฉลี่ยที่ 0.12 ± 0.03 %W/W ของผงไพล จะพบปริมาณของ curcumin สูงในตัวอย่าง หมายเลข 43 และ 48 สำหรับไพลในกลุ่มที่ 3 พบปริมาณสาร curcumin ในช่วง 0.10 – 0.35 % W/W และมีค่าเฉลี่ยที่ 0.20 ± 0.10 %W/W ของผงไพล จะพบปริมาณของ curcumin สูงในตัวอย่าง หมายเลข 45, 84 และ 98 สำหรับไพลในกลุ่มที่ 4 พบปริมาณสาร curcumin ในช่วง 0.18 – 0.28 % W/W และมีค่าเฉลี่ยที่ 0.20 ± 0.03 %W/W ของผงไพล จะพบปริมาณของ curcumin สูงในตัวอย่าง หมายเลข 115



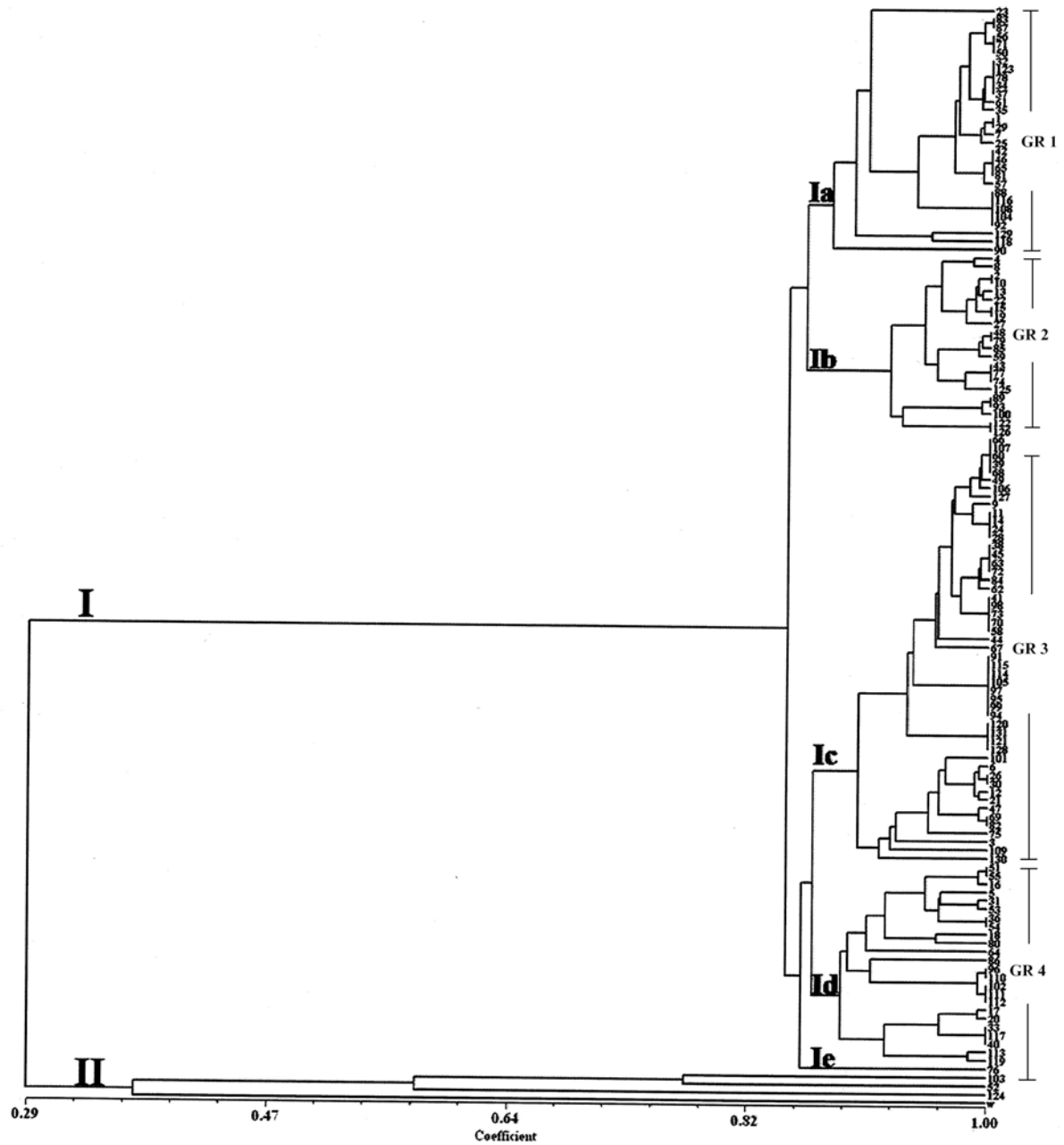
หมายเลขตัวอย่าง

กราฟรูปที่ 16 กราฟแสดงปริมาณของสาร compound D, DMPBD และ curcumin เปรียบเทียบในตัวอย่างไฟลกลุ่มที่ 1, 2, 3 และกลุ่มที่ 4

ผลการศึกษาสามารถสรุปได้จากแผนภูมิที่ 16 แสดงให้เห็นว่ามีความหลากหลายของปริมาณสารสำคัญในไพลกลุ่มต่างๆ จากผลการศึกษาพบว่าไพลกลุ่มที่ 1 สายพันธุ์หมายเลข 90 และ 110 เป็นไพลที่มีปริมาณของสาร compound D และ DMPBD สูงกว่าสายพันธุ์อื่นในกลุ่ม ในขณะที่ไพลกลุ่มที่ 2 ทุกตัวอย่างยกเว้นหมายเลข 89 มีปริมาณ compound D สูง สายพันธุ์หมายเลข 43 และ 48 มีปริมาณของสาร compound D, DMPBD และ curcumin สูง ส่วนไพลกลุ่มที่ 3 ทุกตัวอย่างจะมีปริมาณ compound D ต่ำกว่าไพลกลุ่มอื่น ๆ ส่วนปริมาณ DMPBD มีปริมาณที่ใกล้เคียงไพลกลุ่มที่ 1 และ 2 ยกเว้นหมายเลข 39 และ 111 ไพลกลุ่มสุดท้ายคือไพลกลุ่มที่ 4 ทุกตัวอย่าง มีปริมาณ compound D, DMPBD และ curcumin สูง โดยมีหมายเลข 115 มีปริมาณสารทั้งสามชนิดสูงที่สุด

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างไพลกลุ่มที่ 1, 2, 3 และกลุ่มที่ 4 พบว่า กลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 4 มีปริมาณสารสำคัญส่วนใหญ่สูงกว่ากลุ่มอื่น โดยเฉพาะสาร compound D ที่สูง โดยเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 3 จากแผนภาพที่ 12 โดยรวมไพลหมายเลข 20, 27, 36, 40, 43, 48, 90, 103, 110 และ 115 เป็นพันธุ์ไพลที่น่าสนใจ เพราะมีปริมาณสารสำคัญสูง

รูปที่ 38 แสดงการแบ่งกลุ่มของตัวอย่างจากการศึกษาทาง DNA fingerprint⁽¹⁴⁾ ของ รศ.ดร. วิเชียร กิรตินิจกาล



รูปที่ 38 แสดงการแบ่งกลุ่มของตัวอย่างจากการศึกษาทาง DNA fingerprint
(UPGMA phylogenetic tree of 132 accessions by AFLP analysis using Jaccard's similarity matrices)

สรุป

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์โดยวิธี HPTLC ของสารสำคัญในสารสกัดไพล ซึ่งได้แก่ compound D, DMPBD และ curcumin โดยสารเหล่านี้ออกฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ ซึ่งตรงกับข้อบ่งใช้ของไพล จากผลการวิจัยการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญดังกล่าวในไพล 4 กลุ่ม ซึ่ง รศ.ดร. วิเชียร กิรตินิจกาล แห่งภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ได้ทำการวิจัยความหลากหลายทางพันธุกรรมของไพลในประเทศไทย โดยใช้เทคนิค amplified fragment length polymorphism (AFLP) มีการใช้ AFLP primer 12 ชนิด พบว่ามีความแตกต่างมากกว่า 30 สายพันธุ์ และสามารถแบ่งเป็นกลุ่มได้ 4 กลุ่ม จากผลการวิเคราะห์ทาง TLC fingerprints พบว่าไม่มีความแตกต่างกันในลักษณะ pattern อย่างเด่นชัดในไพลแต่ละกลุ่ม แต่จะแตกต่างกันในด้านปริมาณสารสำคัญเป็นหลัก จากผลการศึกษาปริมาณสารสำคัญพบว่าไพลกลุ่มที่ 1 สายพันธุ์หมายเลข 90 และ 110 เป็นไพลที่มีปริมาณของสาร compound D และ DMPBD สูงกว่าสายพันธุ์อื่นในกลุ่ม ส่วนไพลกลุ่มที่ 2 ทุกตัวอย่างยกเว้นหมายเลข 89 มีปริมาณ compound D สูง โดยเฉพาะหมายเลข 43 และ 48 มีปริมาณของสาร compound D, DMPBD และ curcumin สูง ไพลกลุ่มที่ 3 พบว่าทุกตัวอย่างจะมีปริมาณ compound D ต่ำกว่าไพลกลุ่มอื่น ๆ แต่พบปริมาณ DMPBD มีปริมาณที่ใกล้เคียงกับไพลกลุ่มที่ 1 และ 2 ยกเว้นหมายเลข 39 และ 111 ไพลกลุ่มที่ 4 ทุกตัวอย่าง มีปริมาณ compound D, DMPBD และ curcumin สูง โดยหมายเลข 115 มีปริมาณสารทั้งสามชนิดสูงที่สุด โดยภาพรวมเมื่อเปรียบเทียบระหว่างไพลกลุ่มที่ 1, 2, 3 และกลุ่มที่ 4 พบว่า กลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มที่มีปริมาณสารสำคัญส่วนใหญ่สูงกว่ากลุ่มอื่น โดยเฉพาะสาร compound D กลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 4 มีปริมาณโดยเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 3 โดยสรุปไพลหมายเลข 20, 27, 36, 40, 43, 48, 90, 103, 110 และ 115 เป็นพันธุ์ไพลที่น่าสนใจ เพราะมีปริมาณสารสำคัญสูง ข้อมูลดังกล่าวจะเป็นข้อมูลที่ใช้ประกอบการในการคัดเลือกสายพันธุ์ไพลที่ดี เพื่อนำไปขยายพันธุ์ และเป็นข้อมูลแนะนำให้เกษตรกรทราบต่อไป

Outcome

**Thin-Layer Chromatography-Densitometric Analysis of
Dimethoxyphenylbutadiene (DMPBD) Content in *Zingiber cassumunar*
Rhizomes**

**Prasan Tangyuenyongwatana¹, Vichien Keeratinijakal^{2,3} and Wandee
Gritsanapan^{4*}**

**Accepted by Journal of AOAC International August 3, 2011.
Now the manuscript is in the publishing process .**

รายละเอียดของ **paper** ตามที่แสดงด้านล่าง

Thin-Layer Chromatography-Densitometric Analysis of Dimethoxyphenylbutadiene (DMPBD) Content in *Zingiber cassumunar* Rhizomes

Prasan Tangyuenyongwatana¹, Vichien Keeratinijakal^{2,3} and Wandee Gritsanapan^{4*}

¹Faculty of Oriental Medicine, Rangsit University, 52/347 Pahonyothin Rd, Pathumthani, 12000, Thailand.

²National Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Bangkok, 10900

³Agronomy Department, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok, 10900, Thailand

⁴Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, 447 Sri-Ayudthaya Rd, Ratchatewi, Bangkok, 10400, Thailand.

*Corresponding author, E-mail: pywgs@mahidol.ac.th

Abstract

Zingiber cassumunar (Zingiberaceae) has been widely used as a traditional medicine in Southeast Asia especially Thailand for treatment of asthma, inflammation, and joint-pain. (E)-4-(3,4-dimethoxyphenyl)butadiene or DMPBD, a major component in the rhizome, has been reported to be an active anti-inflammatory agent. This research developed a thin-layer chromatography (TLC)-densitometric method for the simultaneous quantification of DMPBD in the rhizome extracts of 4 varieties of *Z. cassumunar*. DMPBD was found in the range of 1.80 ± 0.01 to 3.23 ± 0.10 % (w/w). The method was

validated for linearity, precision, accuracy, robustness, limit of detection (LOD), and limit of quantitation (LOQ). The linearity showed a good regression coefficient 0.9940 and covered the range of 130-703 ng/spot. Intraday and interday precision showed the relative standard deviation less than 2%. Accuracy of the method was performed by a recovery study conducted at 3 different levels, and the average recovery was 103.1%. The LOD and LOQ were 10 and 40 ng, respectively. The proposed TLC-densitometric method was simple, precise, specific, sensitive, and inexpensive. This method can be used for routine quality control of raw materials of *Z. cassumunar* rhizomes, extracts and its products especially Prasaplai, a Thai traditional medicine for relieving dysmenorrhea.

Key words : *Zingiber cassumunar*, DMPBD, TLC-densitometric method, Prasaplai.

Introduction

(*E*)-4-(3,4-dimethoxyphenyl)butadiene (DMPBD) (Fig.1) is a major anti-inflammatory component of the rhizomes of *Zingiber cassumunar* Roxb.(Zingiberaceae) (1, 2). DMPBD shows a potent anti-inflammatory activity *in vivo* test with the mechanism of action proceeding through the inhibition of cyclooxygenase and lipoxygenase pathways (3). Han et al. reported that DMPBD inhibits cyclooxygenase-2 *in vitro* with the IC₅₀ of 20.68 µM (4). *Z. cassumunar* is a perennial herb widely spread in Southeast Asia especially Thailand, where it is known as Plai. In Thai traditional medicines, *Z. cassumunar* has been included in many preparations for treating asthma, inflammation, muscle and joint-pain, and dysmenorrhoea (5, 6). In addition, its rhizome is reported to have antioxidant, anti-inflammatory, and uterine relaxant activities (7, 8). Various

varieties of *Z. cassumunar* have been found in Thailand and there is no report on the amount of DMPBD in these varieties. Determination of active compounds and their contents in this plant was previously achieved by GC-MS (9) and by HPLC for the contents of the other three components, (*E*)-4-(3',4'-dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol, curcumin and *cis*-3-(2',4',5'-trimethoxyphenyl)-4-[(*E*)-2''',4''',5'''-trimethoxystyryl]cyclohex-1-ene (10). However, there is no information about the content of DMPBD. Thus, this study was aimed to develop TLC-densitometric method, which is a simple, precise, specific, fast and inexpensive method for qualitative and quantitative analysis of DMPBD in the rhizome extracts of *Z. cassumunar*. The method can be applied to analyze DMPBD in traditional medicines such as the Prasaplai preparation that comprises of 50% w/w of *Z. cassumunar* powder and has been popularly used for treatment of dysmenorrhoea in Thailand.

Experimental

Materials and Reagents

Reagents and solvents were reagent grade and used without further purification. All reactions were performed in standard glassware under inert atmosphere of N₂. TLC was performed on pre-coated silica gel GF₂₅₄ plates (Merck). For column chromatography, silica gel (Merck 230-400 mesh) was used. NMR spectra were recorded by a Bruker Avance (¹H, 300 MHz) spectrometer. Chemical shifts are reported in ppm, and coupling constants are reported in Hz. All NMR spectra were obtained in deuterated chloroform (CDCl₃) and referenced to the residual solvent peak. Mass spectra were

obtained from Thermo Finigan Polaris Q. The rhizomes of *Z. cassumunar* were collected from various locations in Thailand and grown in the same atmosphere at Rai Suwan, Nakhon Ratchasima province in the north-eastern part of Thailand. The rhizomes of four varieties were collected in March 2553 and were identified by Dr. Vichien Keeratinijakal using DNA-fingerprinting and by comparison with the specimens at the Forest Herbarium, Department of National Park, Wildlife and Plant Conservation, Ministry of Natural Resources and Environment, Bangkok, Thailand. The voucher specimens of *Z. cassumunar* rhizomes (SMU 029-SMU 032) were deposited at Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok, Thailand.

DMPBD was obtained by synthesis in our laboratory (11) and its structure was identified by NMR and MS compared with reported data in references (2). The purity of DMPBD was more than 95%.

Apparatus

(a) Spotting device.- Linomat 5 automatic sample spotter (CAMAG, Muttenez, Switzerland).

(b) Syringe.-100 L (Hamilton, Bonaduz, Switzerland).

(c) TLC chamber.- Glass twin-trough chamber (20 × 10 cm.) (CAMAG, Switzerland)

(d) Densitometer.- TLC scanner 3 with winCATS software (CAMAG, Switzerland)

(e) *TLC plates*-10 × 10 cm, 0.2 mm. layer thickness precoated with silica gel 60 F₂₅₄, cat. No. 1.05554.0001 (Merck, KGaA, Damstadt, Germany).

Preparation of Standard Solutions

Standard solutions were prepared at 5 concentrations (13, 28.6, 43, 57.5 and 70.3 µg/mL) by dissolving accurately weighed portion of standard DMPBD in methanol in volumetric flasks. Ten microliters of each standard concentration were spotted on the TLC plate to obtain final concentrations of 130, 286, 430, 575, and 703 ng/spot, respectively.

Preparation of Sample Solutions

Dried rhizome powdered of each *Z. cassumunar* sample (1.50 g) was accurately weighed and transferred to a 125 mL flask. Methanol (50 mL) was added and the flask was placed in an ultrasonic bath and sonicated for 15 min. The methanol extract was collected and another portion of methanol (50 mL) was added to the marc and sonicated in the same manner. The extraction process was carried on until exhaustion, and monitored by TLC. The methanol extracts were combined, filtered, and concentrated under vacuum using a rotary evaporator. Each dried extract was dissolved in methanol in a 25 mL volumetric flask, and adjusted to the volume with methanol. An aliquot of the solution (1.0 mL) was diluted with methanol in a 10 mL volumetric flask and then spotted on TLC plate.

Validation of the Method

The method was validated for linearity, precision, accuracy, robustness, limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) according to the International Conference of Harmonization (ICH) guidelines (12).

(a) *Linearity*-- Linearity relationship between peak area and concentration of the standard solution was evaluated at 5 concentration levels over the range of 130-703 ng/spot. Each concentration was done in triplicate.

(b) *Precision*-- Repeatability and intermediate precision of the developed method were expressed in term of relative standard deviation (RSD) of peak area. Intraday precision was studied by repeat analyzing on the same day at three concentrations (178, 356 and 534 ng/spot) of methanolic *Z. cassumunar* extract (n=3). Interday precision was determined on three different days at the same three concentrations by the proposed method.

(c) *Accuracy*-- The accuracy of the method was evaluated by performing recovery studies at 3 levels of the standard DMPBD added to the samples. The solutions were applied on a TLC plate and analyzed by the TLC-densitometric method. Three determinations were performed for each concentration level of the standard (156, 288 and 361 ng/spot) and the recovery and average recovery were calculated.

(d) *Specificity* -- Peak purity of DMPBD was assessed by scanning the standard and sample spots. Correlation coefficients of these spectra were calculated.

(e) *LOD and LOQ* -- LOD and LOQ were determined by scanning the blank (methanol) spot and detecting the noise. Series of the concentrations of DMPBD standard solution (10-100 ng/spot) were applied on the TLC plate. Signal-to-noise ratios of 3:1 and 10: 1 were considered as LOD and LOQ, respectively.

(f) *Robustness*--The robustness of the method was evaluated by introducing small changes in certain chromatographic parameters. The composition of mobile phase, the amount of mobile phase, temperature, and chamber saturation time were varied in the range $\pm 5\%$ and the results on the analytical values were considered.

Chromatographic condition for Quantitative Analysis of DMPBD in *Z. cassumunar* rhizome extracts.

The samples were applied on a precoated silica gel aluminium-backed GF₂₅₄ plate using a Linomat 5. Each sample solution (2 μ L) was applied in triplicate as narrow bands of 6 mm in length using a nitrogen aspirator. The constant application rate of 150 nL/s, 5.0 x 0.45 mm densitometer slit dimension, and 20 mm/s scanning speed were used. The mobile phase consisted of n-hexane: dichloromethane (60 + 40, v/v). Linear ascending development was performed in a twin-trough glass chamber saturated with a mobile phase. The TLC plate was double developed using 50 mL of the mobile phase for a plate. The optimized chamber saturation time for the mobile phase was 25 min at room temperature (25 ± 2 °C). The distance covered by the solvent front was 8 cm, which took about 10 min for each run. The spots were scanned using the TLC scanner 3 in the

reflectance-absorbance mode at 289 nm, operated by winCATS software. The amount of DMPBD in the samples was calculated using the calibration graph.

Results and Discussion

Z. cassumunar extract is composed of many phenylpropanoids and their derivatives, including the main component DMPBD (2). For the chromatographic condition, several trials were made by using different solvent systems containing non-polar and relatively polar solvents; hexane : dichloromethane (60 + 40) with double developments to promote the best separation. DMPBD was separated well from other components (Figure 4B) with the R_f value of 0.3 ± 0.03 . The UV absorption spectrums of the standard and sample were overlaid to confirm the identity of DMPBD in the sample (Fig. 2) while the correlation coefficient was found to be 0.9990.

The method was validated for its linearity, accuracy, precision, robustness, LOD and LOQ. For linearity, peak areas were found to have good linear relationship with the concentration than the peak heights with the correlation coefficient (r^2) of 0.9940 and within the concentration range of 130 – 703 ng/spot (Fig. 3). The correlation coefficient and regression equation are presented in Table 1. The interday and intraday precisions of DMPBD are given in Table 2. The results showed acceptable precision at three different concentration levels of 178 – 534 ng/spot with RSD <2%. The percentage recovery at three levels of DMPBD was 102.8, 104.3 and 102.3%, with an average of 103.1% (Table 3). For the robustness test, the standard deviation of peak areas was calculated for each parameter and the %RSD was found to be less than 2 in each case (Table 4). The change

of mobile phase composition was the main deviation of the method, while the rest showed less significant on %RSD of the method.

The validated method was used to determine the content of DMPBD in four varieties of *Z. cassumunar* collected from different parts of Thailand. The results show that there was a significant difference in the content of *Z. cassumunar* varieties (Table 5). The amount of DMPBD ranged from 1.80 – 3.23% w/w in dried powder. The chromatographic conditions can be applied for analysis of DMPBD content in Prasaplai preparation, which is a popular Thai traditional medicine for the treatment of dysmenorrhoea. This formula is composed of 10 herbs of which 50% of the composition is *Z. cassumunar*. The proposed chromatographic conditions showed a good resolution of DMPBD peak from other peaks.

There are plenty varieties of *Z. cassumunar* in Southeast Asia while more than 100 varieties were identified in Thailand. This developed and validated method utilizes the merit of applying several sample spots on a TLC plate and the analyzing process can be done in a short period of time. In addition, the method is inexpensive and does not require special types of stationary phases. For analysis of herbs, it can represent as an alternative method for HPLC, which needs more time for one sample analysis. This method is recommended for routine quantification of DMPBD in herbal raw materials, extracts, and the products containing this compound.

Conclusions

The TLC-densitometric method was developed and validated for qualitative and quantitative analysis of DMPBD in *Z. cassumunar* rhizome extracts. This method is simple, precise, and accurate. It can be used for quantitative analysis of DMPBD, an active anti-inflammatory component, in the *Z. cassumunar* raw materials, extracts, and its products especially traditional preparations containing this compound. The advantage of this method is the ability to analyze many samples at the same time.

Acknowledgements

We would like to thank the Thailand Research Fund (TRF) for financial support to this research and thank Mr. Panupon Khumsupan for his kind help in proofreading the manuscript.

References

- (1) Tuntiwachwuttikul, P., Pancharoen, O., Jaipetch, T., & Reutrakul, V. (1981) *Phytochemistry*. **20**, 1164-1165.
- (2) Kuronayaki, M., Fukushima, S., Yoshihira, K., Natori, S., Dechatwongse, T., Mishashi, K., Nishi, M., & Hara, S. (1980) *Chem. Pharm. Bull.* **28**, 2948-2959.
- (3) Jeenapongsa, R., Yoorathaworn, K., Pongprayoon, U., & Sriwatanakul, K. (2003) *J. Ethnopharmacol.* **87**, 143-148.
- (4) Han, A., Kim, M., Jeong, Y.H., Lee, S.K., & Seo, E. (2005) *Chem. Pharm. Bull.* **53**, 1466-1468.
- (5) Panthong, A., Kanjanapothi, D., Niwatananun, V., Tuntiwachwuttikul, P., & Reutrakul, V. (1990) *Planta med.* **56**, 655.

- (6) Nualkaew, S., Gritsanapan, W., Petereit, F., & Nahrstedt, A. (2004) *Planta med.* **70**: 1243-1246.
- (7) Kanjanapothi, D., Soparat, P., Panthong, A., Tuntiwachwuttikul, P., & Reutrakul, V. (1987) *Planta med.* **53**, 329-332.
- (8) Ozaki, Y., Kawahara, N., & Harada, M. (1991) *Chem. Pharm. Bull.* **39**, 2353-2356.
- (9) Sukatta, U., Rugthaworn, P., Punjee, P., Chidchenchey, S., & Keeratinijakal, V. (2009) *Kasetsart J (Nat Sci)*. **43**, 212-217.
- (10) Paramapojn, S., Tip-pyang, S., & Gritsanapan, W. (2009) *Intl. J. Biomed. Pharm. Sci.* **3(1)**, 34-38.
- (11) Tangyuenyongwatana, P., Gritsanapan, W. (2008) *Planta Med.* **74**, 1403- 1405.
- (12) Commission of the European Communities (1996) *Proceedings of the International Conference on Harmonization (ICH), Validation of Analytical Procedures*, Geneva, Switzerland.

Figure legends

Figure 1 Chemical structure of DMPBD

Figure 2. UV absorption spectra of DMPBD standard (A) and DMPBD in the *Z. cassumunar* extract (B).

Figure 3 Calibration curve of DMPBD

Figure 4. Densitograms of DMPBD standard (A), *Z. cassumunar* extracts (B) and Prasapalai preparation extract (C)

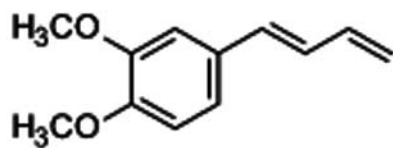


Figure 1 Chemical structure of DMPBD

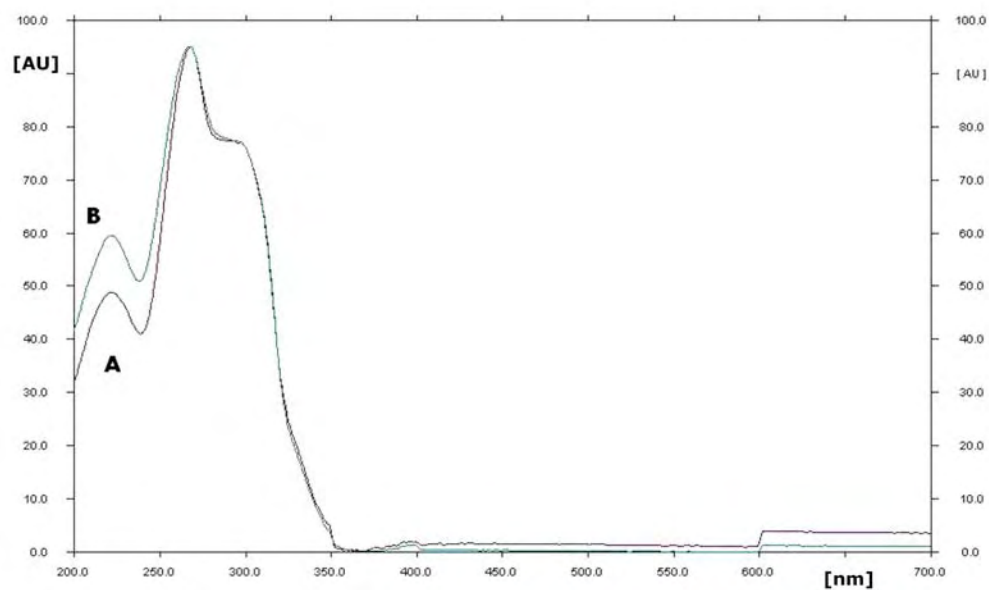


Figure 2. UV absorption spectra of DMPBD standard (A) and DMPBD in the *Z. cassumunar* extract (B).

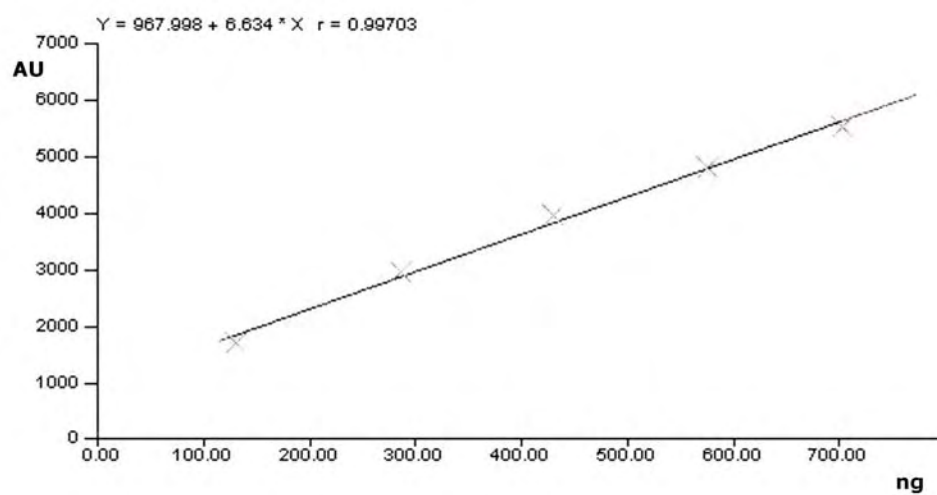


Figure 3 Calibration curve of DMPBD

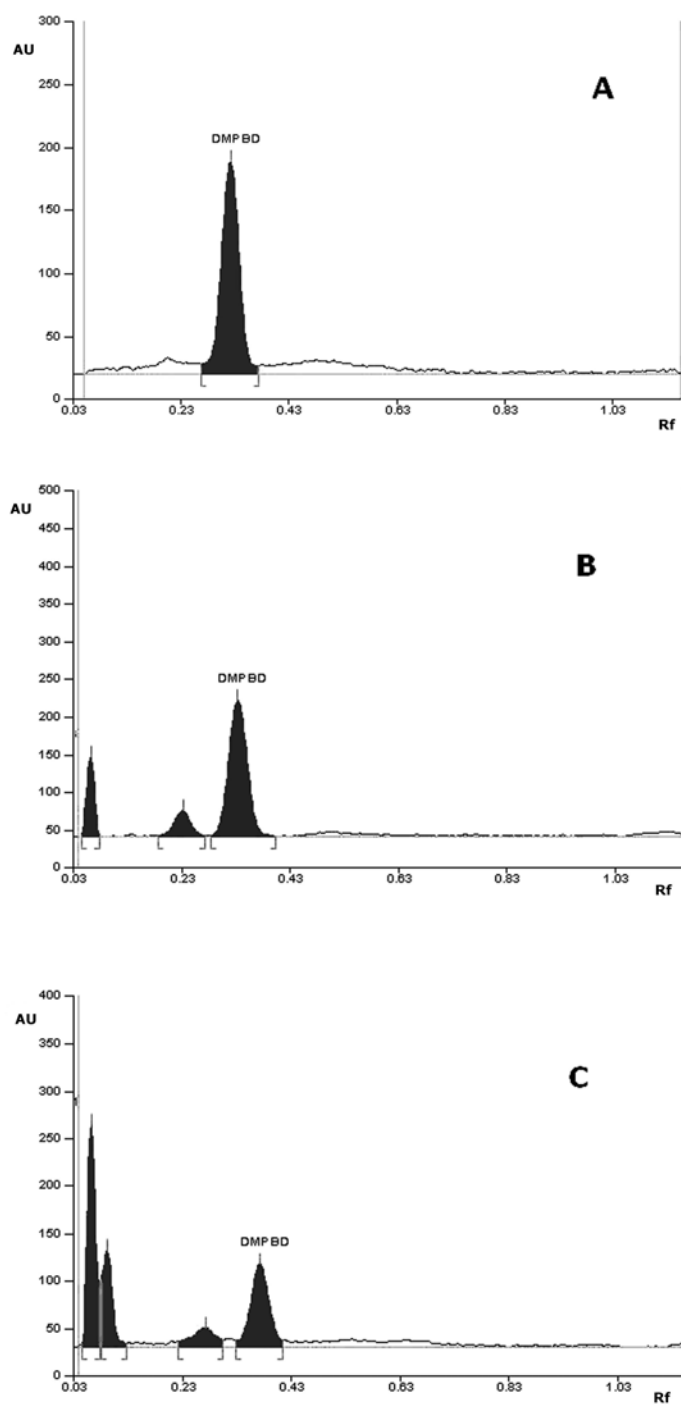


Figure 4. Densitograms of DMPBD standard (A), *Z. cassumunar* extracts (B) and Prasapalai preparation extract (C)

Table 1 Summary of method validation parameters for the quantitation of DMPBD by the proposed TLC-densitometric method

Parameter	Result
Linear range	130-703 ng/spot
Linear regression equation	$y = 6.634x + 967.998^a$
Correlation coefficient (r^2)	0.9940
Limit of quantitation, ng	40
Limit of detection, ng	10
Specificity	0.9990

^a x is the amount of DMPBD in ng, y is the peak area at 289 nm

Table 2 Intraday and interday precision for DMPBD^a

Concentration ng/spot	Intraday precision, %	Interday precision, %
178	1.78	1.72
356	0.87	0.30
534	0.37	0.39

^a RSD, % (n=3)

Table 3 Recovery study of DMPBD

Serial No	Amount present in the extract, ng	Amount added, ng	Amount found ^a , ng	Recovery ^{a,b} , %
1	142.66	156.3	160.75 ± 2.30	102.8 ± 1.45
2	210.85	288.0	300.51 ± 0.96	104.3 ± 0.34
3	210.85	361.0	369.29 ± 8.63	102.3 ± 2.42

^a Expressed as mean standard deviation (SD, n = 3)

^b Average recovery = 103.1%

Table 4 Results from robustness studied

Parameter	RSD % in peak area DMPBD
Mobile phase composition	1.34
Amount of mobile phase	0.94
Temperature	0.86
Chamber saturation time	0.67

Table 5 Yield of crude extract and the content of DMPBD in the extracts and dried powder of rhizomes of *Z. cassumunar*

Sample No	Yield of crude extract % (w/w) ^a	DMPBD content ^a % (w/w) in extract and(in dried powder)
1	12.95 ± 0.47	8.04 ± 0.29 (1.06 ± 0.04)
2	11.65 ± 0.06	6.97 ± 0.04 (0.90 ± 0.01)
3	10.65 ± 0.35	13.21 ± 0.21 (1.37 ± 0.02)
4	10.21 ± 0.33	15.36 ± 0.49 (1.61 ± 0.05)

^a expressed as mean ± SD

เอกสารอ้างอิง

1. Amatayakul T, Cannon JR, Dampawan P, Dechatiwong T, Giles RGF, Huntrakul C, Kusamran K, Mokkahasmit M, Raston CL, Reutrakul V, White AH. Chemistry and crystal structures of some constituents of *Zingiber cassumuar*. Aust J Chem 1979; 32: 71-88.
2. Kuronayaki M, Fukushima S, Yoshihira K, Natori S, Dechatwongse T, Mishashi K, Nishi M, Hara S. Further characterization of the constituents of a Thai medicinal plant, *Zingiber cassumuar* Roxb. Chem Pharm Bull 1980; 28(10): 2948-59.
3. Tuntiwachwuttikul P, Pancharoen O, Jaipetch T, Reutrakul V. Phenylbutanoids from *Zingiber cassumuar*. Phytochemistry 1981; 20(5): 1164-65.
4. Masuda T, Jitoe A, Nakatani N. Structure of cassumunin A, B, and C, new potent antioxidants from *Zingiber cassumuar*. Chem Lett 1993; 189-92.
5. Jitoe A, Masuda T, Nakatani N. Phenylbutanoids dimers from the rhizomes of *Zingiber cassumuar*. Phytochemistry 1993; 32(2): 357-63.
6. Thamaree S, Pachotikarn C, Tankeyyoon M, Itthipanichpong C. Effects on intestinal mobility of thirty herbal medicines used in the treatment of diarrhea and dysentery. Chula Med J 1985; 29(1): 39-51.
7. Kanjanapothi D, Soparat P, Panthong A, Tuntiwachwuttikul P, Reutrakul V. A uterine relaxant compound from *Zingiber cassumuar*. Planta med 1987; 53(4): 329-32.
8. Mokkahasmit M, Ngarmwathana W, Sawasdimongkol K, Permiphaphat U. Pharmacological evaluation of Thai medicinal plants. J Med Assoc Thailand 1971; 54: 490-503.
9. Kiatyingungsulee N, Wangmad M, Swasdimongkol D, Mokkahasmit M. Some pharmacological studies of active constituent in Plai (*Zingiber cassumuar* Roxb.). Bull Dep Med Sci 1979; 21(1): 13-24.
10. Panthong A, Kanjanapothi D, Niwatananun V, Tuntiwachwuttikul P, Reutrakul V.

Anti-inflammatory activity of compounds isolated from *Zingiber cassumuar*.
Planta med 1990; 56: 655.

11. Jeenapongsa R, Yoorathaworn K, Pongprayoon U, Sriwatanakul K. Anti-inflammatory activity of (E)-4-(3',4'-dimethoxyphenyl)butadiene from *Zingiber cassumuar* Roxb. J Ethnopharmacol 2003; 87: 143-8.
12. Masuda T, Jitoe A, Mabry TJ. Isolation and structure determination of cassumunarins A, B and C: new anti-inflammatory antioxidants from a tropical ginger, *Zingiber cassumuar*. JAOCS 1995; 72(9): 1053-7.
13. Ozaki Y, Kawahara N, Harada M. Anti-inflammatory effect of *Zingiber cassumuar* Roxb. and its active principles. Chem Pharm Bull 1991; 39(9): 2353-6.
14. Kladmook M, Chidchenchey S, Keeratinijakal V. Assessment of genetic diversity in cassumunar ginger (*Zingiber cassumuar* Roxb.) in Thailand using AFLP makers. Breeding Science 2010; 60: 412-418.