



การเปรียบเทียบปริมาณกรดโรสมารินิกของสารสกัดหญ้าหนวดแมว
ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
The Comparison of rosmarinic acid in *Orthosiphon aristatus* extract
by high performance liquid chromatography

ชลชิต คำพันธ์^{1,2}, รณชัย ภูวนานา¹, ปานิชา พงศ์นราทร¹, เพ็ญศิริ จันทรแอ¹, วรินทร์ โอนอ่อน¹
และ นฤวัตร ภักดี^{1*}

¹สาขาวิชาแพทย์แผนไทย คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน
วิทยาเขตสกลนคร สกลนคร 47160

²วิทยาลัยการสาธารณสุขสิรินธร พิษณุโลก 65130

Chonlachid kamphan^{1,2}, Ronnachai Poowanna¹, Panicha Pongnaratorn¹,
Pensiri Chan-ae¹, Warin Ohnon¹ and Naruwat Pakdee^{1*}

¹Department of Thai Traditional Medicine, Faculty of Natural Resources Rajamangala University of
Technology Isan, Sakon Nakhon Campus 47160

²Sirindhorn College of Public health, Phitsanulok 65130

Received: 18 August 2022/ Revised: 20 October 2022/ Accepted: 25 October 2022

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดโรสมารินิกของสารสกัดหญ้าหนวดแมว (*Orthosiphon aristatus*) ที่สกัดด้วย 70% เอทานอล จากแหล่งเพาะปลูกที่แตกต่างกัน 10 แหล่ง ทดสอบด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง และโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง พบว่าแหล่งที่ได้ปริมาณผลผลิตของสารสกัดหยาบสูงที่สุด คือ จังหวัดปราจีนบุรี เท่ากับ 13.12 เปอร์เซ็นต์ และผลผลิตต่ำที่สุด คือ จังหวัดเชียงราย เท่ากับ 6.66 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดสอบโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง พบลักษณะรอยพิมพ์ลายนิ้วมือตรงกันทั้งหมด และตำแหน่งแถบสารที่ค่า (Retardation factor, R_f) เท่ากับ 0.35 ตรงกับสารมาตรฐานกรดโรสมารินิก ผลการทดสอบด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงพบรีเทนชันไทม์ของกรดโรสมารินิกเท่ากับ 12.50 นาที และมีคุณสมบัติในการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น (λ_{max}) เท่ากับ 329 นาโนเมตร จากการวิเคราะห์ปริมาณกรดโรสมารินิก พบว่าจังหวัดนครนายกมีปริมาณกรดโรสมารินิกมากที่สุดเท่ากับ 350.86 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ร้อยละ 1.75) ส่วนหญ้าหนวดแมวที่มาจากจังหวัดยะลาปริมาณกรดโรสมารินิกน้อยที่สุดเท่ากับ 81.16 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ร้อยละ 0.41) ซึ่งการวิเคราะห์ด้วย HPLC ได้มีการทดสอบความถูกต้องและความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ พบค่า



R^2 เท่ากับ 0.9997 %recovery ร้อยละ 99.74–108.02 ค่าความแม่นยำภายในวันและระหว่างวัน มีค่า %RSD เท่ากับ 0.1 – 1.9 และ 0.3 – 0.6 ตามลำดับ นอกจากนั้นค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 0.06 และ 0.17 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์มีความถูกต้องและน่าเชื่อถือในการวิเคราะห์กรดโรสมารินิกในหญ้าหนวดแมว

คำสำคัญ: หญ้าหนวดแมว, กรดโรสมารินิก, โครมาโทกราฟีแบบผิวบาง, โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

Abstract

The objective of this study is to compare the amount of rosmarinic acid in *Orthosiphon aristatus* extract from 10 different origins. The methods were used thin layer chromatography and high-performance liquid chromatography. The leaves of *Orthosiphon aristatus* were extracted with 70% ethanol. The results showed that crude extracts from Prachinburi province were found the highest yield at 13.12 % while Chiang Rai province had the lowest yield (6.66 %). TLC fingerprints showed a similar pattern and a spot at retardation factor (R_f) value of 0.35 was identified as standard rosmarinic acid. According to the high-performance liquid chromatography, λ_{max} was 329 nm and the retention time was 12.50 minutes. Nakhon Nayok province has the greatest amount of 350.86 microgram/ml (1.75%) of rosmarinic acid among the planting sites while Yala province has the lowest at 81.16 microgram/ml (0.41 %). The method validation of the HPLC technique demonstrated good linearity and represented a high correlation coefficient value (R^2) were 0.9997, %recovery was 99.74 – 108.02. Intra-day and inter-day precisions were showed %RSD value 0.1 – 1.9 and 0.3 – 0.6, respectively. In addition, LOD and LOQ were 0.06 and 0.17 micrograms/milliliter, respectively. It has been demonstrated that this method can accurately and consistently analyze the rosmarinic acid in *Orthosiphon aristatus*.

Keyword: *Orthosiphon aristatus*, Rosmarinic acid, Thin layer chromatography, High performance liquid chromatography

บทนำ

หญ้าหนวดแมว (*Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq. หรือ *Orthosiphon stamineus* Benth.) อยู่ในวงศ์ Lamiaceae พบทั่วไปในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีกลิ่นหอมเล็กน้อย รสชาติค่อนข้างขม และรสเค็ม [1] มีสรรพคุณลดไข้ ขับปัสสาวะ ขับนิ่ว และยังสามารถใช้รักษาโรคกระเพาะปัสสาวะอักเสบ โรคเบาหวาน โรคไขข้ออักเสบ โรคเก๊าท์ และโรคไต เป็นต้น [2] มีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีพบว่าส่วนใหญ่เป็นสารกลุ่ม phenolic compound ได้แก่ กรดโรสมารินิก (rosmarinic acid) 3'

- hydroxy-5, 6, 7, 4' tetramethoxyflavone (TMF) ซิเนนเซติน (sinensetin) และยูพาโทริน (eupatorin) เป็นต้น [3] จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารสกัดจากหญ้าหนวดแมวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ [4-6] ด้านการอักเสบ [5-7] ด้านมะเร็งต่อมลูกหมาก [8, 9] ด้านการสร้างหลอดเลือดใหม่ [10] ด้านเบาหวาน [4, 7, 10, 11] ด้านเชื้อเอชไอวี [12] และยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย [4, 5, 10] โดยสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาข้างต้นคือ กรดโรสมารินิก นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของหญ้าหนวดแมวที่มาจากแหล่งต่างกันด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟี



แบบผิวบาง [13, 14] และวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง [15] พบว่ามียุงประกอบทางเคมีที่ต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการใช้กรดโรสมารินิกในการรักษาในผู้ป่วยโรคผื่นภูมิแพ้ผิวหนัง (atopic dermatitis) [16] และมีการนำไปใช้ในการต้านการอักเสบด้านภูมิแพ้ในผู้ป่วยภูมิแพ้ตามฤดูกาล (seasonal allergic rhinoconjunctivitis) [17] อย่างไรก็ตามในประเทศไทยยังไม่ได้มีการศึกษาความแตกต่างขององค์ประกอบทางเคมีของหญ้าหนวดแมวจากพื้นที่ต่างกัน ดังนั้นผู้วิจัยจึงศึกษาเปรียบเทียบปริมาณกรดโรสมารินิกของสารสกัดหญ้าหนวดแมว จากแหล่งปลูกหญ้าหนวดแมว 10 แหล่ง ใน 5 ภูมิภาคของประเทศไทย คือ ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง ภาคใต้ และภาคตะวันออก ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง และวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เพื่อเป็นข้อมูลในการเลือกแหล่งปลูกหญ้าหนวดแมวที่มีคุณภาพและมีปริมาณสารสำคัญที่เหมาะสมในการนำไปใช้ทางการแพทย์ต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมตัวอย่างสมุนไพร

ตัวอย่างหญ้าหนวดแมวที่เก็บเกี่ยวในเดือนพฤศจิกายน จาก 10 แหล่งเพาะปลูก นำมาตากแห้ง เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จากนั้นไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง นำไปบด แล้วร่อนด้วยตะแกรงเบอร์ 80 จากนั้นนำผงหญ้าหนวดแมวแห้ง ตัวอย่างละ 50 กรัม เติมน้ำ 70% เอทานอล ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง แล้วนำตัวอย่างที่ได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator นำสารสกัดเก็บที่อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้งาน

การทดสอบด้วย Thin Layer Chromatography (TLC)

เตรียมสารสกัดหญ้าหนวดแมวจากแหล่งเพาะปลูกต่าง ๆ และสารมาตรฐานกรดโรสมารินิก ละลายด้วยเอทานอลให้มีความเข้มข้นตัวอย่างละ 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นหยดตัวอย่างปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง (TLC) ที่เคลือบด้วย silica gel

60 GF254 (Merck) ขนาด 10 x 12 เซนติเมตร ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น โทลูอีน เอทิลอะซิเตท และกรดฟอร์มิก (toluene: ethyl acetate: formic acid) ในอัตราส่วน 9:9:1 วางแผ่น TLC ให้วัฏภาคเคลื่อนที่เคลื่อนไปจากจุดเริ่มต้น จนถึง solvent front นำแผ่นโครมาโทกราฟีออกมาวางให้แห้ง ตรวจสอบผลการแยกสารภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร จากนั้นคำนวณค่า R_f ของแถบสารสกัดที่พบ

การทดสอบด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

เตรียมตัวอย่างสารสกัดหญ้าหนวดแมว ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในเอทานอล กรองผ่าน membrane syringe filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ปริมาตรที่ฉีด 20 ไมโครลิตร วัฏภาคเคลื่อนที่คือ 0.1% กรดฟอร์มิก ในน้ำ (0.1% formic acid in water: A) และอะซิโตนไนไตรล์ (acetonitrile: B) เซคอลัมน์แบบ gradient program แสดงดังตารางที่ 1 วิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC – DAD system (Shi-madzu, Kyoto, Japan) ใช้คอลัมน์ C18 (5 ไมโครเมตร, 4.6 x 250 มิลลิเมตร) อุณหภูมิคอลัมน์ 40 องศาเซลเซียส อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตร/นาที [6] คำนวณหาปริมาณกรดโรสมารินิก เทียบกับสารละลายมาตรฐานกรดโรสมารินิก ในช่วงความเข้มข้น 50-800 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร รายงานผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดโรสมารินิกในตัวอย่างหญ้าหนวดแมว ในหน่วยกรัมต่อน้ำหนักแห้ง 100 กรัม (g/100g DW)

การทดสอบความถูกต้องและความน่าเชื่อถือได้ของวิธีการวิเคราะห์ (Method validation)

การทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity) นำสารละลายมาตรฐานกรดโรสมารินิก ความเข้มข้น 50, 100, 200, 400 และ 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร วิเคราะห์ด้วย HPLC จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกับพื้นที่ใต้กราฟ และหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, R^2)



ตารางที่ 1 ภูมิภาคเคลื่อนที่แบบ gradient program

เวลา (นาที)	B (%)
0.0 - 3.0	80
3.1 - 6.0	70
6.1 - 11.0	60
11.1 - 14.0	55
14.1 - 19.0	5
19.1 - 24.0	5
24.1 - 28.0	2
28.1 - 30.0	0

การหาค่าความแม่นยำ (Accuracy) โดยฉีดสารละลายมาตรฐานกรดโรสมาโรนิก ความเข้มข้น 50, 100 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยทำการฉีดซ้ำ 3 ครั้งคำนวณหาค่าร้อยละการกลับคืนของสารละลายมาตรฐาน (%recovery)

การหาความเที่ยงของเครื่องมือ (Precision) ทดสอบโดยนำสารละลายมาตรฐานกรดโรสมาโรนิก ความเข้มข้น 100, 200 และ 800 µg/ml ปริมาตร 20 ไมโครลิตร วิเคราะห์โดย HPLC โดยทำการฉีดซ้ำ 3 ครั้งคำนวณหาค่าความเที่ยงของเครื่องมือในรูปของร้อยละการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) หาค่าความเที่ยงภายในวัน (intra-day precision) และหาค่าความเที่ยงระหว่างวัน (inter-day precision)

การศึกษาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (Limit of detection, LOD) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถอ่านค่าได้อย่างถูกต้อง (Limit of quantitation, LOQ) โดยพิจารณาจากความเข้มข้นที่ให้อัตราส่วนระหว่างสัญญาณของสารละลายมาตรฐานและสัญญาณรบกวน (S/N) เท่ากับ 3 และ 10 สำหรับ LOD และ LOQ ตามลำดับ

การวิเคราะห์ทางสถิติ

การเปรียบเทียบปริมาณกรดโรสมาโรนิกของสารสกัดหญ้าหนวดแมวจากแหล่งเพาะปลูกที่แตกต่างกัน วิเคราะห์ด้วยการหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

โดยสถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ One-way analysis of variance (ANOVA) กำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05

ผลการวิจัย

สารสกัดหยาบของหญ้าหนวดแมวที่สกัดด้วย 70% เอทานอล จากแหล่งเพาะปลูกทั้ง 10 แหล่งในประเทศไทย พบว่าทั้ง 10 ตัวอย่าง มีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาล มีระดับสีเข้ม-อ่อนต่างกันเล็กน้อย โดยแหล่งที่มีปริมาณผลผลิตสูงที่สุด (%Yield) คือ จังหวัดปราจีนบุรี รองลงมาคือ จังหวัดนครนายก และจังหวัดปัตตานี โดยมีปริมาณร้อยละผลผลิตเท่ากับ ร้อยละ 13.12, 12.78 และ 12.48 ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดหยาบหญ้าหนวดแมวจากแหล่งเพาะปลูกจังหวัดเชียงราย มีปริมาณน้อยที่สุดคือ ร้อยละ 6.66 แสดงดังตารางที่ 2

ผลการทดสอบด้วย Thin Layer Chromatography

การวิเคราะห์สารสกัดหยาบหญ้าหนวดแมว ทั้ง 10 ตัวอย่าง เทียบกับสารมาตรฐานกรดโรสมาโรนิก เมื่อตรวจสอบภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร พบแถบที่บ่งชี้ตำแหน่งของสารมาตรฐานกรดโรสมาโรนิก (R_f เท่ากับ 0.35) ในขณะที่ตำแหน่งอื่น ๆ ของสารสกัดไม่พบแถบที่บ่งชี้ตรงกับตำแหน่งของกรดโรสมาโรนิก การสังเกตที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร พบว่าสารมาตรฐานกรดโรสมาโรนิก ปรากฏเห็นแถบสีน้ำเงิน (R_f เท่ากับ 0.35) และสารสกัดหยาบหญ้าหนวดแมวมีแถบที่ปรากฏ



ตารางที่ 2 ลักษณะสี น้ำหนัก และร้อยละผลผลิตของสารสกัดหยาบหญ้าหนวดแมวจากแหล่งเพาะปลูกที่ต่างกัน

แหล่งที่มา	ลักษณะสีสารสกัด	น้ำหนักสารสกัดหยาบ (g)	ร้อยละผลผลิต (%)
จังหวัดนครนายก (a)	สีน้ำตาลอ่อน	6.39	12.78
จังหวัดนครปฐม (b)	สีน้ำตาลเข้ม	4.73	9.46
จังหวัดนครสวรรค์ (c)	สีน้ำตาลเข้ม	3.40	6.80
จังหวัดเชียงราย (d)	สีน้ำตาลเข้ม	3.33	6.66
จังหวัดปราจีนบุรี (e)	สีน้ำตาลเข้ม	6.56	13.12
จังหวัดชลบุรี (f)	สีน้ำตาลเข้ม	5.04	10.08
จังหวัดนครราชสีมา (g)	สีน้ำตาลอ่อน	3.60	7.20
จังหวัดยโสธร (h)	สีน้ำตาลอ่อน	5.78	11.56
จังหวัดปัตตานี (i)	สีน้ำตาลอ่อน	6.24	12.48
จังหวัดยะลา (j)	สีน้ำตาลอ่อน	4.39	8.78

ชัดเจนไม่น้อยกว่า 7 แถบ (ภาพที่ 1) ค่า R_f ของแถบที่แยกได้จากสารสกัดหยาบ แสดงดังตารางที่ 3

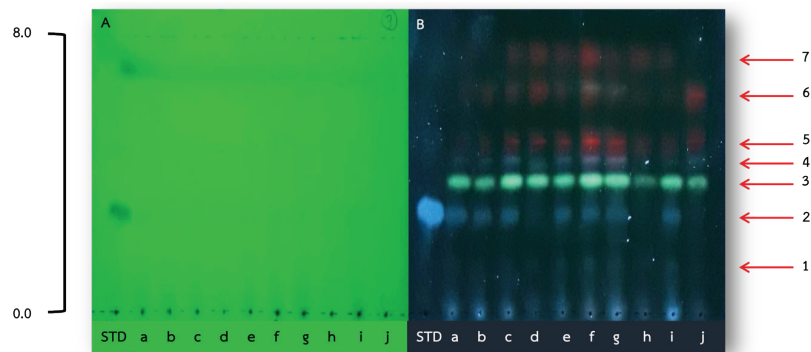
ผลการทดสอบด้วย High Performance Liquid Chromatography

จากผลการทดลองโครมาโทกราฟีของเหลว สมรรถนะสูงจากตัวอย่างหญ้าหนวดแมวทั้ง 10 แหล่ง

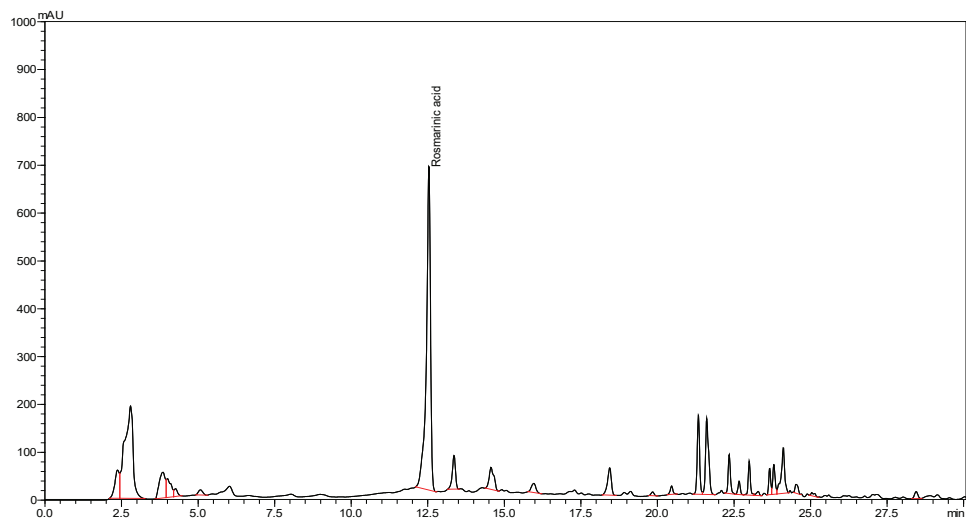
พบว่ามีลักษณะของโครมาโทแกรมที่คล้ายกัน โดยพีคที่ Retention time 12.50 นาที มีลักษณะสเปกตรัม และค่าดูดกลืนแสงมีความยาวคลื่นสูงสุด (λ_{max}) เท่ากับ 329 นาโนเมตร (ภาพที่ 2) ซึ่งตรงกับสารมาตรฐานกรดโรสมารินิก แสดงดังภาพที่ 3

ตารางที่ 3 ลักษณะสี และค่า R_f ของแถบสารที่แยกได้จากสารสกัดหญ้าหนวดแมวโดยวิธี TLC

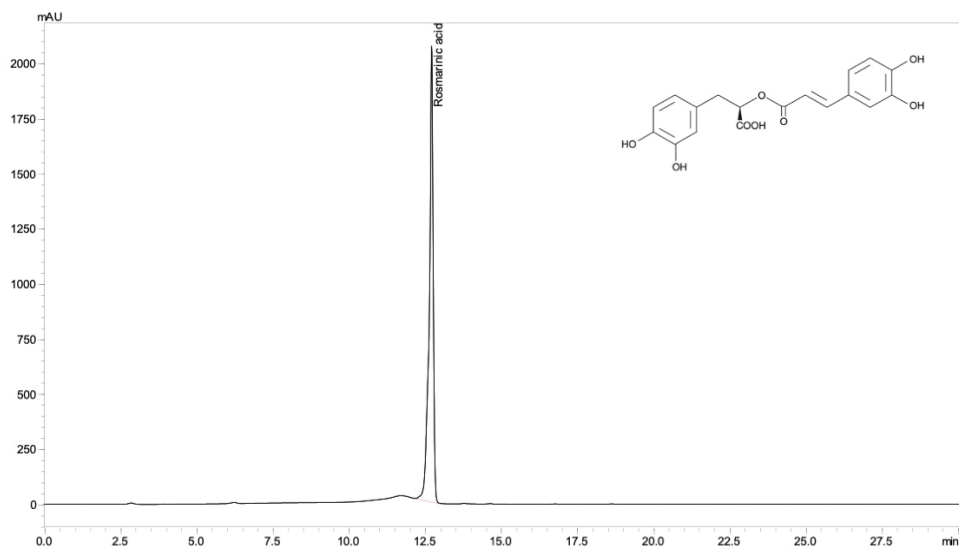
แถบสาร	ลักษณะสีของแถบสาร	R_f
1	สีน้ำเงิน (blue)	0.20
2	สีน้ำเงิน (blue)	0.35
3	สีเขียว (green)	0.38
4	สีฟ้า (light blue)	0.40
5	สีแดง (red)	0.50
6	สีแดงส้ม (red-orange)	0.60
7	สีแดงส้ม (red-orange)	0.70



ภาพที่ 1 TLC chromatogram ภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 (A) และ 366 (B) นาโนเมตร



ภาพที่ 2 HPLC chromatogram ของสารสกัดยาบหญ้าหนวดแมว



ภาพที่ 3 HPLC chromatogram ของสารมาตรฐานกรดโรสมารินิก



การวิเคราะห์ปริมาณกรดโรสมารินิกของสารสกัด
หยาบหญ้าหนวดแมวทั้ง 10 แหล่งเพาะปลูก ส่วนใหญ่
มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)
โดยสารสกัดหยาบหญ้าหนวดแมวจากจังหวัดนครนายกมี
ปริมาณกรดโรสมารินิกสูงที่สุดเท่ากับ 350.86 (ร้อยละ 1.75)
รองลงมาคือจังหวัดชลบุรีมีค่า เท่ากับ 319.93 ไมโครกรัม/
มิลลิลิตร (ร้อยละ 1.60) และแหล่งที่พบปริมาณกรด

โรสมารินิก น้อยที่สุดคือจังหวัดยะลา เท่ากับ 81.16
ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ร้อยละ 0.41) อย่างไรก็ตาม เมื่อ
เปรียบเทียบเป็นรายคู่ ยังพบว่าสารสกัดหยาบหญ้า
หนวดแมว จากจังหวัดนครสวรรค์ จังหวัดเชียงราย จังหวัด
ปราจีนบุรี และจังหวัดนครราชสีมา ไม่มีความแตกต่างกัน
ทางสถิติ แสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ปริมาณและร้อยละกรดโรสมารินิกของหญ้าหนวดแมวจากแหล่งเพาะปลูกที่แตกต่างกัน

แหล่งตัวอย่าง	ปริมาณกรดโรสมารินิก* ($\mu\text{g/ml}$ extracts)	ร้อยละของปริมาณกรดโรสมารินิก (g/100g DW)
จังหวัดนครนายก (a)	350.86 ± 0.06000^a	1.75
จังหวัดนครปฐม (b)	157.69 ± 0.00882^b	0.79
จังหวัดนครสวรรค์ (c)	238.60 ± 0.00333^c	1.19
จังหวัดเชียงราย (d)	199.96 ± 0.17000^d	1.00
จังหวัดปราจีนบุรี (e)	$225.42 \pm 0.01856^{c,e}$	1.13
จังหวัดชลบุรี (f)	319.93 ± 0.00577^f	1.60
จังหวัดนครราชสีมา (g)	$207.58 \pm 0.00577^{d,e}$	1.04
จังหวัดยโสธร (h)	103.41 ± 0.00333^g	0.52
จังหวัดปัตตานี (i)	261.41 ± 0.00577^h	1.31
จังหวัดยะลา (j)	81.16 ± 0.00000^i	0.41

*ตัวอักษรที่ต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ผลการทดสอบความถูกต้องและความน่าเชื่อถือได้ของวิธี การวิเคราะห์ (Method validation)

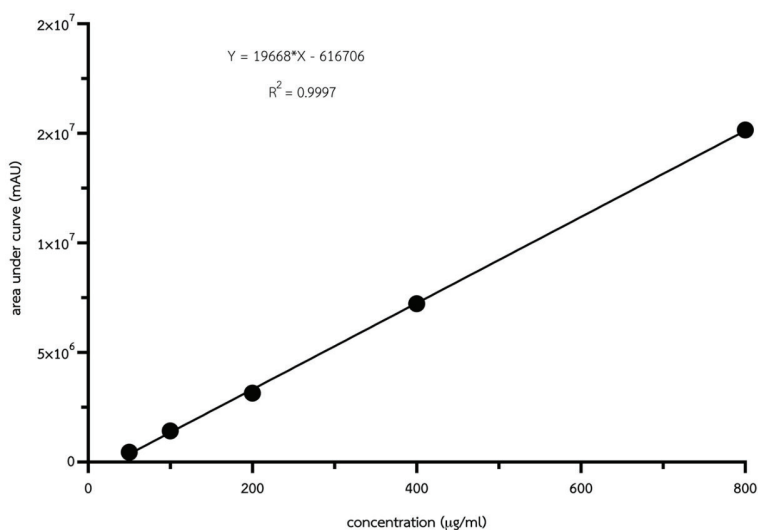
ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity)
แสดงให้เห็นว่ามีลักษณะที่ดี โดยได้สมการเส้นตรง คือ
 $y = 19668x - 616706$ และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2)
เท่ากับ 0.9997 แสดงดังภาพที่ 4

การทดสอบหาค่าความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์
(Accuracy) โดยเติมสารละลายมาตรฐานกรดโรสมารินิกที่
ทราบความเข้มข้นลงไปในตัวอย่งหญ้าหนวดแมว
แล้วคำนวณหาค่า %recovery มีค่าเท่ากับ 99.74 – 108.02 %

จากผลการทดลองแสดงว่าวิธีการวิเคราะห์ดังกล่าว
มีความถูกต้องสูงตามเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (ร้อยละ 90-110)

ผลการทดสอบความแม่นยำของเครื่องมือ
(Precision) พบว่า intra-day precision มีค่า %RSD เท่ากับ
0.1 – 1.9 ส่วน inter-day precision มีค่า %RSD เท่ากับ
0.3 – 0.6 จากผลการทดลองแสดงว่าวิธีการวิเคราะห์ดังกล่าว
มีความแม่นยำตามเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (%RSD น้อยกว่า 2)

ผลการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์
ได้ (LOD) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถอ่านค่าได้
อย่างถูกต้อง (LOQ) พบว่าค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 0.06
และ 0.17 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 5



ภาพที่ 4 กราฟมาตรฐานสารละลายมาตรฐานกรดโรสมารินิก

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ (method validation) กรดโรสมารินิกในสารสกัดหญ้าหนวดแมว

Validation parameter	Rosmarinic acid
Linearity	
linear regression equation	$y = 19668x - 616706$
R^2	0.9997
Accuracy (%recovery)	
50 µg/ml	108.02
100 µg/ml	103.80
400 µg/ml	99.74
Precision (%RSD)	
intra-day	0.1-1.9
inter-day	0.3-0.6
Specificity	
$\lambda_{\max}$ (nm)	329
retention time (min)	12.50
Sensitivity	
LOD (µg/ml)	0.06
LOQ (µg/ml)	0.17



อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากการศึกษานี้ได้วิเคราะห์ปริมาณกรดโรสมารินิกจากสารสกัดหยาบหญ้าหนวดแมวจากแหล่งเพาะปลูกที่ต่างกันในประเทศไทย และสกัดสารด้วยตัวทำละลาย 70% เอทานอล พบว่าสารสกัดหยาบหญ้าหนวดแมวมีร้อยละของผลผลิตอยู่ในช่วงระหว่าง 6.66-13.12 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Suhaimi และคณะ [8] ที่มีการศึกษาการสกัดหญ้าหนวดแมวด้วย 70% เอทานอลร่วมกับการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง พบปริมาณสารสกัดหยาบหญ้าหนวดแมวอยู่ในช่วง 5-10%

ผลการวิเคราะห์ทางโครมาโทกราฟีแบบผิวบางพบว่าสารมาตรฐานกรดโรสมารินิก มีค่า R_f เท่ากับ 0.35 และเมื่อทดสอบสารสกัดหญ้าหนวดแมวภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร พบว่ามีแถบสารทั้งหมด 7 แถบ โดยผลการทดสอบของสารสกัดหญ้าหนวดแมวทั้ง 10 แหล่ง น่าจะมีกรดโรสมารินิกเป็นองค์ประกอบทางเคมี เนื่องจากแถบสาร มีค่า R_f และมีสีตรงกับสารมาตรฐานกรดโรสมารินิก สอดคล้องกับการศึกษาของ Kartini และคณะ [13] ได้ทำการศึกษาทดสอบสารสกัดใบของหญ้าหนวดแมว (*Orthosiphon aristatus*) จาก 11 แหล่ง ในอินโดนีเซีย ด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) พบว่า มีค่า R_f เท่ากับ 0.20-0.30 ซึ่งมีค่าเท่ากันทั้งหมด และปรากฏลักษณะรอยพิมพ์ลายนิ้วมือโครมาโทกราฟีแบบผิวบางคล้ายคลึงกัน นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับข้อมูลใน Thai Herbal Pharmacopoeia ปี 2021 ที่พบแถบสารสีน้ำเงินชัดเจน เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานกรดโรสมารินิก มีค่า R_f เท่ากับ 0.30-0.37 โดยใช้ Mobile Phase ระบบเดียวกัน [1] และเมื่อเปรียบเทียบสารสกัดหญ้าหนวดแมว 7 แหล่งเพาะปลูก ได้แก่ จังหวัดนครนายก จังหวัดนครปฐม จังหวัดนครสวรรค์ จังหวัดปราจีนบุรี จังหวัดชลบุรี จังหวัดนครราชสีมา และจังหวัดปัตตานี ปรากฏเห็นแถบสารสีน้ำเงินชัดเจน แสดงว่าแนวโน้มที่มีปริมาณกรดโรสมารินิกมากกว่าอีก 3 แหล่งเพาะปลูกคือ จังหวัดเชียงราย จังหวัดยโสธร และจังหวัดยะลา ที่ปรากฏแถบสารไม่ชัดเจน ซึ่งน่าจะเกิดจากตัวอย่างจากแหล่งดังกล่าว มีปริมาณกรดโรสมารินิกน้อย ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ด้วย HPLC

จากการทดสอบด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) แต่ละแหล่งมีลักษณะโครมาโทแกรมเหมือนกัน แต่มีพื้นที่ใต้กราฟแตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าหญ้าหนวดแมวแต่ละแหล่งมีปริมาณองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน โดยในการวิเคราะห์ปริมาณกรดโรสมารินิกพบหญ้าหนวดแมวจากทั้ง 10 แหล่งมีปริมาณกรดโรสมารินิกอยู่ระหว่าง 0.41-1.75 g/100 g DW ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในประเทศอินโดนีเซียที่สกัดหญ้าหนวดแมวด้วยเมทานอลจาก 9 แหล่ง พบปริมาณกรดโรสมารินิกอยู่ระหว่าง 0.19-2.60 g/100 g DW [15] ในการศึกษาพบหญ้าหนวดแมวแหล่งที่มีปริมาณกรดโรสมารินิกมากที่สุด คือ จังหวัดนครนายก และแหล่งที่มีปริมาณน้อยที่สุด คือ จังหวัดยะลา ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของพืชสมุนไพรในแต่ละพื้นที่มีความแตกต่างกัน เนื่องจากชนิดของดิน สภาพภูมิอากาศ ปริมาณฝนที่ได้รับ รวมทั้งสถานะแสงแดด [13] นอกจากนี้ยังอาจเกิดจากสายพันธุ์อายุของพืช ช่วงเวลาในการเก็บ และปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมอื่น ๆ ได้ [15] และจากการศึกษา Shekarchi [18] ได้วิเคราะห์ปริมาณกรดโรสมารินิกในพืชสมุนไพรอื่น ๆ 29 สายพันธุ์ในวงศ์ Labiatae พบว่ามีปริมาณตั้งแต่ 0.00 - 5.85 g/100 g DW ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ในการศึกษานี้ยังมีการทดสอบความถูกต้องและความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญด้วยเทคนิค HPLC พบว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความถูกต้องและน่าเชื่อถืออยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ตามเกณฑ์มาตรฐานของ ICH [19] พบว่าค่าความเป็นเส้นตรง ที่ช่วงความเข้มข้น 50 - 800 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีค่า R^2 เท่ากับ 0.9997 ค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 0.06 และ 0.17 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์ intra-day precision และ inter-day precision (%RSD เท่ากับ 0.1 - 1.9 และ 0.3 - 0.6 ตามลำดับ) อยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน %RSD น้อยกว่า 2 ส่วน %recovery มีค่าเท่ากับ ร้อยละ 99.74 - 108.02 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (90-110%) จากการวิเคราะห์ Retention time ลักษณะของสเปกตรัม และค่า λ_{max} ของพีค พบว่าตรงกับสารมาตรฐานกรดโรสมารินิก โดยมี Retention time

เท่ากับ 12.50 นาที และมีค่า $\lambda_{\max}$ เท่ากับ 329 นาโนเมตร ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Hernadi และคณะ [15] และ Lau และ Chua [20] ที่ได้วิเคราะห์หาปริมาณของกรด โรสมารินิกในสารสกัดหญ้าหนวดแมว โดยใช้ RP-HPLC ชนิด Gradient elution พบว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความถูกต้อง และความน่าเชื่อถือ และในปี 2019 การศึกษาของ Guo และคณะ [21] ได้ศึกษาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในหญ้าหนวดแมว โดยใช้วิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบพิเศษและแมสสเปกโตรเมตรี พบว่ามีองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ กรดฟีนอลิก 26 ชนิด ฟลาโวนอยด์ 11 ชนิด ไตเทอร์พีนอยด์ 6 ชนิด กรดไขมัน 4 ชนิด และแทนนิน 5 ชนิด นอกจากนี้ยังพบองค์ประกอบทางเคมีมากที่สุดคือ กรดโรสมารินิก

การศึกษาวิจัยนี้เป็นการเปรียบเทียบปริมาณกรดโรสมารินิกของสารสกัดหญ้าหนวดแมวจากแหล่งปลูกที่แตกต่างกัน ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ซึ่งผลจากการศึกษามีความสำคัญเป็นอย่างมากในด้านการสาธารณสุข สำหรับใช้เป็นฐานข้อมูลและแนวทางในการเลือกซื้อหญ้าหนวดแมวจากแหล่งเพาะปลูกที่พบปริมาณกรดโรสมารินิกตามเกณฑ์ของ Thai herbal pharmacopoeia ได้อย่างเหมาะสม เพื่อนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์หรือนวัตกรรมจากหญ้าหนวดแมว เพื่อนำมาใช้ในการแพทย์และสาธารณสุขต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนวิจัยจาก สาขาวิชา แพทย์แผนไทย คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี วิทยาเขตสกลนคร จังหวัดสกลนคร และกลุ่มงานหลักสูตรการแพทย์แผนไทย วิทยาลัยการสาธารณสุขสิรินธร จังหวัดพิษณุโลก คณะสาธารณสุขและสหเวชศาสตร์ สถาบันพระบรมราชชนก

เอกสารอ้างอิง

1. Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. Thai Herbal Pharmacopoeia 2021.

Bangkok: The Agricultural Co-operative Federation of Thailand, Ltd; 2021.

2. Tabana YM, Al-Suede FS, Ahamed MB, Dahham SS, Hassan LE, Khalilpour S, et al. Cat's whiskers (*Orthosiphon stamineus*) tea modulates arthritis pathogenesis via the angiogenesis and inflammatory cascade. BMC Complement Altern Med 2016;16(1):480.
3. Chua LS, Lau CH, Chew CY, Ismail NIM, Soontornngun N. Phytochemical profile of *Orthosiphon aristatus* extracts after storage: Rosmarinic acid and other caffeic acid derivatives. Phytomedicine 2018;39:49-55.
4. Ashraf K, Halim H, Lim SM, Ramasamy K, Sultan S. In vitro antioxidant, antimicrobial and antiproliferative studies of four different extracts of *Orthosiphon stamineus*, *Gynura procumbens* and *Ficus deltoidea*. Saudi J Biol Sci 2020;27(1): 417-32.
5. Alshawsh MA, Abdulla MA, Ismail S, Amin ZA, Qader SW, Hadi HA, et al. Free radical scavenging, antimicrobial and immunomodulatory activities of *Orthosiphon stamineus*. Molecules 2012;17(5):5385-95.
6. Hsu CL, Hong BH, Yu YS, Yen GC. Antioxidant and anti-inflammatory effects of *Orthosiphon aristatus* and its bioactive compounds. J Agric Food Chem 2010;58(4):2150-6.
7. Wang Q, Wang J, Li N, Liu J, Zhou J, Zhuang P, et al. A Systematic Review of *Orthosiphon stamineus* Benth. in the Treatment of Diabetes and Its Complications. Molecules 2022;27(2):444.
8. Suhaimi SH, Hasham R, Hafiz Idris MK, Ismail HF, Mohd Ariffin NH, Abdul Majid FA. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction Conditions



- Followed by Solid Phase Extraction Fractionation from *Orthosiphon stamineus* Benth (Lamiace) Leaves for Antiproliferative Effect on Prostate Cancer Cells. *Molecules* 2019;24(22):4183.
9. Batubara I, Komariah K, Sandrawati A, Nurcholis W. Genotype selection for phytochemical content and pharmacological activities in ethanol extracts of fifteen types of *Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq. leaves using chemometric analysis. *Sci Rep* 2020;10(1):1-11.
 10. Ameer OZ, Salman IM, Asmawi MZ, Ibraheem ZO, Yam MF. *Orthosiphon stamineus*: traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and toxicology. *J Med Food* 2012;15(8):678-90.
 11. Lokman EF, Saparuddin F, Muhammad H, Omar MH, Zulkapli A. *Orthosiphon stamineus* as a potential antidiabetic drug in maternal hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic rats. *Integr Med Res* 2019;8(3):173-9.
 12. Dubois M, Bailly F, Mbemba G, Mouscadet J-F, Debyser Z, Witvrouw M, et al. Reaction of rosmarinic acid with nitrite ions in acidic conditions: discovery of nitro- and dinitro-rosmarinic acids as new anti-HIV-1 agents. *J Med Chem* 2008;51(8):2575-9.
 13. Kartini K, Jayani NIE, Hadiyat MA, Avanti C. Thin Layer Chromatography Fingerprinting and Clustering of *Orthosiphon stamineus* Benth. from Different Origins. *Pharmacogn J* 2020;12(1):1683-91.
 14. Hashim S, Beh HK, Hamil MS, Ismail Z, Majid AM. High-performance Thin-layer Chromatography Method Development, Validation, and Simultaneous Quantification of Four Compounds Identified in Standardized Extracts of *Orthosiphon stamineus*. *Pharmacogn Res* 2016;8(4):238-43.
 15. Hernadi E, Rohaeti E, Rafi M, Wahyuni WT, Putri SP, Fukusaki E. HPLC fingerprinting coupled with linear discriminant analysis for the detection of adulteration in *Orthosiphon aristatus*. *J Liq Chromatogr Rel Technol* 2019;42(15-16):513-20.
 16. Lee J, Jung E, Koh J, Kim YS, Park D. Effect of rosmarinic acid on atopic dermatitis. *J Dermatol* 2008;35(12):768-71.
 17. Osakabe N, Takano H, Sanbongi C, Yasuda A, Yanagisawa R, Inoue K, et al. Anti-inflammatory and anti-allergic effect of rosmarinic acid (RA); inhibition of seasonal allergic rhinoconjunctivitis (SAR) and its mechanism. *Biofactors* 2004;21(1-4):127-31.
 18. Shekarchi M, Hajimehdipoor H, Saeidnia S, Gohari AR, Hamedani MP. Comparative study of rosmarinic acid content in some plants of Labiatae family. *Pharmacogn Mag* 2012;8(29):37-41.
 19. Guideline IHT. Validation of analytical procedures: text and methodology. Q2 (R1) 2005;1(20):05.
 20. Lau CH, Chua LS. Solvation Free Energy Simulation for Rosmarinic Acid Extraction from *Orthosiphon stamineus*. *Methods Protoc* 2019;2(3):64.
 21. Guo Z, Liang X, Xie Y. Qualitative and quantitative analysis on the chemical constituents in *Orthosiphon stamineus* Benth. using ultra high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 2019;164:135-47.