

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณไมทราไจนีน ในสารสกัดใบกระท่อม โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง Method validation for determination of mitragynine in Kratom leaf extract by high performance liquid chromatography

1

سوبงกช ทรัพย์แดง¹, ธิดารัตน์ เครือเทียน¹, ปัทมาพร จิตปรีดา¹, วรวิทย์ วาณิชยสุวรรณ²
Subongkoch Subtaeng¹, Thidarat Kruatian¹, Pattamaporn Jitpreeda¹, Worrawit Wanitsuwan²
รับบทความ: 7 มิถุนายน 2566 แก้ไขบทความ: 31 สิงหาคม 2566 ยอมรับตีพิมพ์: 4 กันยายน 2566

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณไมทราไจนีนในใบกระท่อม และทดสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ AOAC (Mudge and Brown, 2017) และ Limsuwanchote และคณะ (2017) ในการหาปริมาณไมทราไจนีนในตัวอย่างสารสกัดใบกระท่อม ซึ่งพบว่าวิธีวิเคราะห์มีความจำเพาะเจาะจงและมีช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์ที่ดี โดยอยู่ในช่วง 5-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ 0.9996 ความถูกต้องของวิธีซึ่งแสดงด้วยร้อยละการคืนกลับ พบว่า อยู่ในช่วงร้อยละ 101.19-103.26 ค่าความเที่ยงแสดงด้วยร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ที่วิเคราะห์ภายในวันและต่างวัน มีค่าน้อยกว่า 3% ค่าขีดจำกัดในการตรวจพบและขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณของไมทราไจนีน เท่ากับ 0.108 มิลลิกรัมต่อกรัม และ 0.125 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับของวิธีทดสอบตามมาตรฐาน Standard Method Performance Requirements (SMPR) for Alkaloids of *Mitragyna speciosa* จากนั้นได้ทำการเก็บตัวอย่างใบกระท่อมจากแหล่งต่าง ๆ จำนวน 15 ตัวอย่าง มาวิเคราะห์ตามวิธีที่ผ่านการทดสอบความใช้ได้แล้ว พบว่า ตัวอย่างใบกระท่อมมีปริมาณไมทราไจนีน อยู่ในช่วง 2.30-25.54 มิลลิกรัมต่อกรัม ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าวิธีการวิเคราะห์มีความน่าเชื่อถือ และเหมาะสมสำหรับการตรวจหาปริมาณสารไมทราไจนีนในตัวอย่างสารสกัดใบกระท่อม

คำสำคัญ: ไมทราไจนีน กระท่อม โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

¹กองเทคโนโลยีชุมชน กรมวิทยาศาสตร์บริการ

²สถาบันวิจัยและนวัตกรรมทางการแพทย์ สำนักวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Abstract

In this research, the method modified from the AOAC method (Mudge and Brown, 2017) and Limsuwanchote method (2017) for determination of mitragynine in Kratom leaf extract was optimized and validated. The method presented specificity and good linearity within a concentration range of 5 to 50 µg/mL, with a correlation coefficient (R^2) of 0.9996. The accuracy studies were conducted as percent recovery, resulting in values ranging from 100.19 – 103.26%. The precision evaluated as a relative standard deviation of repeatability (%RSD) for intra-day and inter-day precision, which exhibited good repeatability of less than 3%. The limit of detection (LOD) and the limit of quantitation (LOQ) were 0.108 and 0.125 mg/g, respectively. The linearity, percent recovery, precision, LOD, and LOQ values were deemed acceptable and complied with the requirement of Standard Method Performance Requirements for Alkaloids of *Mitragyna speciosa*. Moreover, using this validated method, fifteen samples of Kratom leaves from the central and southern regions of Thailand were analyzed, revealing mitragynine concentrations ranging from 2.30 to 25.54 mg/g. The research results showed that the modified method is reliable and suitable for determining mitragynine in Kratom leaf extract samples.

Keywords: Mitragynine, Kratom, High performance liquid chromatography

¹Community Technology Division, Department of Science Service

²Medical Science Research and Innovation Institute, Research and Development Office, Prince of Songkla University

*Corresponding author e-mail address : subongkoch@dss.go.th

1. บทนำ (Introduction)

ปัจจุบันกระท่อมได้ถูกปลดออกจากบัญชียาเสพติดให้โทษ ทำให้พืชกระท่อมได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็ว เกิดการเพาะปลูก ซื้อขายและใช้ประโยชน์จากใบพืชกระท่อมอย่างแพร่หลายในเกือบทุกภูมิภาคของประเทศ โดยกระท่อม (*Kratom*; *Mitragyna speciosa* (Korth.) Havil.) เป็นพืชสมุนไพรที่ถูกใช้ประโยชน์มาอย่างยาวนาน ในตำรับยาแผนโบราณหลายขนาน กระท่อมถูกใช้เป็นตัวยาในการรักษาอาการปวด เช่น ยาแก้ปวดลงเป็นเลือด ยาแก้ปวดหัวลูก ยาประสะกาฬแดง ยาประสะกระท่อม ยาเหลืองกระท่อม เป็นต้น [1] สารสำคัญหลักที่พบในใบกระท่อม คือ สารไมทราไจนีน ซึ่งเป็นสารกลุ่มอินโดลอัลคาลอยด์ (Indole alkaloids) พบมากที่สุดถึงร้อยละ 66 นอกจากนี้ยังพบอัลคาลอยด์ชนิดอื่น ๆ อีก เช่น 7-ไฮดรอกซีไมทราไจนีน (7-Hydroxymitragynine) สเปซิโอไจนีน (Speciogynine) เพแนนเทอีน (Paynantheine) และสเปซิโอซีเลียทีน (Speciociliatine) เป็นต้น [2] มีงานวิจัย พบว่า กระท่อมสามารถออกฤทธิ์ระงับปวดได้มากกว่าและมีผลข้างเคียงน้อยกว่ามอร์ฟีน [3] จึงมีความเป็นไปได้ที่พืชกระท่อมจะถูกนำไปต่อยอดใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ และมีโอกาสพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ประเภทต่าง ๆ ที่สร้างมูลค่าเพิ่มมากขึ้น

ปัจจุบันประเทศสหรัฐอเมริกาเป็นประเทศที่รับซื้อกระท่อมมากที่สุด โดยร้อยละ 95 ของทั้งหมด นำเข้าจากประเทศอินโดนีเซีย ในระหว่างปี 2562-2563 อินโดนีเซียมีการส่งออกพืชกระท่อมและผลิตภัณฑ์จากกระท่อมสู่สหรัฐอเมริกา คิดเป็นปริมาณ 121,756 กิโลกรัม มูลค่า 548,909 เหรียญสหรัฐ [4] ซึ่งในขณะนี้รัฐบาลอินโดนีเซียมีแนวโน้มที่จะพิจารณาห้ามไม่ให้มีการส่งออกพืชกระท่อม [5] หากกฎหมายดังกล่าวประกาศใช้ จะเป็นโอกาสของประเทศไทยที่จะส่งออกพืชกระท่อมไปยังสหรัฐอเมริกาเพิ่มขึ้น โดยประเทศไทยมีข้อได้เปรียบ คือ มีกระท่อมคุณภาพดีที่ให้สารสำคัญสูงกว่าในหลายประเทศ ได้มีงานวิจัยของ Takayama และคณะ [6] เปรียบเทียบปริมาณไมทราไจนีนในใบกระท่อมของไทยและประเทศมาเลเซีย พบว่า ใบกระท่อมของไทยมีปริมาณสารไมทราไจนีนสูงกว่าใบกระท่อมของมาเลเซียถึง 5 เท่า และ พบว่า รูปแบบการสร้างและสะสมสารอัลคาลอยด์ของทั้งสองแหล่งแตกต่างกัน ซึ่งเกิดจากปัจจัยของสภาพแวดล้อม ทำให้พืชเจริญเติบโต สร้างและสะสมสารได้แตกต่างกัน ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อปริมาณสารสำคัญในพืชกระท่อมจึงขึ้นอยู่กับพื้นที่เพาะปลูก สายพันธุ์ อายุ และฤดูกาลเก็บเกี่ยว ดังนั้น การศึกษาปริมาณสารสำคัญของวัตถุดิบใบกระท่อมจากแหล่งพื้นที่ต่าง ๆ จึงเป็นข้อมูลสำคัญในการกำหนดคุณลักษณะวัตถุดิบใบกระท่อมนำไปสู่การควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบและสารสกัดใบกระท่อม เป็นตัวแปรสำคัญในการกำหนดราคาของกระท่อมในตลาด

เทคนิค High-performance liquid chromatography (HPLC) เป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมในการวิเคราะห์ปริมาณไมทราไจนีน เนื่องจากให้ผลการวิเคราะห์ที่แม่นยำ รวดเร็ว และมีความน่าเชื่อถือ เช่นงานวิจัยของ Mudge และ Brown (2017, 2018) [7, 8] ได้สกัดไมทราไจนีนในใบกระท่อมด้วย 70% เมทานอลในเกลเซียลแอซิดิก แล้ววิเคราะห์โดยใช้สภาวะกราเดียนท์ และวิธีของ Limsuwanchote และคณะ (2017) [9] และ Wungsintaweekul และคณะ (2012) [10] ได้สกัดไมทราไจนีนในพืชกระท่อมด้วยเมทานอล แล้ววิเคราะห์โดยใช้สภาวะไอโซครีติก โดยผู้วิจัยได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมมาประยุกต์ใช้ในงานวิจัย รวมถึงทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ เพื่อให้ผลการตรวจสอบมีความถูกต้อง แม่นยำ

มีความน่าเชื่อถือ เป็นข้อมูลที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งในด้านการควบคุมคุณภาพวัตถุดิบพืชกระท่อม ให้มีมาตรฐานสามารถนำไปผลิตหรือแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ประเภทต่าง ๆ ได้อย่างมีคุณภาพ ซึ่งนำไปสู่การสร้างมาตรฐานเพิ่มความเชื่อมั่นแก่ผู้ผลิตและผู้บริโภค ตลอดจนยกระดับคุณภาพวัตถุดิบใบกระท่อมให้สามารถแข่งขันได้ในตลาดโลกต่อไป

2. วิธีการวิจัย (Experimental methods)

2.1 ตัวอย่าง

ผู้วิจัยได้ดำเนินการเก็บตัวอย่างใบกระท่อมในพื้นที่ภาคกลาง 3 จังหวัด ได้แก่ ปทุมธานี นนทบุรี และนครปฐม และในพื้นที่ภาคใต้ 4 จังหวัด ได้แก่ ชุมพร นครศรีธรรมราช กระบี่ และสตูล โดยเลือกเก็บใบที่สามหรือสี่นับจากยอด เป็นใบที่ไม่อ่อนหรือไม่แก่จนเกินไป สังเกตลักษณะใบ จดบันทึกข้อมูลของต้นกระท่อมที่เก็บและบันทึกภาพใบกระท่อมไว้ จากนั้นนำตัวอย่างใบกระท่อมสดมาล้างทำความสะอาดและอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนตัวอย่างแห้ง นำมาบดให้ละเอียด และร่อนด้วยตะแกรงที่มีความละเอียด 250 ไมครอน เก็บตัวอย่างไว้ในตู้ดูดความชื้น เพื่อใช้ทำการทดลองต่อไป

2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High-performance liquid chromatography, photodiode array detector, HPLC-PDA) ยี่ห้อ Waters รุ่น Waters 2998 ผลิตจากประเทศสหรัฐอเมริกา ใช้คอลัมน์ชนิดอ็อกตะเดซิลไฮเลน (Octadecylsilane) หรือ C18 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4.6 มม. ความยาว 25 ซม. ขนาดอนุภาค 5 ไมครอน ยี่ห้อ Merck รุ่น LiChrospher® ผลิตจากประเทศเยอรมันนี, เครื่องเขย่าสารโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasonic sonicator) ยี่ห้อ GT sonic ผลิตในประเทศจีน, เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Sartorius รุ่น SECURA6102-1S ผลิตจากประเทศเยอรมันนี, เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge) ยี่ห้อ Kubota รุ่น Kubota 1930 ผลิตจากประเทศญี่ปุ่น และเครื่องทำน้ำบริสุทธิ์ (Deionized Water) ยี่ห้อ Ultra-Pure Water, ELGA, รุ่น ULTRA IONIC ผลิตจากประเทศสหรัฐอเมริกา

2.3 สารเคมี

สารมาตรฐานไมทราไจนีน (Mitagynine) ความบริสุทธิ์ 95.4 เปอร์เซ็นต์ ยี่ห้อ Chromadex สารมาตรฐาน 7-ไฮดรอกซีไมทราไจนีน (7-Hydroxymitagynine) ความบริสุทธิ์ 90.6 เปอร์เซ็นต์ ยี่ห้อ Chromadex ผลิตจากประเทศสหรัฐอเมริกา เอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 (Ethanol 95%) AR grade ยี่ห้อ Merck, เมทานอล (Methanol) HPLC grade ยี่ห้อ Merck กรดแอซีติก (Acetic acid) HPLC grade ยี่ห้อ Merck, แอมโมเนียมแอซีเตต (Ammonium acetate) HPLC grade ยี่ห้อ Merck และแอซีโทไนไทรล์ (Acetonitrile) HPLC grade ยี่ห้อ Merck ผลิตจากประเทศเยอรมันนี

2.4 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

2.4.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน 7-ไฮดรอกซีไมทราไจนีนเข้มข้น โดยชั่งสารมาตรฐาน 7-ไฮดรอกซีไมทราไจนีนน้ำหนัก 200 ไมโครกรัม (0.2 มิลลิกรัม) ละลายด้วยเมทานอล และปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตร

ขนาด 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐาน 7-ไฮดรอกซีไมทราไจนีน Stock solution เข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.4.2 เตรียมสารละลายมาตรฐานไมทราไจนีนเข้มข้น โดยชั่งสารมาตรฐานไมทราไจนีนน้ำหนัก 2,000 ไมโครกรัม (2 มิลลิกรัม) ละลายด้วยเมทานอล และปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานไมทราไจนีน Stock solution ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.5 วิธีดำเนินงาน

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ พัฒนาขึ้นตาม Standard method performance requirements (SMPR) for alkaloids of *Mitragyna speciosa* ของ AOAC (2015) [11] และแนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดี่ยว ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (2549) [12] โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ไมทราไจนีนด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ไมทราไจนีนด้วยเครื่อง HPLC

สภาวะ	รายละเอียด
คอลัมน์	LiChrospher® C18 เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มม. ความยาว 25 ซม. ขนาดอนุภาค 5 ไมครอน
Elution mode	Isocratic
เฟสเคลื่อนที่	20 mM แอมโมเนียมแอซิเตต pH 6.0 และแอซีโตนไตรล์ อัตราส่วน 35 : 65
อัตราการไหล (มล./นาที)	1.0
ปริมาตรที่ฉีด (ไมโครลิตร)	5.0
เวลาในการฉีด (นาที)	15
เวลาที่สารเคลื่อนที่ (นาที)	11.28
เครื่องตรวจจับ	ชนิดโฟโตไดโอดอาร์เรย์ (Photodiode array detector)
ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)	226

2.5.1 การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity)

ทำการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานผสมระหว่าง สารละลายมาตรฐานของ 7-ไฮดรอกซีไมทราไจนีน ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลายมาตรฐานไมทราไจนีน ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยเครื่อง HPLC เพื่อตรวจสอบการแยกสารไมทราไจนีนออกจากสารอื่นๆ ซึ่งสารทั้งสองต้องมีพีคแยกออกจากกันอย่างชัดเจน

2.5.2 การทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity)

กำหนดช่วงความเข้มข้นของสารไมทราจาโนนในช่วง 5-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานไมทราจาโนน 6 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ ความเข้มข้น 5, 10, 20, 30, 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเปิดสารละลายมาตรฐานไมทราจาโนน stock solution ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.25, 0.50, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล กรองด้วยเยื่อกรองชนิด PTFE ขนาดรูพรุน 0.22 ไมครอน แล้วนำไปวิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ สร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration curve) ระหว่างพื้นที่พีค (Peak area) และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานไมทราจาโนน โดยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient) ของกราฟมาตรฐานต้องมีค่าไม่น้อยกว่า 0.995

2.5.3 ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (Precision)

ทดสอบความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ โดยใช้สารมาตรฐานไมทราจาโนน 3 ระดับความเข้มข้น ในช่วง ต่ำ กลาง และสูง ได้แก่ 10, 20 และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้สารสกัดจากตัวอย่างใบกระท่อม 2 ตัวอย่าง โดยทำ Intra-day precision จำนวน 6 ซ้ำ ภายในวันเดียวกัน จากนั้นนำปริมาณไมทราจาโนนมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย (Mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) จากนั้นทำ Intermediate precision ทำการทดลองเหมือน Intra-day precision โดย (1) เปลี่ยนผู้ทดลอง และ (2) เปลี่ยนวันที่ทำการทดลอง โดยใช้ผู้ทดลองเดิม เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำปริมาณไมทราจาโนนมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

2.5.4 ความถูกต้อง (Accuracy)

การทดสอบความถูกต้องโดยใช้วิธีการเติมสารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นลงในตัวอย่างที่มีปริมาณไมทราจาโนนต่ำ หรือ Sample blank ที่ 3 ระดับความเข้มข้นคือ ต่ำ กลาง และสูง ได้แก่ 10, 20 และ 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปสกัดด้วยวิธีเดียวกับการวิเคราะห์จริง ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำผลที่ได้มาคำนวณร้อยละของการคืนกลับ (%Recovery) ในแต่ละระดับความเข้มข้น ควรอยู่ในช่วง 95.0 – 105.0 และค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%Relative standard deviation, %RSD) ไม่เกิน 3.0 โดยมีสูตรคำนวณ ดังนี้

$$\%Recovery = (C1-C2)/C3 \times 100$$

เมื่อ C1 คือ ความเข้มข้นของสารไมทราจาโนนในตัวอย่างที่วัดได้

C2 คือ ความเข้มข้นของสารไมทราจาโนนในตัวอย่างแบลนด์ (Sample blank)

C3 คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานไมทราจาโนนที่เติมลงในตัวอย่าง (Spiked sample)

$$\%RSD = SD / \bar{X}$$

เมื่อ SD = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

\bar{X} = ค่าเฉลี่ยของข้อมูล

2.5.5 การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

โดยทั่วไปขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) จะไม่สามารถแสดงปริมาณได้อย่างถูกต้องแม่นยำ จึงประมาณค่าเป็น 3 เท่าของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานบวกกับค่าเฉลี่ยของ Sample blank เนื่องจากใช้ตัวอย่างผงใบกระท่อมที่มีไมทราไจนีนปริมาณต่ำเป็น Sample blank ทำการวิเคราะห์จำนวน 10 ซ้ำ จากนั้นคำนวณหาค่าเฉลี่ย (\bar{X}) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เพื่อหาค่า LOD และค่าประมาณ LOQ โดยคำนวณจาก

$$\text{LOD} = \bar{X} + 3\text{SD}$$

$$\text{การประมาณค่า} \quad \text{LOQ} = \bar{X} + 10\text{SD}$$

จากนั้นยืนยันค่า LOQ โดยเติมสารละลายมาตรฐานไมทราไจนีนที่ระดับความเข้มข้นเดียวกับค่าประมาณ LOQ จำนวน 7 ซ้ำ แล้วพิจารณาความเที่ยง (Precision) ที่แสดงด้วย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ และความแม่นยำ โดยคำนวณจากค่าร้อยละการคืนกลับ (%Recovery)

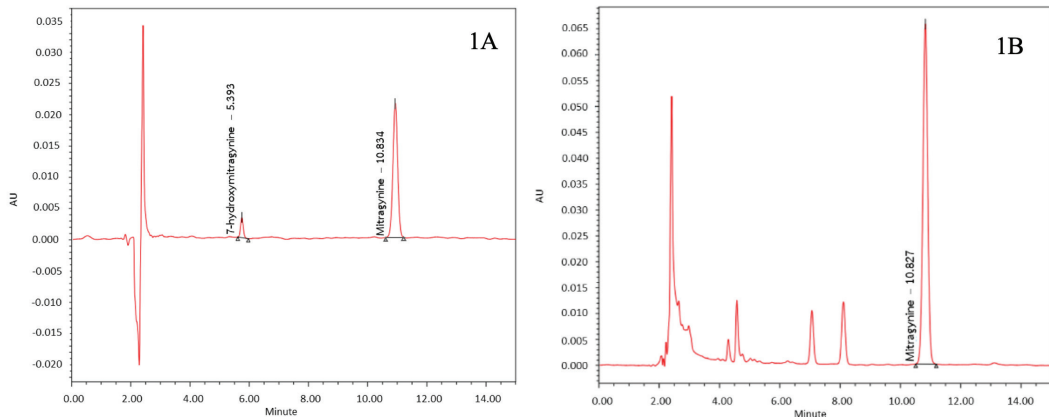
2.5.6 การวิเคราะห์ไมทราไจนีนในตัวอย่างใบกระท่อมจากแหล่งต่าง ๆ

เตรียมตัวอย่างสารสกัดใบกระท่อมจำนวน 15 ตัวอย่าง โดยชั่งตัวอย่างผงใบกระท่อม 0.200x กรัม ลงในหลอดเข็นตริฟิวก์ขนาด 15 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเมทานอล 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex เป็นเวลา 30 วินาที แล้วนำไปสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำสารสกัดที่ได้มาทำปั่นเหวี่ยง ที่ 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเอาเฉพาะสารสกัดส่วนใส นำตะกอนไปสกัดซ้ำ แล้วนำสารสกัดส่วนใสมารวมกัน จากนั้นนำสารละลายกรองผ่านเยื่อกรอง PTFE ขนาดรูพรุน 0.22 ไมครอน นำไปวิเคราะห์หาปริมาณไมทราไจนีนด้วยเครื่อง HPLC แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณไมทราไจนีนในหน่วยมิลลิกรัมต่อกรัม (mg/g)

3. ผลและวิจารณ์ (Results and discussion)

3.1 การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity)

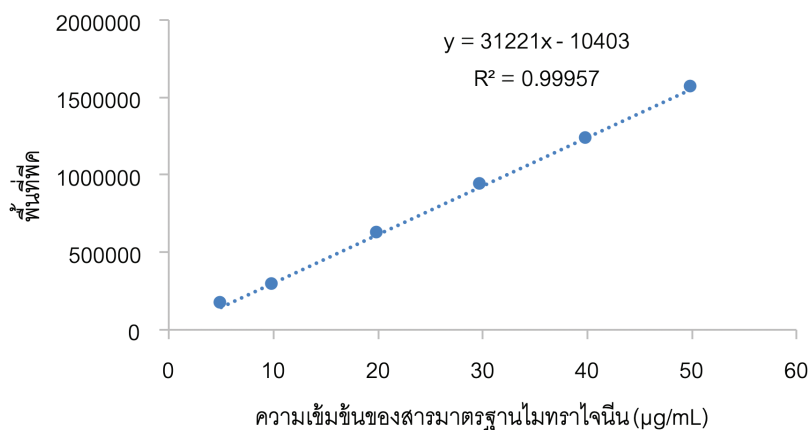
ทำการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานผสมระหว่าง สารละลายมาตรฐานของ 7-ไฮดรอกซีไมทราไจนีน ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลายมาตรฐานไมทราไจนีน ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยเครื่อง HPLC รูปที่ 1A แสดงโครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐานที่ได้จากการวิเคราะห์พบว่า พีคของ 7-ไฮดรอกซีไมทราไจนีนและพีคของไมทราไจนีนแยกจากกันอย่างชัดเจน โดยมี Retention time เท่ากับ 5.39 และ 10.83 นาที ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างสารสกัดใบกระท่อม พบว่า พีคของไมทราไจนีน มี Retention time เท่ากับ 10.83 นาที ดังรูปที่ 1B ดังนั้นวิธีวิเคราะห์นี้มีความจำเพาะเจาะจงสูง ปราศจากเมทริกซ์รบกวน



รูปที่ 1 โครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมระหว่างสารละลายมาตรฐาน 7-ไฮดรอกซีไมทร่าเจนีนและสารละลายมาตรฐานไมทร่าเจนีน (1A) และโครมาโตแกรมของตัวอย่างสารสกัดใบกระเทียม (1B)

3.2 การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and range)

การทดสอบนี้ได้กำหนดช่วงการวิเคราะห์สารไมทร่าเจนีนอยู่ในช่วงความเข้มข้น 5–50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำสารมาตรฐานไมทร่าเจนีนที่เตรียมไว้ไปวิเคราะห์ด้วย HPLC ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ แล้วนำค่าเฉลี่ยมาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่พีค จะได้กราฟมาตรฐานที่มีสมการเส้นตรง $y = 31221x - 10403$ และมีค่า Correlation coefficient (r^2) = 0.9996 ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานไมทร่าเจนีนที่ความเข้มข้น 5-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.3 การทดสอบความเที่ยง (Precision)

ความเที่ยง เป็นความใกล้เคียงของค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำ ๆ กันหลายครั้งเพื่อดูการกระจายของค่าที่วิเคราะห์ได้ในแต่ละความเข้มข้น โดยเลือกวิเคราะห์สารมาตรฐานไมทร่าเจนีนความเข้มข้น 10, 20 และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และตัวอย่างกระเทียม จำนวน 2 ตัวอย่าง โดยวิเคราะห์แบบ Intra-day precision และแบบ Inter-day precision แล้วนำผลการวิเคราะห์มารายงานผลในรูปของ %Relative standard deviation (%RSD) ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความเที่ยง Intra-day และ Inter-day precision ของสารมาตรฐานไมทราไจนีน และในตัวอย่างสารสกัดใบกระท่อม (n = 6)

สารมาตรฐาน/ ตัวอย่าง	Intra-day		Inter-day			
	วันที่ 1		วันที่ 2		วันที่ 3	
	Mean \pm SD	%RSD	Mean \pm SD	%RSD	Mean \pm SD	%RSD
10 μ g/mL	9.90 \pm 0.16	1.64	9.91 \pm 0.16	1.99	9.98 \pm 0.23	2.29
20 μ g/mL	19.95 \pm 0.12	0.59	20.96 \pm 0.46	2.19	21.04 \pm 0.30	1.42
40 μ g/mL	39.83 \pm 0.29	0.72	40.74 \pm 0.74	1.81	41.48 \pm 0.81	1.94
Sample 1	20.58 \pm 0.39	1.89	20.31 \pm 0.34	1.68	20.84 \pm 0.28	1.33
Sample 2	20.49 \pm 0.30	1.46	20.34 \pm 0.34	1.69	20.77 \pm 0.24	1.17

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าค่า %RSD ของ Intra-day และ Inter-day precision ของสารมาตรฐานทั้ง 3 ความเข้มข้น และของตัวอย่างใบกระท่อมที่วิเคราะห์ได้ เป็นไปตามมาตรฐาน Standard method performance requirements for alkaloids of *Mitragyna speciosa* กำหนดไว้ โดยผลการวิเคราะห์ปริมาณของไมทราไจนีนมีค่า %RSD \leq 3% แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์มีความเที่ยงสูง

3.4 การทดสอบความถูกต้อง (Accuracy)

ความถูกต้องของผลทดสอบ (Accuracy) เป็นการแสดงความใกล้เคียงของค่าที่วิเคราะห์ได้ ด้วยวิธีการทดสอบนั้นกับค่าอ้างอิงหรือค่าจริง สำหรับงานวิจัยนี้เนื่องจากไม่สามารถหาสารมาตรฐานอ้างอิงได้ จึงทำการเติมสารมาตรฐานไมทราไจนีน 3 ระดับความเข้มข้น คือความเข้มข้น 10.00, 20.00 และ 40.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในตัวอย่างใบกระท่อมก่อนการสกัด และวิเคราะห์หาปริมาณไมทราไจนีนแล้วคำนวณหา %Recovery พบว่า มีค่าอยู่ในช่วง 100.19 – 103.26% ดังแสดงในตารางที่ 3 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ตาม Standard method performance requirements for alkaloids of *Mitragyna speciosa* ที่กำหนดค่าไว้ในช่วง 95-105

ตารางที่ 3 ค่าร้อยละการคืนกลับ (%Recovery) ของสารไมทราไจนีนในตัวอย่างสารสกัดใบกระท่อม (n = 3)

ความเข้มข้นของ ไมทราไจนีนที่เติม (mg/ml)	ร้อยละการคืนกลับ (%Recovery)	%RSD
10.00	101.99 \pm 1.49	1.46
20.00	100.19 \pm 0.81	0.80
40.00	103.26 \pm 1.60	1.55

3.5 การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) และการประมาณค่าขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

จากการศึกษาขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of detection : LOD) และการประมาณค่าขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation : LOQ) ของไมทราไจนีนโดยคำนวณจากสมการในข้อ 2.5.5 เพื่อหาค่า LOD และ LOQ พบว่า เมื่อนำตัวอย่างกระชอมที่ถูกสกัดไมทราไจนีนออกแล้ว มาสกัดแล้ววิเคราะห์ขีดจำกัดในการตรวจพบของไมทราไจนีนเท่ากับ 0.108 มิลลิกรัมต่อกรัม และมีค่าประมาณขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณเท่ากับ 0.125 มิลลิกรัมต่อกรัม แสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการศึกษาขีดจำกัดในการตรวจพบ (LOD) และการประมาณค่าขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) ของไมทราไจนีน

ลำดับ	ปริมาณไมทราไจนีน (มิลลิกรัมต่อกรัม)	ร้อยละของไมทราไจนีน (%w/w)
1	0.102	0.0102
2	0.102	0.0102
3	0.097	0.0097
4	0.103	0.0103
5	0.099	0.0099
6	0.098	0.0098
7	0.104	0.0104
8	0.097	0.0097
9	0.101	0.0101
10	0.099	0.0099
เฉลี่ย	0.100	0.0100
SD	0.00253	0.000253
%RSD	2.49	2.49
LOD = $(\bar{X}+3SD)$	0.108 (107.6 ppm)	0.0110
การประมาณค่า LOQ= $(\bar{X}+10SD)$	0.125 (125.1 ppm)	0.0130

*หมายเหตุ ค่าที่ยอมรับตามมาตรฐาน Standard method performance requirements for alkaloids of *Mitragyna speciosa* (2015) กำหนด LOD 0.015% (150 ppm), LOQ \leq 0.05 % (\leq 500 ppm)

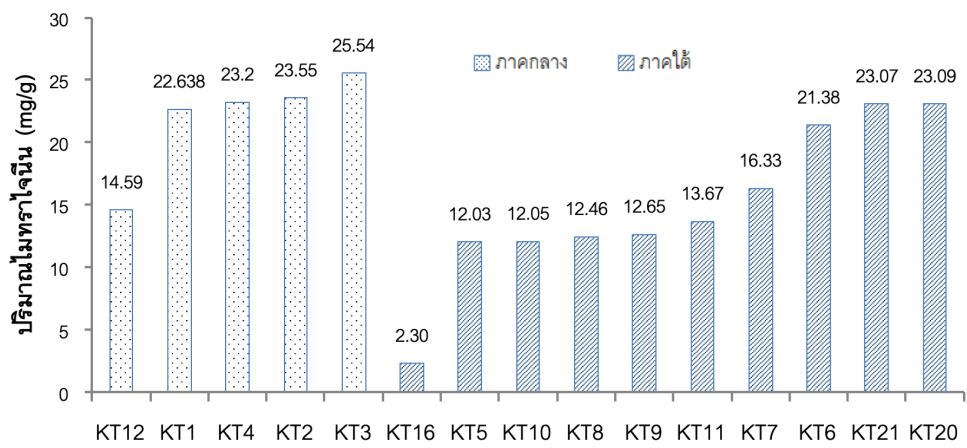
หาขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ โดยทำการเติมสารละลายมาตรฐานไมทราไจนีนที่ระดับความเข้มข้น 0.1251 มิลลิกรัมต่อกรัม (จากการคำนวณค่าประมาณ LOQ) และทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC แสดงผลดังตารางที่ 5 พบว่า %Recovery ของไมทราไจนีนอยู่ในช่วง 99.02-102.39% และมีค่า %RSD = 1.44 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับในช่วง 95-105% และค่า %RSD \leq 3 แสดงว่าขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) ของไมทราไจนีนมีความถูกต้องและมีความเที่ยงที่ยอมรับได้

ตารางที่ 5 การพิสูจน์ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) ของไมทราไจนีนในหน่วย มิลลิกรัมต่อกรัม

ช่วงความเข้มข้นที่พิสูจน์	ปริมาณไมทราไจนีน (มิลลิกรัมต่อกรัม)		
	No.	%Recovery	ปริมาณไมทราไจนีน ในตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้
ความเข้มข้น (0.1251 มิลลิกรัมต่อกรัม)	1	101.65	0.1260
	2	102.09	0.1266
	3	102.39	0.1270
	4	99.47	0.1233
	5	102.28	0.1268
	6	99.86	0.1238
	7	99.02	0.1228
เฉลี่ย			0.1252
SD			0.0018
%RSD			1.440

3.6 การวิเคราะห์ไมทราไจนีนในตัวอย่างใบกระท่อมจากแหล่งต่าง ๆ

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างใบกระท่อมแหล่งต่าง ๆ ในพื้นที่ภาคกลาง 3 จังหวัด ได้แก่ ปทุมธานี นนทบุรี และนครปฐม และในพื้นที่ภาคใต้ 4 จังหวัด ได้แก่ ชุมพร นครศรีธรรมราช กระบี่ และสตูล รวมจำนวน 15 ตัวอย่าง มาสกัดและวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC พบว่า ตัวอย่างใบกระท่อมมีปริมาณไมทราไจนีน อยู่ในช่วง 2.30 – 25.54 มิลลิกรัมต่อกรัม โดยภาคกลางอยู่ในช่วง 14.59 – 25.54 มิลลิกรัมต่อกรัม และภาคใต้ อยู่ในช่วง 2.30 – 23.09 มิลลิกรัมต่อกรัม ดังรูปที่ 3 ซึ่งในแต่ละแหล่งพื้นที่ใบกระท่อมมีปริมาณไมทราไจนีนแตกต่างกันไปตามปัจจัยพื้นที่ปลูก สายพันธุ์ อายุ และฤดูกาลเก็บเกี่ยว [2] โดยผลการวิเคราะห์พบปริมาณสารไมทราไจนีนอยู่ในช่วงที่สอดคล้องกับงานวิจัยที่ได้ทำการสำรวจพืชกระท่อมในประเทศไทย [13]



รูปที่ 3 ปริมาณไมทราไจนีนที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างใบกระท่อมแหล่งต่าง ๆ จากภาคกลางและภาคใต้

4. สรุป (Conclusion)

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณไมทราไจนีนในตัวอย่างสารสกัดใบกระท่อมด้วยเทคนิค HPLC โดยดัดแปลงพัฒนาวิธีทดสอบมาจากวิธีของ AOAC และ Limsuwanchote และคณะ และทำการตรวจสอบคุณลักษณะเฉพาะต่าง ๆ ได้แก่ ความจำเพาะเจาะจง ช่วงความเป็นเส้นตรง ความถูกต้อง ความเที่ยง ชัดจำกัดในการตรวจพบ ชัดจำกัดในการวัดปริมาณ พบว่า ผลที่วิเคราะห์ได้เป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับของวิธีทดสอบตามมาตรฐาน Standard method performance requirements for alkaloids of *Mitragyna speciosa* และวิธีวิเคราะห์สามารถใช้หาปริมาณไมทราไจนีนในตัวอย่างสารสกัดใบกระท่อมจากแหล่งต่าง ๆ ได้ โดยวิธีที่พัฒนานี้มีความน่าเชื่อถือ และเหมาะสมสำหรับการตรวจหาปริมาณสารไมทราไจนีนในตัวอย่างสารสกัดใบกระท่อม

5. เอกสารอ้างอิง (References)

- [1] จุไรทิพย์ หวังสินทวีกุล. พืชกระท่อมในตำรับยาแผนไทยกับการใช้ประโยชน์ทางการแพทย์. วารสารสำนักงาน ปปส. 2562 มิถุนายน-กันยายน;35(3):19-22.
- [2] Flores-Bocanegra L, Raja HA, Graf TN, Augustinovic M, Wallace ED, Hematian S, et al. The chemistry of Kratom [*Mitragyna speciosa*]: Updated characterization data and methods to elucidate indole and oxindole alkaloids. J Nat Prod. 2020;83:2165-77. doi: 10.1021/acs.jnatprod.0c00257.
- [3] Halpenny GM. *Mitragyna speciosa*: Balancing potential medical benefits and abuse. ACS Med Chem Lett. 2017;8:897-9. doi: 10.1021/acsmedchemlett.7b00298.
- [4] สำนักงานที่ปรึกษาการเกษตรต่างประเทศ ประจำกรุงวอชิงตัน ดี.ซี. โอกาสและความท้าทายสำหรับการส่งออกพืชกระท่อมสู่สหรัฐอเมริกา [อินเทอร์เน็ต]. ตุลาคม 2564 [เข้าถึงเมื่อ 10 กรกฎาคม 2565]. เข้าถึงได้จาก: <https://www.opsmoac.go.th/dc-news-files-441991791372>
- [5] มัญชุสา ตั้งเจริญ. สถานะทางกฎหมายของพืชกระท่อมในอินโดนีเซียกับอนาคตพืชกระท่อมไทยในตลาดโลก [อินเทอร์เน็ต]. 2565 [เข้าถึงเมื่อ 30 กรกฎาคม 2565]. เข้าถึงได้จาก: https://www.parliament.go.th/ewtadmin/ewt/parliament_parcy/download/article/article_20220421202054.pdf
- [6] Takayama H. Chemistry and pharmacology of analgesic indole alkaloids from the rubiaceae plant, *Mitragyna speciosa*. Chem Pharm Bull. 2004;52:916-28. doi: 10.1248/cpb.52.916.
- [7] Mudge EM, Brown PN. Determination of mitragynine in *Mitragyna speciosa* raw materials and finished products by liquid chromatography with UV detection: Single-laboratory validation. J AOAC Int. 2017;100(1):18-24.
- [8] Mudge EM, Brown PN. Determination of Alkaloids in *Mitragyna speciosa* (Kratom) raw materials and dietary supplements by HPLC-UV: Single-laboratory validation, First action 2017.14. J AOAC Int. 2018;100(4):964-5.

- [9] Limsuwanchote S, Putalun W, Keawpradub N, Tanaka H, Morimoto S, Wungsintaweeikul J. Anti-mitragynine monoclonal antibody-based ELISA for determination of alkaloids in the kratom cocktail. *Forensic Toxicol.* 2017;35(1):167-72.
- [10] Wungsintaweeikul J. Methyl jasmonate and yeast extract stimulate mitragynine production in *Mitragyna speciosa* (Roxb.) Korth. shoot culture. *Biotechnol Lett.* 2012;34(10):1945-50. doi: 10.1007/s10529-012-0968-6.
- [11] Itilmas C, Betz J, Brown P, Burdette C, Cain T, Collison M, et al. AOAC SMPR 2015:008 Alkaloids of *Mitragyna speciosa*. *AOAC Int* [Internet]. 2015 [cited 2023 July 3];98(4): 1106–08. Available from: <https://doi.org/10.5740/jaoac.int.SMPR2015.008>
- [12] ทิพวรรณ นิ่งน้อย. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว (A practical guide for single laboratory methods validation of chemical method). นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549.
- [13] Sengnon N, Vonghirundecha P, Chaichan W, Juengwatanatrakul T, Onthong J, Kitprasong P, et al. Seasonal and geographic variation in alkaloid content of Kratom (*Mitragyna speciosa* (Korth.) Havil.) from Thailand. *Plants.* 2023;12(4):949. doi: 10.3390/plants12040949.