



การพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณของ rutin ในใบหม่อนโดยวิธี RP-HPLC

Development of RP-HPLC method for quantification of rutin in *Morus alba* L. leaf

ณิรวารรณ์ กิจประไพอำพล¹ สุรพจน์ วงศ์ใหญ่² และ ยูปาภรณ์ สำเภาพันธ์^{1*}
Nirawan Kitprapiumpon¹, Surapote Wongyai², and Yupaporn Sampaopan^{1*}

¹วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต ปทุมธานี

²คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยกรุงเทพธนบุรี กรุงเทพมหานคร

¹College of Oriental Medicine, Rangsit University, Pathum Thani

²Faculty of Pharmacy, Bangkok Thonburi University, Bangkok

*Corresponding author, E-mail: nu_pharx@hotmail.com

บทคัดย่อ

หม่อน (*Morus alba* L.) เป็นไม้พุ่มขนาดกลาง ใบหม่อนเป็นสมุนไพร มีรสจืดเย็น มีสรรพคุณทางแพทย์แผนไทย ได้แก่ แก้ไข้ ตัวร้อน ร้อนใน กระจายน้ำ แก้ไอ ระงับประสาท ใบหม่อนมีสารสำคัญที่มีปริมาณสูงคือ chlorogenic acid และ rutin ซึ่งมีผลต่อการออกฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลและไขมันในเลือด และต้านการอักเสบ งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณของ rutin ในใบหม่อนด้วยวิธี reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) เนื่องจาก rutin มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงที่พบในเครื่องดื่มชา เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ประกอบด้วย 2% v/v acetic acid กับ acetonitrile โดยใช้ระบบ gradient ตรวจวัดด้วย UV 254 nm เวลาในการวิเคราะห์ 60 นาที พบว่า ปริมาณ rutin ในตัวอย่างใบหม่อนมีค่าเท่ากับ 0.18% w/w ของน้ำหนักแห้ง การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โดยพิจารณาจากความเป็นเส้นตรง ความเที่ยงและความแม่นยำ ความเป็นเส้นตรงของ rutin อยู่ในช่วงความเข้มข้น 11.2-39.2 µg/mL มีค่าสัมประสิทธิ์ของการหาปริมาณ (r^2) เท่ากับ 0.9994 ผลการศึกษาความเที่ยงพบค่า %RSD ของการฉีดซ้ำ (injection precision) การวิเคราะห์ในวันเดียวกัน และการวิเคราะห์ต่างวันกันมีค่า %RSD ไม่เกิน 2% ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐาน ผลการศึกษาความแม่นยำของวิธีที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 80, 100 และ 120 ของสารมาตรฐานที่เติมลงในสารละลายตัวอย่าง ได้ร้อยละของการกลับคืน (recovery) อยู่ในช่วง 99.32-100.17 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการวิเคราะห์ปริมาณ เท่ากับ 2.91 µg/mL และ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบ เท่ากับ 0.96 µg/mL แสดงว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความถูกต้องและเที่ยงตรง และสามารถนำไปใช้ในการควบคุมคุณภาพของชาหม่อนได้

คำสำคัญ: ใบหม่อน *Morus alba* L. Rutin HPLC

Abstract

Mulberry (*Morus alba* L.) is a moderate-sized shrub. Mulberry leaf is a medicinal herb with a bland and cool taste. Thai traditional medicines have used mulberry leaves as antipyretic, relieve heartburn, thirst, and cough, and possess sedative effects. It contains high amounts of important substances, namely chlorogenic acid, and rutin, which are responsible for reducing blood sugar, cholesterol, and inflammation. This research aimed to develop reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) method to determine the amount of rutin in mulberry leaves because it is a potent antioxidant in herbal tea. The mobile phase consisted of 2% v/v acetic acid and acetonitrile using a gradient system with a UV 254 nm detector. The analysis time was 60 minutes. The content of rutin found in mulberry leaves sample was at 0.18% w/w of dry weight. The method was validated for linearity, accuracy, and precision. The linearity of rutin in the concentration was in the range of 11.2-39.2 µg/mL with the coefficient of determination (r^2) of 0.9994. All the percentage of relative deviation (%RSD) values for determining the precision of repeated injection,



intraday, and interday were less than 2% and met the standard criteria. The accuracy of the method was determined adding of 3 different concentrations of standard rutin solution to the sample solution. The percentages of recovery of standard rutin were found within 98.0-102.0%. The limits of quantitation and detection were 2.91 and 0.96 µg/mL, respectively. The results indicated that the proposed analytical method was accurate and precise and can be applied to quality control of mulberry tea.

Keywords: Mulberry leaf, *Morus alba* L., Rutin, HPLC

1. บทนำ

หม่อน (*Morus alba* L.) วงศ์ Moraceae เป็นไม้พุ่มขนาดกลาง ใบหม่อนใช้เป็นทั้งอาหารสำหรับเลี้ยงไหม และเป็นสมุนไพรตำราสรรพคุณยาไทย ระบุว่า ใบหม่อน มีรสจืดเย็น ต้มดื่มแก้ไข้ ตัวร้อน ร้อนใน กระหายน้ำ แก้ไอ ระงับประสาท หรือต้มเอาน้ำล้างตา แก้ตาแดง ตาแฉะ และฝ้าฟาง (กองทุนภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก, 2558) การศึกษาทางพฤกษเคมีของใบหม่อน พบว่ามีสารกลุ่มสารฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แทนนิน เทอร์ปีน (Yadev et al., 2022) และอัลคาลอยด์ (Asano et al., 2001; Takasu et al., 2018) ซึ่งมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น ฤทธิ์ต้านเบาหวาน ต้านมะเร็ง ต้านการอักเสบ และ ลดไขมันในเลือด การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด ยืนยันว่าสารสกัดจากใบหม่อนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในระดับสูง งานวิจัยของ Flaczyk et al. (2013) รายงานปริมาณของสารฟีนอลิกและฟลาโวนอลที่พบในสารสกัดด้วยน้ำของใบหม่อนด้วยวิธี HPLC พบว่ามี chlorogenic acid มากที่สุด ตามด้วย rutin และ caffeic acid สำหรับสารอื่น ๆ ที่พบในปริมาณน้อย ๆ ได้แก่ quercetin 3-β-D-glucoside, vanillic acid, gallic acid, kaempferol 3-β-D-glucopyranoside, p-hydroxybenzoic acid, precoumaric acid, sinapic acid, ferulic acid และ protocatechic acid ก่อนหน้านี Huayadi et al. (2012) ได้ทดสอบฤทธิ์การต้านเบาหวานในหนู พบว่า chlorogenic acid และ rutin เป็นสารที่มีความสำคัญในการออกฤทธิ์ลดน้ำตาลของสารสกัดใบหม่อน และได้แนะนำว่าสารทั้ง 2 ตัวนี้เหมาะสมกับการเป็น marker ในการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์จากใบหม่อน เนื่องจาก chlorogenic acid และ rutin เป็นสารออกฤทธิ์ที่สำคัญและมีปริมาณสูง เช่น เป็นสารต้านออกซิเดชัน (Tajik et al., 2017; Yang et al., 2008) และสารต้านการอักเสบ (Girsang et al., 2021; Selloum et al., 2003) rutin เป็นสารฟลาโวนอลที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูง ประโยชน์ของ rutin ยังมีในด้านการบำรุงสมอง ช่วยชะลอความเสื่อมของระบบประสาท (Enogieru et al., 2018)

ปัจจุบันชาจากใบหม่อนเป็นเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพที่มีจำหน่ายในท้องตลาด และยังมีการทำชาหม่อนในครัวเรือน ในขบวนการแปรรูปมีการใช้ความร้อน เช่น การคั่วในกระทะด้วยไฟอ่อน ๆ และอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 °C เพื่อลดปริมาณความชื้นทำให้เก็บไว้ได้นาน (วิโรจน์ แก้วเรือง, 2544) ซึ่งความร้อนที่ใช้นั้นอาจมีผลทำให้สารสำคัญต่าง ๆ ในใบหม่อนสลายตัวได้ Zhou et al. (2000) พบว่า rutin มีแนวโน้มการสลายตัวเพิ่มขึ้น เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 75 °C ด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชัน การที่ปริมาณของ rutin มีความสำคัญต่อคุณภาพของใบหม่อนและชาหม่อน ดังนั้น rutin จึงเหมาะสมในการเป็นสารบ่งชี้คุณภาพของใบหม่อน จึงควรมีวิธีวิเคราะห์หาปริมาณของ rutin ในใบหม่อนที่เชื่อถือได้ ปัจจุบันวิธี RP-HPLC เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีต่าง ๆ ในสมุนไพร Garg et al (2023) ได้รายงานการพัฒนาวิธี RP-HPLC ในการวิเคราะห์หาปริมาณของ rutin และ quercetin ในสารสกัดจากใบหม่อน ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและสะดวก อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้ไม่สามารถนำวิธีการวิเคราะห์ดังกล่าวมาใช้โดยไม่มี การดัดแปลง เนื่องจากความแตกต่างของแหล่งตัวอย่างและสภาวะต่าง ๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์ เช่น เครื่องมือ สารเคมีที่ใช้ และวิธีการเตรียมตัวอย่าง เป็นต้น



งานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณของ rutin ในใบหม่อน ด้วยวิธี RP-HPLC พร้อมกับตรวจสอบความถูกต้องของวิธี และนำวิธีวิเคราะห์มาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณของ rutin ในชาหม่อน เพื่อเป็นประโยชน์ในการตรวจสอบคุณภาพของใบหม่อนและผลิตภัณฑ์ชาหม่อน เพิ่มคุณค่าของผลิตภัณฑ์ที่แปรรูปจากสมุนไพรให้เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคมากขึ้น

2. วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวิธี HPLC สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณ rutin ในใบหม่อน และทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี

3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

เครื่องมือได้แก่ high performance liquid chromatography (HPLC) ร่วมกับ diode array detector (DAD) (Thermo Separation, USA) และ ultrasonicator (GT sonic, China) สารเคมี ได้แก่ rutin (Sigma, Germany), chlorogenic acid (Sigma, Germany), methanol (AR) (Merck, Germany), acetonitrile (HPLC grade) (Honeywell Burdick & Jackson™, USA), water (HPLC grade) (RCI Labscan, Thailand) และ glacial acetic acid (Merck, Germany)

3.2 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.2.1 การเตรียมสารละลายตัวอย่างสำหรับฉีด

ใบหม่อนสดเก็บจากต้นหม่อน จ.ปทุมธานี นำมาล้างทำความสะอาด แล้วผึ่งให้แห้งในที่ร่ม ปั่นให้เป็นผงหยาบ ซึ่งผงสมุนไพรด้วยเครื่องชั่งวิเคราะห์ (Mettler AE240, Switzerland) ประมาณ 0.25 g ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 mL เติมน้ำ methanol 20 mL แล้วนำไป sonicate เป็นเวลา 30 นาที ปรับปริมาตรด้วย methanol แล้วเขย่าให้เข้ากัน จากนั้นจึงกรองผ่าน syringe filter nylon membrane, 0.22 µm (CNW, China) แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

3.2.2 สภาวะทางโครมาโตกราฟี

เครื่อง HPLC ประกอบด้วย Spectra System P2000 Pump, Spectra System AS3000 Autosampler และ Spectra System UV6000 Detector โปรแกรมที่ใช้ในการบันทึกและแปลผลคือ ChromQuest® Chromatography Workstation (Thermo Separation, USA) คอลัมน์ HPLC ที่ใช้คือ VDSpher PUR 100 C18-E column (250 x 4.6 mm i.d., 5 µm) เฟสเคลื่อนที่ใช้ระบบ gradient ระหว่าง 2% (v/v) acetic acid in water (A) กับ acetonitrile (B) อัตราการไหล 1 mL/min ปริมาตรที่ฉีดคือตัวอย่างละ 20 µL ตลอดการวิจัยนี้

3.2.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานเข้มข้น

เตรียมสารละลายมาตรฐานเข้มข้น โดยละลาย rutin ใน methanol ให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 0.1 mg/mL

3.2.4 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ rutin ในใบหม่อน

ทำการปรับสัดส่วนของเฟสเคลื่อนที่ในระบบ gradient ให้ได้ลายพิมพ์โครมาโตแกรมที่มีพีคต่าง ๆ ที่แยกออกจากกัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 254 nm

3.2.5 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation)

ประเมินโดยใช้แนวทางตาม ICH guidelines (ICH, 2005) ตามหัวข้อต่อไปนี้

- 1) การศึกษาความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ (specificity)



ตรวจสอบจากลายพิมพ์โครมาโตแกรมของใบหม่อน เปรียบเทียบกับโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน rutin โดยโครมาโตแกรมของใบหม่อนจะต้องมีพีคที่มีค่า retention time ตรงกับสารมาตรฐาน rutin และมี UV spectrum เหมือนกับ สารมาตรฐาน rutin

2) การศึกษาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linearity and range) โดยการเตรียมกราฟมาตรฐาน

เจือจางสารละลายมาตรฐานเข้มข้น ด้วย methanol ให้ได้ 6 ความเข้มข้นอย่างเป็นระบบ แล้วฉีดเข้าเครื่อง HPLC หาค่า peak area ทำการสร้างกราฟโดยให้แกนนอน (x) เป็นความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน และแกนตั้ง (y) เป็นค่า peak area หาความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรงของตัวแปรทั้งสองด้วยการวิเคราะห์การถดถอย (regression analysis) ด้วยวิธีกำลังสองน้อยที่สุด (method of least square) หาค่าความชัน จุดตัดแกน y และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination) หรือ r² โดยค่านี้นี้จะต้องมีค่ามากกว่า 0.999 แสดงว่าตัวแปรทั้งสองมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง

3) การศึกษาความเที่ยงของวิธี (precision)

ประเมินความเที่ยงของเครื่องมือวิเคราะห์ โดยฉีดสารละลายมาตรฐานซ้ำ ๆ 6 ครั้ง (injection precision) ความเที่ยงภายในวันเดียวกัน (intraday precision) ประเมินจากผลการวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างจำนวน 6 ตัวอย่าง ความเที่ยงในการวิเคราะห์ต่างวันกัน (interday precision) ประเมินจากผลการวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างวันละ 1 ตัวอย่าง ติดต่อกัน 4 วัน นำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณหาค่า %RSD

4) การศึกษาความแม่นยำของวิธี (accuracy)

โดยการเติมสารละลายมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นลงไปในการวิเคราะห์ตัวอย่าง (standard addition) สารละลายมาตรฐานมีใช้เติมมีความเข้มข้นเป็นร้อยละ 80 100 และ 120 ของความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง ในอัตราส่วน 1:1 แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ ทำซ้ำความเข้มข้นละ 3 ครั้ง คำนวณค่าร้อยละการคืนกลับ (% recovery) ตามสูตร ดังนี้

$$\% \text{ Recovery} = \text{Standard found} \times 100 / \text{Standard added}$$

5) ขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection: LOD) และ ขีดจำกัดของการตรวจวัด (limit of quantification: LOQ) จากสมการเส้นตรงที่ได้จากการสร้างกราฟมาตรฐาน คำนวณหาค่า LOD และ LOQ ตามสูตร ดังนี้

$$\text{LOQ} = 3.3\text{SD}/S, \text{LOD} = 10\text{SD}/S$$

โดย SD คือจุดตัดแกน y และ S คือความชันของกราฟมาตรฐาน

3.2.6 การประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ rutin ในชาใบหม่อน

ตัวอย่างชาใบหม่อน ได้จากการนำใบหม่อนสดมาหั่นเอาเส้นกลางใบออก แล้วหั่นตามขวางเป็นเส้นขนาดประมาณ (0.5-1.0) x (3.0-4.0) cm นำมาลวกน้ำร้อน 20-30 วินาที แล้วนำมาล้างน้ำสะอาด ผึ่งให้หมาด ๆ แล้วคั่วในกระทะด้วยไฟอ่อน ๆ จนกระทั่งใบหม่อนแห้งกรอบ ใช้เวลานานกว่า 25 นาที แล้วอบที่อุณหภูมิ 80 °C นาน 1 ชั่วโมง ทั้งให้เย็นแล้วเก็บใส่ถุงพลาสติก รัดปากถุงให้แน่น เก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง ผลิต ณ วันที่ 9 ตุลาคม 2565

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง ใช้วิธีเดียวกับตัวอย่างใบหม่อนสด



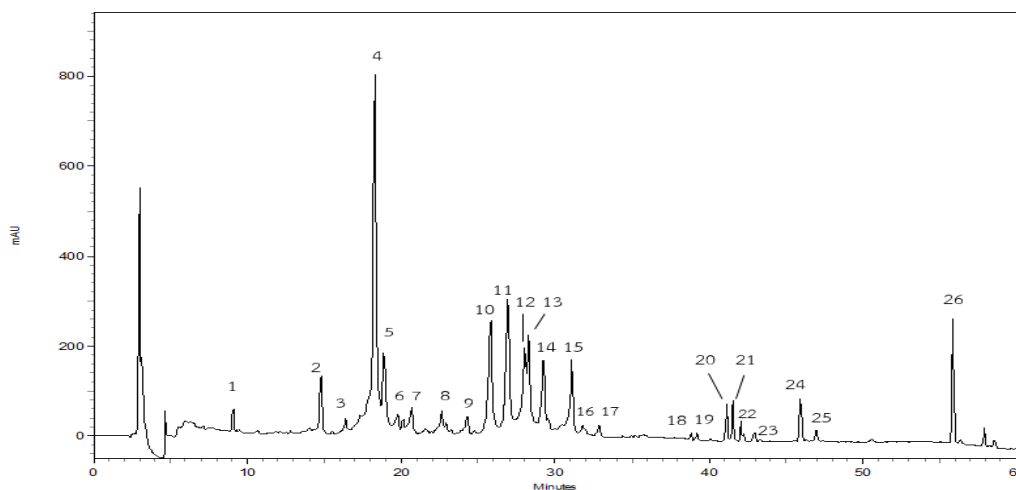
4. ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

4.1 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์

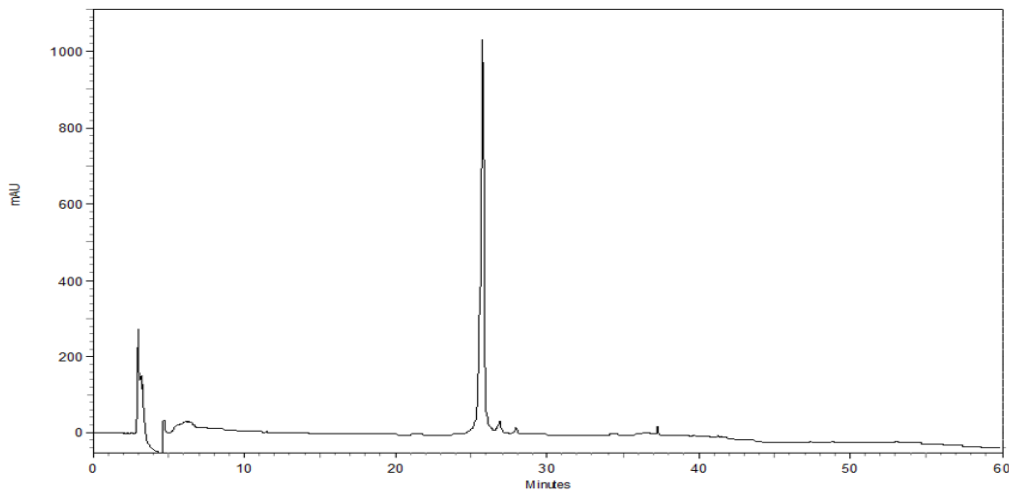
ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ rutin ในใบหม่อน โดยวิธี RP-HPLC ได้ใช้เฟสเคลื่อนที่ระบบ gradient ระหว่างสารละลายของ 2% (v/v) acetic acid กับ acetonitrile โดยผู้วิจัยได้ทำการปรับอัตราส่วนของสารละลายทั้งสองตามตารางที่ 1 ใช้ระยะเวลา 60 นาทีต่อการฉีด 1 ครั้ง ได้ HPLC fingerprint ของใบหม่อนที่มีการซ้อนทับของพีกน้อยที่สุด ดังแสดงในภาพที่ 1 พบจำนวน 26 พีก พีกที่มีความสูงมากที่สุดคือพีก #4 รองลงมาคือพีก #10 และ #11 จากการเปรียบเทียบกับโครมาโตแกรมของ rutin (ภาพที่ 2) พบว่าพีก #10 (retention time = 25.67 นาที) ในโครมาโตแกรมของใบหม่อนมี UV spectrum เหมือนกันกับของ rutin (retention time = 25.65 นาที) ดังแสดงในภาพที่ 3 เป็นการยืนยันว่าพีก #10 นี้เป็น rutin

ตารางที่ 1 ระบบ gradient ของเฟสเคลื่อนที่ในการวิเคราะห์ด้วย HPLC

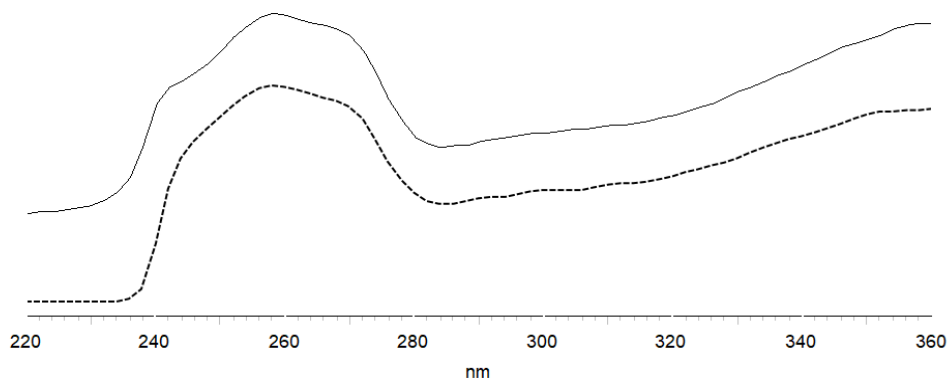
Time (นาที)	2% (v/v) Acetic acid in water (%)	Acetonitrile (%)
0.00	100	0
10.00	90	10
15.00	85	15
30.00	70	30
35.00	55	45
50.00	40	60
60.00	0	100



ภาพที่ 1 โครมาโตแกรม HPLC ของใบหม่อน (25 mg/mL)



ภาพที่ 2 โครมาโตแกรม HPLC ของ rutin (112 µg/mL)



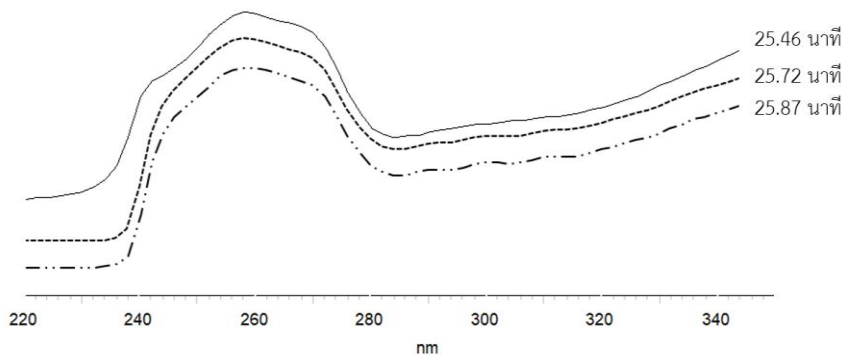
ภาพที่ 3 UV spectrum ของพีคที่ 25.65 นาที ของ rutin (112 µg/mL) (—) และใบหม่อน (- -)

4.2 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

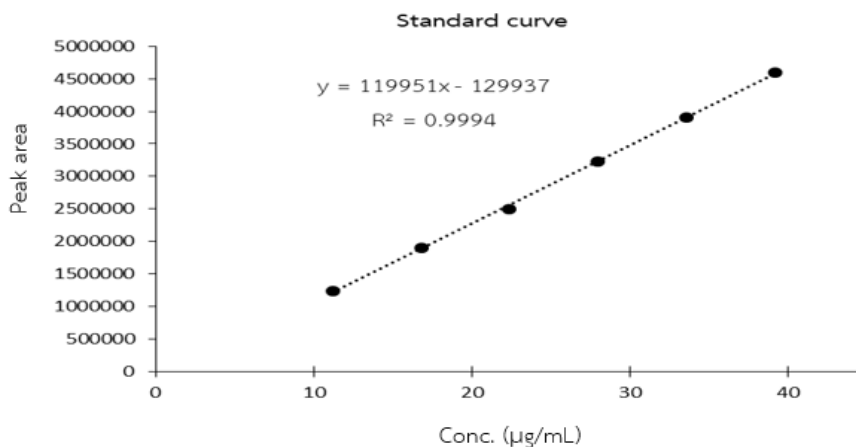
ความเฉพาะเจาะจง (specificity) กับ rutin ของวิธีนี้ สังเกตได้จากความบริสุทธิ์ของพีค rutin ในใบหม่อน สังเกตได้จาก UV spectrum ของพีค #10 ที่ 3 จุด ได้แก่ จุดที่ 1 ในช่วงเริ่มต้นของพีคที่เวลา 25.46 นาที จุดที่ 2 ที่เวลา 25.72 นาทีที่พีคสูงที่สุด และจุดที่ 3 ซึ่งเป็นส่วนปลายของพีคที่เวลา 25.87 นาที พบว่ามีลักษณะเหมือนกัน ดังแสดงในภาพที่ 4 แสดงว่าไม่มีการรบกวนจากสารอื่น ช่วงความเป็นเส้นตรงในการวิเคราะห์หาปริมาณของ rutin อยู่ในช่วงความเข้มข้น 11.2 – 39.2 µg/mL ตามสมการ $y = 119951x - 129937$ ($r^2 = 0.9994$) ดังแสดงในภาพที่ 5 โดยแกน x เป็นความเข้มข้นของสาร และ แกน y เป็น peak area ผลการวิเคราะห์ปริมาณของ rutin ในใบหม่อนพบว่ามีค่า $0.18 \pm 0.003\%$ w/w (n=6) ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณที่พบในชาทั่วไปคืออยู่ในช่วง 0.1-0.3% ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณได้ เท่ากับ 2.91 µg/mL และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ เท่ากับ 0.96 µg/mL ผลการศึกษาความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์พบว่าค่า %RSD ของการฉีดซ้ำ (injection precision) มีค่าเท่ากับ 0.38% การวิเคราะห์ในวันเดียวกัน (intraday) มีค่าเท่ากับ 1.53% และการวิเคราะห์ต่างวันกัน (interday) มีค่าเท่ากับ 1.84% เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานคือไม่เกิน 2%



ผลการศึกษาความแม่นยำของวิธีที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 80, 100 และ 120 ของสารมาตรฐาน rutin ในสารละลาย ตัวอย่าง แสดงในตารางที่ 2 จะเห็นว่าค่าร้อยละของการกลับคืน (% recovery) ของทั้ง 3 ระดับมีค่าอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน คืออยู่ในช่วง 98.0-102.0% แสดงว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความถูกต้องและเที่ยงตรง



ภาพที่ 4 UV spectrum ของพีค #10 ที่เวลา 25.46 (ต้น) 25.72 (กลาง) และ 25.87 (ปลาย) นาที



ภาพที่ 5 กราฟมาตรฐาน

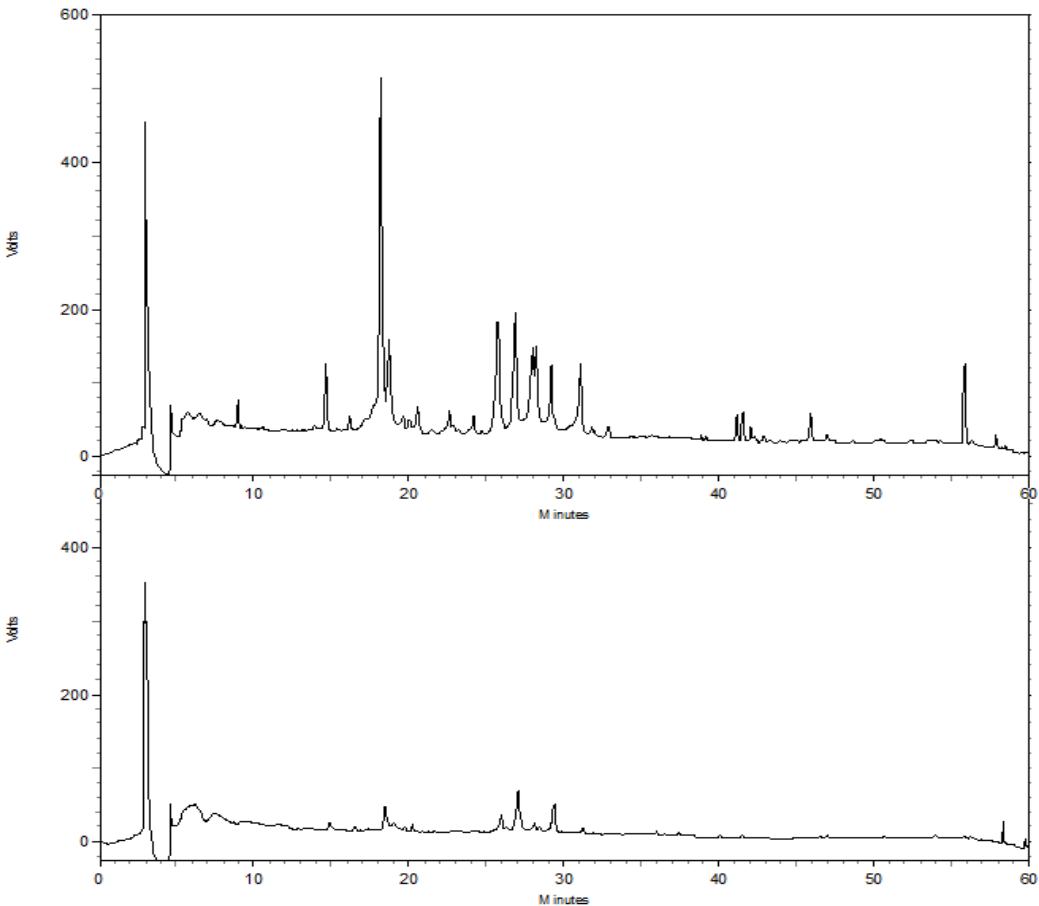
ตารางที่ 3 ผลการศึกษา accuracy ของวิธีวิเคราะห์

Serial No.	Amount of rutin (µg)		% Recovery (2)/(1) × 100	RSD (%)
	Added (1)	Found (2)		
1 (n = 3)	17.9	17.83 ± 0.10	99.73	0.58
2 (n = 3)	22.4	22.44 ± 0.13	100.17	0.57
3 (n = 3)	26.9	26.72 ± 0.38	99.32	1.43



4.3 ผลการวิเคราะห์ rutin ในชาใบหม่อน

วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปใช้ในการหาปริมาณของ rutin ในชาใบหม่อนได้โดยพิมพ์โครมาโตแกรมคล้ายกับของใบหม่อนสด ดังแสดงในภาพที่ 6 เห็นได้ชัดเจนว่าความสูงของแต่ละพีคในโครมาโตแกรมของชาใบหม่อนต่ำมาก คาดว่าเป็นผลมาจากเกิดการเสื่อมสลายของสารต่าง ๆ ตัวอย่างชาใบหม่อนนี้ผลิตไว้ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2565 และได้นำมาวิเคราะห์ในเดือนเมษายน พ.ศ. 2567 นั่นคือเก็บไว้ประมาณ 18 เดือน พบว่าปริมาณของ rutin ที่วิเคราะห์ได้เท่ากับ 0.03% w/w คิดเป็น 16.67% ของปริมาณในใบหม่อนสด ซึ่งการกำหนดอายุการใช้ของผลิตภัณฑ์สมุนไพรคือช่วงเวลาที่สารสำคัญลดลงไป 10% จากปริมาณตั้งต้น ถ้าหากปริมาณของ rutin ในชาใบหม่อนในตอนที่ทำเสร็จใหม่ ๆ มีค่าเท่ากับในใบหม่อนสด คือ 0.18% w/w แสดงว่าอัตราการสลายตัวของ rutin ในชาใบหม่อนมีค่าเท่ากับ 0.0083% w/w ต่อเดือน นั่นคือ rutin จะสลายตัวไป 10% จากปริมาณเริ่มต้นภายในเวลาประมาณ 2 เดือน ซึ่งแสดงว่าชาใบหม่อนนี้มีอายุการใช้เพียง 2 เดือน ซึ่งสั้นกว่าปกติของชาเขียวที่ควรมีอายุครึ่งปีถึงหนึ่งปี การสลายตัวของ rutin และสารอื่น ๆ ในชาใบหม่อนอาจเป็นผลมาจากมีการใช้ความร้อนในขบวนการผลิต ตามปกติอัตราการสลายตัวของสารเคมีจะแปรผันตามอุณหภูมิ สมการของ Arrhenius บอกความสัมพันธ์ของอัตราการสลายตัวกับอุณหภูมิไว้ว่า อุณหภูมิที่สูงขึ้น 10 องศา การสลายตัวจะเร็วขึ้น 2 เท่า จึงเป็นข้อควรระวังในการใช้ความร้อนในการผลิต ควรมีการควบคุมไม่ให้ อุณหภูมิสูงเกินไป



ภาพที่ 6 โครมาโตแกรม HPLC ของ ใบหม่อน (บน) และ ชาใบหม่อน (ล่าง)



5. สรุปผลการวิจัย

rutin เป็นสารฟลาโวนอลที่สำคัญที่พบในใบหม่อน และมีฤทธิ์เป็นสารต้านออกซิเดชันที่ดีมาก ดังนั้นปริมาณของ rutin ในใบหม่อนจึงเป็นสิ่งสำคัญชนิดหนึ่งที่จะต้องนำมาใช้เป็นเกณฑ์ตัดสินในการควบคุมคุณภาพของและผลิตภัณฑ์ที่แปรรูปจากใบหม่อน งานวิจัยนี้ได้ทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ rutin ในใบหม่อนด้วย RP-HPLC ที่ใช้งานได้ง่ายและสะดวก โดยประเมินความถูกต้องของวิธี พบว่ามีความเฉพาะเจาะจง ความแม่นยำและความถูกต้อง ตามเกณฑ์มาตรฐานของการวิเคราะห์ (ICH, 2005) จึงสามารถวิธีวิเคราะห์นี้นำมาประยุกต์ใช้ในการควบคุมคุณภาพวัตถุดิบ การติดตามความคงสภาพและการกำหนดอายุผลิตภัณฑ์ชาใบหม่อนได้

6. เอกสารอ้างอิง

- กองทุนภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก. (2558). *ประมวลสรรพคุณสมุนไพรไทย*. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตร.
- วิโรจน์ แก้วเรือง. (2544). ชาหม่อน ชาสมุนไพโร ชาไทยแท้ๆ. *กลีกร*, 74(2), 99-102.
- Asano, N., Yamashita, T., Yasuda, K., Ikeda, K., Kizu, H., Kameda, Y., . . . Ryu, K. S. (2001). Polyhydroxylated alkaloids isolated from mulberry trees (*Morus alba* L.) and silkworms (*Bombyx mori* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(9), 4208-4213.
- Enogieru, A. B., Haylett, W., Hiss, D. C., Bardien, S., & Ekpo, O. E. (2018). Rutin as a potent antioxidant: Implications for neurodegenerative disorders. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 6241017.
- Flaczyk, E., Kobus-Cisowska, J., Przeor, M., Korczak, J., Remiszewski, M., Korbas, E., & Buchowski, M. (2013). Chemical characterization and antioxidative properties of Polish variety of *Morus alba* L. leaf aqueous extracts from the laboratory and pilot-scale processes. *Agricultural Sciences*, 4, 141-147.
- Garg, S., Chahal, R., Kaushik, D., Kumar, R., & Mittal, V. (2023). RP-HPLC method development and validation for simultaneous estimation of rutin and quercetin in *Morus alba* L. leaf extract. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 16(5), 2327-2335.
- Girsang, E., Ginting, C. N., Lister, I. N. E., Gunawan, K. Y., & Widowati, W. (2021). Anti-inflammatory and antiaging properties of chlorogenic acid on UV-induced fibroblast cell. *PeerJ*, 9, e11419.
- Hunyadi, A., Martins, A., Hsieh, T. J., Seres, A., & Zupkó, I. (2012). Chlorogenic acid and rutin play a major role in the in vivo anti-diabetic activity of *Morus alba* leaf extract on type II diabetic rats. *PLoS One*, 7(11), e50619.
- ICH. (2005). *International conference on harmonization (ICH) of technical requirements for the registration of pharmaceuticals for human use; validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1)*. Retrieved April 30, 2024, from <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>
- Selloum, L., Bouriche, H., Tigrine, C., & Boudoukha, C. (2003). Anti-inflammatory effect of rutin on rat paw oedema, and on neutrophils chemotaxis and degranulation. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 54(4), 313-318.
- Tajik, N., Tajik, M., Mack, I., & Enck, P. (2017). The potential effects of chlorogenic acid, the main phenolic components in coffee, on health: A comprehensive review of the literature. *European Journal of Nutrition*, 56, 2215-2244.



- Takasu, S., Parida, I. S., Onose, S., Ito, J., Ikeda, R., Yamagishi, K., . . . Nakagawa, K. (2018). Evaluation of the anti-hyperglycemic effect and safety of microorganism 1-deoxynojirimycin. *PLoS One*, *13*(6), e0199057.
- Yadav, S., Nair, N., Biharee, A., Prathap, V. M., & Majeed, J. (2022). Updated ethnobotanical notes, phytochemistry and phytopharmacology of plants belonging to the genus *Morus* (Family: Moraceae). *Phytomedicine Plus*, *2*(1), 100120.
- Yang, J., Guo, J., & Yuan, J. (2008). In vitro antioxidant properties of rutin. *LWT-Food Science and Technology*, *41*(6), 1060-1066.
- Zhou, Q., Sun, S. Q., Liang, X., & Yang, X. (2000). Real time monitor of rutin stability during heating by Fourier transform infrared spectroscopy. *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi*, *20*(2), 195-198.