

การแยกและตรวจวิเคราะห์มิทราไจนีนจากใบกระท่อมด้วยวิธีโครมาโทกราฟี

Isolation and Analysis of Mitragynine in Kratom Leaves by Chromatography Techniques

พิชาพัชร ฐิตินาอภิพงษ์¹ อรภา สกุลพานิชย์² และ อ้อมบุญ วลลิสุต^{3*}

Pichapat Thititanaapipong¹ Aurapa Sakulpanich² and Omboon Vallisuta^{3*}

¹คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร สกลนคร 47160 ประเทศไทย

²คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปทุมธานี 12120 ประเทศไทย

³คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา กรุงเทพมหานคร 10600 ประเทศไทย

¹Faculty of Natural Resources, Rajamangala University of Technology Isan Sakon Nakhon Campus, Sakon Nakhon 47160, Thailand

²Faculty of Pharmacy, Thammasart University, Pathum Thani 12120, Thailand

³Faculty of Science and Technology, Bansomdejchaopraya Rajabhat University, Bangkok 10600, Thailand

*E-mail: omboon.va@bsru.ac.th

Received: Oct 15, 2024

Revised: Nov 18, 2024

Accepted: Nov 25, 2024

บทคัดย่อ

มิทราไจนีนเป็นอัลคาลอยด์ออกฤทธิ์หลักในใบกระท่อม ในอดีตประเทศไทยมีการใช้ประโยชน์จากใบกระท่อมอย่างมากมายโดยประชาชน หมอพื้นบ้าน และแพทย์แผนไทย ต่อมากระท่อมถูกจัดเป็นยาเสพติดทำให้การพัฒนาและการใช้ประโยชน์ชะงักไป อย่างไรก็ตามกระท่อมถูกถอดออกจากรายชื่อยาเสพติดควบคุมภายใต้พระราชบัญญัติยาเสพติดในปี 2564 ทำให้มีการใช้ประโยชน์จากกระท่อมมากขึ้น ในปัจจุบันในกระบวนการตรวจสอบคุณภาพของใบกระท่อมและผลิตภัณฑ์จากใบกระท่อมให้มีมาตรฐานเป็นสากล จำเป็นต้องใช้มิทราไจนีนเป็นสารมาตรฐาน ซึ่งมีราคาแพงและยังต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการแยกมิทราไจนีนจากใบกระท่อมเพื่อทดแทนการนำเข้ามิทราไจนีนจากต่างประเทศ สารสกัดจากใบกระท่อมเตรียมโดยนำใบกระท่อมบดละเอียดมาสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 40 จากนั้นนำสารสกัดดังกล่าวมาแยกมิทราไจนีนด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจล (เกรด 9385) เป็นเฟสคงที่ และใช้คลอโรฟอร์ม และเมทานอล (ที่มี 0.1 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์) ในอัตราส่วน 95:5 เป็นเฟสเคลื่อนที่ ตรวจสอบมิทราไจนีนในสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ด้วยเครื่องตรวจจับมวล เพื่อรวมส่วนที่มีมิทราไจนีนเป็นหลักเข้าด้วยกัน แล้วทำมิทราไจนีนให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยการทำให้อยู่ในรูปของมิทราไจนีนพิกเครต จากการใช้เทคนิคการวิเคราะห์ด้วยเครื่องตรวจจับมวลสมรรถนะสูง (HPTLC) พบว่ามิทราไจนีนที่แยกได้มีค่า R_f ตรงกับค่า R_f ของมิทราไจนีนมาตรฐาน นอกจากนี้ในการศึกษานี้ยังมีการพิสูจน์เอกลักษณ์ของมิทราไจนีนพิกเครตด้วยเทคนิค ¹H-NMR spectroscopy, Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) และ MALDI-TOF mass spectrometry ซึ่งข้อมูลที่ได้เป็นข้อมูลเอกลักษณ์ทางกายภาพของสารมิทราไจนีนพิกเครตที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน

คำสำคัญ: กระท่อม โครมาโทกราฟี มิทราไจนีน มิทราไจนีนพิกเครต

Abstract

Mitragynine is the principal active alkaloid in Kratom leaves. In the past, kratom leaves were widely used by Thai people, folk healers and traditional Thai doctors. Later, kratom was classified as a narcotic, causing its development and use to be stagnant. However, kratom has been removed from the list of controlled narcotics under the Narcotics Act in 2021, allowing it to be used more widely. At present, in the process of quality control of kratom leaves and kratom leaf products to meet international standards, it is necessary to use mitragynine as a standard substance, which is expensive and still has to be imported. Therefore, this research aimed to develop an isolation procedure of mitragynine from kratom leaves to replace the import of mitragynine. The extract of kratom

leaves was prepared by extracting finely ground kratom leaves with 40% ethanol. The extract was subjected for mitragynine isolation by column chromatography using silica gel (grade 9385) as a stationary phase and chloroform and methanol (with 0.1 N sodium hydroxide) at the ratio of 95:5 as a mobile phase. The collecting fractions from column chromatography were examined for the presence of mitragynine by thin layer chromatography. The fractions containing mitragynine as the major component were combined and mitragynine was further purified by turning it into mitragynine picrate. By using high performance thin layer chromatography (HPTLC) technique, the isolated mitragynine had R_f value that matched with that of the standard mitragynine. In addition, the characterization of mitragynine picrate was also performed by $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy, Fourier-transform infrared spectroscopy (FIR) and MALDI-TOF mass spectrometry which provided the physical identity data of mitragynine picrate that have never been reported.

Keywords: Kratom, Chromatography, Mitragynine, Mitragynine picrate

1. บทนำ

กระท่อมเป็นพืชที่จัดอยู่ในวงศ์รูเบียซี (Rubiaceae) (Figure 1) กลุ่มเดียวกับต้นกาแฟ ในสกุลมิตราไจนา (*Mitragyna*) ซึ่งมีทั้งหมด 10 ชนิด (Species) พบในทวีปแอฟริกา 4 ชนิด ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ 6 ชนิด ประเทศไทยและประเทศมาเลเซียใช้ประโยชน์จาก *Mitragyna speciosa* (Korth.) Havil. โดยองค์ประกอบหลักของใบกระท่อมเป็นอัลคาลอยด์ที่มีฤทธิ์ลดปวดคือ มิตราไจนีน (Mitragynine) [1] (Figure 2) สำหรับในประเทศไทย พืชกระท่อมได้รับการปลดออกจากสถานะยาเสพติดมาเป็นพืชที่ประชาชนสามารถปลูกเพื่อการบริโภค และขายได้ตั้งแต่วันที่ 24 สิงหาคม 2564 ซึ่งแต่เดิมประชาชนในท้องถิ่นภาคใต้ มักปลูกไว้หลังบ้านประมาณ 1-2 ต้นเพื่อใช้แบบวิถีชาวบ้านที่เน้นการบรรเทาอาการปวดเมื่อย และลดความอ่อนล้าจากการทำงาน และทนแดดมากขึ้น [2], [3] ผู้อำนวยการสถาบันการแพทย์แผนไทย กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือกเปิดเผยว่า พืชกระท่อมมีสรรพคุณแก้อาการปวดเมื่อยตามร่างกาย แก้อาการท้องเสีย ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด และมีฤทธิ์ในการกระตุ้นประสาทส่วนกลาง [2]

ปัจจุบันพบว่ากระท่อมยังคงเป็นสมุนไพรที่นำมาใช้เป็นส่วนประกอบในยาโรคเรื้อรังมากกว่า 100 ชนิด [4] โดยหมอพื้นบ้านใช้พืชกระท่อม 2 แบบในการรักษาโรค แบบแรกคือ ใช้กระท่อมแบบเดี่ยว แก้กกลุ่มอาการปวดเมื่อย ปวดกล้ามเนื้อ กระตุก เอ็น ช้อ โดยใช้เป็นใบสด จำนวน 1-2 ใบ รูดก้านใบออก เคี้ยวใบสด กลืนเฉพาะน้ำ คายกากใบทิ้ง แล้วดื่มน้ำเปล่าตาม ทั้งนี้ก้านใบและใบของกระท่อมไม่สามารถย่อยได้ หากกลืนเข้าไปจะทำให้ติดค้างอยู่ภายในลำไส้ แต่สำหรับผู้ที่ไม่อยากเคี้ยว สามารถนำมาต้มดื่มได้ โดยต้มน้ำให้

เดือด จากนั้นใส่ใบกระท่อม แล้วต้มต่ออีกประมาณครึ่งชั่วโมง นำมาดื่ม เช้าครั้งแก้ว-เย็นครั้งแก้ว [5] แบบที่สอง คือ ใช้กระท่อมแบบตำรับยา โดยใช้ร่วมกับยาอื่น ๆ แก้อาการปวดตามร่างกาย กระตุก เอ็น ช้อ คลายกล้ามเนื้อ รักษาโรคทางเดินอาหาร โดยเฉพาะท้องเสีย มีมูกเลือด ซึ่งกรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือกอยู่ระหว่างฟื้นฟูตำรับยา [2], [3]

จากคุณประโยชน์ของกระท่อมและความนิยมในการบริโภคโดยประชาชน การพัฒนาวิธีควบคุมคุณภาพของใบกระท่อม และผลิตภัณฑ์ให้มีวิธีปฏิบัติตามหลักวิชาการจึงมีความสำคัญ ซึ่งในกระบวนการนี้จำเป็นต้องมีสารมิตราไจนีนเพื่อใช้วิเคราะห์เปรียบเทียบ และเนื่องจากสารมาตรฐานมิตราไจนีนที่มีขายในปัจจุบันต้องนำเข้าจึงมีราคาแพงมาก โดยขนาด 10 มิลลิกรัม มีราคาสูงกว่า 10,000 บาท และมีความบริสุทธิ์เพียง 95.4 เปอร์เซ็นต์ [6] อนึ่ง ประเทศไทยมีพืชกระท่อมที่มีการใช้ประโยชน์สืบเนื่องมาช้านาน หากมีวิธีการแยกสารมิตราไจนีนจากพืชกระท่อมในประเทศไทยมาใช้ประโยชน์ได้เอง จะช่วยในการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากใบกระท่อมให้มีคุณภาพและมีประสิทธิภาพ งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการแยกสารมิตราไจนีนจากใบกระท่อมก้านแดง ด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟี ซึ่งสามารถปฏิบัติในห้องปฏิบัติการเคมีทั่วไปได้

อนึ่งในงานวิจัยนี้ใช้เครื่อง High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC, CAMAG, Switzerland) ซึ่งเป็นเครื่องมือวิเคราะห์สมุนไพรที่มีการระบุไว้ในเภสัชตำรับของอเมริกาและยุโรป คือ United States Pharmacopoeia (USP 38/NF33 1st Supplement) และ European Pharmacopoeia (Ph.Eur.9.0) มีอุปกรณ์ในการใส่ตัวอย่างลงบนแผ่น TLC เป็นแถบสารทำให้ลดการขยายของแถบสาร (band broadening) จึงมีการแยกของแถบสารได้ดีกว่าการหดยสาร [7]



Figure 1 The plant and leaf of Kratom kan dang
(photo by Vallisuta, O. 2024)

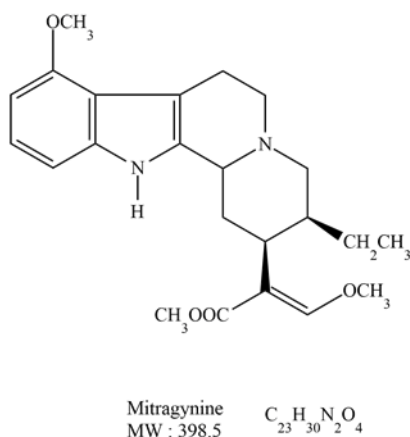


Figure 2 Molecular structure of mitragynine
(by Thititanaapipong, P. 2024)

2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

2.1. การเก็บตัวอย่างพืช

ตัวอย่างพืชสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ ใบกระท่อมสดเพสลาด พันธุ์ก้านแดง จังหวัดชุมพร เก็บในเดือนมีนาคม 2566 ตัวอย่างสมุนไพรได้รับการระบุลักษณะทางพฤกษ-อนุกรมวิธาน โดยพิพิธภัณฑสถานไพร กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กรุงเทพมหานคร มีชื่อพฤกษศาสตร์ว่า *Mitragyna speciosa* (Korth.) Havil. หมายเลขอ้างอิง TTM No.0005467

2.2. สารเคมี และสารมาตรฐาน

สารมาตรฐานที่ใช้ในการวิจัยคือ สารมาตรฐานมิทราไจนีน (ChromaDex, USA) กรดพิคริก (Chemical, USA) สารเคมีอื่น ๆ ได้แก่ กรดอะซิติก คลอโรฟอร์ม เมทานอล เอทานอล เอทิลอะซิเตท เอ็น-เฮกเซน (AR grade, Merck, Germany) สารละลายแอมโมเนีย (28% J.T. Baker, USA)

2.3. เครื่องมือและอุปกรณ์

กระต่ายกรองวัดแมน (Cytiva, China), แผ่นทีแอลซี (TLC) อะลูมิเนียม (Aluminium Silica gel 60 GF₂₅₄, Merck, Germany), ซิลิกาเจลสำหรับคอลัมน์โครมาโทกราฟี เกรด 9385 (Merck, Germany) ยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Uvitec, UK) เครื่องร่งคเลขวางสมรรถนะสูง (HPTLC, CAMAG, Switzerland) พร้อมด้วยตัวตรวจวัดรังสียูวี คลื่นสั้นและคลื่นยาว เครื่องโซนิเคเตอร์ (Elma, Germany), เครื่องวัดค่า pH (Consort, Belgium) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Mettler, Germany), เครื่องเขย่าหลอดทดลอง (Vortex mixer, Scientific Industries, USA), ตู้ อ บ ล ม ร ี อ น (Mettler, Germany) เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Precisa Gravimetrics, Switzerland), เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Heidolph, Germany), คอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 เซนติเมตร ยาว 40 เซนติเมตร เครื่องทำแท่งแบบแช่เยือกแข็ง (Labconco, USA), เครื่องวัดจุดหลอมเหลว (Buchi, Switzerland)

2.4. การเตรียมสารสกัดจากใบกระท่อม

นำใบกระท่อมพันธุ์ก้านแดงมาล้างให้สะอาด ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปอบด้วยเตาอบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำใบกระท่อมที่ได้มาบดเป็นผงละเอียด ด้วยเครื่องบดสมุนไพร แล้วนำไปผ่านตะแกรงร่อนเบอร์ 60 จากนั้นนำผงใบกระท่อมมาสกัดสารด้วยวิธีการหมัก [8] โดยใช้ผงใบกระท่อม 200 กรัม และ 40 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล 2 ลิตร อัตราส่วนมวลต่อปริมาตรผงใบกระท่อม : เอทานอล 1:10 หลังจากหมักเป็นเวลา 5 วัน กรองเก็บสารละลายด้วยกระต่ายกรองวัดแมนเบอร์ 1 ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน ภายใต้ความดัน 80 มิลลิเมตรปรอท อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส อัตราการหมุน 60 รอบต่อนาที นำสารสกัดที่ได้ไปทำให้แห้งโดยขบวนการฟรอสตไดรไรเซชันที่อุณหภูมิ -20°C

2.5. การตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพด้วยรังคเลขวาง (TLC)

ได้พัฒนาระบบของเฟสเคลื่อนที่ขึ้นใหม่ โดยนำคลอโรฟอร์ม 99 มิลลิลิตร ผสมกับ 1 มิลลิลิตร เมทานอล ที่มี 0.2 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ เขย่าให้เข้ากัน นำส่วนผสมนี้ 99 มิลลิลิตร ผสมกับเมทานอล 5 มิลลิลิตร ใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ทิ้งให้เกิดการอิ่มตัวในแท่ง TLC 30 นาที เตรียมแผ่น

วิเคราะห์ Silica gel 60F₂₅₄ โดยหยดตัวอย่างลงบนแผ่น TLC ให้ห่างจากขอบด้านข้างและด้านล่าง 10 มิลลิเมตร ใส่แผ่น TLC ลงไปในแท็งก์ เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่ได้ 70 มิลลิเมตร จึงนำแผ่น TLC ออกมาวางทิ้งไว้ให้แห้ง ก่อนนำไปตรวจดูลักษณะและการเคลื่อนที่ของมิทราไจนีนด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ หาค่า R_f ตามสูตรข้างล่าง

$$R_f = \frac{\text{ระยะที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่}}{\text{ระยะที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

ระบบ TLC นี้ใช้ในการติดตามการแยกของมิทราไจนีน ที่ชะออกมาจากคอลัมน์เทียบกับสารมาตรฐาน

2.6. การแยกมิทราไจนีนด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ใช้วิธีที่ดัดแปลงจากงานของ Still et al. [9] โดยใช้คอลัมน์แก้วขนาด 4 x 40 เซนติเมตร ที่มีแผ่นกรองด้านล่าง พร้อมวาล์วเพลาเพื่อควบคุมการไหล สำหรับเฟสคงที่ใช้ ซิลิกาเจลชนิด 9385 ที่มีขนาด 40-63 ไมครอนในการแยกสาร [9] แต่มีการปรับลดคุณสมบัติของเฟสคงที่ โดยใช้ซิลิกาเจลมา 50 กรัม เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิตร (20 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักซิลิกา) คนให้ทั่วปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง [10] และใช้เฟสเคลื่อนที่ซึ่งพัฒนาขึ้นโดยการเตรียม 0.1 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ ในเมทานอล 100 มิลลิตร แล้วนำส่วนผสมนี้ 5 มิลลิตร ผสมกับคลอโรฟอร์ม 95 มิลลิตร ใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่รวม 600 มิลลิตร นำไปเตรียมซิลิกาเจลในคอลัมน์แก้ว โดยเปิดวาล์วด้านล่างให้เฟสเคลื่อนที่ไหลออกได้ ลดการเกิดฟองอากาศในคอลัมน์และช่วยให้ซิลิกาเจลอัดตัวเป็นแท่ง เปิดวาล์วไว้จนได้ขนาดของแท่งคอลัมน์คงที่ ประมาณ 11.5 เซนติเมตร จึงปิดวาล์ว ค่อย ๆ โรยทรายทะเลสีขาว (white sea sand) ลงบนคอลัมน์อย่างสม่ำเสมอ ให้ความสูงของแถบทราย 0.5 เซนติเมตร ปิดทับหน้าทรายด้วยแผ่นวงกลมสำหรับรีสุทซ์ นำตัวอย่างสารสกัดใบกระพุ่มด้วย 40 เปอร์เซ็นต์เอทานอล 1 กรัม ที่ผสมไว้กับ 2.5 กรัม ของซิลิกาเจล 9385 โรยลงบนแผ่นสำลีที่วางทับบนแถบทรายเหนือคอลัมน์อย่างสม่ำเสมอ ค่อย ๆ เติมเฟสเคลื่อนที่ผ่านกรวยแก้วก้นยาว ปลายแตะกับผนังคอลัมน์เพื่อให้ตัวทำละลายไหลลงไปตามด้านข้างคอลัมน์แก้วอย่างช้า ๆ ในปริมาณที่เพียงพอต่อการชะตัวอย่างลงสู่แถบทราย และเคลื่อนลงแท่งคอลัมน์ (column bed) จากนั้นเติมเฟสเคลื่อนที่ และทำการชะ (elute) สารออกจากคอลัมน์ด้วยอัตราการไหล 5 มิลลิตรต่อนาที เก็บ

สารที่ถูกชะ (eluate) ในหลอดทดลอง หลอดละ 5 มิลลิตร จำนวน 25 หลอด ตรวจสอบประกอบในหลอดด้วย TLC เพื่อรวมหลอดที่มีมิทราไจนีนเป็นสารหลัก

2.7. การตรวจวิเคราะห์มิทราไจนีนด้วยเครื่องรณรงค์ผลผลิตสูง (HPTLC)

เครื่อง HPTLC ประกอบด้วยเครื่อง Linomat 5, เครื่อง TLC Scanner 4 และโปรแกรม HPTLC Software visionCATS

เตรียมสารละลายมาตรฐานมิทราไจนีนโดยชั่งสาร 1 มิลลิกรัม ละลายในเมทานอล 5 มิลลิตร มีความเข้มข้นเท่ากับ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ขนาดที่ใส่ลงในแผ่น TLC คือ 2 ไมโครลิตร เตรียมตัวอย่างสารสกัดใบกระพุ่มโดยละลายผงพืชทราย 80 มิลลิกรัม ในเมทานอล 1 มิลลิตร ขนาดที่ใส่ลงในแผ่น TLC คือ 2 ไมโครลิตร ใช้เฟสเคลื่อนที่เดียวกันกับการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ ด้วยรณรงค์ผลผลิตสูง ในข้อ 2.5. วิธีการวิเคราะห์ เริ่มจากการจุดสารละลายมิทราไจนีนลงบนแผ่น TLC Silica gel 60 GF₂₅₄ ขนาด 20 x 10 เซนติเมตร ตั้งค่าพารามิเตอร์ของเครื่อง Linomat 5 ผ่านโปรแกรม HPTLC Software vision CATS โดยค่า Y ตั้งที่ 10 มิลลิเมตร ความยาว (length) เท่ากับ 8.0 มิลลิเมตร ค่า X ตำแหน่งแรก ตั้งที่ 20 มิลลิเมตร ค่า distance ตั้งที่ 11.4 มิลลิเมตร ระยะทางเคลื่อนที่ คือ 90 มิลลิเมตร ค่าพารามิเตอร์ของเครื่อง Scanner 4 กำหนดให้ความเร็วในการสแกน (Scanning speed) อยู่ที่ 40 มิลลิเมตรต่อวินาที ค่า Data resolution อยู่ที่ 200 ไมโครเมตรต่อขั้น (step) กำหนดช่อง (Slit) ที่ 8 x 0.2 มิลลิเมตร ความยาวคลื่นที่ใช้วัด คือ 254 นาโนเมตร

2.8. การบันทึกข้อมูลทางกายภาพของมิทราไจนีน

นำสารมิทราไจนีนพิกเรต (Mitragnine picrate) ที่เตรียมขึ้นจากการแยกด้วยคอลัมน์ โครมาโทกราฟี มาทำการตรวจวิเคราะห์ข้อมูลทางกายภาพ

2.8.1. การวัดจุดหลอมเหลวของมิทราไจนีนพิกเรต

กรองตะกอนมิทราไจนีนพิกเรต นำมาละลายในเมทานอลอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนตะกอนละลายหมด ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืนจนตกผลึก แล้วนำมากรอง จากนั้นทิ้งไว้ให้แห้งสนิท และบดเป็นผงละเอียด บรรจุในหลอดสำหรับวัดจุดหลอมเหลวให้ได้ความสูง ในหลอด 2 มิลลิเมตร ตั้งอุณหภูมิ

เริ่มต้นที่ 220 องศาเซลเซียส อัตราเพิ่มอุณหภูมิ 1 องศาเซลเซียส ต่อนาที และอุณหภูมิสุดท้าย 235 องศาเซลเซียส

2.8.2. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมิตรา ไจนีนพิกเรตด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy

ซังมิตราไจนีนพิกเรต 5 มิลลิกรัม นำมาละลาย
ในตัวทำละลาย CDCl_3 แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง
Ascend TM 600/Avance III HD (Bruker, Switzerland)

2.8.3. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมิตรา ไจนีนพิกเรตด้วยเทคนิค Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR)

นำมิตราไจนีนพิกเรต 5 มิลลิกรัมมาเตรียมเป็น
KBr pellet หลังจากนั้นวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วยเครื่อง
Invenio S Fourier Transform Infrared Spectrometer
(Bruker, Switzerland)

2.8.4. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมิตรา ไจนีนพิกเรตด้วยเทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry

นำมิตราไจนีนพิกเรต 5 มิลลิกรัม มาหามวล
โมเลกุล ด้วยเครื่อง MALDI-TOF Mass Spectrometer ที่มี
เทคโนโลยี SpiralTOF™ (JEOL JMS-S3000, JEOL, USA)
โดยใช้โหมดสไปรัล (Spiral mode) และใช้สาร α -Cyano-4-
hydroxycinnamic acid เป็นเมทริกซ์ ทำหน้าที่เป็นตัวกลาง
ช่วยรับพลังงานจากเลเซอร์ แล้วถ่ายเทประจุและพลังงานไป
ยังโมเลกุลของสารมิตราไจนีนพิกเรตที่ต้องการวิเคราะห์

3. ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

3.1. การเตรียมสารสกัดจากใบกระท่อม

ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้ตัวทำละลายในการสกัดเป็น
40 เปอร์เซ็นต์ เอทานอลในน้ำโดยปริมาตร เนื่องจากมีการใช้
ใบกระท่อมสด โดยการปั่นกับสุราขาวเพื่อใช้ภายนอก ในการ
ลดอาการปวด บวม และคลายกล้ามเนื้อ ที่วัดศิริวงศ์ จังหวัด
ชุมพร [11] หลังจากการหมัก ระเหยตัวทำละลายออกด้วย
เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน นำไปทำให้แห้งโดยขบวนการ
พรีชดราย ได้สารสกัดหยาบจากใบกระท่อม มีลักษณะเป็นผงสี
น้ำตาล 6.58 กรัม ร้อยละผลผลิตใบกระท่อมก้านแดงที่สกัด
ด้วยตัวทำละลายเอทานอล 40 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 3.20 ± 0.23
(ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2. การวัดจุดหลอมเหลวมิตราไจนีนพิกเรต

ผลึกของมิตราไจนีนพิกเรตมีสีส้มตรงกับรายงาน
ก่อนหน้า และได้รายงานว่ามีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 220-225
องศาเซลเซียส [12] งานวิจัยนี้ได้ทำการตกผลึกซ้ำ (recrystallize)
ได้ผลึกรูปเข็ม และได้ค่าจุดหลอมเหลวมิตราไจนีนพิกเรต
เท่ากับ 235-236 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ผลึกสีส้มได้เปลี่ยนเป็น
มวลสีน้ำตาลไหม้

3.3. การตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพด้วยแรงคเลข ผิวบาง (TLC)

จากการทดลองใช้ระบบที่แอลซีของรายงานก่อนหน้า
ซึ่งใช้ส่วนผสมเฮกเซน และเอทิลอะซิเตต ในอัตราส่วน 80:20
โดยปริมาตร [12] พบว่าไม่ให้เกิดการแยกที่ดี แม้จะเปลี่ยน
อัตราส่วน พบว่าระบบเฟสเคลื่อนที่ใหม่ซึ่งใช้คลอโรฟอร์มทำ
ให้เป็นเบสด้วยเมทานอลที่มี 0.2 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์
แล้วนำมาผสมกับเมทานอลในอัตราส่วน 95:5 สามารถให้
การแยกที่ดีขึ้น จากการตรวจดูลักษณะและการเคลื่อนที่ของ
มิตราไจนีนด้วยเครื่อง ยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์
ภายใต้แสงปกติ (white light) พบเป็นแถบสีน้ำตาลและ
ภายใต้รังสียูวีคลื่นยาว (365 นาโนเมตร) ปรากฏเป็นแถบเรือง
แสงสีเขียวปนฟ้า ซึ่งตรงกับรายงานก่อนหน้า [6] ภายใต้รังสี
ยูวีคลื่นสั้น (254 นาโนเมตร) ปรากฏเป็นแถบดำบนพื้นเรือง
แสงสีเขียว และสีน้ำตาลอ่อนกับสเปรย์ดราเจนดอร์ฟ
(Dragendorff's spray) (Figure 3) ทั้งนี้อาจเป็นผลจาก
โซเดียมไฮดรอกไซด์บนแผ่น TLC เพราะสารสกัดให้สีส้มกับ
ดราเจนดอร์ฟสเปรย์บนกระดาษกรอง

3.4. การแยกมิตราไจนีนด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

จากการทดลองพบว่าต้องทำให้ซิลิกาเจล มีสมรรถภาพ
(activity) ในระดับ 5 [10] เพื่อลดอำนาจในการดูดซับสาร
งานวิจัยโดยทั่วไปมักใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในการสกัดใบ
กระท่อม เช่น 95 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล [3], [6] เมทานอล [13]
และคลอโรฟอร์ม [14] เป็นต้น ซึ่งทำให้ได้สารอื่น ๆ นอกจาก
มิตราไจนีนออกมาด้วย โดยเฉพาะสี ซึ่งไปรบกวนการแยกหรือ
วิเคราะห์มิตราไจนีนในขั้นตอนโครมาโทกราฟี [15] จากการ
ทดลองพบว่าการใช้สารสกัด 40 เปอร์เซ็นต์ เอทานอลมาทำ
การแยกมิตราไจนีน มีข้อดีกว่าการใช้ 95 เปอร์เซ็นต์ เพราะ
เมื่อนำมาลงคอลัมน์สารสกัด 40 เปอร์เซ็นต์ เอทานอลให้สาร
อื่น ๆ ออกมาน้อยกว่า โดยเฉพาะสี (Figure 4)

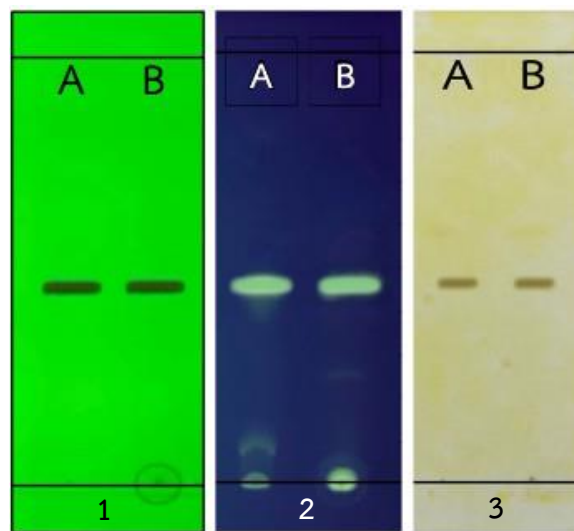


Figure 3 TLC chromatogram of standard mitragynine and 40% ethanol extract of Kratom observed under UV₂₅₄ nm (1), UV₃₆₆ nm (2), and Dragendorff's spray (3)



Figure 4 Comparison of Kratom kan dang extracts (1 g each) in a silica gel column
[A] 95% ethanol extract and [B] 40% ethanol extract

เมื่อตรวจสอบส่วนประกอบในหลอดด้วย TLC พบว่า หลอดที่ 9-11 มีสารมิตราไจนีนเป็นหลักจึงทำการรวมแล้ว นำไประเหยแห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน ได้น้ำหนัก 0.0164 กรัม นำไปทำเกลือพิกเรต โดยละลาย ด้วยเมทานอล 3 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง หยด สารละลายอิมิตัวในน้ำของกรดพิกคริกลงในหลอดทดลองจน ไม่มีลักษณะขุ่นเพิ่ม เก็บในตู้เย็นให้ตกตะกอนสมบูรณ์ (Figure 5) กรองเก็บตะกอนมิตราไจนีนพิกเรตได้น้ำหนัก 0.0212 กรัม การแยกสารมิตราไจนีนมาเตรียมให้อยู่ในรูปของเกลือพิกเรตนั้น มีการศึกษาแล้วพบว่าสารมิตราไจนีนที่ผ่านระบบการ crystallization จะสามารถได้สารมิตราไจนีนเบสที่มีความบริสุทธิ์ได้ถึงร้อยละ 99 เมื่อวิเคราะห์ด้วย GC-MS [12]

หากเปรียบเทียบกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ ซึ่งต้องสกัด อัลคาลอยด์รวมเพื่อลงคอลัมน์ต้องใช้สองคอลัมน์ในการแยก โดยครั้งแรกใช้คอลัมน์ขนาด 1.5 x 22.5 นิ้ว (ประมาณ 4x57 เซนติเมตร) รวมสารที่ชะออกมาได้ แล้วต้องนำไปผ่านซิลิกา คอลัมน์ที่สอง ขนาด 1 x 36 นิ้ว (ประมาณ 2.54x91 เซนติเมตร) จึงสามารถแยกมิตราไจนีนได้ [14] การใช้สารสกัด 40 เปอร์เซ็นต์ เอทานอลมาลงคอลัมน์ทำให้สามารถแยกมิตราไจนีนออกมาได้ ด้วยการผ่านคอลัมน์เพียงครั้งเดียวเป็นการประหยัดเวลาและ ทรัพยากร

3.5. การตรวจวิเคราะห์มิตราไจนีนด้วยเครื่องรังสีเลข ผิวบางสมรรถนะสูง (HPTLC)

การตรวจวิเคราะห์มิตราไจนีนด้วย HPTLC พบว่า สามารถตรวจพบมิตราไจนีนในสารสกัด 40 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล (Figure 6) ที่ค่า R_f เดียวกันกับสารมาตรฐานมิตราไจนีน คือ 0.58 ปรากฏเป็นแถบดำบนพื้นเรืองแสงเขียว ที่ค่า R_f เดียวกันกับสารมาตรฐานมิตราไจนีน คือ 0.58 โดยมีลักษณะ ของยูวีสเปกตรัมเหมือนกัน และค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด ตรงกันที่ 226 นาโนเมตร (Figure 7)

3.6. การบันทึกข้อมูลทางกายภาพของสารมิตราไจนีนพิกเรต

3.6.1. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมิตราไจนีนพิกเรตด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมิตราไจนีนพิกเรต ด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy ได้ ^1H NMR spectrum ของสารมิตราไจนีน พบ โครงสร้างของพิกเรต ปรากฏที่ δ เท่ากับ 8.962 ส่วนในล้านส่วน ส่วนโครงสร้างของสารมิตราไจนีนพบไฮโดรเจนของวงแหวนอะโรมาติก (Ar-H) ในช่วง δ ที่ 7.566-6.456 ส่วนในล้านส่วน ค่า δ ของหมู่ $-\text{OCH}_3$ อยู่ที่ 3.8-3.7 ค่า δ ของหมู่ $-\text{N}-\text{CH}_2$ อยู่ที่ 3.3 (Figure 8)

เมื่อนำข้อมูลของมิตราไจนีนพิกเรตที่สังเคราะห์ ได้จากห้องปฏิบัติการมาเปรียบเทียบกับข้อมูลของมิตราไจนีน ที่เคยมีรายงานมาก่อน [16] พบว่า ค่า chemical shift มีการ เคลื่อนไปทางด้านซ้ายมากขึ้นหรือถูกเคลื่อนไปอยู่ในส่วน downfield (low field) (Table 1) การเคลื่อนไปสู่ส่วน downfield นั้นอาจเป็นผลของอิเล็กตรอนและประจุใน โครงสร้างของพิกเรตแต่พบสัญญาณที่สำคัญตรงกันที่ 7.56-6.45 ส่วนในล้านส่วนเป็นโปรตอนของวงแหวนอะโรมาติก (aromatic protons), สัญญาณที่ 6.44 ส่วนในล้านส่วน เป็น โปรตอนของหมู่แอลคีน(alkene proton), สัญญาณที่ 3.86, 3.76 และ 3.75 ส่วนในล้านส่วน เป็นโปรตอนของหมู่เมทิล (methyl proton) ที่จับกับออกซิเจน ($\text{O}-\text{CH}_3$) และสัญญาณที่ 3.28, 3.16 และ 1.27 ส่วนในล้านส่วน เป็นโปรตอนของหมู่แอลคิล (alkyl proton) ซึ่งมีความคลาดเคลื่อนจากรายงานที่มีมาก่อน [13] เล็กน้อย (Figure 8, Table 1) แต่ก็อยู่ในช่วง chemical shift ของโปรตอนดังกล่าว [17] นอกจากนี้ยังพบสัญญาณโปรตอน ของพิกเรต ที่ตำแหน่ง 8.962 ส่วนในล้านส่วน ซึ่งใกล้เคียงกับที่ มีรายงานมาก่อน คือ ที่ตำแหน่ง 9 ส่วนในล้านส่วน [18]

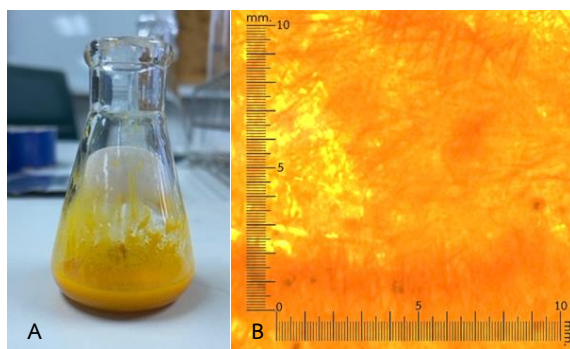


Figure 5 Precipitation of mitragynine picrate [A] and its needle crystals after recrystallization [B]

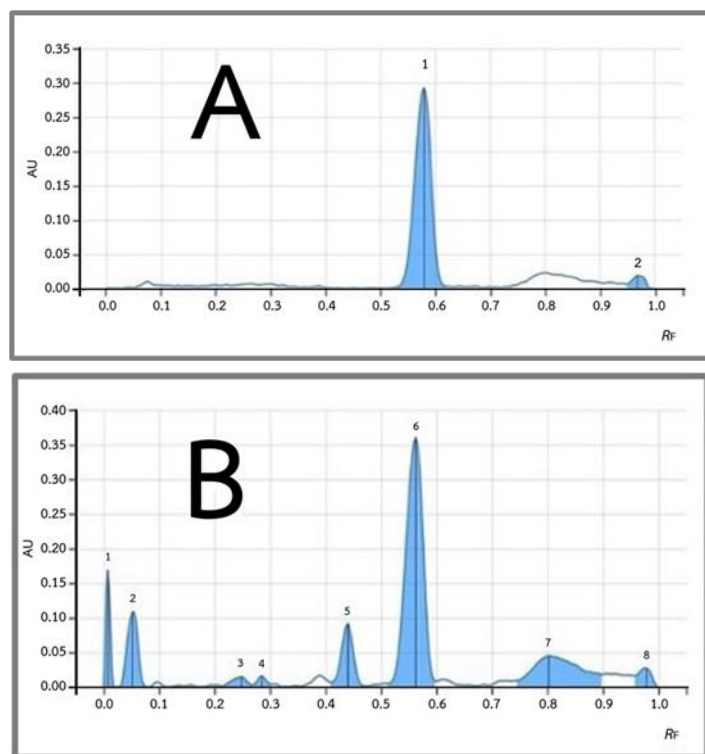


Figure 6 HPTLC chromatogram pattern under UV_{254} of 40 % ethanol Kratom extract, 2 μ L of 80 μ g /mL [A] and standard mitragynine, 12 μ L of 200 μ g/mL [B] [TLC system: Silica gel GF₂₅₄, *CHCl₃-MeOH 99:5]

Note: *CHCl₃ = 99 mL + 1 mL MeOH (0.2 N NaOH)

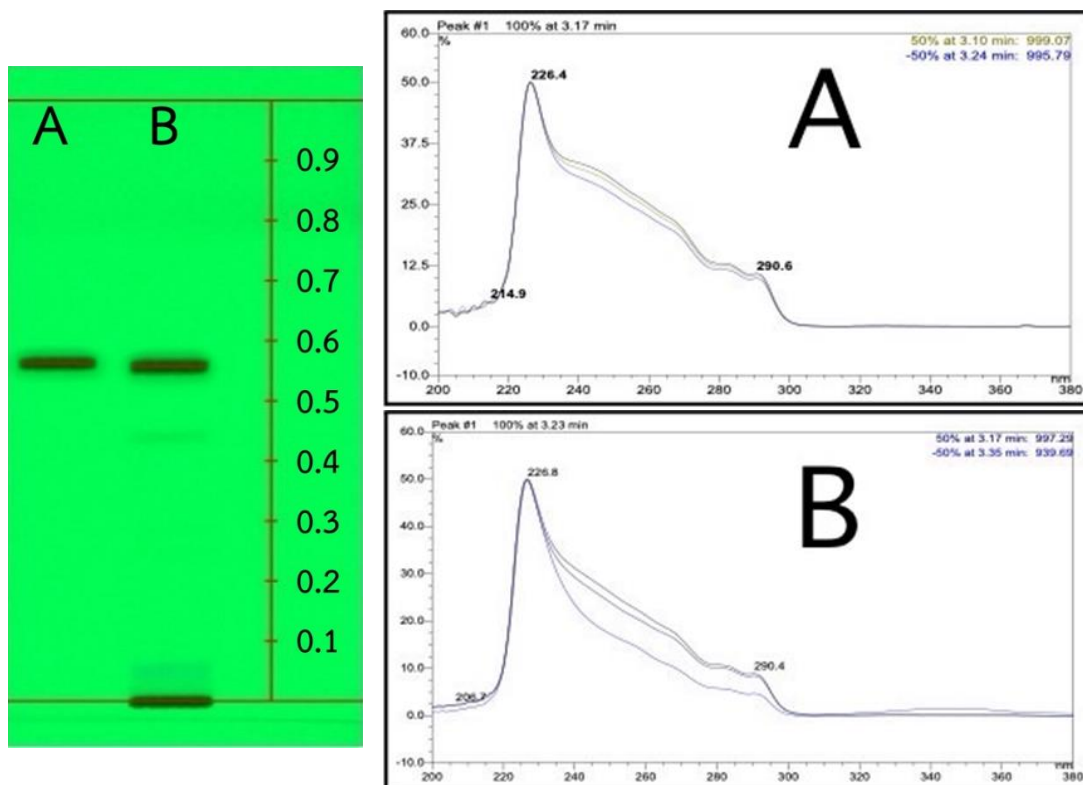


Figure 7 Appearance under UV_{254} nm of standard mitragynine [A] and mitragynine in 40% ethanol Kratom extract [B] and their UV absorption spectra [TLC system: Silica gel GF₂₅₄, *CHCl₃-MeOH 99:5]

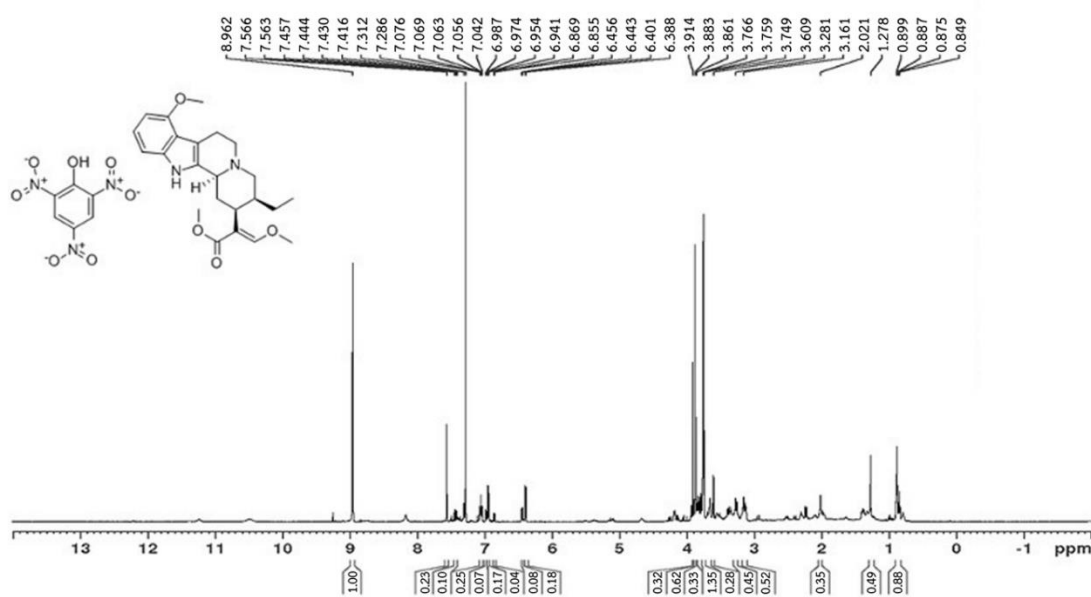


Figure 8 ^1H -NMR spectrum of mitragynine picrate and its molecular structure

Table 1 Chemical shifts of mitragynine picrate versus previously reported chemical shift of mitragynine [16]

δ in ppm ^1H NMR of mitragynine picrate	δ in ppm ^1H NMR of mitragynine [16]
7.566-6.456 (3H, m, Ar-H)	7.42–6.45 (3H, m, Ar-H)
6.443(1H, s, =CH)	6.43 (1H, s, =CH)
3.861(3H, s, $-\text{OCH}_3$)	3.86 (3H, s, $-\text{OCH}_3$)
3.766 (3H, s, $-\text{OCH}_3$)	3.71 (3H, s, $-\text{OCH}_3$)
3.759 (3H, s, $-\text{OCH}_3$)	3.70 (3H, s, $-\text{OCH}_3$)
3.281 (4H, $-\text{N}-\text{CH}_2$)	3.01–2.99 (4H, m, $-\text{N}-\text{CH}_2$)
3.161(2H, $-\text{CH}_2$)	2.52–2.51 (2H, m, $-\text{CH}_2$)
1.278 (2H, m, $-\text{CH}_2$)	1.53–1.33 (2H, m, $-\text{CH}_2$)
0.875 (3H)	0.862 (3H, t, $J = 7.5$ Hz)

3.6.2. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมิตราไจนีนพิกเรตด้วยเทคนิค FTIR

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมิตราไจนีนพิกเรตด้วยเทคนิค FTIR ได้ IR spectrum (Figure 9) และพบพิกที่แสดงถึง N–H stretch ของหมู่ secondary amine (2° amine) จำนวน 1 พิกที่ตำแหน่ง 3319 cm^{-1} แต่ไม่พบพิกแสดงถึง N–H stretch ของ primary amine (1° amine) และ tertiary amine (3° amine) ในตำแหน่งที่ $3400\text{--}3250\text{ cm}^{-1}$ พิกที่แสดงถึง C–N stretch (aromatic amines) ในช่วง $1335\text{--}1250\text{ cm}^{-1}$ พิกที่แสดงถึง C–N stretch (aliphatic amines) อยู่ในช่วง $1250\text{--}1020\text{ cm}^{-1}$ พิกที่แสดงถึง N–H wag ของหมู่ secondary amine ที่ $723\text{--}708\text{ cm}^{-1}$ พิกที่แสดงถึง C–H stretch $2952\text{--}2884\text{ cm}^{-1}$ พิกที่แสดงถึง $\text{C}=\text{O}$ ที่ตำแหน่ง $1685\text{--}1608\text{ cm}^{-1}$ พิกที่แสดง

ถึง $-\text{OCH}_3$ อยู่ที่ตำแหน่ง 2847 cm^{-1} และอยู่ในช่วง $1145\text{--}1078\text{ cm}^{-1}$ ในส่วนของพิกเรตพบพิกที่ตำแหน่ง 3084 cm^{-1} และพบพิกของ N–O stretch ที่ตำแหน่ง 1545 และ 1437 cm^{-1}

เมื่อเปรียบเทียบตำแหน่งของพิกใน IR spectrum ของสารมิตราไจนีนพิกเรตที่ได้จากงานวิจัยนี้กับรายงานวิจัยที่กล่าวถึง IR spectrum ของกรดพิคริก [19] สารที่มีโครงสร้างของพิกเรตต่างๆ [20], [21] รวมทั้งสารมิตราไจนีน [22] พบว่า IR spectrum ของสารมิตราไจนีนพิกเรตมีพิกที่บ่งบอกถึงโครงสร้างของพิกเรตได้แก่ พิกของ $-\text{O}-\text{H}$ ที่ตำแหน่ง 3084 cm^{-1} พิกของ N–O stretch ที่ตำแหน่ง 1545 cm^{-1} พิกของ (NO_2) symmetric stretching ที่ 1330 cm^{-1} และพิกของ NO_2 rocking ที่ 543 cm^{-1} (Table 2)

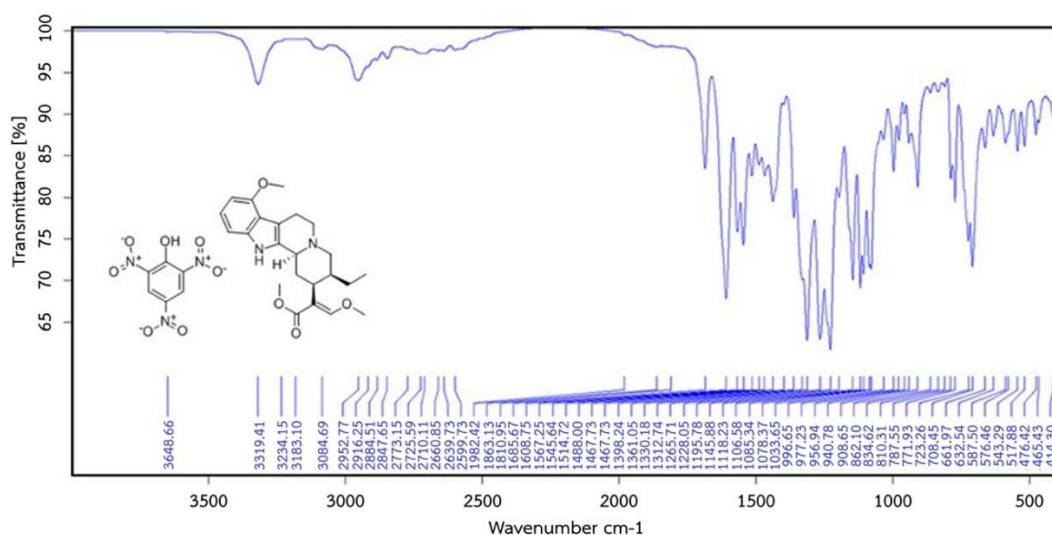


Figure 9 IR spectrum of mitragynine picrate and its molecular structure

Table 2 Infrared absorption frequencies of mitragynine picrate from the present study versus previously reported values of picric acid, picrate and mitragynine

Wavenumber (cm ⁻¹) of mitragynine picrate In present study	Wavenumber (cm ⁻¹) of picric acid [19]	Wavenumber (cm ⁻¹) of picrate [20], [21]	Wavenumber (cm ⁻¹) of mitragynine [22]	Assignment
3319			3359	N-H stretch (2° amine)
3084	3013	3080		-(O-H)
2952	2981	2920	2926	-(C-H)
2847				-OCH ₃
1685			1697	C=O
	1632	1631	1622	C-C stretch
1608				-(C=C)
1545		1548		C-NO ₂ stretch
1514			1508	-(C-C)
1467		1460	1461	C-C stretch
1437	1431		1434	-(C-C)
1330				(NO ₂) symmetric stretching
1265		1266		C-N stretch
1145	1148		1146	C-H deformation
1085	1087	1084		C-H bend
1033	1032			C-H out of plane bend
996		995		C-H out-of-plane deformation
661		662		C-C out-of-plane ring deformation
543		542		NO ₂ rocking

3.6.3. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมิตรา ไจนีนพิกเรตด้วยเทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry

สเปกตรัมของมวล (Mass spectrum) ที่ได้จากเครื่อง MALDI-TOF mass spectrometer เป็นผลเชิงคุณภาพจากกระบวนการ soft ionization เพื่อระบุมวลของไอออนที่ตรวจพบด้วยการฉายเลเซอร์ลงบนส่วนผสมของสารกับเมทริกซ์ สำหรับสารที่มีขนาดโมเลกุลน้อยกว่า 5 กิโลดาลตัน (KDa) ใช้ α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CCA) เป็นเมทริกซ์ช่วยทำหน้าที่เป็นตัวกลางถ่ายเทประจุและพลังงานไปยังโมเลกุลของสารตัวอย่าง ทำให้สารแตกตัวเป็นไอออนในสถานะแก๊สได้ ค่า m/z ที่ตรวจพบมักอยู่ในรูป Molecular ion เช่น M^+ , $[M+H]^+$ เป็นต้น ค่า m/z ของไอออนที่ตรวจวัดได้จะมีค่าเท่ากับน้ำหนักโมเลกุลของสาร [23] พบว่ามิตราไจนีนพิกเรตให้มวลของมิตราไจนีนที่มี parent ion ที่ m/z 399 โดยมีความเข้มข้น (intensity) ของมวลที่ 397 m/z มากกว่า parent ion (Figure 10) ซึ่งตรงกับผลวิเคราะห์มวลของมิตราไจนีนในรายงานก่อนหน้านี้ซึ่งใช้เทคนิค Electrospray ionization (ESI) ร่วมกับการทำให้เกิดการแยกตัวจากการชนกัน (Collision-induced dissociation, CID) [13] ซึ่งสอดคล้องกับสูตรโครงสร้าง $C_{23}H_{30}N_2O_4$ ของมิตราไจนีน และมีน้ำหนักโมเลกุล 398.5 กรัม/โมล ตามบันทึกของสถาบันสุขภาพแห่งชาติ (สหรัฐอเมริกา) [24]

เมื่อทำการวิเคราะห์ mass spectra โดยใช้เทคโนโลยี SpiralTOF™ ในส่วนของ TOF analyzer พบว่าสารมิตราไจนีนพิกเรต เกิดการแตกตัวให้อิออนของมิตราไจนีนที่มี parent ion ที่ m/z 380 มี base peak ที่ m/z 379.0470 และปรากฏมวลที่ m/z 335.0610, 307.1785, 282.0505, และ 212.0131 (Figure 11) แต่สเปกตรัมมวลของสารมิตราไจนีนพิกเรตที่ได้จาก MALDI-TOF ให้ base peak ที่ m/z 397 (Figure 10) แสดงว่ามีการสูญเสียประจุ 17 m/z ซึ่งอาจเกิดจากเสียน้ำ -OH ซึ่งสเปกตรัมมวลมีความแตกต่างจาก mass spectra ที่ได้จาก electron impact (EI-MS) ซึ่งมี base peak ที่ m/z 214 และมวลที่ m/z 397, 398, 383, 186, 269, 399 [13] เรียงลำดับตาม intensity จากข้อมูลข้างต้น แสดงว่าสเปกตรัมมวลที่ใช้วิธีการต่างกันจะให้อารมณ์แบบการแตกเป็นไอออนไม่เหมือนกัน สำหรับกรดพิกคริก หรือ 2,4,6-ไตรโนโตรฟินอล (2,4,6-Trinitrophenol) ที่มีสูตรโมเลกุล $C_6H_3N_3O_7$ มีน้ำหนักโมเลกุล 229.10 g/mol [25] ปรากฏรายงานการบันทึก parent ion ที่ m/z 229 ใน

สเปกตรัมมวลของกรดพิกคริก [26] แต่ไม่พบมวล 229 ในการศึกษาครั้งนี้ อนึ่ง ข้อมูลจากสถาบันสุขภาพแห่งชาติ (สหรัฐอเมริกา) ได้ให้สูตรโมเลกุลของมิตราไจนีน [24] และ มิตราไจนีนพิกเรต [27] เหมือนกันคือ $C_{23}H_{30}N_2O_4$ และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันคือ 398.5 g/mol จึงมีความเป็นไปได้ที่ส่วนของกรดพิกคริกในมิตราไจนีนพิกเรต ได้สลายไปในกระบวนการของ mass spectrometry ทั้งนี้สามารถเห็นสัญญาณของพิกเรตได้ในโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ของมิตราไจนีนพิกเรต (Figure 7) และใน IR spectrum (Table 2)

เมื่อสารมิตราไจนีนพิกเรต ที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับเมทริกซ์ (CCA) ถูกยิงด้วยเลเซอร์ สารมิตราไจนีนพิกเรตเกิดการแตกตัวกลายเป็นไอออนที่มีมวลโมเลกุล 379.0470, 335.0610, 307.1785, 282.0505, และ 212.0131 (Figure 11) จากข้อมูลโครงสร้างทางเคมีของสารมิตราไจนีนพิกเรตที่ประกอบด้วยโครงสร้างที่เป็นสารมิตราไจนีนมวลโมเลกุล 398.5 กรัมต่อโมล และ พิกเรตมวลโมเลกุล 228.1 กรัมต่อโมล รวมแล้วสารมิตราไจนีนพิกเรตน่าจะมีมวลโมเลกุล 626.6 กรัมต่อโมล แต่ใน mass spectrum ปรากฏมวลโมเลกุล 379.0470 ดังนั้นสารที่เกิดแตกตัวออกจากสารมิตราไจนีนพิกเรต อาจเป็นสารพิกเรต ที่มีมวลโมเลกุล 228.1 กรัมต่อโมล พร้อมกับสารบางชนิดที่มีมวลโมเลกุล 19.453 กรัมต่อโมล

4. บทสรุป

งานวิจัยนี้ได้นำเสนอข้อมูลใหม่คือระบบตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ ในการตรวจวิเคราะห์สารสกัดใบกระท่อมด้วยที่แอลซี และการแยกสารมิตราไจนีนด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี จำเป็นต้องใช้สถานะที่เป็นเบสด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ สารสกัดใบกระท่อมที่จะนำมาแยกสารมิตราไจนีน ควรเตรียมโดยใช้ 40 เปอร์เซ็นต์ เอทานอลจะทำให้ได้สารมิตราไจนีน จากการผ่านคอลัมน์เพียงครั้งเดียว อนึ่ง ซิลิกาเจลที่ใช้เป็นเฟสคงที่ในคอลัมน์โครมาโทกราฟี ต้องทำให้มีสมรรถนะระดับ 5 เพื่อลดความสามารถการดูดซับสาร เมื่อได้สารมิตราไจนีนจากคอลัมน์ ทำการเปลี่ยนเป็นรูปเกลือพิกเรตซึ่งอยู่ในสถานะของแข็งเพื่อความสะดวกในการเก็บรักษาตลอดจนความคงตัวและสามารถสกัดกลับมาเป็นเบสได้เมื่อต้องการ ผู้วิจัยได้ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์และบันทึกข้อมูลทางกายภาพของมิตราไจนีนพิกเรตเพื่อการใช้ประโยชน์ต่อไป เนื่องจากยังไม่เคยมีรายงานข้อมูลเหล่านี้มาก่อน

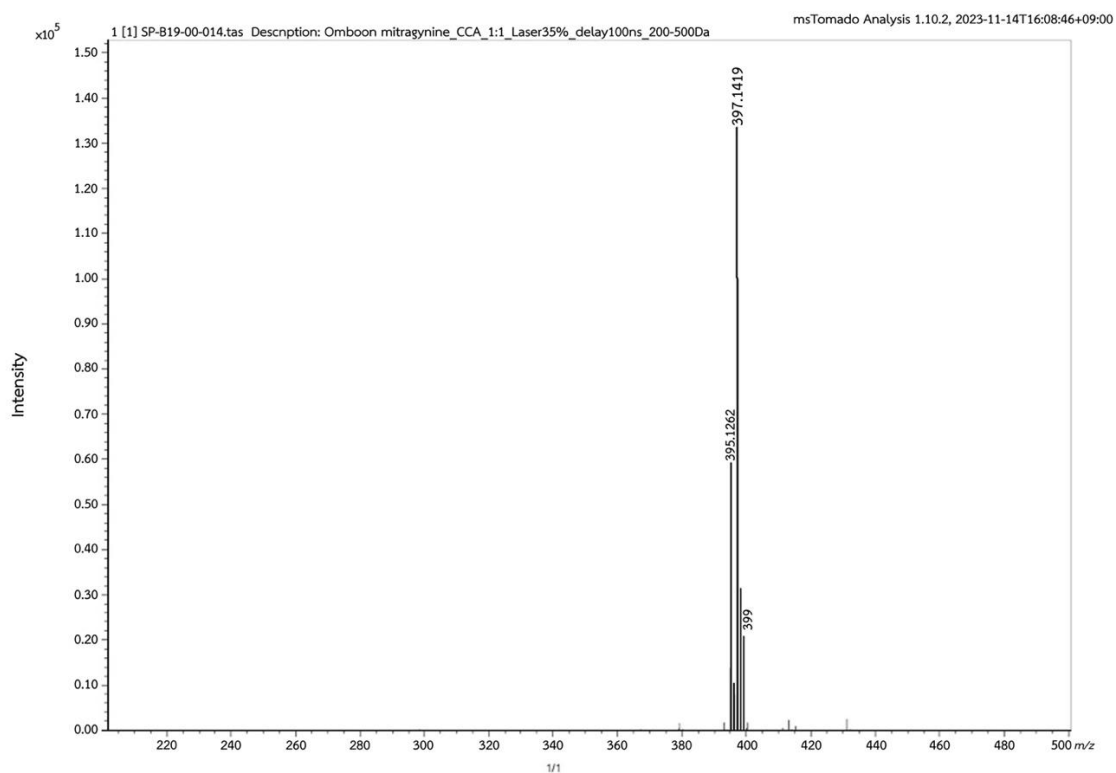


Figure 10 MALDI-TOF MS spectra of mitragynine picrate showing parent ion of mitragynine at m/z 399

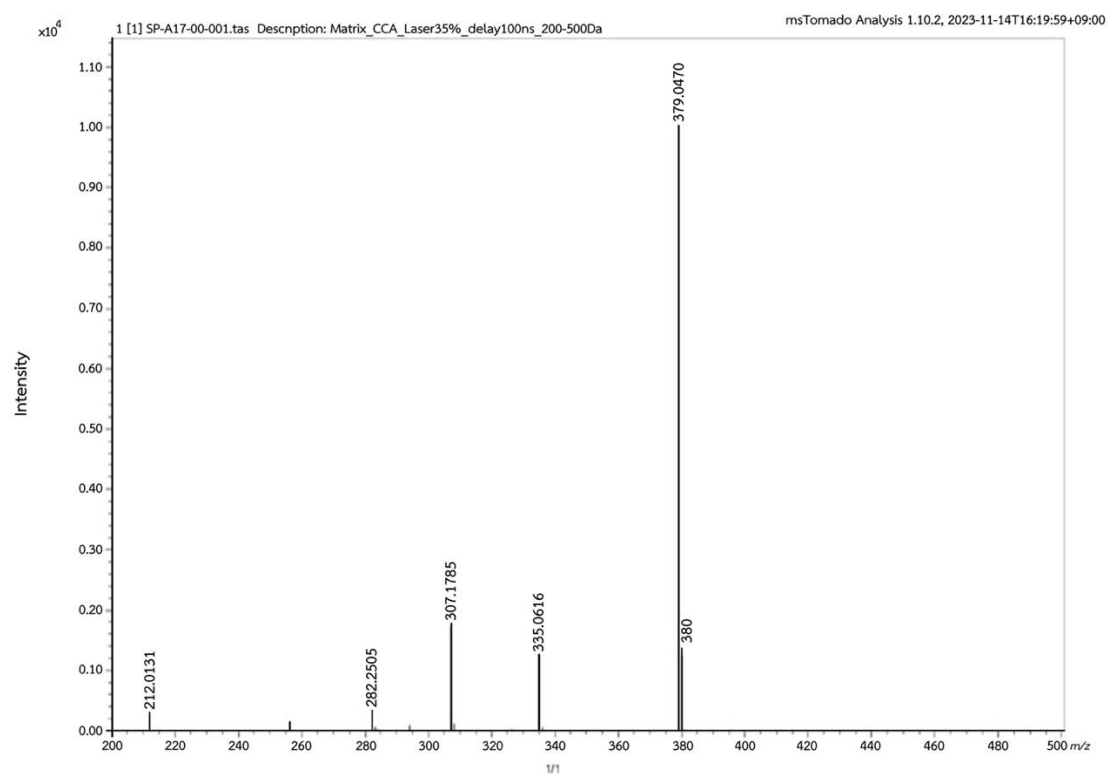


Figure 11 MALDI-TOF MS spectra under SpiralTOF™ of mitragynine picrate showing the mass pattern of mitragynine part

5. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้เขียนขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ในความอนุเคราะห์การใช้เครื่องรณเลขผิวบางสมรรถนะสูง และภาควิชาแพทย์แผนไทย คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยาในความอนุเคราะห์การใช้เครื่องมือและสถานที่ งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

6. References

- [1] Mat, N.H. and et al. 2023. Analgesic effects of main indole alkaloid of kratom, mitragynine in acute pain animal model. **Behavioural Brain Research**. 439: 114251.
- [2] Thai PBS. 2021. **Fatigue and Aches from WFH Can Be Cured with Kratom Leaves**. <https://news.thaipbs.or.th/content/307253>. Accessed 12 November 2024 (in Thai)
- [3] Insuan, W. and et al. 2024. Effect of extraction methods on total phenolic content, antioxidant activity and antibacterial activity of ethanolic leaf extracts of kratom (*Mitragyna speciosa*). **Journal of Science and Technology, Ubon Ratchathani University**. 26(1): 34-41. (in Thai)
- [4] Nakaphand, T. and et al. 2021. Traditional use of kratom (*Mitragyna speciosa* Korth) among folk healers in southern Thailand. **Journal of Thai Traditional & Alternative Medicine**. 14(3): 274-285. (in Thai)
- [5] Keawpradub, N. 2021. **Kratom leaves: Medicinal Properties, Benefits and Disadvantages**. <https://kratom.sci.psu.ac.th/knowledge/pharmacy/4308/>. Accessed 20 September 2024. (in Thai)
- [6] Thongchin, T. and et al. 2024. The evaluation of chemical and physico-chemical Properties of *Mitragyna speciosa* (Korth.) Havil. leaves. **Journal of Thai Traditional & Alternative Medicine**. 22(1), 80-93. (in Thai)
- [7] De-eknamkul, W. 2021. **Evaluation of Herbal Drugs, Raw Materials and Extracts by HPTLC Technique**. Bangkok: Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University. (in Thai)
- [8] Boffa, L. and et al. 2018. Alkaloid profiles and activity in different *Mitragyna speciosa* strains. **Natural Product Communications**. 13(9): 1111-1116.
- [9] Still, W.C., Kahn, M. and Mitra, A. 1978. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. **Journal of Organic Chemistry**. 43(14): 2923-2925.
- [10] Luanratana, O. 1982. **Phytochemical Investigations within the Genus *Duboisia***. Ph.D. Thesis, University of Queensland.
- [11] Akkachayo, K. 2022. **The Fascination of Kratom in Thai Herbal Formula. Thai Medicinal Plants Learning Center of Folk Healers - Moh Porn, Keereewong Temple**. Chumphon: Chumphon Province Press. (in Thai)
- [12] Beng, G.T. and et al. 2011. A simple and cost effective isolation and purification protocol of mitragynine from *Mitragyna speciosa* korth (ketum) leaves. **Malaysian Journal of Analytical Sciences**. 15(1): 54-60.
- [13] Wang, M. and et al. 2014. Comparison of three chromatographic techniques for the detection of mitragynine and other indole and oxindole alkaloids in *Mitragyna speciosa* (kratom) plants: Liquid Chromatography. **Journal of Separation Science**. 37(12): 1411-1418.
- [14] Ali, Z., Demiray, H. and Khan, I.A. 2014. Isolation, characterization, and NMR spectroscopic data of indole and oxindole alkaloids from *Mitragyna speciosa*. **Tetrahedron Letters**. 55(2): 369-372.
- [15] Wungsintaweekul, J. 2021. **Kratom**. <https://kratom.sci.psu.ac.th/knowledge/interdisciplinary/3197/>. Accessed 10 November 2024. (in Thai)

- [16] Shamima, A.R. and et al. 2012. Antinociceptive action of isolated mitragynine from *Mitragyna Speciosa* through activation of opioid receptor system. **International Journal of Molecular Sciences**. 13(9): 11427-11442.
- [17] Liu, X. 2021. **Organic Chemistry I**. Surrey: Kwantlen Polytechnic University.
- [18] Prasad, K.D. and Row, T.N.G. 2014. N-Alkyl derivative of 1,9-pyrazoloanthrone as a sensor for picric acid. **RSC Advances**. 4(85): 45306-45310.
- [19] Dinar, K., Kadri, M. and Seridi, A. 2023. Charge transfer complex of N-(4-methoxyphenyl)-2-oxooxazolidine-3-sulfonamide and picric acid: experimental and DFT studies. **Malaysian Journal of Chemistry**. 25(1): 30-46.
- [20] Meddour, A. and Azizi, A. 2017. Synthesis and spectral investigations of pyridinium picrate. **Journal of Molecular Structure**. 1128: 499-506.
- [21] Uma Devi, T. and et al. 2009. Studies on L-valinium picrate single crystal: a promising NLO crystal. **Journal of Minerals and Materials Characterization and Engineering**. 8(4): 393-403.
- [22] Sakamoto, J., Kitajima, M. and Ishikawa, H. 2022. Asymmetric total syntheses of mitragynine, speciogynine, and 7-hydroxymitragynine. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. 70(9): 662-668.
- [23] Li, L. 2009. **MALDI Mass Spectrometry for Synthetic Polymer Analysis**. Hoboken: John Wiley & Sons Inc.
- [24] National Center for Biotechnology Information. 2024. **PubChem Compound Summary for CID 3034396, Mitragynine**. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Mitragynine>. Accessed 12 November 2024.
- [25] National Center for Biotechnology Information. 2024. **PubChem Compound Summary for CID 6954, Picric Acid**. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Picric-Acid>. Accessed 12 November 2024.
- [26] The National Institute of Standards and Technology. 2024. **Picric Acid**. <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C88891&Mask=200>. Accessed 12 November 2024.
- [27] National Center for Biotechnology Information. 2024. **PubChem Compound Summary for CID 3032504, Mitragynine picrate**. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Mitragynine-picrate>. Accessed 12 November 2024.