

การวิเคราะห์หาองค์ประกอบสำคัญเชิงเคมีในสารสกัด จากใบพลูสู่การผลิตระดับอุตสาหกรรม

Chemical Analysis of Major Components in *Piper betle* L. Extraction for industrial Process

นิรมล สิงห์ทองรัตน์, สุมนทา วัฒนสินธุ์ และจिरดา สิงขรรัตน์*

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Niramol Singtongrat, Sumonta Wattanasin and Jirada Singkhonrat*

Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,
Rangsit Centre, Klong Nueng, Klong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

วิธีการวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ได้ถูกพัฒนาขึ้นและตรวจสอบความใช้ได้สำหรับการวิเคราะห์ทางปริมาณของอัลลิไพโรแคทีคอล (APC) 1 และยูจีนอล 2 ในสารสกัดของพลู งานวิจัยนี้ศึกษาผลการสกัดด้วยเทคนิคของไหลวิกฤตยิ่งยวดยิ่งต่อคุณภาพของสารสกัดจากใบพลู กระบวนการสกัดที่ใช้ตัวทำละลายต่างชนิด เพื่อสกัดใบพลูแห้งจะนำมาซึ่งความสามารถในการสกัดองค์ประกอบในอัตราส่วนที่ต่างกันของสารสำคัญในสมุนไพร โดยผลกระทบของตัวทำละลายต่อคุณภาพของสารสกัดใบพลูนี้ถูกศึกษาโดยวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของสารสำคัญหลักที่ถูพบในสารสกัด ได้แก่ APC 1 และยูจีนอล 2 ปัจจัยที่ชักนำสำหรับการสกัดสารสำคัญหลักเหล่านี้ศึกษาได้จาก HPLC ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าปริมาณของยูจีนอล 2 เพิ่มขึ้นตามสภาพขั้วที่สูงขึ้นของตัวทำละลาย แต่ขณะเดียวกันปริมาณของสารที่ไม่ต้องการก็เพิ่มขึ้นด้วย การสกัดซ้ำแสดงให้เห็นว่าปริมาณของสารสำคัญเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 40.6 เป็นร้อยละ 55 โดยมวลและจากร้อยละ 10.7 เป็นร้อยละ 45.5 โดยมวลสำหรับ APC 1 และยูจีนอล 2 ตามลำดับ

คำสำคัญ : พลู, อัลลิไพโรแคทีคอล, ยูจีนอล, เทคนิคของไหลวิกฤตยิ่งยวด, การตรวจสอบความใช้ได้

Abstract

A high performance liquid chromatographic (HPLC) method was developed and validated for quantitative determination of allcypyrocatechol, APC 1 and eugenol 2 in extracts of *Piper betle* (L.). This work studied the effects of supercritical fluid extraction (SFE) on quality of betel-leaf extracts (*Piper betle* L.). As the extraction, applied different solvents on the dried-leaves, this might lead to

the ability to extract different composition of valuable phytochemicals in the herbs. The effect of solvent on the quality of leaf extract was studied by analyzing the change of major phytochemicals found in the extracts, which are APC 1 and eugenol 2. The influencing factors for the extraction of these major compounds based on HPLC were investigated. The results indicated that the content of eugenol 2 increased with the polarity of the solvent but more impurity also increased. Partition showed that the content of major compounds increased from 40.6 % w/w to 55 % w/w and 10.7 % w/w to 45.5 % w/w for APC 1 and eugenol 2, respectively.

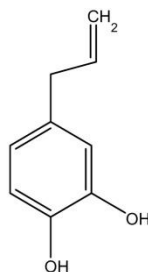
Keywords: *Piper betle* L., allylpyrocatechol, eugenol, supercritical fluid extraction (SFE), method validation

1. คำนำ

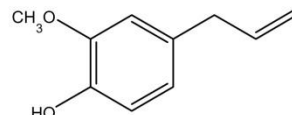
พลู (*Piper betle* L.) เป็นสมุนไพรของไทยที่มีความสำคัญทางการค้า เพื่อการส่งออก เนื่องจากพลูสามารถใช้ประโยชน์ได้มากมาย ทั้งด้านการแพทย์ การเกษตร และอุตสาหกรรมพลู เป็นพืชในวงศ์ Piperaceae สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพภูมิอากาศเขตร้อนชื้นของเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ลำต้นมีลักษณะเป็นไม้เถา เลื้อยพันตามต้นไม้อื่น มีใบเป็นใบเดี่ยวรูปหัวใจ ใบสีเขียวเหลืองถึงเขียวเข้ม เนื้อใบหนาเป็นมัน มีรสเผ็ดและกลิ่นหอมเฉพาะตัว มีดอกสีขาว ออกเป็นช่อแน่นบนแกนยาวคล้ายพริกไทย ประชากรแถบอินเดียหรือจีนนิยมบริโภคใบพลู เพราะมีฤทธิ์ทำให้ปากสดชื่น งานวิจัยของ Ramji และคณะ (2002) พบว่าใบพลูสามารถระงับกลิ่นปาก ป้องกันฟันผุ รักษาแผลทางเดินอาหาร และกระตุ้นเอนไซม์ไลเปสในตับอ่อน นอกจากนี้ยังใช้รักษาอาการผื่นคันจากลมพิษ ใช้เป็นยาถ่ายพยาธิ และยาระบายแก้ท้องผูก

Vila และคณะ (2001) พบว่าในสารสกัดจากใบพลูมีสารอัลลิวัลลิไพโรแคทีคอล (APC) 1 (รูปที่ 1) ซึ่งมีศักยภาพในการป้องกันกลิ่นปากที่เกิดจากการย่อยสลายโปรตีนของจุลินทรีย์ จึงได้นำ APC 1 มาทดแทนผลิตภัณฑ์สังเคราะห์จำพวกสารประกอบกำมะถันระเหย (volatile sulfur compound, VSC) ได้แก่ เมอร์แคปแทน (methyl-

mercaptan) ไฮโดรเจนซัลไฟด์ (hydrogen sulfide) และกรดไขมันระเหย (volatile fatty acids) เช่น butyric acid และ propionic acid



1



2

รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของสารอัลลิวัลไพโรแคทีคอล (APC) 1 (1) หรือ hydroxychavicol (HC) และยูจีนอล (2)

มีรายงานวิจัยที่พบคุณสมบัติทางชีวภาพของใบพลูอีกมาก เช่น สามารถต้านออกซิเดชัน (Bhattacharya *et al.*, 2005) ป้องกันรังสี (Dubey *et al.*, 1987) รักษาเบาหวาน (Bandyopadhyay *et al.*, 2011) ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Bandyopadhyay *et al.*, 2011) โดยสารที่สำคัญคือ APC 1 มีศักยภาพในการรักษาโรคเก๊าท์ (Murata *et al.*, 2009) ป้องกันโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดโดยมีฤทธิ์ต้าน

การอักเสบและการเกิดเกล็ดเลือด (Jeng *et al.*, 2007) ต้านเชื้อรา (Ali *et al.*, 2010) และสามารถทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวโดยไม่มีผลต่อเซลล์อื่น (Bandyopadhyay *et al.*, 2011) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากใบพลูด้วยเมทานอลสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อมาเลเรียได้ (Adhroey *et al.*, 2001)

การสกัดสารสำคัญจากใบพลูมีเทคนิคที่สามารถประยุกต์ใช้เพื่อผลิตในระดับอุตสาหกรรมหลายวิธี เช่น วิธีสกัด hydro-distillation จากใบพลูสด แล้ววิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี (GC-MS) ได้ 5-(2-propenyl)-1,3-benzodioxole 7 ร้อยละ 18.27 โดยมวล (Sugumaran *et al.*, 2011) วิธีสกัดด้วยการต้มใบสดในน้ำ แล้ววิเคราะห์หาปริมาณ

สารสำคัญด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ได้ APC 1 ร้อยละ 5 โดยมวล (Anjali *et al.*, 2010) วิธีสกัดด้วยเมทานอลจากใบพลูแห้ง แล้ววิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญด้วยคอลัมน์ โครมาโทกราฟี ได้ APC 1 ร้อยละ 0.9 โดยมวล และยูจีนอล 2 ร้อยละ 0.16 โดยมวล (Sarkar *et al.*, 2008) และวิธีสกัดด้วยแอลกอฮอล์จากใบพลูแห้ง แล้ววิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ได้ APC 1 ร้อยละ 54.4 โดยมวล (Bandyopadhyay *et al.*, 2011) (ตารางที่ 1) ข้อควรระวังคือหลีกเลี่ยงการสัมผัสกับความร้อน เพราะมีผลต่อการออกฤทธิ์ของสารสำคัญ

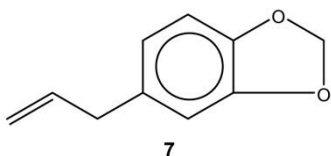
ตารางที่ 1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการสกัดสารจากใบพลู

เทคนิคสกัด (เทคนิควิเคราะห์)	วัตถุดิบที่ใช้	ปริมาณสารสำคัญที่พบ (% w/w)	เอกสารอ้างอิง
Hydro-distillation (GC-MS)	ใบพลูสด	5-(2-Propenyl)-1,3-benzodioxole 7 (18.27)	Sugumaran <i>et al.</i> (2011)
extracted in boiling water (HPLC)	ใบพลูสด	APC 1 (5.0)	Pandey <i>et al.</i> (2010)
Alcoholic extract (HPLC)	ใบพลูแห้ง	APC 1 (54.4)	Bandyopadhyay <i>et al.</i> (2011)
Ethanol extract + chromatography (HPLC)	ใบพลูแห้ง	APC 1 (0.9), Eugenol 2 (0.16)	Sarkar <i>et al.</i> (2008)

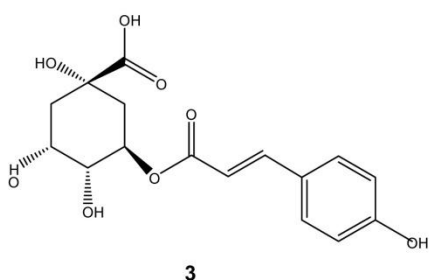
งานวิจัยครั้งนี้จึงสกัดสารจากใบพลูแห้ง โดยศึกษา APC 1 และยูจีนอล 2 วิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง และพัฒนาวิธีการตรวจความใช้ได้ในการควบคุมคุณภาพ เพราะเทคนิควิเคราะห์ที่ใช้ได้เป็นส่วนสำคัญต่อการขึ้นทะเบียนยาใหม่ นอกจากมาตรการ

ทางกฎระเบียบแล้ว วิธีการทดสอบที่ดีและเชื่อถือได้มีความจำเป็นต่อการควบคุมคุณภาพของยาและสารออกฤทธิ์สำคัญ ดังนั้นการศึกษาความใช้ได้จึงเป็นส่วนที่สำคัญเพื่อคุณภาพ ความปลอดภัย และประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์สำคัญ โดยใบพลูประกอบด้วยสารประกอบฟีนอล ซึ่งมีฤทธิ์ต่อต้าน

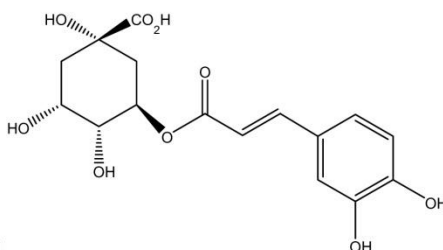
ออกซิเดชัน โดยสารสำคัญที่พบมาก ได้แก่ APC 1 และยูคีนอล 2 นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าพบ *cis-p-coumaryl quinic acid cis-3*, *trans-p-coumaryl quinic acid trans-3* และ *chlorogenic acid* 4 (รูปที่ 2) ในปริมาณเล็กน้อยอีกด้วย (Bandyopadhyay *et al.*, 2011)



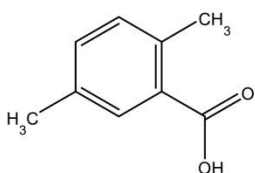
รูปที่ 3 สูตรโครงสร้างของสาร 5-(2-Propenyl)-1,3-benzodioxole



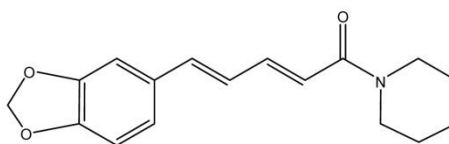
3



4



5



6

รูปที่ 2 สูตรโครงสร้างของสาร *p-coumaryl quinic acid* (3), *chlorogenic acid* (4), *2,5 dimethylbenzoic acid* 5 (5) และ *piperine* (6)

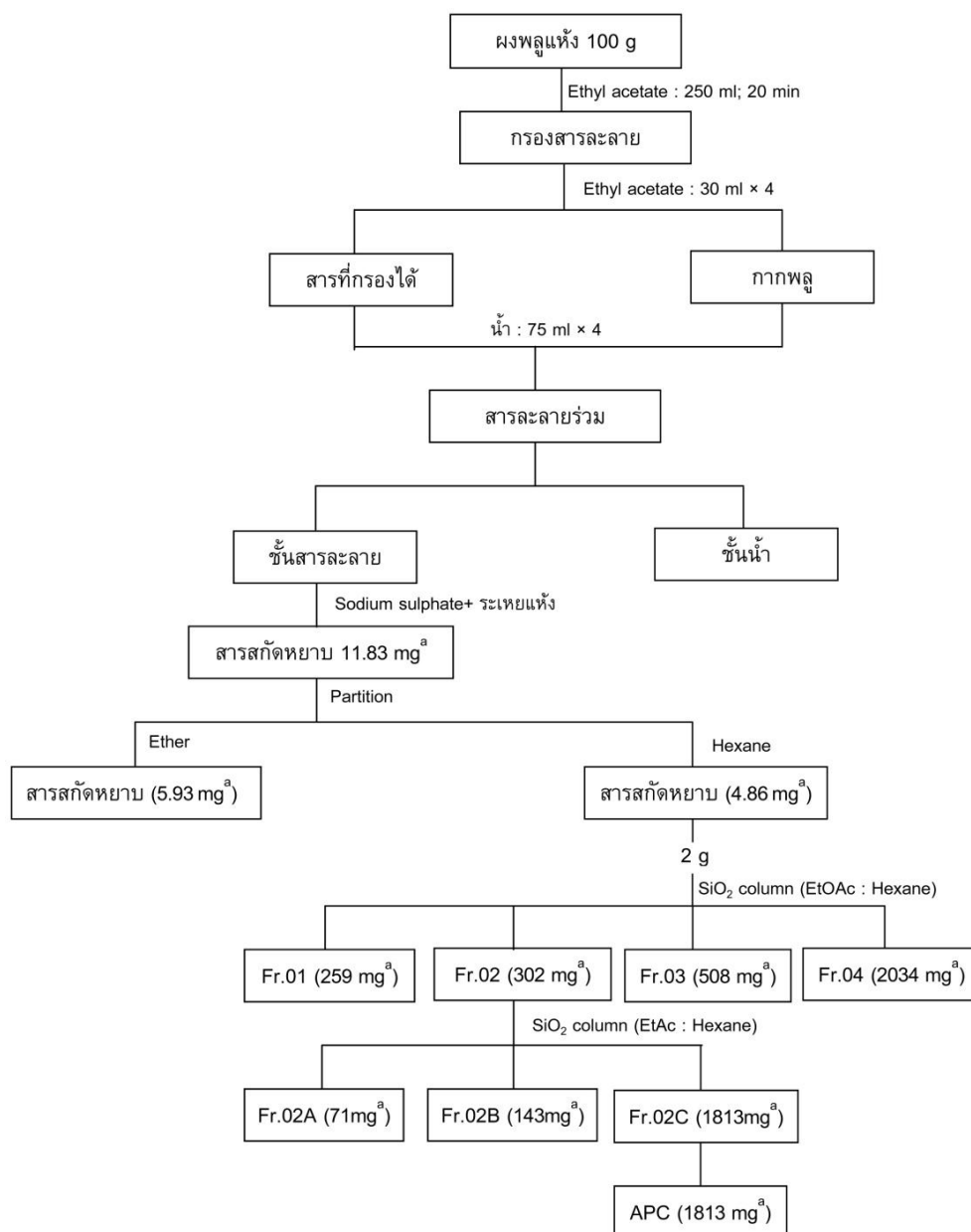
2. วัสดุอุปกรณ์

ใบพลู (*P. betle* L.) เก็บในช่วงเดือนตุลาคม ปี พ.ศ. 2553 ที่จังหวัดปทุมธานี เครื่องอบ (ยี่ห้อ EUREKA) เครื่องบดละเอียด (ยี่ห้อ Mill Machine, Model PM1) เครื่องระเหยสารละลาย (rotary

evaporator ยี่ห้อ Buchi รุ่น Rotavapor RII) เครื่องของไหลวิกฤตยิ่งยวด (supercritical fluid extraction, SFE) รุ่น 24L-SFE เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น 20AT สารมาตรฐานที่ใช้ศึกษา 98 % กรด 2,5-ไดเมทิลเบนโซอิก (2,5-DMA) 5 เป็นสารเทียบแทนหากเทคนิคของไหลวิกฤตยิ่งยวด (supercritical fluid extraction, SFE) สามารถสกัดกรดเหล่านี้ได้ ทั้งนี้พืชตระกูล Piperaceae พบสารสำคัญในกลุ่ม piperamides ด้วย ในงานวิจัยนี้จึงใช้พิเพอริน 6 (รูปที่ 3) เป็นสารเทียบแทนหากสามารถพบสารกลุ่มนี้ในงานครั้งนี้ด้วย งานวิจัยนี้สนใจศึกษาการสกัดสารสำคัญในใบพลู โดยศึกษาวิธีการสกัดด้วยเทคนิคของไหลวิกฤตยิ่งยวด เพื่อทดสอบคุณภาพทางเคมีด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง และพิสูจน์โครงสร้างของสารแยกบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (NMR)

เบนโซอิก (2,5-DMA) 5 ยี่ห้อ Acros Organics 95 % ยูจีนอล 2 และ 97 % ฟิเพอริน 6 (ยี่ห้อ Aldrich chemistry) อัลลิไพโรแคทีซอล (APC) 1 แยกบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (รูปที่ 4) ตัวทำละลายที่ใช้ศึกษา ได้แก่ ไดเอทิลอีเทอร์ (AR grade

ยี่ห้อ Merck KGaA) เมทานอล (HPLC grade ยี่ห้อ Merck KGaA) เอทิลอะซิเตด (RCI Labscan commercial grade กลั่นก่อนใช้) โซเดียมซัลเฟต (Ajex finechem Pty Ltd.) Deionized water (DI)



รูปที่ 4 การสกัดใบพื้ด้วยเทคนิคเอทิลอะซิเตด (Mula *et al.*, 2008) และทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ไดอัลลิไพโรแคทีซอล (APC) 1 (Ramji *et al.*, 2002) a : น้ำหนักสารสกัด (mg)

3. วิธีการวิจัย

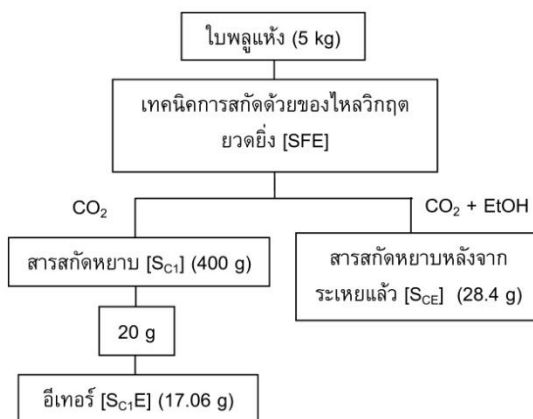
3.1 ใบพลู

นำตัวอย่างใบพลูสดที่มีลักษณะใบสีเขียวแก่มาล้างให้สะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วอบให้แห้งด้วยเครื่องอบ โดยควบคุมที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ได้นำหนักคิดเป็นร้อยละ 10 ของใบพลูที่เหลือจากการอบแห้ง จากนั้นนำตัวอย่างใบพลูไปบดให้เป็นผงละเอียดด้วยเครื่องบดละเอียด

3.2 การสกัดสารสำคัญจากใบพลู

การสกัดด้วยเทคนิคของไหลวิกฤตยวดยิ่ง (supercritical fluid extraction, SFE) (รูปที่ 5) สกัดที่สถาบันการแพทย์แผนไทย กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข และอุทยานวิทยาศาสตร์ (สวทช.) การสกัดได้สารสกัดหยาบ 2 ส่วน ส่วนที่ 1 (สารสกัดหยาบ [S_{C1}]) สภาวะในการสกัดใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นตัวทำละลายเดี่ยว สกัดที่ความดัน 8 MPa และอุณหภูมิที่ 60°C ส่วนที่ 2 (สารสกัดหยาบ [S_{CE1}]) สกัดโดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์และเอทานอลเป็นตัวทำละลายร่วม ความดันที่ 5 MPa และอุณหภูมิที่ 60°C นำสารสกัดที่ได้ไประเหยเอาเอทานอลออกทิ้งไว้ในแห้งแล้วชั่งน้ำหนักหาปริมาณสารสกัดหยาบ นำสารสกัดหยาบ [S_{C1}] ข้างต้นมาทำการสกัดซ้ำด้วยไดเอทิล-อีเทอร์ จะได้ [S_{C1E}] ดังแสดงในแผนผังที่ 2 แสดงตัวอย่างการสกัดใบพลู

สำหรับการสกัดด้วยเทคนิคของไหลวิกฤตยวดยิ่ง ได้ทำการสกัด 2 ครั้ง ครั้งที่ 1 ได้สารสกัดหยาบ [S_{C1}] และ [S_{CE1}] ครั้งที่ 2 ได้สารสกัดหยาบ [S_{C2}] และ [S_{CE2}] งานวิจัยนี้ได้รายการผลการสกัดทั้ง 2 ครั้ง โดยนำสารสกัดหยาบ [S_{C1}], [S_{CE1}] และ [S_{C2}] มาศึกษาหาปริมาณสารสำคัญ นอกจากนี้ยังศึกษาหาปริมาณสารสำคัญของสารสกัดหยาบที่ผ่านการสกัดซ้ำ [S_{C1E}] อีกด้วย (สกัดซ้ำ n = 3)



รูปที่ 5 ตัวอย่างการสกัดใบพลูแห้งด้วยเทคนิคการสกัดด้วยของไหลวิกฤตยวดยิ่ง (supercritical fluid extraction, SFE) ครั้ง 1

3.3 การตรวจสอบความใช้ได้ (method validation)

3.3.1 ค่าความเป็นเส้นตรง (linearity) สร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ของกรด 2,5-ไดเมทิลเบนโซอิก (2,5-DMA) 5 อัลลิไพโรแคทีซอล (APC) 1 ยูจีนอล 2 และฟิเพอรีน 6 โดยตรวจสอบด้วยวิธี external standard เตรียมสารละลาย stock standard ที่ความเข้มข้น 1,000 ppm ละลายสารมาตรฐานแต่ละชนิดด้วยตัวทำละลายเมทานอลที่ความเข้มข้นของกรด 2,5-ไดเมทิลเบนโซอิก (2,5-DMA) 5 เป็น 30, 40 และ 50 และ APC 1 และยูจีนอล 2 มีความเข้มข้นเป็น 30, 40, 50, 60, 80 และ 100 ppm ส่วนฟิเพอรีน 6 มีความเข้มข้นเป็น 30, 40, 50, 60 และ 80 ppm แล้วศึกษาค่าความเป็นเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นต่อพื้นที่ใต้พีค (peak area) ของสารมาตรฐานแต่ละชนิด

3.3.2 ค่าความแม่นยำ (precision) ศึกษาความแม่นยำของเครื่องมือวิเคราะห์ (repeatability) และค่าความแม่นยำของผู้วิเคราะห์ (reproducibility) โดยวิเคราะห์ 10 ซ้ำ ที่ความ

เข้มข้น 40 ppm ของกรด 2,5-ไดเมทิลเบนโซอิก (2,5-DMA) 5 APC 1 ยูกีนอล 2 และพิเพอริน 6 ประเมินเป็น relative standard deviation (% RSD)

3.3.3 การหาขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ (limit of detection and quantification) ขีดจำกัดต่ำสุดของการทดสอบเชิงคุณภาพ (LOD) และขีดจำกัดต่ำสุดของการทดสอบเชิงปริมาณ (LOQ) โดยตรวจสอบจากค่าของกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานกรด 2,5-ไดเมทิลเบนโซอิก (2,5-DMA) 5 APC 1 ยูกีนอล 2 และพิเพอริน 6 ซึ่ง LOD ให้สัญญาณเป็น 3 เท่า ของสัญญาณ noise (S/N) และ LOQ ให้สัญญาณเป็น 10 เท่าของสัญญาณ noise (S/N)

3.4 การวิเคราะห์สารสำคัญในใบพลู

สารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยเทคนิคของไหลวิกฤตยวดยิ่งนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น 20AT โดยวิเคราะห์แบบ isocratic ใช้ injection value loop ที่ 20 μ l และจับสัญญาณด้วยยูวี-วิส ดีเทคเตอร์ (UV-Vis detector) รุ่น SPD-20A สภาวะในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญใช้เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ในอัตราส่วนของเมทานอล : น้ำ (70:30) อัตราการไหล (flow rate) ที่ 0.7 ml/min ปริมาณสารที่ใช้ฉีดตัวอย่างที่ 20 μ l เวลาในการวิเคราะห์ที่ 15 นาที และใช้คอลัมน์ RP-C18 ยี่ห้อ HPLC Column Thermo Scientific Hypersil GOLD ขนาด 5 μ m 4.6 x 250 mm สารมาตรฐานที่ใช้ ได้แก่ กรด 2,5-ไดเมทิลเบนโซอิก (2,5-DMA) 5 APC 1 ยูกีนอล 2 และพิเพอริน 6 โดย APC 1 ได้จากการแยกจากวิธีการสกัดใบพลูด้วยสารละลายเอทิลอะซิเตตและทำการสกัดซ้ำ ๆ ด้วยเฮกเซน (รูปที่ 4) หลังจากผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟี จะได้สารสกัดมีลักษณะของสารเป็นของเหลวคล้ายน้ำมัน สีเหลืองอ่อนใส มี

น้ำหนัก 400 mg ซึ่งผลของ ^1H NMR คาดว่าเป็น APC 1 (CDCl_3 , 400 MHz), δ (ppm): 3.24 (2H, dd, $J = 6.5$, 1'-H) 5.05 (2H, dd, 3'-H) 5.95 (2H, broad s, 3-OH, 4-OH), 6.71 (1H, d, 6-H), 6.75 (1H, m, H-1') 6.9 (1H, dd, H-4,5) $R_f = 0.43$ ในตัวทำละลาย 35 % เอทิลอะซิเตตในเฮกเซน

4. ผลการวิจัย

4.1 การสกัดด้วยเทคนิคของไหลวิกฤตยวดยิ่ง

ได้สารสกัดหยาบเป็น $[\text{S}_{\text{C}_1}]$ น้ำหนัก 400 g และ $[\text{S}_{\text{CE}}]$ (หลังจากนำไประเหยสารละลาย) ออกได้น้ำหนัก 28.40 g จากน้ำหนักเริ่มต้น ลักษณะของสารสกัดทั้ง 2 คือของเหลวหนืดสีเขียวน้ำตาลเข้ม เมื่อนำสารสกัดหยาบ $[\text{S}_{\text{C}_1}]$ น้ำหนัก 20 g มาสกัดซ้ำ (partition) ด้วยอีเทอร์ จะได้สารสกัด $[\text{S}_{\text{C}_1}\text{E}]$ มีน้ำหนักเท่ากับ 17.06 g ลักษณะของสารเป็นของเหลวหนืดสีเขียวเข้ม

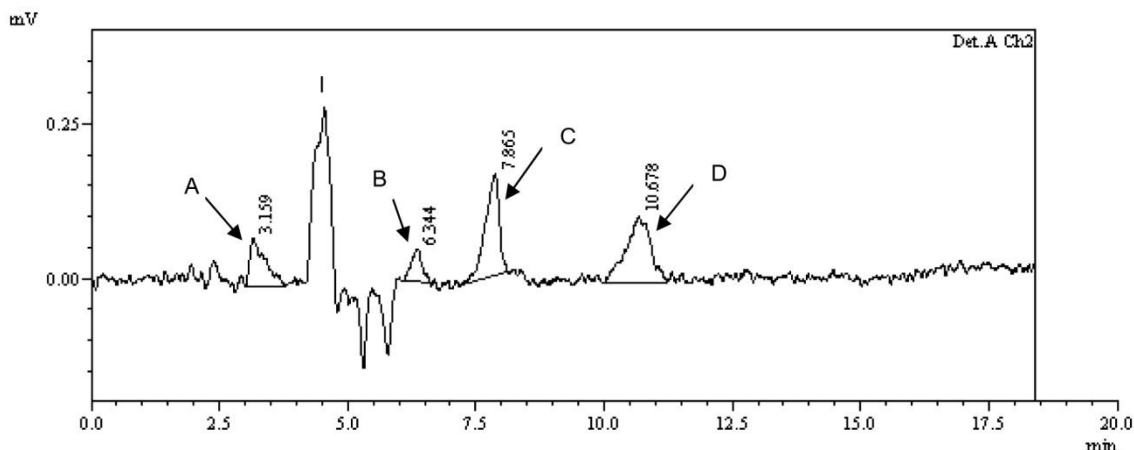
4.2 ผลการตรวจสอบความใช้ได้

ในการทดลองครั้งนี้มีการศึกษา % RSD ของ retention time และ peak area ของสารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ กรด 2,5-ไดเมทิลเบนโซอิก (2,5-DMA) 5 APC 1 ยูกีนอล 2 และพิเพอริน 6 โดยศึกษาในวันเดียวกัน (Inter-day) ศึกษา % recovery ของการสกัดใบพลูมีความแตกต่างกันของแต่ละตัวอย่างที่ทำการฉีดสารสกัดตัวอย่างใบพลูที่ความเข้มข้น 1 ml/10 ml ในสารละลาย methanol และ spike สารมาตรฐานมีความเข้มข้น 50 μ g/ml ของกรด 2,5-ไดเมทิลเบนโซอิก (2,5-DMA) 5 APC 1 ยูกีนอล 2 และพิเพอริน 6 นอกจากนี้ได้ศึกษา limit of detection (LOD) (รูปที่ 6) ได้ศึกษาอัตราส่วนของ signal ที่เป็น 3 เท่าของสัญญาณ noise และ limit of quantification (LOQ) (รูปที่ 7) ได้ศึกษาอัตราส่วน

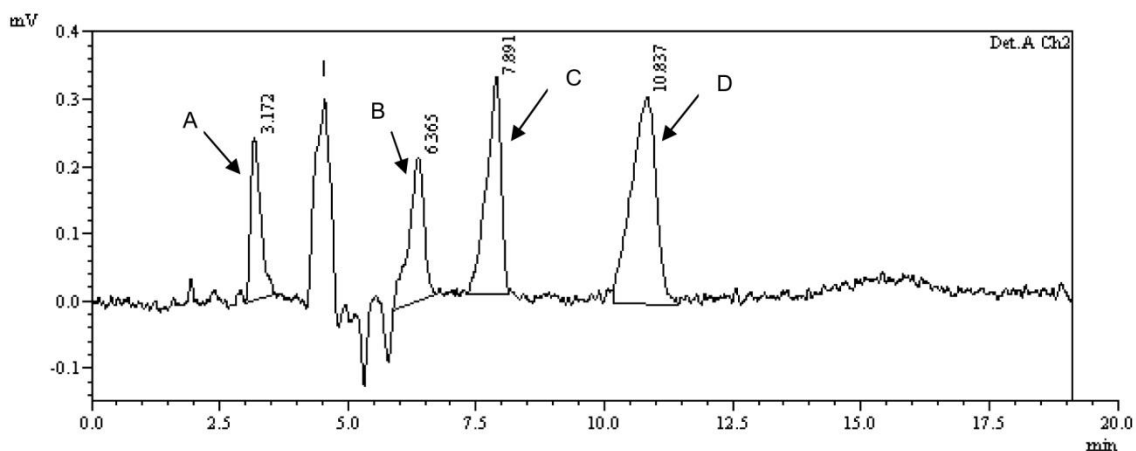
ของ signal ที่เป็น 10 เท่า ของสัญญาณ noise ดังแสดงในตารางที่ 2

ผลการวิเคราะห์สารสำคัญที่สกัดจากเทคนิคของไหลวิกฤตยวดยิ่งนั้น พบว่าสารสกัด

ตัวอย่าง [S_{C1}], [S_{C2}], [S_{C1E}] และ [S_{CE}] วิเคราะห์พบสารสำคัญอัลลิไพโรแคทีซอล (APC) 1 และยูจีนอล 2 (รูปที่ 8 และ 9) ในสัดส่วนต่าง ๆ ดังตาราง 3



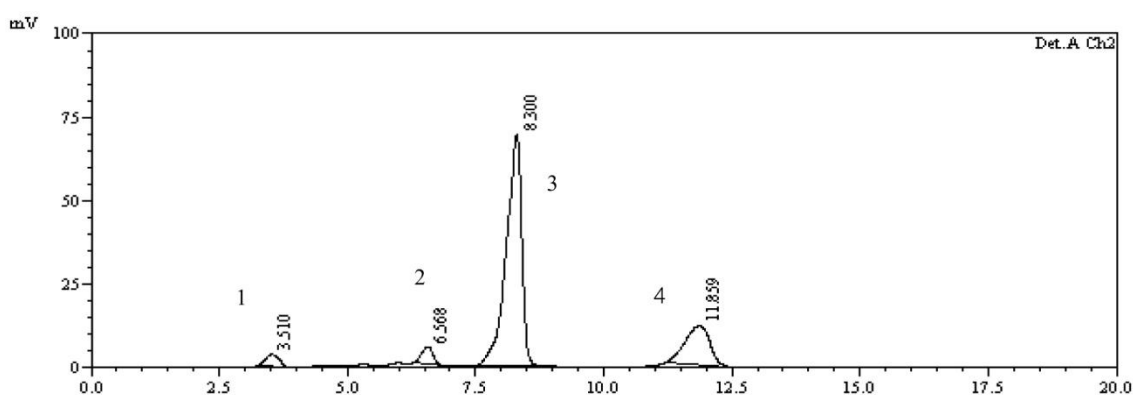
รูปที่ 6 โคโรมาโตแกรม limit of detection (LOD) ของสารมาตรฐานรวม 4 ชนิด ละลายในเมทานอล (A: 2,5-DMA; B: allylpyrocatechol; C: eugenol; D: piperine และ I: Interfere)



รูปที่ 7 โคโรมาโตแกรม limit of quantification (LOQ) ของสารมาตรฐานรวม 4 ชนิด ละลายในเมทานอล (A: 2,5-DMA; B: allylpyrocatechol; C: eugenol; D: piperine และ I: Interfere)

ตารางที่ 2 ผลการตรวจสอบความใช้ได้ (method validation)

Analytical features	2,5-DMA 5	APC 1	Eugenol 2	Piperine 6
Working				
- Range, mg/L	30-60	30-60	30-60	30-60
- Slope	2648	31806	37451	7698
- Intercept	-27259	-25555	-34689	-63272
- R ²	0.9998	0.9994	0.9992	0.9982
Inter-day Precision (% RSD)				
- Repeatability (n=10)				
Peak area	3.17	4.22	1.85	4.13
Retention time	0.52	0.08	0.11	0.15
- Reproducibility (n=10)				
Peak area	7.09	8.92	8.16	7.59
Retention time	1.41	0.28	0.25	0.22
% Recovery				
- Sample 1	100.00	71.66	97.72	89.51
- Sample 2	100.00	55.22	96.91	100.00
LOD, mg/L (3S/N)	0.5	1.0	0.1	0.5
LOQ, mg/L (10S/N)	2.0	2.0	0.2	1.2

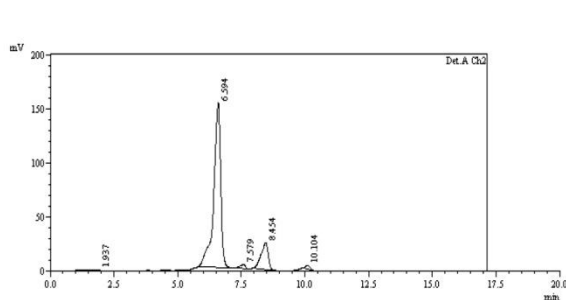
รูปที่ 8 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน 2,5-DMA (1), APC (2), eugenol (3) และ piperine (4) ที่ 280 nm; อัตราการไหล (flow rate) 0.7 ml/min ปริมาณสารที่ฉีดตัวอย่างที่ 20 μ l

ตารางที่ 3 ปริมาณสารสำคัญที่พบต่อน้ำหนักสารตัวอย่าง (% w/w)

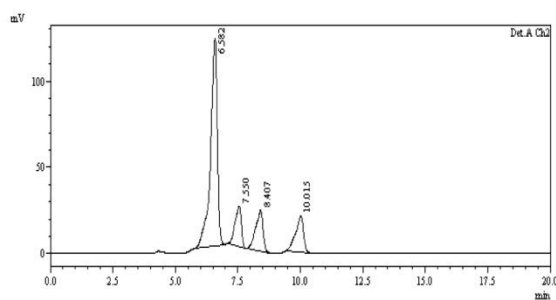
sample	ปริมาณสารที่พบต่อน้ำหนักตัวอย่าง (% w/w)				ลักษณะโดยทั่วไป
	APC 1	% w/w	Eugenol 2	% w/w	
S _{C1} ^a	40.61	40.6	10.74	10.7	เหลว หนืด สีเขียวน้ำตาลเข้ม
S _{C2} ^a	34.49	34.5	19.98	20.0	เหลว หนืด สีเขียวเข้ม
S _{C1E} ^b	55.48	55.5	45.46	45.5	เหลว หนืด สีเขียวน้ำตาลเข้ม
S _{CE} ^a	22.46	22.5	31.53	31.5	เหลว หนืด สีเขียวน้ำตาลเข้ม

^a ปริมาณสารที่พบต่อน้ำหนักตัวอย่างสารสกัด (% w/w)

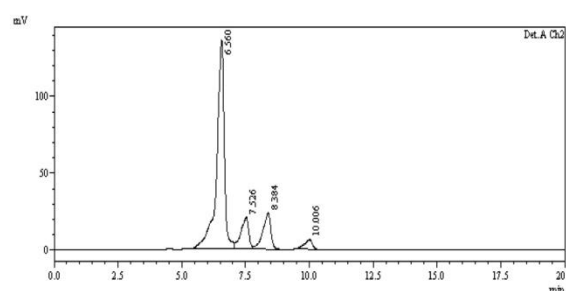
^b ปริมาณสารที่พบต่อน้ำหนักตัวอย่างสารสกัด S_{C1}^a



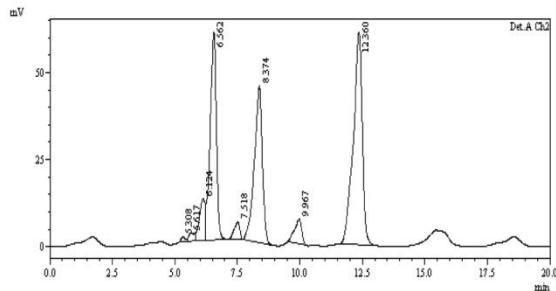
[S_{C1}]



[S_{C2}]



[S_{C1E}]



[S_{CE}]

รูปที่ 9 โครมาโตแกรมของสารสกัด [S_{C1}], [S_{C2}], [S_{C1E}] และ [S_{CE}] ที่ 280 nm; อัตราการไหล (flow rate) 0.7 ml/min ปริมาณสารที่ใช้ฉีดตัวอย่างที่ 20 µl

5. สรุป

5.1 ผลการรายงานตรวจสอบความใช้ได้ (method validation) พบว่าค่าความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง (linearity, R²) ของสารสำคัญกรด 2,5-ไดเมทิลเบนโซอิก (2,5-DMA) 5 อัลลิไพโรแคทีซอล

(APC) 1 ยูจีนอล 2 และ พิเพอริน 6 ได้ R² = 0.9998, 0.9994, 0.9992 และ 0.9982 ตามลำดับ ผลการรายงานค่าความแม่นยำ (precision) ซึ่งวิเคราะห์ความแม่นยำของเครื่องมือ (repeatability) (n = 10) สารสำคัญทั้ง 4 สาร ที่ค่า % RSD ไม่เกิน

5 ถือว่าเป็นค่าที่ยอมรับได้ และความแม่นยำของผู้ทดลอง (reproducibility) ($n = 10$) พบว่า % RSD มีค่าไม่เกิน 10 ถือว่าเป็นค่าที่ยอมรับได้ สำหรับค่าความถูกต้อง (accuracy) ซึ่งรายงานเป็นค่า % recovery พบว่ากรด 2,5-ไดเมทิลเบนโซอิก (2,5-DMA) 5 ยูจีนอล 2 และพิเพอริน 6 ในตัวอย่างสารสกัด [S_{C1}] และ [S_{C1}] มีค่าอยู่ในช่วงที่ดี (90-110 %) สำหรับค่าการหาขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ (LOD) อัตราส่วนของ signal ที่เป็น 3 เท่าของสัญญาณ noise และค่าการหาขีดจำกัดปริมาณต่ำสุดของวิธี (LOQ) ได้ศึกษาอัตราส่วนของ signal ที่เป็น 10 เท่าของสัญญาณ noise พบว่ากรด 2,5-ไดเมทิลเบนโซอิก (2,5-DMA) 5 อัลลิไพโรแคทีคอล (APC) 1 ยูจีนอล 2 และพิเพอริน 6 มีค่าปริมาณต่ำสุดของ noise ที่ 2.0, 2.0, 0.2 และ 1.2 ตามลำดับ

5.2 การสกัดด้วย SFE ได้สารสกัดหยาบ [S_{C1}] เป็นคิดเป็นร้อยละ 8 โดยมวลของผงพริกแห้ง สารสกัดหยาบ [S_{C2}] คิดเป็น 0.57 โดยมวลของผงพริกแห้ง และเมื่อนำสารสกัดหยาบ [S_{C1}] ผ่านการสกัดซ้ำ (partition) ได้อัตราร้อยละ 4.27 ดังนั้นการสกัดเพื่อให้ได้อัลลิไพโรแคทีคอล (APC) 1 ในปริมาณสูงในตัวอย่าง สามารถใช้ SFE แบบคาร์บอนไดออกไซด์เป็นตัวทำละลายเดี่ยว แต่หากต้องการปริมาณของยูจีนอล 2 มากในตัวอย่างต้องใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายร่วม มีข้อเสียคือสารที่ไม่ต้องการก็มีปริมาณสูงขึ้นด้วยและเพิ่มค่าใช้จ่ายจากตัวทำละลาย

5.3 ปริมาณของอัลลิไพโรแคทีคอล (APC) 1 และยูจีนอล 2 จากการสกัด S_{C1} ให้ปริมาณสารสำคัญเพิ่มขึ้นจากการทำการสกัดซ้ำด้วยอีเทอร์ โดยมีปริมาณสารเพิ่มขึ้นเป็น 1.35 และ 4.25 เท่าตามลำดับ

5.4 ใน SFE เป็นเทคนิคที่ไม่สามารถสกัดฟีนอลิกออกมาได้จากใบพริก ดังที่แสดงในสารสกัดตัวอย่างทั้งหมดไม่สามารถพบกรด 2,5-ไดเมทิลเบนโซอิก (2,5-DMA) 5 และพิเพอริน 6 ดังนั้นหากต้องการสารสำคัญจำพวกกรด *cis-p-coumaric* quinic acid, *trans-p-coumaric* quinic acid และ chlorogenic acid ต้องใช้เทคนิคอื่นสำหรับสารกลุ่ม piperamides มีแนวโน้มว่าพบในใบพริก เพราะเทคนิค SFE แบบคาร์บอนไดออกไซด์และเอทานอลเป็นตัวทำละลายร่วมนั้น วิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) แสดงสารที่ retention time ($t = 11.86$) ใกล้เคียงกับพิเพอริน 6 ($t = 12.36$) ซึ่งอยู่ระหว่างการศึกษานี้ต่อไป

6. เอกสารอ้างอิง

- Ali, I., Khan, F.G., Suri, K.A., Gupta, B.D., Satti, N.K., Dutt, P., Afrin, F., Qazi, G.N. and Khan, I.A., 2010. *In vitro* antifungal activity of hydroxychavicol isolated from *Piper betle* L., Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. 9: 1-9.
- Bhattacharya, S., Subramanian, M., Bauri, A. and Kamat, J.P., 2005. Radioprotecting property of the ethanolic extract of the *Piper betel* leaf. J. Rad. Res. 46: 165-171.
- Chakraborty, J.B., Mahato, S.K., Joshi, K., Shinde, V., Rakshit, S., Biswas, N., Choudhury (Mukherjee), I., Mandal, L., Ganguly, D., Chowdhury, A.A., Chaudhuri, J., Paul, K., Pal, B.C., Vinayagam, J., Pal, C., Manna, A., Jaisankar, P., Chaudhuri, U., Konar, A., Roy, S. and Bandyopadhyay, S., 2011. Hydroxychavicol, a *Piper betle*

- leaf component, induces apoptosis of CML cells through mitochondrial reactive oxygen species-dependent JNK and endothelial nitric oxide synthase activation and overrides imatinibresistance. Japanese Cancer Association 103: 88-99.
- Dubey, P., Tripathi, S.C. and Pflanzenkrankh, Z., 1987, Combination of capillary GC, GC/MS and ^{13}C -NMR for the characterization of the rhizome oil of *Piper betle* L. (Piperaceae) from Vietnam, Pflanzenschutz 94: 235.
- Jeng, J.H., Chang, M.C., Tsai, C.Y., Wu, H.L., Lin, B.R., Lee, C.S., Chen, Y.J., Chang, C.H., Tsai, Y.L. and Kao, C.J., 2007, Hydroxychavicol, a novel betel leaf component, inhibits platelet aggregation by suppression of cyclooxygenase, thromboxane production and calcium mobilization, British J. Pharm. 152: 73-82.
- Mula, S., Benerjee, D., Patro, B.S., Bhattacharya, S., Bank, A., Bandyopadhyay, S.K. and Chattopadhyay, S., 2008, Inhibitory property of the Piper betel phenolics against photosensitization-induced biological damages, Bioorg Med. Chem. 16: 2932-2938.
- Murata, K., Nakao, K., Hirata, N., Namba, K., Nomi, T., Kitamura, Y., Moriyama, K., Shintani, T., Iinuma, M. and Matsuda, H., 2009, Hydroxychavicol: A potent xanthine oxidase inhibitor obtained from the leaves of betel, *Piper betle*, J. Nat. Med. 63: 355-359.
- Pandey, A. and Bani, S., 2010, Hydroxychavicol inhibits immune responses to mitigate cognitive dysfunction in rats, J. Neuro-immunol. 226: 48-58.
- Ramji, N., Ramji, N., Iyer, R. and Chandrasekaran, S., 2002, Chandrasekaran, phenolic antibacterials from *Piper betle* in the prevention of halitosis, J. Ethnopharm. 83: 149-152.
- Santos, P.R.D. dos, Moreira, D. de L., Guimaraes, E.F. and Kaplan, M.A.C., 2011, Essential oil analysis of 10 Piperaceae species from the Brazilian Atlantic forest, Phytochemistry 58: 547-551.
- Sarkar, D., Saha, P., Gamre, S., Bhattacharjee, S., Hariharan, C., Ganguly, S., Sen, R., Mandal, G., Chattopadhyay, S., Majumdar, S. and Chatterjee, M., 2008, Anti-inflammatory effect of allylpyrocatechol in LPS-induced macrophages is mediated by suppression of iNOS and COX-2 via the NF- κ B pathway, Int. Immunopharm. 8: 1264-1271.
- Sugumaran, M., Suresh Gandhi, M., Sankaranarayanan, K., Yokesh, M., Poornima, M. and Rama Rajasekhar, S., 2011, Chemical composition and antimicrobial activity of vellaikodi variety of *Piper betle* Linn. Leaf oil against dental pathogens, Int. J. Pharm. Tech. Res. 3: 2135-2139.
- Vila, R., Milo, B.A., Tomi, F., Casanova, J., Ferro, E.A. and Canigual, S., 2001, Chemical composition of the essential oil from the leaves of *Piper fulvescens*, a plant traditionally used in Paraguay, J. Ethnopharm. 76: 105-110.