การพัฒนาและตรวจสอบวิธีวิเคราะห์ปริมาณแมงจิเฟอริน ของสารสกัดใบมะม่วงน้ำดอกไม้ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography และ Infrared Spectroscopy

Analytical Method Development and Validation for Quantitative Analysis of Mangiferin in Nam Dok Mai Mango Leaf Extracts by High Performance Liquid Chromatographic and Infrared Spectroscopic Techniques

สุธีรา ญานะโส
อรัญญา จุติวิบูลย์สุข
ภูริต ธนะรังสฤษฏ์
กนกภรณ์ สวัสดี

การวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
ปีการศึกษา 2564

ชื่อเรื่อง การพัฒนาและตรวจสอบวิธีวิเคราะห์ปริมาณแมงจิเฟอรินของสารสกัดใบมะม่วงน้ำดอกไม้ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography และ Infrared Spectroscopy

ผู้วิจัย สุธีรา ญานะโส
อรัญญา จุติวิบูลย์สุข
ภูริต ธนะรังสฤษฏ์
กนกภรณ์ สวัสดี

สถาบัน คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

ปีที่พิมพ์ 2566

สถานที่พิมพ์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

แหล่งที่เก็บรายงานฉบับสมบูรณ์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

จำนวนหน้างานวิจัย 37 หน้า

คำสำคัญ มะม่วงน้ำดอกไม้, แมงจิเฟอริน, HPLC, IR spectroscopy

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและตรวจสอบวิธีวิเคราะห์ รวมทั้งหาปริมาณแมงจิเฟอรินจากสารสกัดใบมะม่วงน้ำดอกไม้ที่ปลูกในจังหวัดสมุทรปราการด้วยวิธี high performance liquid chromatography (HPLC) และ infrared (IR) spectroscopy จากผลการวิจัยพบว่าทั้ง 2 วิธี ผ่านการตรวจสอบวิธีวิเคราะห์ในหัวข้อความจำเพาะเจาะจง ความเป็นเส้นตรงและพิสัย ความเที่ยง ความแม่น ขีดจำกัดของการตรวจพบ และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ เมื่อวิเคราะห์หาปริมาณแมงจิเฟอรินจากสารสกัดใบมะม่วงน้ำดอกไม้จำนวน 5 ตัวอย่างที่มีแหล่งปลูกในจังหวัดสมุทรปราการ (M1 – M5) ด้วยวิธี HPLC และ IR spectroscopy พบปริมาณแมงจิเฟอริน 85.08 – 109.40 และ 81.33 – 98.95 %w/w ตามลำดับ เมื่อทดสอบนัยสำคัญทางสถิติด้วย paired t-test พบว่าทั้ง 2 วิธีสามารถวิเคราะห์ปริมาณแมงจิเฟอรินได้แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังนั้นวิธี HPLC และ IR spectroscopy ที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปประยุกต์ใช้วิเคราะห์หาปริมาณแมงจิเฟอรินเพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพของสารสกัดจากใบมะม่วงน้ำดอกไม้

Research Title	Analytical Method Development and Validation for Quantitative Analysis of Mangiferin in Nam Dok Mai Mango Leaf Extracts by High Performance Liquid Chromatographic and Infrared Spectroscopic Techniques
Researchers	Suthira Yanaso Aranya Jutiviboonsuk Phurit Thanarangsarit Kanokporn Sawasdee
Institution	Faculty of Pharmaceutical Sciences, Huachiew Chalermprakiet University
Year of Publication	2023
Publisher	Huachiew Chalermprakiet University
Sources	Huachiew Chalermprakiet University
No. of Pages	37 pages
Keywords	Nam Dok Mai mango, mangiferin, HPLC, IR
Copyright	Huachiew Chalermprakiet University

ABSTRACT

This research aims to develop and validate analytical methods for the quantification of mangiferin from Nam Dok Mai mango leaf extracts cultivated in Samut Prakan province using high performance liquid chromatography (HPLC) and infrared (IR) spectroscopy. The results confirmed that both methods were validated in terms of specificity, linearity, range, accuracy, precision, limit of detection and limit of quantitation. The mangiferin content in five samples obtained from Nam Dok Mai mango leaf extracts in Samut Prakan (M1 – M5), analyzed by using HPLC and IR methods, ranged from 85.08 to 109.40 and 81.33 to 98.95 %w/w, respectively. Statistical analysis using a paired t-test revealed no significant difference in the mangiferin quantity between the two methods at a 95% confidence level. Therefore, the developed HPLC and IR methods can be applied to quantify mangiferin content and control the quality of Nam Dok Mai mango leaf extracts.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องการพัฒนาและตรวจสอบวิธีวิเคราะห์ปริมาณแมงจิเฟอรินของสารสกัดใบมะม่วงน้ำดอกไม้ด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography และ infrared spectroscopy ไม่อาจสำเร็จลุล่วงได้ หากขาดความร่วมมือร่วมใจจากทีมสนับสนุนงานวิจัย คณะผู้วิจัยขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเภสัชเคมีและเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ คุณวิไลพรรณ ลีปรีชานนท์ คุณชัยวิชิต รัตนมะณี คุณนภัสนันท์ นราสินวิวัฒน์ และคุณมยุรี จานแสน และขอขอบคุณมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ผู้ให้ทุนอุดหนุนงานวิจัย ประจำปีการศึกษา 2564 ขอขอบคุณ รศ.พวงแก้ว ลัคนทินพร ผู้ให้คำปรึกษาด้านงานวิจัย และขอขอบคุณอาจารย์ทุกท่านที่เคยอบรมสั่งสอนและให้ความรู้จนสามารถทำให้คณะผู้วิจัยนำมาใช้สร้างสรรค์งานอันเกิดประโยชน์ สุดท้ายขอขอบคุณกำลังใจจากครอบครัวที่ช่วยให้งานนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ข
กิตติกรรมประกาศ ค
สารบัญ ฆ
สารบัญตาราง จ
สารบัญรูปภาพ ฉ
บทที่ 1 บทนำ 1
  1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
  1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2
  1.3 สมมติฐานการวิจัย 2
  1.4 ขอบเขตของการวิจัย 2
  1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4
  2.1 แมงจิเฟอริน (mangiferin) 4
  2.2 วิธีวิเคราะห์ mangiferin จากสารสกัดใบมะม่วง 5
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย 7
  3.1 กรอบแนวคิดในการวิจัย 7
  3.2 วิธีวิจัย 7
บทที่ 4 ผลและอภิปรายผลการวิจัย 13
  4.1 การสกัด mangiferin จากใบมะม่วงน้ำดอกไม้สมุทรปราการ 13
  4.2 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณ mangiferin ด้วยวิธี HPLC 13
  4.3 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณ mangiferin ด้วยวิธี HPLC 15
  4.4 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณ mangiferin ด้วยวิธี IR spectroscopy 23
  4.5 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณ mangiferin ด้วยวิธี IR spectroscopy 24

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ • HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY • 華僑崇聖大學

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลและอภิปรายผลการวิจัย (ต่อ)

4.6 การวิเคราะห์หาปริมาณ mangiferin จากสารสกัดใบมะม่วงด้วยวิธี HPLC และ IR spectroscopy ที่พัฒนาขึ้น 30
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 33
เอกสารอ้างอิง 35
ภาคผนวก (ประวัติย่อผู้วิจัย) 37

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ผลการทดสอบความเหมาะสมของสภาวะวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC	15
2	Peak area ของสารละลายมาตรฐาน mangiferin ที่ช่วงความเข้มข้น 30 – 360 µg/mL	16
3	ผลการวิเคราะห์ linear regression ของสารละลายมาตรฐาน mangiferin ที่ช่วงความเข้มข้น 30 – 360 µg/mL	20
4	Peak area ของสารมาตรฐาน mangiferin และสารสกัด M2 (standard addition method) ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC	21
5	ผลการประเมิน accuracy ของวิธี HPLC	22
6	ผลการประเมิน precision แบบ intra-day และ inter-day ของวิธี HPLC	22
7	ผลการวิเคราะห์ linear regression ของสารมาตรฐาน mangiferin ที่ช่วงความเข้มข้น 5.18 – 34 %w/w	27
8	ผลการประเมิน accuracy ของวิธี IR spectroscopy	28
9	ผลการประเมิน precision แบบ intra-day และ inter-day ของวิธี IR spectroscopy	28
10	ผลการประเมิน robustness ของการวิเคราะห์ด้วยวิธี IR spectroscopy	29
11	ผลจากการวิเคราะห์ปริมาณ mangiferin ในสารสกัด M1 – M5 ด้วยวิธี HPLC	31
12	ผลจากการวิเคราะห์ปริมาณ mangiferin ในสารสกัด M1 – M5 ด้วยวิธี IR spectroscopy	31
13	ผลการทดสอบ paired t-test ระหว่างวิธี HPLC และ IR spectroscopy ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95	32

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ **หน้า**

1 โครงสร้างเคมีของ mangiferin 4

2 HPLC chromatogram ของสารละลายมาตรฐาน mangiferin (mgf) จากการทดสอบความเหมาะสมของสภาวะวิเคราะห์ 14

3 HPLC chromatogram ของสารละลายมาตรฐาน mangiferin (สีแดง) และสารละลาย M2 (สีดำ) 17

4 HPLC chromatogram ของสารละลายมาตรฐาน mangiferin (mgf) ความเข้มข้น 30, 60, 120, 240 และ 360 μg/mL 18

5 Calibration curve ของสารละลายมาตรฐาน mangiferin ที่ช่วงความเข้มข้น 30 – 360 μg/mL 19

6 IR spectrum ของ KBr 24

7 IR specta ของสารมาตรฐาน mangiferin (สีดำ) และสารสกัด M2 (สีน้ำเงิน) 25

8 Calibration curve ของสารมาตรฐาน mangiferin ที่ช่วงความเข้มข้น 5 – 40 %w/w 26

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

“มะม่วงน้ำดอกไม้” เป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่มีการปลูกมากในจังหวัดสมุทรปราการ ซึ่งเป็นจังหวัดที่มีพื้นที่ชายฝั่งติดกับทะเลอ่าวไทย มีแม่น้ำเจ้าพระยา และลำคลองระบายน้ำขนาดใหญ่หลายสายไหลผ่านในเขตอำเภอต่างๆ ซึ่งได้นำพาแร่ธาตุอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อการปลูกพืชมาสะสมเกิดตะกอนดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ มีความเหมาะสมต่อการเพาะปลูกพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ โดยเฉพาะมะม่วงน้ำดอกไม้ ซึ่งทางจังหวัดสมุทรปราการ ได้ดำเนินการส่งเสริมและพัฒนาเกษตรกรชาวสวนมะม่วง โดยการรวมกลุ่มเกษตรกรผู้ปลูกมะม่วงในรูปแบบแปลงใหญ่ เพื่อกระตุ้นและปลูกจิตสำนึกการอนุรักษ์มะม่วงน้ำดอกไม้ ให้คงอยู่คู่จังหวัดสมุทรปราการ ส่งเสริมให้มีการฟื้นฟูบำรุงรักษาสวนมะม่วงให้ถูกต้องตามหลักวิชาการ พัฒนาการผลิตให้มีคุณภาพที่ดี และเพิ่มมูลค่าผลผลิตด้วยการสร้างแบรนด์มะม่วงน้ำดอกไม้ที่เป็นอัตลักษณ์ของจังหวัดสมุทรปราการ (1)

ในการปลูกมะม่วงน้ำดอกไม้ให้ผลผลิตที่ดีและมีจำนวนมากจำเป็นต้องมีกระบวนการตัดแต่งกิ่ง (2) หลังจากกระบวนการดังกล่าว จะทำให้เกิดขยะทางการเกษตร นั่นคือ ใบมะม่วง เพื่อเพิ่มมูลค่าจากใบมะม่วงและลดขยะทางการเกษตรที่มักถูกกำจัดด้วยวิธีการเผาจนก่อให้เกิดมลพิษทางอากาศ จึงมีการนำใบมะม่วงมาวิจัย โดยนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ เพื่อให้ได้สารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ จากการศึกษาพบว่าหนึ่งในสารสำคัญที่พบได้เป็นส่วนใหญ่ในใบมะม่วง คือ mangiferin ซึ่งมีฤทธิ์ต่างๆ เช่น ต้านเบาหวาน ต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านเชื้อไวรัส ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ต้านมะเร็ง ปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกัน ปกป้องหัวใจ และปกป้องเซลล์ประสาท เป็นต้น (3) สามารถนำสารสกัดจากใบมะม่วงไปพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางหรืออาหารเสริมได้ ในปัจจุบันประเทศไทยมีการบังคับใช้พระราชบัญญัติผลิตภัณฑ์สมุนไพร พ.ศ. 2562 เพื่อควบคุมคุณภาพ ประสิทธิภาพ และความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาจากสมุนไพรหรือสมุนไพรเพื่อสุขภาพ กฎหมายกำหนดให้มีการจดแจ้ง แจ้งรายละเอียด หรือขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์ ซึ่งการควบคุมคุณภาพเป็นหนึ่งในกระบวนการสำคัญที่ใช้ยืนยันคุณภาพของวัตถุดิบสมุนไพรและผลิตภัณฑ์จากสมุนไพร (4) การวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยวิธี high performance liquid chromatography (HPLC) เป็นหนึ่งในวิธีมาตรฐานที่ได้รับการยอมรับจากตำรายาต่างๆ (5) แต่ปัจจุบันยังไม่มีแนวทางการวิเคราะห์สาร mangiferin ที่ได้รับการยอมรับด้วยวิธี HPLC อย่างเป็นทางการ นอกจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC แล้ว ปัจจุบัน ยังได้มีการประยุกต์ใช้วิธี IR spectroscopy เพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเช่นกัน

ซึ่งวิธีนี้มีจุดเด่นที่สำคัญ คือ เป็นวิธีที่มีความรวดเร็ว และไม่มีการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvents) ในกระบวนการวิเคราะห์ ทำให้ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ นอกจากนี้ยังสามารถลดมลพิษที่เกิดจากการใช้สารเคมีในกระบวนการวิเคราะห์ได้อีกด้วย (6)

ดังนั้น จุดประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือ การพัฒนาและตรวจสอบวิธีวิเคราะห์ปริมาณ mangiferin โดยใช้วิธี HPLC และ IR spectroscopy โดยใช้องค์ความรู้ทางเภสัชเคมีและเภสัชเวท โดยมุ่งหวังให้เป็นแนวทางที่ได้มาตรฐาน สามารถใช้ในการควบคุมคุณภาพเพื่อวิเคราะห์วัตถุดิบสารสกัดจากใบมะม่วงน้ำดอกไม้ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการตรวจวิเคราะห์ในผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปเมื่อมีการพัฒนาต่อยอดในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาและตรวจสอบวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ mangiferin จากสารสกัดใบมะม่วงน้ำดอกไม้ด้วยวิธี HPLC และ IR spectroscopy
2. เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ mangiferin ของสารสกัดใบมะม่วงน้ำดอกไม้ที่มีแหล่งปลูกในจังหวัดสมุทรปราการด้วยวิธี HPLC และ IR spectroscopy ที่พัฒนาและผ่านการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

1.3 สมมติฐานการวิจัย

1. วิธี HPLC และ IR spectroscopy ที่พัฒนาและผ่านการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ตามพารามิเตอร์ที่กำหนดได้
2. เมื่อประยุกต์ใช้วิธี HPLC และ IR spectroscopy ที่พัฒนาและผ่านการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ เพื่อหาปริมาณ mangiferin จากวัตถุดิบสารสกัดจากใบมะม่วงน้ำดอกไม้สมุทรปราการแล้ว สามารถให้ข้อมูลเชิงปริมาณที่แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ เป็นการพัฒนาและตรวจสอบวิธีวิเคราะห์เพื่อใช้เป็นแนวทางการควบคุมคุณภาพวัตถุดิบสารสกัดจากใบมะม่วงน้ำดอกไม้ ซึ่งมี mangiferin เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลัก โดยใช้วิธี HPLC และ IR spectroscopy

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้วิธี HPLC และ IR spectroscopy ที่ผ่านการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ สามารถใช้หาปริมาณของ mangiferin จากสารสกัดใบมะม่วงน้ำดอกไม้

2. ได้ข้อมูลเบื้องต้นเชิงปริมาณของ mangiferin จากสารสกัดใบมะม่วงน้ำดอกไม้ที่มีแหล่งปลูกในจังหวัดสมุทรปราการ เพื่อนำไปใช้ต่อยอดเชิงพาณิชย์หรือพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปในอนาคต

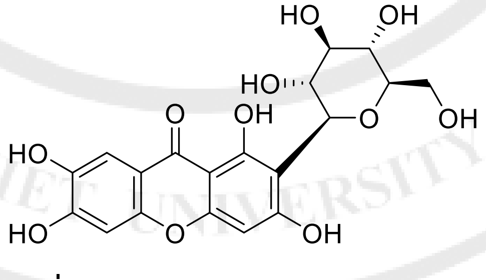
มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY 華僑崇聖大學

บทที่ 2

แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แมงจิเฟอริน (mangiferin)

แมงจิเฟอริน หรือ mangiferin (รูปที่ 1) เป็นสารพฤกษเคมีที่มีโครงสร้างจัดอยู่ในกลุ่มแซนโธนไกลโคไซด์ (xanthone glycosides) โดยมี C-glycosidic bond เป็นพันธะที่เชื่อมต่อระหว่างโครงสร้างน้ำตาลกับโครงสร้างที่ไม่ใช่น้ำตาล แมงจิเฟอรินเป็นสารที่พบได้ในหลายส่วนของมะม่วง โดยเฉพาะส่วนใบมีรายงานว่าพบสารแมงจิเฟอรินในปริมาณที่มากกว่าส่วนอื่น (7) จากงานวิจัยก่อนหน้าได้ศึกษาเปรียบเทียบปริมาณสารแมงจิเฟอรินในใบมะม่วง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ น้ำดอกไม้ เขียวเสวย และแก้ว พบว่าสายพันธุ์ที่มีปริมาณสารมากที่สุด คือ น้ำดอกไม้ โดยมีปริมาณสารคิดเป็นร้อยละ 2.80 โดยน้ำหนัก (8) มีรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพของสารแมงจิเฟอรินพบว่ามีฤทธิ์หลากหลาย เช่น ต้านเบาหวาน ต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านเชื้อไวรัส ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ต้านมะเร็ง ปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกัน (immunomodulatory) ปกป้องหัวใจ และปกป้องเซลล์ประสาท เป็นต้น (3) นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยเกี่ยวกับการนำสารแมงจิเฟอรินมาใช้ประโยชน์ด้านเครื่องสำอาง พบว่าแมงจิเฟอรินสามารถซึมผ่านผิวชั้นหนังกำพร้าเข้าสู่ชั้นหนังแท้ได้ มีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อิลาสเทสและคอลลาจิเนส (9) เร่งการสมานแผล (10) และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (11) จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นจะเห็นได้ว่า สารแมงจิเฟอรินซึ่งเป็นสารจากธรรมชาติที่พบมากในใบมะม่วงน้ำดอกไม้สามารถพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารตลอดจนเครื่องสำอางบำรุงผิวชะลอวัยได้



รูปที่ 1 โครงสร้างเคมีของ mangiferin (3)

2.2 วิธีวิเคราะห์ mangiferin จากสารสกัดใบมะม่วง

เนื่องจากปริมาณของสารสำคัญในสมุนไพร เกิดการเปลี่ยนแปลงได้จากปัจจัยต่างๆ เช่น พื้นที่ในการเพาะปลูก อายุของสมุนไพร ช่วงเวลาการเก็บเกี่ยว เป็นต้น ดังนั้นจึงนิยมกำหนดสารที่เป็นตัวบ่งชี้ทางเคมี (chemical marker) เพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพสมุนไพร ซึ่งอาจเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพและเป็นสารที่พบได้มากในสมุนไพรชนิดนั้น (12) จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่า mangiferin ซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย และพบได้มากในใบมะม่วง (8) สามารถทำหน้าที่เป็น chemical marker เพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพและประสิทธิภาพของสารสกัดได้ โดยทั่วไปการวิเคราะห์เชิงปริมาณเพื่อควบคุมคุณภาพของสมุนไพรนิยมใช้วิธี high performance liquid chromatography (HPLC) เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความไวสูง สามารถวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็ว แยกสารที่ต้องการวิเคราะห์ได้ดี และใช้วิเคราะห์สารเกือบทุกชนิดที่พบในพืชได้ (5) นอกจากวิธีนี้ การใช้วิธี IR spectroscopy เพื่อวิเคราะห์เชิงปริมาณ กำลังเริ่มได้รับความนิยมเช่นกัน เนื่องจากเป็นวิธีที่สามารถทำได้โดยง่าย ไม่ต้องเตรียมสารตัวอย่างให้ยุ่งยาก วิเคราะห์ได้รวดเร็ว และไม่จำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvents) ซึ่งอาจก่อให้เกิดพิษต่อผู้วิเคราะห์และเกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม (6) เพื่อความน่าเชื่อถือของวิธีเหล่านี้ จำเป็นต้องมีการพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

2.2.1 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์

การใช้วิธี HPLC เพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ จะต้องทำการพัฒนาสภาวะการวิเคราะห์ให้มีความเหมาะสมที่สุด โดยการปรับเปลี่ยนปัจจัยต่างๆ เช่น ชนิดของคอลัมน์ ชนิดของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ปริมาณสารที่ฉีดเข้าเครื่อง (injection volume) อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ (flow rate) ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ เป็นต้น (13)

การใช้วิธี IR spectroscopy เพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ จะต้องทำการปรับอัตราส่วนระหว่าง potassium bromide (KBr) กับสารที่ต้องการวิเคราะห์ให้เหมาะสม และต้องนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ เพื่อให้สามารถเลือก peak ที่เหมาะสมที่สุดจาก IR spectrum แล้วนำไปใช้เป็นตัวแทนในการวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ (6)

2.2.2 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (14,15)

หลังจากพัฒนาวิธีวิเคราะห์ จะต้องทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี เพื่อให้มั่นใจว่าวิธีวิเคราะห์สามารถวิเคราะห์ปริมาณสารได้อย่างถูกต้องแม่นยำ ในการตรวจสอบวิธีวิเคราะห์ นิยมอ้างอิงตาม International Conference on Harmonization (ICH) guideline ซึ่งหัวข้อหรือพารามิเตอร์ (parameter) ที่จะต้องทำการวิเคราะห์ ได้แก่

1) ความจำเพาะเจาะจง (specificity) เป็นพารามิเตอร์แสดงความสามารถของวิธีวิเคราะห์ที่สามารถตรวจวิเคราะห์สารที่ต้องการได้อย่างถูกต้องและจำเพาะเจาะจง โดยปราศจากการ

รบกวนจากสารแปลกปลอมหรือสารอื่นที่คาดว่าจะมีในตัวอย่าง จึงอาจทดสอบด้วยการตรวจเอกลักษณ์หรือการวิเคราะห์เชิงปริมาณได้

2) ความเป็นเส้นตรง (linearity) เป็นพารามิเตอร์ที่แสดงความเป็นเส้นตรง ทำได้โดยการสร้างกราฟเส้นตรงหรือกราฟมาตรฐาน (calibration curve หรือ standard curve) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลวิเคราะห์กับปริมาณของสารที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน อย่างน้อย 5 ความเข้มข้น ในช่วงความเข้มข้นที่จะใช้ในการวิเคราะห์สารตัวอย่าง

3) พิสัย (range) เป็นพารามิเตอร์ที่แสดงช่วงความเข้มข้นระหว่างค่าสูงและค่าต่ำของสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่เป็นเส้นตรง แสดงให้เห็นว่าสามารถวิเคราะห์ปริมาณสารตัวอย่างในช่วงดังกล่าวได้อย่างมีความเที่ยง (accuracy) ความแม่น (precision) และมีความเป็นเส้นตรง (linearity)

4) ขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection; LOD) เป็นพารามิเตอร์แสดงขีดความสามารถของวิธีวิเคราะห์ที่จะตรวจพบปริมาณต่ำสุดของสารที่ต้องการวิเคราะห์ แต่ไม่จำเป็นว่าต้องสามารถตรวจหาปริมาณของสารที่ระดับนี้ได้อย่างเที่ยงและแม่น ในการทดสอบจะรายงานเป็นค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่าง

5) ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation; LOQ) เป็นพารามิเตอร์แสดงปริมาณหรือความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดปริมาณได้ โดยค่าที่วัดได้มีความเที่ยงและแม่นอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ในการทดสอบจะรายงานเป็นค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่าง

6) ความเที่ยง (accuracy) เป็นพารามิเตอร์ที่บอกถึงความใกล้เคียงกันระหว่างผลวิเคราะห์ที่ได้จากการใช้วิธีที่ต้องการทดสอบกับค่าแท้จริงหรือค่าอ้างอิงที่ได้รับการยอมรับ โดยจะต้องตรวจสอบครอบคลุมช่วงความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ ต้องทำการตรวจสอบที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน 3 ระดับ อย่างละ 3 ซ้ำ เมื่อทดสอบแล้วจะรายงานเป็นค่าร้อยละของการกลับคืน (% recovery)

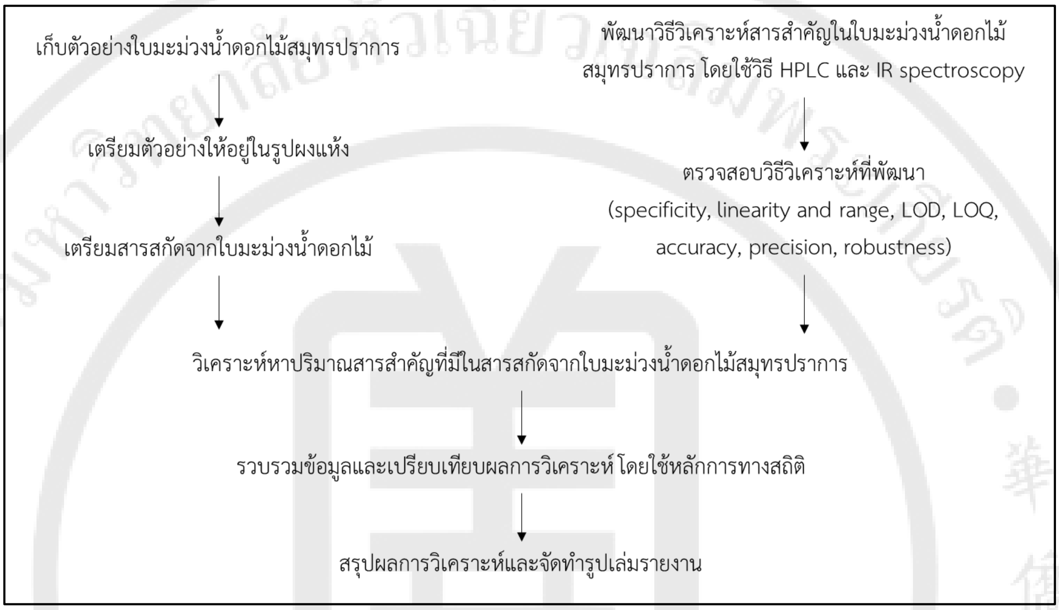
7) ความแม่น (precision) เป็นพารามิเตอร์ที่บอกถึงความใกล้เคียงกันของผลการทดสอบที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำๆ กันหลายครั้งภายใต้สภาวะที่กำหนด โดยจะต้องตรวจสอบครอบคลุมช่วงความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ ต้องทำการตรวจสอบที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน 3 ระดับ อย่างละ 3 ซ้ำ หรือตรวจสอบที่ความเข้มข้น 1 ระดับ จำนวน 6 ซ้ำ เมื่อทดสอบแล้วจะรายงานเป็นร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% relative standard deviation หรือ %RSD)

8) ความคงทน (robustness) เป็นพารามิเตอร์ที่แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์จะยังคงมีประสิทธิภาพหรือให้ผลที่ยอมรับได้เหมือนเดิม แม้ว่าจะมีการจงใจเปลี่ยนแปลงตัวแปรหรือสภาวะการวิเคราะห์ เมื่อทดสอบแล้วสามารถรายงานผลของความเที่ยง และ/หรือความแม่น เพื่อใช้ตรวจสอบประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์จากการเปลี่ยนแปลงตัวแปรดังกล่าว

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 กรอบแนวคิดในการวิจัย


เก็บตัวอย่างใบมะม่วงน้ำดอกไม้สมุทรปราการ
เตรียมตัวอย่างให้อยู่ในรูปผงแห้ง
เตรียมสารสกัดจากใบมะม่วงน้ำดอกไม้
พัฒนาวิธีวิเคราะห์สารสำคัญในใบมะม่วงน้ำดอกไม้สมุทรปราการ โดยใช้วิธี HPLC และ IR spectroscopy
ตรวจสอบวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนา (specificity, linearity and range, LOD, LOQ, accuracy, precision, robustness)
วิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญที่มีในสารสกัดจากใบมะม่วงน้ำดอกไม้สมุทรปราการ
รวบรวมข้อมูลและเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ โดยใช้หลักการทางสถิติ
สรุปผลการวิเคราะห์และจัดทำรูปเล่มรายงาน

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY 華僑崇聖大學

3.2 วิธีวิจัย

3.2.1 การเตรียมวัตถุดิบสมุนไพร

วัตถุดิบสมุนไพรสำหรับการวิจัย คือ ใบมะม่วงน้ำดอกไม้ ซึ่งเป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่มีแหล่งปลูกในจังหวัดสมุทรปราการ เตรียมโดยล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา จากนั้นนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 ℃ เป็นเวลา 2 วัน นำไปบดให้ละเอียดจนได้ผงแห้งของใบมะม่วงน้ำดอกไม้ แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 ℃ ก่อนนำไปสกัดในขั้นตอนต่อไป

3.2.2 การสกัด mangiferin จากใบมะม่วง

การสกัด mangiferin จากใบมะม่วงน้ำดอกไม้ (M1 – M5) ซึ่งมี mangiferin เป็นองค์ประกอบหลัก ได้มาจากการหมักผงแห้งใบมะม่วงด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (maceration) แล้วจึงสกัดด้วยวิธีการแบ่งส่วน (partition) ดังนี้

1) สารสกัด M1 – M3 ได้มาจากกระบวนการหมักผงแห้งใบมะม่วงโดยเลือกใช้ตัวทำละลายที่มีความเป็นขั้วต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ 95% methanol, 95% ethanol และ 70% acetone สำหรับสารสกัด M1, M2 และ M3 ตามลำดับ โดยใช้อัตราส่วนผงแห้งต่อตัวทำละลาย 1:5 แล้วนำมาหมักที่อุณหภูมิห้อง ทำการเปลี่ยนตัวทำละลายใหม่ทุกสัปดาห์เป็นเวลา 3 สัปดาห์ จากนั้นกรองแยกกากออกและระเหยตัวทำละลายออกจนหมดด้วย rotary evaporator จะได้สารสกัดหยาบ แล้วนำ

สารสกัดหยาบที่ได้มาละลายด้วย 50% methanol ปริมาตร 50 mL และทำการสกัดโดยวิธีแบ่งส่วนด้วย dichloromethane ปริมาตร 100 mL (ทำซ้ำ 4 รอบ) จากนั้นนำสารสกัด methanol-น้ำ มาปรับความเป็นกรดด่างให้ได้ pH 3 ด้วยการเติม 2 N sulfuric acid และให้ความร้อน 60 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาพักให้สารสกัดเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำการสกัดโดยวิธีแบ่งส่วนด้วย ethyl acetate ปริมาตร 100 mL (ทำซ้ำ 3 รอบ) นำสารสกัดชั้น ethyl acetate มาระเหยจนแห้งและทำการตกผลึกด้วย 70% methanol ที่อุณหภูมิ 4 – 8 °C กรองเก็บผลึก จะได้สารสกัดใบมะม่วง M1 – M3 ที่มี mangiferin เป็นองค์ประกอบหลัก

2) สารสกัด M4 ได้มาจากการนำผงแห้งใบมะม่วง 1.5 kg มาหมักด้วย 85% ethanol 1 ลิตร โดยทำการเปลี่ยนตัวทำละลายใหม่ทุกวันเป็นเวลา 7 วัน กรองแยกกากออก แล้วนำสารสกัดมาระเหยตัวทำละลายออกจนหมดด้วย rotary evaporator จะได้สารสกัดหยาบ แล้วนำสารสกัดหยาบที่ได้มาละลายด้วย 50% ethanol 1 L และทำการสกัดโดยวิธีแบ่งส่วนด้วย dichloromethane 500 mL จากนั้นนำสารสกัดชั้น ethanol-น้ำ มาระเหยตัวทำละลายออกจนหมด จะได้สารสกัดใบมะม่วง M4 ที่มี mangiferin เป็นองค์ประกอบหลัก

3) สารสกัด M5 ได้มาจากการนำผงแห้งใบมะม่วง 382 g มาหมักด้วย 85% ethanol ครั้งละ 1.4 L เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองเก็บสารละลายทั้งหมดและนำกากสมุนไพรไปหมักซ้ำรวมทั้งหมด 3 รอบ หลังจากนั้นระเหยตัวทำละลายออกจนหมดด้วย rotary evaporator จากนั้นนำสารสกัดเข้มข้นที่ได้ใส่ลงใน porcelain dish แล้วนำไปกำจัดน้ำออกด้วย vacuum hot air oven เป็นเวลา 1 คืน จะได้สารสกัดหยาบ จากนั้นนำสารสกัดหยาบมาละลายด้วย 50% methanol ปริมาตร 500 mL และทำการสกัดโดยวิธีแบ่งส่วนด้วย dichloromethane ปริมาตร 500 mL จากนั้นนำสารละลายชั้น dichloromethane ซึ่งมีตะกอนปนอยู่ไปกรองเก็บตะกอน โดยล้างตะกอนด้วย dichloromethane แล้วปล่อยตะกอนทิ้งไว้ให้แห้ง จะได้สารสกัด M5 ที่มี mangiferin เป็นองค์ประกอบหลัก

3.3.3 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณ mangiferin ด้วยวิธี HPLC

สารมาตรฐาน mangiferin (Sigma) ถูกนำมาใช้ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ร่วมกับสารสกัดจากใบมะม่วง สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณ mangiferin ด้วยวิธี HPLC ทำได้โดยการนำสารมาตรฐาน mangiferin และสารสกัด M1 – M5 มาเตรียมเป็นสารละลายโดยใช้ methanol (Fisher) เป็นตัวทำละลาย การวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณ mangiferin ด้วยวิธี HPLC ทำได้โดยการใช้เครื่อง YL 9100 HPLC ซึ่งประกอบไปด้วย YL9100 quaternary pump, YL9101 in-line vacuum degasser, Rheodyne 7725i injector และ YL9160 PDA detector ซึ่งมีสภาวะการทดลองดังนี้

Column:	Mightysil RP-18 GP 5 µm, 250 × 4.6 mm
Guard column:	Mightysil RP-18 GP, 5 × 4.6 mm

Injection volume:	20 µL
Injection temperature:	25 °C (ambient temperature)
Mobile phase:	Solution A : Solution B (85:15)

Solution A: ละลาย potassium phosphate monobasic 0.136 g ในน้ำ แล้วเติม *o*-phosphoric acid 0.5 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 1 ลิตร

Solution B: acetonitrile

Flow rate:	1.0 mL/min
Detection condition:	UV 254 nm

จากนั้นทดสอบความเหมาะสมของสภาวะวิเคราะห์ (system suitability) ในพารามิเตอร์ %RSD (≤ 2), tailing factor (≤ 1.5), number of theoretical plates (≥ 2000) และ resolution (≥ 2) โดยวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม YL-Clarity version 4.0.3.867

3.3.4 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณ mangiferin ด้วยวิธี HPLC

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เป็นไปตาม ICH 2005 guideline (14) โดยทดสอบในหัวข้อ specificity, linearity, accuracy, precision, limit of detection (LOD) และ limit of quantitation (LOQ) ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

1) ความจำเพาะเจาะจง (specificity) ทำได้โดยเปรียบเทียบ HPLC chromatogram ของสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 250 µg/mL กับตัวแทนของสารละลายตัวอย่าง (M2) ที่มีความเข้มข้น 200 µg/mL ว่ามีสัญญาณรบกวนบริเวณ peak ของ mangiferin ที่ต้องการวิเคราะห์ในสารละลายตัวอย่างหรือไม่

2) ความเป็นเส้นตรง (linearity) และพิสัย (range) ทำได้โดยวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน mangiferin ที่มีความเข้มข้น 30, 60, 120, 240 และ 360 µg/mL อย่างละ 3 ซ้ำ แล้วนำค่าเฉลี่ยของ peak area และความเข้มข้นมาสร้าง calibration curve จากนั้นวิเคราะห์หา linear regression equation, correlation coefficient (r) และ correlation of determination (r^2) โดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel 2016 (Data Analysis Toolpak)

3) ความเที่ยง (accuracy) และความแม่น (precision) ทำได้โดยวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 100, 180 และ 250 µg/mL อย่างละ 3 ซ้ำ ทั้งแบบ intra-day และ inter-day ด้วยวิธี standard addition method โดยการใช้สารละลายของสารสกัด M2 ที่มีความเข้มข้น 40 µg/mL จากนั้นวิเคราะห์หา % recovery และ % relative standard deviation (%RSD) ดังสมการต่อไปนี้

% Recovery = (ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ได้ ÷ ความเข้มข้นของสารที่เตรียม) × 100 หรือ
% Recovery = (Found concentration ÷ Nominal concentration) × 100
% RSD = (ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ÷ ค่าเฉลี่ยของ peak area) × 100

4) ขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) คำนวณโดยอาศัยค่า slope (S) และ standard deviation ของ y-intercept (σ) ของ calibration curve ดังสมการต่อไปนี้

$$\mathrm{LOD} = 3.3\sigma \div S$$

$$\mathrm{LOQ} = 10\sigma \div S$$

3.3.5 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณ mangiferin ด้วยวิธี IR spectroscopy

การวิเคราะห์ด้วยวิธี IR spectroscopy ทำได้โดยนำสารมาตรฐาน mangiferin และสารสกัด M1 – M5 มาบดผสมกับ KBr (Spectrosol®) เพื่อเตรียมเป็นสารผสม (mixture) ในรูปแบบของแข็งก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Spectrum 100 FT-IR spectrometer (PerkinElmer®) ร่วมกับการใช้ universal ATR sampling accessory (PerkinElmer®) แล้ววิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม Spectrum version 6.1.0 software ซึ่งมีสภาวะการทดลองดังนี้

Mode: reflectance
Force gauge: 80 ± 1
Spectral resolution: 4 cm^{-1}
Scan number: 3
Scan wavenumber: 4000 – 600 cm^{-1}
Selected wavenumber: 1700 – 930 cm^{-1}

3.3.6 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณ mangiferin ด้วยวิธี IR spectroscopy

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เป็นไปตาม ICH 2005 guideline (14) โดยทดสอบในหัวข้อ specificity, linearity, accuracy, precision, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ) และ robustness ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

1) ความจำเพาะเจาะจง (specificity) ทำได้โดยเปรียบเทียบ IR spectrum ของ KBr ซึ่งเป็นสารเพิ่มปริมาณ (diluent) กับสารสกัดตัวอย่าง (M2) และสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 5 %w/w

2) ความเป็นเส้นตรง (linearity) และพิสัย (range) ทำได้โดยวิเคราะห์สารมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 5, 10, 15, 25 และ 35 %w/w แล้วนำ corrected peak area ซึ่งได้จากการ

ประมวลผลของโปรแกรม Spectrum version 6.1.0 software และความเข้มข้นมาสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) จากนั้นวิเคราะห์หา linear regression equation, correlation coefficient (r) และ correlation of determination (r^2) โดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel 2016 (Data Analysis Toolpak)

3) ความเที่ยง (accuracy) และความแม่น (precision) สำหรับการประเมิน accuracy ทำได้โดยวิเคราะห์สารมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 5, 15 และ 25 %w/w อย่างละ 3 ซ้ำ สำหรับการประเมิน precision ทำได้โดยวิเคราะห์สารมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 15 %w/w จำนวน 6 ซ้ำ ทั้งแบบ intra-day และ inter-day โดยใช้วิธี spiked blank method จากนั้นวิเคราะห์หา % recovery และ % relative standard deviation (%RSD) โดยอาศัยการคำนวณโดยใช้สมการเดียวกันกับวิธี HPLC และมีการประเมิน F-test สำหรับผล inter-day precision เพื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนจากการวิเคราะห์ผลการทดลองของวันที่แตกต่างกันว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4) ขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) คำนวณโดยอาศัยค่า slope (S) ของ calibration curve และ standard deviation ของการวิเคราะห์ blank จำนวน 3 ซ้ำ (σ) แล้วนำไปคำนวณโดยใช้สมการเช่นเดียวกับการหา LOD และ LOQ ของวิธี HPLC

5) ความคงทน (robustness) ทำได้โดยวิเคราะห์สารมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 15 %w/w โดยเปลี่ยนแปลง force gauge ให้มีค่า 75, 80 และ 85 จากนั้นเปรียบเทียบ peak area (corrected) เพื่อหา %RSD

3.3.7 การวิเคราะห์หาปริมาณ mangiferin จากสารสกัดใบมะม่วงด้วยวิธี HPLC และ IR spectroscopy ที่พัฒนาขึ้น

วิธี HPLC และ IR spectroscopy ที่ผ่านการตรวจสอบความถูกต้องวิธีวิเคราะห์แล้ว จะถูกนำมาใช้เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณของ mangiferin ในสารสกัด M1 – M5 ซึ่งมีรายละเอียดของแต่ละวิธีดังนี้

1) HPLC ทำได้โดยเตรียมสารละลายตัวอย่าง M1 – M5 ให้มีความเข้มข้น 200 µg/mL โดยใช้ methanol เป็นตัวทำละลาย จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ mangiferin ด้วยวิธี HPLC ที่ผ่านการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เรียบร้อยแล้ว ทำทั้งหมด 2 ซ้ำ จากนั้นนำ peak area ที่ได้มาคำนวณ % relative difference (ตามสมการด้านล่าง) และปริมาณ mangiferin ในสารสกัดโดยอาศัย calibration curve จะได้ความเข้มข้นของ mangiferin ในหน่วย µg/mL จากนั้นนำความเข้มข้นที่ได้มาคำนวณเพื่อหาปริมาณ mangiferin (%w/w) ที่พบในสารสกัดต่อไป

$$\%\ \text{Relative difference} = (|\ \text{peak area 1} - \text{peak area 2}\ | \div \text{average peak area}) \times 100$$

2) IR spectroscopy ทำได้โดยเตรียมสารผสมตัวอย่าง M1 – M5 ให้มีความเข้มข้น 15 %w/w โดยบดผสมกับ KBr ที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 105 °C มาเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ mangiferin ด้วยวิธี IR spectroscopy ที่ผ่านการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เรียบร้อยแล้ว โดยทำทั้งหมด 2 ซ้ำ จากนั้นนำ peak area (corrected) ที่ได้มาคำนวณ % relative difference และปริมาณ mangiferin ในสารสกัดโดยใช้วิธี standard comparison (single point method) จะได้ความเข้มข้นของ mangiferin ที่ผสมอยู่กับ KBr ในหน่วย %w/w จากนั้นนำข้อมูลมาคำนวณเพื่อหาปริมาณ mangiferin (%w/w) ที่พบในสารสกัดต่อไป

เมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างทั้งหมดด้วยวิธี HPLC และ IR spectroscopy แล้ว นำผลการวิเคราะห์หาปริมาณ mangiferin (%w/w) ของสารสกัด M1 – M5 มาเปรียบเทียบความแตกต่างของการวิเคราะห์ 2 วิธี ด้วยสถิติ paired t-test ($p < 0.05$) โดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel 2016 (Data Analysis Toolpak)

บทที่ 4

ผลและอภิปรายผลการวิจัย

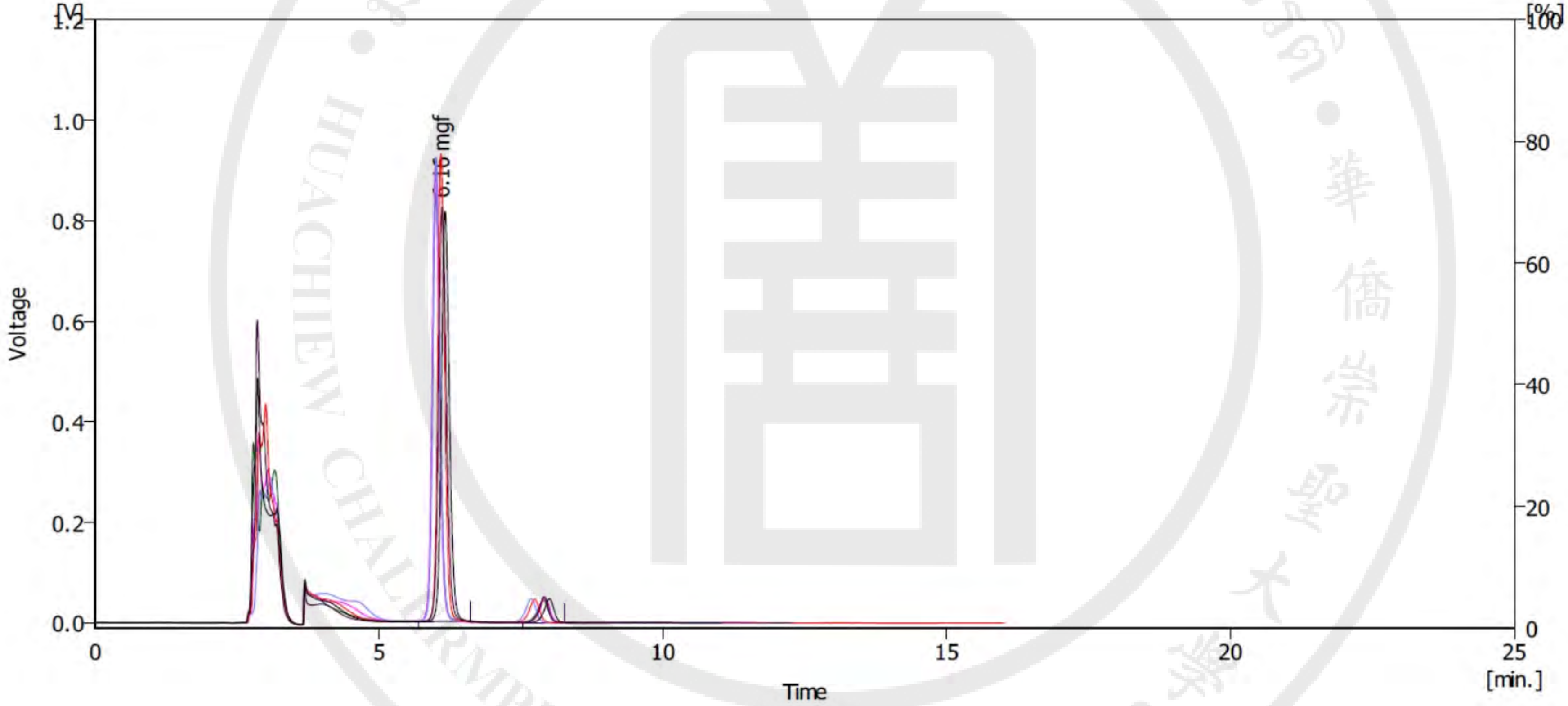
4.1 การสกัด mangiferin จากใบมะม่วงน้ำดอกไม้สมุทรปราการ

สารสกัดใบมะม่วงน้ำดอกไม้ M1 – M5 ซึ่งมี mangiferin เป็นองค์ประกอบหลัก อยู่ในรูปแบบของแข็ง สีเหลืองอ่อน มีลักษณะภายนอกเหมือนสารมาตรฐาน mangiferin โดยสารสกัด M1 – M5 มีร้อยละผลผลิตเท่ากับ 2.80, 1.00, 0.66, 2.13 และ 1.26 ของน้ำหนักใบมะม่วงแห้ง ตามลำดับ

4.2 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณ mangiferin ด้วยวิธี HPLC

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณ mangiferin ทำได้โดยเปรียบเทียบ HPLC chromatogram ของสารมาตรฐาน mangiferin กับสารสกัดจากใบมะม่วง ซึ่งพบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการทดลองนี้ คือ การใช้ reversed phase-C18 column (5 µm) ขนาด 250 × 4.6 mm ควบคู่กับการใช้ reversed phase-C18 guard column ขนาด 5 × 4.6 mm ปริมาณสารที่ฉีดเข้าคอลัมน์ คือ 20 µL ส่วน mobile phase ที่ใช้เป็น isocratic condition โดยใช้ phosphate buffer : acetonitrile (85:15) โดยกำหนดให้อัตราการไหล (flow rate) เป็น 1.0 mL/min และมี detection condition ที่ความยาวคลื่น 254 nm พบว่า retention time ของ mangiferin คือ 6 นาที ดังนั้นจึงใช้เวลา run time ทั้งหมด 10 นาที สำหรับการทดลองในสภาวะนี้

ผลการทดสอบความเหมาะสมของสภาวะวิเคราะห์ (system suitability) โดยใช้สารมาตรฐาน mangiferin ที่มีความเข้มข้น 250 µg/mL ฉีดซ้ำทั้งหมด 6 ครั้ง แล้วทดสอบในพารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่ %RSD (≤ 2) โดยวิเคราะห์ผลจาก retention time (min) และ peak area (mV·s), tailing factor (≤ 1.5), number of theoretical plates (≥ 2000) รวมทั้ง resolution (≥ 2) ดังแสดงในรูปที่ 2 และตารางที่ 1 พบว่า %RSD ของ retention time และ peak area มีค่าเท่ากับ 1.17 และ 1.32 ตามลำดับ ส่วน tailing factor, number of theoretical plates และ resolution มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.119, 9726.583 และ 6.362 ตามลำดับ แสดงว่าสภาวะวิเคราะห์มีความเหมาะสมผ่านการทดสอบในทุกพารามิเตอร์ สามารถนำสภาวะทดลองดังกล่าวไปใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation) ได้



รูปที่ 2 HPLC chromatogram ของสารละลายมาตรฐาน mangiferin (mgf) จากการทดสอบความเหมาะสมของสภาวะวิเคราะห์

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบความเหมาะสมของสภาวะวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

Injection No.	Retention time (min)	Peak area (mV·s)	Tailing factor	Number of theoretical plates	Resolution
1	6.163	8009.452	1.122	8950.925	6.437
2	6.000	8127.391	1.114	9271.488	6.507
3	5.993	8303.138	1.131	10152.911	6.913
4	6.003	8238.122	1.11	10186.819	5.924
5	6.090	8117.304	1.113	11000.670	5.900
6	6.110	8074.642	1.122	8796.685	6.490
Mean	**6.060**	**8145.008**	**1.119**	**9726.583**	**6.362**
%RSD	**1.17**	**1.32**	**0.71**	**8.83**	**6.10**
Acceptance criteria	%RSD ≤ 2	%RSD ≤ 2	≤ 1.5	≥ 2000	≥ 2
Parameter result	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed

4.3 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณ mangiferin ด้วยวิธี HPLC

การตรวจสอบวิธีวิเคราะห์ของงานวิจัยนี้ได้อ้างอิงตามแนวทางของ ICH 2005 guideline (14) โดยทดสอบในหัวข้อ specificity, linearity, accuracy, precision, limit of detection (LOD) และ limit of quantitation (LOQ) ผลการประเมินในแต่ละหัวข้อแสดงดังต่อไปนี้

1) ความจำเพาะเจาะจง (specificity)

ผลของการประเมินในหัวข้อ specificity โดยการเปรียบเทียบ HPLC chromatogram ของสารละลายมาตรฐาน mangiferin (250 µg/mL) กับสารละลายของสารสกัดใบมะม่วง M2 (200 µg/mL) พบว่าไม่มีสัญญาณอื่นรบกวนบริเวณ peak ของ mangiferin ที่ต้องการวิเคราะห์ในสารละลายตัวอย่าง ดังแสดงในรูปที่ 3 โดยสารมาตรฐาน mangiferin พบ peak ที่ retention time 6.16 นาที ในขณะที่สารสกัด M2 พบ peak ที่ retention time 6.19 นาที และไม่มี peak อื่นใดขึ้นที่บริเวณใกล้เคียงกับ peak ของสารมาตรฐาน mangiferin นั่นแสดงว่าวิธี HPLC นี้

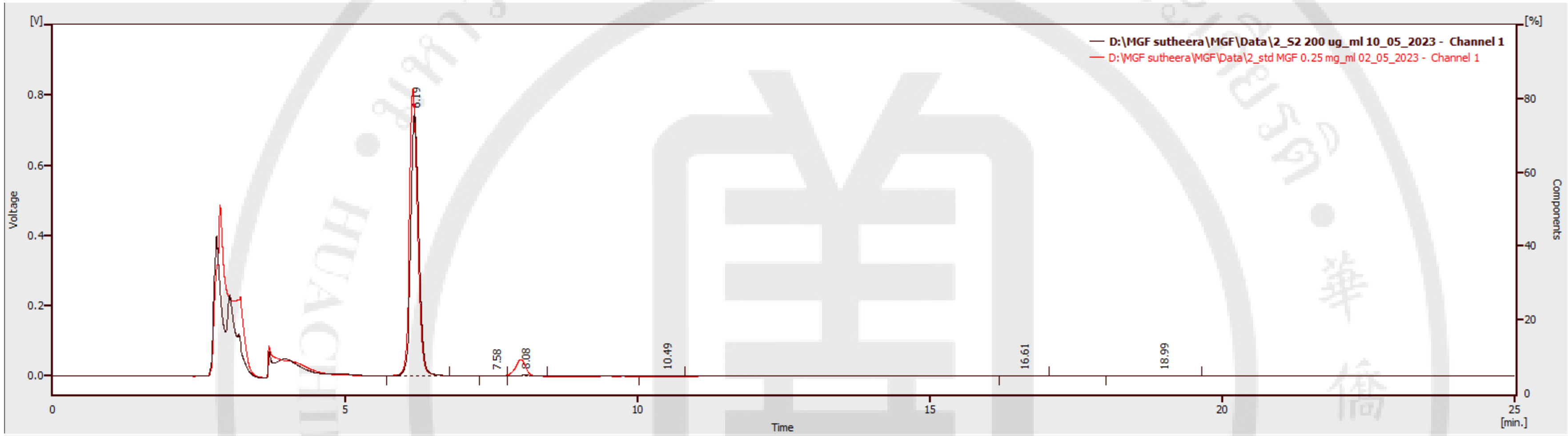
สามารถวิเคราะห์หรือตรวจวัด mangiferin ในสารสกัดใบมะม่วงน้ำดอกไม้ได้อย่างจำเพาะเจาะจง สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์นี้จึงผ่านการประเมินในหัวข้อ specificity

2) ความเป็นเส้นตรง (linearity) และพิสัย (range)

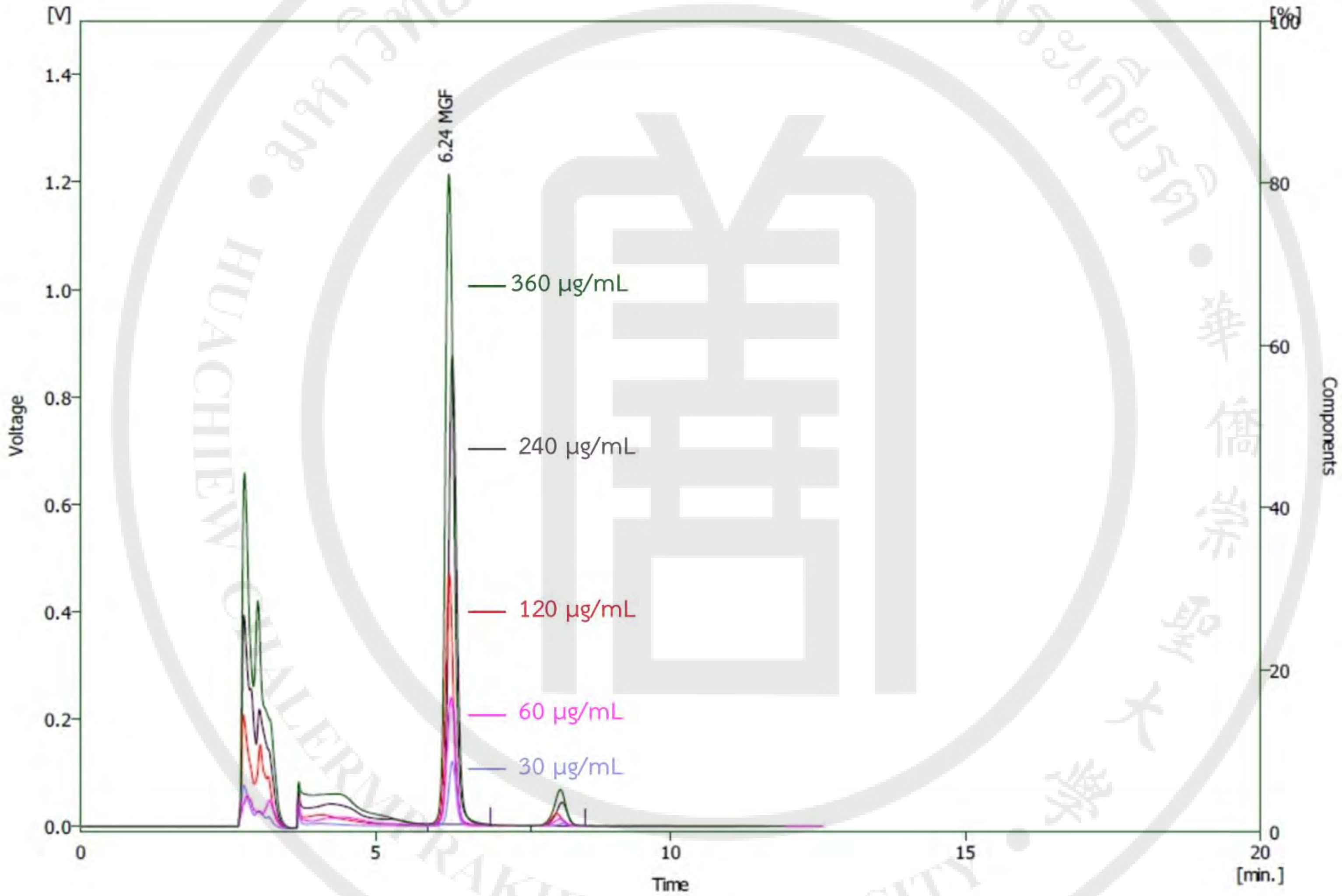
การประเมิน linearity และ range โดยวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน mangiferin 5 ความเข้มข้นที่อยู่ในช่วง 30 – 360 µg/mL ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ได้ค่า peak area และ HPLC chromatogram ดังแสดงในตารางที่ 2 และรูปที่ 4

ตารางที่ 2 Peak area ของสารละลายมาตรฐาน mangiferin ที่ช่วงความเข้มข้น 30 – 360 µg/mL

Concentration (µg/mL)	Injection No.	Peak area (mV·s)	Average peak area ± SD
30	1	1128.428	1126.904 ± 14.6446
	2	1111.556	
	3	1140.726	
60	1	2429.316	2412.273 ± 14.8483
	2	2402.132	
	3	2405.371	
120	1	4425.892	4512.964 ± 75.4436
	2	4558.864	
	3	4554.136	
240	1	8458.321	8700.309 ± 209.7808
	2	8830.750	
	3	8811.857	
360	1	12739.211	13030.134 ± 277.6805
	2	13058.852	
	3	13292.340	

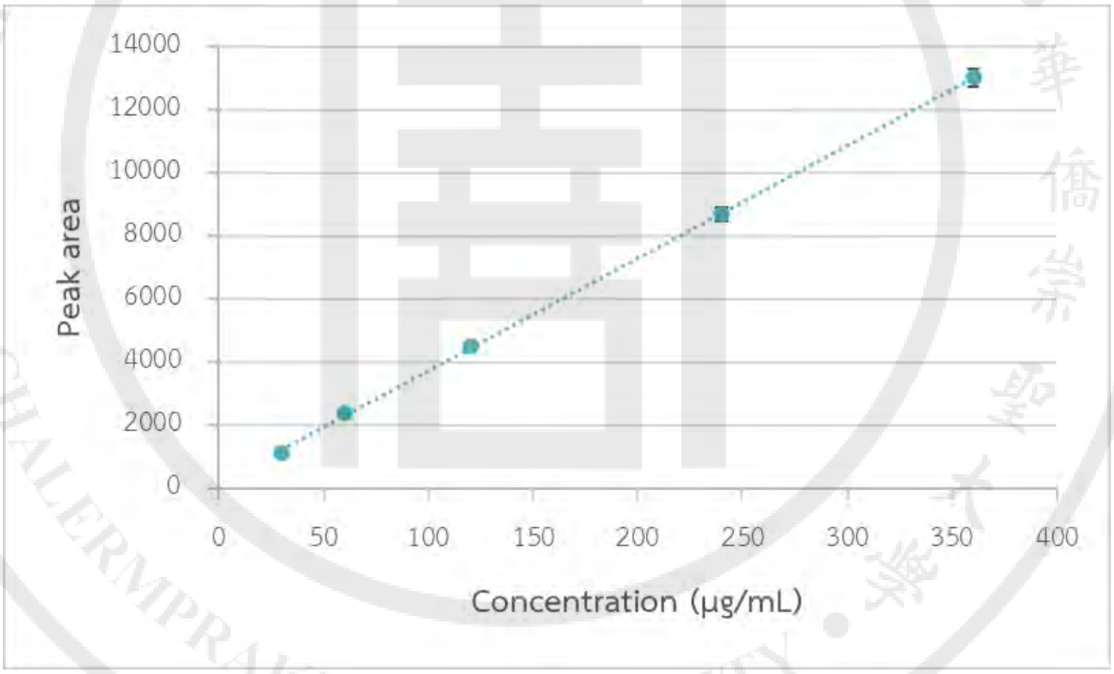


รูปที่ 3 HPLC chromatogram ของสารละลายมาตรฐาน mangiferin (สีแดง) และสารละลาย M2 (สีดำ)



รูปที่ 4 HPLC chromatogram ของสารละลายมาตรฐาน mangiferin (mgf) ความเข้มข้น 30, 60, 120, 240 และ 360 µg/mL

เมื่อนำค่าเฉลี่ยของ peak area และความเข้มข้นมาสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) แล้ววิเคราะห์หา linear regression equation, correlation coefficient (r) และ correlation of determination (r^2) ดังแสดงในรูปที่ 5 พบว่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน mangiferin ในช่วง 30 – 360 µg/mL มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง และมีทิศทางเดียวกันกับค่าเฉลี่ยของ peak area ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC เนื่องจากมีค่า r และ r^2 เท่ากับ 0.9994 และ 0.9988 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าเข้าใกล้ 1 (14,15) เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้น (linear regression) ดังแสดงในตารางที่ 3 พบว่า intercept มีค่าเท่ากับ 170.89 และ slope (X Variable 1) มีค่าเท่ากับ 35.71 เมื่อนำมาสร้างสมการเส้นตรงจะได้เป็น $y = 35.71x + 170.89$ ซึ่งสามารถใช้สมการเส้นตรงในการคำนวณเพื่อวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างที่มีช่วงความเข้มข้นอยู่ในช่วง 30 – 360 µg/mL ได้



รูปที่ 5 Calibration curve ของสารละลายมาตรฐาน mangiferin ที่ช่วงความเข้มข้น 30 – 360 µg/mL

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์ linear regression ของสารละลายมาตรฐาน mangiferin ที่ช่วงความเข้มข้น 30 – 360 µg/mL

Regression Statistics	
Multiple R	0.99940999
R Square	0.99882032
Adjusted R Square	0.99872958
Standard Error	161.341244
Observations	15

	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%	Lower 95.0%	Upper 95.0%
Intercept	170.894596	69.11238012	2.47270599	0.027991786	21.58637638	320.202816	21.5863764	320.202816
X Variable 1	35.7137173	0.340409644	104.913941	2.01055E-20	34.97830698	36.4491276	34.978307	36.4491276

3) ความเที่ยง (accuracy) และความแม่น (precision)

การประเมิน accuracy และ precision ด้วยการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน mangiferin ที่มีความเข้มข้น 100, 180 และ 250 µg/mL อย่างละ 3 ซ้ำ โดยใช้วิธี standard addition method ได้ค่า peak area ดังแสดงในตารางที่ 4 จากนั้นนำ peak area มาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน mangiferin โดยใช้สมการเส้นตรง $y = 35.71x + 170.89$ จาก calibration curve ที่ได้จากการทดสอบในหัวข้อ linearity และ range แล้วนำมาคำนวณหาร้อยละการกลับคืน (% recovery) เพื่อใช้ในการทดสอบพารามิเตอร์ accuracy ดังแสดงในตารางที่ 5 และนำค่า peak area ของการวิเคราะห์ในวันที่ 1 และ 2 มาคำนวณหาร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% relative standard deviation หรือ %RSD) เพื่อทดสอบพารามิเตอร์ intra-day และ inter-day precision ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 4 Peak area ของสารมาตรฐาน mangiferin และสารสกัด M2 (standard addition method) ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

Test	Day 1			Day 2		
	Peak area 1	Peak area 2	Peak area 3	Peak area 1	Peak area 2	Peak area 3
Sample (M2)	1636.912	1588.248	1648.686	1772.631	1783.4	1788.623
Standard (100 µg/mL) + sample	5260.719	5210.202	5267.738	5437.71	5394.326	5440.675
Standard (180 µg/mL) + sample	8085.763	8148.834	8234.986	8387.467	8409.65	8439.68
Standard (250 µg/mL) + sample	10653.511	10510.301	10556.934	10810.304	10755.508	10708.034

ตารางที่ 5 ผลการประเมิน accuracy ของวิธี HPLC

Nominal conc. (µg/mL)	Found conc. (µg/mL)	Average found conc. (µg/mL)	% Recovery
100	101.82	101.42	101.4
	100.10		
	102.02		
180	180.93	182.92	101.6
	182.70		
	185.11		
250	252.84	250.60	100.2
	248.83		
	250.13		

Note: conc. = concentration

ตารางที่ 6 ผลการประเมิน precision แบบ intra-day และ inter-day ของวิธี HPLC

Precision	Nominal concentration (µg/mL)	Average peak area	SD	%RSD
intra-day (n = 3)	100	3621.60	31.389	0.87
	180	6531.91	74.908	1.15
	250	8948.97	73.042	0.82
inter-day (n = 6)	100	3632.15	28.226	0.78
	180	6581.31	73.808	1.12
	250	8962.68	58.373	0.65

Note: SD = standard deviation, %RSD = % relative standard deviation

ผลการประเมิน accuracy พบว่า % recovery อยู่ในช่วง 100.2 – 101.6 แสดงว่าผ่านเกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐาน AOAC 2016 (15) ซึ่งกำหนดเกณฑ์การยอมรับของ % recovery อยู่ที่ 98 – 102% ส่วนผลการทดสอบ intra-day และ inter-day precision พบว่า %RSD

อยู่ในช่วง 0.65 – 1.15 ซึ่งกำหนดเกณฑ์การยอมรับที่ ≤ 2% จึงผ่านเกณฑ์การยอมรับเช่นเดียวกัน แสดงว่าการวิเคราะห์ mangiferin ในสารสกัดใบมะม่วงด้วยวิธี HPLC มีความน่าเชื่อถือ สามารถให้ค่าการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องและแม่นยำ

4) ขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ)

ผลของ LOD และ LOQ จากการคำนวณโดยอาศัยข้อมูล linear regression ของ calibration curve จากการวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน mangiferin ในช่วง 30 – 360 μg/mL ด้วยวิธี HPLC ซึ่งมีค่า slope (S) เท่ากับ 35.71 และ standard deviation ของ y-intercept (σ) เท่ากับ 69.11 พบว่า LOD หรือความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่พบได้จากการวิเคราะห์ มีค่าเท่ากับ 6.4 μg/mL ส่วน LOQ หรือความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่วิเคราะห์หาปริมาณได้ มีค่าเท่ากับ 19.4 μg/mL

4.4 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณ mangiferin ด้วยวิธี IR spectroscopy

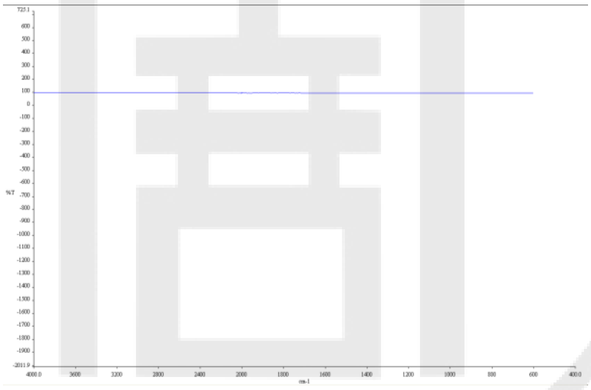
การพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณ mangiferin ด้วยวิธี IR spectroscopy ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาโดยใช้เครื่อง FT-IR spectrometer ร่วมกับ ATR accessory โดยเลือก reflectance mode ซึ่งทำได้โดยเปรียบเทียบ peak area จาก IR spectrum ของสารมาตรฐาน mangiferin กับสารสกัดจากใบมะม่วง โดยใช้ KBr เป็น diluent ซึ่งก่อนการใช้ KBr ทุกครั้งจะต้องนำไปอบที่อุณหภูมิ 110 °C อย่างน้อย 2 ชั่วโมงเพื่อกำจัดความชื้น สำหรับการเตรียมสารผสม (mixture) ในรูปแบบของแข็งก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี IR spectroscopy พบว่าจะต้องนำสารที่ต้องการวิเคราะห์มาบดผสมกับ KBr โดยควบคุมเวลา 2 นาทีให้เท่ากันทุกครั้ง เพื่อให้มั่นใจว่าสารที่ต้องการวิเคราะห์มีอนุภาคละเอียดมากเพียงพอ เนื่องจากขนาดอนุภาคของสารจะส่งผลต่อ peak area ที่เกิดขึ้น แล้วจึงนำสารผสมไปวิเคราะห์ เมื่อเตรียมสารให้มีความเข้มข้นต่างๆ ในหน่วย %w/w แล้วสามารถนำสารปริมาณที่มากเพียงพอวางลงบน ATR crystal โดยต้องควบคุมปริมาณให้สามารถปิดบริเวณ ATR crystal ได้สนิท โดยไม่จำเป็นต้องชั่งให้มีน้ำหนักที่แน่นอน ในการวิเคราะห์จะต้องมีการควบคุมแรงกด (force gauge) ที่ใช้ในการวัด ซึ่งพบว่าการใช้ force gauge ที่มีค่าเท่ากับ 80 มีความเหมาะสม นอกจากนี้ยังมีการกำหนดสภาวะที่ใช้วิเคราะห์ให้มี resolution = 4 cm^{-1}, scan number = 3 และ scan wavenumber = 4000 – 600 cm^{-1} ในทุกครั้งของการวิเคราะห์ สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณของ mangiferin โดยอาศัย peak area ($T{\cdot}cm^{-1}$) จาก IR spectrum พบว่าการเลือกข้อมูลของ wavenumber ที่อยู่ในช่วง 1700 – 930 cm^{-1} มีความเหมาะสมมากที่สุดในการนำมาใช้เพื่อคำนวณหาปริมาณ ดังนั้นจึงใช้สภาวะวิเคราะห์ดังกล่าวมาตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation) เพื่อหาปริมาณ mangiferin ในสารสกัดใบมะม่วงน้ำดอกไม้

4.5 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณ mangiferin ด้วยวิธี IR spectroscopy

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณ mangiferin ด้วยเทคนิค IR spectroscopy โดยใช้ ATR accessory เป็นไปตาม ICH 2005 guideline (14) โดยทดสอบในหัวข้อ specificity, linearity, range, accuracy, precision, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ) และ robustness ซึ่งผลการประเมินในแต่ละพารามิเตอร์มีรายละเอียดดังนี้

1) ความจำเพาะเจาะจง (specificity)

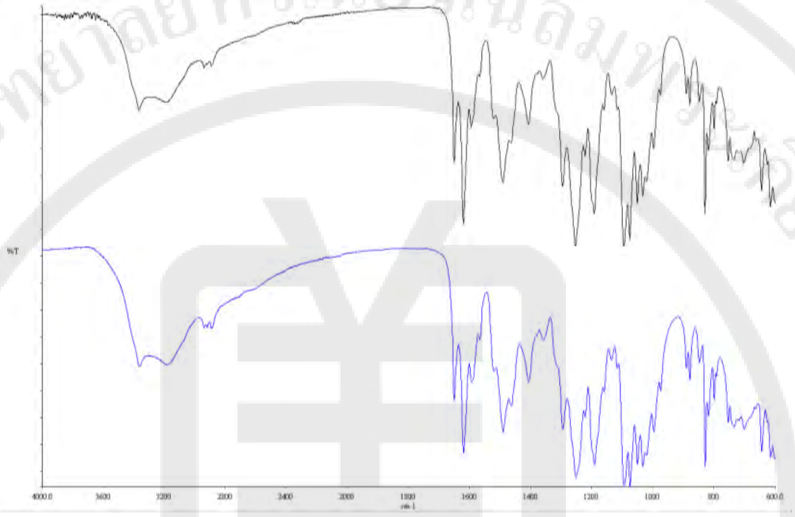
เนื่องจากการวิเคราะห์เชิงปริมาณของ mangiferin ในงานวิจัยนี้ ได้มีการใช้สาร KBr เป็น diluent เพื่อให้มั่นใจว่า KBr ที่ใช้มีความบริสุทธิ์มากเพียงพอ ปราศจากความชื้น และไม่รบกวนการวิเคราะห์ จึงทำการวิเคราะห์ IR spectrum ของ KBr ด้วยสภาวะที่กำหนด ดังแสดงในรูปที่ 6 พบว่าไม่ปรากฏ peak ที่รบกวนการวิเคราะห์ในช่วง wavenumber 4000 – 600 cm^{-1} ซึ่งเป็นช่วง wavenumber ที่ใช้ในการวิเคราะห์



รูปที่ 6 IR spectrum ของ KBr

นอกจากนี้เพื่อยืนยันว่าสารสกัดตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ประกอบไปด้วย mangiferin เป็นองค์ประกอบหลัก จึงได้ทำการเปรียบเทียบ IR spectrum ระหว่างสารสกัดตัวอย่าง (M2) และสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 50 %w/w ดังแสดงในรูปที่ 7 แล้วนำข้อมูลไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง 2 spectra โดยอาศัยการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Spectrum version 6.1.0 พบว่าค่า correlation ของทั้ง 2 spectra มีค่าเท่ากับ 0.9686 (> 0.95) และค่า discrimination เท่ากับ 0.031 (< 0.05) แสดงว่า spectrum ของสารมาตรฐาน mangiferin มีความใกล้เคียงกับสารสกัดตัวอย่าง และไม่พบ peak ของ functional group ใดๆ ที่มีความแตกต่างกัน นอกจากนี้การ

เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี IR spectroscopy กับวิธี HPLC ซึ่งจะกล่าวต่อไปในหัวข้อ 4.6 พบว่าผลการวิเคราะห์ที่ได้จากทั้ง 2 วิธีมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 นั่นแสดงว่าวิธี IR spectroscopy มีความจำเพาะเจาะจงต่อการวิเคราะห์ mangiferin ที่เป็นองค์ประกอบหลักในสารสกัดใบมะม่วงน้ำดอกไม้

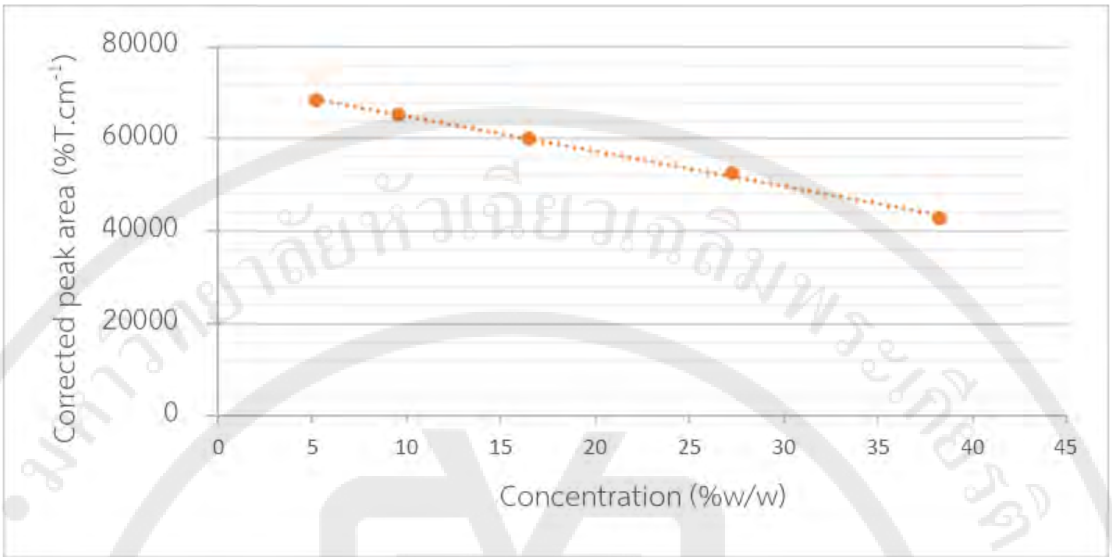


รูปที่ 7 IR spectra ของสารมาตรฐาน mangiferin (สีดำ) และสารสกัด M2 (สีน้ำเงิน)

2) ความเป็นเส้นตรง (linearity) และพิสัย (range)

งานวิจัยนี้ทดสอบหัวข้อ linearity และ range โดยวิเคราะห์สารมาตรฐาน mangiferin 5 ความเข้มข้นที่อยู่ในช่วง 5 – 40 %w/w โดยกำหนดให้ scan จำนวน 3 ครั้ง แล้วนำค่า corrected peak area ($T{\cdot}cm^{-1}$) ที่ wavenumber 1700 – 930 cm^{-1} และความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่วิเคราะห์มาสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) แล้ววิเคราะห์หา linear regression equation, correlation coefficient (r) และ correlation of determination (r^2) ดังแสดงในรูปที่ 8 และตารางที่ 7 พบว่าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน mangiferin ในช่วง 5 – 40 %w/w มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง และมีทิศทางตรงกันข้ามกับค่า corrected peak area ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย ATR-FTIR เนื่องจากมีค่า r เท่ากับ 0.9989 และ r^2 เท่ากับ 0.9978 ซึ่งมีค่าเข้าใกล้ 1 (14,15) และเมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้น (linear regression) พบว่า intercept มีค่าเท่ากับ 72561 และ slope (X Variable 1) มีค่าเท่ากับ -760.1 เมื่อนำมาสร้างสมการเส้นตรงจะได้เป็น $y = -760.1x + 72561$ ซึ่งสามารถใช้สมการนี้ในการคำนวณเพื่อวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ทำการทดสอบในช่วง 5 – 40 %w/w ได้

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY 華僑崇



รูปที่ 8 Calibration curve ของสารมาตรฐาน mangiferin ที่ช่วงความเข้มข้น 5 – 40 %w/w

3) ความเที่ยง (accuracy) และความแม่น (precision)

สำหรับการประเมิน accuracy ของการวิเคราะห์ด้วยวิธี IR spectroscopy ทำโดยการวิเคราะห์สารมาตรฐาน mangiferin ที่มีความเข้มข้น 5, 15 และ 25 %w/w อย่างละ 3 ซ้ำ โดยใช้วิธี spiked blank method และใช้สารมาตรฐาน 15% w/w mangiferin ทำการวิเคราะห์ 6 ซ้ำ เพื่อประเมิน precision ทั้งแบบ intra-day และ inter-day โดยใช้วิธี standard addition มาวิเคราะห์หา corrected peak area แล้วนำมาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารมาตรฐานโดยใช้สมการเส้นตรงที่สร้างขึ้นใหม่เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน จากนั้นนำค่า corrected peak area มาคำนวณหาร้อยละการกลับคืน (% recovery) เพื่อใช้ในการประเมิน accuracy ดังแสดงในตารางที่ 8 และนำความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่วิเคราะห์ได้ (amount found) ของการวิเคราะห์ของในวันที่ 1 และ 2 มาคำนวณหาร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% relative standard deviation หรือ %RSD) เพื่อประเมินพารามิเตอร์ intra-day และ inter-day precision ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 7 ผลการวิเคราะห์ Linear regression ของสารมาตรฐาน mangiferin ที่ช่วงความเข้มข้น 5.18 – 34 %w/w

Regression Statistics	
Multiple R	0.998948
R Square	0.997898
Adjusted R Square	0.997197
Standard Error	542.2794
Observations	5

	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%	Lower 95.0%	Upper 95.0%
Intercept	72561.49	458.8431	158.1401	5.58E-07	71101.25	74021.73	71101.25	74021.73
X Variable 1	-760.096	20.14258	-37.7358	4.09E-05	-824.199	-695.994	-824.199	-695.994

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ • 華僑崇聖大學 • HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY

ตารางที่ 8 ผลการประเมิน accuracy ของวิธี IR spectroscopy

Nominal concentration (%w/w)	Average peak area ($T\cdot cm^{-1}$)	Found concentration (%w/w)	% Recovery
9.55	65260.33	9.60	100.6
16.45	60163.62	16.31	99.15
38.24	42979.47	38.92	101.8

ตารางที่ 9 ผลการประเมิน precision แบบ intra-day และ inter-day ของวิธี IR spectroscopy

No.	Corrected peak area ($T\cdot cm^{-1}$)	
	Day1	Day 2
1	53917.15	56523.76
2	53086.07	56572.79
3	52767.01	56494.57
4	52705.03	56406.5
5	52600.42	56205.81
6	52558.97	56959.12
Average	52939.11	56527.09
SD	469.36	226.41
%RSD	0.89	0.40

ผลการทดสอบพารามิเตอร์ accuracy พบว่า % recovery อยู่ในช่วง 99.15 – 101.8 แสดงว่าผ่านเกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐาน AOAC 2016 (15) ซึ่งกำหนดเกณฑ์การยอมรับของ % recovery อยู่ที่ 98 – 102% ส่วนผลการทดสอบ intra-day precision พบว่า %RSD อยู่ในช่วง 0.89 และ 0.40 ซึ่งกำหนดเกณฑ์การยอมรับ ≤ 2% จึงผ่านเกณฑ์การยอมรับเช่นเดียวกัน สำหรับการทดสอบ inter-day precision นั้น ใช้การวิเคราะห์ F-test ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของผลการวิเคราะห์จากทั้งสองวันว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่ โดยการคำนวณค่า F เทียบกับ critical F ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (7.15) พบว่าค่า F ที่คำนวณได้เท่ากับ 4.30 ซึ่งมีค่าน้อยกว่า critical F แสดงว่าผลการวิเคราะห์ทั้ง 2 วันมีความแปรปรวนที่ไม่แตกต่างกัน จึงถือว่า inter-day precision อยู่ในเกณฑ์การยอมรับเช่นเดียวกัน (14,15) จากผลการประเมิน accuracy และ

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY
華僑崇聖大學

precision แสดงว่าการวิเคราะห์ปริมาณของ mangiferin ในสารสกัดใบมะม่วงด้วยวิธี IR spectroscopy ที่พัฒนาขึ้นภายใต้สภาวะวิเคราะห์ที่กำหนดมีความน่าเชื่อถือ สามารถให้ค่าการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องและแม่นยำ

4) ขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ)

LOD และ LOQ ของการวิเคราะห์นี้คำนวณได้โดยอาศัยข้อมูลจาก linear regression ของ calibration curve ซึ่งได้มาจากการวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน mangiferin ในช่วง 5 – 40 %w/w ด้วยวิธี FT-IR ที่พัฒนาขึ้น ซึ่งพบว่า slope (S) มีค่าเท่ากับ -760.096 ร่วมกับการใช้ข้อมูล standard deviation (SD) ของการวิเคราะห์ blank ซึ่งมีค่าเท่ากับ 254.678 เมื่อนำไปคำนวณหา LOD หรือความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่พบได้จากการวิเคราะห์ มีค่าเท่ากับ 1.11 %w/w และเมื่อคำนวณหา LOQ หรือความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่วิเคราะห์หาปริมาณได้ มีค่าเท่ากับ 3.35 %w/w

5) ความคงทน (robustness)

ผลวิเคราะห์สารมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 15 %w/w โดยเปลี่ยนแปลงแรงกด (force gauge) ให้มีค่า 75, 80 และ 85 แล้วเปรียบเทียบ peak area เพื่อหา %RSD ผลที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 10 พบว่าค่า peak area ที่ได้มี %RSD เท่ากับ 1.79 ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับ แสดงว่าการเปลี่ยนแปลง force gauge ในช่วง ± 5 ไม่ได้มีผลต่อการวิเคราะห์ด้วยวิธี IR spectroscopy

ตารางที่ 10 ผลการประเมิน robustness ของการวิเคราะห์ด้วยวิธี IR spectroscopy

Force gauge	Peak area ($T \cdot cm^{-1}$)
75	54986.01
80	53917.15
85	53059.44
Average	53987.53
SD	965.21
%RSD	1.79

4.6 การวิเคราะห์หาปริมาณ mangiferin จากสารสกัดใบมะม่วงด้วยวิธี HPLC และ IR spectroscopy ที่พัฒนาขึ้น

วิธี HPLC และ IR spectroscopy ที่ผ่านการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์แล้ว ได้ถูกนำมาใช้เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณของ mangiferin ในสารสกัด M1 – M5 ซึ่งผลจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC แสดงดังตารางที่ 11 พบว่า % relative difference ของ peak area จากการวิเคราะห์ 2 ครั้งอยู่ในช่วง 0.01 – 0.42 และ average peak area อยู่ในช่วง 6235.622 – 7984.588 mV·s เมื่อนำมาคำนวณหาความเข้มข้น (µg/mL) โดยใช้สมการเส้นตรง $y = 35.71x + 170.89$ พบว่าสารสกัด M1 – M5 มีความเข้มข้นของ mangiferin อยู่ในช่วง 170.16 – 218.79 µg/mL เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างที่เตรียม คือ 200 µg/mL แล้วคำนวณย้อนกลับ พบปริมาณของ mangiferin ในสารสกัด M1 – M5 อยู่ในช่วง 85.08 – 109.40 %w/w

สำหรับผลจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี IR spectroscopy แสดงดังตารางที่ 12 พบว่า % relative difference ของ peak area จากการวิเคราะห์ 2 ครั้งอยู่ในช่วง 0.58 – 1.67 เมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์สารสกัด M1 – M5 ด้วย HPLC และ IR spectroscopy พบว่า % relative difference ของ peak area จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC มีค่าน้อยกว่าการวิเคราะห์ด้วยวิธี IR แสดงว่าการวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวน 2 ซ้ำ โดยวิธี IR spectroscopy มีความแตกต่างกันมากกว่า เพื่อลดความผิดพลาดจากการวิเคราะห์ จึงอาจพิจารณาเพิ่มจำนวนการวิเคราะห์ตัวอย่างซ้ำของวิธี IR spectroscopy แล้ววิเคราะห์ความแตกต่างของผลการวิเคราะห์ที่ได้โดยคำนวณในรูปแบบ %RSD แทน เมื่อพิจารณา peak area (%T·cm^{-1}) ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี IR spectroscopy พบว่าอยู่ในช่วง 42307.095 – 56466.900 เมื่อนำมาคำนวณหาความเข้มข้น (%w/w) โดยใช้ standard comparison (single point) โดยเทียบกับสารมาตรฐาน mangiferin ที่ความเข้มข้น 9.55 %w/w ซึ่งมี peak area เท่ากับ 68,834.38 พบว่าสารสกัด M1 – M5 มีความเข้มข้นของ mangiferin อยู่ในช่วง 12.74 – 17.01 %w/w และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของตัวอย่างที่เตรียม (amount added) แล้วคำนวณเป็น %w/w พบว่าปริมาณของ mangiferin ในสารสกัด M1 – M5 อยู่ในช่วง 81.33 – 98.95 %w/w

ตารางที่ 11 ผลจากการวิเคราะห์ปริมาณ mangiferin ในสารสกัด M1 – M5 ด้วยวิธี HPLC

Sample	Peak area (mV·s)		% Relative difference	Average peak area (mV·s)	Concentration (µg/mL)	Amount found (%w/w)
	Assay 1	Assay 2				
M1	7220.780	7208.839	0.17	7214.810	197.09	98.54
M2	7181.075	7150.861	0.42	7165.968	195.46	97.73
M3	6223.832	6247.412	0.38	6235.622	170.16	85.08
M4	7465.232	7433.605	0.42	7449.419	203.38	101.69
M5	7985.093	7984.022	0.01	7984.558	218.79	109.40

ตารางที่ 12 ผลจากการวิเคราะห์ปริมาณ mangiferin ในสารสกัด M1 – M5 ด้วยวิธี IR spectroscopy

Sample	Peak area (%T·cm^{-1})		% Relative difference	Average peak area (%T·cm^{-1})	Calculated Concentration (%w/w)	Amount added (g)	Amount found (%w/w)
	Assay 1	Assay 2					
M1	50204.48	50894.32	1.36	50549.400	14.24	16.54	86.07
M2	41953.05	42661.14	1.67	42307.095	17.01	17.19	98.95
M3	51474.06	51771.45	0.58	51622.755	13.94	14.51	96.07
M4	56782.93	56150.87	1.12	56466.900	12.74	14.92	85.42
M5	53955.01	54480.88	0.97	54217.945	13.27	16.32	81.33

เพื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณ mangiferin ในสารสกัด M1 – M5 ด้วยวิธี HPLC และ IR spectroscopy ว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่ โดยอาศัยการวิเคราะห์ paired t-test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังแสดงในตารางที่ 13 พบว่า calculated t (t Stat) มีค่าน้อยกว่า t critical นั่นแสดงว่าการวิเคราะห์ทั้ง 2 วิธีให้ผลการวิเคราะห์ที่แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางที่ 13 ผลการทดสอบ paired t-test ระหว่างวิธี HPLC และ IR spectroscopy ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

Data	Variable 1	Variable 2
Mean	98.488	89.568
Variance	77.41907	56.90112
Observations	5	5
Pearson Correlation	0.744468517	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	4	
t Stat	1.306284944	
P(T ≤ t) two-tail	0.261505462	
t Critical two-tail	2.776445105	

IR spectroscopy เป็นวิธีวิเคราะห์มีความเหมาะสมเช่นเดียวกันกับ HPLC ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ ซึ่งการใช้วิธี IR spectroscopy โดยใช้เทคนิค ATR มีข้อดี คือ สามารถเตรียมสารตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ได้ง่ายกว่า สามารถวิเคราะห์ได้รวดเร็วกว่า กระบวนการวิเคราะห์ไม่จำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ จึงเป็นวิธีวิเคราะห์ที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้นนอกจากการใช้วิธี HPLC ซึ่งเป็นวิธีทั่วไปที่ได้รับการยอมรับแล้ว ยังสามารถเลือกใช้วิธี IR spectroscopy เป็นอีกทางเลือกหนึ่งเพื่อการวิเคราะห์ mangiferin จากสารสกัดจากใบมะม่วงน้ำดอกไม้ได้เช่นเดียวกัน

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ mangiferin โดยใช้วิธี HPLC และ IR spectroscopy สำหรับใช้ในการควบคุมคุณภาพสารสกัดจากใบมะม่วงน้ำดอกไม้ที่มี mangiferin เป็นองค์ประกอบหลัก ดังนั้นเพื่อให้เกิดความมั่นใจและความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น จึงจำเป็นต้องมีกระบวนการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ตามแนวทางของ ICH 2005 และ AOAC 2016 โดยการวิเคราะห์ด้วย HPLC จะประเมินในหัวข้อ specificity, linearity, range, accuracy, precision, limit of detection (LOD) และ limit of quantitation (LOQ) ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับ ผลจากการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์พบว่า HPLC chromatogram ของสารสกัดใบมะม่วงมี peak ของ mangiferin ที่แยกออกจากองค์ประกอบอื่นอย่างชัดเจน เมื่อวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน mangiferin ในช่วงความเข้มข้น 60 – 360 µg/mL พบว่ามีค่า $r = 0.9994$ และ $r^2 = 0.9988$ นอกจากนี้ยังพบว่ามี % recovery และ %RSD มีค่าอยู่ในช่วง 100.2 – 101.6 และ 0.65 – 1.15 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ เมื่อคำนวณ LOD และ LOQ โดยอาศัยข้อมูล slope และ SD ของ y-intercept จาก calibration curve พบว่ามีค่าเท่ากับ 6.4 และ 19.4 µg/mL ตามลำดับ

สำหรับการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ mangiferin ในสารสกัดใบมะม่วงน้ำดอกไม้ด้วยวิธี IR spectroscopy ได้ทำการประเมินในหัวข้อ specificity, linearity, range, accuracy, precision, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ) และ robustness ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับ โดยพบว่า IR spectrum ของสารสกัดใบมะม่วงมีลักษณะปรากฏที่ใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน mangiferin เมื่อทำการวิเคราะห์สารมาตรฐาน mangiferin ใน KBr ที่ความเข้มข้นในช่วง 5 – 40 %w/w พบว่ามีค่า $r = 0.9989$ และ $r^2 = 0.9978$ จึงสามารถวิเคราะห์ mangiferin ที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วงดังกล่าวได้ ส่วนผลการประเมิน accuracy และ precision พบว่า % recovery และ %RSD มีค่าอยู่ในช่วง 99.15 – 101.8 และ 0.40 - 0.89 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ เมื่อคำนวณ LOD และ LOQ โดยอาศัยข้อมูล slope จาก calibration curve ร่วมกับ SD ของการวิเคราะห์ blank พบว่ามีค่าเท่ากับ 1.11 และ 3.35 %w/w ตามลำดับ

จากผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทั้ง HPLC และ IR spectroscopy แล้วพบว่าทุกหัวข้อของการประเมินอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ เมื่อนำวิธีวิเคราะห์ทั้ง 2 วิธีมาประยุกต์ใช้ในการหาปริมาณ mangiferin จากสารสกัดใบมะม่วง 5 ตัวอย่าง (M1 – M5) ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ พบว่าการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC มี % relative difference ของผลวิเคราะห์ที่น้อยกว่าการวิเคราะห์ด้วย

วิธี IR spectroscopy ซึ่งหากต้องการให้การวิเคราะห์ด้วยวิธี IR spectroscopy มีความน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น ควรเพิ่มจำนวนของการวิเคราะห์ซ้ำ ส่วนปริมาณ mangiferin ที่พบจากทั้งสองวิธีมีค่าที่แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p-value = 0.26) โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC พบปริมาณ mangiferin ในสารสกัดใบมะม่วงน้ำดอกไม้ที่มีแหล่งปลูกในจังหวัดสมุทรปราการอยู่ในช่วง 85.05 – 109.40 %w/w ส่วนการวิเคราะห์ด้วยวิธี IR spectroscopy พบปริมาณ mangiferin ของสารสกัดอยู่ในช่วง 81.33 – 98.95 %w/w นั่นแสดงว่าสามารถเลือกใช้วิธี HPLC หรือ IR spectroscopy ในการวิเคราะห์ mangiferin เพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพของสารสกัดจากใบมะม่วงน้ำดอกไม้ได้

อย่างไรก็ตาม ในกระบวนการทำ analytical method validation อาจพิจารณาทำการทดลองเพิ่มเติมเพื่อให้งานมีความสมบูรณ์มากขึ้น เช่น ภายใต้หัวข้อ specificity ของ HPLC method อาจต้องพิจารณาถึง peak purity เพิ่มเติม ส่วนการทดสอบ specificity ด้วยเทคนิค IR spectroscopy อาจจำเป็นต้องพิจารณาถึงสารอื่นๆที่ปรากฏอยู่ในสารสกัดและอาจกระทบต่อผลการวิเคราะห์ โดยการพิจารณาวิเคราะห์ method linearity เพิ่มเติมจาก system linearity ในส่วนของการกำหนดค่า LOD และ LOQ อาจพิจารณาทดลองหาความเข้มข้นที่แท้จริงเพิ่มเติมนอกเหนือจากการประมาณค่าด้วยวิธีการคำนวณเพียงอย่างเดียว เป็นต้น สำหรับขั้นตอนการวิเคราะห์หาปริมาณ mangiferin ด้วย IR ยังสามารถทำได้โดยการคำนวณจากสมการเส้นตรงที่ได้จาก calibration curve ซึ่งจากการทดลองเบื้องต้นพบว่า การทำ calibration curve ควรทำการทดลองในช่วงเวลาเดียวกันกับการวิเคราะห์สารตัวอย่าง นอกจากนี้ การวิเคราะห์โดยใช้วิธี standard comparison (single point) อาจพิจารณาข้อมูลจาก calibration curve ซึ่งใช้ค่า corrected peak area ที่ได้จากการวิเคราะห์ในโหมด absorption แทน transmission แล้วพิจารณาค่า p-value ของ y-intercept เพิ่มเติมโดยที่ค่า intercept significant ควรมีค่ามากกว่า 0.05 นอกจากนี้ การพิจารณาช่วงผลการทดสอบตัวอย่าง อาจเพิ่มเติมการพิจารณาผลการวิเคราะห์ในทางปฏิบัติร่วมกับการพิจารณาข้อมูลจากสถิติ เช่น การพิจารณาขอบบน-ขอบล่างของผลการวิเคราะห์ เพื่อลดความคลาดเคลื่อนของการวิเคราะห์ และทำให้ผลการทดลองที่ได้มีความน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. สำนักข่าว กรมประชาสัมพันธ์. จ.สมุทรปราการ จัดมหกรรมวันมะม่วงน้ำดอกไม้สมุทรปราการ [อินเทอร์เน็ต]. กรุงเทพฯ: สำนักข่าว กรมประชาสัมพันธ์; 2565. เข้าถึงได้จาก: https://thainews.prd.go.th/th/news/detail/TCATG220311195304083.
2. Davenport TL. Pruning strategies to maximize tropical mango production from the time of planting to restoration of old orchards. HortScience. 2006;41(3):544-48.
3. Du S, Liu H, Lei T, Xie X, Wang H, He X, et al. Mangiferin: An effective therapeutic agent against several disorders (Review). Mol Med Rep. 2018;18(6):4775-86.
4. กองผลิตภัณฑ์สมุนไพร สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. พระราชบัญญัติผลิตภัณฑ์สมุนไพร พ.ศ. 2562. กรุงเทพฯ: สำนักงานกิจการโรงพิมพ์ องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึกในพระบรมราชูปถัมภ์; 2562.
5. Liang YZ, Xie P, Chan K. Quality control of herbal medicines. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2004;812(1-2):53-70.
6. Junaedi EC, Lestari K, Muchtaridi M. Infrared spectroscopy technique for quantification of compounds in plant-based medicine and supplement. J Adv Pharm Technol Res. 2021;12(1):1-7.
7. Barreto JC, Trevisan MTS, Hull WE, Erben G, de Brito ES, Pfundstein B, et al. Characterization and quantitation of polyphenolic compounds in bark, kernel, leaves, and peel of mango (*Mangifera indica* L.). J Agric Food Chem. 2008;56(14):5599-610.
8. Jutiviboonsuk A, Sardsaengjun C. Mangiferin in leaves of three Thai mango (*Mangifera indica* L.) varieties. Isan J Pharm Sci. 2010;6(3):122-9.
9. Ochocka R, Hering A, Stefanowicz-Hajduk J, Cal K, Baranska H. The effect of mangiferin on skin: Penetration, permeation and inhibition of ECM enzymes. PLoS One. 2017;12(7):e0181542.
10. Allaw M, Pleguezuelos-Villa M, Manca ML, Caddeo C, Aroffu M, Nacher A, et al. Innovative strategies to treat skin wounds with mangiferin: Fabrication of transfersomes modified with glycols and mucin. Nanomedicine (Lond). 2020;15(17):1671-85.

11. Sapin A, Alaon M. Evaluation of the bioactivities of natural phenolics from mango (*Mangifera indica* Linn) leaves for cosmetic industry applications. Philipp J Sci. 2021;150(2):397-406.
12. Van Wyk AS, Prinsloo G. Health, safety and quality concerns of plant-based traditional medicines and herbal remedies. S Afr J Bot. 2020;133(11):54-62.
13. Shen MR, He Y, Shi SM. Development of chromatographic technologies for the quality control of Traditional Chinese Medicine in the Chinese Pharmacopoeia. J Pharm Anal. 2021;11(2):155-62.
14. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). Geneva: ICH Steering Committee; 2005.
15. Appendix F: Guidelines for standard method performance requirements. In: Latimer GW, editor. Official methods of analysis of AOAC International, volume I. 20th ed. Maryland: AOAC International; 2016.

ประวัติย่อผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ-นามสกุล	ดร.ภญ.สุธีรา ญานะโส
ประวัติการศึกษา	ภ.บ. เกียรตินิยมอันดับ 1 มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ภ.ม. (เภสัชเคมีและเภสัชพฤกษเคมี หลักสูตรนานาชาติ) มหาวิทยาลัยมหิดล ปร.ด. (เภสัชศาสตร์) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
สถานที่ติดต่อ	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ โทรศัพท์ 02-312-6300 ต่อ 1215 หรือ 1494

ผู้วิจัย

ชื่อ-นามสกุล	ผศ.ดร.ภญ.อรัญญา จุติวิบูลย์สุข
ประวัติการศึกษา	ภ.บ. เกียรตินิยมอันดับ 2 มหาวิทยาลัยมหิดล ปร.ด. (เภสัชเคมีและเภสัชพฤกษเคมี) มหาวิทยาลัยมหิดล
สถานที่ติดต่อ	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ โทรศัพท์ 02-312-6300 ต่อ 1215 หรือ 1494

ผู้วิจัย

ชื่อ-นามสกุล	ภก.ภูริต ธนะรังสฤษฏ์
ประวัติการศึกษา	ภ.บ. (บริบาลเภสัชกรรม) มหาวิทยาลัยนเรศวร วท.ม. (เภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ) มหาวิทยาลัยนเรศวร
สถานที่ติดต่อ	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ โทรศัพท์ 02-312-6300 ต่อ 1215 หรือ 1494

ผู้วิจัย

ชื่อ-นามสกุล	ดร.ภญ.กนกภรณ์ สวัสดี
ประวัติการศึกษา	ภ.บ. มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ภ.ม. (เภสัชเวท) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย วท.ด. (เภสัชเวท) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
สถานที่ติดต่อ	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ โทรศัพท์ 02-312-6300 ต่อ 1215 หรือ 1494

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ • 華僑崇聖大學 • HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY