Original Article

วิธีวิเคราะห์บ่งชี้ความคงตัวของ *trans*-resveratrol ในตัวอย่างวัตถุดิบและรูปแบบเม็ดโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูงยิ่งยวด

กริชอมร จิตรรังศรี, อมรรัตน์ ไชยเดชกำจร[2], มาลัย สถิรพันธุ์[*]

Received: 28 June 2015 **Accepted:** 22 Septemeber 2015

บทคัดย่อ

บทนำ: *Trans*-Resveratrol เป็นสารกลุ่มฟีนอลิกที่พบในผลไม้ตระกูลเบอร์รี่และถั่ว แสดงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลากหลาย มีวิธีวิเคราะห์หลายวิธีที่ถูกพัฒนาเพื่อหาปริมาณ *t*-resveratrol ในผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ แต่ยังไม่มีวิธีวิเคราะห์ใดที่ใช้บ่งชี้ความคงตัวของสารในรูปวัตถุดิบและรูปแบบเม็ด งานวิจัยนี้พัฒนาขึ้นเพื่อหาวิธีวิเคราะห์บ่งชี้ความคงตัวของสาร *t*-resveratrol โดยเทคนิค โครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูงยิ่งยวด (UPLC) และทดสอบความถูกต้องของวิธีตามข้อกำหนดของ The International Conference on Harmonization (ICH) นอกจากนั้นผู้วิจัยได้ทำการศึกษาความคงตัวของผลิตภัณฑ์ในสภาวะเร่ง ความคงตัวของสารละลายมาตรฐาน และความคงตัวในเครื่องฉีดตัวอย่างอัตโนมัติ **วิธีดำเนินการวิจัย:** พัฒนาวิธีวิเคราะห์ด้วย UPLC และทดสอบความถูกต้องของวิธีในหัวข้อ ความแม่น ความเที่ยง ความจำเพาะเจาะจง ขีดจำกัดการวิเคราะห์ ขีดจำกัดการตรวจวัดปริมาณ ความเป็นเส้นตรง ช่วงการวิเคราะห์ ความทนของวิธี พร้อมศึกษาความคงตัวของผลิตภัณฑ์หลังเก็บในสภาวะเร่งเป็นเวลา 1 เดือน และเปรียบเทียบพื้นที่พีคระหว่างสารละลายมาตรฐานที่เก็บในอุณหภูมิต่างๆ กับที่เตรียมขึ้นใหม่ **ผลการศึกษา:** สภาวะ UPLC ที่เหมาะสมคือ ใช้คอลัมน์รีเวิร์สเฟส C18 เฟสเคลื่อนที่แบบเกรเดียนท์ระหว่างอะซิโตไนไตรล์และน้ำ เวลาวิเคราะห์ 3 นาที อัตราการไหล 0.4 มิลลิลิตร/นาที ตรวจวัดด้วย UV ความยาวคลื่น 306 นาโนเมตร พบว่าพีคของสารสลายตัวที่เกิดจากการเร่งปฏิกิริยาแยกออกจากพีคสารหลัก และพีคหลักมีความบริสุทธิ์ในทุกสภาวะการทดสอบ วิธีวิเคราะห์มีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.4 – 1.8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีค่าสัมประสิทธิ์การกำหนด (r^2) เท่ากับ 0.9999 การทดสอบความเที่ยงแบบภายในวันและต่างวัน มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) น้อยกว่า 2.0 และมีค่าการได้กลับคืน (%recovery) ของวิธีเท่ากับ 99.04% และ 99.93% สำหรับตัวอย่างวัตถุดิบและรูปแบบเม็ดตามลำดับ ค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 0.01 และ 0.02 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาณของ *t*-resveratrol ที่วิเคราะห์ได้จากการเปลี่ยนแปลงสภาวะวิเคราะห์อยู่ในช่วง ±2% เทียบกับวิธีที่พัฒนาขึ้น ตัวอย่างคงตัวเป็นเวลา 1 เดือนเมื่อเก็บที่สภาวะ 40°C 75%RH สารละลายมาตรฐานคงตัวเป็นเวลา 25 วันที่อุณหภูมิ –20°C และ 2 วันเมื่อเก็บในเครื่องฉีดตัวอย่างอัตโนมัติที่อุณหภูมิห้อง **สรุปผลการวิจัย:** วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีความแม่น ความเที่ยง ความน่าเชื่อถือและเหมาะสมที่จะเป็นวิธีวิเคราะห์บ่งชี้ความคงตัวของ *t*-resveratrol ในตัวอย่างวัตถุดิบและรูปแบบเม็ด

คำสำคัญ: *t*-resveratrol, วิธีวิเคราะห์บ่งชี้ความคงตัว, โครมาโทกราฟีแบบของเหลว สมรรถนะสูงยิ่งยวด

วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน 2558; 11(3): 48-60

[1] นักศึกษาหลักสูตรเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการทางเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ จังหวัดนครปฐม 73000

[2] ปร.ด; ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อาจารย์ประจำภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ จังหวัดนครปฐม 73000

* **ติดต่อผู้นิพนธ์:** มาลัย สถิรพันธุ์ อาจารย์ประจำภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ จังหวัดนครปฐม 73000 อีเมล์: satiraphan_m@su.ac.th

Stability-indicating Ultra-high Performance Liquid Chromatography Method for Determination of *trans*-Resveratrol Bulk and Tablets

Kritamorn Jitrangsri, Amornrut Chaidedgumjorn[2], Malai Satiraphan[*]

Abstract

Introduction: *trans*-Resveratrol is a phenolic compound found in berries and nuts. It shows many pharmacological activities. There are many analytical methods has been developed to quantify *t*-resveratrol in natural products, none of these methods are stability-indicating method of *t*-resveratrol in bulk and tablet dosage-form. This research was therefore conducted to develop the stability-indicating method for determination of *t*-resveratrol by using Ultra-high Performance Liquid Chromatography (UPLC). The developed method was subsequently validated under the International Conference on Harmonization (ICH) guidelines on validation of analytical procedures. Furthermore, accelerated stability, standard stock solution (SSS) stability and auto-sampler (AS) stability studies of *t*-resveratrol in bulk and tablets were also carried out. **Methods:** UPLC conditions were developed and then validated with the following criteria; accuracy, precision, specificity, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ), linearity, range and robustness. The stability of product was analyzed after 1 month storage at accelerated conditions. The peak area of *t*-resveratrol between aged solution and freshly prepared solution was compared for SSS and AS study. **Results:** The optimum UPLC conditions were found to be as follows: reversed-phase C18 column with gradient elution system comprised of acetonitrile and water, run time 3 minutes, flow rate at 0.4 mL/min and UV detection at 306 nm. The degradants of *t*-resveratrol in bulk and tablets obtained from forced degradation study were well separated from the *t*-resveratrol peak, and the *t*-resveratrol peak was pure in all stress conditions. The linearity of the proposed method was found in a range of concentration 0.4 – 1.8 µg/mL. The coefficient of determination (r^2) was 0.9999. Repeatability and intermediate precision showed a good reproducibility with %RSD less than 2.0. Recovery of method was found to be 99.04% and 99.93% for *t*-resveratrol in bulk and tablets, respectively. The LOD and LOQ were 0.01 µg/mL and 0.02 µg/mL, respectively. The content of *t*-resveratrol resulted from changing of flow rate and column temperature were within ±2% compared to developed analytical conditions. *t*-Resveratrol in bulk and tablets was stable for 1 month of storage at 40°C 75%RH, standard solution was stable for 25 days at -20°C and 2 days in auto-sampler compartment at room temperature. **Conclusion:** The newly developed method was precise, accurate and reliable. It is suitable to be a stability-indicating method for determination of *t*-resveratrol in bulk and tablets.

Keywords: *t*-resveratrol, stability-indicating method, UPLC

IJPS 2015; 11(3): 48-60

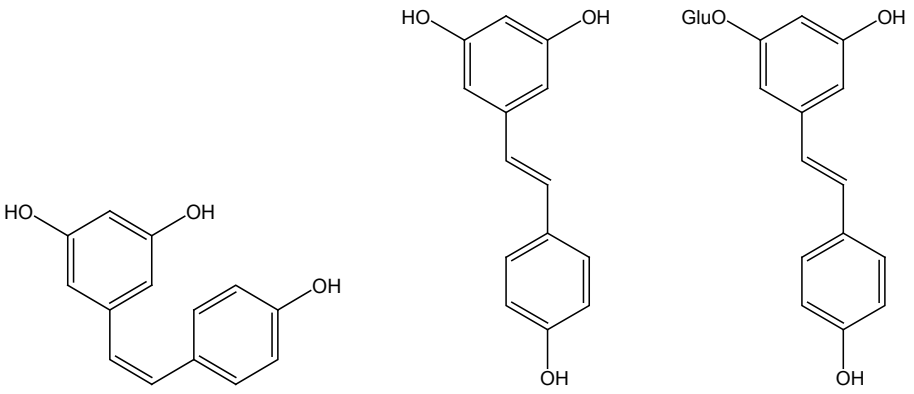
[1] Master degree student in Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Sanam Chandra Palace Campus, Nakhon Pathom, 73000

[2] Ph.D., Assistant Professor, Lecturer, Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Sanam Chandra Palace Campus, Nakhon Pathom, 73000

[*] **Corresponding Author:** Malai Satiraphan, Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Sanam Chandra Palace Campus, Nakhon Pathom, Thailand 73000 E-mail: satiraphan_m@su.ac.th

บทนำ

T*rans*-Resveratrol หรือ *trans*-3,5,4'-trihydroxystilbene เป็นสารในกลุ่มฟีนอลิกที่ไม่ใช่ฟลาโวนอยด์ มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 228.2 โครงสร้างหลักประกอบด้วยหมู่ stilbene ที่มีลักษณะคล้าย estrogen diethylstilbestrol พบในธรรมชาติได้ 3 รูปแบบคือ *cis*-, *trans*- และต่อด้วยโมเลกุลน้ำตาลคือ piceid (รูปที่ 1) (Carrizzo et al., 2013)



(ก) (ข) (ค)

รูปที่ 1 รูปแบบของ resveratrol ที่พบได้ในธรรมชาติ (ก) *cis*-isomer (ข) *trans*-isomer (ค) piceid

t-resveratrol สามารถพบได้ในพืชผลไม้หรืออาหารหลายชนิด เช่น ไวน์ ถั่วลิสง พืชตระกูลเบอร์รี่ หม่อน สน โกศน้ำเต้า เป็นต้น (Aggarwal et al., 2004) และแสดงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลากหลาย เช่น ต้านอนุมูลอิสระ ป้องกันโรคหัวใจ รักษาโรคเบาหวาน เพิ่มกระบวนการเมแทบอลิซึมของไขมัน ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ปกป้องเซลล์ประสาท และต้านพิษต่อยีนของเอทานอล เป็นต้น (Chun-fu et al., 2013) และปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีการอ้างอิงว่ามีส่วนประกอบของ resveratrol ในผลิตภัณฑ์จำหน่ายอย่างแพร่หลายในท้องตลาดและสื่อออนไลน์

เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) เป็นวิธีที่ใช้แยกและวิเคราะห์สารในธรรมชาติ เช่น วิเคราะห์หาปริมาณ rutin ในเมล็ดลำไย (Nusuk et al., 2011) วิเคราะห์หาปริมาณแอลคาลอยด์จากรากส่องฟ้าดง (Daodee et al., 2012) รวมถึง *t*-resveratrol มีรายงานการวิเคราะห์สาร *t*-resveratrol ในถั่วลิสงของ Phan-Thien *และคณะ* (2014) โดยใช้การแยกด้วยคอลัมน์รีเวิร์สเฟส C_{18} เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) ในน้ำและ 0.1%TFA ในอะซิโตไนไตรล์ ระบบการแยกแบบเกรเดียนท์ (gradient) ใช้เวลาวิเคราะห์ 35 นาทีต่อตัวอย่าง (Phan-Thien et al., 2014) Sales และ Resurreccion ใช้ HPLC รีเวิร์สเฟส C_{18} วิเคราะห์ปริมาณสาร *t*-resveratrol และ *t*-piceid ในถั่วลิสง ระบบการแยกแบบเกรเดียนท์ระหว่างน้ำกับอะซิโตไนไตรล์ ใช้เวลาวิเคราะห์ 34 นาทีต่อตัวอย่าง (Sales and Resurreccion, 2009) เป็นต้น แต่ยังไม่มีวิธีวิเคราะห์ที่เป็นวิธีบ่งชี้ความคงตัวของสาร *t*-resveratrol ซึ่งจำเป็นต่อการศึกษาความคงตัวและควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ วัตถุประสงค์งานวิจัยนี้คือเพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์บ่งชี้ความคงตัวของสาร

t-resveratrol ในรูปแบบวัตถุดิบและเม็ดที่มีความง่าย และความรวดเร็วในการวิเคราะห์ ผู้วิจัยจึงเลือกใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูงยิ่งยวด (UPLC) ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ เนื่องจากมีข้อดีที่เหนือกว่า HPLC อยู่สามด้านคือ ลดระยะเวลาในการวิเคราะห์ (speed) เพิ่มความไวในการตรวจวัด (sensitivity) และเพิ่มความสามารถในการแยกสาร (resolution) (Nováková et al., 2006)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เครื่องมือและสารเคมี

เครื่องมือ: UPLC: Waters® Acquity H Class, เครื่องชั่งวิเคราะห์ความละเอียด 6 ตำแหน่ง: Mettler Toledo XP26, เครื่องชั่งวิเคราะห์ความละเอียด 4 ตำแหน่ง: Sartorius-CP224S, เครื่องทำน้ำบริสุทธิ์: TKA-UPW40, เครื่องปั่นเหวี่ยง: Beckman Coulter Microfuge®16

สารเคมี: *t*-resveratrol reference standard (Sigma Aldrich, US), อะซิโตไนไตรล์ HPLC grade (JT baker, US), เอทานอล HPLC grade (Merck, US), *t*-resveratrol bulk from China, *t*-resveratrol 30 มิลลิกรัม tablets plus grape seed from US, hydrochloric acid AR grade (LabScan, Thailand), sodium hydroxide AR grade (UNIVAR, India), 3%hydrogen peroxide solution (Siribancha, Thailand)

2. การเตรียมตัวอย่าง

2.1 สารละลายมาตรฐาน

- Standard Stock

Solution (SSS)

การเตรียมสารละลายมาตรฐานโดยละลาย *t*-resveratrol reference standard 10 มิลลิกรัม ในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ด้วย 80% เอทานอล จะได้สารละลาย SSS ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

- Standard solution

ทำการปิเปต 2 มิลลิลิตร ของสารละลาย SSS เจือจางเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยตัวทำละลาย (40% อะซิโตไนไตรล์ในน้ำ) จากนั้นเตรียมสารละลายมาตรฐานเพื่อใช้เป็น calibration curve โดยเจือจางในตัวทำละลายให้ได้ความเข้มข้น 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.4 และ 1.8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

- วัตถุดิบ *t*-resveratrol

การเตรียมสารละลายวัตถุดิบโดยละลาย 10 มิลลิกรัม ของวัตถุดิบ *t*-resveratrol ด้วย 80%เอทานอล ในขวดปรับปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปต 500 ไมโครลิตร แล้วเจือจางเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยตัวทำละลายได้ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นปิเปต 200 ไมโครลิตร แล้วเจือจางเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยตัวทำละลาย กรองผ่าน syringe filter ขนาดรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร ก่อนนำสารละลายไปฉีดเข้าเครื่อง UPLC

- *t*-resveratrol แบบเม็ด

การเตรียมสารละลายผลิตภัณฑ์แบบเม็ดโดยชั่งน้ำหนักและบด *t*-resveratrol จำนวน 20 เม็ด จนเป็นผงละเอียด ชั่งผงยาที่บดได้ประมาณ 25 มิลลิกรัม ละลายด้วย 5 มิลลิลิตร ของ 80% เอทานอล แล้วนำไปแช่ในอ่างคลื่นเสียงความถี่สูงยิ่งยวดเป็นเวลา 20 นาที ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วย 80% เอทานอล จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9500 rpm เป็นเวลา 5 นาที ปิเปตสารละลายใสส่วนบน 100 ไมโครลิตร แล้วเจือจางเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยตัวทำละลาย กรองผ่าน syringe filter ขนาดรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร ก่อนนำสารละลายไปฉีดเข้าเครื่อง UPLC

- ความจำเพาะเจาะจงของวิธีทดสอบ (Specificity)

ตามข้อกำหนดของ ICH เมื่อไม่มีสารมาตรฐาน impurities ให้ศึกษาโดยการเร่งตัวอย่างให้สลายตัว (forced degradation) ในสภาวะเร่งต่างๆ

ได้แก่ สภาวะกรด ด่าง ออกซิเดชัน ความร้อน และแสง (ICH, 2005) สำหรับตัวอย่างวัตถุดิบใช้สารละลายตัวอย่างความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร สัมผัสกับสภาวะเร่งในปริมาตรเท่ากัน แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร และสำหรับตัวอย่างเม็ดใช้สารละลายใสส่วนบนหลังปั่นเหวี่ยงในข้อ 1.2.3 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร สัมผัสกับสภาวะเร่งในปริมาตรเท่ากัน แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ยกเว้นหัวข้อ thermolysis ที่ใช้รูปแบบผงของตัวอย่างวัตถุดิบและรูปแบบเม็ดสัมผัสกับสภาวะเร่ง โดยให้สัมผัสกับสภาวะเร่งจนสารสลายตัวไปประมาณ 20% จึงทำการหยุดปฏิกิริยา (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 สภาวะเร่งต่างๆ ที่ใช้ศึกษา forced degrada

Stress conditions	Raw material	Tablets
Acid hydrolysis	0.1 N HCl 8 hr, RT	0.1 N HCl 24 hr, RT
Basic hydrolysis	0.01 N NaOH 8 hr, RT	0.01 N NaOH 8 hr, RT
Oxidation	3%H_2O_2 2 hr, RT	3%H_2O_2 8 hr, RT
Thermolysis	60°C 1 month	60°C 1 month
Photolysis	UV 254 nm 15 minutes	UV 254 nm 15 minutes

hr = hours, RT = room temperature

จากนั้นพิจารณาค่ามุมความบริสุทธิ์ของพีค (peak purity angle) คือค่าความบริสุทธิ์ของพีค ณ จุดเวลาต่างๆ เทียบกับตำแหน่ง apex และค่าขีดแบ่งความบริสุทธิ์ของพีค (peakpurity threshold) คือค่ามุมความบริสุทธิ์ที่มากสุดของพีคซึ่งเกิดจากกระบวนการรบกวนต่างๆ เช่น สารถูกชะออกมาในเวลาเดียวกัน สัญญาณของตัวทำละลายหรือสิ่งรบกวนอื่นๆ เป็นต้น โดยจะถือว่าพีคมีความบริสุทธิ์เมื่อค่า peak purity angle น้อยกว่าค่า peak purity threshold

- ความเที่ยงของวิธี (Precision)

ทำการทดสอบหัวข้อ repeatability โดยวิเคราะห์ตัวอย่าง t-resveratrol วัตถุดิบและรูปแบบเม็ดจำนวน 6 ซ้ำภายในวันเดียวกัน และ intermediate precision โดยวิเคราะห์ตัวอย่าง t-resveratrol วัตถุดิบและรูปแบบเม็ดจำนวน 6 ซ้ำต่างวันกัน โดยพิจารณาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ภายในวันที่วิเคราะห์ และทดสอบความแปรปรวนระหว่างวันที่วิเคราะห์โดยใช้ F-test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

- ความแม่นของวิธี (Accuracy)

ทำการวิเคราะห์ค่าการได้กลับคืน (%recovery) ของวิธีโดย spike สารละลายมาตรฐานลงในตัวอย่างที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนที่ระดับ 50%, 100% และ 150% (0.5, 1.0 และ 1.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ)

- ความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (Linearity and Range)

ทำการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานในช่วงความเข้มข้น 0.4 – 1.8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารกับพื้นที่พีค แล้วพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์การกำหนด (Coefficient of determination)

- LOD และ LOQ

ทำการทดสอบโดยนำสารละลายมาตรฐานมาเจือจาง แล้ววิเคราะห์หาความเข้มข้นที่ทำให้พื้นที่ใต้พีคที่ได้รับมีอัตราส่วน signal to noise ประมาณ 3:1 สำหรับ LOD และประมาณ 10:1 สำหรับ LOQ

- ความทนของวิธีทดสอบ (Robustness)

ทำการวิเคราะห์ปริมาณ t-resveratrol ในตัวอย่างวัตถุดิบและรูปแบบเม็ดภายใต้สภาวะการวิเคราะห์ที่เปลี่ยนไป ได้แก่ การเปลี่ยนอัตราการไหล (±10%) หรือเปลี่ยนอุณหภูมิคอลัมน์ (±5°C)

- ความคงตัว (Stability)

- ความคงตัวของผลิตภัณฑ์ (Product stability)

- ทำการวิเคราะห์ปริมาณ t-resveratrol ในตัวอย่างวัตถุดิบและรูปแบบเม็ด หลังเก็บในตู้ศึกษาความคงตัวที่สภาวะ 40°C 75%RH เป็นเวลา 1 เดือน

- ความคงตัวของสารละลายมาตรฐาน (Standard stock solution stability) ทำการเจือจางสารละลายมาตรฐาน SSS ที่เก็บที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 25 วัน แล้วพิจารณาพื้นที่พีคที่ได้รับเทียบกับสารละลายมาตรฐานที่เตรียมขึ้นใหม่ความคงตัวของสารในเครื่องฉีดตัวอย่างอัตโนมัติ (Auto-sampler stability)

ทำการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานใน vial เดิมที่เก็บอยู่ในเครื่องฉีดตัวอย่างอัตโนมัติเป็นเวลา 2 วันที่อุณหภูมิห้อง เปรียบเทียบพื้นที่พีคที่ได้รับกับพื้นที่พีคเก่าที่เคยได้รับตอนเตรียมสารละลายครั้งแรก

1.3 สภาวะที่ใช้วิเคราะห์ (Chromatographic conditions)

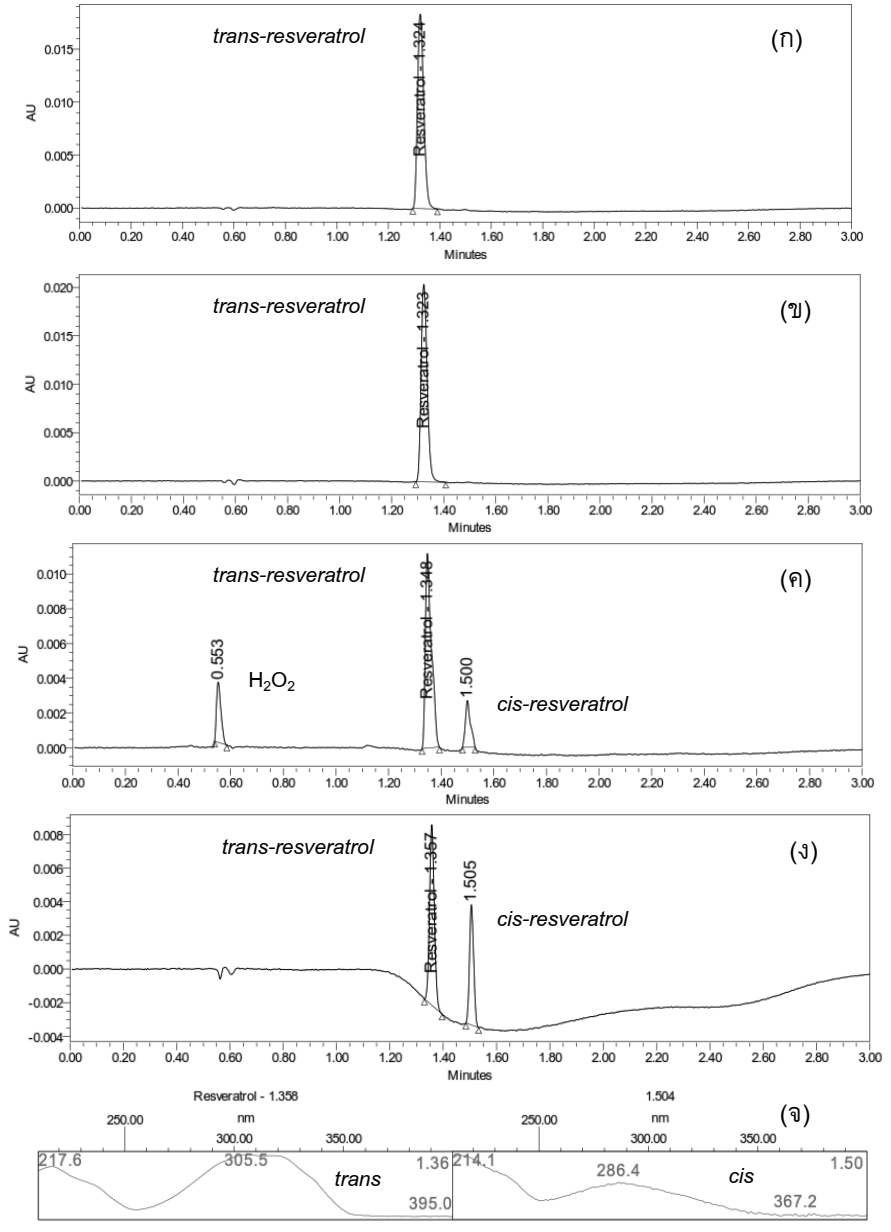
ทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UPLC ยี่ห้อ Waters® รุ่น Acquity H Class ประกอบด้วยปั๊มแรงดันสูงสองตัว ระบบกำจัดฟองอากาศ ระบบควบคุมอุณหภูมิคอลัมน์ เครื่องฉีดตัวอย่างอัตโนมัติควบคุมอุณหภูมิได้ และระบบตรวจวัดความไวสูงแบบ photodiode array คอลัมน์ Acquity BEH C18 2.1 mm x 100 mm ขนาดอนุภาค 1.7 ไมโครเมตร เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยอะซิโตไน-ไตรล์ (A) และน้ำ (B) โปรแกรมการแยกแบบเกรเดียนท์ (gradient) ดังนี้ 0 นาที; 70%B, 0.2 นาที; 40%B, 0.7 นาที; 60%B, 1.3 นาที; 60%B, 1.5 นาที; 70%B และ 3.0 นาที; 70%B อัตราการไหลที่ 0.4 มิลลิลิตร/นาที อุณหภูมิคอลัมน์ 30°C ปริมาตรฉีด 2 ไมโครลิตร ตรวจวัดโดยใช้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 306 นาโนเมตร

ผลการวิจัย

1. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์

เนื่องจากผู้วิจัยต้องการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่มีความง่ายและสะดวกในการวิเคราะห์ จึงเริ่มต้นจากการทดลองใช้สภาวะการวิเคราะห์ของ Lee และคณะ (2004) ซึ่งใช้เฟสเคลื่อนที่คือน้ำกับอะซิโตไนไตรล์ ในอัตราส่วน 60:40 คอลัมน์รีเวิร์สเฟส C_{18} อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตร/นาที พบพีคของ *t*-resveratrol ที่เวลาประมาณ 16 นาที (Lee et al., 2004) จึงทำการโอนย้ายวิธีวิเคราะห์จาก HPLC เป็น UPLC โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปของบริษัท Waters แล้วทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี พบว่าเมื่อทำการทดสอบสภาวะเร่งออกซิเดชัน สภาวะที่ใช้ไม่สามารถแยกพีคของสารละลาย H_2O_2 ออกจากพีคของสารหลักได้ จึงปรับระบบการแยกจากไอโซเครติก (isocratic) เป็นเกรเดียนท์ (gradient) โดยเพิ่มอัตราส่วนของน้ำในช่วงแรกเป็น 70% เพื่อให้พีคของ H_2O_2 ที่ละลายน้ำออกมาก่อน และเนื่องด้วยคุณสมบัติของสาร *t*-resveratrol ที่ไม่สามารถละลายในน้ำจึงถูกชะออกมาทีหลัง แล้วจึงเพิ่มอัตราส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์เพื่อให้สาร *t*-resveratrol ออกมาเร็วขึ้น แล้วลดปริมาณลงกลับสู่สภาวะเริ่มต้น ทิ้งไว้เป็นเวลา 1.5 นาทีเพื่อให้คอลัมน์อยู่ในสภาวะสมดุลก่อนเริ่มฉีดเข็มต่อไป จากนั้นจึงปรับอัตราการไหลให้มีความเหมาะสมระหว่าง retention time ของสารกับแรงดันย้อน

กลับของระบบ พบว่าที่อัตราการไหล 0.4 มิลลิลิตร/นาที ทำให้สาร *t*-resveratrol ถูกชะออกมาที่เวลาประมาณ 1.3 นาที (รูปที่ 2(ก)) และมีแรงดันย้อนกลับของระบบสูงสุดที่ 10,000 psi



รูปที่ 2 โครมาโตแกรมที่ได้จากการศึกษาการสลายตัว (ก) สารละลายมาตรฐาน *t*-resveratrol (ข) ตัวอย่างวัตถุดิบที่ไม่ผ่านการสลายตัว (ค) ตัวอย่างวัตถุดิบที่สัมผัส 3%H_2O_2 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (ง) ตัวอย่างวัตถุดิบที่สัมผัส UV 254 นาโนเมตร เป็นเวลา 15 นาที และ (จ) UV spectra ของสาร *trans*- และ *cis*-resveratrol

2. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

- ความจำเพาะเจาะจงของวิธี (Specificity)

ศึกษาสารสลายตัวที่เกิดจากการเร่งปฏิกิริยา (forced degradation study) พบว่าสาร *t*-resveratrol สลายตัวได้ง่ายในสภาวะที่เป็นด่าง และภายใต้แสง UV ส่วนการเร่งปฏิกิริยาในกรดและออกซิเดชันพบสารค่อยๆ สลายตัว แต่สารมีความคงทนที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 1 เดือนโดยไม่เกิดการสลายตัว และสารสลายตัวที่เกิดจากการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน และฉายแสง UV คือ *cis*-resveratrol (ไอโซเมอร์ของ *t*-resveratrol) ซึ่งสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ได้โดยพิจารณาค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 286 นาโนเมตร (รูปที่ 2(จ)) แต่พีคของ *t*-resveratrol ที่วิเคราะห์ได้โดยผ่านการเร่งปฏิกิริยาในทุกสภาวะยังคงมีความบริสุทธิ์อยู่ โดยมีค่า peak purity angle น้อยกว่าค่า peak purity threshold

- ความเที่ยงของวิธี (Precision)

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร *t*-resveratrol ในตัวอย่างวัตถุดิบและรูปแบบเม็ดจำนวน 6 ซ้ำที่ความเข้มข้น 1.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ให้ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ภายในวันที่วิเคราะห์น้อยกว่า 2.0% และไม่พบความแตกต่างของความแปรปรวนระหว่างวันที่วิเคราะห์โดยใช้ F-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลการศึกษาความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (Precision)

Sample	Analyzed on	%Label amount						Mean	SD	%RSD	F_{cal} [a]
		1	2	3	4	5	6				
Raw	2 Apr 15	94.85	93.87	92.43	92.51	92.18	93.01	93.14	1.03	1.11	3.05
material	3 Apr 15	93.13	91.79	92.11	93.32	92.72	92.80	92.65	0.59	0.64	
Tablets	2 Apr 15	108.15	107.88	110.62	106.96	106.74	105.90	107.71	1.64	1.52	1.38
	3 Apr 15	108.32	109.61	110.05	105.04	108.90	106.54	108.08	1.93	1.78	

[a] $F_{cal} = SD_{large}^2/SD_{small}^2$, $F_{cri(0.05,5,5)} = 5.05$, $F_{cal} < F_{cri}$; accepted H_0

เนื่องจากค่า F ที่คำนวณได้ของตัวอย่างมีค่าน้อยกว่าค่า F ที่จุดวิกฤต

3. ความแม่นของวิธี (Accuracy)

จากการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ผ่านการ spike สารละลายมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 50%, 100% และ 150% ของตัวอย่างวัตถุดิบและรูปแบบเม็ด มีค่าการได้กลับคืน (%recovery) อยู่ในช่วง 98.35-99.55% และ 98.30-102.26% ของตัวอย่างวัตถุดิบและรูปแบบเม็ดตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลการศึกษาความแม่นของวิธี (Accuracy)

Sample	Applied (µg/mL)	Found (µg/mL)[a] ± SD	%Recovery[b]
Raw material	0.5	0.492 ± 0.005	98.35
	1.0	0.992 ± 0.004	99.22
	1.5	1.493 ± 0.017	99.55
Tablets	0.5	0.492 ± 0.008	98.30
	1.0	0.992 ± 0.015	99.24
	1.5	1.534 ± 0.040	102.26

[a]ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ (n=3) [b]%Recovery = (Conc.Found/Conc.Applied) x 100

4. ความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (Linearity and Range)

วิธีวิเคราะห์มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงระหว่างพื้นที่พีคกับความเข้มข้นของสารโดยมีค่าสัมประสิทธิ์การกำหนด (r^2) เท่ากับ 0.9999 ในช่วงความเข้มข้น 0.4 – 1.8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และมีสมการถดถอยเชิงเส้นเท่ากับ y = 29875.5882x - 620.6716

5. LOD และ LOQ

LOD และ LOQ ของวิธีวิเคราะห์เท่ากับ 0.01 และ 0.02 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

6. ความทนของวิธีทดสอบ (Robustness)

ผลการวิเคราะห์ปริมาณ *t*-resveratrol เมื่อเปลี่ยนสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ได้แก่ ที่อุณหภูมิคอลัมน์ 25 และ 35°C ที่อัตราการไหล 0.36 และ 0.44 มิลลิลิตร/นาที อยู่ในช่วง 2% เมื่อเทียบกับวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นทั้งในตัวอย่างวัตถุดิบและรูปแบบเม็ด (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ผลการศึกษาความทนของวิธีทดสอบ (Robustness)

Sample	Normal condition (%L.A.[a]) 0.40 mL/min, 30°C	Changed Condition (%L.A.[a])			
		Flow rate (mL/min)		Column Temperature (°C)	
		0.36	0.44	25	35
Raw material	92.34	92.50	92.53	92.90	92.65
Tablets	109.33	109.44	109.30	110.30	109.90

[a]ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ (n=3)

7. การศึกษาความคงตัว (Stability)

ความคงตัวของผลิตภัณฑ์ (Product stability) พบว่าตัวอย่างวัตถุดิบและรูปแบบเม็ดมีความคงตัวเป็นเวลาอย่างน้อย 1 เดือน หลังเก็บในตู้ศึกษาความคงตัวที่สภาวะ 40°C 75%RH โดยมีปริมาณ *t*-resveratrol เปลี่ยนแปลงไม่เกิน 2% เมื่อเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้เก็บในตู้ศึกษาความคงตัว สำหรับความคงตัวของสารละลายมาตรฐาน (Standard stock solution stability) และความคงตัวของสารในเครื่องฉีดตัวอย่างอัตโนมัติ (Auto-sampler stability) พบว่าสารละลายมาตรฐานที่เก็บที่อุณหภูมิ -20°C มีความคงตัวเป็นเวลาอย่างน้อย 25 วันและสามารถเก็บในเครื่องฉีดตัวอย่างอัตโนมัติได้เป็นเวลา 2 วันที่อุณหภูมิห้องโดยไม่ทำให้ปริมาณพื้นที่พีคที่วัดได้เปลี่ยนแปลงเกิน 2%

อภิปรายผลการวิจัย

วิธีวิเคราะห์ *t*-resveratrol ที่พัฒนาขึ้นมีความสะดวกในการวิเคราะห์มากกว่าวิธีวิเคราะห์ที่เคยได้รับการตีพิมพ์มาก่อน (Beňova et al., 2010; Casas et al., 2010; Chukwumah et al., 2012; Marqués et al., 2013; Phan-Thien et al., 2014; Püssa et al., 2006; Xiong et al., 2014; Yu et al., 2005; Zupančič et al., 2015) เนื่องจากเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยน้ำกับอะซิโต-ไนไตรล์เท่านั้น และเป็นวิธีวิเคราะห์ที่มีความรวดเร็วมากกว่า โดยมีระยะเวลาวิเคราะห์ต่อหนึ่งตัวอย่างเพียง 3 นาที ทั้งนี้อาจเนื่องจากวิธีวิเคราะห์ที่มีเป็นวิธีที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณ *t*-resveratrol ในตัวอย่างสมุนไพร จึงจำเป็นต้องใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์นานเพราะเป็นสารผสมหลายชนิด จากการศึกษาความจำเพาะเจาะจงของวิธีทดสอบพบว่าสาร *t*-resveratrol สลายตัวง่ายในสภาวะที่เป็นด่าง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Zupančič และคณะ (2015) ที่สรุปว่า *t*-resveratrol สลายตัวอย่างรวดเร็วในสภาวะที่เป็นด่าง โดยที่ pH 10.0 สารจะสลายตัวไปเกือบทั้งหมดภายในเวลา 9 นาที ทำให้จำเป็นต้องลดความเข้มข้นของด่างที่ใช้ทดสอบลงเป็น 0.01 N NaOH เนื่องจากถ้าใช้ 0.1 N NaOH สารจะสลายไปเกือบทั้งหมดในเวลา 1 ชั่วโมง นอกจากนี้ *t*-resveratrol จะเปลี่ยนไอโซเมอร์ไปเป็น *cis*-resveratrol ได้ง่ายเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสง โดยการฉายแสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เป็นเวลา 15 นาที จะทำให้ประมาณ 50% ของ *t*-resveratrol เปลี่ยนเป็น *cis* ไอโซเมอร์ ซึ่งพิสูจน์เอกลักษณ์ได้โดยค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารจะเปลี่ยนจาก 306 นาโนเมตร เป็น 286 นาโนเมตร (Liu et al., 2013; Rudolf et al., 2005; Zupančič et al., 2015;) (รูปที่ 2(จ)) โดยปัจจัยที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนไอโซเมอร์ของสารได้แก่ ระยะเวลาในการฉายแสง สถานะทางกายภาพของสาร และอุณหภูมิ (Zupančič et al., 2015) โดยวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถแยกสารทั้งสองไอโซเมอร์ออกจากกันได้ และพีคของสาร *t*-resveratrol จะไม่ถูกรบกวนด้วยพีคของสารสลายตัวที่เกิดขึ้นในทุกสภาวะที่ใช้ทดสอบ ผลการศึกษาความเที่ยงของวิธี (Precision) พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) จากการทดลองแบบภายในวันและระหว่างวันที่วิเคราะห์อยู่ในช่วง 0.64-1.78% ซึ่งมีค่าน้อยกว่าวิธีที่พัฒนาโดย Lee และคณะ (2004) และ Phan-Thien และคณะ (2014) และมีความสามารถในการฉีดซ้ำ (Repeatability) ที่ดีโดยมีค่า %RSD ของพื้นที่พีคจากการวิเคราะห์ตัวอย่างซ้ำจำนวน 5 ครั้งน้อยกว่า 1.0% (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความเหมาะสมของระบบ (system suitability)

Injections	Retention Time (min)	Peak area	USP Plates	USP Tailing factor
1	1.297	32318	14462	1.28
2	1.298	32201	14229	1.28
3	1.299	32222	13732	1.28
4	1.295	32336	14020	1.28
5	1.297	32241	13267	1.29
Mean	1.297	32264	13942	1.28
%RSD	0.10	0.19	3.32	0.35

นอกจากนี้ผลการทดสอบความแม่น (Accuracy) ของวิธีพบว่ามีค่าการได้กลับคืน (%Recovery) อยู่ในช่วง 98.35-102.26% ซึ่งมีค่าการได้กลับคืนมากกว่าวิธีวิเคราะห์ของ Liu และคณะ (2013) Phan-Thien และคณะ (2014) และ Rudolf และคณะ (2005) ทั้งนี้อาจเนื่องจากตัวอย่างที่ใช้ศึกษาเป็นวัตถุดิบและรูปแบบเม็ดซึ่งมีตัวกลางที่ไม่ซับซ้อนเหมือนตัวอย่างสมุนไพร นอกจากนี้ค่า LOD และ LOQ ของวิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่มีค่าเท่ากับ 0.01 และ 0.02 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งมีค่าเท่ากับวิธีของ Rudolf และคณะ (2005) แต่มีค่าต่ำกว่าวิธีวิเคราะห์ของ Lee และคณะ (2004) Pascual-Marti และคณะ (2001) และ Zupančič และคณะ (2015) ผลการศึกษาความทนของวิธีวิเคราะห์ (Robustness) พบว่าเมื่อเปลี่ยนอัตราการไหลในช่วง ±10% และอุณหภูมิคอลัมน์ ±5°C ไม่ส่งผลต่อการหาปริมาณของ *t*-resveratrol ในตัวอย่างวัตถุดิบและรูปแบบเม็ด สำหรับผลการศึกษาความคงตัวของสาร *t*-resveratrol พบว่าทั้งตัวอย่างวัตถุดิบและรูปแบบเม็ดมีความคงตัวเป็นเวลา 1 เดือนที่อุณหภูมิ 40°C 75%RH และในรูปสารละลายคงตัวเป็นเวลาอย่างน้อย 25 วันเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ –20°C และอย่างน้อย 2 วันเมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Liazid และคณะ (2007) ที่ระบุว่าสาร *t*-resveratrol จะสลายตัวเมื่ออุณหภูมิมากกว่า 100°C และการศึกษาของ Zupančič และคณะ (2015) ที่สรุปว่าสารละลาย *t*-resveratrol ในตัวกลางที่ pH 6.8 อัตราการสลายตัวจะลดลง 22 เท่าเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4°C เมื่อเทียบกับการเก็บที่อุณหภูมิ 37°C

สรุปผลการวิจัย

วิธีวิเคราะห์บ่งชี้ความคงตัวของสาร *t*-resveratrol ในตัวอย่างวัตถุดิบและรูปแบบเม็ดที่พัฒนาขึ้น มีความง่าย สะดวก วิเคราะห์ได้รวดเร็ว พร้อมทั้งมีความถูกต้อง แม่นยำ และน่าเชื่อถือ เหมาะสมที่จะใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ที่ใช้ติดตามความคงตัวหรือควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ *t*-resveratrol ในห้องปฏิบัติการ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยชิ้นนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณและเครื่องมือจากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ รวมทั้งการอนุเคราะห์เครื่อง UPLC และคอลัมน์ที่ใช้ในงานวิจัยจากบริษัทสิทธิพรแอสโซซิเอส จำกัด

References

Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS. Role of Resveratrol in Prevention and Therapy of Cancer: Preclinical and Clinical Studies. *Anticancer Res* 2004; 2783-840.

Beňová B, Adam M, Pavlíková P, Fischer J. Supercritical fluid extraction of piceid, resveratrol and emodin from Japanese knotweed. *J Supercrit Fluids* 2010; 51(3): 325–30.

Carrizzo A, Forte M, Damato A, et al. Antioxidant effects of resveratrol in cardiovascular, cerebral and metabolic diseases. *Food Chem Toxicol* 2013; 61: 215–26.

Casas L, Mantell C, Rodríguez M, et al. Extraction of resveratrol from the pomace of Palomino fino grapes by supercritical carbon dioxide. *J Food Eng* 2010; 96(2): 304–8.

Chukwumah Y, Walker L, Vogler B, Verghese M. Profiling of bioactive compounds in cultivars of Runner and Valencia peanut market-types using liquid chromatography/APCI mass spectrometry. *Food Chem* 2012; 132(1): 525–31.

Chun-fu WU, Jing-yu Y, Fang W, Xiao-xiao W. Resveratrol: botanical origin, pharmacological activity and applications. *Chin J Nat Med* 2013; 11(1): 1–15.

Daodee S, Wangboonskul J, Yenjai C, Boonyarat C, Monthakantirat O. Determination of five carbazole alkaloids from the root of Clausena harmandiana by High Performance Liquid Chromatography. *IJPS* 2012; 8(2): 94-100.

ICH. Validation of a analytical Procedures: text and methodology Q2(R1). Guidance. 2005; 17.

Lee SS, Lee SM, Kim M, Chun J, Cheong YK, Lee J. Analysis of trans-resveratrol in peanuts and peanut butters consumed in Korea. *Food Res Int* 2004; 37(3): 247–51.

Liazid A, Palma M, Brigui J, Barroso CG. Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction. *J Chromatogr A* 2007; 1140(1-2):29–34.

Liu C, Wang L, Wang J, et al. Resveratrols in Vitis berry skins and leaves: their extraction and analysis by HPLC. *Food Chem* 2013; 136(2): 643–9.

Marqués JL, Porta G Della, Reverchon E, Renuncio J a. R, Mainar a. M. Supercritical antisolvent extraction of antioxidants from grape seeds after vinification. *J Supercrit Fluids* 2013; 82: 238–43.

Nováková L, Matysová L, Solich P. Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. *Talanta* 2006; 68(3): 908–18.

Nusuk C, Patarapanich C, Tuesuwan B. Development of modified extract and HPLC analytical method for determination of rutin in modified extract of Longan seed. *IJPS* 2011; 7(3): 14-22.

Pascual-Marti MC, Salvador A, Chafer A, Berna A. Supercritical fluid extraction of resveratrol from grape skin of *Vitis inifera* and determination by HPLC. *Talanta* 2001; 54: 735–40.

Phan-Thien K-Y, Wright GC, Lee NA. Peanut antioxidants: Part 2. Quantitation of free and matrix-bound phytochemicals in five selected genotypes with diverse antioxidant capacity by high performance liquid chromatography (HPLC). *LWT - Food Sci Technol* 2014; 57(1): 312–9.

Püssa T, Floren J, Kuldkepp P, Raal A. Survey of grapevine *Vitis vinifera* stem polyphenols by liquid chromatography-diode array detection-tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 2006; 54(20): 7488–94.

Rudolf JL, Resurreccion a. V a., Saalia FK, Phillips RD. Development of a reverse-phase high-performance liquid chromatography method for analyzing trans-resveratrol in peanut kernels. *Food Chem*. 2005; 89(4): 623–38.

Sales JM, Resurreccion a. V a. Maximising resveratrol and piceid contents in UV and ultrasound treated peanuts. *Food Chem* 2009; 117(4): 674–80.

Xiong Q, Zhang Q, Zhang D, Shi Y, Jiang C, Shi X. Preliminary separation and purification of resveratrol from extract of peanut (*Arachis hypogaea*) sprouts by macroporous adsorption resins. *Food Chem* 2014; 145: 1–7.

Yu J, Ahmedna M, Goktepe I. Effects of processing methods and extraction solvents on concentration and antioxidant activity of peanut skin phenolics. *Food Chem* 2005; 90(1-2): 199–206.

Zupančič Š, Lavrič Z, Kristl J. Stability and solubility of trans-resveratrol are strongly influenced by pH and temperature. *Eur J Pharm Biopharm* 2015; 93: 196–204.