

การพัฒนาและการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ ออกซีเรสเวอราทรอลในแก่นมะหาดด้วยวิธีโครมาโทกราฟี ของเหลวประสิทธิภาพสูงพิเศษ

อัครชัย ช่วยพรหม*, ธนวัฒน์ ทองจีน, สายัณห์ เรืองเชตร, ศักดิ์วิชัย อ่อนทอง

สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 88/7 ถนนติวานนท์ ตำบลตลาดขวัญ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000

* ผู้รับผิดชอบบทความ: aussavashai@gmail.com

บทคัดย่อ

บทนำและวัตถุประสงค์: ออกซีเรสเวอราทรอล (oxyresveratrol) เป็นสารออกฤทธิ์ชนิดหนึ่งที่พบในแก่นมะหาด (*Artocarpus lacucha* Roxb. ex Buch.–Ham.) มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลายเช่น ด้านออกซิเดชัน ด้านอักเสบ และบรรเทาอาการปวด ปัจจุบันแก่นมะหาดถูกนำมาใช้เป็นองค์ประกอบทางยาและผลิตภัณฑ์สุขภาพที่หลากหลาย อย่างไรก็ตาม วิธีการตรวจวิเคราะห์สารในแก่นมะหาดที่ใช้ในปัจจุบันนั้นมีความยุ่งยากทั้งในขั้นตอนการสกัดและระยะเวลาในการวิเคราะห์ ซึ่งส่งผลต่อการนำไปใช้เพื่อวิเคราะห์และควบคุมคุณภาพของสารออกฤทธิ์ในแก่นมะหาด ผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณออกซีเรสเวอราทรอลในแก่นมะหาดด้วยวิธี Ultra-High Performance Liquid Chromatography (UHPLC)

วิธีการศึกษา: แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน ได้แก่ 1) การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณออกซีเรสเวอราทรอลในแก่นมะหาดด้วยวิธี UHPLC 2) การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (method validation) และ 3) การวิเคราะห์ปริมาณออกซีเรสเวอราทรอลในตัวอย่างแก่นมะหาด จำนวน 8 ตัวอย่าง

ผลการศึกษา: การพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณออกซีเรสเวอราทรอลในแก่นมะหาดด้วยวิธี UHPLC จะใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายในการสกัด ใช้เวลาในการสกัด 30 นาที เลือกใช้คอลัมน์ชนิด ARC-18, ขนาด 4.6×150 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 2.7 ไมโครเมตร เป็นวัฏภาคคงที่ ใช้ 0.1% ออร์โทฟอสฟริกแอซิดในน้ำ และ 0.1% ออร์โทฟอสฟริกแอซิดในอะซิโตนในอัตราส่วนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ตรวจวัดด้วย diode array detector (DAD) ที่ความยาวคลื่น 326 นาโนเมตร ระบบการวิเคราะห์ออกซีเรสเวอราทรอลที่พัฒนาขึ้นมี retention time เฉลี่ยที่ 4.76 นาที ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ดังกล่าว พบว่ากราฟมาตรฐานของออกซีเรสเวอราทรอลมีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 14.33 – 229.32 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.9999 ค่าร้อยละของการคืนกลับและค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) อยู่ในช่วง 98.03 – 98.70% และ 0.52 – 0.87% ตามลำดับ ชัดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ เท่ากับร้อยละ 0.274 และ 0.912 โดยน้ำหนักแห้งของแก่นมะหาด ตามลำดับ ปริมาณออกซีเรสเวอราทรอลในตัวอย่างแก่นมะหาดมีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 1.54 – 26.23 โดยน้ำหนักแห้งของแก่นมะหาด

อภิปรายผล: วิธีวิเคราะห์ปริมาณออกซีเรสเวอราทรอลในวัตถุดิบแก่นมะหาดด้วยวิธี UHPLC ที่พัฒนาขึ้นผ่านเกณฑ์ยอมรับได้ของการทดสอบความใช้ได้หรือความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทุกค่า โดยวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนา

ขึ้นใช้เวลาน้อย วิธีการเตรียมวัตถุดิบที่ง่าย สะดวก และรวดเร็ว และเหมาะสำหรับใช้วิเคราะห์หาปริมาณออกซีเรสเวอราทรอลในแก่นมะหาดที่เป็นลักษณะงานประจำ โดยผลการวิเคราะห์ปริมาณออกซีเรสเวอราทรอลในตัวอย่างแก่นมะหาด 8 ตัวอย่าง พบว่ามีปริมาณเฉลี่ยร้อยละ 8.80 ± 8.27 โดยน้ำหนักแห้งของแก่นมะหาด ซึ่งชี้ให้เห็นว่าแก่นมะหาดในตลาดวัตถุดิบสมุนไพรของประเทศไทยยังมีคุณภาพที่แตกต่างกันมาก จึงควรต้องมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมเพื่อหาระยะเวลาเก็บเกี่ยวแก่นมะหาดที่เหมาะสมสำหรับการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตยาหรือผลิตภัณฑ์สมุนไพร

ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ: วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความเหมาะสม สามารถนำไปใช้เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์ปริมาณออกซีเรสเวอราทรอลในแก่นมะหาดได้ และควรมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมเพื่อนำไปสู่การกำหนดเกณฑ์ปริมาณออกซีเรสเวอราทรอลในมอโนกราฟีของแก่นมะหาดในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทยต่อไป

คำสำคัญ: แก่นมะหาด, โครมาโทกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูงพิเศษ, ออกซีเรสเวอราทรอล

Development and Validation of Oxyresveratrol Quantification Method in *Artocarpus lacucha* Buch.-Ham. Heartwood by Ultra-High Performance Liquid Chromatography

Aussavashai Shuayprom*, Thanawat Thongchin, Sayan Ruengkhet, Sakwichai Ontong

Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, 88/7 Tiwanon Road, Talat Khwan Subdistrict, Mueang District, Nonthaburi Province 11000, Thailand

*Corresponding author: aussavashai@gmail.com

Abstract

Introduction and Objective: Oxyresveratrol is an active principle in the heartwood of *Artocarpus lacucha* Roxb. ex Buch.–Ham. (Ma Hat in Thai) with antioxidative, anti-inflammatory and pain-relieving activities. This heartwood has been used as an herbal ingredient in various traditional medicinal products and herbal health supplements in the markets. However, available analytical methods for the quality control of oxyresveratrol in *A. lacucha* heartwood are still practically complicated and inconvenient regarding the extraction process and analytical time. Therefore, this study aimed to develop new analytical method for the quantification assessment of oxyresveratrol in *A. lacucha* heartwood samples using ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) technique.

Methods: The study was divided into three steps, namely, 1) developing UHPLC method for the analysis of oxyresveratrol in *A. lacucha* heartwood, 2) testing the validity of the newly-developed analytical method, and 3) quantitative analysis of oxyresveratrol in 8 samples of *A. lacucha* Roxb. heartwood using new method.

Results: UHPLC method development for the analysis of oxyresveratrol in *A. lacucha* heartwood: It was found that oxyresveratrol was best extracted by reflux with methanol for 30 minutes. Chromatographic separation was achieved using ARC-18 column (4.6×150 mm, $2.7 \mu\text{m}$) as the stationary phase, 0.1% ortho-phosphoric acid in water and 0.1% ortho-phosphoric acid in acetonitrile as the isocratic mobile phase, and detection with diode array detector (DAD) at 326 nm. Under these analytical conditions, the average retention time for oxyresveratrol was 4.76 minutes. Method validation: The calibration curve of oxyresveratrol was found to be linear at the concentration range of 14.33 – 229.32 $\mu\text{g/mL}$ with correlation coefficient (r) of 0.9999. The percentage recoveries and % relative standard deviation (%RSD) were in the range of 98.03 – 98.70% and 0.52 – 0.87%, respectively. The limit of detection (LOD) and the limit of quantitation (LOQ) of oxyresveratrol was 0.274 and 0.912% w/w of the

dried heartwood, respectively. Quantitative analysis of oxyresveratrol in 8 heartwood samples showed that the content of oxyresveratrol was in the range of 1.54 – 26.23% w/w (on a dry weight basis).

Discussion: The developed UHPLC method for determining oxyresveratrol content in *A. lacucha* heartwood met all acceptance criteria for analytical method validation. The newly developed method is rapid, with a simple, convenient, and efficient mobile phase preparation process, making it suitable for routine analysis of oxyresveratrol in *A. lacucha* heartwood. The analysis of eight heartwood samples revealed an average oxyresveratrol content of $8.80 \pm 8.27\%$ w/w (on a dry weight basis). This wide variation highlights significant quality differences among raw materials currently available in the domestic herbal market. Consequently, further research is needed to determine the optimal harvesting period for *A. lacucha* heartwood to ensure standardized quality for pharmaceutical and herbal product manufacturing.

Conclusion and Recommendation: The developed method is suitable for the quantitative analysis of oxyresveratrol in *A. lacucha* heartwood. Furthermore, additional research should be conducted to establish acceptance level of oxyresveratrol content in the monograph of “Kaen Ma Hat” or *Artocarpus lacucha* heartwood or in the Thai Herbal Pharmacopoeia (THP) in the future.

Keywords: *Artocarpus lacucha* Roxb. heartwood, oxyresveratrol, UHPLC

บทนำและวัตถุประสงค์

มะหาด มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Artocarpus lacucha* Buch.-Ham. อยู่ในวงศ์ Moraceae มีชื่อเรียกอื่น เช่น monkey jack, กาแย, ตาแป, ตาแปง, หาด, มะหาดเป็นไม้ยืนต้น สูงประมาณ 30 เมตร ทรงพุ่มแผ่กว้าง ใบเดี่ยวเรียงสลับ รูปขอบขนานหรือรูปวงรี กว้าง 8 - 10 ซม. หลังใบเป็นมันสีเขียวเข้ม ท้องใบสาก ดอกช่อออกที่ซอกใบก่อนข้างกลม ก้านสั้นแยกเพศ อยู่บนต้นเดียวกัน ผลเป็นผลรวม สีเหลือง ผิวขรุขระ มีขนนุ่ม (Figure 1) มะหาดมีสรรพคุณ ดังนี้ เปลือกต้น ขับพยาธิไส้เดือน พยาธิเส้นด้าย และพยาธิตัวตืด, แก่น แก้กษัย คุมกำเนิด แก่เส้นเอ็นปวด แก้อาเจียน ละลายเลือด แก้ลม แก้เส้นเอ็นพิการ ระบายท้อง ไม่ผูกไม่ถ่าย. มะหาดมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น ลดความดันโลหิต ต้านแบคทีเรีย ต้านไมโคแบคทีเรียฆ่าพยาธิตัวตืด^[1]

สารสำคัญที่พบในแก่นของต้นมะหาดคือ

ออกซีเรสเวราทรอล (oxyresveratrol) อยู่ในกลุ่มฟอลิฟีนอล กลุ่มย่อย stilbenoids มีสูตรโครงสร้างดังแสดงใน Figure 2 มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน^[2-5] ฤทธิ์ต้านเชื้อราและแบคทีเรีย^[6-8] ฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดได้โดยผ่านการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาไกลโคไซด์^[9] ฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส^[10-13] ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส^[14-16] ฤทธิ์ต้านอักเสบ^[17,18] ฤทธิ์ต้านมะเร็ง^[19] ฤทธิ์ต้านการเกิดไกลเคชัน^[20] ฆ่าพยาธิ^[21] ฤทธิ์ชะลอวัย^[22] เป็นต้น

ปัจจุบันมีรายงานการวิเคราะห์ปริมาณออกซีเรสเวราทรอลในแก่นมะหาดและสารสกัดแก่นมะหาดหลายวิธี เช่น capillary zone electrophoresis^[23], TLC densitometry^[24, 25], HPLC^[9,16, 20,24-27] และ quantitative nuclear magnetic resonance (qNMR)^[28] จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่าการศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณออกซีเรสเวราทรอลในวัตถุดิบแก่นมะหาดและสาร

สกัดแก่นมะหาดยังมีไม่มาก นอกจากนั้น รายงานการศึกษาดังกล่าวยังมีข้อจำกัดในเรื่องเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ที่นานเกินไป หรือวิธีการเตรียมตัวอย่างในการวิเคราะห์และการเตรียมวัสดุภาคเคลื่อนที่มีความยุ่งยาก อาจไม่เหมาะสำหรับใช้ในการวิเคราะห์แบบงานประจำ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ออกซีเรสเวอร์ราทรอลในแก่นมะหาด และทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น เพื่อให้ได้วิธีมาตรฐานที่มีความถูกต้อง แม่นยำ สะดวกและ

รวดเร็ว สามารถใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพของวัตถุดิบและสารสกัดของมะหาดที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์แบบงานประจำ เพื่อเตรียมข้อมูลสำหรับการขออนุญาตขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้ ยังสามารถนำไปใช้ในการวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่มีมะหาดเป็นส่วนผสม รวมถึงเป็นข้อมูลในการพัฒนาพันธุ์มะหาดและวิธีสกัดแก่นมะหาดเพื่อให้ได้สารออกฤทธิ์ในปริมาณสูงเพื่อเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจของมะหาดต่อไป



Figure 1 *Artocarpus lacucha* Roxb. Ex Buch.-Ham. and its heartwood

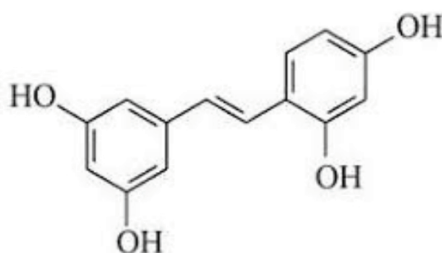


Figure 2 Chemical structure of oxyresveratrol^[25]

ระเบียบวิธีศึกษา

1. วัสดุ

1.1 ตัวอย่างสมุนไพร

จัดหาแก่นมะหาดจำนวน 8 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 1 กิโลกรัม จากแหล่งปลูกธรรมชาติและร้านจำหน่ายสมุนไพรแห้ง ผ่านการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเภสัชเวชเปรียบเทียบกับตัวอย่างจริง (authentic) จำนวน 1 ตัวอย่าง ที่ได้จากอำเภอชะอำ จังหวัดจันทบุรี ว่าเป็นมะหาด *Artocarpus lacucha* Buch.-Ham. วงศ์ Moraceae (Figure 1) โดยนักพฤกษศาสตร์ ห้องปฏิบัติการพิพิธภัณฑ์พืชสถาบันวิจัยสมุนไพร หมายเลขอ้างอิง DMSC 5237 จากนั้นนำแก่นมะหาดมาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ และอบให้แห้งด้วยเตาอบร้อนไฟฟ้าที่มีพัดลมระบายอากาศที่อุณหภูมิ 45 - 50 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง และนำตัวอย่างที่แห้งแล้วไปบดเป็นผงละเอียด ผ่านร่อนที่มีขนาดช่อง 180 ไมโครเมตร เก็บผงสมุนไพรแก่นมะหาดในขวดแก้วสีชาที่มีฝาปิดสนิท ระบุชื่อสมุนไพร แหล่งที่เก็บ วันที่เก็บ และวันที่เตรียมตัวอย่าง เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

1.2 สารมาตรฐาน

สารมาตรฐาน oxyresveratrol ความบริสุทธิ์ $\geq 98\%$ (Chengdu Biopurity Phytochemicals Ltd., Lot. PRF9081641)

1.3 สารเคมีและตัวทำละลาย

methanol HPLC grade, acetonitrile HPLC grade, ethanol AR, ortho-phosphoric acid AR จาก RCI Labscan Limited, Thailand, methanol AR (Merck, Germany), และน้ำปราศจากไอออน (deionized water)

1.4 วัสดุวิทยาศาสตร์และเครื่องแก้ว

คอลัมน์ชนิด C-18 (รุ่น ARC-18), ขนาด 4.6×150 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 2.7 ไมโครเมตร และชนิด C-8 (รุ่น ARC-8), ขนาด 2.1×100 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 3.0 ไมโครเมตร (Restek, USA), กระดาษกรองเบอร์ 4 (Whatman, UK), PVDF membrane filter ขนาด 0.2 ไมโครเมตร, nylon syringe filter ขนาด 0.2 ไมโครเมตร (Leroon, China), เครื่องแก้ว และ micropipette

1.5 เครื่องมือ

เครื่อง Ultra High Performance Liquid Chromatography-DAD detector รุ่น 1290 Infinity II (Agilent), ตู้อบร้อนไฟฟ้ารุ่น UL-50 (Mettler), เครื่องบดปั่น รุ่น RT 34 (ChyunTseh Industrial), เครื่องร่อน รุ่น AS 200 Basic (Retsch), แรงที่มีขนาดช่อง 180 ไมโครเมตร (Endocott), เครื่องระเหยสุญญากาศ ประกอบด้วย อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิรุ่น SB-1000 (Eyela) และ rotavapor รุ่น N-1000 (Eyela) และ เครื่องทำสุญญากาศรุ่น A-3S (Eyela) และเครื่องทำน้ำเย็นหมุนเวียน รุ่น CA-101 (Eyela) และเครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง รุ่น XT 220A (Precisa)

2. วิธีการศึกษา

2.1 การศึกษาหาสภาวะของระบบโครมาโทกราฟี

2.1.1 การเตรียมสารมาตรฐาน

เตรียมสารละลายสารมาตรฐานออกซีเรสเวอราทรอล ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำสารละลายสารมาตรฐานที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC

2.1.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

สกัดตัวอย่างแก่นมะหาด น้ำหนัก 1 กรัม ด้วยเอทานอล ปริมาตร 40 มิลลิลิตร โดยวิธีฟลักซ์ เป็นเวลา 30 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 แล้วนำสารสกัดที่ได้มาระเหยแห้ง ละลายและปรับ ปริมาตรด้วยเมทานอล จนครบ 50 มิลลิลิตร โดยใช้ ขวดแก้ววัดปริมาตร (volumetric flask) กรองผ่าน nylon syringe filter นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไป วิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC

2.1.3 การเลือกชนิดของตัวทำละลายในการสกัด

สกัดตัวอย่างแก่นมะหาด น้ำหนัก 1 กรัม โดยใช้เอทานอล 40 มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับ เมทานอล 40 มิลลิลิตร ด้วยวิธีฟลักซ์ เป็นเวลา 30 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 นำสารสกัด เอทานอลและสารสกัดเมทานอลไประเหยแห้งด้วย เครื่องระเหยสุญญากาศ จากนั้นละลายและปรับ ปริมาตรด้วยเมทานอล จนครบ 50 มิลลิลิตร โดยใช้ ขวดแก้ววัดปริมาตร ปิเปตสารละลายตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยเมทานอล จนครบ 25 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดแก้ววัดปริมาตร กรองผ่าน nylon syringe filter แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการสกัด สารออกซีเรสเวอราทรอลจากแก่นมะหาด

2.1.4 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัด

สกัดตัวอย่างแก่นมะหาด น้ำหนัก 1 กรัม ด้วยเมทานอล ด้วยวิธีฟลักซ์ เป็นเวลา 30, 45 และ 60 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 นำสารละลาย ที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จากนั้นนำสารสกัดมาเตรียมเป็นสารละลายตัวอย่างด้วย

วิธีเดียวกับในข้อ 2.1.3 นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไป วิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC เพื่อเปรียบเทียบผลของ เวลาที่ใช้ในการสกัดสารออกซีเรสเวอราทรอล

2.1.5 การเลือกใช้ความยาวคลื่นในการตรวจวิเคราะห์สารออกซีเรสเวอราทรอล

สกัดตัวอย่างแก่นมะหาด น้ำหนัก 1 กรัม ด้วยเมทานอล ด้วยวิธีฟลักซ์ เป็นเวลา 30 นาที กรอง ผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 นำสารละลายที่ได้ไประเหย แห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จากนั้นนำสารสกัด มาเตรียมเป็นสารละลายตัวอย่างด้วยวิธีเดียวกับใน ข้อ 2.1.3 นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย เครื่อง UHPLC วัดการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet, UV) ของออกซีเรสเวอราทรอล เพื่อดู ความยาวคลื่นที่สารชนิดนี้สามารถดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) และวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างแก่นมะหาด โดยใช้ DAD เพื่อเลือกความยาวคลื่นสำหรับการตรวจ วัดสารออกซีเรสเวอราทรอลโดยที่ไม่พบการซ้อนทับ ของพีคอื่น (co-eluting peaks)

2.1.6 วัฏภาคคงที่ (Stationary phase) และวัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase)

วัฏภาคคงที่ เปรียบเทียบผลของคอลัมน์ ชนิดต่าง ๆ ที่แตกต่างกันในเรื่องชนิดอนุภาคภายใน คอลัมน์ (ชนิด C-18 และ C-8) ความยาวคอลัมน์ (150 และ 100 มิลลิเมตร) โดยพิจารณาเลือกคอลัมน์ จาก ลักษณะของ peak shape, peak symmetry และ retention time

วัฏภาคเคลื่อนที่ ศึกษาชนิดและสัดส่วน ของวัฏภาคเคลื่อนที่ โดยพิจารณาจาก peak shape และ retention time ของออกซีเรสเวอราทรอล ความสามารถในการแยกสิ่งเจือปน (impurity) จาก พีคของออกซีเรสเวอราทรอล ในสารละลายตัวอย่าง

แก่นมะหาด และความดันของระบบโครมาโทกราฟี

2.2 การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation)

ทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณออกซีเรสเวอราทรอลในแก่นมะหาดที่พัฒนาขึ้นตามแนวปฏิบัติ การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดี่ยว กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข^[29] และ ICH Harmonised Guideline Validation of Analytical Procedures Q2(R1)^[30]

2.2.1 การทดสอบความจำเพาะ (specificity)

ฉีดสารละลายสารมาตรฐานออกซีเรสเวอราทรอล ความเข้มข้น 50.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และสารละลายตัวอย่างด้วยเครื่อง UHPLC เพื่อตรวจสอบการแยกสารออกซีเรสเวอราทรอลออกจากกันและออกจากการรบกวนของสารอื่น ซึ่งต้องมีค่า retention time แยกจากกันได้ดี กำหนด peak purity และค่า resolution

2.2.2 การทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) และช่วงการวิเคราะห์ (range)

เตรียมสารละลายสารมาตรฐานออกซีเรสเวอราทรอล โดยชั่งสารมาตรฐานออกซีเรสเวอราทรอล น้ำหนัก 10 มิลลิกรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยเมทานอล จนครบ 50 มิลลิลิตร ด้วยขวดแก้ววัดปริมาตร จะได้ stock solution ของสารละลายมาตรฐานออกซีเรสเวอราทรอลความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เจือจางให้ได้ 5 ระดับความเข้มข้น คือ 12.50, 25.0, 50.0, 100.0 และ 200.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ฉีดสารละลายมาตรฐานออกซีเรสเวอราทรอล ที่ 5 ระดับความเข้มข้น ความ

เข้มข้นละ 3 ซ้ำ เข้าเครื่อง UHPLC นำค่าพื้นที่ใต้พีค (area under curve, AUC) และความเข้มข้นของสารละลายสารมาตรฐานออกซีเรสเวอราทรอลไปสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) และคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r)

2.2.3 การทดสอบหาร้อยละของการคืนกลับ (% recovery) และความเที่ยง (precision)

การทดสอบร้อยละของการคืนกลับ (% recovery)

เตรียม sample blank (sample blank คือ ตัวอย่างแก่นมะหาดที่นำมาสกัดและตรวจวิเคราะห์หาปริมาณออกซีเรสเวอราทรอล แล้วมีปริมาณสารออกซีเรสเวอราทรอลในปริมาณต่ำ) โดยชั่งตัวอย่างแก่นมะหาด 1 กรัม สกัดด้วยเมทานอล ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ด้วยวิธีรีฟลักซ์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำสารสกัดมาเตรียมเป็นสารละลายตัวอย่างด้วยวิธีเดียวกับในข้อ 2.1.3 นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC จำนวน 6 ซ้ำ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย (mean)

เตรียม spiked sample ลงใน sample blank โดยเติมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 3 ระดับ ระดับละ 3 ซ้ำ ฉีดซ้ำละ 2 ครั้ง โดย spiked สารละลายสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นระดับต่ำ กลาง และสูง ลงไปใน sample blank 50, 100, 150% ตามลำดับ

เติมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 3 ระดับ ลงใน sample blank แล้ววิเคราะห์ sample blank (unspiked) จำนวน 6 ซ้ำ และวิเคราะห์ spiked sample ระดับละ 3 ซ้ำ จากนั้นคำนวณค่าร้อยละของการคืนกลับ (% recovery)

$$\% \text{ recovery} = \frac{(C1 - C2)}{C3} \times 100$$

เมื่อ C1 คือ ความเข้มข้นของสารใน spiked sample

C2 คือ ความเข้มข้นของสารใน sample blank

C3 คือ ความเข้มข้นของสารที่เติม

การทดสอบความเที่ยง (precision)

Repeatability precision ทดสอบโดยวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์เรสเวอราทรอลในตัวอย่างแก่นมะหาดเข้มข้น 801.20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซ้ำ 10 ครั้ง ในวันเดียวกัน นำค่าพื้นที่ใต้พีคมาคำนวณ

LOD ($\mu\text{g/mL}$), ค่าประมาณ = $3 \times \text{standard error/slope}$

$$\text{LOD (\% w/w), ค่าประมาณ} = \frac{\text{LOD (\mu g/mL)} \times \text{ปริมาตรที่เตรียม (mL)} \times \text{ระดับเจือจาง}}{1,000,000 \times \text{น้ำหนักตัวอย่าง (g)}} \times 100$$

เตรียมสารละลายตัวอย่างแก่นมะหาด โดยซังตัวอย่างแก่นมะหาด 1 กรัม สกัดด้วยเมทานอลโดยวิธีรีฟลักซ์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำสารสกัดมาเตรียมเป็นสารละลายตัวอย่างด้วยวิธีเดียวกับในข้อ 2.1.3 นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC

เตรียมสารละลาย spiked sample ให้มีความเข้มข้นใกล้เคียงกับค่าประมาณของ LOD

ความเข้มข้นสารออกฤทธิ์เรสเวอราทรอล คำนวณค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% relative standard deviation, % RSD) เกณฑ์การยอมรับ (acceptance criteria) คือ % RSD < 2

Intermediate precision ทดสอบโดยวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์เรสเวอราทรอลในตัวอย่างแก่นมะหาดเข้มข้น 801.20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 วัน วันละ 10 ซ้ำ คำนวณค่า % RSD เกณฑ์การยอมรับ (acceptance criteria) คือ % RSD < 2

2.2.4 การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD)

คำนวณค่าประมาณ (estimated) ของ LOD จากกราฟมาตรฐาน ดังนี้

แล้วตรวจวิเคราะห์ปริมาณออกฤทธิ์เรสเวอราทรอล ใน spiked sample 6 ซ้ำ คำนวณค่า % RSD และ % recovery เกณฑ์การยอมรับ (acceptance criteria) คือ % RSD < 2

2.2.5 การทดสอบขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

คำนวณค่าประมาณของ LOQ จากกราฟมาตรฐาน ดังนี้

LOQ ($\mu\text{g/mL}$), ค่าประมาณ = $10 \times \text{standard error/slope}$

$$\text{LOQ (\% w/w), ค่าประมาณ} = \frac{\text{LOQ (mg/mL)} \times \text{ปริมาตรที่เตรียม (mL)} \times \text{ระดับเจือจาง}}{1,000 \times \text{น้ำหนักตัวอย่าง (g)}} \times 100$$

เตรียมสารละลาย spiked sample ให้มีความเข้มข้นใกล้เคียงกับค่าประมาณของ LOQ แล้วตรวจวิเคราะห์ปริมาณออกซีเรสเวอราทรอล ใน spiked sample 6 ซ้ำ คำนวณค่า % RSD และ % recovery เกณฑ์การยอมรับ (acceptance criteria) คือ % RSD < 2

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณออกซีเรสเวอราทรอลในตัวอย่างแก่นมะหาด

2.3.1 การเตรียมสารละลายตัวอย่างแก่นมะหาด

สกัดตัวอย่างแก่นมะหาด น้ำหนัก 1 กรัม ด้วยเมทานอล ปริมาตร 40 มิลลิลิตร โดยวิธีรีฟลักซ์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำสารสกัดมาเตรียมเป็น

สารละลายตัวอย่างด้วยวิธีเดียวกับในข้อ 2.1.3 นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC

วิเคราะห์ปริมาณออกซีเรสเวอราทรอล ในตัวอย่างแก่นมะหาด จำนวน 8 ตัวอย่าง ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น โดยที่แต่ละตัวอย่างให้วิเคราะห์ 3 ซ้ำ นำมาหาความเข้มข้นของสารออกซีเรสเวอราทรอล ในสารละลายตัวอย่างแก่นมะหาด ($\mu\text{g/mL}$) โดยคำนวณจากกราฟมาตรฐาน แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย (mean)

จากนั้นคำนวณปริมาณออกซีเรสเวอราทรอล เป็นค่าร้อยละโดยน้ำหนักของตัวอย่างแก่นมะหาด (% w/w) ด้วยสมการ

$$C_s (\% \text{ w/w}) = \frac{C_0 (\mu\text{g/mL}) \times \text{ปริมาตรที่เตรียม (mL)} \times \text{ระดับเจือจาง}}{1,000,000 \times \text{น้ำหนักตัวอย่าง (g)}} \times 100$$

เมื่อ C_0 คือ ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ในสารละลายที่คำนวณได้จากกราฟมาตรฐาน ($\mu\text{g/mL}$)

C_s คือ ปริมาณของสารที่วิเคราะห์เมื่อคำนวณเป็นร้อยละโดยน้ำหนักแห้งของสมุนไพร (g/100 g dried herb)

ผลการศึกษา

1. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณออกซีเรสเวอราทรอลในแก่นมะหาด

1.1 การศึกษาหาสภาวะของระบบโครมาโทกราฟี

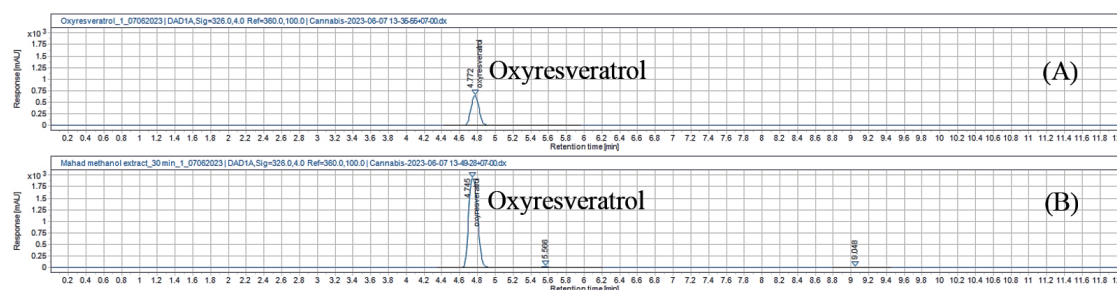
หลังจากนำสารละลายมาตรฐานของออกซีเรสเวอราทรอลและสารละลายตัวอย่างแก่นมะหาดไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC พบว่าได้สภาวะของ

ระบบโครมาโทกราฟีที่เหมาะสมในการแยกสารออกซีเรสเวอราทรอล ดังแสดงใน Table 1 และ Figure 3 โดยสัดส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ (0.1% ortho-phosphoric acid in deionized water (A) และ 0.1% ortho-phosphoric acid in acetonitrile (B)) แบบ Isocratic program จะเริ่มที่เวลา นาทีที่ 0.0 ถึง นาทีที่ 12.0 ใช้ %A : %B (80 : 20)

Table 1 Optimal chromatography conditions for the separation of oxyresveratrol by UHPLC system

Optimal UHPLC conditions			
Stationary phase	UHPLC column ARC–18; 4.6 × 150 mm, 2.7 μm		
Column Temperature	40 °C		
Mobile phase	Isocratic: 0.1% ortho–phosphoric acid in deionized water (A) and 0.1% ortho–phosphoric acid in acetonitrile (B)		
Flow rate	1.0 mL/min		
Detection	DAD 326 nm		
Injection volume	5 μL		

Isocratic program			
Time (min)	Flow rate (mL/min)	0.1% H ₃ PO ₄ in water (%A)	0.1% H ₃ PO ₄ in acetonitrile (%B)
initial	1.0	80	20
12.0	1.0	80	20

**Figure 3** Chromatogram of standard solution of oxyresveratrol (A) and sample solution of *Artocarpus lacucha* Roxb. ex Buch.–Ham. heartwood (B)

1.2 การเลือกชนิดของตัวทำละลายในการสกัด

การศึกษานิตของตัวทำละลายในการสกัดพบว่าเมื่อนำสารละลายที่ได้จากการสกัดแก่นมะหาดด้วยเอทานอลและเมทานอล วิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC ตัวอย่างละ 2 ข้าง พบว่าพื้นที่ใต้พีคเฉลี่ยของสารออกซีเรสเวอราทรอล จากการสกัดแก่นมะหาดด้วยเอทานอล ที่ retention time เฉลี่ย 4.76 นาที

มีค่า 1,710.013 ซึ่งน้อยกว่าแก่นมะหาดที่สกัดด้วยเมทานอล คือ ที่ retention time เฉลี่ย 4.75 มีค่า 2,682.038 (Figure 4)

ดังนั้น ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณออกซีเรสเวอราทรอลในแก่นมะหาด จึงเลือกใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายในการสกัดแก่นมะหาด

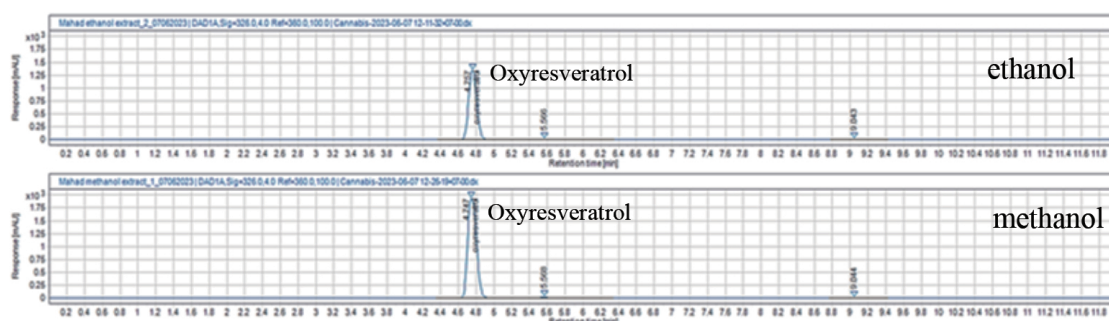


Figure 4 Effect of ethanol and methanol as solvent for the extraction of oxyresveratrol in *Artocarpus lacucha* Roxb. ex Buch.–Ham. heartwood.

1.3 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัด

เมื่อนำสารละลายที่ได้จากการสกัดตัวอย่าง แก่นมะหาดที่สกัดด้วยวิธีเดียวกันโดยการรีฟลักซ์กับ เมทานอล ที่ระยะเวลาสกัดแตกต่างกัน (30, 45 และ 60 นาที) มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC พบว่าสาร ออกซีเรสเวราทรอลให้ retention time เหลือ 4.76 นาที ค่าพื้นที่ใต้พีคของสารออกซีเรสเวราทรอล จากการ

สกัดด้วยระยะเวลา 30 นาที มีค่ามากกว่าการสกัด ด้วยระยะเวลา 45 และ 60 นาที ตามลำดับ (Table 2) ดังนั้น ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารออกซี- เรสเวราทรอลในแก่นมะหาดจึงเลือกใช้เมทานอล เป็นตัวทำละลายในการสกัดและใช้เวลาในการสกัด 30 นาที

Table 2 Effect of extraction time (30, 40, and 60 minutes) on retention time and peak areas of oxyresveratrol extracted from *Artocarpus lacucha* Roxb. ex Buch.–Ham. heartwood using methanol as solvent.

Extraction time (minutes)	Sample No.	Retention time (min)/ peak area of oxyresveratrol
30 min	1	4.745/2680.749
	2	4.747/2679.821
45 min	1	4.755/2013.280
	2	4.757/2050.196
60 min	1	4.763/1553.299
	2	4.766/1582.032

1.4 ความยาวคลื่นในการตรวจวัดสารออกซีเรส-เวราทรอล

จากการศึกษาการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต ของออกซีเรสเวราทรอล พบว่า $\lambda_{\max}$ ของสาร ออกซีเรสเวราทรอลในสารละลายมาตรฐาน

ออกซีเรสเวราทรอล (E) และสารละลายตัวอย่าง แก่นมะหาด (F) มีค่าเท่ากับ 218, 302 และ 326 นาโนเมตร (Figure 5) และเมื่อวิเคราะห์สารละลายตัวอย่าง แก่นมะหาดด้วยเครื่อง UHPLC โดยใช้ DAD เป็นเครื่อง ตรวจวัด ที่ความยาวคลื่น 326 นาโนเมตร ไม่พบการ

ซ้อนทับของพีคของสารอื่น

ดังนั้น ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารออก

ชีเรสเวอร์ราทรอลในแก่นมะหาด จึงเลือกการตรวจวัด

การดูดกลืนแสง UV ที่ความยาวคลื่น 326 นาโนเมตร

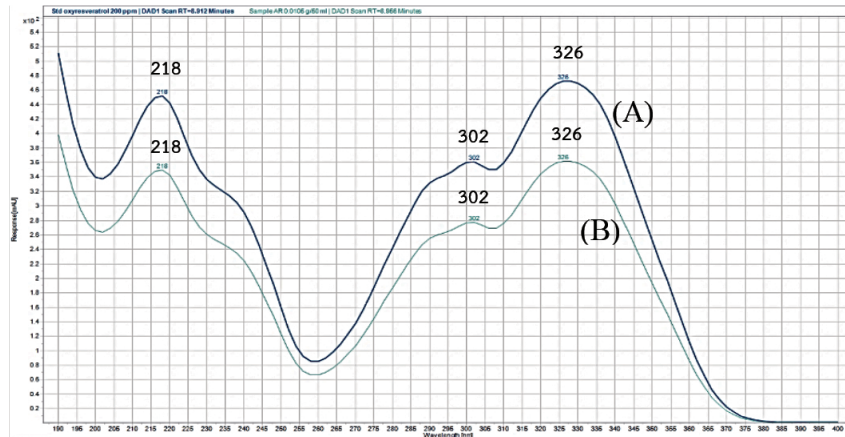


Figure 5 UV spectrum of standard oxyresveratrol (A) and sample solution of methanolic extract of *Artocarpus lacucha* Roxb. ex Buch.-Ham. heartwood (B)

1.5 วัฏภาคคงที่ (stationary phase) และวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase)

วัฏภาคคงที่ พบว่าเมื่อใช้ UHPLC column ชนิด C-8 (G), ขนาด 2.1 × 100 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 3.0 ไมโครเมตร UHPLC chromatographic fingerprint ที่ได้ให้พีคของออกซีเรสเวอร์ราทรอลที่ retention time 1.86 นาที แต่ให้การแยกสารออกซีเรส-

เวอร์ราทรอลออกจากสิ่งเจือปนอื่นได้น้อย เมื่อใช้ UHPLC column ชนิด C-18 (H), ขนาด 4.6 × 150 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 2.7 ไมโครเมตร UHPLC chromatographic fingerprint ที่ได้ให้พีคของออกซีเรสเวอร์ราทรอล ที่ retention time 4.75 นาที ซึ่งมีการแยกจากสิ่งเจือปน (impurity) อื่นอย่างชัดเจน (Figure 6)

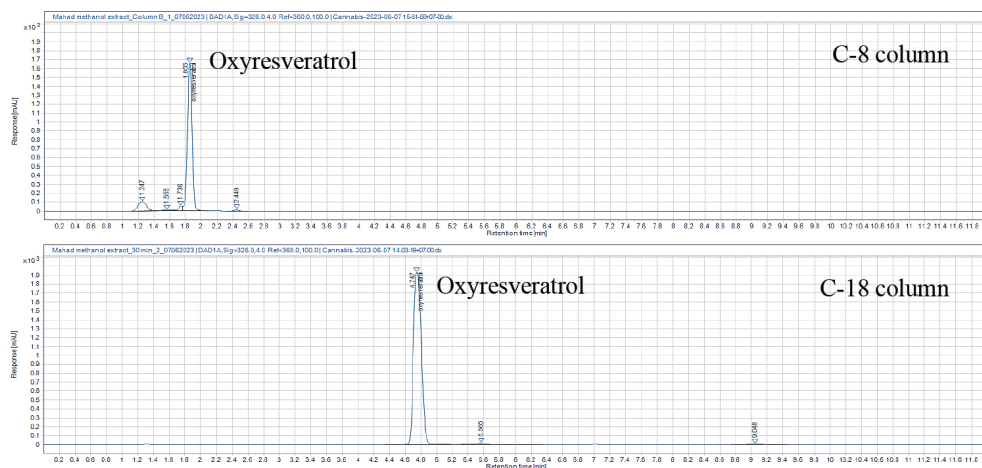


Figure 6 Chromatogram of sample solution of methanolic extract of *Artocarpus lacucha* Roxb. ex Buch-Ham. heartwood using C-8 column vs C-18 column

ภูมิภาคเคลื่อนที่พบว่าเมื่อปรับเปลี่ยนองค์ประกอบและสัดส่วนของภูมิภาคเคลื่อนที่จากเมทานอลและอะซิโตนไนไทรล์ เป็น 0.1% ออร์โทฟอสโฟริกแอซิด (0.1% ortho-phosphoric acid) ในน้ำ และ 0.1% ออร์โทฟอสโฟริกแอซิดในอะซิโตนไนไทรล์ มีผลให้

retention time ของสารออกซีเรสเวราทรอล เปลี่ยนจาก 9.631 นาที เป็น 4.622 นาที และได้ peak shape ของออกซีเรสเวราทรอลที่ดีขึ้น การแยกดีขึ้น และแยกจากสิ่งเจือปนอื่นอย่างชัดเจน (Figure 7)

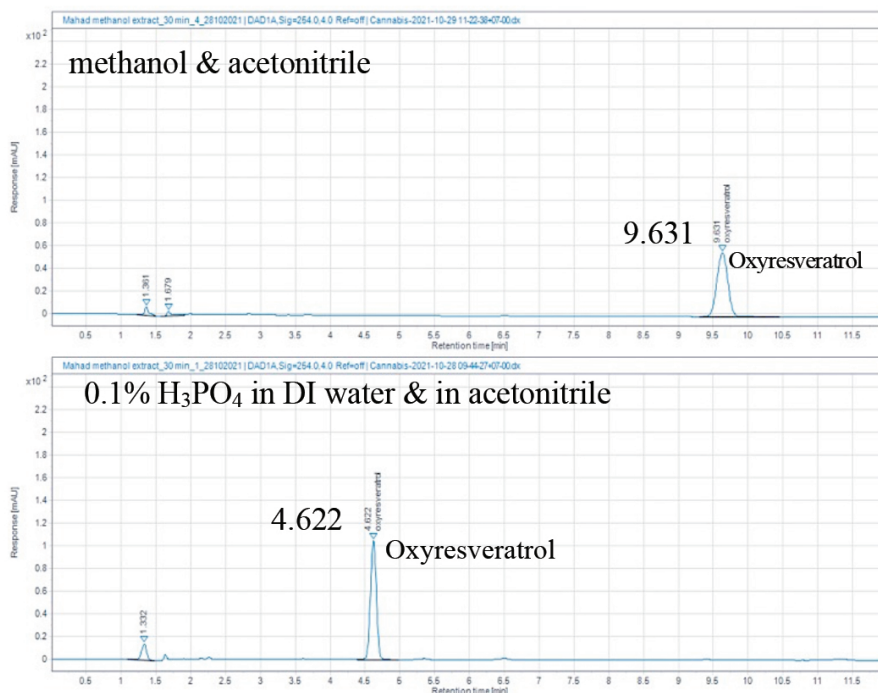


Figure 7 Effect of two types of mobile phase in isocratic program (methanol and acetonitrile VS 0.1% ortho-phosphoric acid in deionized water and in acetonitrile) on chromatograms of methanolic extract of *Artocarpus lacucha* Roxb. ex Buch.-Ham. heartwood sample solution

ดังนั้น ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณออกซีเรสเวราทรอลในแก่นมะหาดด้วยเครื่อง UHPLC จึงเลือกใช้ UHPLC column ชนิด C-18, ขนาด 4.6×150 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 2.7 ไมโครเมตร ใช้ 0.1% ออร์โทฟอสโฟริกแอซิดในน้ำ และ 0.1% ออร์โทฟอสโฟริกแอซิดในอะซิโตนไนไทรล์ เป็นภูมิภาคเคลื่อนที่ ที่ตรวจวัดด้วย DAD ที่ความยาวคลื่น 326 นาโนเมตร

2. การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (method validation)

2.1 การทดสอบความจำเพาะ (specificity)

จากการฉีดสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างแก่นมะหาด พบว่าภายใต้สภาวะ UHPLC ที่พัฒนาขึ้นสามารถแยกสารออกซีเรสเวราทรอลออกจากกันได้ และไม่มีการรบกวนของสารอื่นในตัวอย่าง โดยมีค่า retention time เฉลี่ย

เท่ากับ 4.76 นาที มีค่า peak purity ของสารละลาย
สารมาตรฐานซีรัมโบน เท่ากับร้อยละ 96.74 และมีค่า
resolution > 2 เมื่อคำนวณจากพีคของออกซีเรส-

เวอราทอรอลกับพีคสารอื่นในสารละลายตัวอย่าง
แก่นมะหาด (Figure 8)

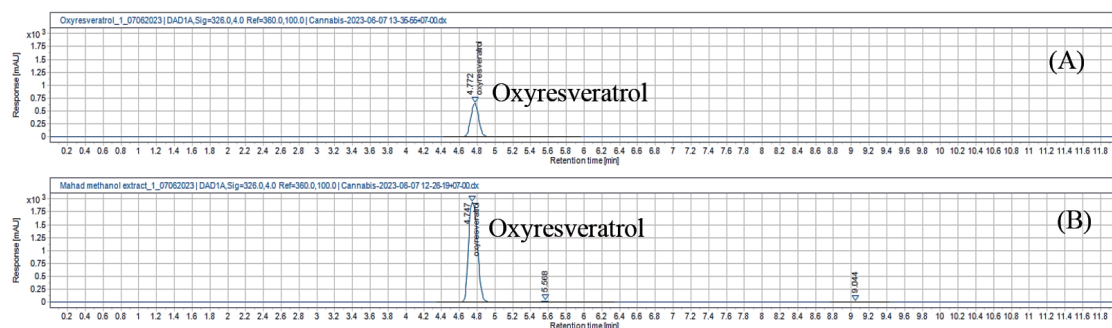


Figure 8 Chromatogram of standard solution of oxyresveratrol (A) and sample solution of *Artocarpus lacucha* Roxb. ex Buch.–Ham. heartwood (B)

2.2 การทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) และช่วงการวิเคราะห์ (range)

จากกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ
สารละลายมาตรฐานและพื้นที่ใต้พีค พบว่าความเข้ม
ขึ้นของสารละลายมาตรฐานออกซีเรสเวอราทอรอลกับ

พื้นที่ใต้พีคมีลักษณะเป็นเส้นตรง โดยสารมาตรฐาน
ออกซีเรสเวอราทอรอลมีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วง
ความเข้มข้น 14.333 - 229.320 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9999
(Figure 9)

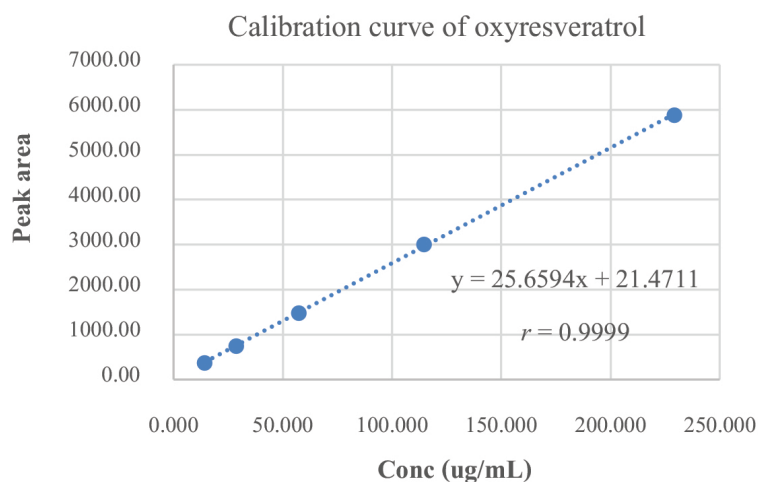


Figure 9 Calibration curve of standard oxyresveratrol determined by UHPLC at 326 nm showing peak areas against concentration range of 14.333 – 229.320 $\mu\text{g/mL}$

2.3 การทดสอบร้อยละของการคืนกลับ

(% recovery) และความเที่ยง (precision)

เมื่อเติมสารละลายสารมาตรฐานออกซีเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ในช่วงการใช้งาน 3 ระดับ ลงใน sample blank วิเคราะห์ sample blank จำนวน 6 ซ้ำ และวิเคราะห์ spiked sample ระดับ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำทำ duplicate ตามลำดับ การเตรียม spiked sample ให้มีความเข้มข้น 50, 100, 150 % ความเข้มข้นของออกซีเรสเวอราทรอลที่คำนวณได้เท่ากับ 9.5550, 32.7600 และ 85.9950 ไมโครกรัม/

มิลลิลิตร ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง spiked sample พบว่าในทุกระดับความเข้มข้น ร้อยละของการคืนกลับของสารออกซีเรสเวอราทรอลอยู่ในช่วงร้อยละ 98.03 - 98.70 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (ร้อยละ 95 - 105) และมีค่า % RSD อยู่ในช่วง 0.52 - 0.87 ซึ่งไม่เกิน 2.00 อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ส่วนค่า HorRatR ที่แสดง repeatability ของการวิเคราะห์สารออกซีเรสเวอราทรอลภายในห้องปฏิบัติการเดียว อยู่ในช่วง 0.72 - 1.34 ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ (0.3 - 1.3) (Table 3)

Table 3 Results of % recovery and repeatability

Analyzed substance	Sample blank concentration		Spiked sample concentration		% Recovery (mean $\pm$ SD)	%RSD (n=6)	HorRatR
	($\mu\text{g/mL}$)	(%w/w)	(%)	($\mu\text{g/mL}$)			
Oxyresveratrol	28.6650	3.5653	50	9.5550	98.03 $\pm$ 0.51	0.52	0.72
			100	32.7600	98.70 $\pm$ 0.86	0.87	1.34
			150	85.9950	98.61 $\pm$ 0.66	0.67	1.14

การทดสอบความเที่ยง (precision)

Repeatability precision ของการวิเคราะห์ปริมาณสารออกซีเรสเวอราทรอลในตัวอย่างแถมมะหาด พบว่ามีค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) เท่ากับ 0.09 ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับ

Intermediate precision, between-day ของการวิเคราะห์ปริมาณสารออกซีเรสเวอราทรอลในตัวอย่างแถมมะหาด พบว่ามีค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับ 0.13 ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับ

2.4 การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ

(Limit of detection, LOD)

จากการคำนวณค่าประมาณของ LOD ของออกซีเรสเวอราทรอล ตามสูตรในวิธีการศึกษาข้อ 2.2.4 พบว่า

- ค่าประมาณของ LOD ($\mu\text{g/mL}$) จากกราฟมาตรฐานของออกซีเรสเวอราทรอล มีค่า 2.200 $\mu\text{g/mL}$
- ค่าประมาณของ LOD (% w/w) เท่ากับ ร้อยละ 0.274 โดยน้ำหนักแห้งของแถมมะหาด
- ร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วงร้อยละ 97.26 - 99.71 และค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 1.02

2.5 การทดสอบขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

จากการคำนวณค่าประมาณของ LOQ ของออกซีเรสเวราทรอล ตามสูตรในวิธีการศึกษาข้อ 2.2.5 พบว่า

- ค่าประมาณของ LOQ ($\mu\text{g/mL}$) จากกราฟมาตรฐานของออกซีเรสเวราทรอล มีค่า $7.334 \mu\text{g/mL}$
- ค่าประมาณของ LOQ (% w/w) เท่ากับร้อยละ 0.912 โดยน้ำหนักแห้งของแก่นมะหาด
- ร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วงร้อยละ

96.13 - 98.72 และค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 1.14

3. การวิเคราะห์ปริมาณออกซีเรสเวราทรอลในแก่นมะหาด

ผลการวิเคราะห์ปริมาณออกซีเรสเวราทรอลในตัวอย่างแก่นมะหาด จำนวน 8 ตัวอย่าง พบว่าปริมาณสารออกซีเรสเวราทรอลในตัวอย่างแก่นมะหาดมีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 1.54 - 26.23 โดยน้ำหนัก มีปริมาณเฉลี่ยร้อยละ 8.80 ± 8.27 โดยน้ำหนักแห้งของแก่นมะหาด (Table 4)

Table 4 Concentrations ($\mu\text{g/mL}$) and contents (% w/w) of oxyresveratrol in *Artocarpus lacucha* Roxb. ex Buch.–Ham. heartwood extract sample solutions, and as percent by weight of dried heartwood samples.

Sample No.	Collection site	Concentration* ($\mu\text{g/mL}$)	Content** (% w/w)
1	Makham District, Chanthaburi Province	89.56	11.14
2	Pong Nam Ron District, Chanthaburi Province	87.23	10.85
3	Jakrawat Herbal Shop	92.86	11.55
4	Bangkok Herbal Shop	12.38	1.54
5	Tha Prachan Herbal Shop	22.03	2.74
6	Tan Chun Herbal Shop	38.11	4.74
7	San Dee Pharmacy Herbal Shop	210.88	26.23
8	Ban Mho Kim Herbal Shop	13.18	1.64
	mean		8.80
	SD		8.27

* Concentrations of oxyresveratrol ($\mu\text{g/mL}$) calculated from linear equation of standard curve using peak areas analyzed by UHPLC.

** Content of oxyresveratrol in % w/w on a dry weight basis

อภิปรายผล

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารออกซีเรสเวราทรอลในวัตถุดิบแก่นมะหาดด้วยวิธี UHPLC จะใช้ เมทานอลเป็นตัวทำละลายในการสกัด ใช้เวลา

ในการสกัด 30 นาที เลือกใช้คอลัมน์ชนิด C-18 ขนาด 4.6×150 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 2.7 ไมโครเมตร เป็นวัสดุภาคคงที่ ใช้ 0.1% ออร์โทฟอสโฟรีกแอซิดในน้ำ และ 0.1% ออร์โทฟอสโฟรีกแอซิดในอะซิโตนไทรล

แบบ Isocratic อัตราส่วน 80 : 20 เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตร/นาที ตรวจวัดสารด้วย diode array detector (DAD) ที่ความยาวคลื่น 326 นาโนเมตร ใช้เวลาในการวิเคราะห์ 12 นาที จะปรากฏตำแหน่งพีคของสารออกซีเรสเวอราทรอลที่ retention time เฉลี่ย 4.76 นาที

เมื่อเปรียบเทียบตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด แก่นมะหาดจะเลือกใช้เมทานอล เนื่องจากสารสกัด แก่นมะหาดด้วยเมทานอลจะให้พื้นที่ใต้พีคของสารออกซีเรสเวอราทรอลมากกว่าสารสกัดแก่นมะหาดด้วยเอทานอล เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC

ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ พบว่าทั้งหมดอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ คือกราฟมาตรฐานของออกซีเรสเวอราทรอลมีความเป็นเส้นตรงตลอดช่วงการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 14.333 - 229.320 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9999 ถือว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ คือมากกว่า 0.995

ผลการทดสอบความแม่นยำของวิธี พบว่าร้อยละของการคืนกลับของสารออกซีเรสเวอราทรอล อยู่ในช่วง 98.03 - 98.70 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ที่กำหนดค่าไว้ในช่วงร้อยละ 95 - 105 ค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ อยู่ในช่วง 0.52 - 0.87 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ที่กำหนดค่าไว้ไม่เกินร้อยละ 2.0 และค่า HorRat อยู่ในช่วง 0.72 - 1.34 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ที่กำหนดค่าไว้ คือ 0.3 - 1.3 แสดงว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความแม่นยำ การทดสอบความเที่ยงพบว่าการวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวน 10 ซ้ำภายในวันเดียวกันและการวิเคราะห์ตัวอย่างเมื่อเปลี่ยนวันที่วิเคราะห์เป็นเวลา 3 วัน วันละ 10 ซ้ำ มีค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ

0.09 และ 0.13 ตามลำดับ ค่าขีดจำกัดของการตรวจพบของการวิเคราะห์สารออกซีเรสเวอราทรอล เท่ากับ 2.20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ร้อยละ 0.274 โดยน้ำหนักแห้งของแก่นมะหาด ค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณของการวิเคราะห์สารออกซีเรสเวอราทรอล เท่ากับ 7.33 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ร้อยละ 0.912 โดยน้ำหนักแห้งของแก่นมะหาดและผลทดสอบยืนยันค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ โดยทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงที่ระดับความเข้มข้นนี้จำนวน 6 ซ้ำ ได้ค่าร้อยละของการคืนกลับ เท่ากับ 97.68 ± 1.12 และค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 1.14 ดังนั้น ที่ความเข้มข้นระดับนี้มีความแม่นยำและความเที่ยงเหมาะสมกับการใช้งาน

ผลการวิเคราะห์ปริมาณออกซีเรสเวอราทรอล ในตัวอย่างแก่นมะหาด จำนวน 8 ตัวอย่าง พบว่า ปริมาณสารออกซีเรสเวอราทรอลในตัวอย่างแก่นมะหาดมีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 1.54 - 26.23 โดยน้ำหนักแห้งของแก่นมะหาด และมีค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ 8.80 ± 8.27 % w/w ซึ่งชี้ให้เห็นว่าคุณภาพของแก่นมะหาดในตลาดวัตถุดิบสมุนไพร เมื่อใช้ปริมาณของออกซีเรสเวอราทรอลเป็นเกณฑ์ยังมีปัญหา เพราะคุณภาพแตกต่างกันมาก ดังนั้น ควรมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมว่าระยะเวลาที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยวแก่นมะหาดควรเป็นเวลาที่ปี เพื่อให้ได้สารออกซีเรสเวอราทรอลในปริมาณสูง และหากจะกำหนดค่ามาตรฐานของปริมาณออกซีเรสเวอราทรอลในแก่นมะหาดในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia, THP) ว่าต้องมีปริมาณไม่ต่ำกว่าร้อยละเท่าใดของน้ำหนักแห้งของแก่นมะหาด คงต้องมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมโดยใช้

จำนวนตัวอย่างที่มากกว่านี้มาก

เมื่อเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารออกซีสเรสเวราทรอลในแก่นมะหาดด้วยวิธี UHPLC ที่พัฒนาขึ้นใหม่นี้กับรายงานผลการศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณสารออกซีสเรสเวราทรอลในแก่นมะหาดก่อนหน้านี้ โดยเมื่อเปรียบเทียบการเลือกใช้ภูมิภาคเคลื่อนที่ พบว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นใหม่นี้ให้ peak shape ของสารออกซีสเรสเวราทรอลที่สมมาตร มีการแยกจากสิ่งเจือปน (impurity) อื่นอย่างชัดเจนกว่าวิธีการวิเคราะห์ที่มีรายงานไว้ก่อนหน้านี้^[16,24,26] และเมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์ พบว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นใหม่นี้ใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยกว่าวิธีการวิเคราะห์ที่มีรายงานไว้ก่อนหน้านี้^[16,24] แต่ใช้เวลามากกว่ารายงานผลการวิเคราะห์ของดวงเพ็ญ ปัทมดิลก และคณะ^[26] อย่างไรก็ตาม วิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีข้อได้เปรียบเหนือวิธีการวิเคราะห์ที่มีรายงานไว้ก่อนหน้านี้ในแง่ของความเรียบง่ายและเวลาที่รวดเร็วในวิธีเตรียมตัวอย่าง โดยวิธีวิเคราะห์ก่อนหน้านี้ใช้วิธีสกัดแก่นมะหาดเป็นเวลา 60 นาที^[26] 6 ชั่วโมง^[16] และ 8 ชั่วโมง^[24] ในขณะที่วิธีวิเคราะห์นี้เตรียมสารสกัดแก่นมะหาดโดยการสกัดด้วยวิธีรีฟลักซ์ ใช้เวลา 30 นาที

เมื่อนำวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นใหม่นี้เปรียบเทียบกับผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารออกซีสเรสเวราทรอลของมะหาดจากวิทยานิพนธ์ของ Acom Sornsute^[16] และรายงานการศึกษาของดวงเพ็ญ ปัทมดิลก และคณะ^[26] พบว่าค่าร้อยละของการคืนกลับของสารออกซีสเรสเวราทรอล (95.91 - 99.64) ของวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีค่าใกล้เคียงกับวิธีการวิเคราะห์ที่มีรายงานไว้ก่อนหน้านี้ (103.8 - 110.5)^[16] และ (95.75 - 100.36)^[26] ตามลำดับ

ค่าขีดจำกัดของการตรวจพบของการวิเคราะห์สารออกซีสเรสเวราทรอล (2.20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณของการวิเคราะห์สารออกซีสเรสเวราทรอล (7.33 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ที่ได้จากวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีค่ามากกว่าค่าขีดจำกัดของการตรวจพบของการวิเคราะห์สารออกซีสเรสเวราทรอล (1.2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณของการวิเคราะห์สารออกซีสเรสเวราทรอล (4.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ที่ได้จากวิธีการวิเคราะห์ที่มีรายงานไว้ก่อนหน้านี้^[16] แต่มีค่าน้อยกว่าค่าขีดจำกัดของการตรวจพบของการวิเคราะห์สารออกซีสเรสเวราทรอล (5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณของการวิเคราะห์สารออกซีสเรสเวราทรอล (17 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ที่ได้จากวิธีการวิเคราะห์จากรายงานการศึกษาของดวงเพ็ญ ปัทมดิลก และคณะ^[26] ทั้งนี้ค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณของการวิเคราะห์สารออกซีสเรสเวราทรอลของวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงเพื่อยืนยันค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณของการวิเคราะห์สารออกซีสเรสเวราทรอล ซึ่งแตกต่างกับวิธีการวิเคราะห์ที่มีรายงานไว้ก่อนหน้านี้ที่ไม่ได้มีการทดสอบดังกล่าว^[16,26]

จากผลการเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารออกซีสเรสเวราทรอลในแก่นมะหาดด้วยวิธี UHPLC ที่พัฒนาขึ้นใหม่นี้กับรายงานการศึกษาวิธีการวิเคราะห์ที่มีรายงานไว้ก่อนหน้านี้สามารถสรุปได้ว่า วิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถใช้เป็นทางเลือกใช้ในการตรวจวิเคราะห์ที่เป็นงานประจำได้ดี เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการควบคุมคุณภาพวัตถุดิบ สารสกัด และผลิตภัณฑ์จากมะหาด การขออนุญาตขึ้นทะเบียน

ผลิตภัณฑ์ การวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่มีเมหาคเป็นส่วนผสม รวมถึงเป็นข้อมูลในการพัฒนาพันธุ์เมหาคและวิธีสกัดแก่นเมหาคเพื่อให้ได้ปริมาณสารออกฤทธิ์ในปริมาณสูงเพื่อเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจของพืชเมหาคต่อไป

ข้อสรุป

การศึกษานี้ได้พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณออกซีเรสเวราทรอลในแก่นเมหาคด้วยวิธี UHPLC และทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ผลการวิจัยพบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้น มีความถูกต้องแม่นยำ สะดวก รวดเร็ว และประหยัดสารเคมีที่ใช้ในวัฏภาคเคลื่อนที่ จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับใช้วิเคราะห์ปริมาณออกซีเรสเวราทรอลในตัวอย่างแก่นเมหาค และเป็นประโยชน์ในการศึกษาวิจัยในอนาคตเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ผสมแก่นเมหาค พัฒนาสายพันธุ์เมหาค และการกำหนดระยะเวลาเก็บเกี่ยวที่เหมาะสมรวมทั้งในการกำหนดปริมาณขั้นต่ำของออกซีเรสเวราทรอลในมอโนกราฟวัตถุดิบแก่นเมหาคใน THP

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่สนับสนุนงบประมาณในการวิจัยนี้ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการวิจัยเพื่อแยกสารสำคัญจากสมุนไพรทุกท่าน ที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Boonyaprapat N, Chokchaicharoenporn O. Mahad. Medicinal Plants indigenous to Thailand. Bangkok: Prachachon; 1999. p. 724-25. (in Thai)
2. Likhitwitayawuid K. Oxyresveratrol: sources, productions, biological activities, pharmacokinetics, and delivery systems. Molecules. 2021;26(14): 4212.

3. Borah HJ, Singhal R, Hazarika S. *Artocarpus lakoocha* Roxb.: an untapped bioresource of resveratrol from north east India, its extractive separation and antioxidant activity. Industrial Crops and Products. 2017;95:75-82.
4. Hu X, Liang Y, Zhao B, Wang Y. Oxyresveratrol protects human lens epithelial cells against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and apoptosis by activation of Akt/HO-1 pathway. J Pharmacol Sci. 2019;139(3): 166-73.
5. Singhatong S. Antioxidant and toxicity activities of *Artocarpus lakoocha* Roxb. heartwood extract. J Med Plant Res. 2010;4(10):947-53.
6. Phoolcharoen W, Sooampon S, Sritularak B, Likhitvitayawuid K, Kuvatanasuchati J, Pavasant P. Anti-periodontal bacterial activity of oxyresveratrol. Thai J Pharm Sci. 2012;36:92-4.
7. Teanpaisan R, Senapong S, Puripattanavong J. *In vitro* antimicrobial and antibiofilm activity of *Artocarpus Lakoocha* (Moraceae) extract against some oral pathogens. Trop J Pharm Res. 2014;13(7):1149-55.
8. Senapong S, Puripattanavong J, Teanpaisan R. Anticandidal and antibiofilm activity of *Artocarpus lakoocha* extract. Songklanakarin J Sci Technol. 2014;36(4):451-7.
9. Wongon M, Limpeanchob N. Inhibitory effect of *Artocarpus lakoocha* Roxb. and oxyresveratrol on α -glucosidase and sugar digestion in Caco-2 cells. Heliyon. 2020;6(3):e03458.
10. Chuanasa T, Phromjai J, Lipipun V, Likhitwitayawuid K, Suzuki M, Pramyothin P, et al. Anti-herpes simplex virus (HSV-1) activity of oxyresveratrol derived from Thai medicinal plant: mechanism of action and therapeutic efficacy on cutaneous HSV-1 infection in mice. Antiviral Res. 2008;80(1):62-70.
11. Sasivimolphan P, Lipipun V, Likhitwitayawuid K, Takemoto M, Pramyothin P, Hattori M, Shiraki K. Inhibitory activity of oxyresveratrol on wild-type and drug-resistant varicella-zoster virus replication in vitro. Antiviral Res. 2009;84(1):95-7.
12. Lipipun V, Sasivimolphan P, Yoshida Y, Daikoku T, Sritularak B, Ritthidej G, Likhitwitayawuid K, Pramyothin P, Hattori M, Shiraki K. Topical cream-based oxyresveratrol in the treatment of cutaneous HSV-1 infection in mice. Antiviral Res. 2011;91(2):154-60.
13. Sasivimolphan P, Lipipun V, Ritthidej G, Chitphet K, Yoshida Y, Daikoku T, Sritularak B, Likhitwitayawuid

- K, Pramyothin P, Hattori M, Shiraki K. Microemulsion-based oxyresveratrol for topical treatment of herpes simplex virus (HSV) infection: physicochemical properties and efficacy in cutaneous HSV-1 infection in mice. *AAPS PharmSciTech*. 2012;13(4):1266-75.
14. Sritularak B, De-eknamkul W, Likhitwitayawuid K. Tyrosinase inhibitors from *Artocarpus lakoocha*. *Thai J Pharm Sci*. 1998;22(4):149-55.
15. Likhitwitayawuid K, Sornsute A, Sritularak B, Ploypradith P. Chemical transformations of oxyresveratrol (trans-2,4,3',5'-tetrahydroxystilbene) into a potent tyrosinase inhibitor and a strong cytotoxic agent. *Bioorg Med Chem Lett*. 2006;16(21):5650-3.
16. Sornsute A. Isolation and structure modification of oxyresveratrol from *Artocarpus lakoocha* for tyrosinase inhibitory activity [Thesis]. Bangkok: Chulalongkorn University; 2006.
17. Ashraf MI, Shahzad M, Shabbir A. Oxyresveratrol ameliorates allergic airway inflammation via attenuation of IL-4, IL-5, and IL-13 expression levels. *Cytokine*. 2015;76(2):375-81.
18. Aziz RS, Siddiqua A, Shahzad M, Shabbir A, Naseem N. Oxyresveratrol ameliorates ethanol-induced gastric ulcer via downregulation of IL-6, TNF- α , NF- κ B, and COX-2 levels, and upregulation of TFF-2 levels. *Biomed Pharmacother*. 2019;110:554-60.
19. Sunilkumar D, Drishya G, Chandrasekharan A, Shaji S. K, Bose C, Jossart J, Perry JP, Mishra N, Kumar GB, Nair BG. Oxyresveratrol drives caspase-independent apoptosis-like cell death in MDA-MB-231 breast cancer cells through the induction of ROS. *Biochem Pharmacol*. 2020;173:113724.
20. Povichit N, Phrutivorapongkul A, Suttajit M, Leelapornpisid P. Antiglycation and antioxidant activities of oxyresveratrol extracted from the heartwood of *Artocarpus lakoocha* Roxb. *Maejo Int J Sci Technol*. 2010;4:454-61.
21. Preyavichyapugdee M, Sangfuang M, Preyavichyapugdee N, Pootaeng-on Y, Sophon P. The *in vitro* effect of a crude extract from *Artocarpus lakoocha* Roxb. on *Paramphistomum cervi*. *Silpakorn U Science &Tech J*. 2017;11(1):36-46.
22. Prugsakij W. In vitro evaluation of anti-aging activity of *Artocarpus lakoocha* heartwood extract [Thesis]. Bangkok: Chulalongkorn University; 2006.
23. Palanuvej C, Issaravanich S, Tunsaringkarn T, Rungsiyothin A, Vipunngun N, Ruangrunsi N, Likhitwitayawuid K. Pharmacognostic Study of *Artocarpus lakoocha* heartwood. *J Health Res*. 2018;21(4):257-62.
24. Maneechai S, Likhitwitayawuid K, Sritularak B, Palanuvej C, Ruangrunsi N, Sirisa-Ard P. Quantitative analysis of oxyresveratrol content in *Artocarpus lakoocha* and 'Puag-Haad'. *Med Princ Pract*. 2009;18(3):223-7.
25. Rojsanga P, Sithisarn P. Validated TLC-densitometric method for determination of oxyresveratrol contents in ma-haad (*Artocarpus lakoocha*) heartwood extracts. *Mahidol Univ J Pharm Sci*. 2016;43(2):91-6.
26. Pattamadilok D, Sakpetch A, Thongsrirak P, Ontong S. Chemical quality of *Artocarpus lakoocha* heartwood. *J Thai Trad Alt Med*. 2558;13(2):115-22.
27. Radapong S, Sarker SD, Ritchie KJ. Oxyresveratrol possesses DNA damaging activity. *Molecules*. 2020;25(11):2577.
28. Duangdee N, Chamboonchu N, Kongkiatpaiboon S, Prateeptongkum S. Quantitative ^1H NMR spectroscopy for the determination of oxyresveratrol in *Artocarpus lakoocha* heartwood. *Phytochem Anal*. 2019;30(6):617-22.
29. Department of Medical Science. Practical guidelines for testing the accuracy of chemical analysis methods in the single laboratory setting. Nonthaburi: Department of Medical Science; 2006.
30. ICH Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. 2005.