

การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องวิธีวิเคราะห์สาร Andrographolide จากฟ้าทะลายโจรด้วย UPLC

เมทินี หลิมศิริวงศ์*, อมร สหเมธาพัฒน์, ปิติกาญจน์ กาญจนพฤกษ์

สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ จังหวัดนนทบุรี 11000

*ผู้รับผิดชอบบทความ: maytinee.l@dmsc.mail.go.th

บทคัดย่อ

วิธีวิเคราะห์สาร andrographolide ที่พัฒนาขึ้นโดยใช้เครื่อง Ultra Performance Liquid Chromatography ใช้ detector ชนิด diode array ร่วมกับ mass spectrometer ใช้คอลัมน์ ACQUITY® UPLC BEH C18 ขนาด 2.1 x 100 มิลลิเมตร บรรจุนุภาคนาขนาด 1.7 ไมโครเมตร สารละลายตัวพาในระบบ gradient เป็น 0.050% formic acid ในน้ำ และ 0.025% formic acid ใน acetonitrile อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาทีและตรวจวัดด้วยยูวีความยาวคลื่น 223 นาโนเมตร วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟีตามข้อกำหนดของตำราของสหรัฐอเมริกาฉบับที่ 39 (USP39) มีความเฉพาะเจาะจงของวิธี โดยสามารถแยกสาร andrographolide ออกจากสารกลุ่ม diterpene lactones อื่นๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีความแม่นยำและความเที่ยง ความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ รวมทั้งความคงทนต่อสภาวะที่มีการเปลี่ยนแปลงตามหลักเกณฑ์การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ของ USP และ ICH guidelines วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจเอกลักษณ์และควบคุมคุณภาพสาร andrographolide ในวัตถุดิบฟ้าทะลายโจรได้

คำสำคัญ: andrographolide, ฟ้าทะลายโจร, UPLC

Development and Validation of UPLC Method for Analysis of Andrographolide from *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees

Maytinee Limsiriwong*, Amorn Sahamethapat, Pitikan Kanjanapruk

Bureau of Drug and Narcotic, Department of Medical Sciences, Tiwanon road, Nonthaburi 11000, Thailand

*Corresponding author: maytinee.l@dmcs.mail.go.th

Abstract

The Ultra Performance Liquid Chromatography method was developed and validated using a diode array detector and a mass spectrometer to determine the content of the andrographolide. The chromatographic conditions were: ACQUITY® UPLC BEH C18, 1.7 μ column, size 2.1 $\times$ 100 mm, mixture of 0.050% formic acid in water and 0.025% formic acid in acetonitrile as the mobile phase of the gradient system, flow rate 0.5 ml/min and UV detector 223 nm. The chromatogram showed suitability of chromatographic system, which conformed to the United States Pharmacopoeia 39th revision (USP39) requirements. The selectivity and specificity of the method were assessed by the separation of andrographolide from the other diterpene lactones. The developed method showed good accuracy, precision, linearity and range including robustness, according to the USP and ICH guidelines. The validated method could be used as the reference method for the assay of the andrographolide substance in andrographolide bulk material and powdered andrographis.

Key words: andrographolide, *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees, UPLC

บทนำ

ฟ้าทะลายโจร *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees เป็นหนึ่งในสมุนไพรที่ได้รับการส่งเสริมให้ใช้เป็นยาพัฒนาจากสมุนไพรซึ่งบรรจุอยู่ในบัญชียาหลักแห่งชาติ^[1] มีฤทธิ์ลดไข้ แก้ท้องเสีย ลดอาการคออักเสบ^[2] ปัจจุบันมีการใช้ยานี้อย่างแพร่หลายทั้งขายตามร้านขายยาและการจ่ายยาในโรงพยาบาล จึงทำให้บริษัทผู้ผลิตยาสมุนไพร โรงพยาบาลและกลุ่มเกษตรกรผลิตภัณฑ์ท้องถิ่นมีการนำฟ้าทะลายโจรมาผลิตยาเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามวัตถุดิบจากธรรมชาติจะมีปริมาณสารสำคัญแตกต่างกันไปตามอายุพืช ฤดูที่เก็บเกี่ยว การตากแห้ง^[3] ดังนั้นการควบคุมปริมาณสารสำคัญของวัตถุดิบที่มาจาก

แหล่งต่าง ๆ จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งเพื่อให้มั่นใจในคุณภาพของวัตถุดิบที่จะนำไปผลิตเป็นยาต่อไป

การควบคุมคุณภาพวัตถุดิบฟ้าทะลายโจรตามตำรายาของสหรัฐอเมริกาฉบับที่ 39 (USP39)^[4] มีการวิเคราะห์หาปริมาณของสารกลุ่ม diterpene lactones ในวัตถุดิบจากใบและต้น (andrographis) ผงละเอียดของใบและต้น (powdered andrographis) และผงสารสกัดฟ้าทะลายโจร (powdered andrographis extract) โดยวิเคราะห์ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ซึ่งกำหนดให้ใช้สารละลายตัวพา คือ acetonitrile และ phosphate buffer โดยอัตราส่วนจะปรับเปลี่ยนเป็นไปตามเวลาที่กำหนด (gradient system) และ

ใช้คอลัมน์ชนิด L1 หรือ C18 ใช้สารมาตรฐาน andrographolide ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่ม diterpene lactones ในรูปของผลรวมของปริมาณสาร andrographolide, neoandrographolide, 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide และ andrograpanin ซึ่งได้จากการคำนวณเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน andrographolide วิธีมาตรฐานตาม USP39 นี้ใช้เวลาในการวิเคราะห์ต่อการฉีดหนึ่งครั้งนานถึงประมาณ 45 นาที นอกจากนี้ยังไม่สามารถตรวจเอกลักษณ์สารที่ชะออกมาอย่างต่อเนื่องโดยใช้ mass spectrometer ได้ รวมถึงวิธีที่กำหนดใน USP ระบุให้ใช้สารละลายตัวพาที่ไม่เหมาะสมกับการใช้ร่วมกับ mass spectrometer เนื่องจากเกลือ phosphate สามารถตกตะกอนในเครื่องได้

วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นเป็นการวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) ใช้ detector ชนิด diode array ร่วมกับ mass spectrometer โดย UPLC เป็นเทคนิคในการแยกสารซึ่งมีหลักการเช่นเดียวกับ HPLC แต่มีประสิทธิภาพในการแยกที่ดีกว่า โดยใช้คอลัมน์ที่มีขนาดเล็กและบรรจุอนุภาคนาโนขนาดเล็กและใช้อัตราการไหลของสารละลายตัวพาต่ำ ๆ ซึ่งคอลัมน์และตัวเครื่องสามารถทนต่อความดันได้ถึงระดับ 15,000 psi นอกจากนี้สารตัวอย่างที่ฉีดแต่ละครั้งใช้ในปริมาณน้อยและตรวจวัดด้วย detector ที่มีความไวสูง ซึ่งให้ผลการวิเคราะห์ที่ได้มีความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยง (precision) สูง มี retention time สั้นแต่สามารถแยกพีคออกจากกันได้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ^[5] การใช้ detector ชนิด diode array ร่วมกับ mass spectrometer สามารถตรวจเอกลักษณ์สารสมุนไพรซึ่งมีส่วนประกอบเป็นสารหลายชนิด เป็นการยืนยันชนิดและความบริสุทธิ์ของสารที่แยกออกมาแต่ละ

พีค จึงได้มีการพัฒนาปรับเปลี่ยนชนิดของสารละลายตัวพาให้เป็นสารละลายที่เหมาะสมสามารถใช้ได้กับเครื่อง mass spectrometer ด้วย

ระเบียบวิธีศึกษา

วัสดุ

1. สารมาตรฐาน

- andrographolide, USP, ประเทศสหรัฐอเมริกา lot F0I344 ความบริสุทธิ์ร้อยละ 99.5 เมื่อคำนวณสภาพปกติ (as is basis)

- powdered andrographis extract, USP, ประเทศสหรัฐอเมริกา lot F0I342 ซึ่งประกอบด้วย total diterpene lactones ร้อยละ 41 เมื่อคำนวณสภาพปกติ

2. ตัวอย่าง

สารมาตรฐาน andrographolide lot no. RSC6001213 ความบริสุทธิ์ร้อยละ 98.2 เมื่อคำนวณสภาพปกติ ผลิตโดยศูนย์สารมาตรฐานยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

3. เครื่องมือและอุปกรณ์

Ultra Performance Liquid Chromatograph (UPLC) (Waters®, USA) ประกอบด้วย binary solvent manager, sample manager, diode array detector, mass spectrometer: ACQUITY® ODa detector และโปรแกรมประมวลผล Empower® 3

Ultra Performance Liquid Chromatograph, H-Class (UPLC H-Class) (Waters®, USA) ประกอบด้วย quaternary solvent manager, sample manager, UV detector และโปรแกรมประมวลผล Empower® 3

คอลัมน์ ACQUITY® UPLC BEH C18

ขนาด 2.1×100 มิลลิเมตร บรรจุน้ำหนักขนาด 1.7 ไมโครเมตร (Waters®, USA) lot No. 0216330731 และ 0128153184

4. สารเคมี

acetonitrile (HPLC grade), methyl alcohol (HPLC grade), ethyl alcohol (AR grade), formic acid (AR grade), chloroform (AR grade), hydrochloric acid 37% (AR grade), sodium hydroxide (AR grade), hydrogen peroxide 35% (AR grade), purified water (type I กรองด้วย Milli Q-Waters®, Milford, MA, USA)

วิธีการศึกษา

1. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ (method development)

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อตรวจเอกลักษณ์และหาปริมาณของสาร andrographolide โดยใช้เครื่อง UPLC โดยทำการปรับเปลี่ยนชนิดของสารละลายตัวพาให้เหมาะสมกับคุณสมบัติของสาร andrographolide และสามารถใช้ร่วมกับ mass spectrometer นอกจากนี้อัตราส่วนของสารละลายตัวพาและชนิดของสารที่บรรจุ ขนาดและความยาวของคอลัมน์ต้องมีความเหมาะสมที่จะแยกสาร andrographolide ที่ต้องการวิเคราะห์ออกจากสารกลุ่ม diterpene lactones อื่นๆ ได้ตามข้อกำหนดมาตรฐานที่ระบุในตำรายา USP39 โดยใช้เวลาอย่างรวดเร็วในการฉีดแต่ละครั้ง พร้อมกับสามารถยืนยันชนิดและความบริสุทธิ์ของ andrographolide และ diterpene lactones แต่ละพีคด้วย detector ชนิด diode array ร่วมกับ mass spectrometer

2. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation)

เมื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ตามข้อ 1 จนได้สภาวะของเครื่องและระบบโครมาโทกราฟีที่เหมาะสมแล้ว ทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ตามหลักเกณฑ์ตำรายา USP^[4] และ ICH guidelines^[6] โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

2.1 การเตรียมสารละลาย

- สารละลายตัวพาของระบบโครมาโทกราฟี ประกอบด้วย 0.025% formic acid ใน acetonitrile และ 0.050% formic acid ในน้ำ

- ตัวทำละลายเริ่มต้น (initial solution) สำหรับละลายผงยา ได้แก่ methanol : acetonitrile อัตราส่วน 50:50

- ตัวทำละลายเจือจาง (diluted solution) สำหรับเจือจางสารละลายในการละลายผงยาขึ้นไป ได้แก่ 0.050% formic acid ในน้ำ

1) การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

- เตรียมสารละลายมาตรฐานเริ่มต้น (standard stock solution) โดยเตรียมสาร andrographolide ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในตัวทำละลายเริ่มต้น

- สารละลายมาตรฐานตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ

(1) เตรียมสารละลายมาตรฐาน andrographolide ความเข้มข้น 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากสารละลายมาตรฐานเริ่มต้นโดยการเจือจางด้วยตัวทำละลายเจือจาง

(2) เตรียมสารละลายมาตรฐาน powdered andrographis extract ความเข้มข้น 0.60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในตัวทำละลายเริ่มต้นอุ่นบน water bath หรือ sonicate เป็นเวลา 15-20 นาที

2) การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

เตรียมสารละลายตัวอย่าง andrographolide ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในตัวทำละลายเริ่มต้ก่อนแล้วเจือจางด้วยตัวทำละลายเจือจาง ให้ได้สารละลายตัวอย่าง andrographolide ความเข้มข้น 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2 วิธีการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

1) ความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟี

(chromatographic system suitability)

ฉีดสารละลายมาตรฐาน andrographolide และสารละลายมาตรฐาน powdered andrographis extract สำหรับตรวจสอบความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟี ตรวจสอบพารามิเตอร์ต่าง ๆ เช่น %RSD, retention time (RT), theoretical plate, tailing factor และ resolution ซึ่งคำนวณตามวิธีของ USP ฉีดซ้ำ 6 ครั้ง เพื่อแสดงความเหมาะสมของระบบที่ใช้รวมทั้งตรวจเอกลักษณ์ของสารแต่ละชนิดจากการดู RT, UV spectrum และ mass spectrum ของสารแต่ละพีค

2) ความจำเพาะเจาะจงของวิธี (selectivity

/ specificity)

นำสารละลายตัวอย่าง andrographolide ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มา 5 มิลลิลิตร ทำให้สลายตัวด้วยสภาวะต่าง ๆ แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตรด้วยตัวทำละลายเจือจาง นำมาฉีดซ้ำ 2 ครั้ง ตรวจสอบการสลายตัวที่เกิดขึ้น ค่า RT และ resolution ของสารสลายตัวที่เกิดขึ้นจะต้องแยกจาก andrographolide อย่างชัดเจนโดยกำหนดสภาวะต่าง ๆ ที่ทำให้สลายตัว (stress conditions) ตามหลักการของ ICH guideline^[6] ได้แก่

(1) เติม 1.0 N hydrochloric acid จำนวน 0.25 มิลลิลิตร ตั้งไว้ 20 ชั่วโมง

(2) เติม 0.1 N sodium hydroxide จำนวน 0.10 มิลลิลิตร ตั้งไว้ 10 นาที

(3) เติม hydrogen peroxide 35% จำนวน 0.50 มิลลิลิตร ตั้งไว้ 20 นาที

(4) ตั้งไว้ให้ถูกแสงแดด 3, 6 ชั่วโมง (ช่วงเวลา 10.00-16.00 น.)

(5) วางบน water bath ที่ 90 °C นาน 1, 2, 3 ชั่วโมง

3) ความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์

(linearity and range)

เตรียมสารละลายมาตรฐาน andrographolide ความเข้มข้น 75, 100, 125, 150 และ 175 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ฉีดสารละลายแต่ละระดับความเข้มข้นซ้ำ 6 ครั้ง นำค่าเฉลี่ยของแต่ละระดับมาสร้างกราฟมาตรฐานหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสาร andrographolide กับพื้นที่ใต้พีคของสาร andrographolide คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (correlation coefficient) ค่าความลาดเอียงของกราฟ (slope) และจุดที่เส้นกราฟตัดแกน Y (intercept) ทดสอบสร้างเส้นกราฟมาตรฐานซ้ำ 3 วัน เพื่อศึกษาความเป็นเส้นตรงของระบบโครมาโทกราฟี (linearity of system)

4) ความแม่นยำ (accuracy)

ฉีดสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง andrographolide ความเข้มข้น 75, 100, 125, 150 และ 175 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ละระดับความเข้มข้น ฉีดซ้ำ 3 ครั้ง ทำการทดสอบซ้ำ 3 วัน คำนวณปริมาณสาร andrographolide ที่ตรวจพบในแต่ละระดับจากเส้นกราฟมาตรฐานในวันเดียวกัน คำนวณร้อยละของการคืนกลับ (%recovery) ในทุกระดับความเข้มข้น ควรอยู่ในช่วงร้อยละ 97-103^[7] และค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพันธ์

(%relative standard deviation, RSD) ไม่เกิน 2.0

5) ความเที่ยง (precision)

5.1) ความทวนซ้ำได้ (repeatability)

(1) ความเที่ยงของระบบ (system precision) นี้นิยามโดยมาตรฐาน andrographolide ความเข้มข้น 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 3 ตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างฉีดซ้ำ 6 ครั้ง คำนวณ %RSD ของพื้นที่ใต้พีคของสาร andrographolide โดย %RSD ไม่ควรเกินร้อยละ 2.0

(2) ความเที่ยงของวิธี (method precision) คำนวณ %RSD ของร้อยละของการคืนกลับของสารละลายตัวอย่างทั้ง 5 ระดับความเข้มข้นของการทดสอบความแม่นยำในข้อ 4 โดย %RSD ไม่ควรเกินร้อยละ 2.0

5.2) Intermediate precision

นิยามโดยตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของ andrographolide ความเข้มข้น 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดสอบ 2 วัน ๆ ละ 10 ตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างฉีดซ้ำ 3 ครั้ง โดยใช้นักวิเคราะห์ 2 คน และเครื่องมือ 2 เครื่อง คำนวณร้อยละของสาร andrographolide, %RSD ของแต่ละวันและร้อยละของความแตกต่างสัมพัทธ์ (%relative percent difference, RPD) ระหว่างวัน

6) ความคงสภาพของสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง

นิยามโดยมาตรฐาน andrographolide ความเข้มข้น 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรทุก ๆ 1 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ติดต่อกันคำนวณปริมาณของสาร andrographolide เปรียบเทียบกับปริมาณที่ 0 ชั่วโมง โดยให้ปริมาณที่ 0 ชั่วโมงเป็น 100% ปริมาณที่พบในเวลาต่าง ๆ ไม่ควรน้อยกว่า 98% เพื่อดูความคงสภาพ

ของสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง ในระหว่างทำการทดสอบ

7) ความคงทน (robustness)

7.1) ผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงสภาวะของระบบ UPLC

ทดสอบโดยการฉีดสารละลายมาตรฐาน powdered andrographis extract เพื่อตรวจสอบความเหมาะสมของระบบในขณะที่ทำการเปลี่ยนแปลงสภาวะต่าง ๆ ของเครื่อง UPLC ดังนี้

(1) การใช้คอลัมน์ ACQUITY® UPLC BEH C18 ขนาด 2.1 x 100 มิลลิเมตร บรรจุอนุภาคขนาด 1.7 ไมโครเมตร จำนวน 2 รุ่นผลิตได้แก่ lot No. 0216330731 และ lot No. 0128153184

(2) อัตราการไหลของสารละลายตัวพา 0.45, 0.50 และ 0.55 มิลลิลิตรต่อนาที

(3) อุณหภูมิของคอลัมน์ทดสอบโดยใช้อุณหภูมิ 38°C, 40°C และ 42°C

(4) ปริมาตรของสารละลายที่ฉีด ใช้ 1.5, 2.0 และ 2.5 ไมโครลิตร

(5) ความเข้มข้นของ formic acid ในสารละลายตัวพาเปลี่ยนอัตราส่วนดังนี้

%formic acid ใน acetonitrile: %formic acid ในน้ำ เท่ากับ 0.020:0.045, 0.025:0.050 และ 0.030:0.055 โดยแต่ละสภาวะฉีดซ้ำ 3 ครั้ง ดูค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ในการตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ ได้แก่ retention time, tailing factor, theoretical plates และ resolution

7.2) ความคงสภาพของคอลัมน์

ในระหว่างการศึกษาทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ให้ตรวจสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์ โดยทำการบันทึกค่าการเปลี่ยนแปลง theoretical plates ในวันเริ่มต้นและในระหว่าง

การทดสอบจนจบการทดลอง นับจำนวนครั้งที่ฉีดสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างในการทดสอบ

8) ขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection) และขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณ (limit of quantitation)

ค่า limit of detection (LOD) และ limit of quantitation (LOQ) ได้จากการทดสอบหาความเข้มข้นของสารละลายของ andrographolide ที่ฉีดแล้วให้ค่า signal-to-noise เท่ากับ 3 และ 10 ตามลำดับ

9) ทดสอบวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนากับตัวอย่างผลิตภัณฑ์

นำวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมาทดสอบกับตัวอย่างผลิตภัณฑ์สมุนไพรฟ้าทะลายโจรแคปซูล 12 ตัวอย่าง ว่าสามารถแยกพีคของตัวยาสำคัญและสารกลุ่ม diterpene lactones อื่น ๆ ได้ตามข้อกำหนดในหัวข้อ system suitability ตามมาตรฐานตำรายา USP39

ผลการศึกษา

1. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ (method development)

1.1 ทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง UPLC ในการหาปริมาณและตรวจเอกลักษณ์ของสาร andrographolide โดยการปรับเปลี่ยนชนิดและอัตราส่วนของสารละลายตัวพาและทดลองเปลี่ยนคอลัมน์ให้เหมาะสมกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ พบว่าการใช้สารละลายตัวพาที่มีอัตราส่วนของ 0.025% formic acid ใน acetonitrile ต่อ 0.050% formic acid ในน้ำ (gradient) เท่ากับ 90:10 โดยปรับถึง 20:80 ในเวลา 10 นาที และเลือกใช้คอลัมน์ ACQUITY® UPLC BEH C18 สามารถแยกพีคของสาร

andrographolide และสารกลุ่ม diterpene lactones ซึ่งได้แก่ สาร neoandrographolide, สาร 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide และ สาร andrograpanin ได้อย่างชัดเจนตามข้อกำหนด

1.2 วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถตรวจเอกลักษณ์ของสาร andrographolide และสารกลุ่ม diterpene lactones ทั้ง 3 ชนิด โดยประมวลจากผลของ retention time (RT), ความยาวคลื่นที่ดูดกลืนแสง UV สูงสุด (λ_{max}) และ mass spectrum LC-MS(ESI)(+) จากการทดสอบโดยใช้สารมาตรฐาน powdered andrographis extract USP ได้ผลดังนี้ andrographolide (RT 3.2 นาที, λ_{max} 227.3 นาโนเมตร, $[M+H-2H_2O]^+$ m/z 315.1) neoandrographolide (RT 4.2 นาที, λ_{max} 200.2 นาโนเมตร, $[M+H-Glc]^+$ m/z 319.2), 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide (RT 4.6 นาที, λ_{max} 251.0 นาโนเมตร, $[M+H-H_2O]^+$ m/z 315.1), และ andrograpanin (RT 5.6 นาที, λ_{max} 200.2 นาโนเมตร, $[M+H]^+$ m/z 319.2)

สรุปรายละเอียดของวิธีวิเคราะห์โดย UPLC ที่พัฒนาขึ้นตามตารางที่ 1 เปรียบเทียบกับวิธี HPLC ตาม USP39 และจากภาพที่ 1 โครมาโทแกรมแสดงการแยกสารทั้ง 4 ชนิดที่ RT ต่าง ๆ พร้อม UV spectrum และ mass spectrum ของสารแต่ละตัว ตามลำดับ

2. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation)

ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นเพื่อหาปริมาณของสาร andrographolide มีรายละเอียดดังนี้

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์สาร andrographolide โดยวิธี HPLC ตาม USP39 และวิธี UPLC ที่พัฒนาขึ้น

Condition	HPLC (USP39)			UPLC (developed method)		
Column	XBridge C18 4.6 x 100 mm, 3.5 μ m			ACQUITY UPLC BEH C18 2.1 x 100 mm, 1.7 μ m		
Mobile phase	Phosphate buffer : ACN (gradient)			0.050% formic acid ในน้ำ (A) : 0.025% formic acid ใน ACN (B) (gradient)		
	Time (min)	A (%)	B (%)	Time (min)	A (%)	B (%)
	0	95	5	0.00	90	10
	18	55	45	4.50	55	45
	25	20	80	6.25	20	80
	28	20	80	7.00	20	80
	35	55	45	8.00	90	10
	40	95	5	10.00	90	10
	45	95	5			
Flow rate	1.5 ml/min			0.5 ml/min		
Pressure	1800 psi			8400 psi		
Column temperature	Room Temperature			40 °C		
Detection	UV 223 nm			UV 223 nm		
Injection volume	20 μ l			2 μ l		
Retention time						
– Andrographolide	10.5 min			3.2 min		
– Neoandrographolide	11.7 min			4.2 min		
– 14-deoxy-11,12 didehydroandrographolide	13.9 min			4.6 min		
– Andrograpanin	15.1 min			5.6 min		
Run time	45 min			10 min		

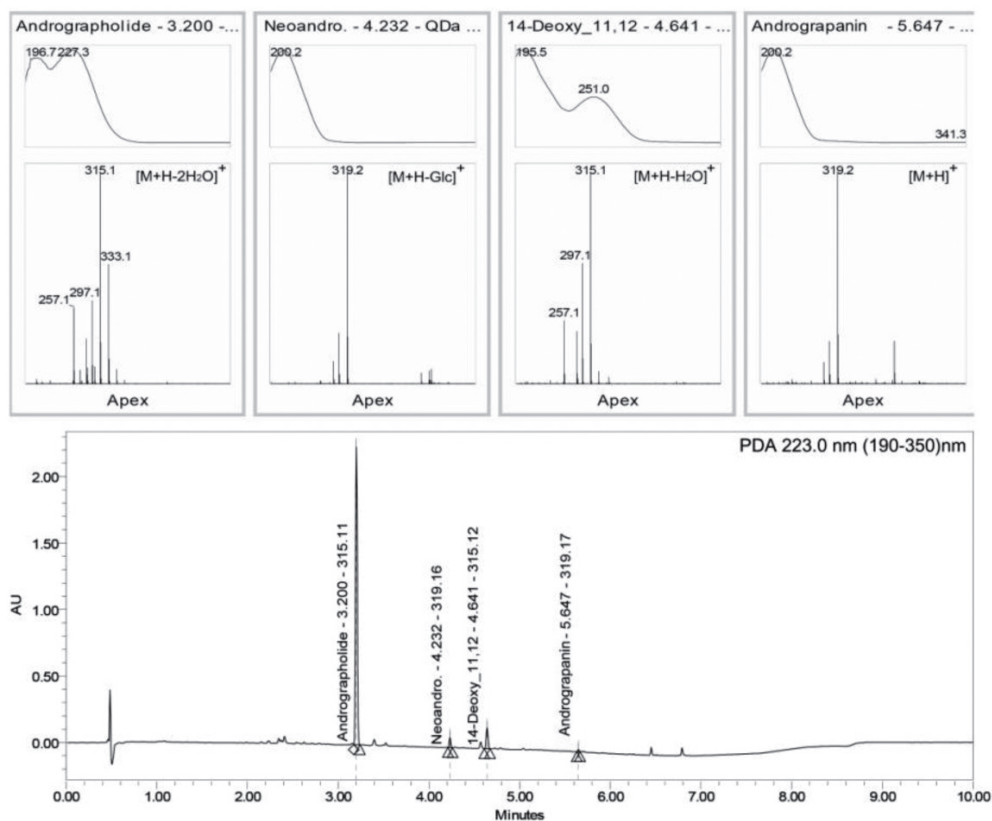
2.1 การทดสอบความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟ (chromatographic system suitability):

ฉีดสารละลายมาตรฐาน 2 ชนิดที่เตรียมเพื่อใช้ทดสอบความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟ พบว่าสารละลายมาตรฐาน andrographolide ให้ผลการทดสอบอยู่ในช่วงตามข้อกำหนดตามมาตรฐานของ USP ดังแสดงในตารางที่ 2 สำหรับสารละลาย

มาตรฐาน powdered andrographis extract แสดงพีคของสารทั้ง 4 ชนิดสอดคล้องกับโครมาโทแกรมมาตรฐานของ USP ดังแสดงในภาพที่ 2

2.2 ความจำเพาะเจาะจงของวิธี (selectivity/specificity):

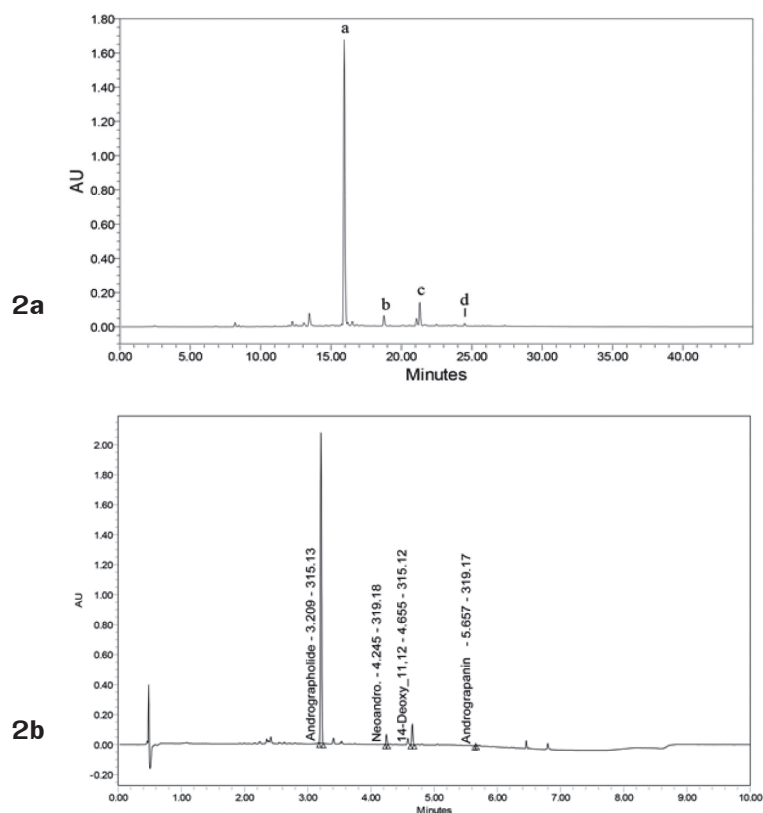
จากการนำสารละลายตัวอย่าง andrographolide มาทดสอบในสภาวะต่าง ๆ (stress conditions) พบว่าสารที่เกิดขึ้นจากการสลายตัวใน



ภาพที่ 1 โครมาโทแกรมแสดง retention time, UV spectrum และ mass spectrum ของสาร andrographolide, neo-andrographolide, 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide และ andrograpanin เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี UPLC ที่พัฒนาขึ้น

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟี

Suitability requirements (ข้อกำหนดตาม USP 39)		andro grapholide	neoandro grapholide	14-deoxy-11,12- didehydro andrographolide	andro grapanin
Standard andrographolide solution	Tailing factor (NMT 1.5)	1.07	-	-	-
	Theoretical plate (NLT 5,000)	165,826	-	-	-
	%RSD (NMT 2.0)	0.41	-	-	-
Standard andrographis extract solution	Chromatogram is similar to reference chromatogram provided in Certificate of analysis	Concordance with the reference chromatogram (Figure 2)			
	Resolution (NLT 5.0)	-	12.5	-	-



ภาพที่ 2 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน USP powdered andrographis extract

2a: โครมาโทแกรมมาตรฐานจาก USP เมื่อวิเคราะห์สารมาตรฐาน USP powdered andrographis extract lot FOI342 ด้วยวิธี HPLC ตามตำรายา USP 39

a : andrographolide c : 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide

b : neoandrographolide d : andrograpanin

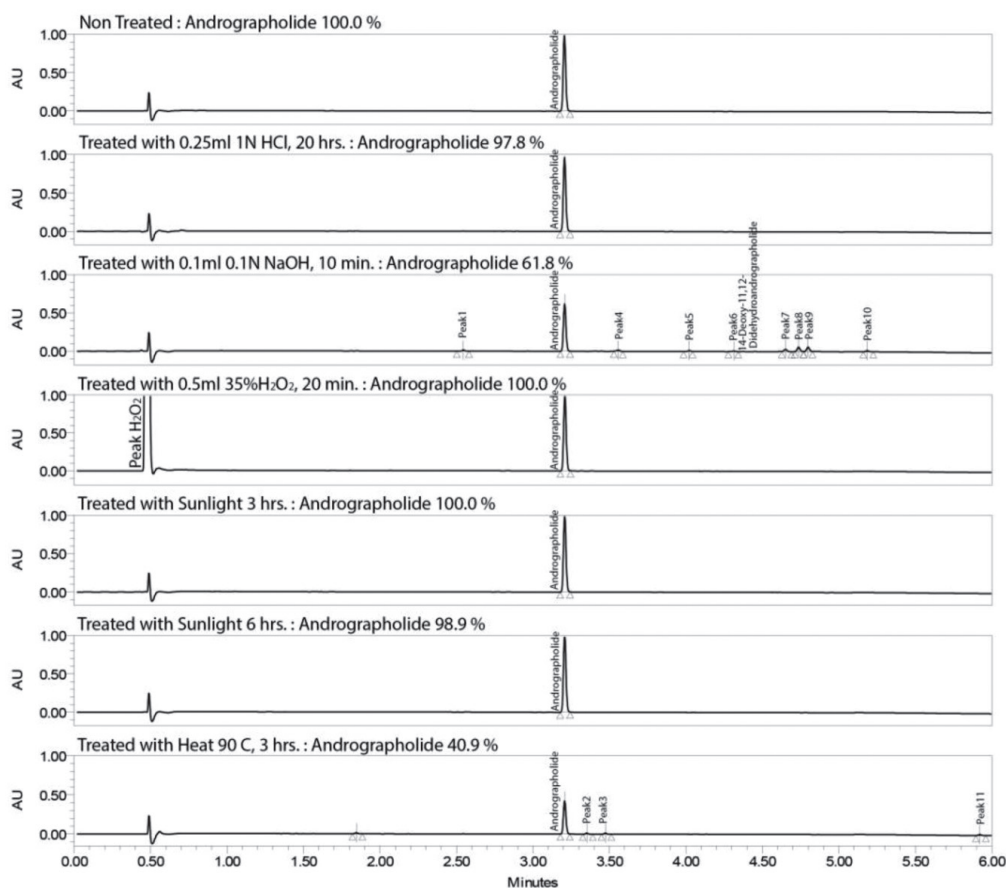
2b: โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน USP powdered andrographis extract lot FOI342 เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี UPLC ที่พัฒนาขึ้น

สภาวะต่าง ๆ ไม่รบกวนพีคของ andrographolide (resolution > 2) และเมื่อดูค่า peak purity ของพีค andrographolide พบว่ามีค่า peak angle น้อยกว่า peak threshold ซึ่งหมายถึงไม่มีการปนเปื้อนของสารอื่น (co-elute) ในพีคนี้ แสดงว่าระบบมีความจำเพาะเจาะจงกับสาร andrographolide นอกจากนี้ยังพบว่าสาร andrographolide มีการสลายตัวประมาณ 40% เมื่อเติม 0.1 N sodium hydroxide เป็นเวลา 10 นาทีเป็น 14-Deoxy-11,12-didehy-

droandrographolide และสารอื่น ๆ และเมื่อถูกความร้อน 90°C เป็นเวลา 1, 2, 3 ชั่วโมง พบว่าสาร andrographolide เกิดการสลายตัวประมาณ 4, 4, 60% ตามลำดับ โดยโครมาโทแกรมการสลายตัวของสาร andrographolide ในสภาวะต่าง ๆ แสดงดังภาพที่ 3

2.3 ความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (linearity and range):

สารละลายมาตรฐาน andrographolide ความ



ภาพที่ 3 โครมาโทแกรมของสาร andrographolide และสารสลายตัวที่เกิดขึ้นในสภาวะต่าง ๆ

เข้มข้น 75, 100, 125, 150 และ 175 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร ฉีดซ้ำ 3 ครั้ง ทำซ้ำ 3 วัน พบว่าความสัมพันธ์ ระหว่างความเข้มข้น andrographolide และ peak area มีลักษณะเป็นเส้นตรงตลอดช่วงความเข้มข้นที่ ทดสอบ โดยมี correlation coefficient เท่ากับ 0.99982, 0.99985 และ 0.99946

2.4 ความแม่นยำ (accuracy):

สารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง andrographolide 5 ระดับความเข้มข้น 75, 100, 125, 150 และ 175 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ฉีดซ้ำ 3 ครั้ง ทำซ้ำ 3 วัน คำนวณปริมาณ andrographolide ใน

สารละลายตัวอย่างที่ตรวจพบจากเส้นกราฟมาตรฐาน ในวันเดียวกัน คำนวณร้อยละของการคืนกลับ (% recovery) อยู่ในช่วงร้อยละ 99.3-100.3

2.5 ความเที่ยง (precision):

1) repeatability

- **system precision** สารละลายมาตรฐาน andrographolide 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 3 ตัวอย่าง ฉีดซ้ำ 6 ครั้ง คำนวณ %RSD ได้ 0.03, 0.51 และ 0.11 โดยค่าที่ได้ไม่ควรเกินร้อยละ 2.0

- **method precision** คำนวณ %RSD จาก

ร้อยละของการคืนกลับของสารละลายทั้ง 5 ระดับ ความเข้มข้นของการทดสอบความแม่นยำ ได้เท่ากับ 1.15

2) intermediate precision:

สารละลายตัวอย่าง andrographolide 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดสอบ 2 วัน วันละ 10 ตัวอย่าง ฉีดซ้ำ 3 ครั้ง ใช้นักวิเคราะห์ 2 คน และ เครื่องมือ 2 เครื่อง คำนวณปริมาณ andrographolide พบว่า %RSD ของการทดสอบภายในวันเท่ากับ 0.28 และ 0.19 และ %RPD ของการทดสอบระหว่างวันเท่ากับ 1.18

2.6 ความคงสภาพของสารละลายมาตรฐาน และสารละลายตัวอย่าง:

ฉีดสารละลายมาตรฐานและตัวอย่าง an-

drographolide 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทุก ๆ 1 ชั่วโมงเป็นเวลา 24 ชั่วโมงติดต่อกัน เพื่อทดสอบความคงสภาพของยาในระหว่างทำการวิเคราะห์ พบว่าในระยะเวลา 24 ชั่วโมงปริมาณ andrographolide มีการเปลี่ยนแปลงสูงสุด 1.2% เมื่อเทียบกับปริมาณที่จุดเริ่มต้น ซึ่งไม่เกินข้อกำหนด 2.0% แสดงถึงความคงสภาพที่ดีในตัวทำละลายที่ใช้

2.7 ความคงทน (robustness)

1) ผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงสภาวะของระบบ UPLC

ประเมินผลโดยการเปรียบเทียบค่า retention time, theoretical plate, tailing factor และ resolution ของพีคสาร neoandrographolide และ

ตารางที่ 3 ผลของการเปลี่ยนแปลงสภาวะของเครื่อง UPLC

สภาวะของเครื่อง UPLC		Retention time andrographolide	Resolution neoandrographolide VS 14-deoxy-11,12- didehydroandrographolide	Theoretical plate andrographolide	Tailing factor andrographolide
%formic acid ใน น้ำ : ACN	0.050:0.025	3.206	12.2	162640	1.07
	0.450:0.020	3.192	12.0	161163	1.07
	0.550:0.030	3.190	11.9	160676	1.07
อัตราการไหลของ สารละลายตัวพา (ml/min)	0.50	3.206	12.2	162640	1.07
	0.45	3.350	12.4	163368	1.07
	0.55	3.086	11.8	157504	1.07
อุณหภูมิของ คอลัมน์ (° C)	40	3.206	12.2	162640	1.07
	38	3.224	12.3	160930	1.08
	42	3.189	11.8	162042	1.08
ปริมาตรของ สารละลายที่ฉีด (μl)	2.0	3.206	12.2	162640	1.07
	1.5	3.206	12.1	168088	1.08
	2.5	3.204	12.0	148621	1.06
คอลัมน์ lot. No.	0216330731	3.206	12.2	162640	1.07
	0128153184	3.212	11.3	139347	0.98

14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide (ตาม USP38 ควรมีค่าไม่ต่ำกว่า 5.0) ดังตารางที่ 3

2) ความคงสภาพของคอลัมน์

จากการตรวจสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์ ACQUITY® UPLC BEH C18 ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้โดยบันทึกค่า theoretical plate ของสาร andrographolide เมื่อเริ่มต้นใช้ประมาณ 160,000 หลังจากจบการทดสอบ พบว่าฉีดยาละลายต่าง ๆ ประมาณ 1,000 ครั้ง ค่า theoretical plates ลดลงเหลือประมาณ 92% แสดงถึงความคงทนของคอลัมน์

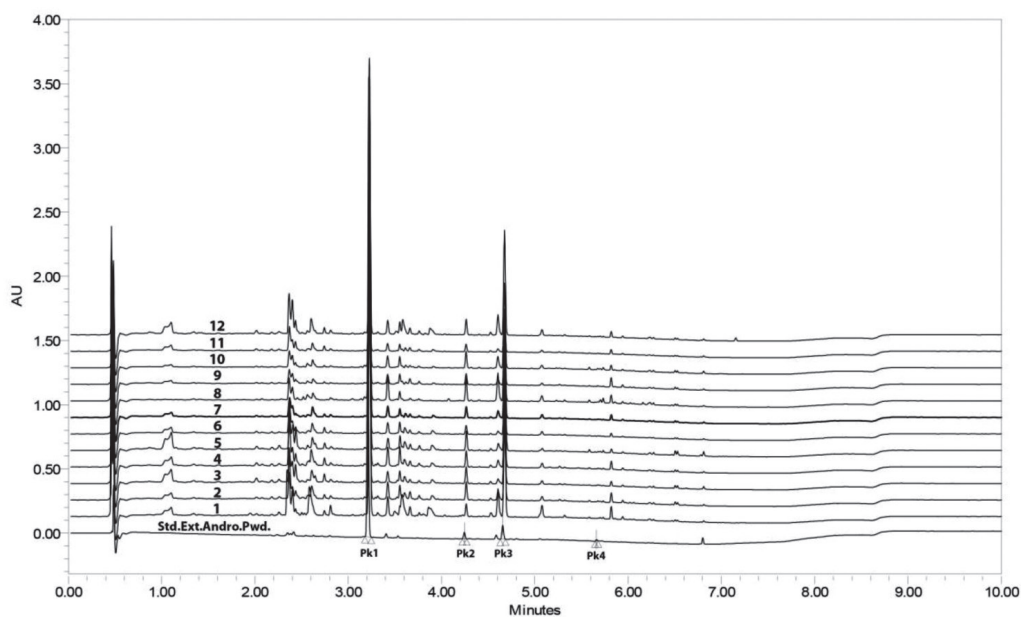
2.8 ขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection) และขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณ (limit of quantitation):

จากการทดสอบฉีดยาละลายของ androgra-

pholide พบว่า limit of detection (LOD) มีค่าเท่ากับ 164.5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ($n = 6$, $S/N = 3.7$) และ limit of quantitation (LOQ) มีค่าเท่ากับ 299.0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ($\%RSD = 2.2$, $n = 6$, $S/N = 10.6$)

2.9 ทดสอบวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนากับตัวอย่างผลิตภัณฑ์

จากการวิเคราะห์เพื่อแยกพีคของสาร andrographolide และสารกลุ่ม diterpene lactones อีก 3 ชนิด ได้แก่ สาร neoandrographolide, สาร 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide และสาร andrograpanin ของผลิตภัณฑ์ฟ้าทะลายโจรแคปซูลทั้ง 12 แหล่งผลิตโดยวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถแยกพีคของสาร andrographolide, สาร neoandrographolide,



ภาพที่ 4 โครมาโทแกรมของผลิตภัณฑ์ฟ้าทะลายโจรแคปซูลจำนวน 12 ตัวอย่างเทียบกับสารละลายมาตรฐาน USP powdered andrographis extract

Pk1 : andrographolide

Pk2 : neoandrographolide

Pk3 : 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide

Pk4 : andrograpanin

สาร 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide และสาร andrograpanin ได้ตามข้อกำหนดในหัวข้อ system suitability ตามมาตรฐาน USP39 โดยมีค่า relative retention time เทียบกับ andrographolide เท่ากับ 1.35, 1.48, 1.79 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4 เมื่อคำนวณหาปริมาณสารทั้ง 4 ชนิดของผลิตภัณฑ์ฟ้าทะลายโจรแคปซูลทั้ง 12 แหล่งผลิตพบว่าปริมาณต่อแคปซูลอยู่ในช่วง 3.14-9.62, 0.60-1.95, 1.02-4.23, 0.01-0.05 มิลลิกรัมตามลำดับ

อภิปรายผล

วิธี UPLC ที่พัฒนาขึ้นสามารถวิเคราะห์หาปริมาณสาร andrographolide ได้สะดวกและรวดเร็ว ใช้เวลาวิเคราะห์ 10 นาทีต่อหนึ่งครั้งซึ่งเร็วกว่าการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC ที่กำหนดใน USP ประมาณ 4 เท่า จึงลดเวลาในการทำงาน ประหยัดค่าใช้จ่ายและลดปริมาณการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ได้อย่างมาก นอกจากนี้วิธีนี้ยังสามารถตรวจเอกลักษณ์สารแต่ละตัวโดยใช้ detector ชนิด diode array และ mass spectrometer เพื่อยืนยันชนิดของสารสำคัญรวมทั้งความบริสุทธิ์ของสารว่าไม่มีสารอื่นเจือปน การปรับเปลี่ยนใช้ formic acid เป็นส่วนประกอบในสารละลายตัวพาของระบบโครมาโทกราฟีแบบ phosphate buffer เป็นการเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมเมื่อใช้กับ detector ชนิด Electrospray Ionization Source-Mass spectrometer (ESI-MS) เนื่องจากขณะที่มีการใช้ความร้อนสูงในการระเหยสารละลายตัวพา phosphate จะทำให้เกิดการปนเปื้อนในส่วนของ ion source ของเครื่อง^[8-10] นอกจากนี้การเติม formic acid ทั้งในเฟสน้ำและ acetonitrile ของสารละลายตัวพานั้นเพื่อเป็นการปรับ baseline ให้เป็นเส้นตรงซึ่งทำให้ผลวิเคราะห์ดีกว่าการใช้ formic acid ในเฟส

น้ำเพียงอย่างเดียว ในขณะที่ปรับเพิ่มสัดส่วนของ acetonitrile ของสารละลายตัวพานั้น baseline จะเอนลงเนื่องจากการดูดกลืนคลื่น UV ที่ความยาวคลื่น 223 nm ใกล้กับ UV cut-off ของ formic acid (210 nm) ทำให้ baseline ไม่คงที่ผลการวิเคราะห์ที่ได้อาจไม่ถูกต้อง

วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถแยกพิคได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากการทดสอบพบว่า การแยกสาร andrographolide และสารกลุ่ม diterpene lactones ทั้ง 3 ชนิดจากสารมาตรฐาน powdered andrographis extract ให้ mass spectrum ของสารแต่ละตัวที่แยกได้สอดคล้องกับการทดลองของ Yong-Xi S. และคณะ^[11] สำหรับสาร 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide ซึ่ง USP39 ได้กำหนดให้มีปริมาณสารตัวนี้ในโมโนกราฟี powdered andrographis extract ไม่เกิน 15% ของผลรวมของ diterpene lactones^[4] สารนี้จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นจากการสลายตัวของสาร andrographolide ในสภาวะที่เป็นต่าง ซึ่งสาร 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide นี้ มีผลต่อระบบหัวใจและหลอดเลือดโดยมีฤทธิ์ในการขยายหลอดเลือดและลดการเต้นของหัวใจ ผู้บริโภคที่ได้รับฟ้าทะลายโจรที่มีสารนี้ในปริมาณมาก อาจมีผลให้เกิดอาการความดันโลหิตต่ำ^[12] จึงควรระมัดระวังในการจ่ายยาให้กับผู้ป่วยที่มีภาวะโรคหัวใจและหลอดเลือด นอกจากนี้เมื่อสาร andrographolide ในรูปผลึก amorphous สัมผัสความร้อนที่มากกว่า 90°C จะสลายตัวเป็นสาร 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide โดยสอดคล้องกับรายงานที่สาร andrographolide เกิดการสลายตัวที่อุณหภูมิมากกว่า 70°C เช่นกัน^[13-14] ดังนั้นขั้นตอนในการผลิตและการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์จากฟ้าทะลายโจรควรหลีกเลี่ยงสภาวะที่จะทำให้เกิด

การสลายตัวดังกล่าวด้วย

ข้อสรุป

วิธีวิเคราะห์สาร andrographolide ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจเอกลักษณ์และวิเคราะห์หาความบริสุทธิ์ของสาร andrographolide นอกจากนี้ยังใช้ในการควบคุมคุณภาพปริมาณสาร andrographolide ในวัตถุดิบฟ้าทะลายโจร รวมทั้งวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่ม diterpene lactones ในรูปของผลรวมเมื่อใช้วิธีเปรียบเทียบกับสาร andrographolide ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ฟ้าทะลายโจรที่มีการผลิตและจำหน่ายในประเทศและยังเป็นการส่งเสริมการส่งออกผลิตภัณฑ์สมุนไพรไทยที่ได้มาตรฐานไปยังต่างประเทศด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนายอำพร วงศ์เจริญสถิต ที่ได้ให้คำแนะนำขั้นตอนในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์และนางสาวนิดาพรรณ เรืองฤทธิพันธ์ ที่ได้ให้คำแนะนำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สาร andrographolide จากฟ้าทะลายโจรจนสามารถนำมาพัฒนาเป็นวิธีวิเคราะห์มาตรฐานนี้

References

1. National List of Essential Medicines A.D.2011. Published in Government Gazette, Vol. 2, (28 June 2011). (in Thai)
2. Department of Medical Sciences. Thai Herbal Pharmacopoeia. Nonthaburi: Department of Medical Sciences; 2016. p.103-13.
3. Aromdee C. No bitter of *Andrographis paniculata*. Khon Kaen: Khon Kaen University Press; 2015. p. 2. (in Thai)
4. The United States Pharmacopoeial Convention, Inc. The United States Pharmacopoeia, The National Formulary

- 39th revision. Rockville, MD.: The United States Pharmacopoeial Convention, Inc.; 2016. p.6461, 6463.
5. Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC): An introduction [Internet]. 2005 [cited 2005 May]; [7 screens]. Available from: <https://pdfs.semanticscholar.org/7e1c/346c178f9a48e91b45fc8a5c9a9e47685686.pdf>
6. European Medicines Agency. ICH guidelines on validation of analytical procedures: text and methodology, London: European Medicines Agency; 1995. 15 p.
7. ORA validation and verification guidance for human drug analytical methods [Internet]. 2014 [cited 2014 Sep 22]; [3 screens]. Available from: <https://www.fda.gov/downloads/ScienceResearch/FieldScience/LaboratoryManual/UCM292774.pdf>
8. Wheat T.E. Effective use of the ACQUITY[™] QDa mass detector with your chromatography system [Internet]. 2015 [cited 2016 May 20]; [76 screens]. Available from: http://www.waters.com/webassets/cms/events/docs/us_events/2015_us_events/QDaMTESlides11_12_15FINAL.pdf
9. Solvents and caveats for LC/MS [Internet]. 2015 [cited 2016 May 20]; [1 screen]. Available from: http://www.waters.com/waters/en_TH/Solvents-and-Caveats-for-LC-MS/nav.htm?cid=10091173&locale=en_TH
10. Pitt JJ. Principles and application of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. Clin Biochem Rev. 2009;30(1):19-34.
11. Yong-Xi S, Shi-Ping L, Zhao J, Jian-Fei Q, Zhi-Yuan J. Qualitative and quantitative analysis of *Andrographis paniculata* by rapid resolution liquid chromatography/Time-of-Flight mass spectrometry. Molecules. 2013;18(10):12192-207.
12. Yoopan N, Thisoda P, Rangkadilok N, Sahasitawat S, Pholphana N, Ruchirawat S, Satayavivad J. Cardiovascular effects of 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide and *Andrographis paniculata* extracts. Planta Med. 2007;73(6):503-11.
13. Pholphana N, Rangkadilok N, Satayavivad J. *Andrographis paniculata*: Herbs that are widely known both domestically and internationally [Internet]. 2016 [cited 2017 Aug 20]; [1 screen]. Available from: <http://www.eht.sc.mahidol.ac.th/article/1807> (in Thai)
14. Lomlim L, Jirayupong N, Plubrukarn A. Heat-accelerated degradation of solid-state andrographolide. Chem Pharm Bull. 2003;51(1):24-6.