

การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของ  
วิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดโรสมารินิกในตัวอย่างชีวภาพ  
ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

นายทัตต์กันต์ อินสมพันธ์  
นายณัฐวัฒน์ ทรัพย์งาม

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา  
ตามหลักสูตร ปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต  
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

พ.ศ. 2561

METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION  
FOR DETERMINATION OF ROSMARINIC ACID IN  
BIOLOGICAL SAMPLE BY HIGH PERFORMANCE  
LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD

MR. TATKAN INSOMPAN  
MR. NATTAWAT SUBNGARM

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL  
FULFILMENT OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHARMACY  
FACULTY OF PHARMACY  
MAHIDOL UNIVERSITY

2017

**บทคัดย่อ**  
**การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ**  
**กรดโรสมารินิกในตัวอย่างชีวภาพด้วยเครื่องโครมาโทกราฟี**  
**ของเหลวสมรรถนะสูง**

ทัตต์กันต์ อินสมพันธ์, ณัฐวัฒน์ ทรัพย์งาม

อาจารย์ที่ปรึกษา : กชพรรณ ชูลักษณะ<sup>\*</sup>, ปิยนุช โรจน์สง่า<sup>\*\*</sup>, อัญชลี จินตพัฒนากิจ<sup>\*\*\*</sup>

<sup>\*</sup>ภาควิชาเภสัชอุตสาหกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

<sup>\*\*</sup>ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

<sup>\*\*\*</sup>ภาควิชาเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

**คำสำคัญ:** กรดโรสมารินิก, *Thunbergia laurifolia*, การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

**หลักการและเหตุผล:** กรดโรสมารินิกเป็นสารออกฤทธิ์หลักตัวหนึ่งที่พบในใบรางจืดที่มีรายงานฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากมาย จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า สารตัวนี้มีความสามารถในการดูดซึมผ่านลำไส้เล็กได้น้อย และสารช่วยบางตัวที่ใช้ในการเตรียมยาในรูปแบบรับประทานอาจมีผลทำให้ตัวยาประเภทนี้มีการดูดซึมน้อยลงยิ่งขึ้น ในปัจจุบันยังไม่มีรายงานผลของสารช่วยต่อการดูดซึมกรดโรสมารินิก จึงมีแนวคิดที่จะศึกษาผลของสารช่วยต่อความสามารถในการดูดซึมผ่านลำไส้เล็กของกรดโรสมารินิกด้วย Caco-2 monolayers ซึ่งจำเป็นต้องใช้วิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสม

**วัตถุประสงค์:** เพื่อพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดโรสมารินิกใน Hank's balanced salt solution ซึ่งเป็นสารละลายที่จะใช้ในการศึกษาผลของสารช่วยต่อการดูดซึมของกรดโรสมารินิกด้วย Caco-2 monolayers

**วิธีดำเนินการวิจัย:** พัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดโรสมารินิกด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง และตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ตามแนวทางของ US FDA Bioanalytical Method Validation

**ผลการวิจัย:** วิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดโรสมารินิกในตัวอย่างชีวภาพที่พัฒนาขึ้นมานั้น ผ่านเกณฑ์มาตรฐานหัวข้อความเป็นเส้นตรง ความจำเพาะ ความไวของวิธีวิเคราะห์ ความถูกต้องและแม่นยำ รวมถึงความคงสภาพของตัวอย่าง

**สรุป:** วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมานี้ เป็นวิธีที่ง่าย มีความไว ความถูกต้องและแม่นยำ สามารถนำไปใช้ในการศึกษาผลของสารช่วยต่อการดูดซึมของกรดโรสมารินิกด้วย Caco-2 monolayers

**Abstract**

**Method development and validation for determination  
of rosmarinic acid in biological sample by  
high performance liquid chromatography method**

TATKAN INSOMPAN, NATTAWAT SUBNGAM

**Project advisor:** Kotchaphan Chooluck\*, Piyanuch Rojsanga\*\*, \*\*\* Anchalee Jintapattanakit

\*Department of Manufacturing Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Mahidol University

\*\*Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Mahidol University

\*\*\*Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Mahidol University

**Keyword:** rosmarinic acid, *Thunbergia laurifolia* by HPLC, Method biological validation

**BACKGROUND:** Rosmarinic acid is a major active ingredient of *Thunbergia laurifolia* leaves in which its pharmacological effects have been reported. The previous studies demonstrated that rosmarinic acid has poor intestinal permeability. Furthermore, its permeability may be worse because of some excipients used in the development of oral dosage forms. Until now, the information relating to the effect of excipients on the permeability of rosmarinic acid was limited. To study the effect of tablet excipients on the permeability of rosmarinic acid by using the Caco-2 cell monolayer model, an bioanalytical method was needed.

**OBJECTIVE:** To develop and validate the analytical method for the determination of rosmarinic acid content in Hank's balanced salt solution which was the solution used in the permeability study.

**METHOD:** The quantitative analysis of rosmarinic acid was performed by using high performance liquid chromatography method. The method was validated according to US-FDA bioanalytical method validation guidelines.

**RESULT:** All of validated parameters such as linearity, specificity, sensitivity, precision and accuracy, were within acceptable ranges for the analytical purposes.

**CONCLUSION:** The developed method could be applied to investigate the effect of excipients on the permeability of rosmarinic acid.