

การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ แอนโดรกราโฟไลด์ในผลิตภัณฑ์ฟ้าทะลายโจรโดยเทคนิคโครมาโทกราฟี ชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูง

ประภาพรพรณ สุขพรรณ^{*}, สรณสิริ สุขเขียว, จิราบุษ แจ่มทวีกุล

สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ จังหวัดนนทบุรี 11000

^{*}ผู้รับผิดชอบบทความ: prapapun.s@dmssc.mail.go.th

บทคัดย่อ

บทนำและวัตถุประสงค์: จากการระบาดของเชื้อไวรัสโคโรนา (COVID-19) ฟ้าทะลายโจรได้ถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคนี้ ทำให้ท้องตลาดมีผลิตภัณฑ์ฟ้าทะลายโจรที่หลากหลายมากขึ้น จึงทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารแอนโดรกราโฟไลด์ในผลิตภัณฑ์ฟ้าทะลายโจรทั้ง 3 ชนิด คือ แคปซูล สารสกัดชนิดแคปซูล และสารสกัดชนิดเม็ด เพื่อใช้ควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ฟ้าทะลายโจรที่มีจำหน่ายในท้องตลาด

วิธีการศึกษา: การศึกษาวิจัยนี้แบ่งเป็น 2 ส่วน 1) พัฒนาวิธีการสกัดสารแอนโดรกราโฟไลด์จากผลิตภัณฑ์ฟ้าทะลายโจรด้วยตัวทำละลายเมทานอลร่วมกับเครื่องเขย่าความถี่สูง 2) ตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ตามหลักเกณฑ์ ICH Guideline ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูง ซึ่งใช้คอลัมน์ Zorbax C18 ขนาด 4.6×150 มิลลิเมตร บรรจุอนุภาคขนาด 5 ไมครอนเมตร สารละลายตัวทำละลายเป็นส่วนผสมระหว่างน้ำและเมทานอล ในอัตราส่วน 50:50 อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดด้วยอัตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 224 นาโนเมตร

ผลการศึกษา: พบว่าการสกัดด้วยเมทานอล 5 นาที และสกัดต่อด้วย 50% เมทานอล 15 นาทีร่วมกับเครื่องเขย่าความถี่สูงให้ปริมาณสารแอนโดรกราโฟไลด์เทียบเท่ากับวิธีสกัดตามตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทยปี 2021 โดยวิธีดังกล่าวมีความจำเพาะเจาะจง และมีช่วงการวิเคราะห์ที่มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.02-0.14 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ≥ 0.9999 ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ให้ค่า %RSD อยู่ในช่วง 0.2-1.1 ค่าความแม่นยำให้ค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วง 95-99 และมีความทนต่อสภาวะที่เปลี่ยนแปลงไปได้แก่สัดส่วนสารละลายตัวทำละลาย อัตราการไหลของตัวทำละลายและอุณหภูมิคอลัมน์

อภิปรายผล: ผลการวิเคราะห์การสกัดด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถใช้ในการเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความถี่สูงทดแทนวิธีที่สกัดด้วยวิธีที่สกัดด้วยการเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความถี่สูงตามตำรา (ไดคลอโรมีเทน) ลดระยะเวลาและขั้นตอนในการสกัดหาปริมาณสารแอนโดรกราโฟไลด์

ข้อสรุป: จากผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในผลิตภัณฑ์ฟ้าทะลายโจรได้ทั้ง 3 ชนิด คือ แคปซูล สารสกัดชนิดแคปซูล และสารสกัดชนิดเม็ดซึ่งครอบคลุมทุกผลิตภัณฑ์ที่จำหน่ายในท้องตลาด

คำสำคัญ: แอนโดรกราโฟไลด์, ฟ้าทะลายโจร, สารสกัด, โครมาโทกราฟีชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูง

Development and Validation of Analytical Method for Quatitative Analysis of Andrographolide from *Andrographis paniculata* Products by High Performace Liquid Chromatography

Prapapun Sukphan^{*}, Sornsiri Sukkhieo, Jiranuch Jamtaweekul

Bureau of Drug and Narcotic, Department of Medical Sciences, Ministry of Public health, Nonthaburi 11000, Thailand

^{*} **Corresponding author:** prapapun.s@dmsc.mail.go.th

Abstract

Introduction and Objective: Due to the outbreak of coronavirus disease 2019 (COVID-19), *Andrographis paniculata*, or *Fa Thalai Chon* in Thai, has been used to treat this disease, leading to more varieties of *A. paniculata* products available in the market. Therefore, an analytical method was developed to determine the andrographolide content in three variants of *A. paniculata* products: *A. paniculata* capsules, *A. paniculata* extract capsules, and *A. paniculata* extract tablets. The method will be used for the quality control of *A. paniculata* products in the market.

Methods: The study was divided into two parts: (1) development of a method for extraction of *A. paniculata* in products using methanol as a solvent and ultrasonic sonication and (2) validation of the analytical method according to the ICH Guidelines using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) technique with a Zorbax C18 column (4.6 × 150 mm, 5-μm particle size). The mobile phase was a mixture of water and methanol (50:50), with a flow rate of 1.0 mL/min, and detection under UV light at the 224 nm wavelength.

Results: The 5-minute methanol extraction of *A. paniculata* followed by a 15-minute extraction with 50% methanol, coupled with ultrasonic sonication, yielded an andrographolide content comparable to that achieved using the Thai Herbal Pharmacopoeia 2021 extraction method. This method demonstrated specificity and a linear relationship for the concentrations ranging from 0.02 to 0.14 mg/mL, with a correlation coefficient (r) of ≥ 0.9999. Precision, represented by %RSD, ranged from 0.2% to 1.1%, while accuracy, measured by percentage recovery fell within the 95% to 99% range. Moreover, the method exhibited robustness against variations in mobile phase ratio, flow rate, and column temperature.

Discussion: The comparison between the reflux method and ultrasonic sonication method revealed that the latter is a viable alternative, offering ease of use, convenience, and elimination of carcinogenic chemicals like dichloromethane. Additionally, it reduced both the analytical time and extraction steps for andrographolide extraction.

Conclusion: The developed HPLC method is suitable for analyzing andrographolide content in three variations of *A. paniculata* products (capsules, extract capsules and extract tablets), encompassing all products found in the market.

Key words: andrographolide, *Andrographis paniculata*, extract, High Performance Liquid Chromatography

บทนำและวัตถุประสงค์

ฟ้าทะลายโจร มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees วงศ์ Acanthaceae^[1-2] จัดเป็นสมุนไพรท้องถิ่นในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น อินเดีย จีน ศรีลังกา และไทย ถูกใช้กันอย่างแพร่หลายในหลายประเทศทั่วทวีปเอเชีย โดยนิยมนำส่วนของใบและลำต้นมาทำเป็นยารักษาโรค โดยเฉพาะโรคไข้หวัด ในประเทศไทยได้บรรจุฟ้าทะลายโจรอยู่ในบัญชียาหลักแห่งชาติ (บัญชียาจากสมุนไพร) ของกระทรวงสาธารณสุข ในหมวดหมู่ยารักษาภูมิอาการของระบบทางเดินอาหารและระบบทางเดินหายใจ เช่น ท้องเสีย บิด แก้อาการไอ เจ็บคอ หรือคออักเสบ ต่อมทอนซิลอักเสบ หลอดลมอักเสบ แก้ไข้ทั่วไป เป็นยาชมเจริญอาหาร ฟ้าทะลายโจรเป็นที่รู้จักและได้รับการยอมรับเป็นสมุนไพรไทยมานาน ปัจจุบันมีการนำฟ้าทะลายโจรมาทำเป็นฟ้าทะลายโจรแคปซูล ฟ้าทะลายโจรสกัดแคปซูล ฟ้าทะลายโจรสกัดชนิดเม็ด เพื่อความสะดวกในการรับประทาน ซึ่งมีผู้ทำการศึกษาค้นคว้าวิจัยถึงสรรพคุณยา และได้พบสารพฤษเคมีในส่วนต่างๆ ของพืชอยู่หลายชนิด รวมทั้งสารแอนโดรกราโฟไลด์ (Figure 1) ที่เป็นสารสำคัญที่มีอยู่ในทุกส่วน คือ ราก ต้น ใบ^[3]

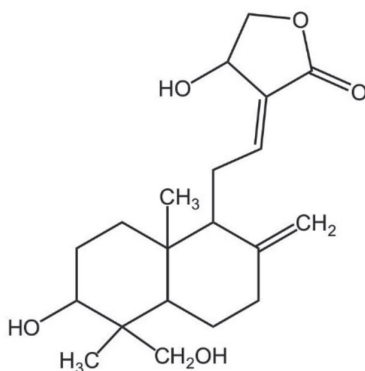


Figure 1 Chemical structure of Andrographolide

จากการระบาดของเชื้อไวรัสโคโรนา (COVID-19) กรมการแพทย์กระทรวงสาธารณสุขได้มีแนวทางเวชปฏิบัติ การวินิจฉัย ดูแลรักษา และป้องกันการติดเชื้อนี้ โดยพิจารณาใช้ฟ้าทะลายโจรในผู้ป่วยที่ไม่มีอาการหรือมีอาการน้อย ไม่มีปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรงและไม่มีข้อห้ามต่อการใช้ฟ้าทะลายโจร ขนาดยาที่ใช้ในผู้ใหญ่ คือ ฟ้าทะลายโจรที่มีปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ 180 มิลลิกรัมต่อวัน แบ่งให้รับประทานก่อนอาหาร 3 ครั้ง ต่อเนื่อง 5 วันซึ่งจะต้องเริ่มยาเร็วที่สุดหลังทราบว่าติดเชื้อไวรัสโคโรนา^[4-6] จากสถานการณ์ดังกล่าวจึงทำให้มีการใช้ผลิตภัณฑ์ฟ้าทะลายโจรเป็นจำนวนมาก ดังนั้นทางสำนักยาและวัตถุเสพติดร่วมกับสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาจึงเก็บตัวอย่างฟ้าทะลายโจรแคปซูล ฟ้าทะลายโจรสกัดแคปซูล และฟ้าทะลายโจรสกัดชนิดเม็ด เพื่อตรวจสอบคุณภาพผลิตภัณฑ์ฟ้าทะลายโจรว่ามีสารสำคัญตรงตามฉลากที่แจ้งหรือไม่

วิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจวิเคราะห์ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในผลิตภัณฑ์ฟ้าทะลายโจรยังไม่มีระบุไว้ในตำรามาตรฐานยาของสหรัฐอเมริกา (USP) แต่มีระบุในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทยปี 2021 (THP 2021) ซึ่งวิธีที่ระบุไว้นั้นขั้นตอนการสกัดสารสำคัญใช้วิธีรีฟลักซ์ ซึ่งมีความยุ่งยาก ใช้เวลานาน มีหลายขั้นตอนและใช้สารเคมีไดคลอโรมีเทน ซึ่งเป็นสารที่อันตรายหากสัมผัสถูกผิวหนังสามารถก่อให้เกิดการระคายเคืองและมะเร็งได้ หากสูดดมในปริมาณมากจะก่อให้เกิดอาการมึนงง ปวดศีรษะ ง่วงซึม หัวใจเต้นผิดปกติ หมดสติได้^[7] ผู้วิจัยจึงพัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่สะดวก รวดเร็ว ลดการใช้สารเคมีที่ก่อให้เกิดมะเร็งและลดการใช้อุปกรณ์ในการสกัดถึง 2 เครื่องมือ จากการศึกษาในปี 2016^[8] และ ปี 2013 ระบุ

ว่าสารแอนโดรกราโฟไลด์ละลายได้ดีในเมทานอล^[9] และสามารถสกัดด้วยเครื่องเขย่าความถี่สูงในการสกัดสารสำคัญแทนการรฟลักซ์ แต่มีการศึกษาเฉพาะรูปแบบฟ้าทะลายโจรชนิดแคปซูลอย่างเดียว^[8] ซึ่งจะไม่ครอบคลุมกับผลิตภัณฑ์ฟ้าทะลายโจรสกัดชนิดแคปซูลและฟ้าทะลายโจรสกัดชนิดเม็ด ผู้วิจัยจึงพัฒนาวิธีวิเคราะห์โดยเลือกตัวทำละลายเมทานอลเพื่อนำมาใช้ในการสกัด โดยศึกษาประสิทธิภาพของการสกัด และระยะเวลาสกัดที่เหมาะสมให้ครอบคลุมกับทุกผลิตภัณฑ์ฟ้าทะลายโจรทุกรูปแบบ โดยตรวจสอบความถูกต้องของวิธีที่พัฒนาขึ้นก่อนนำไปใช้หาปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในผลิตภัณฑ์สมุนไพรเพื่อเปรียบเทียบวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธีที่ระบุในตำรายามาตรฐานยาสมุนไพรไทย

ระเบียบวิธีศึกษา

วัสดุ

1. สารมาตรฐาน andrographolide, DMSC ความบริสุทธิ์ร้อยละ 99.67 Control No. 02A64213

2. ตัวอย่าง จำนวนตัวอย่าง 32 ตัวอย่าง

3. เครื่องมือและอุปกรณ์

High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) รุ่น 2996-2695

คอลัมน์ Zorbax C18 4.6 × 150 mm, 5 μm Guard column Phenomenex C18 3.0 × 4.0 mm, ขนาดอนุภาค 5 μm

เครื่องเขย่าความถี่สูง (Sonicate) รุ่น S 100 H (Elma, USA)

เครื่องชั่ง Microbalance Mettler รุ่น MX5

เครื่องชั่ง 5 ตำแหน่ง Mettler Toledo รุ่น XPE

205

4. สารเคมี Methanol HPLC grade, น้ำบริสุทธิ์ (water type I) จากเครื่องผลิตน้ำ ยี่ห้อ Millipore รุ่น Milli Q

วิธีการศึกษา

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ (method development)

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในผลิตภัณฑ์ฟ้าทะลายโจร ด้วยเครื่อง HPLC โดยทำการเปลี่ยนวิธีสกัดตัวอย่าง จากวิธีรฟลักซ์มาเป็นการสกัดด้วยวิธีเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความถี่สูง (sonicate) และปรับอัตราส่วนของสารละลายตัวพาให้เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์สารแอนโดรกราโฟไลด์ ซึ่งทำให้ใช้เวลาในการวิเคราะห์เร็วขึ้นและลดการใช้สารเคมีไดคลอโรมีเทนที่เป็นอันตรายและก่อมะเร็ง

วิธีวิเคราะห์

การเตรียมสารละลายมาตรฐานตั้งต้น (standard stock solution)

ซึ่งสารมาตรฐานแอนโดรกราโฟไลด์ 5 mg ใส่ในขวดกำหนดปริมาตรขนาด 25 ml เติมนเมทานอล 2 ml นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความถี่สูงประมาณ 5 นาที ปรับปริมาตรด้วย 50% เมทานอล ได้สารละลายมาตรฐานแอนโดรกราโฟไลด์ความเข้มข้น 0.2 mg/ml

การสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve)

เตรียมสารละลายมาตรฐานแอนโดรกราโฟไลด์จากสารละลายมาตรฐานตั้งต้นทั้งหมด 6 ความเข้มข้น คือ 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10 และ 0.14

mg/ml โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานตั้งต้น 1, 2, 3, 4, 5 และ 7 ml ตามลำดับ ใส่ในขวดกำหนดปริมาตรขนาด 10 ml ปรับปริมาตรด้วย 50% เมทานอล กรองผ่านเมมเบรนชนิดไนลอน ความละเอียดขนาด $0.45\ \mu\text{m}$

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

การเตรียมสารละลายตัวอย่างผลิตภัณฑ์ฟ้าทะลายโจรชนิดแคปซูลและสารสกัดฟ้าทะลายโจรชนิดแคปซูลโดยสุ่มตัวอย่างแคปซูลยา 20 แคปซูล จากนั้นนำผงตัวอย่างจำนวน 20 แคปซูลผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยบดและนำไปแรงผ่าน US Sieve No.80 (สารสกัดฟ้าทะลายโจรชนิดแคปซูลไม่ต้องแรงผ่าน US Sieve No.80) ซึ่งผงฟ้าทะลายโจรปริมาณ 400 mg (แบบแคปซูล) 200 mg (แบบสารสกัดชนิดแคปซูล) ใส่ในขวดกำหนดปริมาตรขนาด 100 ml เติมนเมทานอลจำนวน 10 ml เขย่าด้วยเครื่องเขย่าความถี่สูง 5 นาที จากนั้นเติม 50% เมทานอล จำนวน 60 ml เขย่าด้วยเครื่องเขย่าความถี่สูง 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที จากนั้นปรับปริมาตรจนครบ 100 ml ด้วย 50% เมทานอล ผสมให้เข้ากัน กรองผ่านเมมเบรนชนิดไนลอน ความละเอียดขนาด $0.45\ \mu\text{m}$ การเตรียมสารละลายตัวอย่างผลิตภัณฑ์สารสกัดฟ้าทะลายโจรชนิดเม็ดโดยสุ่มตัวอย่างยา 20 เม็ดผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยการบด จากนั้นซึ่งผงฟ้าทะลายโจรปริมาณ 80 mg ใส่ในขวดกำหนดปริมาตรขนาด 100 ml เติมนเมทานอลจำนวน 10 ml เขย่าด้วยเครื่องเขย่าความถี่สูง 5 นาที จากนั้นเติม 50% เมทานอล จำนวน 60 ml เขย่าด้วยเครื่องเขย่าความถี่สูง 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที จากนั้นปรับปริมาตรจนครบ 100 ml ด้วย 50% เมทานอล ผสมให้เข้ากัน

กรองผ่านเมมเบรนชนิดไนลอน ความละเอียดขนาด $0.45\ \mu\text{m}$

สภาวะเครื่องโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูง

ในการทดสอบวิธีวิเคราะห์นี้ใช้คอลัมน์ Zorbax ชนิด C18 ขนาด $4.6 \times 150\ \text{mm}$ อนุภาค $5\ \mu\text{m}$ ตั้งค่าอุณหภูมิคอลัมน์ที่ 25°C อุณหภูมิตัวอย่างที่ 30°C สารละลายตัวพาเป็นส่วนผสมระหว่างน้ำและเมทานอล ในอัตราส่วน 50:50 อัตราการไหล $1.0\ \text{ml/min}$ ปริมาตรการฉีด $20\ \mu\text{l}$ ตรวจวัดด้วยอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น $224\ \text{nm}$

ความเหมาะสมของระบบ (system suitability)

ฉีดสารละลายมาตรฐานแอนโดรกราโฟไลด์ ความเข้มข้น $0.060\ \text{มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร}$ 5 ซ้ำ เพื่อตรวจสอบความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟี โดยมีค่า $\%RSD \leq 2$ ก่อนการสร้างกราฟมาตรฐาน

วิธีการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์และเกณฑ์การยอมรับ

ความจำเพาะเจาะจง (specificity)

พิกแอนโดรกราโฟไลด์ในสารละลายตัวอย่าง ต้องไม่มีสัญญาณจากสารอื่น ๆ รบกวน และมีค่า retention time ของสารแอนโดรกราโฟไลด์ในตัวอย่าง สอดคล้องกับมาตรฐาน โดยประเมินค่าความบริสุทธิ์ของพีก (peak purity) จากค่า purity angle ต้องมีค่าน้อยกว่า purity threshold

การทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity)

เตรียมสารละลายมาตรฐานสำหรับสร้างกราฟมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10

และ 0.14 mg/ml จัดภายใต้สภาวะเครื่องที่ผ่านการทดสอบความเหมาะสมของระบบ เกณฑ์การยอมรับคือ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) อยู่ในช่วง 0.995-1.000^[10]

การทดสอบความเที่ยงตรง (precision)

เตรียมสารละลายตัวอย่างตามที่อธิบายในการเตรียมสารละลายตัวอย่างในหัวข้อวิธีวิเคราะห์ โดยเตรียมตัวอย่างทั้งหมด 6 ตัวอย่าง เกณฑ์การยอมรับมีค่า $\%RSD \leq 2.0$ ^[10]

Intermediate precision

ทำเหมือนการทดสอบความเที่ยงตรงแต่เปลี่ยนนักวิเคราะห์ เกณฑ์การยอมรับ มีค่า $\%RSD \leq 2.0$ ^[10]

การทดสอบความแม่นยำ (accuracy)

ผลิตภัณฑ์ฟ้าทะลายโจรชนิดแคปซูล

ซึ่งสารมาตรฐานแอนโดรกราโฟไลด์ลงในขวดกำหนดปริมาตรขนาด 100 ml ที่มีผงตัวอย่างฟ้าทะลายโจรชนิดแคปซูลปริมาณ 100 mg ปรับปริมาตรด้วย 50% เมทานอล โดยให้มีระดับความเข้มข้นสุดท้าย คือ 0.04, 0.08, 0.12 mg/ml กรองผ่านเมมเบรนชนิดไนลอนความละเอียดขนาด 0.45 μm ทำซ้ำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

ผลิตภัณฑ์สารสกัดฟ้าทะลายโจรชนิดแคปซูล

ซึ่งสารมาตรฐานแอนโดรกราโฟไลด์ลงในขวดกำหนดปริมาตรขนาด 100 ml ที่มีผงตัวอย่างสารสกัดฟ้าทะลายโจรปริมาณ 100 mg และปรับปริมาตรด้วย 50% เมทานอล โดยให้มีระดับความเข้มข้นสุดท้าย คือ 0.05, 0.10, 0.125 mg/ml กรองผ่านเมมเบรนชนิด

ไนลอนความละเอียดขนาด 0.45 μm ทำซ้ำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

ผลิตภัณฑ์สารสกัดฟ้าทะลายโจรชนิดเม็ด

ซึ่งสารมาตรฐานแอนโดรกราโฟไลด์ลงในขวดกำหนดปริมาตรขนาด 100 ml ที่มีผงตัวอย่างสารสกัดฟ้าทะลายโจรปริมาณ 40 mg และปรับปริมาตรด้วย 50% เมทานอล โดยให้มีระดับความเข้มข้นสุดท้าย คือ 0.03, 0.06, 0.09 mg/ml กรองผ่านเมมเบรนชนิดไนลอน ความละเอียดขนาด 0.45 μm ทำซ้ำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

และคำนวณร้อยละการกลับคืน (%recovery) โดยมีเกณฑ์การยอมรับอยู่ในช่วง %recovery 95-105^[10]

Filter effect

เตรียมสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0.06 mg/ml กรองและไม่กรองผ่านเมมเบรนชนิดไนลอนความละเอียดขนาด 0.45 μm เข้าเครื่อง HPLC อย่างละ 2 ซ้ำ

เตรียมสารละลายตัวอย่างผลิตภัณฑ์ฟ้าทะลายโจรชนิดแคปซูล สารสกัดฟ้าทะลายโจรชนิดแคปซูล และผลิตภัณฑ์สารสกัดฟ้าทะลายโจรชนิดเม็ดเหมือนกับหัวข้อการเตรียมสารละลายตัวอย่าง จากนั้นกรองและไม่กรองผ่านเมมเบรนชนิดไนลอนขนาด 0.45 μm เข้าเครื่อง HPLC อย่างละ 2 ซ้ำ

คำนวณหาค่า %different ของ peak area ของสารละลายมาตรฐานและสารละลาย

ตัวอย่างที่กรองเปรียบเทียบกับที่ไม่ได้กรอง โดยเกณฑ์ผ่าน คือ ค่าไม่มากกว่า 2 สูตรคำนวณดังนี้

$$\%different = \frac{\text{peak area of filtered std or sample} - \text{peak area of non-filtered std or sample}}{\text{peak area of non-filtered std or sample}} \times 100$$

ความทนของวิธี (Robustness)

เปลี่ยนสัดส่วนสารละลายตัวพา ดังนี้ อัตราส่วน
ผสมระหว่างเมทานอลและน้ำ ในอัตราส่วน 48:52,
50:50 และ 52:48

เปลี่ยนอัตราการไหลของตัวพา ดังนี้ 0.8 ml/
min, 1.0 ml/min และ 1.2 ml/min

เปลี่ยนอุณหภูมิของคอลัมน์ ดังนี้ อุณหภูมิ
28 °C, อุณหภูมิ 30 °C และอุณหภูมิ 32 °C

ฉีดสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง
เข้าเครื่อง HPLC อย่างละ 3 ซ้ำ

นำค่า peak area ของสารแอนโดรกราโฟไลด์มา

คำนวณหาปริมาณ และใช้คำนวณหาค่า %RSD โดย
เกณฑ์ผ่าน คือ ค่าไม่มากกว่า 2

ผลการศึกษา

จากการทดลองเปรียบเทียบวิธีเตรียมสาร
สกัดตัวอย่างพบว่า การสกัดโดยวิธีฟลักซ์ด้วยตัว
ทำละลายไดคลอโรมีเทนและเมทานอล อัตราส่วน
1:1^[11] ได้ปริมาณสารสำคัญเทียบเท่ากับการสกัดด้วย
เครื่องเขย่าความถี่สูงที่ใช้ตัวทำละลาย 50% เมทานอล
(Table 1)

Table 1 Content of andrographolide extracted using the reflux extraction method and ultrasonication method

Methods	Times	Andrographolide of capsule	Andrographolide of extract capsule	Andrographolide of extract tablet
Reflux extraction dichloromethane : methanol (1:1) ^[10]	30 min	2.4 %w/w	21.5 mg/capsule	19.6 mg/tablet
Ultrasonication 100% methanol 5 min and 50% methanol at different times	sonicate 10 min	2.5 %w/w	21.3 mg/capsule	20.5 mg/tablet
	sonicate 15 min	2.6 %w/w	22.0 mg/capsule	20.5 mg/tablet
	sonicate 20 min	2.6 %w/w	22.0 mg/capsule	21.1 mg/tablet

ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจง

พิกแอนโดรกราโฟไลด์ไม่ถูกรบกวนจากพิก
อื่นๆ โดยพิจารณาจากค่าความบริสุทธิ์ของพิก
(peak purity) โดยประเมินค่าความบริสุทธิ์ของพิก
purity จาก purity angle มีค่า 0.118 ซึ่งมีค่าน้อยกว่า

purity threshold มีค่า 0.290 และจากการทดสอบ
ฉีดตัวทำละลาย คือ 50% เมทานอลและสารละลาย
มาตรฐานพบว่าตัวทำละลายไม่มีสัญญาณรบกวน
พิกของแอนโดรกราโฟไลด์ซึ่งมีค่า retention time
ประมาณ 5.4 นาที (Figure 2)

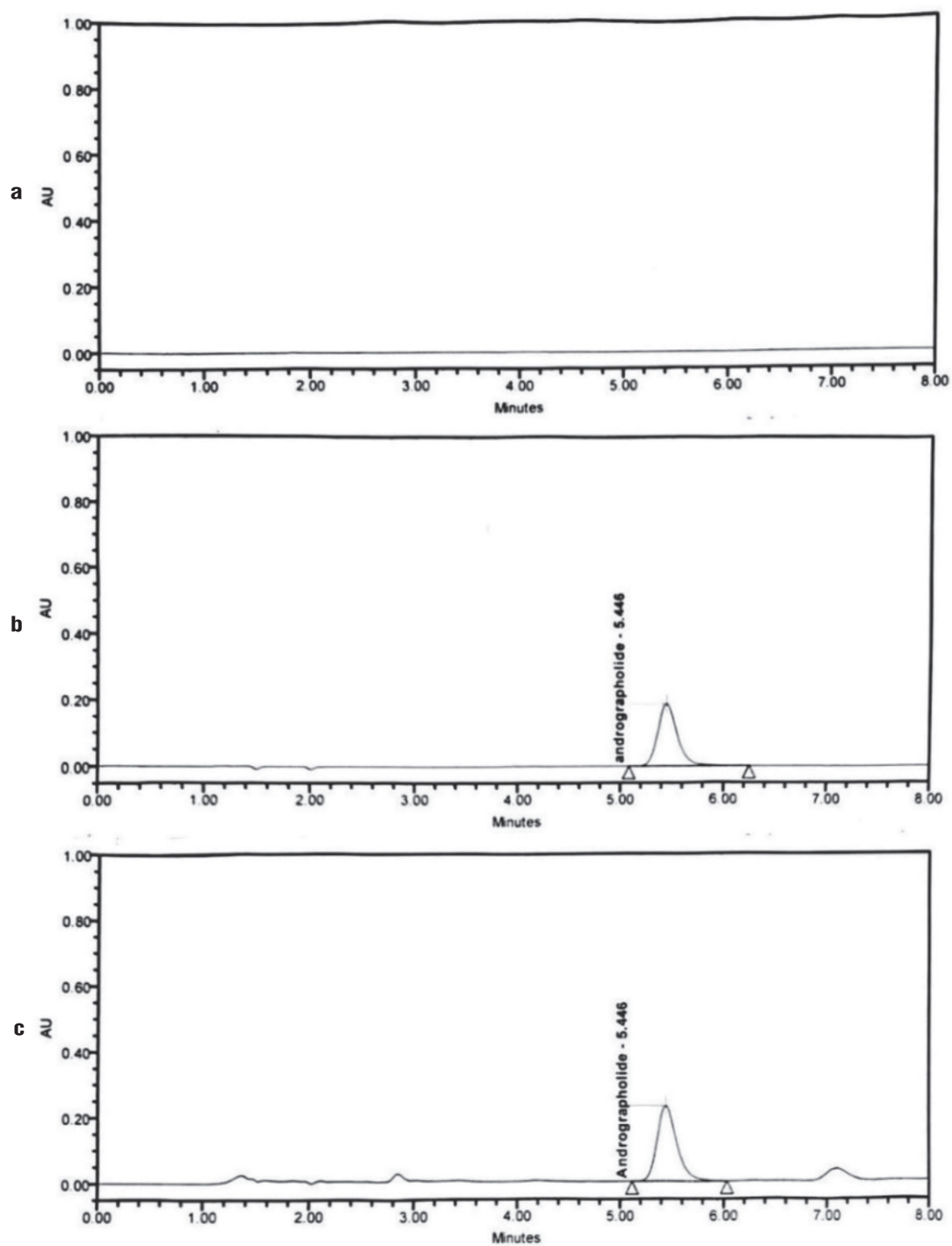


Figure 2 HPLC chromatograms of standard and sample

a: diluent (50% methanol), b: andrographolide standard solution, c: sample solution

ผลการทดสอบความแม่นยำ

จากการทดสอบความแม่นยำที่ระดับความเข้มข้น

ต่ำ กลาง และสูง พบว่าได้ค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ใน

ช่วง 95-99

Table 3 Accuracy test results for low, medium, and high concentration

Products	Concentration (mg/ml)	Recovery (%)			Mean (%)	RSD (%)	Criteria (%)
		Injection					
		1	2	3			
Capsule	0.04	95.0	95.8	98.9	96.6	2.2	95–105
	0.08	95.8	95.9	96.2	96.0	0.2	95–105
	0.12	96.7	96.8	96.6	96.7	0.1	95–105
Extract capsule	0.05	95.6	94.7	97.2	95.8	1.3	95–105
	0.10	96.9	96.7	97.7	97.1	0.5	95–105
	0.125	97.6	97.1	96.6	97.1	0.5	95–105
Extract tablet	0.03	97.3	98.8	96.6	97.6	1.1	95–105
	0.06	96.3	96.1	96.4	96.3	0.2	95–105
	0.09	99.0	98.6	97.1	98.2	1.0	95–105

ผลการทดสอบความทนของวิธีจากการทดสอบความทนของวิธีโดยการเปลี่ยน
สัดส่วนสารละลายตัวพา เปลี่ยนอัตราการใช้ของตัว

พาและเปลี่ยนอุณหภูมิของคอลัมน์ พบว่า %RSD อยู่

ในช่วง 0.1-1.1

Table 4 Test results robustness

Products	Mobile phase (methanol:water)	RSD (%)	Flow rate (ml/min)	RSD (%)	Temperature (°C)	RSD (%)
Capsule	48:52	1.0	0.8	0.4	28	0.5
	50:50	0.4	1.0	0.4	30	0.4
	52:48	1.1	1.2	0.4	32	0.7
Extract capsule	48:52	0.8	0.8	0.4	28	0.7
	50:50	0.7	1.0	0.7	30	0.7
	52:48	1.0	1.2	0.5	32	0.7
Extract tablet	48:52	0.5	0.8	0.2	28	0.2
	50:50	0.1	1.0	0.1	30	0.1
	52:48	0.3	1.2	0.1	32	0.1

อภิปรายผล

แอนโดรกราโฟไลด์สามารถละลายในสารตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น อะซีโตน, เมทานอล, คลอโรฟอร์ม และอีเทอร์^[9] ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้เมทานอลในการสกัดเนื่องจากหาซื้อได้ง่ายและราคาถูก การแช่สกัดและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความถี่สูงเป็นเวลา 5 นาที ซึ่งพบว่าให้ผลที่แตกต่างจากงานวิจัยปี 2016^[8] ที่ผ่านมามีงานวิจัยนี้เลือกใช้ 50% เมทานอลในการสกัดด้วยการแช่และเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความถี่สูง โดยพบว่าการใช้ 50% เมทานอลในการสกัดตั้งแต่ต้นจะไม่สามารถสกัดสารแอนโดรกราโฟไลด์ในผลิตภัณฑ์สารสกัดฟ้าทะลายโจรชนิดแคปซูลและชนิดเม็ดได้ โดยพบว่าค่าปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ที่สกัดได้น้อยกว่าวิธีฟลักซ์ซึ่งเป็นวิธีที่ระบุไว้ในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย เนื่องจากโดยทั่วไปสารสกัดที่นำมาใช้ในการผลิตยาสมุนไพรมักใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายในการสกัดซึ่งปลอดภัยและให้ปริมาณสารสำคัญที่สูง^[12] ดังนั้นจึงใช้เมทานอลในการสกัดในช่วง 5 นาทีแรกเนื่องจากเมทานอลมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับเอทานอลซึ่งสามารถทำให้ตัวอย่างสารสกัดแตกตัวได้ดี และใช้ 50% เมทานอลในการสกัดต่อเป็นเวลา 15 นาที ปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml ด้วย 50% เมทานอลเพื่อไม่ให้เกิดปัญหาในการแยกฟีดของสารแอนโดรกราโฟไลด์ในผลิตภัณฑ์ฟ้าทะลายโจร เนื่องจากสารละลายตัวพาในระบบโครมาโตกราฟีในการแยกสารสำคัญในวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ใช้สารละลายตัวพาผสมระหว่างเมทานอลและน้ำในอัตราส่วน 50:50 โดยทั้งนี้ได้ทดลองแล้วว่า การสกัดต่อด้วย 50% เมทานอลเป็นเวลา 15 นาที เป็นเวลาที่เหมาะสมให้ปริมาณตัวยาสำคัญในระดับที่สูงและไม่ได้แตกต่างจากการใช้

เวลาในการสกัด 20 นาที ขึ้นตอนในการสกัดน้อยกว่าระยะเวลาในการสกัดสั้นกว่า และปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ที่ได้จากวิธีการสกัดด้วยการแช่และเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความถี่สูงไม่แตกต่างจากวิธีฟลักซ์ที่ระบุในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย

การสกัดแบบร้อนและต่อเนื่องด้วยวิธีฟลักซ์กับการสกัดแบบแช่ในตัวทำละลายที่เหมาะสมและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความถี่สูงให้ปริมาณสารแอนโดรกราโฟไลด์ไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (Table 3) ดังนั้นจึงเลือกใช้การสกัดแบบแช่ในตัวทำละลายที่เหมาะสมและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความถี่สูง โดยช่วงแรกจะต้องใช้ตัวทำละลายเมทานอล จำนวน 10 ml เขย่าความถี่สูงเป็นเวลา 5 นาที ก่อน จึงจะสามารถละลายตัวอย่างออกมาได้หมด จากนั้นเติม 50% เมทานอลจำนวน 60 ml เขย่าความถี่สูงเป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้อุณหภูมิลดลงก่อนปรับปริมาตร ในการสกัดแอนโดรกราโฟไลด์ออกมาจากผลิตภัณฑ์ฟ้าทะลายโจรผู้วิเคราะห์ใช้วิธีดังกล่าวเนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก ไม่ใช้สารเคมีที่เป็นสารก่อมะเร็ง (ไดคลอโรมีเทน) ลดระยะเวลาและขั้นตอนในการสกัดสารสำคัญออกมาและสามารถใช้วิธีนี้กับทุกผลิตภัณฑ์ฟ้าทะลายโจร คือ ฟ้าทะลายโจรชนิดแคปซูล ฟ้าทะลายโจรสกัดชนิดแคปซูลและฟ้าทะลายโจรสกัดชนิดเม็ด ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยเดิมที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ด้วยเครื่องเขย่าความถี่สูงจากผลิตภัณฑ์ฟ้าทะลายโจรชนิดแคปซูลได้เพียงอย่างเดียว โดยวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ได้ผ่านการทดสอบความถูกต้องของวิธีตาม ICH guideline

Table 5 Compare reflux extraction method with ultrasonication method (capsules)

Sample	Content of andrographolide reflux extraction method (mg/unit)	Content of andrographolide ultrasonication method (mg/unit)
1	11.192	11.129
2	11.163	11.201
3	11.172	11.187
4	11.159	11.209
5	11.189	11.120
6	11.120	11.219
Mean	11.172	
%RSD	0.3	

Table 6 Compare reflux extraction method with ultrasonication method (extract capsules)

Sample	Content of andrographolide reflux extraction method (mg/unit)	Content of andrographolide ultrasonication method (mg/unit)
1	21.348	21.583
2	21.209	21.568
3	21.251	21.555
4	21.457	21.518
5	21.452	21.813
6	21.496	21.697
Mean	21.496	
%RSD	0.8	

Table 7 Compare reflux extraction method with ultrasonication method (extract tablets)

Sample	Content of andrographolide reflux extraction method (mg/unit)	Content of andrographolide ultrasonication method (mg/unit)
1	20.001	20.436
2	20.089	20.719
3	19.999	20.308
4	20.135	20.774
5	20.006	20.808
6	19.963	20.325
Mean	20.297	
%RSD	1.6	

ข้อสรุป

จากผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นผ่านทุกหัวข้อการทดสอบ ซึ่งวิธีดังกล่าวมีความจำเพาะเจาะจงสามารถแยกแอนโดรกราโฟไลด์ออกจากส่วนประกอบอื่นๆ ในสารละลายตัวอย่างได้ ค่าความเป็นเส้นตรงของสารมาตรฐานแอนโดรกราโฟไลด์อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.02-0.14 mg/ml มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มากกว่า 0.9999

ค่าทดสอบความเที่ยงของการวิเคราะห์ %RSD อยู่ใน ช่วง 0.2-1.1 การทดสอบความแม่นยำให้ค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วง 95-99 และจากการทดสอบความทนของวิธีมีค่า %RSD อยู่ในช่วง 0.1-1.1 จากผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้วิเคราะห์หาปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์และสามารถนำไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการวิเคราะห์ในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทยได้

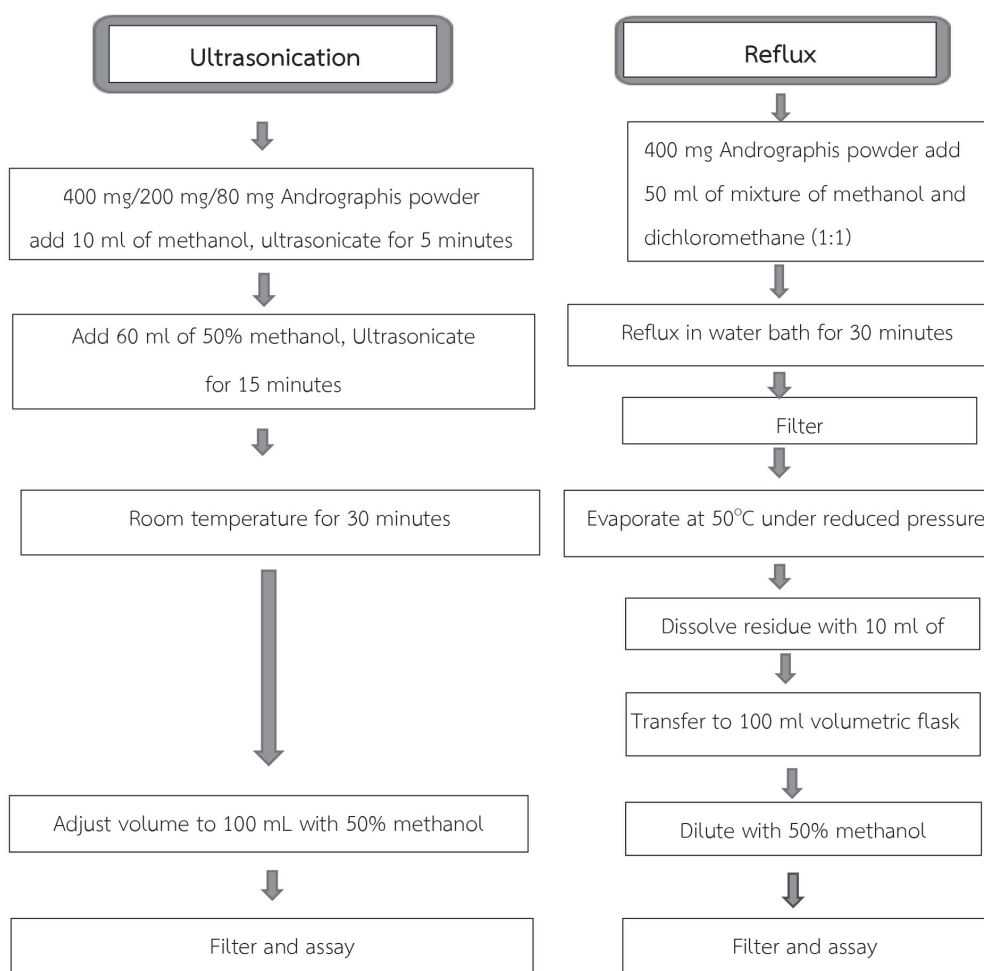


Figure 4 Flow chart for sample preparation procedures of ultrasonication and reflux extraction

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ญ. ฐิวัชรณารณ์ ขวัญกิจปณิธิและ
คุณฮามีตา เจ๊ะโซ๊ะ จากสำนักยาและวัตถุเสพติด กรม
วิทยาศาสตร์การแพทย์ สำหรับความช่วยเหลือและ
อำนวยความสะดวกในห้องปฏิบัติการในการทำวิจัย
ครั้งนี้

References

1. Aromdee C. No bitter of *Andrographis paniculata*. Khon Kaen: Khon Kaen University Press; 2015. p. 2, 18. (in Thai)
2. Jia-qi Hu, Thomas F. *Andrographis*. Flora of China [Internet]. 2011 [cited 2023 Jan 2]; 19:473-4. Available from: <http://flora.huh.harvard.edu/china/PDF/PDF19/Andrographis.pdf>
3. Thanachod T. Fa Thalai Chon [Internet]. Nakhon Pathom: Central laboratory and Greenhouse complex; 2014 [cited 2023 Jan 2]; Available from: http://eto.ku.ac.th/neweto/e-book/plant/herb_gar/ฟ้าทะลายโจร.pdf (in Thai)
4. Aekkhaluck I, Waru Nya A, Wipawadee Y, Panee S. A Comprehensive review of *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees and Its constituents as potential lead compounds for COVID-19 drug discovery. *Molecules*. 2022;27:4479.
5. Department of Medical Services [Internet]. Nonthaburi: Department of Medical Services Ministry of Public Health; c2021 [updated 2021 Aug 4; cited 2023 Jan 2] Available from: https://covid19.dms.go.th/backend///Content//Content_File/Covid_Health/Attach/25640804171629PM_CPG_COVID_v.17_n_20210804.pdf (in Thai)
6. Kulthanit W, Pornvimol L, Nitapha I, Wararath C, Pantitra S, Anutida T, Sayomporn S. Efficacy and safety of *Andrographis Paniculata* extract in patients with mild COVID-19: a randomized controlled trial. *Archives of Internal Medicine Research*. 2022;5(3):423-7.
7. Core Research Unit on Chemical Management. Clinical knowledge platform. [Internet]. 2003 [cited 2023 Jan 2]; [1 screen]. Available from: <http://www.chemtrack.org/Chem-Detail.asp?ID=00714&NAME=ไคคัลโลโรมีเทน> (in Thai)
8. Triporn W, Supanee D, Jiranuch J, Prapapun S. Alternative to the Thai herbal pharmacopoeia method for quality control of *Andrographis* capsules. *Journal of Thai Traditional & Alternative Medicine*. 2016;14(3):314-24.
9. Namfa S, Wichan K, Prapaporn B, Narubodee P, Ruedeekorn W. Liquid and solid self-microemulsifying drug delivery systems for a crude extract of *Andrographis paniculata*. *Eur J Pharm Sci*. 2013;50(3-4):459-66.
10. ICH Harmonised guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R2). International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. 2023:21-2.
11. Thai Pharmacopoeia Committee. Thai Herbal Pharmacopoeia Volume 1. Nonthaburi: Department of Medical Sciences; 2021. p. 140-1.
12. Pandey A, Tripathi S. Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. *J Pharmacogn and Phytochem*. 2014;2(5):115-9