

โครงการการพิสูจน์เอกลักษณ์สมุนไพร ที่มีใช้ในการเลี้ยงสัตว์ด้วยเทคนิค TLC/HPTLC
การพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ andrographolide ในฟ้าทะลายโจรด้วยเทคนิค TLC
และ HPTLC และ การพัฒนาวิธีการตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีที่เป็นลักษณะเฉพาะตัวในสมุนไพร
ฟ้าทะลายโจรด้วยเทคนิค TLC ร่วมกับ ion trap mass spectrometer

สุนันท์ กิตติจรรวัฒนา ชุศักดิ์ อาจสูงเนิน ศศิกานต์ วุฒิกานต์นนท์

บทคัดย่อ

ทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ andrographolide ในฟ้าทะลายโจร จากใบและลำต้นอบแห้ง และชนิดบรรจุในแคปซูล โดยดัดแปลงวิธีจาก Thai Herbal Pharmacopoeia (2016) โดยเปลี่ยนชนิด TLC plate ชนิด silica gel GF254 เป็น HPTLC plate ชนิด silica gel 60 F254 เปลี่ยน mobile phase จาก chloroform เป็น dichloromethane และไม่ใช้การ derivatization เนื่องจากเครื่องถ่ายภาพ (TLC visualizer) สามารถวัดค่า Rf ของสารสำคัญ andrographolide บนแผ่น TLC/HPTLC ได้ ผลการพัฒนาพบว่า ตำแหน่ง band ของ andrographolide ในตัวอย่าง มีค่า Rf เท่ากับ band ของสารมาตรฐาน andrographolide ($R_f = 0.45 \pm 0.01$)

ทำการพัฒนาวิธีการตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีที่เป็นลักษณะเฉพาะตัว (fingerprints) ในสมุนไพรฟ้าทะลายโจรชนิดบรรจุในแคปซูล ด้วยเทคนิค TLC ร่วมกับ ion trap mass spectrometer โดยวิธีที่พัฒนาขึ้นเอง ผลการพัฒนา พบว่า การสกัดผงยาจากภายในแคปซูลแล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย TLC ตามวิธีใน Thai Herbal Pharmacopoeia (2016) แล้วทำการชุบ silica บน TLC plate บริเวณ band ที่คาดว่าจะเป็ยสารสำคัญ ไปละลายด้วย 80% warm ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร vortex และ sonicate นาน 5 นาที นำไปฉีดเข้าเครื่อง mass spectrometer ชนิด ion trap พบว่า band ตำแหน่งที่ 4 จากการดู TLC plate ที่ 254 นาโนเมตร สามารถตรวจพบ mass spectrum ที่ 409.0 (acetic acid adduction) > 349.0, 331.0, 286.9 m/z ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ andrographolide

คำสำคัญ : ฟ้าทะลายโจร, andrographolide, วิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ, TLC / HPTLC

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์และวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์
กรมปศุสัตว์

Method Development for Andrographolide Assay in
Andrographis paniculata by TLC and HPTLC and
Method Development for Andrographolide Identification in
Andrographis paniculata by TLC and Ion trap Mass Spectrometer

Sunan Kittijaruwattana, Chusak Ardsoongnearn and Sasikan Wutthikannon

Abstract

Method development of andrographolide assay in *Andrographis paniculata* by TLC and HPTLC from dried leaves and stems and in capsules by adapting the method from Thai Herbal Pharmacopoeia (2016). By changing the TLC plate silica gel GF254 to HPTLC plate silica gel 60 F254, changing the mobile phase from chloroform to dichloromethane. The derivatization step was not required because the TLC visualizer can measure the R_f values of andrographolide in TLC/ HPTLC plate. The results show that the R_f value of andrographolide in the sample bands were equal to the R_f value of standard andrographolide bands (R_f = 0.45 ± 0.01).

Method for identifying chemical characteristics of andrographolide (fingerprints) in *Andrographis paniculata* in capsules by TLC and ion trap mass spectrometer by in-house method was developed. The method started from the extraction of *Andrographis paniculata* herb powder, analyzed using TLC according to the Thai Herbal Pharmacopoeia (2016) method. The silica on the TLC plate at the bands which expected to be andrographolide was scraped. Dissolved with 1 mL of warm 80% ethanol, vortex and sonicate for 5 minutes, then direct infused into ion trap mass spectrometer. The presence of mass spectrum at 409.0 (acetic acid adduction) > 349.0, 331.0 and 286.9 m/z which is the characteristic of andrographolide were measured from the 4th bands from the TLC plate which measured at 254 nm.

Keywords: *Andrographis paniculata*, andrographolide, assay, identification, TLC, HPTLC, ion trap mass spectrometer

Veterinary Drugs and Hazardous Substances Assay Division, Bureau of Quality Control of Livestock Products, Department of Livestock Development

บทนำ

ฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees) เป็นสมุนไพรที่ได้รับการบรรจุอยู่ในบัญชียาหลักแห่งชาติ ในส่วนของบัญชียาจากสมุนไพร ปรับปรุงล่าสุด เรื่องบัญชียาหลักแห่งชาติ (ฉบับที่ 2) พศ..2555 (กลุ่มยาบรรเทาอาการท้องเสีย และยารักษากลุ่มยาระบบทางเดินหายใจ ยาแคปซูล ยาเม็ด ยาลูกกลอน) ซึ่งมีสรรพคุณทางยาหลากหลายโดยมีฤทธิ์ในการบรรเทาอาการท้องเสีย ชนิดที่ไม่เกิดจากการติดเชื้อ บรรเทาอาการเจ็บคอ บรรเทาอาการของโรคหวัด (common cold) เช่น เจ็บคอ ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ โดยมีสารสำคัญในการออกฤทธิ์ คือ สารกลุ่ม Lactone คือ สารแอนโดรกราโฟไลด์ (andrographolide) นิโอแอนโดรกราโฟไลด์ (neo-andrographolide) ไดออกซีแอนโดรกราโฟไลด์ (14-deoxy-andrographolide) สารกลุ่มฟลาโวน เช่น aroxylin, wagonin, andrographidine A

ลักษณะทางกายภาพและเคมีของวัตถุดิบฟ้าทะลายโจรที่ดี คือ ปริมาณความชื้นไม่เกิน 11% w/w ปริมาณสิ่งแปลกปลอมไม่เกิน 2% w/w ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด ไม่เกิน 2.0% w/w ปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอล (85%) ไม่น้อยกว่า 13% w/w สารสกัดด้วยน้ำ ไม่น้อยกว่า 18% w/w ปริมาณแลคโตนรวมคำนวณเป็นแอนโดรกราโฟไลด์ไม่น้อยกว่าร้อยละ 6.0 และไม่ควรเก็บวัตถุดิบไว้นาน ๆ เพราะปริมาณสารสำคัญจะลดประมาณ 25 % เมื่อเก็บไว้ 1 ปี

ในมนุษย์ มีมาตรการส่งเสริมการใช้ยาสมุนไพรมาทดแทนยาแผนปัจจุบัน โดยแนะนำให้ใช้ยาเข้มข้น และยาฟ้าทะลายโจร เป็นลำดับแรก (First line drug) ที่แนะนำ

จากการศึกษาโดยใช้สารสกัดฟ้าทะลายโจรชนิดต่าง ๆ ในสัตว์ทดลองพบว่า

1. มีฤทธิ์ลดการเกร็งตัวของกล้ามเนื้อลำไส้และท่อนำสุจิ
2. การศึกษาในหลอดทดลองแสดงให้เห็นว่าฟ้าทะลายโจรมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคท้องเสีย อย่างไรก็ตามในบางการศึกษาให้ผลขัดแย้งกัน
3. การศึกษาในสัตว์ทดลองยังพบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ลดไข้อีกด้วย
4. มีการนำสมุนไพรฟ้าทะลายโจร ซึ่งมีสรรพคุณแก้เจ็บคอ ลดไข้ แก้ท้องเสีย ไปผสมร่วมกับสมุนไพรอื่นๆ เช่น ไพล ผสมอาหารให้ไก่กิน เพื่อป้องกันและรักษาโรกระบบทางเดินหายใจและทางเดินอาหาร

ประกอบกับสมุนไพรมีราคาถูก และหาได้ง่ายในท้องตลาด จึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการลดการใช้ยาแผนปัจจุบัน

มีวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ andrographolide ในสมุนไพรฟ้าทะลายโจรในรูปแบบ total lactone content ด้วยวิธีการไทเทรต และ andrographolide content ด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) ตามที่ระบุใน Thai Herbal Pharmacopoeia (2016) ซึ่งเป็นวิธีการที่ยุ่งยาก ซับซ้อน กลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์และวัตถุดิบตราয়ด้านการปศุสัตว์จึงได้พัฒนาวิธีการตรวจหาปริมาณสารสำคัญ andrographolide ในสมุนไพรฟ้าทะลายโจรด้วยวิธี thin layer chromatography (TLC)/ high performance thin layer chromatography (HPTLC) ซึ่งดัดแปลงมา

จากวิธีการตรวจเอกลักษณ์ของสารสำคัญ andrographolide ตามที่ระบุใน Thai Herbal Pharmacopoeia (2016)

นอกจากนี้ ยังได้ทำการพัฒนาวิธีการตรวจสอบเอกลักษณ์ของ andrographolide ในสมุนไพรฟ้าทะลายโจร ด้วยเทคนิค TLC ร่วมกับ ion trap mass spectrometer

1. วัตถุประสงค์

- 1.1 เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ andrographolide ในสมุนไพรฟ้าทะลายโจรด้วยเทคนิค TLC และ/ หรือ เทคนิค HPTLC
- 1.2 เพื่อตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีที่เป็นลักษณะเฉพาะตัว (fingerprints) ในสมุนไพรฟ้าทะลายโจร ด้วยเทคนิค TLC ร่วมกับ ion trap mass spectrometer

2. ขอบข่าย

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาสารสำคัญในสมุนไพรฟ้าทะลายโจร จากใบและลำต้นอบแห้ง และชนิดบรรจุในแคปซูล ด้วยเทคนิค TLC และ/ หรือ เทคนิค HPTLC ให้มีความเหมาะสม และพร้อมสำหรับนำไปทดสอบความใช้ได้ของวิธี

การตรวจสอบเอกลักษณ์ของสมุนไพรฟ้าทะลายโจรชนิดแคปซูล ด้วยเทคนิค TLC ร่วมกับ ion trap mass spectrometer

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถตรวจวิเคราะห์หาสารสำคัญ andrographolide และพิสูจน์เอกลักษณ์สมุนไพรฟ้าทะลายโจรได้ด้วยเครื่องมือวิเคราะห์ที่มีใช้ในห้องปฏิบัติการ

4. เครื่องมือและวัสดุวิทยาศาสตร์

- 4.1 เครื่องมือและอุปกรณ์
 - 4.1.1 เครื่องชั่งน้ำหนักไฟฟ้าทศนิยม 5 ตำแหน่งยี่ห้อ Mettler Toledo
 - 4.1.2 เครื่องทำน้ำบริสุทธิ์พร้อมอุปกรณ์ยี่ห้อ Thermo scientific
 - 4.1.3 ชุดวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารโดยหลักการ HPTLC พร้อมอุปกรณ์ยี่ห้อ CAMAG
 - 4.1.4 เครื่องถ่ายภาพพร้อมเก็บข้อมูลบนแผ่น TLC/ HPTLC ยี่ห้อ CAMAG
 - 4.1.5 ชุดเตรียมความเข้มข้นสารละลายพร้อมอุปกรณ์ยี่ห้อ Caliper Life sciences
 - 4.1.6 Mass spectrometer รุ่น HTC ยี่ห้อ BRUKER
 - 4.1.7 TLC developing chamber
 - 4.1.8 Vortex mixer
 - 4.1.9 เครื่อง Hot plate magnetic stirrer
 - 4.1.10 TLC SCRAPER KIT
 - 4.1.11 เครื่อง LC -MS ชนิด ion trap

4.2 วัสดุวิทยาศาสตร์

- 4.2.1 Methanol (CH₃OH), AR grade
- 4.2.2 Chloroform Reagent grade
- 4.2.3 Activated charcoal
- 4.2.4 Ethanol Absolute
- 4.2.5 Dichloromethane AR grade
- 4.2.6 Andrographolide
- 4.2.7 Beaker แก้วขนาด 50และ100 mL
- 4.2.8 Stainless beaker ขนาด1000 mL
- 4.2.9 Volumetric flask ขนาด 10 และ 100 mL class A
- 4.2.10 Volumetric pipette ขนาด 20 mL class A
- 4.2.11 Amber glass vial ขนาด 16 mL
- 4.2.12 Vial HPTLC สีใส พร้อมฝา ขนาด 2mL
- 4.2.13 Disposable syringe ขนาด 3 mL
- 4.2.14 Syringe membrane filter nylon 0.45µm. 13 mm
- 4.2.15 Cylinder ขนาด 25, 50 และ 100 mL
- 4.2.16 Centrifuge tube ขนาด 50 mL
- 4.2.17 Culture tube ขนาด 20 x 150 mm
- 4.2.18 กรวยกรอง
- 4.2.19 กระดาษซังสาร
- 4.2.20 กระดาษกรอง เบอร์ 4
- 4.2.21 TLC plate silica gel 60 F254
- 4.2.22 HPTLC plate silica gel 60 F254
- 4.2.23 โกร่งบดยา

5. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Thai Herbal Pharmacopoeia (2016) เป็นตำรายาที่มีการระบุวิธีการตรวจเอกลักษณ์ (Identification) สารสำคัญ andrographolide ในสมุนไพรฟ้าทะลาย หรือฟ้าทะลายโจร (FA-THA-LAI CHON) โดยใช้วิธี thin layer chromatography (TLC) และการหาปริมาณของสารสำคัญ andrographolide (andrographolide content) ในยาแคปซูลฟ้าทะลาย (FA-THA-LAI CAPSULES) ด้วยวิธี high-pressure liquid chromatography และหาปริมาณ total lactone content โดยวิธีการไทเทรต นอกจากนี้ ยังมีระบุในตำราของสหราชอาณาจักร (British Pharmacopoeia, 2018) ถึงวิธีการตรวจเอกลักษณ์ของสารกลุ่ม andrographis herb ด้วยเทคนิค thin layer chromatography (TLC) และการหาปริมาณ (content) สารสำคัญด้วยเทคนิค liquid chromatography

Wang และคณะ (2014) ได้ศึกษาการหาองค์ประกอบสารสำคัญจำนวน 6 ชนิดในสารสกัดฟ้าทะลายโจร และตรวจ metabolite ในสารสำคัญ andrographolide ในพลาสมาหนู โดยวิธี LCMS-MS

ศิวะรักษ์ และคณะ (2548) ได้ศึกษาผลการอบแห้งสารสกัดที่ได้จากการสกัดสารสำคัญจากฟ้าทะลายโจร และนำผลผลิตแห้งที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณ andrographolide ด้วยเทคนิค HPLC

Reich และ Schibli (2008) ได้ทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจสอบเอกลักษณ์ของสมุนไพร โดยกำหนดเกณฑ์การยอมรับของค่า precision ว่า Rf ต้องต่างกันไม่เกิน

- 0.01 ที่สารชนิดเดียวกันในเพลทเดียวกัน
- 0.02 ในการทำซ้ำต่างเพลท
- 0.05 ในการทำ intermediate precision (ต่างวัน)
- 0.07 ในการทำ reproducibility (ต่างห้องปฏิบัติการ)

6. วิธีดำเนินการ

6.1 การวิเคราะห์หาสารสำคัญ andrographolide ด้วยเทคนิค TLC โดยใช้สภาวะตาม Thai Herbal Pharmacopoeia (2016)

6.1.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน andrographolide

ชั่งสารมาตรฐาน andrographolide ปริมาณ 20 มิลลิกรัมลงใน volumetric flask ขนาด 10 mL ละลายและปรับปริมาตรด้วย ethanol ผสมให้เข้ากัน จะได้ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรตามวิธีมาตรฐาน Thai Herbal pharmacopoeia (2016)

6.1.2 การเตรียมตัวอย่างชนิดของตัวอย่าง มี 2 ชนิด ได้แก่

Sample A คือ ตัวอย่างสมุนไพรฟ้าทะลายโจรชนิดแคปซูล นำผงยาภายในแคปซูล (แคปซูล มี 1 ทะลายโจร 400 มิลลิกรัม) จำนวน 4 แคปซูลผสมรวมกันแล้วนำไปชั่งปริมาณ 1 กรัม

Sample B ตัวอย่างสมุนไพรฟ้าทะลายโจรส่วนใบและลำต้นอบแห้งบดละเอียดชั่งปริมาณ 1 กรัม

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสมุนไพรฟ้าทะลายโจรส่วนใบและลำต้นอบแห้งบดละเอียด (ศิวะรักษ์ และคณะ, 2548)

- นำตัวอย่างฟ้าทะลายโจรมาล้างทำความสะอาด ผึ่งแห้งที่อุณหภูมิห้อง ชั่วโมง 24
- ชั่งตัวอย่าง กรัม ใส่ในห่อกระดาษ 5 ขนาด 5x 5 cm.
- นำไปอบแห้งที่ อุณหภูมิ 40 - 50°C ประมาณ ชั่วโมง 18
- นำมาลดขนาดด้วยการบด
- เก็บในถุงพลาสติกแห้งในห้องปรับอากาศ นำมาใช้ในระยะเวลาไม่เกินกว่า สัปดาห์ 1

นำตัวอย่าง (Sample A และ Sample B) แยกใส่ลงใน centrifuge tube แก้วขนาด 50 มิลลิลิตรละลายด้วย ethanol ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำไปต้ม 5 นาที เติม activated charcoal ปริมาณ 300 มิลลิกรัมนำไปผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง vortex mixer และกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์

4 นำส่วนใสที่กรองได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่อง TurboVap จนแห้ง ละลายด้วย 80 % ethanol ที่อุณหภูมิ 1 มิลลิลิตร นำไปทดสอบหาปริมาณ andrographolide ด้วยเทคนิค TLC ตามข้อ 6.4

6.1.3 สภาวะในการวิเคราะห์หาสารสำคัญ andrographolide ด้วยเทคนิค TLC โดยใช้สภาวะตาม Thai Herbal Pharmacopoeia (2016) ดังนี้

สภาวะที่ใช้ในการทดสอบ

TLC	silica gel 60 F254 ขนาด 20 x 10 cm.
Mobile phase	Chloroform: absolute ethanol (85:15, v/v)
Injection volume	2 และ 5 ไมโครลิตร
Detector	254, 366 nm และแสงขาว

6.2 การวิเคราะห์หาสารสำคัญ andrographolide ด้วยเทคนิค TLC/ HPTLC โดยดัดแปลงจาก Thai Herbal Pharmacopoeia (2016)

6.2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน andrographolide ตามข้อ 6.1.1

6.2.2 การเตรียมตัวอย่างตามข้อ 6.1.2 โดยชนิดของตัวอย่าง มี 2 ชนิด ได้แก่

Sample A คือ ตัวอย่างสมุนไพรฟ้าทะลายโจรชนิดแคปซูล นำผงยาภายในแคปซูลจำนวน 2 แคปซูลผสมรวมกันแล้วนำไปชั่งปริมาณ 150 มิลลิกรัม

Sample B ตัวอย่างสมุนไพรฟ้าทะลายโจรส่วนใบและลำต้นอบแห้งบดละเอียดชั่งปริมาณ 150 มิลลิกรัม

6.2.3 สภาวะในการวิเคราะห์หาสารสำคัญ andrographolide ด้วยเทคนิค HPTLC โดยดัดแปลงจาก Thai Herbal pharmacopoeia (2016) ดังนี้

- เปลี่ยนชนิด TLC plate ชนิด silica gel GF254 เป็น HPTLC plate ชนิด silica gel 60F254 และ TLC plate silica gel 60 F254
- เปลี่ยน mobile phase จาก chloroform เป็น dichloromethane
- ไม่ใช้การ derivatization เนื่องจากเครื่องถ่ายภาพพร้อมเก็บข้อมูลบนแผ่น TLC/ HPTLC สามารถวัดค่า Rf ของสารสำคัญ andrographolide ใน band ของสารมาตรฐาน และตัวอย่างได้

สภาวะที่ใช้ในการทดสอบ

TLC plate	silica gel 60 F254 ขนาด 20 x 10 cm.
HPTLC plate	silica gel 60 F254 ขนาด 10 x 10 cm.
Injection volume	2 µL
Detector	254 nm

6.3 ตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีที่เป็นลักษณะเฉพาะตัว (fingerprints) ในสมุนไพรฟ้าทะลายโจร ด้วยเทคนิค TLC/ HPTLC ร่วมกับ ion trap mass spectrometer

6.3.1 การเตรียมตัวอย่างตามข้อ 6.1.2 แต่ใช้ตัวอย่างเพียง 1 ชนิด ได้แก่ ตัวอย่างสมุนไพรฟ้าทะลายโจรชนิดแคปซูล โดยนำผงยาจากภายในแคปซูลจำนวน 8 แคปซูล ผสมรวมกัน แล้วนำไปชั่งปริมาณ 2 กรัม

6.3.2 สภาวะในการตรวจเอกลักษณ์ด้วยเทคนิค TLC และ HPTLC โดยใช้สภาวะตาม Thai Herbal Pharmacopoeia (2016) ตามข้อ 6.1.3

6.3.3 การยืนยันชนิดสารสำคัญ andrographolide โดยวิธีที่พัฒนาขึ้นเอง ดังนี้

- ทำการชุบ silica ที่ TLC plate และ HPTLC plate บริเวณ band ที่คาดว่าจะเป็
นสารสำคัญ

- นำไปละลายด้วย 80% warm ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร vortex และ
sonicate นาน 5 นาที

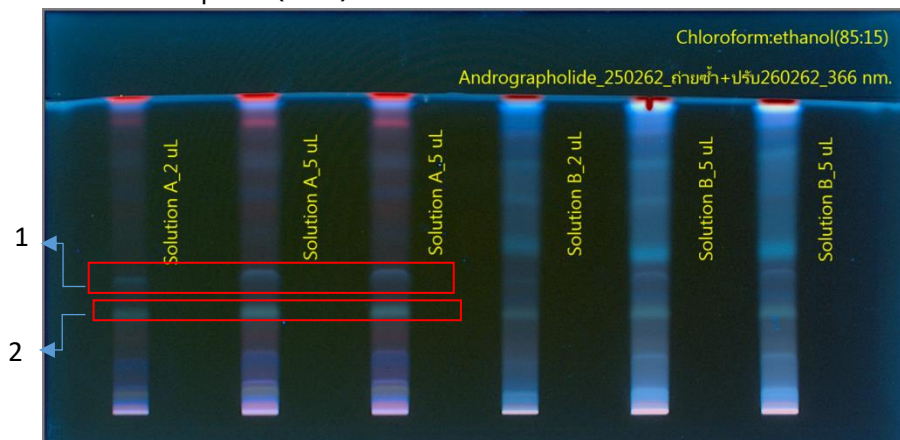
- นำไปฉีดเข้าเครื่อง mass spectrometer ชนิด ion trap ดูพิกที่ 409.0, 349.2,
331.0 และ 287.0 m/z (Wang et al., 2014)

ตารางที่ 1 สภาวะที่ใช้ในการทดสอบด้วยเครื่อง mass spectrometer

Tune Source		Trap	
Trap Drive	41.2	Rolling	on
Octopole RF Amplitude	120.8 Vpp	Rolling, Averages	5 cts
Lens 2	77.5 Volt	Scan Begin	50 m/z
Capillary Exit	-91.7 Volt	Scan End	500 m/z
Dry Temp (Set)	300 °C	Averages	8 Spectra
Nabulizer (Set)	30.00 psi	Max. Accu. Time	200000 µs
Dry Gas (Set)	6.00 l/min	(Smart ICC Target	50000
HV Capillary	4050 V	ICC	on
HV End Plate Offset	-500 V		

7 ผลการทดลอง

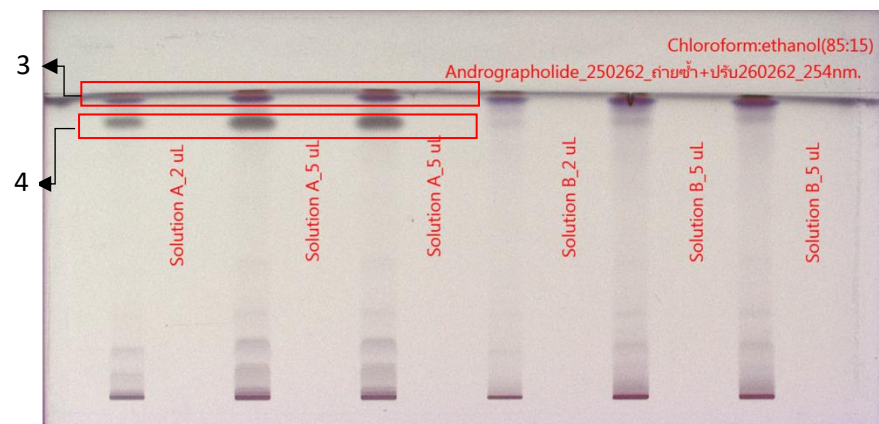
7.1 ผลการวิเคราะห์หาสารสำคัญ andrographolide ด้วยเทคนิค TLC โดยใช้สภาวะตาม Thai Herbal Pharmacopoeia (2016)



รูปที่ 1 TLC plate เมื่อดูที่ 366 นาโนเมตร

Solution A ตัวอย่างฟ้าทะลายโจรจากแคปซูล

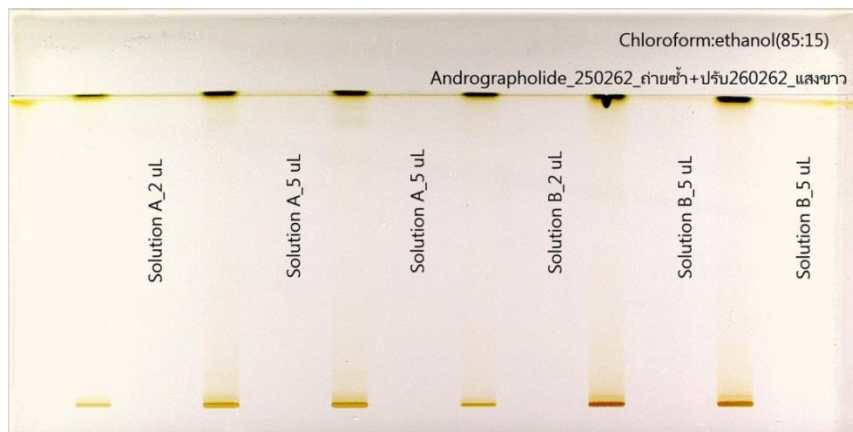
Solution B ตัวอย่างจากใบและลำต้นอบแห้ง



รูปที่ 2 TLC plate เมื่อดูที่ 254 นาโนเมตร

Solution A ตัวอย่างฟ้าทะลายโจรจากแคปซูล

Solution B ตัวอย่างจากใบและลำต้นอบแห้ง



รูปที่ 3 TLC plate เมื่อดูที่แสงขาว

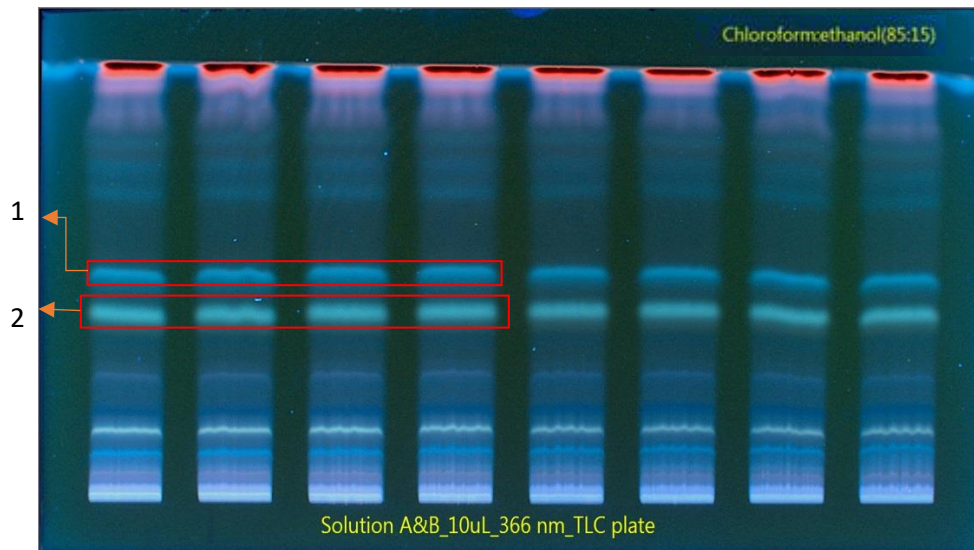
Solution A ตัวอย่างฟ้าทะลายโจรจากแคปซูล

Solution B ตัวอย่างจากใบและลำต้นอบแห้ง

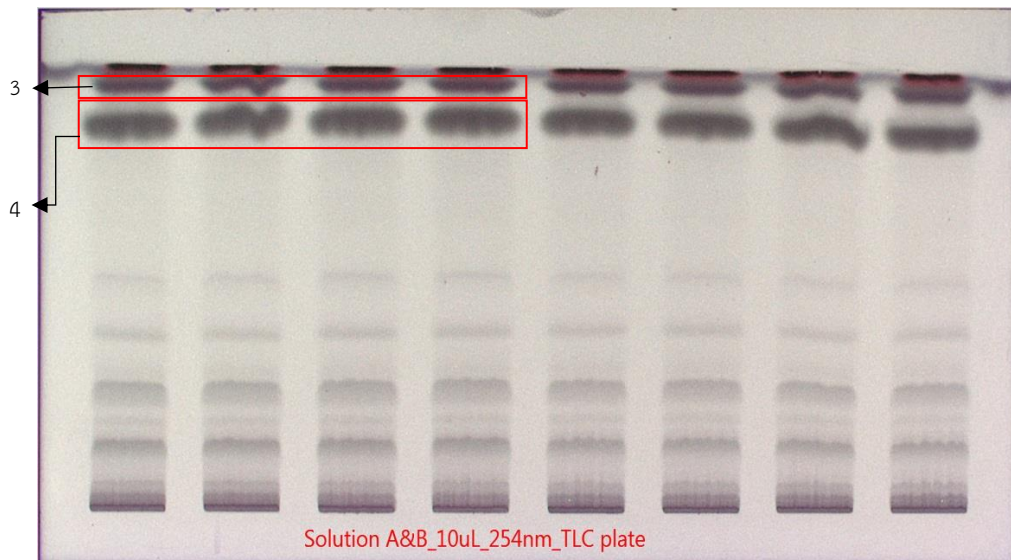
แต่เนื่องจากยังไม่ได้รับสารมาตรฐาน ทำให้ไม่สามารถยืนยันได้ว่า band ที่สงสัยในตำแหน่งที่ 1– 4 band ใดเป็นสารสำคัญ andrographolide จึงทำการพัฒนาการตรวจเอกลักษณ์สมุนไพรฟ้าทะลายโจรด้วยเทคนิค TLC ร่วมกับ ion trap mass spectrometer

7.2 ผลการตรวจเอกลักษณ์สมุนไพรฟ้าทะลายโจร ด้วยเทคนิค TLC ร่วมกับ ion trap mass spectrometer

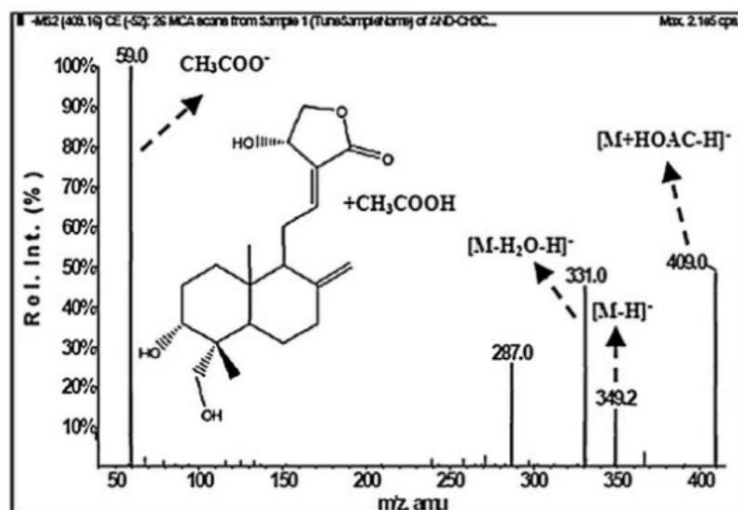
ทำการพัฒนาวิธีการตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีที่เป็นลักษณะเฉพาะตัว (fingerprints) ในสมุนไพรฟ้าทะลายโจรชนิดบรรจุในแคปซูล ด้วยเทคนิค TLC/ HPTLC ร่วมกับ ion trap mass spectrometer โดยวิธีที่พัฒนาขึ้นเอง ผลการพัฒนา พบว่า การจุด plate ชนิด TLC ทำได้ง่ายกว่าเนื่องจากการแยกได้ชัดเจนกว่าชนิด HPTLC จึงได้เลือกพัฒนาต่อไปด้วยเทคนิค TLC ร่วมกับ ion trap mass spectrometer



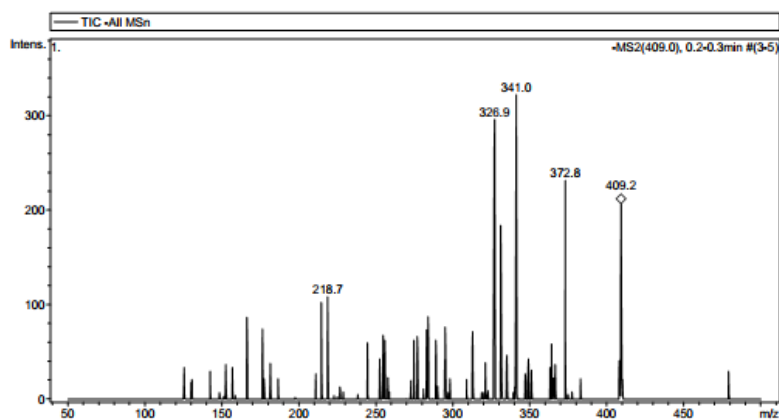
รูปที่ 4 TLC plate เมื่อดูที่ 366 นาโนเมตร band คาดว่าเป็นสารสำคัญ คือ ตำแหน่งที่ 1 และ 2
 Solution A ตัวอย่างฟ้าทะลายโจรจากแคปซูล
 Solution B ตัวอย่างจากใบและลำต้นอบแห้ง



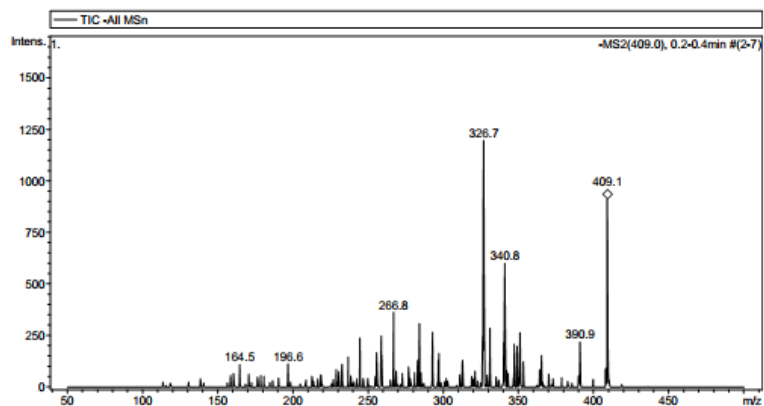
รูปที่ 5 TLC plate เมื่อดูที่ 254 นาโนเมตร band คาดว่าเป็นสารสำคัญ คือ ตำแหน่งที่ 3 และ 4
 Solution A ตัวอย่างฟ้าทะลายโจรจากแคปซูล
 Solution B ตัวอย่างจากใบและลำต้นอบแห้ง



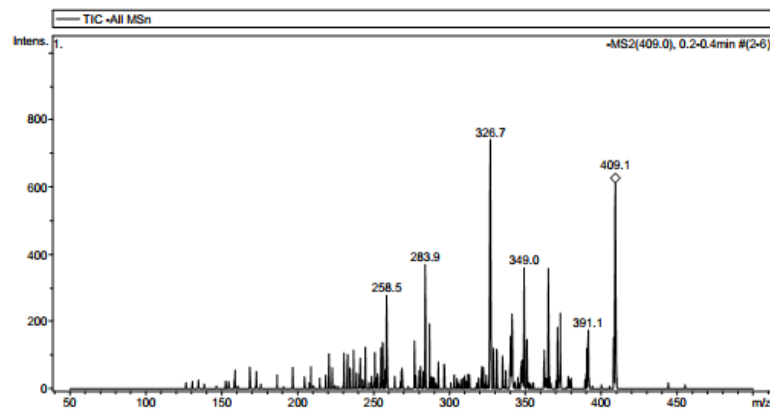
รูปที่ 6 Product ion scan and proposed fragmentation pattern of andrographolide (Wang et al.,2014)



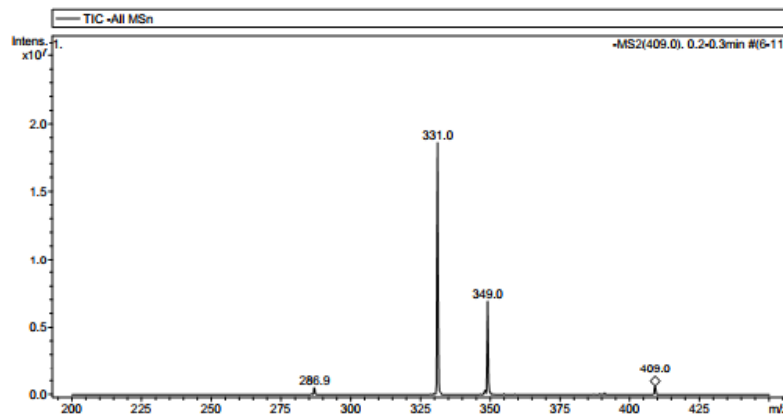
รูปที่ 7 ผลการตรวจวัดด้วยเครื่อง mass spectrometer ของ band ตำแหน่งที่ 1



รูปที่ 8 ผลการตรวจวัดด้วยเครื่อง mass spectrometer ของ band ตำแหน่งที่ 2



รูปที่ 9 ผลการตรวจวัดด้วยเครื่อง Mass Spectrometer ใน band ตำแหน่งที่ 3

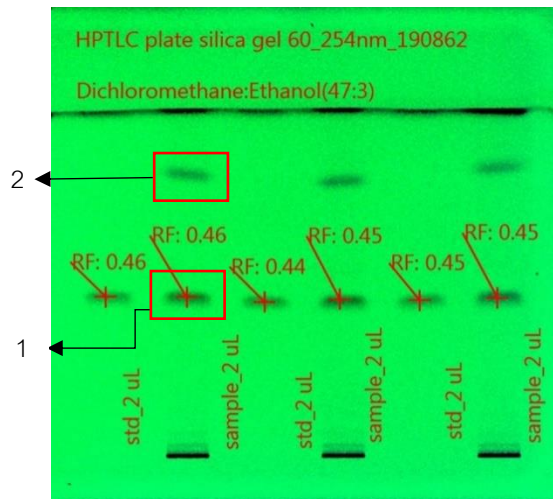


รูปที่ 10 ผลการตรวจวัดด้วยเครื่อง mass spectrometer ของ band ตำแหน่งที่ 4 พบ mass spectrum ที่ 409.0 (acetic acid adduction) > 349.0, 331.0, 286.9 m/z

จากรูปที่ 7 - 9 พบว่า band ตำแหน่งที่ 1 - 3 เมื่อนำไปตรวจวัดด้วยเครื่อง mass spectrometer ไม่พบ mass spectrum ของ andrographolide ที่ 409.0, 287.0, 331.0 และ 349.2 m/z (Wang et. al., 2014) แต่พบใน band ตำแหน่งที่ 4 ดังรูปที่ 10

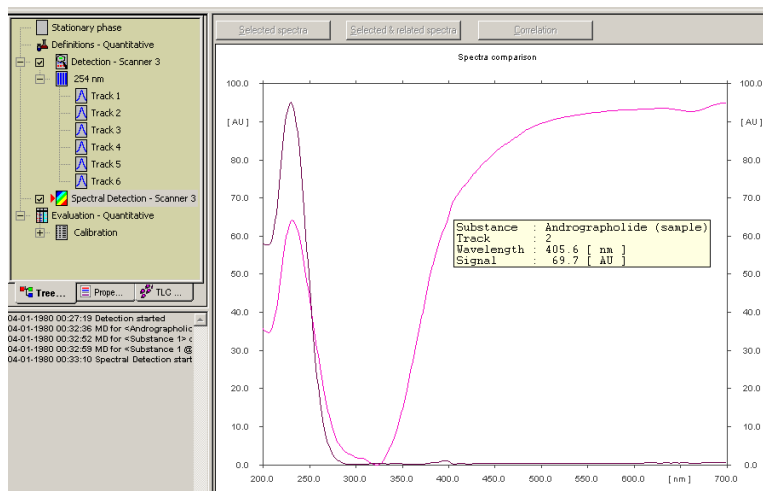
7.3 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ andrographolide ด้วยเทคนิค TLC/ HPTLC โดยดัดแปลงจาก Thai Herbal Pharmacopoeia (2016)

เมื่อทราบว่า ตำแหน่งที่ 4 คือ andrographolide จึงได้ทำการปรับสภาวะ เพื่อแยก band ของสารตำแหน่งที่ 3 และ 4 ให้ชัดเจนขึ้น โดยเตรียมสารมาตรฐานตามข้อ 6.2.1 และเตรียมตัวอย่างตามข้อ 6.2.2 เปลี่ยน mobile phase เพื่อลดความเป็นพิษของสาร ตามข้อ 6.2.3



รูปที่ 11 HPTLC plate silica gel 60 F₂₅₄ ขนาด 10 x 10 เซนติเมตร ที่ 254 นาโนเมตร
ตำแหน่งที่ 1 เป็นตำแหน่ง band ของ andrographolide ในตัวอย่างฟ้าทะลายโจรจากแคปซูล
ตำแหน่งที่ 2 เป็นตำแหน่ง band ของอนุพันธ์อื่นในตัวอย่าง

จากรูปที่ 11 พบ band ที่มีการแยกของสารสำคัญ andrographolide ตำแหน่งที่ 1 กับสาร
อนุพันธ์อื่นในตำแหน่งที่ 2 ของตัวอย่างหลังจากมีการปรับอัตราส่วนของ mobile phase ตามข้อ 6.2.3
และพบว่าค่า Rf ของสารมาตรฐาน และ Sample A มีค่า Rf ต่างกันไม่เกิน 0.01 (0.45 ± 0.01)



รูปที่ 12 Spectrum ของสารมาตรฐาน และ Sample A โดย
เส้นสีแดงเข้มเป็น spectrum ของสารมาตรฐาน
เส้นสีชมพูเป็น spectrum ของ Sample A (ตัวอย่างฟ้าทะลายโจรจากแคปซูล)

จากรูปที่ 12 พบว่า spectrum ของสารมาตรฐาน และตัวอย่างเหมือนกัน แต่ช่วงท้ายของ
spectrum ของตัวอย่างมีความแตกต่าง อาจเป็นเพราะตัวอย่างยังมีส่วนของอนุพันธ์อื่นรวมอยู่

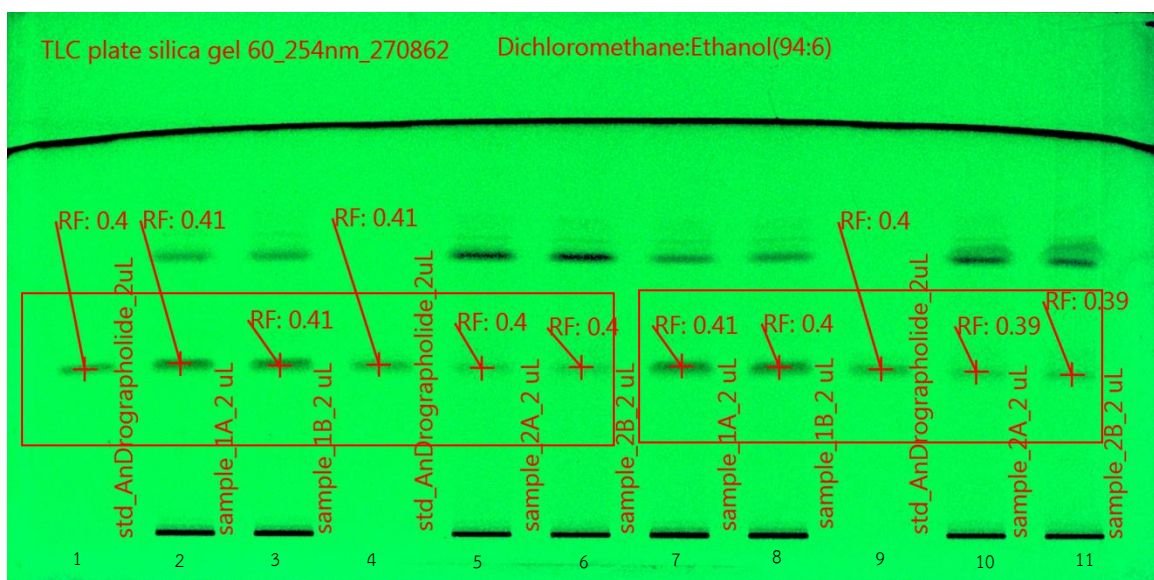
Global peak table												Export to file	
	Track	Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance	
1	1	1	0.40	1.6	0.46	198.3	100.00	0.51	2.4	4944.3	100.00	Andrographolide	
2	2	1	0.40	0.4	0.46	249.0	55.79	0.51	1.4	6329.8	55.78	Andrographolide	
3	2	2	0.77	2.4	0.81	197.4	44.21	0.86	8.0	5017.4	44.22	Substance 1	
4	3	1	0.40	3.7	0.45	205.8	100.00	0.49	2.1	4910.3	100.00	Andrographolide	
5	4	1	0.39	0.0	0.45	254.4	53.87	0.49	3.7	6384.2	54.56	Andrographolide	
6	4	2	0.74	0.5	0.78	217.9	46.13	0.83	8.1	5316.8	45.44	Substance 1	
7	5	1	0.39	2.4	0.45	194.4	100.00	0.50	2.5	4855.3	100.00	Andrographolide	
8	6	1	0.40	3.1	0.46	242.0	56.75	0.52	1.3	6469.3	56.22	Andrographolide	
9	6	2m	0.77	0.2	0.82	184.4	43.25	0.88	8.5	5038.0	43.78	Substance 1	

รูปที่ 13 Area ของสารมาตรฐาน และ Sample A

ตำแหน่งที่ 1 เป็น area ของสารมาตรฐาน

ตำแหน่งที่ 2 เป็น area ของ Sample A (ตัวอย่างฟ้าทะลายโจรจากแคปซูล)

จากรูปที่ 13 พบว่า area ของ Sample A มีค่ามากกว่า Area ของสารมาตรฐาน อาจเป็นเพราะมีอนุพันธ์อื่นรวมอยู่ด้วย หรือมีปริมาณของสารสำคัญ andrographolide มากกว่าสารมาตรฐาน



รูปที่ 14 TLC plate silica gel 60 F₂₅₄ ขนาด 20 x 10 เซนติเมตร ที่ 254 นาโนเมตร

Track ที่ 1, 4 และ 9 คือสารมาตรฐาน andrographolide

Track ที่ 2-3 และ 7-8 คือ ตัวอย่างฟ้าทะลายโจรจากแคปซูล

Track ที่ 5-6 และ 10-11 คือ ตัวอย่างจากใบและลำต้นอบแห้ง

การคำนวณ หาค่า Rf

$$Rf = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

	Track	Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	1	1	0.36	1.3	0.41	221.5	100.00	0.46	0.1	4618.3	100.00	Andrographolide
2	2	1	0.36	0.3	0.42	285.8	100.00	0.46	7.3	6386.9	100.00	Andrographolide
3	3	1m	0.38	1.4	0.42	275.8	100.00	0.46	8.5	6347.9	100.00	Andrographolide
4	4	1	0.37	1.6	0.42	189.2	100.00	0.47	3.9	4774.9	100.00	Andrographolide
5	5	1	0.35	0.7	0.41	111.1	100.00	0.48	17.2	3674.2	100.00	Andrographolide
6	6	1	0.36	0.0	0.41	110.9	100.00	0.51	2.9	3723.4	100.00	Andrographolide
7	7	1	0.36	0.1	0.42	265.2	100.00	0.46	6.3	6417.1	100.00	Andrographolide
8	8	1	0.37	1.1	0.42	265.7	100.00	0.47	4.3	6494.4	100.00	Andrographolide
9	9	1	0.37	2.8	0.41	191.1	100.00	0.47	2.0	4951.7	100.00	Andrographolide
10	10	1m	0.35	1.8	0.41	116.5	100.00	0.52	2.4	4189.7	100.00	Andrographolide
11	11	1m	0.35	1.3	0.40	126.4	100.00	0.50	1.8	4377.1	100.00	Andrographolide

รูปที่ 15 Area ของสารสำคัญ andrographolide

หมายเลข 1 Area ของสารมาตรฐาน andrographolide

หมายเลข 2 Area ของสารสำคัญ andrographolide ใน sample A (ตัวอย่างฟ้าทะลายโจรจากแคปซูล)

หมายเลข 3 Area ของสารสำคัญ andrographolide ใน sample B (ตัวอย่างจากใบและลำต้นอบแห้ง)

จากการคำนวณหาปริมาณ andrographolide ในการวิเคราะห์ด้วย HPTLC พบปริมาณสารสำคัญ andrographolide ใน Sample A และ Sample B ดังนี้

การคำนวณหาปริมาณสารสำคัญในตัวอย่าง

$$= \frac{\text{น้ำหนักสารมาตรฐาน}}{\text{ปริมาตรตัวทำละลาย}} \times \text{Purity ของสารมาตรฐาน} \times \frac{\text{ปริมาตรตัวทำละลาย}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \times \frac{\text{พื้นที่ที่วัดตัวอย่าง}}{\text{พื้นที่ที่วัดสารมาตรฐาน}}$$

เมื่อนำ TLC plate silica gel 60 F₂₅₄ มาวิเคราะห์โดยใช้สภาวะตามข้อ 6.2.3 พบว่า สามารถแยกสารสำคัญ andrographolide ได้เช่นเดียวกับการใช้ HPTLC plate silica gel 60 F₂₅₄

ตารางที่ 2 ปริมาณ andrographolide จากการวิเคราะห์ด้วย HPTLC

Sample	% (w/w)
Sample A 1	1.786
Sample A 2	1.769
Sample B 1	1.028
Sample B 2	1.040

Sample A1, A2 คือ ตัวอย่างฟ้าทะลายโจรจากแคปซูล

Solution B1, B2 ตัวอย่างจากใบและลำต้นอบแห้ง

8 สรุปผลการทดลอง

ทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ andrographolide ในฟ้าทะลายโจร จากใบและลำต้นอบแห้ง และชนิดบรรจุในแคปซูล โดยดัดแปลงวิธีจาก Thai Herbal Pharmacopoeia (2016) โดยเปลี่ยนชนิด TLC plate ชนิด silica gel 60 GF254 เป็น HPTLC plate ชนิด silica gel 60 F254 เปลี่ยน mobile phase จาก chloroform เป็น dichloromethane และไม่ใช้การ derivatization เนื่องจากเครื่องถ่ายภาพ (TLC visualizer) สามารถวัดค่า Rf ของสารสำคัญ andrographolide บนแผ่น TLC/HPTLC ได้ ผลการพัฒนาพบว่า ตำแหน่ง band ของ andrographolide ในตัวอย่างมีค่า Rf เท่ากับ band ของสารมาตรฐาน andrographolide ($R_f = 0.45 \pm 0.01$) สามารถแยกสารสำคัญ andrographolide ออกจากอนุพันธ์ในกลุ่มของสาร andrographis ได้

ตามมาตรฐาน Thai Herbal Pharmacopoeia (2016) ระบุว่า การวิเคราะห์ด้วย HPLC จะต้อง มี andrographolide ไม่น้อยกว่า 1.เปอร์เซ็นต์ และจากการคำนวณหาในการ วิเคราะห์ด้วย HPTLC พบปริมาณสารสำคัญ andrographolide ใน Sample A และ Sample B ไม่น้อยกว่า 1.เปอร์เซ็นต์ 0% และพบว่า Sample A และ Sample B ที่มีน้ำหนักเท่ากัน แต่มีปริมาณสารสำคัญไม่เท่ากัน อาจด้วยปัจจัยจากการเตรียมผลิตภัณฑ์ การเก็บรักษา หีบห่อบรรจุ โดยในผลิตภัณฑ์ฟ้าทะลายโจรในแคปซูลมีบรรจุภัณฑ์ที่มีฝาปิดและสามารถป้องกันความชื้นได้ระดับหนึ่ง จะมีปริมาณสารสำคัญมากกว่าตัวอย่างที่เป็นใบและลำต้นอบแห้งที่ไม่มีภาชนะบรรจุ จึงอาจทำให้เกิดการสูญเสียสารสำคัญได้

ทำการพัฒนาวิธีการตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีที่เป็นลักษณะเฉพาะตัว (fingerprints) ในสมุนไพรฟ้าทะลายโจรชนิดบรรจุในแคปซูล ด้วยเทคนิค TLC/ HPTLC ร่วมกับ ion trap mass spectrometer โดยวิธีที่พัฒนาขึ้นเอง ผลการพัฒนา พบว่า

1. การชุบ plate ชนิด TLC ทำได้ง่ายกว่า เนื่องจากมีการแยกได้ชัดเจนกว่าชนิด HPTLC จึงได้เลือกพัฒนาต่อไปด้วยเทคนิค TLC ร่วมกับ ion trap mass spectrometer

2. การสกัดผงยาจากภายในแคปซูล แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย TLC ตามวิธีใน Thai Herbal Pharmacopoeia (2016) แล้วทำการชุบ silica บน TLC plate บริเวณ band ที่คาดว่าจะเป็สารสำคัญไปละลายด้วย 80% warm ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร vortex และ sonicate นาน 5 นาที นำไปฉีดเข้าเครื่อง mass spectrometer ชนิด ion trap พบว่า band ตำแหน่งที่ 4 จากการดู TLC plate ที่ 254 นาโนเมตร สามารถตรวจพบ mass spectrum ที่ 409.0, 349.0, 331.0, 286.9 m/z ซึ่งใกล้เคียงกับ mass spectrum ที่ Wang และคณะ (2014) (ระบุ (409.0, 349.2, 331.0 287.0 m/z) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ andrographolide จึงสามารถใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ในการตรวจสอบเอกลักษณ์ในสมุนไพรฟ้าทะลายโจรได้ ทดแทนการซื้อสารมาตรฐาน andrographolide ที่มีราคาแพง

9 ข้อเสนอแนะ

-

10 กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ที่พิจารณาให้ดำเนินการในปีงบประมาณ 2562 เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ กลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์ฯ ที่ช่วยเหลือในการปฏิบัติงานให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

11 เอกสารอ้างอิง

Thai Herbal pharmacopoeia (2016) ฟ้าทะลาย (FA-THA-LAI). 103-111

Thai Herbal pharmacopoeia (2016) ยาแคปซูลฟ้าทะลาย (FA-THA-LAI CAPSULES). 112-113

British Pharmacopoeia 2018 Volume IV Andrographis Herb IV-62 – IV-64

J AOAC Int. Author manuscript; available in PMC 2009 March 30.

Wang, J., W. Yang, G. Wang, P. Tang and Y. Sai. (2014) Determination of six components of *Andrographis paniculate* extract and one major metabolite of andrographolide in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography B, 951-952, 78-88

คณะกรรมการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (2510) “ฟ้าทะลายโจรกับไข้หวัด” สืบค้นเมื่อ 21 กันยายน 2562 จาก <http://www.ttmed.psu.ac.th/blog.php?p=11>

สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดลำปาง (2560) “การใช้ยาสมุนไพรทดแทนยาแผนปัจจุบัน” สืบค้นเมื่อ 21 กันยายน 2562 จาก [www.lpho.go.th > plugins > download-attachments > includes > download](http://www.lpho.go.th/plugins/download-attachments/includes/download)

ศิริรักษ์ สีดานนท์ ผึ้งผาย พรรณวดี เชาวน์ อินทรประสิทธิ์ สุรพจน์ วงศ์ใหญ่ วิศวกรรมสาร มก. ฉบับที่ 57 ปีที่ 19 ธันวาคม 2548 – มีนาคม 2549 การอบแห้งสารสกัดจากสมุนไพรฟ้าทะลายโจร 24-31

ภาคผนวก

ตารางที่ 3 สรุปวิธีการเตรียมตัวอย่าง

ขั้นตอน	6.1.1 Sample A (ยาแคปซูล)	6.1.2 Sample B (ใบและลำต้นอบแห้ง)	6.3 Sample A (ยาแคปซูล)	6.2.1 Sample A (ยาแคปซูล)	6.2.2 Sample B (ใบและลำต้นอบแห้ง)
เอกสารอ้างอิง	Thai Herbal Pharmacopoeia (2016)		วิธีที่พัฒนาขึ้น (in-house method)	ดัดแปลงจาก Thai Herbal Pharmacopoeia (2016)	
น้ำหนักตัวอย่าง	1 กรัม		2 กรัม	150 มิลลิกรัม	
การเตรียมตัวอย่าง	- นำตัวอย่าง สมุนไพรฟ้าทะลาย โจรแคปซูล มา 4 แคปซูลนำผงยามา ผสมรวมกันแล้ว นำไปชั่ง 1 กรัม	- ชั่งตัวอย่างสมุนไพร ฟ้าทะลายโจรส่วน ใบและลำต้น อบแห้งบดละเอียด 1 กรัม	- นำตัวอย่างสมุนไพรฟ้า ทะลายโจรแคปซูล มา 8 แคปซูลนำผงยามา ผสมรวมกันแล้วนำไป ชั่ง 2 กรัม	- นำตัวอย่างสมุนไพร ฟ้าทะลายโจรแคปซูล มา 4 แคปซูลนำผงยา มาผสมรวมกันแล้ว นำไปชั่ง 150 มิลลิกรัม	- ชั่งตัวอย่างสมุนไพรฟ้า ทะลายโจรส่วนใบและลำ ต้นอบแห้งบดละเอียด 150 มิลลิกรัม
การสกัดและการ กรอง	ใส่ตัวอย่างใน Centrifuge Tube แก้วขนาด 50 มิลลิลิตร - ละลายด้วย 20 mL ethanol นำไปต้ม 5 นาที - เติม Activated charcoal ปริมาณ 300 มิลลิกรัม นำไปผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง Vortex mixer - กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4				
การระเหยแห้ง	ด้วยก๊าซไนโตรเจน โดยเครื่อง TurboVap ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส				
การเจือจางตัวอย่าง	- 1 mL of warm ethanol (80%), vortex และ sonicate 5 นาที				
TLC/HPTLC plat	TLC plate Silica gel 60 F ₂₅₄	TLC plate Silica gel 60 F ₂₅₄	TLC plate Silica gel 60 F ₂₅₄	TLC/HPTLC plate Silica gel 60 F ₂₅₄	
Mobile phase	Chloroform: absolute ethanol (85:15, v/v)			Dichloromethane: absolute ethanol (94:6, v/v)	
Injection volume	2 และ 5 ไมโครลิตร		10 ไมโครลิตร	2 ไมโครลิตร	
TLC/HPTLC Visualizer Detector	254 นาโนเมตร 366 นาโนเมตรและแสงขาว		254 นาโนเมตร และ 366 นาโนเมตร	254 นาโนเมตร	
การเตรียมตัวอย่าง ก่อนนำไปยืนยันชนิด สารสำคัญ andrographolide	-		- ชูด plate บริเวณ band ที่สงสัย - ละลายด้วย 1 mL of warm 80% ethanol - Vortex และ Sonicate 5 นาที	-	
Mass spectrometer ชนิด ion trap			409.0, 287.0, 331.0 และ 349.2 m/z		