

ภาคผนวก ข

ข้อมูลวิธีการหาปริมาณสารสำคัญ (แอนโดรกราโฟไลด์)

การหาปริมาณแอนโดรแกรโฟไลด์ ด้วย HPLC ตามวิธีการที่ได้ผ่านการตรวจสอบความเที่ยงตรงแล้ว (พรรณทิพา และณัฐพล, 2544)

ตารางผนวกที่ ข1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการหาปริมาณแอนโดรแกรโฟไลด์

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย	บริษัท,เมือง,ประเทศ
1. High Performance Liquid Chromatographic System, Spectra System Isocratic Pump, P-1000 uv/vis Detectors	Thermo Separation Co., Ltd., CA, USA
2. Column Inertsil ODS-3 (5cm,4.6 mm ID.x15 cm)	GL Sciences Inc., Japan
3. Electronic Analytical Balance "Mettler" AE-240	Mettler-Toledo AG, Greifense, Switzerland
4. Automatic Micropipette Calibra microsyringe MS-R 100	Brand GmbH& C., Wertheim, Germany
5. Cellulose acetate membrane filter 0.45	Sartorius, AG, Goettinger, Germany

ตารางผนวกที่ ข2 สารเคมีที่ใช้ในการหาปริมาณแอนโดรแกรโฟไลด์

สารเคมีที่ใช้	GRADE	บริษัท,เมือง,ประเทศ
1. Standard Andrograopholide	Analytical Grade (AR)	Sigma, St. Louis, Mo USA
2. Methanol	Analytical(AR)	Merck,Darmstadt,Germany
3. Absolute ethanol	Analytical(AR)	Merck

ตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์

1. ผงฟ้าทะลายโจรก่อนสกัด (crude)
2. สารสกัดฟ้าทะลายโจร (crude extract)
3. กากฟ้าทะลายโจรหลังการสกัด

## วิธีการ

การวิเคราะห์หาปริมาณ andrographolide ในฟ้าทะลายโจร โดยใช้ reversed-phase HPLC Chromatography

### 1.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ซึ่ง สารมาตรฐาน andrographolide ให้มีความเข้มข้น 20 mg / 100 ml โดยใช้ methanol / water (50:50 ,v/v) เป็นตัวทำละลาย

### 1.2 การทำ calibration graph

pipette สารละลายมาตรฐาน andrographolide ในข้อ 1.1 ปริมาตร 1 , 2 , 3, 4 , 5 และ 6 ml ใส่ลงใน 10 ml volumetric flask แยกกัน ละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol/water (50:50 ,v/v) แล้วฉีดปริมาตร 20 ml

หมายเหตุ: กรณีที่ตัวอย่างเป็นสารละลายสกัดจะข้ามขั้นตอนที่ 1.3

### 1.3 การเตรียมตัวอย่างฟ้าทะลายโจร

ซึ่งตัวอย่างฟ้าทะลายโจรที่เป็น crude 100 mg, crude extract 1g และ residue 1g แยกกันใส่ลงใน 50-ml volumetric flask เติม 40 ml ของ methanol / water (50:50 ,v/v) และนำไป sonicate ใน ultrasonic bath เป็นเวลา 30 นาที ปรับปริมาตรให้ครบด้วย methanol / water (50:50 ,v/v) ผสมให้เข้ากัน กรองผ่าน membrane filter 0.45 cm ก่อนฉีดปริมาตร 20 ml ทำการวิเคราะห์แบบ triplicate

### 1.4 Chromatographic conditions :

Column : Inertsil ODS-3 (5 cm, 4.6 mm I.D. 15 cm)  
 Mobile phase : methanol / water (60:40, v/v )  
 Flow rate : 1 ml/min  
 Detector : 254 nm  
 Injection volume : 20 ml

1.5 ปริมาณของแอนโดรกราโฟไลด์และแลคโตนรวมคำนวณจากพื้นที่ของพีคในโครมาโทแกรม

ตารางผนวกที่ ข3 ข้อมูลปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ของสารละลายสกัด 85%

เอทิลแอลกอฮอล์ ด้วยอัตราส่วนวัตถุดิบฟ้าทะลายโจรผงต่อเอทิลแอลกอฮอล์ 10:1 ที่ความถี่ 20Hz ที่ใช้ในการอบแห้งในสัดส่วนแลคโตส 4:1 ที่อุณหภูมิ 45 50 และ 55 องศาเซลเซียส

พื้นที่สารมาตรฐานแอนโดรกราโฟไลด์

$$\text{พื้นที่เฉลี่ย} = 394,186$$

weight(g)	area	area/g	แอนโดรกราโฟไลด์ (mg)/(g) ตัวอย่าง
1.0079	551,428	547105.864	2.8314
1.0055	549,058	546054.699	2.8260
		เฉลี่ย	2.83

ตารางผนวกที่ ข4 ข้อมูลปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ของสารละลายสกัด 85% เอทิลแอลกอฮอล์ ด้วยอัตราส่วนวัตถุดิบฟ้าทะลายโจรผงต่อเอทิลแอลกอฮอล์ 5:1 ที่ความถี่ 40Hz ที่ใช้ในการอบแห้งในสัดส่วนแลคโตส 2:1

พื้นที่สารมาตรฐานแอนโดรกราโฟไลด์

$$\text{พื้นที่เฉลี่ย} = 398,939$$

weight(g)	area	area/g	แอนโดรกราโฟไลด์ (mg)/(g) ตัวอย่าง
0.5115	288,922	564852.3949	3.2565
0.513	284,710	554990.2534	3.1997
		เฉลี่ย	3.23

ตารางผนวกที่ ข5 ข้อมูลปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ของผลิตภัณฑ์ฟ้าทะลายโจรอบแห้งใน ปริมาณ 200 มิลลิลิตร สัดส่วนแลคโตสต่อของแข็งในสารละลาย 4:1 อบแห้งที่ อุณหภูมิ 45 °C

พื้นที่สารมาตรฐานแอนโดรกราโฟไลด์เฉลี่ย = 424249

ความชื้นของผลิตภัณฑ์ = 3.86%

weight(g)	area	area/g	andrographolide (mg)/(g)	
			ตัวอย่าง	ตัวอย่าง หักความชื้น
0.03168	233348	7365783	36.9809	38.4657
0.03112	231582	7441581	37.3615	38.8615
0.03058	219546	7179398	36.0451	37.4924
		เฉลี่ย	36.7959	37.4924

ตารางผนวกที่ ข6 ข้อมูลปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ของผลิตภัณฑ์ฟ้าทะลายโจรอบแห้งในสัดส่วนแลคโตสต่อของแข็งในสารละลาย 4:1 อบแห้งที่อุณหภูมิ 55 °C

พื้นที่สารมาตรฐานแอนโดรกราโฟไลด์

พื้นที่ครั้งที่ 1 = 356058    พื้นที่ครั้งที่ 2 = 352983    พื้นที่เฉลี่ย = 354520.5

Temp.	weight(g)	area	area/g	andrographolide (mg)/(g)	
				ตัวอย่าง	ตัวอย่าง หักความชื้น
55 °C	0.04928	380,724	7725731	42.4945	45.2985
moisture	0.05067	305,642	6032011	33.1784	35.3677
6.19%	0.05073	393,787	7762409	42.6963	45.5135
			เฉลี่ย	39.4564	42.0599

ตารางผนวกที่ ข7 ข้อมูลปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ของผลิตภัณฑ์ฟ้าทะลายโจรอบแห้งในสัดส่วนแลคโตสต่อของแข็งในสารละลาย 4:1 อบแห้งที่อุณหภูมิ 50 °C

พื้นที่สารมาตรฐานแอนโดรกราโฟไลด์

$$\text{พื้นที่ครั้งที่ 1} = 356058 \quad \text{พื้นที่ครั้งที่ 2} = 352983 \quad \text{พื้นที่เฉลี่ย} = 354520.5$$

Temp.	weight(g)	area	area/g	andrographolide (mg)/(g)	
				ตัวอย่าง	ตัวอย่าง หักความชื้น
50 °C	0.04971	392,728	7900382	43.4552	46.1405
moisture	0.04994	376,356	7536163	41.4518	44.0134
5.82%	0.05067	377,083	7441938	40.9335	43.4631
			เฉลี่ย	41.9400	44.539

ตารางผนวกที่ ข8 ข้อมูลปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ของผลิตภัณฑ์ฟ้าทะลายโจรอบแห้งในสัดส่วนแลคโตสต่อของแข็งในสารละลาย 4:1 อบแห้งที่อุณหภูมิ 45 °C

พื้นที่สารมาตรฐานแอนโดรกราโฟไลด์

$$\text{พื้นที่ครั้งที่ 1} = 356058 \quad \text{พื้นที่ครั้งที่ 2} = 352983 \quad \text{พื้นที่เฉลี่ย} = 354520.5$$

Temp.	weight(g)	area	area/g	andrographolide(mg)/(g)	
				ตัวอย่าง	ตัวอย่าง หักความชื้น
45 °C	0.04987	403,811	8097273	44.5381	47.0010
moisture	0.04988	389,389	7806516	42.9389	45.3133
5.24%	0.04956	298,517	6023345	33.1307	34.9628
			เฉลี่ย	40.2026	42.4257

ตารางผนวกที่ ข9 ข้อมูลปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ของผลิตภัณฑ์ฟ้าทะลายโจรอบแห้งในสัดส่วน  
ส่วนแลคโตสต่อของแข็งในสารละลาย 2:1 อบแห้งที่อุณหภูมิ 55 °C

พื้นที่สารมาตรฐานแอนโดรกราโฟไลด์เฉลี่ย = 386679

weight(g)	area	area/g	andrographolide (mg)/(g)	
			ตัวอย่าง	ตัวอย่างหักความชื้น 5.09%
0.02444	178,016	7283797.054	41.8177	44.0604
0.05055	342,824	6781879.327	38.9361	41.0242
0.05415	400,141	7389492.151	42.4245	44.6997
0.0538	392,933	7303587.361	41.9313	44.1801
0.05506	412,959	7500163.458	43.0599	45.3692
0.05483	406,007	7404833.121	42.5126	44.7925
		เฉลี่ย	40.69	42.87

การคำนวณปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ โดยใช้สมการที่ (9)

$$\frac{x}{1+y} = z \quad (9)$$

- $x$  คือ ร้อยละของแอนโดรกราโฟไลด์ในของแข็ง  
 $y$  คือ อัตราส่วนแลคโตสต่อของแข็งในสารละลายโดยน้ำหนัก  
 $z$  คือ ร้อยละของแอนโดรกราโฟไลด์ในผลิตภัณฑ์สุดท้ายโดยน้ำหนักแห้ง (น้ำหนักผลิตภัณฑ์ที่ไม่รวมความชื้น)

จากข้อมูลปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในสารละลายสกัด ดังตาราง ข3 และ ร้อยละของ  
 แอ้งในสารละลาย ดังตาราง ก7 ที่ใช้ในการอบแห้ง ในสัดส่วนแลคโตส 4:1 สามารถหาค่า  $x$  ได้ดังนี้

$$\begin{aligned}
 x &= \frac{2.83 \text{ mg Andrographolide}}{\text{g solution}} \times \frac{100 \text{ g solution}}{1.27 \text{ g solid}} \times 100 \\
 &= 22.28\%
 \end{aligned}$$

ร้อยละของแอนโดรกราโฟไลด์ในผลิตภัณฑ์สุดท้ายโดยน้ำหนักแห้ง (น้ำหนักผลิตภัณฑ์ที่ไม่รวมความชื้น)

$$z = \frac{22.28}{1+4} = 4.46\%$$

จากข้อมูลปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในสารละลายสกัด ดังตาราง ข4 และ ร้อยละของแห้งในสารละลาย ดังตาราง ก9 ที่ใช้ในการอบแห้ง ในสัดส่วนแลคโตส 2:1 สามารถหาค่า x ได้ดังนี้

$$\begin{aligned}
 x &= \frac{3.23 \text{ mg Andrographolide}}{\text{g solution}} \times \frac{100 \text{ g solution}}{2.50 \text{ g solid}} \times 100 \\
 &= 12.92\%
 \end{aligned}$$

ร้อยละของแอนโดรกราโฟไลด์ในผลิตภัณฑ์สุดท้ายโดยน้ำหนักแห้ง (น้ำหนักผลิตภัณฑ์ที่ไม่รวมความชื้น)

$$z = \frac{12.92}{1+2} = 4.31\%$$