นิพนธ์ต้นฉบับ

การผลิตสารมาตรฐาน Andrographolide จากฟ้าทะลายโจร

เมทินี หลิมศิริวงษ์*, อมร สหเมธาพัฒน์, ปิติกาญจน์ กาญจนาพฤกษ์
สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ จังหวัดนนทบุรี 11000
** ผู้รับผิดชอบบทความ: maytinee.l@dmsc.mail.go.th*

บทคัดย่อ

สารมาตรฐาน andrographolide กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ผลิตจากสารสำคัญของฟ้าทะลายโจรโดยใช้เทคนิคการสกัดสาร andrographolide จากใบของฟ้าทะลายโจรด้วยคลอโรฟอร์ม แล้วนำมาแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกซ้ำด้วยเอทานอล นำสารสำคัญที่ผลิตได้ไปตรวจยืนยันเอกลักษณ์และความบริสุทธิ์ด้วยวิธี IR spectroscopy, mass spectroscopy, ^{1}H-NMR spectroscopy และ differential scanning calorimetry พบว่าเป็นสาร andrographolide ซึ่งมีความบริสุทธิ์สูงสามารถนำมาผลิตเป็นสารมาตรฐานกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กำหนดค่าความบริสุทธิ์ โดยวิธี UPLC มีค่าเท่ากับ 98.2% เมื่อคำนวณในสภาวะปกติโดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน andrographolide ของ USP วิธีการสกัดแยกสารโดยเทคนิคการละลายที่ใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมและการทำให้สารบริสุทธิ์ขึ้นโดยการตกผลึกซ้ำที่ได้พัฒนาขึ้นนี้เป็นวิธีที่สะดวก ขั้นตอนไม่ยุ่งยากซับซ้อน แต่สามารถแยกสาร andrographolide ในฟ้าทะลายโจรออกจากสารกลุ่ม diterpene lactones ชนิดอื่นได้อย่างเฉพาะเจาะจงและมีประสิทธิภาพโดยมีร้อยละของผลผลิตเท่ากับ 0.18

คำสำคัญ: andrographolide, ฟ้าทะลายโจร, สารมาตรฐาน

Received date 12/02/19; Revised date 24/05/19; Accepted date 24/09/19

Production of Andrographolide Reference Standard 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@dmsc.mail.go.th*

Abstract

Andrographolide DMSc reference substance was produced by extraction of leaves of *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees with chloroform. Andrographolide crude extract was purified by recrystallization with ethanol. Identification of andrographolide raw material was performed by IR spectroscopy, mass spectroscopy, ^{1}H-NMR spectroscopy and differential scanning calorimetry to ensure the identity and purity of this substance. The assigned value of andrographolide DMSc reference substance was 98.2% calculated on the as is basis, determined by UPLC method compared with andrographolide USP reference standard. This developed method of liquid extraction and purification by recrystallization was a non-complicated method but selective separation of andrographolide from other diterpene lactones with the yield of 0.18%.

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

บทนำ

ฟ้าทะลายโจร [*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees] มีถิ่นกำเนิดจากอินเดียและศรีลังกา พบได้ทั่วไปในแถบเอเชีย[1] เป็นสมุนไพรที่ใช้กันอย่างแพร่หลายมาเป็นเวลานาน มีรสขม มีฤทธิ์ลดไข้ แก้ท้องเสีย ลดอาการคออักเสบ โดยมีสารสำคัญคือ สารกลุ่ม diterpene lactones ซึ่งได้แก่ สาร andrographolide, สาร neoandrographolide, สาร 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide และสารกลุ่ม flavonoids เป็นต้น[2] ปัจจุบันมีการใช้ยานี้อย่างกว้างขวางทั้งเป็นยาสามัญประจำบ้านและใช้ในโรงพยาบาล นอกจากนี้รัฐบาลยังส่งเสริมการใช้ยาสมุนไพรเพื่อทดแทนยาแผนปัจจุบันตามแผนยุทธศาสตร์ชาติ 20 ปี ด้านสาธารณสุขและส่งเสริมอุตสาหกรรมการผลิตสมุนไพรเพื่อการส่งออกไปยังต่างประเทศ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุขซึ่งเป็นหน่วยงานคุ้มครองผู้บริโภคได้ดำเนินการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ฟ้าทะลายโจรเพื่อให้มั่นใจในคุณภาพผลิตภัณฑ์ที่มีจำหน่ายในท้องตลาดและส่งออกไปยังต่างประเทศ

การควบคุมคุณภาพวัตถุดิบฟ้าทะลายโจรตามตำรายาของสหรัฐอเมริกาฉบับที่ 39 (USP39)[3] มีการวิเคราะห์หาปริมาณของสารกลุ่ม diterpene lactones ในวัตถุดิบจากใบและต้น (andrographis) ผงละเอียดของใบและต้น (powdered androg-raphis) และสารที่ได้จากการสกัดจากใบและต้น (powdered andrographis extract) โดยวิเคราะห์ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatog-raphy (HPLC) ใช้สารมาตรฐาน andrographolide เป็นตัวเปรียบเทียบในการวิเคราะห์หาปริมาณสาร

กลุ่ม diterpene lactones โดยการคำนวณในรูปของผลรวมของปริมาณสาร andrographolide, สาร neoandrographolide, สาร 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide และสาร andrograpanin ดังนั้นสารมาตรฐาน andrographolide จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์ฟ้าทะลายโจร โดยสารมาตรฐานนี้ต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศซึ่งมีราคาค่อนข้างสูง ในแต่ละปีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ต้องใช้งบประมาณในการซื้อสารมาตรฐาน andrographolide เพิ่มขึ้นตามปริมาณงานควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ฟ้าทะลายโจรในท้องตลาดที่มีจำนวนเพิ่มมากขึ้น ศูนย์สารมาตรฐานยาและวัตถุเสพติด สำนักยาและวัตถุเสพติดจึงมีแนวคิดในการผลิตสารมาตรฐานกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ andrographolide เพื่อนำมาใช้ในการควบคุมคุณภาพฟ้าทะลายโจรเพื่อทดแทนการนำเข้าสารมาตรฐานจากต่างประเทศ โดยพัฒนาวิธีการสกัดสาร andrographolide จากใบของฟ้าทะลายโจรแล้วนำมาแยกให้บริสุทธิ์และมีปริมาณมากพอที่จะนำมาผลิตเป็นสารมาตรฐาน ทำการตรวจเอกลักษณ์เพื่อยืนยัน รวมทั้งทดสอบความบริสุทธิ์ของสาร andrographolide ที่ได้ด้วยวิธี UPLC ซึ่งศูนย์สารมาตรฐานยาและวัตถุเสพติดได้พัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์แล้ว[4] เพื่อทำการกำหนดค่าความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐานที่ผลิตขึ้น

สำหรับวิธีการสกัดสาร andrographolide จากใบของฟ้าทะลายโจรนั้น ใช้หลักการเลือกตัวทำละลายให้เหมาะสมที่สามารถสกัดสาร andrographolide ได้ในปริมาณสูงแต่มีสารเจือปนอื่น ๆ ออกมาในปริมาณน้อย แล้วจึงนำสารสกัดที่ได้มาแยกให้ได้สาร andrographolide ที่บริสุทธิ์ขึ้น ซึ่งการแยกสาร andrographolide ในสารสกัดออกจากสารอื่น ๆ สามารถทำได้หลายวิธีได้แก่ การแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography)[5-6] วิธี flash column chromatography[1,6] สำหรับวิธีที่พัฒนาขึ้นเป็นการแยกสาร andrographolide และทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคการตกผลึกซ้ำ[7-8] โดยใช้หลักการความแตกต่างของค่าการละลายของสารที่ต้องการกับสารเจือปนอยู่เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ เมื่อได้ตัวทำละลายและสภาวะที่เหมาะสม สารที่ต้องการจะตกผลึกออกมา วิธีนี้จะสามารถแยกสารให้บริสุทธิ์ได้อย่างรวดเร็วและได้สารที่ต้องการในปริมาณค่อนข้างสูง

ระเบียบวิธีศึกษา

วัสดุ

1. วัตถุดิบสมุนไพร

ใบฟ้าทะลายโจร จากห้างหุ้นส่วนจำกัดอ้วยอัน จังหวัดนครปฐม

2. สารมาตรฐาน

andrographolide (USP reference standard, USA) lot F0I344 ความบริสุทธิ์ร้อยละ 99.5 เมื่อคำนวณสภาพปกติ

powdered andrographis extract (USP reference standard, USA) lot F0I342 ซึ่งประกอบด้วย total diterpene lactones ร้อยละ 41 เมื่อคำนวณสภาพปกติ (as is basis)

3. เครื่องมือและอุปกรณ์

Infrared spectrophotometer (Jasco, Japan)

NMR spectrophotometer (Bruker, Germany)

Differential scanning calorimeter

(DSC) (Mettler Toledo, Switzerland)

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

คอลัมน์ ACQUITY® UPLC BEH C18 ขนาด 2.1 x 100 มิลลิเมตร บรรจุอนุภาคขนาด 1.7 ไมโครเมตร (Waters®, USA)

4. สารเคมี

acetonitrile (HPLC grade), methyl alcohol (HPLC grade), ethyl alcohol (AR grade), formic acid (AR grade), chloroform (AR grade), hexane (AR grade)

วิธีการศึกษา

1. การเตรียมสมุนไพรเพื่อใช้ในการผลิต ทำการตรวจเอกลักษณ์ของฟ้าทะลายโจรอบแห้งที่ซื้อมาโดยวิธี UPLC ที่ศูนย์สารมาตรฐานยาและวัตถุเสพติดพัฒนาขึ้น[4] หลังจากนั้นนำไปบดและปั่นให้เป็นผงละเอียด

2. ทดสอบหาตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับสกัดผงฟ้าทะลายโจร เพื่อให้ได้สารสกัดฟ้าทะลายโจรที่มีสาร andrographolide ได้ในปริมาณสูงแต่มีสารเจือปนอื่น ๆ ในปริมาณต่ำ

3. นำสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคการตกผลึก เพื่อแยกสาร andrographolide ออกจากสารอื่นโดยใช้ตัวทำละลายและสภาวะที่เหมาะสม

4. นำผลึกจากข้อ 3 มาทำการตกผลึกซ้ำเพื่อให้สาร andrographolide มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น

5. นำผลึกไปตรวจเอกลักษณ์ด้วย IR spectroscopy และทดสอบความบริสุทธิ์เบื้องต้นโดยหาปริมาณสาร andrographolide ด้วยวิธีวิเคราะห์โดย UPLC ซึ่งใช้ detector ชนิด diode array ร่วมกับ mass spectrometer เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน andrographolide USP โดยวัตถุดิบที่ผลิตได้ควรมีความบริสุทธิ์ของสาร andrographolide มากกว่าร้อยละ 95 มี UV spectrum และ mass spectrum สอดคล้องกับ spectrum ของสารมาตรฐาน andrographolide USP

6. ทำตามขั้นตอนที่ 3-5 ซ้ำ ให้ได้สาร andrographolide ปริมาณมากเพียงพอที่จะนำไปผลิตเป็นสารมาตรฐาน

7. ตรวจเอกลักษณ์เพื่อยืนยันสารสำคัญและความบริสุทธิ์ด้วย mass spectroscopy, IR spectroscopy, nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) และ differential scanning calorimeter (DSC)

8. ทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของผงสาร andrographolide ที่ผลิตขึ้น (homogeneity testing) และประมวลผลด้วยวิธีทางสถิติ

9. ประมวลผลการทดสอบคุณสมบัติทั้งหมดและกำหนดค่าความบริสุทธิ์แล้วนำไปผลิตเป็นสารมาตรฐาน

ผลการศึกษา

นำฟ้าทะลายโจรอบแห้งที่ผ่านการตรวจเอกลักษณ์ด้วยวิธี UPLC แล้ว มาบดและปั่นให้ละเอียด นำมาสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ได้แก่ chloroform, hexane, methanol, ethanol, 50% ethanol นำสารสกัดที่ได้ไปฉีดหาปริมาณสาร andrographolide สารกลุ่ม diterpene lactones และ

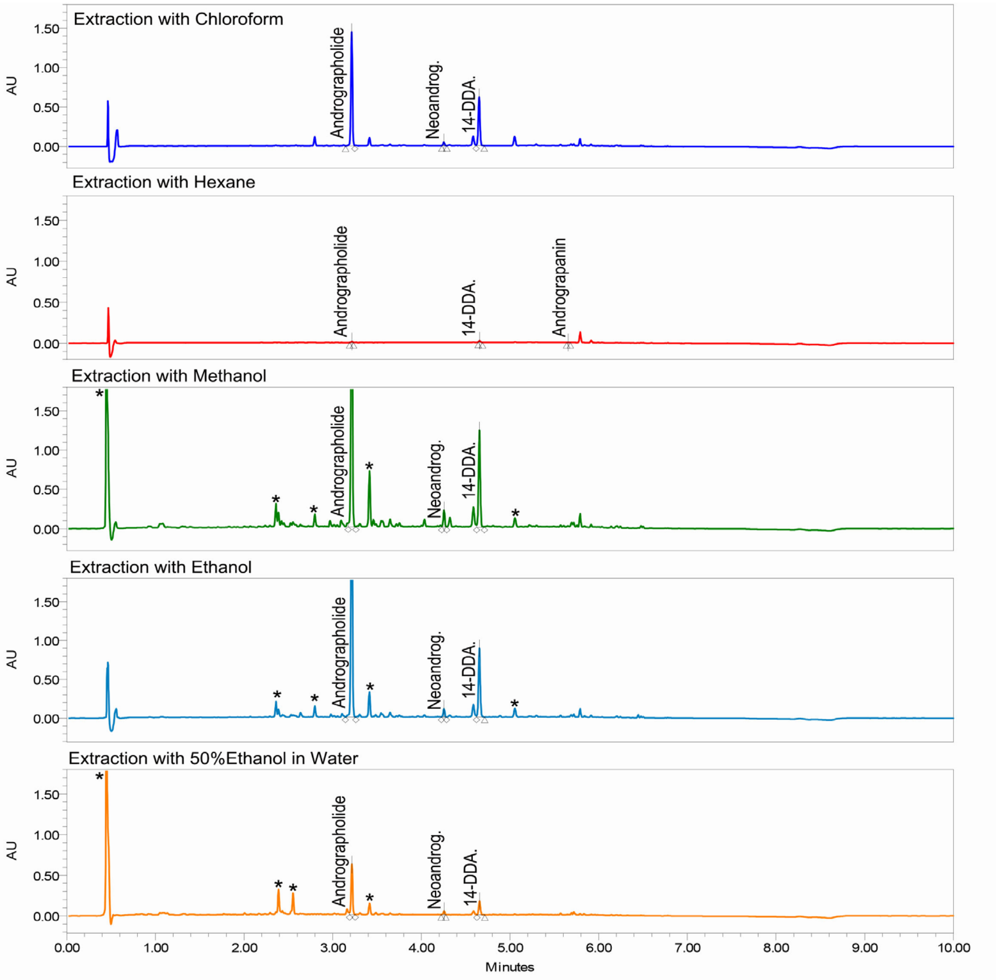
สารตัวอื่น ๆ ที่สกัดออกมาได้ ด้วยวิธี UPLC ตามรายละเอียดวิธีในตารางที่ 1 พบว่าสารสกัดที่มีปริมาณสาร andrographolide มากที่สุดคือสารสกัดจาก methanol และ ethanol รองลงมาคือสารสกัดจาก chloroform และ 50% ethanol ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจาก hexane มีปริมาณ andrographolide น้อยที่สุด แต่ในสารสกัดของ methanol และ ethanol พบสารกลุ่ม diterpene lactones และสารอื่น ๆ ปนออกมาในปริมาณสูงเช่นกัน โดยมีปริมาณสารอื่น ๆ มากกว่าการสกัดด้วย chloroform ดังโครมาโทแกรม (ภาพที่ 1) จากผลการทดสอบข้างต้นจึงเลือก chloroform เป็นตัวทำละลายที่จะนำมาสกัดสาร andrographolide จากผงฟ้าทะลายโจรเนื่องจากสามารถสกัดสาร andrographolide ได้โดยมีสารอื่น ๆ เจือปนในปริมาณที่ต่ำ

ทำการสกัดผงฟ้าทะลายโจรแห้งด้วย chloroform ที่อุณหภูมิ 60°C กรองแยกผงและกากที่เหลือออกจากสารสกัด เมื่อทิ้งสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิห้องจะมีผงละเอียดสีเขียวเทา (ภาพที่ 2a) แยกออกมา กรองเพื่อแยกผงละเอียดสีเขียวเทาออกจากสารสกัด แล้วนำมาละลายด้วย ethanol ที่อุณหภูมิ 60°C และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง สาร andrographolide ตกผลึกออกมาจากสารละลาย ซึ่งจะได้ผลึกสีออกเหลือง (ภาพที่ 2b) ล้างผลึกด้วย ethanol เย็น เพื่อกำจัดสิ่งเจือปนบนผิวผลึก ทำการตกผลึกซ้ำด้วย ethanol จนได้ผลึกที่มีสีขาวและความบริสุทธิ์มากขึ้น (ภาพที่ 2c, 2d)

นำผลึกสาร andrographolide ไปบดและตรวจเอกลักษณ์ด้วยวิธี IR spectroscopy พบว่ามี IR spectrum (KBr) ที่มีการดูดกลืนแสงที่ 2929, 1729, 1675, 1459, 908, 659 cm^{-1} และนำไปหาปริมาณด้วยวิธีวิเคราะห์โดย UPLC โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน andrographolide USP พบว่าสาร andrographolide ที่ผลิตขึ้นมีความบริสุทธิ์เบื้องต้นมากกว่าร้อยละ 98 จากโครมาโทแกรมของ

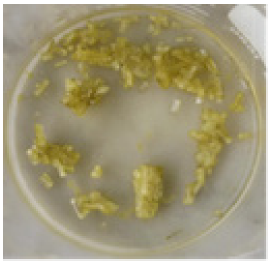
ตารางที่ 1 วิธีวิเคราะห์สาร andrographolide โดย UPLC[4]

Chromatographic Condition			
Column	ACQUITY® UPLC BEH C18 2.1 x 100 mm, 1.7 μm		
Mobile phase (gradient)	0.050% formic acid in water (A): 0.025% formic acid in ACN (B)		
	Time (min)	A (%)	B (%)
	0.00	90	10
	4.50	55	45
	6.25	20	80
	7.00	20	80
	8.00	90	10
	10.00	90	10
Flow rate	0.5 ml/min		
Column temperature	40°C		
Detection	UV 223 nm		
Injection volume	2 μl		

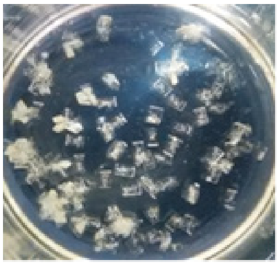


ภาพที่ 1 โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ซึ่งประกอบด้วย สาร andrographolide, สารกลุ่ม diterpene lactones และสารอื่น (*)

2a: ผงละเอียดสีเขียวเทา จากการสกัดด้วย chloroform



2b: ผลึกสีเหลือง จากการตกผลึกด้วย ethanol



2c: ผลึกสีขาว จากการตกผลึกซ้ำ

2d: ผลึกสาร andrographolide ที่มีความบริสุทธิ์สูง

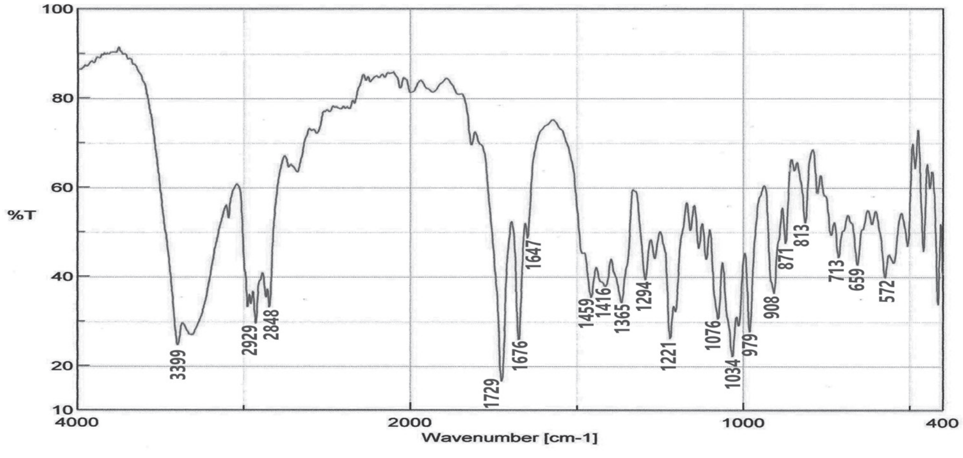
ภาพที่ 2 ลักษณะของผลึกที่สกัดได้จากฟ้าทะลายโจร

สาร andrographolide มี retention time เท่ากับ 3.20 นาทีและพบว่า UV spectrum มี λmax ที่ 226 นาโนเมตร และ mass spectrum LC-MS(ESI)(+) $[M+H-2H_2O]^+$ m/z เท่ากับ 315 ดังภาพที่ 3 และ 4 ซึ่งสอดคล้องกับผล IR, UV และ mass spectrum ของสารมาตรฐาน andrographolide USP เมื่อทดสอบที่สภาวะเดียวกัน

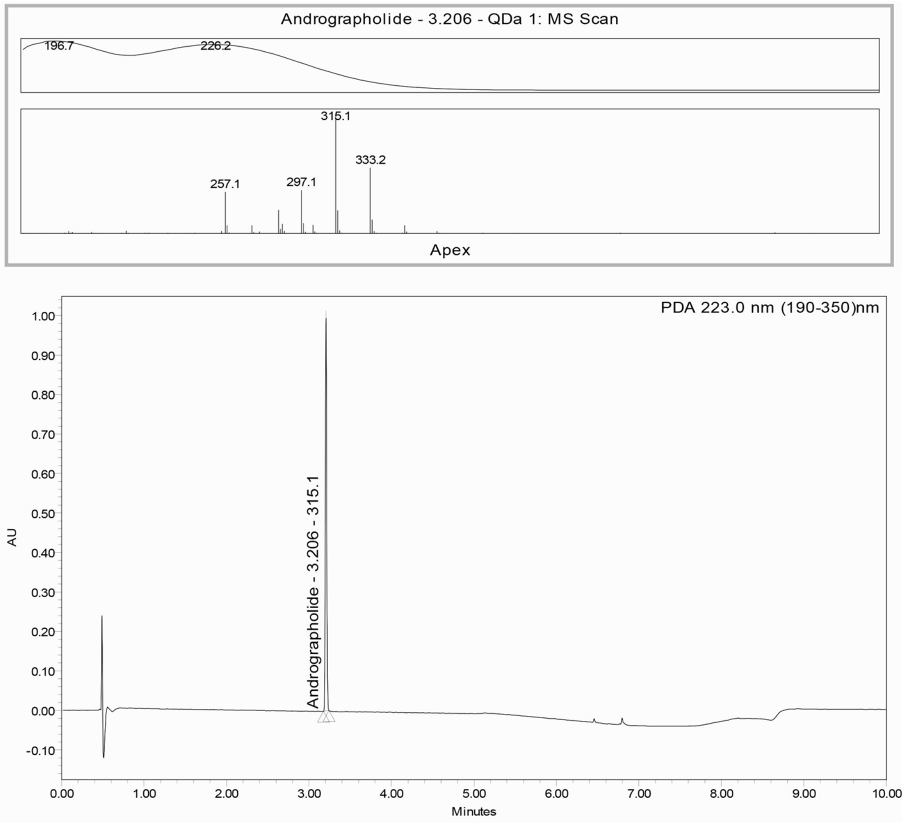
นอกจากนี้เมื่อตรวจด้วยเครื่อง DSC พบว่ามีจุดหลอมเหลว 230.2°C และเมื่อตรวจโดยเครื่อง NMR (Bruker ADVANCE 300 spectrometer) ให้ผลดังนี้ ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 6.97 (1H, dt, *J* = 7.0, 1.7 Hz, H-12), 5.04 (2H, br s, OH), 4.90 (1H, s, H-19a), 4.58 (1H, s, H-17b), 4.46 (1H, dd, *J* = 10.5, 6.1 Hz, H-15a), 4.26 (1H, dd, *J* = 10.5, 2.0 Hz, H-19a), 4.19 (1H, d, *J* = 11.1 Hz, H-15b), 3.48 (1H, d, *J* = 10.1 Hz, H-19b), 2.54 (2H, t, *J* = 6.5 Hz, H-11), 2.43 (1H, brd, H-9), 1.85-1.59 (several protons), 1.30-1.22 (several protons), 0.70 (3H, s, H-20) ดังแสดงในภาพที่ 5 สามารถพิสูจน์โครงสร้างของสารจากค่าเคมีคอลชิฟต์ของโปรตอนบนคาร์บอนทั้ง 20 ตำแหน่ง พบว่าสอดคล้องกับโครงสร้างโมเลกุลของสาร andrographolide

จากการประมวลผลตรวจเอกลักษณ์สารสำคัญด้วยการใช้ FT-IR, NMR, DSC, UPLC และ mass spectroscopy สามารถยืนยันได้ว่าเป็นสาร andrographolide มีลักษณะเป็นผงสีขาว (white crystalline powder) โดยมีโครงสร้างโมเลกุลดังแสดงในภาพที่ 6 มีสูตรโมเลกุล $C_{20}H_{30}O_5$ และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 350.45 โดยสามารถผลิตสาร andrographolide ความบริสุทธิ์สูงได้ 13 กรัมจากปริมาณฟ้าละลายโจรแห้งเริ่มต้น 7 กิโลกรัม คิดเป็นร้อยละผลผลิต (%yield) เท่ากับ 0.18

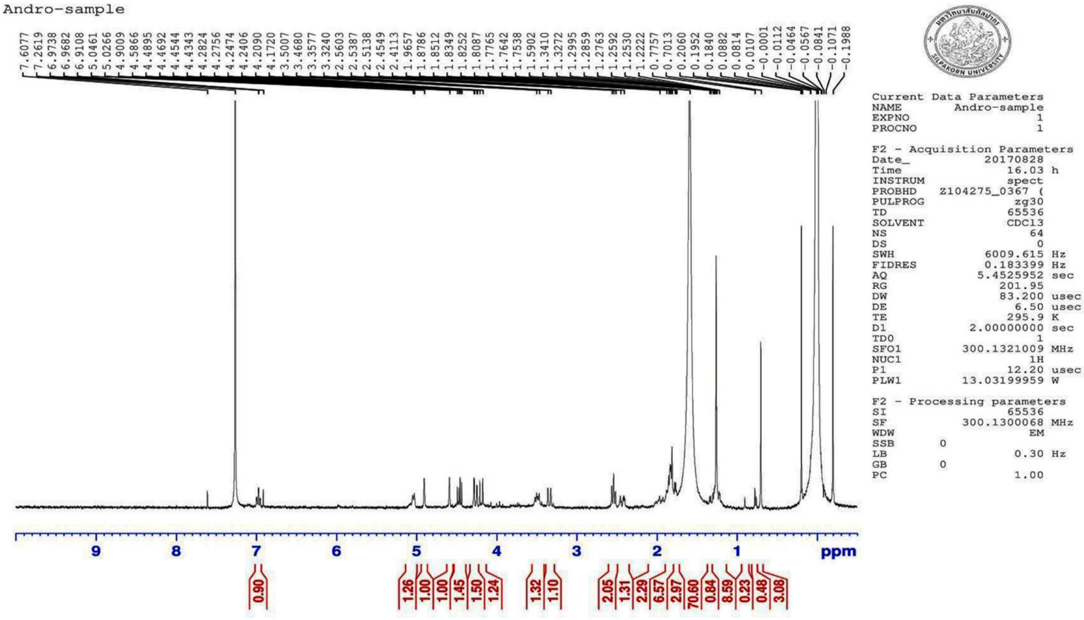
หลังจากตรวจเอกลักษณ์เพื่อยืนยันสารสำคัญแล้ว นำไปทดสอบหาความบริสุทธิ์ของสาร andrographolide โดยวิธี UPLC ตามรายละเอียดในตารางที่ 1 พบว่าได้ความบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 95 จึงนำไปทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของผงยา (homogeneity testing) พบว่าผงสาร andrographolide ที่ผลิตขึ้นมีความเป็นเนื้อเดียวกันของผงยา (homogeneous powder) แล้วจึงนำมาผลิตเป็นสารมาตรฐานกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ andrographolide (Andrographolide DMSc reference standard)



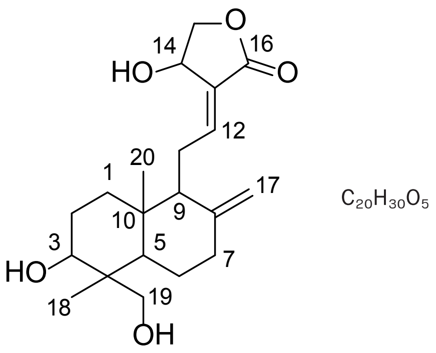
ภาพที่ 3 IR spectrum ของสาร andrographolide lot no. RSC6001213



ภาพที่ 4 UPLC chromatogram, UV spectrum และ mass spectrum ของสาร andrographolide lot no. RSC6001213



ภาพที่ 5 [1]H-NMR spectrum ของสาร andrographolide lot no. RSC6001213



ภาพที่ 6 โครงสร้างโมเลกุลของสาร andrographolide lot no. RSC6001213

สามารถกำหนดค่าความบริสุทธิ์ได้เท่ากับ 98.2% เมื่อคำนวณในสภาวะปกติโดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน andrographolide ของ USP

อภิปรายผล

การสกัดสารสำคัญ andrographolide ในฟ้าทะลายโจรใช้หลักการสกัดพืชสมุนไพรโดยการเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมกับคุณสมบัติสารที่ต้องการสกัดออกมา แล้วจึงนำสารสกัดที่ได้มาทำให้ตกผลึกเพื่อแยกสารที่ต้องการออกจากสารอื่นที่อยู่ในสารสกัด หลังจากนั้นทำให้สารที่ต้องการมีความบริสุทธิ์ยิ่งขึ้นโดยเทคนิคการตกผลึกซ้ำ (recrystallization)[8-9] การเลือกใช้ chloroform เป็นตัวทำละลายที่มีค่า polarity index (PI) ค่อนข้างต่ำ (PI = 4.1) นั้นถึงแม้ว่าไม่ค่อยเหมาะสมกับคุณสมบัติความเป็นขั้วของสาร andrographolide ที่ต้องการสกัดออกจากฟ้าทะลายโจร ทำให้ปริมาณที่สกัดออกมาได้นั้นน้อยกว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีค่า PI สูงกว่าเช่น ethanol (PI = 5.2) และ methanol (PI = 6.6) แต่พบว่าสารสกัดที่ได้จาก chloroform จะมีการเจือปนของสารกลุ่ม diterpene lactones และสารอื่นน้อยกว่าเมื่อเทียบกับการสกัดด้วยตัวทำละลายอื่น[10] จึงได้สารสกัดที่มีความเข้มข้นของสาร andrographolide ค่อนข้างสูงและเมื่อทำให้อุณหภูมิของสารสกัด chloroform เย็นลง สาร andrographolide ที่มีความเข้มข้นสูงและมีค่าการละลายใน chloroform ต่ำจึงตกผลึกออกมา หลังจากนั้นนำมาทำให้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยเทคนิคการตกผลึกซ้ำโดยเลือกใช้ ethanol ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมสามารถละลายสาร andrographolide ได้ดีเมื่อให้ความร้อน ตามหลักการของการตกผลึกซ้ำ[9] สารละลายอิ่มตัวของ andrographolide (saturated solution) เมื่อทิ้งให้เย็นลงอย่างช้า ๆ ที่อุณหภูมิห้อง สาร andrographolide ที่อิ่มตัวจะตกผลึกออกมาจากสารอื่น ๆ ที่ละลายใน ethanol ได้ดีแต่มีความเข้มข้นน้อย[8] หลังจากนั้นจึงล้างผลึกด้วย ethanol เย็นซ้ำหลาย ๆ ครั้งเพื่อกำจัดสิ่งเจือปนอื่น นอกจากนี้การปล่อยให้ตกผลึกอย่างช้า ๆ จะได้ผลึกที่มีขนาดใหญ่และมีความบริสุทธิ์กว่าการทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะได้ผลึกเล็กละเอียดและมีพื้นที่ผิวมาก มีโอกาสที่สารอื่นจะปนเปื้อนอยู่กับผลึกละเอียดได้มากกว่า[9]

วิธีการแยกสารและทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกเป็นวิธีการที่สะดวก ขั้นตอนไม่ยุ่งยากซับซ้อน และไม่สิ้นเปลืองตัวทำละลายอินทรีย์เหมือนวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) หรือวิธี flash column chromatography แต่ต้องศึกษาและทดสอบเพื่อหาตัวทำละลายและสภาวะที่เหมาะสม อีกทั้งปริมาณสารที่ต้องการต้องมีปริมาณมากพอที่จะทำให้เกิดสภาวะอิ่มตัวของสารละลายจึงจะทำให้เกิดการตกผลึกได้[9] วิธีการผลิตสาร andrographolide จากฟ้าทะลายโจรที่พัฒนาขึ้นนี้ใช้หลักการสกัดและตกผลึกซึ่งเป็นหลักการพื้นฐานแต่

มีแนวคิดที่แตกต่างในการเลือกตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดและตกผลึก กล่าวคือตัวทำละลายที่เลือกอาจไม่ใช่ตัวที่สามารถให้ร้อยละของผลผลิตได้สูงสุด แต่เป็นตัวทำละลายที่สามารถแยกสาร andrographolide ออกจากสารกลุ่ม diterpene lactones ชนิดอื่นได้อย่างเฉพาะเจาะจงและมีประสิทธิภาพ จึงลดเวลาการทำงานไม่ต้องตกผลึกซ้ำหลายครั้ง เนื่องจากมีสารเจือปนน้อย ทำให้สามารถผลิตสาร andrographolide ได้ปริมาณมากพอ (อย่างน้อย 10 กรัม) และมีความบริสุทธิ์เหมาะสมที่จะนำมาผลิตเป็นสารมาตรฐาน

การตรวจเอกลักษณ์ผลึกสาร andrographolide ที่ผลิตขึ้น ได้ IR spectra และ Mass spectra สอดคล้องกับการศึกษาของ Singh P.K. และคณะ[11] และ Yong-Xi S. และคณะ[12] ตามลำดับ นอกจากนี้การทดสอบโดย NMR พบว่าโครงสร้างโมเลกุลเป็นสาร andrographolide สำหรับการหาค่าจุดหลอมเหลวของสารก็เป็นวิธีการตรวจเอกลักษณ์และความบริสุทธิ์ของสารเช่นกัน[13] ซึ่งจากผลการทดสอบทั้งหมดสามารถยืนยันได้ว่าสารที่ได้จากวิธีผลิตที่พัฒนาขึ้นนี้คือสาร andrographolide

ข้อสรุป

สาร andrographolide ที่สกัดจากฟ้าทะลายโจร โดยวิธีที่พัฒนาขึ้นมีร้อยละของผลผลิตเท่ากับ 0.18 นำมาผลิตเป็นสารมาตรฐานกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข andrographolide (Andrographolide DMSc reference standard) ผ่านการตรวจเอกลักษณ์เพื่อยืนยันสารสำคัญและความบริสุทธิ์ นอกจากนี้ยังพบว่ามีความเป็นเนื้อเดียวกันของผงยา กำหนดค่าความบริสุทธิ์ได้เท่ากับ 98.2% เมื่อคำนวณในสภาวะปกติ เป็นสารมาตรฐานจากสมุนไพรชนิดแรกที่ผลิตและมีจำหน่ายที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยราคาถูกกว่าการนำเข้าสารมาตรฐานชนิดนี้จากต่างประเทศประมาณ 5 เท่า ผู้ประกอบการผลิตยาพัฒนาจากสมุนไพรสามารถนำไปใช้เป็นสารมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์วัตถุดิบเพื่อหาปริมาณสาร andrographolide และใช้ในการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ฟ้าทะลายโจรที่มีการผลิตในประเทศซึ่งเป็นการส่งเสริมการส่งออกผลิตภัณฑ์สมุนไพรไทยที่ได้มาตรฐานไปยังต่างประเทศ นอกจากนี้การวิจัยยังสามารถนำไปเป็นตัวเปรียบเทียบเพื่อต่อยอดงานวิจัย ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ ทดสอบความเป็นพิษและกำหนดขนาด (dose) ของสารสำคัญเพื่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ดร.วุฒิชัย นุตกุลและนายธีระวุธ ปิ่นทอง ที่ได้ให้คำแนะนำและเป็นที่ปรึกษาในการสกัดและแยกสาร andrographolide จากฟ้าทะลายโจร จนสามารถนำมาผลิตเป็นสารมาตรฐาน andrographolide กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

References

1. Aromdee C. No bitter of *Andrographis paniculata*. Khon Kaen: Khon Kaen University Press; 2015. p. 2, 18. (in Thai)
2. Department of Medical Sciences. Thai Herbal Pharmacopoeia. Nonthaburi: Department of Medical Sciences; 2016. p. 103-13.
3. The United States Pharmacopoeial Convention. The United States Pharmacopoeia, The National Formulary 39th revision. Rockville, MD.: The United States Pharmacopoeial Convention, Inc.; 2016. p. 6461, 6463.
4. Limsiriwong M, Sahamethapat A, Kanjanapruk P. Development and validation of UPLC method for analysis of andrographolide from *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees. Journal of Thai Traditional and Alternative

Medicine. 2019;17(2):153-67. (in Thai)

5. Borooah D.D, Borua P.K. Column chromatography for isolation of andrographolide from in vitro grown medicinal plant-*Andrographis paniculata* Wall. ex Nees. International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology. 2011;2(3):571-5.
6. Zala S.P, Patel K.P, Patel K.S, Parmar J.P, Sen D.J. Laboratory techniques of purification and isolation. Int J of Drug Dev & Res. 2012;4(2):41-55.
7. Kilambi P.K, Shah P.A, Panchal S.R, Joshi H.R. A simple and facile method for the isolation of andrographolide from *Andrographis paniculata* Nees. Am J Pharm Tech Res. 2016;6(6):266-75.
8. Jadhao D, Thorat B. Purification (crystallization) of bioactive ingredient andrographolide from *Andrographis paniculata*. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2014;3(10):747-63.
9. Department of Chemistry. Recrystallization. [Internet]. 2015 [cited 2016 Jun 6]; [18 screens]. Available from: http://www.chem.utoronto.ca/coursenotes/CHM249/Recrystallization.pdf
10. Kumoro A, Hasan M, Singh H. Effects of solvent properties on the soxhlet extraction of diterpenoid lactones from *Andrographis paniculata* leaves. Science Asia. 2009;35:306-9.
11. Singh P.K, Hasan T, Prasad O, Sinha L, Raj K, Misra N. FT-IR spectra and vibrational spectroscopy of andrographolide. Spectroscopy. 2006;20:275-83.
12. 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.
13. Mohana S.J, Umarani V. Isolation and characterisation of andrographolide from *Andrographis paniculata*. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2016;5(9):1954-61.