



การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์แอนโดรกราโฟไลด์
ในน้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของสารสกัดฟ้าทะลายโจร
ANALYTICAL METHOD VALIDATION OF ANDROGRAPHOLIDE IN
MOUTHWASHES CONTAINING *Andrographis paniculata* EXTRACT

ขวัญศรี สราญกวิน

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง
มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

2565

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์แอนโดรกราโฟไลด์
ในน้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของสารสกัดฟ้าทะลายโจร
ANALYTICAL METHOD VALIDATION OF ANDROGRAPHOLIDE IN
MOUTHWASHES CONTAINING *Andrographis paniculata* EXTRACT

ขวัญศรี สราญกวิน

การค้นคว้าอิสระนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง
มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

2565

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์แอนโดรกราโฟไลด์
ในน้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของสารสกัดฟ้าทะลายโจร
ANALYTICAL METHOD VALIDATION OF ANDROGRAPHOLIDE IN
MOUTHWASHES CONTAINING *Andrographis paniculata* EXTRACT

ขวัญศรี สราญกวิน

การค้นคว้าอิสระนี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

2565

คณะกรรมการสอบการค้นคว้าอิสระ

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ณัฐยา เหล่าฤทธิ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.มยุรี กัลยาวัฒนกุล)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชัยศักดิ์ จันศรีนิยม)

©ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

กิตติกรรมประกาศ

การค้นคว้าอิสระนี้ประสบความสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี โดยได้รับคำปรึกษาและแนะนำจาก
รองศาสตราจารย์ ดร.มยุรี กัลยาวัฒนกุล สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
ผู้เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา ซึ่งคอยให้ข้อชี้แนะและตรวจทานแก้ไขจนการศึกษาวิจัยบรรลุเป้าหมาย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านจากหน่วยประสานงานมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง กรุงเทพมหานคร
ที่ให้คำแนะนำในการจัดการเอกสารและให้ความช่วยเหลือในจัดหาสารเคมี

ขอขอบคุณกลุ่มคัมครองผู้บริโภคดีานสาธารณสุข ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 4 สระบุรี
ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ในการศึกษาวิจัย ขอขอบคุณเพื่อนร่วมงานทุกท่านที่ให้คำปรึกษา
และแนะนำให้การศึกษานี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

สุดท้ายนี้ ผู้เขียนหวังเป็นอย่างยิ่งว่าผลการค้นคว้าอิสระครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้สนใจ
หากมีข้อบกพร่องประการใด ผู้เขียนขอน้อมรับและขออภัยไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขวัญศรี สราญกวิน

ชื่อเรื่องการค้นคว้าอิสระ	การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์แอนโดรกราโฟไลด์ ในน้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของสารสกัดฟ้าทะลายโจร
ชื่อผู้เขียน	ขวัญศรี สราญกวิน
หลักสูตร	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง)
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.มยุรี กัลยาวัฒนกุล

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในน้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของสารสกัดฟ้าทะลายโจร โดยการเตรียมน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรใน 50% เมทานอล วิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง วัฏภาคคงที่เป็นคอลัมน์ C18 วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นส่วนผสมของเมทานอลในน้ำ 40-60% ปรับสัดส่วนแบบเกรเดียนท์ อัตราการไหล 0.4 mL/min ตรวจวัดด้วยอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 224 nm การทดสอบความถูกต้องของวิธี พบว่า กราฟมาตรฐานของแอนโดรกราโฟไลด์ มีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.001-0.1 mg/mL โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 0.9999 ความแม่นยำแสดงด้วยร้อยละค่าการกลับคืนซึ่งอยู่ในช่วง 95.3-98.8 ความเที่ยงแสดงด้วยร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ซึ่งอยู่ในช่วง 0.2-1.5 ซีดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ เท่ากับ 0.0001 และ 0.00025% w/w ตามลำดับ สรุปได้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีความแม่นยำและเที่ยง เมื่อนำมาวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของสารสกัดฟ้าทะลายโจรสูตรมีแอลกอฮอล์และไม่มีแอลกอฮอล์ที่กำหนดในท้องตลาด จำนวน 7 ตัวอย่าง พบว่า มีปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์อยู่ในช่วง 0.0-0.0086% w/w

คำสำคัญ: แอนโดรกราโฟไลด์, ฟ้าทะลายโจร, น้ำยาบ้วนปาก, การทดสอบความถูกต้อง

Independent Study Title Analytical Method Validation of Andrographolide in Mouthwashes Containing *Andrographis paniculata* Extract

Author Kwansri Sarankawin

Degree Master of Science (Cosmetic Science)

Advisor Assoc. Prof. Mayuree Kanlayavattanakul, Ph. D.

ABSTRACT

The objective of this study was to develop and validate an analytical method for determining andrographolide content in mouthwashes containing *Andrographis paniculata* extract. The mouthwash was prepared in 50% methanol, analyzed by UHPLC. C18 column was used as stationary phase. The 40-60% mixture of methanol in water was used as a mobile phase, using gradient elution with a flow rate of 0.4 mL/min. Detection was conducted on UV at 224 nm. The method validation showed the calibration curve of andrographolide was linear at a concentration range of 0.001-0.1 mg/mL with R^2 at 0.9999. The accuracy, as % recovery, was in the range of 95.3-98.8. The precision, as %RSD, was in the range of 0.2-1.5. The LOD and LOQ were 0.0001 and 0.00025% w/w, respectively. In conclusion, this method was accurate and precise. The analysis of andrographolide containing in 7 samples of alcohol and alcohol-free mouthwashes showed the content was in the range of 0.0-0.0086% w/w.

Keywords: Andrographolide, *Andrographis paniculata*, Mouthwash, Validation

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	(3)
บทคัดย่อภาษาไทย	(4)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	(5)
สารบัญตาราง	(8)
สารบัญภาพ	(10)
อักษรย่อและสัญลักษณ์	(11)
บทที่	
1 บทนำ	1
1.1 ที่มาปัญหาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา	2
1.3 ขอบเขตของการศึกษา	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
2 ทบทวนวรรณกรรม	3
2.1 น้ำยาบ้วนปาก	3
2.2 สมุนไพรฟ้าทะลายโจร	5
2.3 หลักการโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง	7
2.4 การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์	8
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	12

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่	
3 ระเบียบวิธีการวิจัย	14
3.1 สารเคมี อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้	14
3.2 วิธีดำเนินการวิจัย	16
4 ผลการวิจัย	24
4.1 ผลการเตรียมสารสกัดฟ้าทะลายโจร	24
4.2 ผลการศึกษาสภาวะและการวิเคราะห์ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในสารสกัด	25
4.3 ผลการพัฒนาตำรับน้ำยาบ้วนปากพื้นและทดสอบความคงตัว	29
4.4 ผลการพัฒนาตำรับน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรและทดสอบความคงตัว	30
4.5 ผลการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในน้ำยาบ้วนปาก	33
4.6 ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์	34
4.7 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำยาบ้วนปากที่จำหน่ายในท้องตลาด	46
5 สรุปผลการวิจัย	47
5.1 ข้อสรุป	47
5.2 ข้อเสนอแนะ	48
รายการอ้างอิง	49
ภาคผนวก	54
ภาคผนวก โครมาโทแกรม	55

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
2.1 ส่วนประกอบของน้ำยาบ้วนปากและหน้าที่ในสูตรตำรับ	3
2.2 ข้อกำหนดคุณภาพสมุนไพรฟ้าทะลายโจร	7
2.3 เกณฑ์การยอมรับ %recovery ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	10
2.4 เกณฑ์การยอมรับ %RSD ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	11
3.1 ตำรับน้ำยาบ้วนปากพื้น สูตรมีแอลกอฮอล์	17
3.2 ตำรับน้ำยาบ้วนปากพื้น สูตรไม่มีแอลกอฮอล์	18
3.3 ตำรับน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร สูตรมีแอลกอฮอล์	19
3.4 ตำรับน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร สูตรไม่มีแอลกอฮอล์	20
3.5 ตัวอย่างน้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่จำหน่ายในท้องตลาด	23
4.1 ข้อมูลกราฟมาตรฐานของแอนโดรกราโฟไลด์	27
4.2 ผลการทดสอบความคงตัวของน้ำยาบ้วนปากพื้น MWA-1 และ MWA-2	30
4.3 ผลการทดสอบความคงตัวของน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร MWA-1-AP และ MWA-2-AP	32
4.4 ข้อมูลกราฟมาตรฐานของแอนโดรกราโฟไลด์	35
4.5 ผลการวิเคราะห์น้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร MWA-1-AP ที่มีปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ 0.0010% w/w (ความเข้มข้นต่ำ)	37
4.6 ผลการวิเคราะห์น้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร MWA-2-AP ที่มีปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ 0.0010% w/w (ความเข้มข้นต่ำ)	38
4.7 ผลการวิเคราะห์น้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร MWA-1-AP ที่มีปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ 0.0100% w/w (ความเข้มข้นกลาง)	39
4.8 ผลการวิเคราะห์น้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร MWA-2-AP ที่มีปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ 0.0100% w/w (ความเข้มข้นกลาง)	40

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง	หน้า
4.9 ผลการวิเคราะห์น้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร MWA-1-AP ที่มีปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ 0.0225% w/w (ความเข้มข้นสูง)	41
4.10 ผลการวิเคราะห์น้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร MWA-2-AP ที่มีปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ 0.0225% w/w (ความเข้มข้นสูง)	42
4.11 ผลการวิเคราะห์น้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่มีปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ 0.0001% w/w (LOD)	43
4.12 ผลการวิเคราะห์น้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่มีปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ 0.00025% w/w (LOQ)	44
4.13 สรุปผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์	45
4.14 ผลการวิเคราะห์น้ำยาบ้วนปากที่จำหน่ายในท้องตลาด	46

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
2.1 โครงสร้างของแอนโดรกราโฟไลด์	5
3.1 ตัวอย่างน้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่จำหน่ายในท้องตลาด	23
4.1 สารสกัดฟ้าทะลายโจร	24
4.2 โครมาโทแกรมของสารสกัดฟ้าทะลายโจร ความเข้มข้น 0.4 g/ml (เส้นสีฟ้า) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานแอนโดรกราโฟไลด์ ความเข้มข้น 0.1 mg/ml (เส้นสีเขียว)	26
4.3 กราฟมาตรฐานของแอนโดรกราโฟไลด์	27
4.4 residual plot ของกราฟมาตรฐาน	28
4.5 ลักษณะน้ำยาบ้วนปากพื้น MWA-1 และ MWA-2 ก่อนและหลังทดสอบความคงตัว	30
4.6 ลักษณะน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร MWA-1-AP และ MWA-2-AP ก่อนและหลังทดสอบความคงตัว	31
4.7 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานแอนโดรกราโฟไลด์ ความเข้มข้น 0.06 mg/ml	34
4.8 โครมาโทแกรมของน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร MWA-1-AP	34
4.9 โครมาโทแกรมของน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร MWA-2-AP	35
4.10 กราฟมาตรฐานของแอนโดรกราโฟไลด์	36
4.11 residual plot ของกราฟมาตรฐาน	36

อักษรย่อและสัญลักษณ์

IC ₅₀	: 50% inhibitory concentration	ความเข้มข้นของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งได้ 50%
°C	: degree Celsius	องศาเซลเซียส
%	: percent	ร้อยละ
w/w	: weight by weight	โดยน้ำหนัก
USP	: The United States Pharmacopoeia	ตำรายาของสหรัฐอเมริกา
THP	: Thai Herbal Pharmacopoeia	ตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย
psi	: pounds per square inch	ปอนด์ต่อตารางนิ้ว
PDA	: photo diode array	ไดโอดเอเรย์
mAU	: milli absorbance unit	หน่วยการดูดกลืนแสงของสาร
nm	: nanometer	นาโนเมตร
μm	: micrometer	ไมโครเมตร
mm	: millimeter	มิลลิเมตร
μl	: microliter	ไมโครลิตร
ml	: milliliter	มิลลิลิตร
μg	: microgram	ไมโครกรัม
mg	: milligram	มิลลิกรัม
g	: gram	กรัม
R ²	: coefficient of determination	สัมประสิทธิ์การตัดสินใจ
$\bar{x}$	: average	ค่าเฉลี่ย
SD	: standard deviation	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
RSD	: relative standard deviation	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์
S _{y/x}	: SD of y-intercept	ค่าเบี่ยงเบนของจุดตัดแกน y

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาปัญหาและความสำคัญ

สถานการณ์การแพร่ระบาดของโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (COVID-19) ในประเทศไทย ตั้งแต่เดือนธันวาคม 2562 จนถึงปัจจุบัน มีจำนวนผู้ป่วยไม่น้อยกว่า 3,400,000 คน และมีผู้ป่วยหลายรายไม่สามารถเข้าถึงการรักษาด้วยยาฟาวิพิราเวียร์ได้ทันเวลาที่ ทำให้อาการแย่ลงอย่างรวดเร็ว จึงมีความพยายามศึกษาสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส COVID-19 เพื่อมาทดแทนยาฟาวิพิราเวียร์ การศึกษาเบื้องต้นพบสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส COVID-19 ในหลอดทดลอง ได้แก่ ฟ้าทะลายโจร กระชาย และขิง (Kanjanasirirat et al., 2020) โดยฟ้าทะลายโจรเป็นสมุนไพรที่มีการศึกษาวิจัยทางคลินิกมากที่สุดขณะนี้ ซึ่งพบว่าสามารถลดโอกาสการเกิดปอดอักเสบได้ในผู้ป่วยที่ไม่มีอาการหรือมีอาการรุนแรงน้อย (อัมพร เบญจพลพิทักษ์ และคณะ, 2564) ฟ้าทะลายโจรแคปซูลจึงถูกบรรจุอยู่ในแนวทางเวชปฏิบัติการดูแลรักษาโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ของกรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

ปัจจุบันมีการใช้ฟ้าทะลายโจรในผลิตภัณฑ์ดูแลสุขภาพหลายชนิด เช่น ยาสีฟัน น้ำยาบ้วนปาก สเปรย์พ่นปาก เป็นต้น โดยหวังผลในการยับยั้งเชื้อไวรัส COVID-19 แต่ยังขาดข้อมูลที่ยืนยันถึงประสิทธิภาพ และผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ไม่ได้รับปริมาณฟ้าทะลายโจรหรือสารออกฤทธิ์ ผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่เป็นส่วนประกอบในน้ำยาบ้วนปาก ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ดูแลสุขภาพที่ได้รับความนิยม และมีการจำหน่ายในท้องตลาดมากรูปแบบหนึ่ง ข้อมูลจากการศึกษาวิจัยนี้จะเป็นแนวทางในการนำไปวิเคราะห์ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ที่มีส่วนผสมของสารสกัดฟ้าทะลายโจร

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

พัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณแอนโดรกราโฟไลต์ในผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของสารสกัดฟ้าทะลายโจรด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

1.3 ขอบเขตของการศึกษา

เตรียมตำรับน้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของสารสกัดฟ้าทะลายโจรทั้งรูปแบบที่มีแอลกอฮอล์และไม่มีแอลกอฮอล์ พัฒนาวิธีและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณแอนโดรกราโฟไลต์ในผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของสารสกัดฟ้าทะลายโจร โดยใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้วิธีวิเคราะห์ปริมาณแอนโดรกราโฟไลต์ในผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากที่มีความถูกต้องแม่นยำ และเป็นแนวทางสำหรับผู้ประกอบการเครื่องสำอาง เพื่อนำข้อมูลไปใช้ในการพัฒนาตำรับเครื่องสำอางที่มีส่วนผสมของสารสกัดฟ้าทะลายโจร

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

2.1 น้ำยาบ้วนปาก

น้ำยาบ้วนปาก (mouthwash) เป็นผลิตภัณฑ์ในรูปสารละลายที่ไม่ปราศจากเชื้อ โดยทั่วไปมีวัตถุประสงค์เพื่อลดปริมาณแบคทีเรียในช่องปาก กำจัดเศษอาหาร ลดกลิ่นปาก ทำให้ช่องปากสะอาด สดชื่น และเสริมประสิทธิภาพในการทำความสะอาดช่องปาก เนื่องจากสามารถแทรกซึมเข้าไประหว่างร่องฟันและซอกเหงือกได้ดี โดยใช้การอม กลั้ว และบ้วนทิ้ง

น้ำยาบ้วนปากที่จำหน่ายในท้องตลาด มีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับ (1) วัตถุประสงค์ในการใช้ คือ ใช้เป็นเครื่องสำอาง หรือใช้รักษาบรรเทาอาการในช่องปาก (2) ชนิดของสารสำคัญในการออกฤทธิ์ ซึ่งอาจใช้สารเคมีสังเคราะห์ หรือสารสกัดจากธรรมชาติ หรืออาจใช้ร่วมกัน (3) ชนิดของสารช่วยอื่น ๆ ในตำรับ เช่น แอลกอฮอล์ นอกจากเป็นสารช่วยทำละลายในตำรับแล้ว ยังสามารถฆ่าเชื้อและช่วยลด คราบหินปูนได้อีกด้วย (จริงใจ อาริมิตร และบังอร ศรีพานิชกุลชัย, 2562)

สารที่ใช้ในน้ำยาบ้วนปาก แบ่งเป็นสองกลุ่ม คือ สารพื้นฐานในสูตรตำรับน้ำยาบ้วนปากทั่วไป และตัวยาที่ผสมเพื่อวัตถุประสงค์เฉพาะ ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ส่วนประกอบของน้ำยาบ้วนปากและหน้าที่ในสูตรตำรับ

ส่วนประกอบ	หน้าที่
น้ำ	กระสายยาหลัก
แอลกอฮอล์	เพิ่มความเข้มข้นของรสชาติและความสดชื่น ช่วยละลายสารแต่งรสบางชนิด ช่วยทำความสะอาด มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและต้านการแข็งตัวของตำรับ ใช้ในความเข้มข้น 5-25% w/w

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

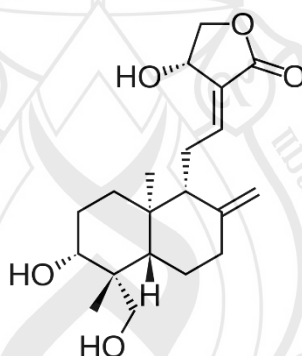
ส่วนประกอบ	หน้าที่
สารแต่งกลิ่นรส (flavors)	เพิ่มความสดชื่นและความเย็นซ่าให้กับช่องปาก นิยมใช้น้ำมันหอมระเหยเพราะระเหยสู่ช่องปากและลมหายใจได้อย่างทั่วถึง และน้ำมันหอมระเหยบางชนิดมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อโรคได้
สารคงความชุ่มชื้น (humectants)	เพิ่มความหนืดของตำรับ ช่วยป้องกันการตกผลึกของตำรับรอบฝาขวดและช่วยให้รสชาติดีขึ้น เช่น กลีเซอริน โพรพิลีนไกลคอล ซอร์บิทอล เป็นต้น ใช้ในความเข้มข้น 5-20% w/w
สารลดแรงตึงผิว (surfactants)	ช่วยละลายสารแต่งกลิ่นรส ช่วยให้เกิดฟอง ช่วยกำจัดเศษอาหารในปาก นิยมใช้ชนิดไม่มีประจุ เช่น โพลอกซาเมอร์ 407 โพลอกซาเมอร์ 338 โพลีซอร์เบต 80 โซเดียมเมทิลโคโคอิลทอเรต เป็นต้น ใช้ในความเข้มข้น 0-1% w/w
สี (colors)	แต่งสี ใช้สีสังเคราะห์ที่ละลายน้ำได้ เช่น CI 16035, CI 17200, CI 42051 หรือจากธรรมชาติ เช่น คาราเมล
สารกันเสีย (preservatives)	ป้องกันการเจริญของเชื้อ เช่น โซเดียมเบนโซเอต โพแทสเซียมซอร์เบต เมทิลพาราเบน เป็นต้น
ส่วนประกอบเพิ่มเติม :	
สารต้านแบคทีเรีย (antibacterials)	เพิ่มประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรีย
เกลือฝาดสมาน (astringent salts)	ทำปฏิกิริยากับน้ำลายและโปรตีนในเยื่อช่องปาก
คลอโรฟิลลิน (chlorophyllin)	ช่วยดับกลิ่น
สารต้านพลัค (antiplaques)	ลดการเกิดพลัค
สารต้านหินปูน (anticalculus)	ลดการเกิดหินปูน
สารป้องกันฟันผุ (anticaries)	ป้องกันการรวมตัวของเศษอาหาร ป้องกันฟันผุ
สารลดเสียวฟัน (desensitizing agents)	ลดอาการเสียวฟัน

ที่มา กิตติโชติ วรโชติกำจร (2562, หน้า 6-7)

2.2 สมุนไพรฟ้าทะลายโจร

2.2.1 สรรพคุณของฟ้าทะลายโจร

ฟ้าทะลายโจร ชื่อวิทยาศาสตร์ *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees วงศ์ Acanthaceae เป็นพืชล้มลุก ลักษณะเป็นพุ่ม ลำต้นตั้งตรง สูง 30-60 cm กิ่งก้านสีเขียว ใบเดี่ยวรูปไข่รียาว ออกดอกเป็นช่อตามซอกใบและปลายกิ่ง (คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร, ม.ป.ป.) ส่วนเหนือดินของฟ้าทะลายโจรเป็นสมุนไพรในบัญชียาจากสมุนไพรของบัญชียาหลักแห่งชาติ มีข้อบ่งใช้สำคัญ คือ บรรเทาอาการเจ็บคอ และบรรเทาอาการโรคหวัด องค์ประกอบทางเคมีของฟ้าทะลายโจรเป็นสารกลุ่มไดเทอร์ปีนแลคโตน โดยมีแอนโดรกราโฟไลด์เป็นองค์ประกอบหลัก ดังภาพที่ 2.1 และเป็นสารสำคัญที่มีผลต่อการแสดงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสมุนไพรชนิดนี้ นอกจากนี้ยังมี นิโอแอนโดรกราโฟไลด์ 14-ดีออกซี-11,12-ไดไฮโดรแอนโดรกราโฟไลด์ แอนโดรกราพานิน รวมถึงสารกลุ่มฟลาโวนอยด์อื่น ๆ (Lomlim et al., 2003)



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของแอนโดรกราโฟไลด์

ฟ้าทะลายโจรมีฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส COVID-19 ในหลอดทดลองได้ 2 กลไก คือ ทำลายไวรัสโดยตรง ทำให้ไวรัสไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ได้ โดยสารสกัดหยาบของฟ้าทะลายโจรให้ผลดีกว่าแอนโดรกราโฟไลด์ที่เป็นสารเดี่ยว ($IC_{50} < 1$ และ $13.5 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ) และยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสในเซลล์ โดยแอนโดรกราโฟไลด์ที่เป็นสารเดี่ยวให้ผลดีกว่าสารสกัดหยาบของฟ้าทะลายโจร ($IC_{50} = 0.64$ และ $3.02 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ) (สุภาพร ภูมิอมร, 2564) นอกจากนี้ มีการศึกษาอื่นหลังพบว่า การรับประทานฟ้าทะลายโจรที่มีแอนโดรกราโฟไลด์ 180 mg/วัน สามารถลดโอกาสการเกิดปอดอักเสบได้ในผู้ป่วยที่ไม่มีอาการหรือมีอาการรุนแรงน้อย (อัมพร เบญจพลพิทักษ์ และคณะ, 2564)

2.2.2 คุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของแอนโดรกราโฟไลต์

แอนโดรกราโฟไลต์เป็นผลึกสีขาว ไม่มีกลิ่น มีรสขม ละลายน้ำได้น้อย แต่ละลายได้ดีใน แอลกอฮอล์ ตัวทำละลายที่สามารถสกัดแอนโดรกราโฟไลต์จากฟ้าทะลายโจรได้มากที่สุด คือ เมทานอล และเอทานอล รองลงมา คือ คลอโรฟอร์ม 50% เอทานอล และเฮกเซน ตามลำดับ (เมทินี หลิมศิริวงศ์ และคณะ, 2562)

เมื่ออยู่ในรูปที่เป็นผลึกของแข็งมีความคงตัวดีมาก ไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางเคมี หลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 70 °C นาน 1 เดือน (Lomlim et al., 2003) มีความคงตัวดีในช่วง pH 3-5 และความคงตัวลดลงเมื่อ pH สูงขึ้นหรืออยู่ในสภาวะที่เป็นด่าง (Yan et al., 2018) ในรูปสารสกัดน้ำ ฟ้าทะลายโจรเข้มข้นที่มีปริมาณแอนโดรกราโฟไลต์ 2.92% w/w หลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 40, 50 และ 60 °C นาน 1 เดือน เมื่อสิ้นสุดการทดสอบมีปริมาณแอนโดรกราโฟไลต์ 2.88, 2.67 และ 2.39% w/w ตามลำดับ (บัณฑิตย เติ่งเจริญกุล และคณะ, 2550) แสดงว่า ความคงตัวของแอนโดรกราโฟไลต์ มีแนวโน้มลดลงเมื่ออยู่ในสารสกัดน้ำ

2.2.3 การวิเคราะห์แอนโดรกราโฟไลต์

การวิเคราะห์ปริมาณแอนโดรกราโฟไลต์ในสมุนไพรฟ้าทะลายโจร โดยทั่วไปมักอ้างอิงจาก ตำรายาของสหรัฐอเมริกา ฉบับที่ 39 (USP39) หรือตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย 2021 (THP 2021) ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดย USP 39 ใช้วัฏภาคคงที่เป็นคอลัมน์ C18 วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นฟอสเฟตบัฟเฟอร์และอะซิโตนไตรล์ ปรับสัดส่วนแบบเกรเดียนท์ และตรวจวัดด้วยอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 223 nm (The United States Pharmacopoeia Convention, 2016) ส่วน THP 2021 ใช้วัฏภาคคงที่เป็นคอลัมน์ C18 วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นน้ำและเมทานอล ในสัดส่วนคงที่ 50 : 50 และตรวจวัดด้วยอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 224 nm (Department of Medical Sciences, 2021)

การวิเคราะห์ปริมาณแอนโดรกราโฟไลต์ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง จากตำรามาตรฐานสมุนไพรไทยทางเครื่องสำอาง เล่ม 1 วิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เตรียมสารละลาย ตัวอย่างโดยชั่งตัวอย่าง 0.1-0.5 g ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 ml เติมนเมทานอล 10 ml ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน และปรับปริมาตรจนครบด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็นคอลัมน์ C18 วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นน้ำและอะซิโตนไตรล์ ปรับสัดส่วนแบบเกรเดียนท์ และตรวจวัดด้วยอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 210 nm (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2561)

2.2.4 ข้อกำหนดมาตรฐานที่เกี่ยวข้อง

THP 2021 ระบุข้อกำหนดทางเคมี-ฟิสิกส์ของสมุนไพรฟ้าทะลายโจร เพื่อใช้เป็นแนวทางในการควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบสมุนไพรชนิดนี้ ดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ข้อกำหนดคุณภาพสมุนไพรฟ้าทะลายโจร

รายการทดสอบ	ข้อกำหนด (% w/w)
ปริมาณความชื้น	ไม่เกิน 11.0
ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด	ไม่เกิน 2.0
ปริมาณสารสกัดด้วย 85% เอทานอล	ไม่น้อยกว่า 13.0
ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ	ไม่น้อยกว่า 18.0
ปริมาณแลคโตนรวม	ไม่น้อยกว่า 6.0
ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์	ไม่น้อยกว่า 1.0

ที่มา Department of Medical Sciences (2021)

2.3 หลักการโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

High performance liquid chromatography (HPLC) เป็นเทคนิคการแยกและวิเคราะห์สารประกอบที่ผสมอยู่ในตัวอย่าง กระบวนการแยกสารประกอบเกิดจากวัฏภาคเคลื่อนที่ซึ่งเป็นของเหลวที่มีความดันสูงดันสารต่าง ๆ เคลื่อนที่ผ่านไปยังวัฏภาคคงที่ซึ่งเป็นคอลัมน์ วัฏภาคคงที่ที่มีแรงหน่วง (retention force) ต่อสารแต่ละชนิดแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับขนาด รูปร่าง ประจุ ความจำเพาะ (specificity) การดูดซับ (adsorption) และการละลาย (solubility) จึงทำให้โมเลกุลของสารแต่ละชนิดเคลื่อนที่ออกมาจากคอลัมน์ในเวลาหน่วง (retention time) ที่แตกต่างกัน (ชูชาติ อารีจิตรานุสรณ์, ม.ป.ป.) เมื่อสารเคลื่อนที่ผ่านเข้าสู่ตัวตรวจวัดสัญญาณ (detector) สัญญาณที่บันทึกได้จะมีลักษณะเป็นพีค (peak) ซึ่งเรียกว่าโครมาโทแกรม (chromatogram) การวิเคราะห์ผลจะคำนวณพื้นที่ใต้พีคของสารเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานจึงจะทราบปริมาณของสารตัวอย่างนั้น

Ultra high performance liquid chromatography (UHPLC/UPLC) เป็นเทคนิคการแยกและวิเคราะห์ปริมาณสารที่พัฒนาต่อมาจากเทคนิค HPLC โดยการออกแบบเครื่องมือให้สามารถทำงานได้ที่ความดันสูงถึง 15,000 psi และใช้คอลัมน์ที่บรรจุอนุภาคขนาดเล็กกว่า 2 μm ทำให้ประสิทธิภาพของการแยก (resolution) ดีขึ้น สามารถใช้คอลัมน์ที่สั้นลงโดยไม่ทำให้ประสิทธิภาพในการแยกลดลง ทำให้เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์และปริมาณตัวทำละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ลดลงด้วย (อารีย์ คมฤทธิ์ และปัทมา นพรัตน์, 2551)

2.4 การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

การทดสอบความถูกต้องของวิธี (method validation) หมายถึง กระบวนการทดสอบความสามารถของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น หรือดัดแปลงมาจากวิธีมาตรฐาน เพื่อแสดงหลักฐานว่ามีความเหมาะสมในการนำวิธีวิเคราะห์นั้นไปใช้งาน

2.4.1 ขั้นตอนการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (ทิพวรรณ นิงน้อย, 2549)

2.4.1.1 กำหนดวัตถุประสงค์ เช่น เพื่อใช้ยืนยันความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ หรือใช้ในการศึกษาความสามารถของนักวิเคราะห์

2.4.1.2 กำหนดประเภทของวิธีและการนำวิธีไปใช้งาน เช่น ใช้สำหรับการวิเคราะห์เชิงคุณภาพหรือเชิงปริมาณ ผลการวิเคราะห์จะนำไปใช้งานประเภทใด

2.4.1.3 กำหนดขอบเขตหรือคุณลักษณะเฉพาะของวิธีวิเคราะห์ อาจเลือกบางรายการหรือทุกรายการขึ้นกับวิธีวิเคราะห์

1. วิธีวิเคราะห์ทั่วไป (ไม่มีมาตรฐานหรือสารอ้างอิง) ทดสอบความเที่ยง

2. วิธีวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (มีมาตรฐานหรือสารอ้างอิง) อาจทดสอบบางรายการ

3. วิธีวิเคราะห์เชิงปริมาณ (มีมาตรฐานหรือสารอ้างอิง) ควรทดสอบทุกรายการ

2.4.1.4 กำหนดความต้องการทางเทคนิค เช่น เครื่องมือ มาตรฐาน สารเคมี เป็นต้น

2.4.1.5 กำหนดเงื่อนไขที่จำเป็นซึ่งมีผลต่อการวิเคราะห์

2.4.1.6 ดำเนินการทดสอบคุณลักษณะเฉพาะของวิธีวิเคราะห์

2.4.1.7 คำนวณและประเมินผลโดยใช้สถิติที่เหมาะสม

2.4.1.8 ทบทวนผลและหากพบว่ามีคุณลักษณะเฉพาะอย่างใดอย่างหนึ่งไม่ผ่านเกณฑ์ยอมรับ ควรหาสาเหตุที่ทำให้เกิดความผิดพลาด อาจทดสอบใหม่หรือปรับเปลี่ยนวิธีทดสอบ

2.4.1.9 สรุปผลการทดสอบและจัดทำรายงาน

2.4.2 คุณลักษณะเฉพาะของวิธีวิเคราะห์ (International Conference on Harmonization [ICH], 2005 และทิพวรรณ นิ่งน้อย, 2549)

2.4.2.1 ความจำเพาะเจาะจง (specificity/selectivity)

ความจำเพาะเจาะจง หมายถึง ความสามารถของวิธีวิเคราะห์ที่จำเพาะต่อสารที่ต้องการวิเคราะห์ โดยไม่มีการรบกวนจากสารแปลกปลอมอื่นในตัวอย่าง ทำการทดสอบโดย

1. กรณีที่มี matrix blank ให้วิเคราะห์ matrix blank กับ spiked matrix blank ถ้าสัญญาณของ matrix blank น้อยมากเมื่อเทียบกับสัญญาณของ spiked matrix blank แสดงว่าไม่มีการรบกวนจากสารอื่นในตัวอย่าง โดยแสดงผลการเปรียบเทียบให้ชัดเจน เช่น โครมาโทแกรม สเปกตรัม เป็นต้น

2. กรณีที่ไม่มี matrix blank ให้วิเคราะห์ตัวอย่างและยืนยันด้วยข้อมูลสเปกตรัม เช่น ultraviolet (UV), mass spectrometry (MS), optical emission spectrometry (OES) เป็นต้น โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

2.4.2.2 ความเป็นเส้นตรง (linearity) และช่วงของการใช้งาน (working range)

ความเป็นเส้นตรง หมายถึง ความสามารถของวิธีวิเคราะห์ที่แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างค่าสัญญาณที่วัดได้จากเครื่องมือและความเข้มข้นหรือปริมาณของสารในช่วงที่กำหนด และช่วงของการใช้งาน หมายถึง ช่วงของความเข้มข้นที่วิธีวิเคราะห์นั้นตรวจวัดสารที่ต้องการวิเคราะห์ได้ ทำการทดสอบโดยกำหนดช่วงของกราฟมาตรฐานให้ครอบคลุมความเข้มข้นที่ต้องการ เตรียมสารละลายมาตรฐานให้มีความเข้มข้นอย่างน้อย 5 ระดับ วัดค่าสัญญาณโดยเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ สร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ โดยกำหนดให้แกน x เป็นความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน และแกน y เป็นค่าสัญญาณที่วัดได้ ประเมินความเป็นเส้นตรง สร้าง regression line และหาค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, R^2) ซึ่งมีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 1 ค่า R^2 ที่ได้ควรเข้าใกล้ 1 จึงแสดงว่า x สามารถอธิบายการเปลี่ยนแปลงของ y ได้ดี

2.4.2.3 ความแม่นยำ (accuracy)

ความแม่นยำ หมายถึง ค่าที่แสดงความใกล้เคียงระหว่างผลการวิเคราะห์และค่าจริง (true value) หรือค่าอ้างอิง (reference value) ทำการทดสอบโดยการเติมสารที่มีความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ในช่วงการใช้งาน ลงในเนื้อตัวอย่างซึ่งไม่มีสารที่สนใจ จากนั้นวิเคราะห์ตัวอย่างตามขั้นตอนวิธีวิเคราะห์ และคำนวณปริมาณสารที่ได้ ในรูปร้อยละการกลับคืน (%recovery)

$$\%recovery = \frac{(\text{ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ได้})}{(\text{ความเข้มข้นของสารที่เติมจริง})} \times 100$$

เกณฑ์การยอมรับ ใช้ตาม Association of Official Analytical Chemists [AOAC] International (2019) ดังตารางที่ 2.3 หรือใช้ค่าอ้างอิงเฉพาะของการวิเคราะห์แต่ละประเภท

ตารางที่ 2.3 เกณฑ์การยอมรับ %recovery ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้น (%)	%recovery
100	98-102
10	98-102
1	97-103
0.1	95-105
0.01	90-107
0.001	80-110
0.0001	80-110
0.00001	80-110
0.000001	60-115
0.0000001	40-120

ที่มา AOAC International (2019)

2.4.2.4 ความเที่ยง (precision)

ความเที่ยง หมายถึง ค่าที่แสดงความใกล้เคียงของผลการวิเคราะห์ซ้ำภายใต้สภาวะที่กำหนด แบ่งเป็นหลายแบบ ได้แก่

1. repeatability หมายถึง ความเที่ยงเมื่อวิเคราะห์ซ้ำโดยวิธีเดียวกันในห้องปฏิบัติการเดียวกัน นักวิเคราะห์คนเดียวกัน และเครื่องมือเดียวกัน ในช่วงเวลาเดียวกัน
2. intermediate precision หมายถึง ความเที่ยงเมื่อวิเคราะห์ซ้ำโดยวิธีเดียวกันในห้องปฏิบัติการเดียวกัน ภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน เช่น นักวิเคราะห์ เครื่องมือ และช่วงเวลา เป็นต้น
3. reproducibility หมายถึง ความเที่ยงเมื่อวิเคราะห์ซ้ำโดยวิธีเดียวกัน ภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน ได้แก่ นักวิเคราะห์ เครื่องมือ และห้องปฏิบัติการ

โดยทั่วไปความเที่ยงจะแสดงในรูปร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, %RSD) ซึ่งเป็นค่าที่บอกความคลาดเคลื่อนของผลการวิเคราะห์ เช่นเดียวกับค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) แต่นิยมแสดงเป็นค่าร้อยละ จึงใช้เปรียบเทียบความคลาดเคลื่อนที่ความเข้มข้นต่างระดับ และบอกความเที่ยงของวิธีได้

$$\%RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100$$

เกณฑ์การยอมรับ ใช้ตาม AOAC International (2019) ดังตารางที่ 2.4 หรือใช้ค่าอ้างอิงเฉพาะของการวิเคราะห์แต่ละประเภท

ตารางที่ 2.4 เกณฑ์การยอมรับ %RSD ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้น (%)	%RSD
100	1.3
10	1.9
1	2.7
0.1	3.7
0.01	5.3
0.001	7.3
0.0001	11
0.00001	15
0.000001	21
0.0000001	30

ที่มา AOAC International (2019)

2.4.2.5 ขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD)

ขีดจำกัดของการตรวจพบ หมายถึง ความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่สามารถตรวจสอบได้ แต่ไม่จำเป็นต้องหาปริมาณได้อย่างถูกต้อง ทำการทดสอบได้หลายแบบ เช่น

1. คำนวณจากสัญญาณของ sample blank อย่างน้อย 6 ซ้ำ คำนวณค่า LOD = ความเข้มข้นของ sample blank + 3SD

2. คำนวณจากสัญญาณของ spiked sample ที่มีความเข้มข้นต่ำสุดที่ยอมรับได้ เช่น ระดับ LOQ หรือระดับต่ำสุดของกราฟมาตรฐาน อย่างน้อย 6 ซ้ำ คำนวณค่า LOD = 3SD

3. คำนวณจากจุดตัดของกราฟมาตรฐาน โดยสร้างกราฟมาตรฐานในช่วงการใช้งาน วิเคราะห์อย่างน้อย 3 ซ้ำ คำนวณค่า LOD = จุดตัดแกน $y + 3S_{y/x}$ โดยที่ $S_{y/x}$ คือ SD ของจุดตัดแกน y

2.4.2.6 ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ)

ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ หมายถึง ความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่สามารถหาปริมาณได้โดยที่มีความแม่นยำและความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ คำนวณ LOQ เช่นเดียวกับ LOD โดยประมาณค่าจาก 10SD หรือ $10S_{y/x}$ ที่ได้จากการหาค่า LOD

2.4.2.7 ความทน (robustness)

ความทน หมายถึง ความสามารถของวิธีวิเคราะห์ที่ยังให้ผลการวิเคราะห์ที่ยอมรับได้ เมื่อตัวแปรหรือเงื่อนไขบางอย่างที่กำหนดไว้ในวิธีมีการเปลี่ยนแปลงไปเล็กน้อย เช่น การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิหรือความเป็นกรดต่าง ให้ผลการวิเคราะห์ไม่แตกต่างกัน โดยพิจารณาความใช้ได้ของความแม่นยำและความเที่ยง

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.5.1 การคัดกรองหาสารสกัดสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต้านไวรัส COVID-19 ด้วยวิธี plaque reduction assay ของ Kanjanasirirat et al. (2020) โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง Vero E6 ที่ติดเชื้อไวรัสดังกล่าวมาทดสอบกับสารสกัดหยาบและสารประกอบบริสุทธิ์ที่ได้จากสมุนไพรไทยรวม 122 ชนิด พบว่า สารสกัดหยาบ 2 ชนิด ได้แก่ กระชาย (*Boesenbergia rotunda*) และขิง (*Zingiber officinale*) และสารประกอบบริสุทธิ์ 2 ชนิด ได้แก่ แอนโดรกราโฟไลด์และแพนดราดินเอ แสดงฤทธิ์ยับยั้งไวรัส COVID-19 ได้ไม่น้อยกว่า 99%

2.5.2 การศึกษาฤทธิ์ต้านไวรัส COVID-19 ในหลอดทดลองของสมุนไพรฟ้าทะลายโจรโดยสุภาพร ภูมิอมร (2564) ได้ศึกษาเปรียบเทียบตัวอย่างทดสอบ 2 กลุ่ม คือ แอนโดรกราโฟไลด์ที่เป็นสารเดี่ยว และสารสกัดหยาบของฟ้าทะลายโจรจากองค์การเภสัชกรรม โดยศึกษา 3 กลไก ได้แก่

2.5.2.1 การป้องกันเซลล์จากการติดเชื้อ (cell protection test) โดยใส่ตัวอย่างทดสอบลงไปในเซลล์เพาะเลี้ยง จากนั้นใส่ไวรัสเข้าไปในเซลล์เพื่อให้เกิดการติดเชื้อ พบว่า ทั้งแอนโดรกราโฟไลด์และสารสกัดหยาบของฟ้าทะลายโจรไม่มีฤทธิ์ป้องกันเซลล์จากการติดเชื้อ

2.5.2.2 การทำลายเชื้อไวรัสโดยตรง (viral inactivation test) โดยนำตัวอย่างทดสอบผสมกับไวรัสโดยตรง เพื่อดูว่าไวรัสสามารถเพิ่มจำนวนภายในเซลล์ได้หรือไม่ พบว่า สารสกัดหยาบของฟ้าทะลายโจรมีฤทธิ์ทำลายไวรัสได้ดีกว่าแอนโดรกราโฟไลด์ที่เป็นสารเดี่ยว ($IC_{50} < 1$ และ $13.5 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ)

2.5.2.3 การยับยั้งการเพิ่มจำนวนไวรัสในเซลล์ (antiviral test) โดยนำไวรัสเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย จากนั้นใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมตัวอย่างทดสอบ เพื่อดูว่ามีผลในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนไวรัสในเซลล์หรือไม่ พบว่า ทั้งแอนโดรกราโฟไลด์และสารสกัดหยาบของฟ้าทะลายโจรมีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสในเซลล์ ($IC_{50} = 0.64$ และ $3.02 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ)

2.5.3 การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์แอนโดรกราโฟไลด์ในฟ้าทะลายโจรด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงของเมทีนี หลิมศิริวงษ์ และคณะ (2562) โดยใช้ตัวตรวจวัดชนิดไดโอดเอเรย์ ร่วมกับแมสสเปกโตรมิเตอร์ ภูมิภาคคงที่เป็นคอลัมน์ C18 ภูมิภาคเคลื่อนที่เป็น 0.050% กรดฟอร์มิกในน้ำ และ 0.025% กรดฟอร์มิกในอะซิโตนไตรล์ ปรับสัดส่วนแบบเกรเดียนท์ อัตราการไหล 0.5 mL/min ตรวจวัดด้วยอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 223 nm สามารถแยกสารแอนโดรกราโฟไลด์ออกจากสารกลุ่มไดเทอร์ปีนแลคโตนอื่น ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีความแม่นยำและความเที่ยง ความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ รวมทั้งความคงทนต่อสภาวะที่มีการเปลี่ยนแปลงตามหลักเกณฑ์การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ของ USP และ ICH guidelines

บทที่ 3

ระเบียบวิธีการวิจัย

3.1 สารเคมี อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้

3.1.1 สารเคมีและวัตถุดิบ

- 3.1.1.1 ฟ้ายละลายเจอร์ส่วนเหนือดินอบแห้ง (มวกเหล็ก, สระบุรี, ประเทศไทย)
- 3.1.1.2 สารมาตรฐานแอนโดรกราโฟไลด์ ความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่า 98%
(DMSc, ประเทศไทย)
- 3.1.1.3 เมทานอล สำหรับงานโครมาโทกราฟของเหลวสมรรถนะสูง
(RCI Labscan, ประเทศไทย)
- 3.1.1.4 95% เอทานอล สำหรับงานอาหาร (SML Chemrich, ประเทศไทย)
- 3.1.1.5 กลีเซอริน (MySkinRecipes, ประเทศไทย)
- 3.1.1.6 โพลอกซาเมอร์ 407 (MySkinRecipes, ประเทศไทย)
- 3.1.1.7 โซเดียมแซ็กคาริน (Xining, สาธารณรัฐประชาชนจีน)
- 3.1.1.8 โซเดียมเบนโซเอต (trc canada, ประเทศแคนาดา)
- 3.1.1.9 แคลเซียมกลีเซอโรฟอสเฟต (MySkinRecipes, ประเทศไทย)
- 3.1.1.10 ซิงค์แลกเตท (MySkinRecipes, สาธารณรัฐประชาชนจีน)
- 3.1.1.11 ลอริลปีเทน (AK ChemTech, สาธารณรัฐเกาหลี)
- 3.1.1.12 70% ซอร์บิทอล (MySkinRecipes, ประเทศไทย)
- 3.1.1.13 โคควาเฟรช® 4 (Sensient, ประเทศสิงคโปร์)
- 3.1.1.14 โซลูบิลิแซนท แอลอาร์ไอ® (Sensient, ประเทศสิงคโปร์)
- 3.1.1.15 สารแต่งกลิ่นรสเปปเปอร์มินต์ (MySkinRecipes, ประเทศไทย)
- 3.1.1.16 ยูนิเซิร์ท® เยลโล่ (Sensient, ประเทศสิงคโปร์)
- 3.1.1.17 ยูนิเซิร์ท® บลู (Sensient, ประเทศสิงคโปร์)
- 3.1.1.18 น้ำปราศจากไอออน (PURELAB ultra, ELGA, ประเทศเยอรมนี)

3.1.2 เครื่องมือ

- 3.1.2.1 เครื่องโครมาโทกราฟของเหลวสมรรถนะสูง
(1290 Infinity II, Agilent, ประเทศเยอรมนี)
- 3.1.2.2 เครื่องชั่งไฟฟ้า 5 ตำแหน่ง (XPR205DR, Mettler-Toledo, สมาพันธรัฐสวิส)
- 3.1.2.3 เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (S220, Mettler-Toledo, ประเทศเยอรมนี)
- 3.1.2.4 เครื่องระเหยสุญญากาศ (N-1000, Eyla, ประเทศญี่ปุ่น)
- 3.1.2.5 ตู้อบสุญญากาศ (VD 56, BINDER, ประเทศเยอรมนี)
- 3.1.2.6 ตู้อบลมร้อน (FED 115, BINDER, ประเทศเยอรมนี)
- 3.1.2.7 ตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิ (MPR-722, PHCbi, ประเทศญี่ปุ่น)

3.1.3 อุปกรณ์

- 3.1.3.1 คอลัมน์ InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 ขนาด 2.1×50 mm, $1.9 \mu\text{m}$
(Agilent, ประเทศเยอรมนี)
- 3.1.3.2 ไมโครปิเปต ขนาด 10-100 และ 100-1,000 μl
(Eppendorf, ประเทศเยอรมนี)
- 3.1.3.3 ขวดวัดปริมาตร (Pyrex, ประเทศเยอรมนี)
- 3.1.3.4 ขวดรูปชมพู่ชนิดมีฝาปิด (Duran, ประเทศเยอรมนี)
- 3.1.3.5 ขวดก้นกลม (Witeg, ประเทศเยอรมนี)
- 3.1.3.6 หัวกรองอนุภาคชนิดไนลอน ขนาด $0.22 \mu\text{m}$
(Membrane Solutions, สาธารณรัฐประชาชนจีน)
- 3.1.3.7 กระดาษกรอง เบอร์ 1 (Whatman, สหราชอาณาจักร)
- 3.1.3.8 กระบอกตวง (Pyrex, ประเทศเยอรมนี)
- 3.1.3.9 ปีกเกอร์ (Pyrex, ประเทศเยอรมนี)

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 การเตรียมสารสกัดฟ้าทะลายโจร

เตรียมสารสกัดฟ้าทะลายโจร โดยชั่งผงฟ้าทะลายโจร 10 g ลงในขวดรูปชมพู่ชนิดมีฝาปิดเต็ม 95% เอทานอล 100 ml เขย่าต่อเนื่องเป็นเวลา 6 ชั่วโมง แช่สกัดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง กรองสารละลายที่ได้ลงในขวดกันกลม ระเหยแห้งโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rafi et al., 2020) และอบแห้งโดยใช้ตู้อบสุญญากาศ บันทึกน้ำหนักสารสกัดที่ได้ คำนวณร้อยละผลที่ได้

3.2.2 การศึกษาสภาวะและการวิเคราะห์ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในสารสกัด

ทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในสารสกัดฟ้าทะลายโจร ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

3.2.2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน โดยชั่งสารมาตรฐานแอนโดรกราโฟไลด์ ละลาย และเจือจางโดยใช้ตัวทำละลายเป็นเมทานอลและน้ำ ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.001-1.0 mg/ml

3.2.2.2 เตรียมสารละลายตัวอย่าง โดยชั่งสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ได้จากข้อ 3.2.1 ละลายโดยใช้ตัวทำละลายเป็นเมทานอลและน้ำ ให้มีความเข้มข้นประมาณ 0.5-1.0 mg/ml

3.2.2.3 ฉีดสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างที่ได้ เข้าสู่ระบบโครมาโทกราฟี โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นเมทานอลและน้ำ พิจารณาลักษณะโครมาโทแกรมที่ได้ และปรับสัดส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ให้มีความเหมาะสม

3.2.2.4 สร้างกราฟมาตรฐาน โดยกำหนดให้แกน x เป็นความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน และแกน y เป็นค่าสัญญาณที่วัดได้ (พื้นที่ใต้พีค) พิจารณาเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายมาตรฐาน ซึ่งให้กราฟมาตรฐานที่มีความเป็นเส้นตรงและครอบคลุมความเข้มข้นของตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์

3.2.2.5 ประเมินความเป็นเส้นตรง ขีดจำกัดของการตรวจพบ และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ

3.2.2.6 วิเคราะห์ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่เตรียมได้

3.2.3 การพัฒนาตำรับน้ำยาบ้วนปากพื้นและทดสอบความคงตัว

3.2.3.1 พัฒนาตำรับน้ำยาบ้วนปากพื้น สูตรมีแอลกอฮอล์ (รหัส MWA-1) โดยมีส่วนประกอบดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ตำรับน้ำยาบ้วนปากพื้น สูตรมีแอลกอฮอล์

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (% w/w)	หน้าที่
	MWA-1	
เอทิลแอลกอฮอล์	10.00	สารช่วยทำละลาย
กลีเซอริน	10.00	สารคงความชุ่มชื้น
โพลอกซาเมอร์ 407	2.00	สารลดแรงตึงผิว
โซเดียมแซ็กคาริน	0.05	สารให้ความหวาน
โซเดียมเบนโซเอต	0.10	สารกันเสีย
สารแต่งกลิ่นรสเปเปอร์มินต์	0.25	สารแต่งกลิ่นรส
ยูนิเชิร์ท® เยลโล่	0.20	สารแต่งสี
ยูนิเชิร์ท® บลู	0.20	สารแต่งสี
น้ำ	75.40	ตัวทำละลายหลัก
รวม	100.00	

ที่มา กิตติโชติ วรโชติกำจร (2562, หน้า 14)

วิธีการเตรียมตำรับ MWA-1

ละลายโพลอกซาเมอร์ 407 ในน้ำ 50 g และละลายกลีเซอรินในน้ำ 30 g ผสมทั้งสองส่วนให้เข้ากัน เติมโซเดียมแซ็กคาริน โซเดียมเบนโซเอต และแอลกอฮอล์ ผสมให้เข้ากันตามลำดับ แต่งรสกลิ่นสี และเติมน้ำให้ครบ 100 g

3.2.3.2 พัฒนาตำรับน้ำยาบ้วนปากพื้น สูตรไม่มีแอลกอฮอล์ (รหัส MWAF-1 และ MWAF-2) โดยมีส่วนประกอบดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ตำรับน้ำยาบ้วนปากพื้น สูตรไม่มีแอลกอฮอล์

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (% w/w)		หน้าที่
	MWAF-1	MWAF-2	
แคลเซียมกลีเซอโรฟอสเฟต	0.50	0.50	สารป้องกันฟันผุ
ซิงค์แลคเตท	0.20	0.20	สารลดกลิ่นปาก
ลอริลปีเทน	0.20	0.20	สารลดแรงตึงผิว
โซเดียมแซ็กคาริน	0.03	0.03	สารให้ความหวาน
โซเดียมเบนโซเอต	0.30	0.30	สารกันเสีย
ซอร์บิทอล	30.00	20.00	สารคงความชุ่มชื้น
โพรพิลีนไกลคอล	-	10.00	สารคงความชุ่มชื้น
เมนทิลแลคเตท, พีพีจี-26-บิวเทต-26, ฟิอีจี-40 ไฮโดรจีเนท แคสเตอร์ออยล์ (โควาเพรช® 4)	2.00	2.00	สารให้ความรู้สึกเย็น
พีพีจี-26-บิวเทต-26, ฟิอีจี-40 ไฮโดรจีเนท แคสเตอร์ออยล์, น้ำ (โซลูบิลแซนท์ แอลอาร์ไอ®)	1.00	1.00	สารช่วยทำละลาย
สารแต่งกลิ่นรสเปปเปอร์มินต์	0.20	0.20	สารแต่งกลิ่นรส
ยูนิเซิร์ท® เยลโล่	0.20	0.20	สารแต่งสี
ยูนิเซิร์ท® บลู	0.20	0.20	สารแต่งสี
น้ำ	65.17	65.17	ตัวทำละลายหลัก
รวม	100.00	100.00	

ที่มา Jebsen & Jessen (2020)

วิธีการเตรียมตำรับ MWAF-1 และ MWAF-2

ละลายแคลเซียมกลีเซอโรฟอสเฟตในน้ำ 20 g และละลายซิงค์แลคเตทในน้ำ 20 g ผสมทั้งสองส่วนให้เข้ากัน เติมลอริลปีเทน โซเดียมแซ็กคาริน โซเดียมเบนโซเอต ซอร์บิทอล และโพรพิลีนไกลคอล (ถ้ามี) ผสมให้เข้ากันตามลำดับ แต่งรสกลิ่นสี และเติมน้ำให้ครบ 100 g

3.2.3.3 ประเมินคุณลักษณะทั่วไปของน้ำยาบ้วนปากพื้น โดยสังเกตลักษณะปรากฏ กลิ่น สี ความใสด้วยตาเปล่า วัดความเป็นกรดต่าง (pH) ก่อนและหลังทดสอบความคงตัวระยะสั้น (intrinsic stability) โดยเก็บผลิตภัณฑ์ในตู้บ่มร้อนที่อุณหภูมิ $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และย้ายไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำซ้ำ 6 รอบ (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2563)

3.2.4 การพัฒนาตำรับน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรและทดสอบความคงตัว

3.2.4.1 พัฒนาตำรับน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร สูตรมีแอลกอฮอล์ (รหัส MWA-1-AP) โดยมีส่วนประกอบดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 ตำรับน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร สูตรมีแอลกอฮอล์

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (% w/w)	หน้าที่
	MWA-1-AP	
สารสกัดฟ้าทะลายโจร	x	สารออกฤทธิ์
เอทิลแอลกอฮอล์	10.00	สารช่วยทำละลาย
กลีเซอริน	10.00	สารคงความชุ่มชื้น
โพลอกซาเมอร์ 407	2.00	สารลดแรงตึงผิว
โซเดียมแซ็กคาริน	0.05	สารให้ความหวาน
โซเดียมเบนโซเอต	0.10	สารกันเสีย
สารแต่งกลิ่นรสเปเปอร์มินต์	0.25	สารแต่งกลิ่นรส
ยูนิเซิร์ท® เยลโล่	0.20	สารแต่งสี
ยูนิเซิร์ท® บลู	0.20	สารแต่งสี
น้ำ	75.40	ตัวทำละลายหลัก
รวม	100.00	

วิธีการเตรียมตำรับ MWA-1-AP

จากการศึกษาของสุภาพร ภูมิอมร (2564) ซึ่งได้ค่า IC_{50} ของแอนโดรกราโฟไลด์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส COVID-19 ในหลอดทดลอง เท่ากับ $13.5 \mu\text{g/ml}$ หากต้องการตำรับน้ำยาบ้วนปาก 100 g ที่มีปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในตำรับ เป็นสิบเท่าของค่า IC_{50} จะเท่ากับ $135 \mu\text{g/ml}$ หรือคิดเป็น 0.0135% w/w (โดยประมาณ)

ชั่งสารสกัดฟ้าทะลายโจรมา $\times$ g เพื่อให้มีปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ 0.0135 g ละลายด้วยแอลกอฮอล์ 10 g เพื่อเตรียมไว้ผสมในตำรับ จากนั้นเตรียมตำรับเช่นเดียวกับ MWA-1

3.2.4.2 พัฒนารับน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร สูตรไม่มีแอลกอฮอล์ (รหัส MWA-1-AP และ MWA-2-AP) โดยมีส่วนประกอบดังตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 ตำรับน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร สูตรไม่มีแอลกอฮอล์

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (% w/w)		หน้าที่
	MWA-1-AP	MWA-2-AP	
สารสกัดฟ้าทะลายโจร	$\times$	$\times$	สารออกฤทธิ์
แคลเซียมกลีเซอโรฟอสเฟต	0.50	0.50	สารป้องกันฟันผุ
ซิงค์แลคเตท	0.20	0.20	สารลดกลิ่นปาก
ลอรีลบีเทน	0.20	0.20	สารลดแรงตึงผิว
โซเดียมแซ็กคาริน	0.03	0.03	สารให้ความหวาน
โซเดียมเบนโซเอต	0.30	0.30	สารกันเสีย
ซอร์บิทอล	30.00	20.00	สารคงความชุ่มชื้น
โพรพิลีนไกลคอล	-	10.00	สารคงความชุ่มชื้น
เมนทิลแลคเตท, พีพีจี-26-บิวเทต-26, พีโอจี-40 ไฮโดรจีเนท แคสเตอร์ออยล์ (โควาเฟรซ® 4)	2.00	2.00	สารให้ความรู้สึกเย็น
พีพีจี-26-บิวเทต-26, พีโอจี-40 ไฮโดรจีเนท แคสเตอร์ออยล์, น้ำ (โซลูบิลิแซนท แอลอาร์ไอ®)	1.00	1.00	สารช่วยทำละลาย
สารแต่งกลิ่นรสเปเปอร์มินต์	0.20	0.20	สารแต่งกลิ่นรส
ยูนิเซิร์ท® เยลโล่	0.20	0.20	สารแต่งสี
ยูนิเซิร์ท® บลู	0.20	0.20	สารแต่งสี
น้ำ	65.17	65.17	ตัวทำละลายหลัก
รวม	100.00	100.00	

วิธีการเตรียมตำรับ MWAf-1-AP และ MWAf-2-AP

จากการศึกษาของสุภาพร ภูมิอมร (2564) ซึ่งได้ค่า IC_{50} ของแอนโดรกราโฟไลด์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส COVID-19 ในหลอดทดลอง เท่ากับ $13.5 \mu\text{g/ml}$ หากต้องการตำรับน้ำยาบ้วนปาก 100 g ที่มีปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในตำรับ เป็นสิบเท่าของค่า IC_{50} จะเท่ากับ $135 \mu\text{g/ml}$ หรือคิดเป็น 0.0135% w/w (โดยประมาณ)

ชั่งสารสกัดฟ้าทะลายโจรมา $\times \text{g}$ เพื่อให้มีปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ 0.0135 g ละลายด้วยซอร์บิทอล 30 g (สำหรับตำรับ MWAf-1-AP) หรือละลายโพรพิลีนไกลคอล 10 g (สำหรับตำรับ MWAf-2-AP) เพื่อเตรียมไว้ผสมในตำรับ จากนั้นเตรียมตำรับเช่นเดียวกับ MWAf-1 และ MWAf-2

3.2.4.3 ประเมินคุณลักษณะของน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร โดยสังเกตลักษณะปรากฏ กลิ่น สี ความใสด้วยตาเปล่า วัดความเป็นกรดต่าง (pH) ก่อนและหลังทดสอบความคงตัวระยะสั้น (intrinsic stability) โดยเก็บผลิตภัณฑ์ในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ $40 \pm 2^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และย้ายไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ $4 \pm 2^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำซ้ำ 6 รอบ (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2563)

3.2.5 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในน้ำยาบ้วนปาก

ทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

3.2.5.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน ในช่วงความเข้มข้นเดียวกับการวิเคราะห์ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในสารสกัดฟ้าทะลายโจรจากข้อ 3.2.2

3.2.5.2 เตรียมสารละลายตัวอย่าง โดยชั่งตัวอย่างน้ำยาบ้วนปาก และเจือจางโดยใช้ตัวทำละลายเป็นเมทานอลและน้ำ ให้มีความเข้มข้นประมาณ $0.1\text{--}0.6 \text{ g/ml}$

3.2.5.3 ฉีดสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างที่ได้ เข้าสู่ระบบโครมาโทกราฟี โดยใช้สภาวะตามข้อ 3.2.2 พิจารณาลักษณะโครมาโทแกรมที่ได้ และปรับสัดส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ ให้มีความเหมาะสม

3.2.5.4 พิจารณาเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายตัวอย่าง ซึ่งให้ค่าสัญญาณของแอนโดรกราโฟไลด์อยู่ในช่วงการใช้งานของกราฟมาตรฐาน

3.2.6 การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

ดำเนินการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากตามแนวทางของ ICH (2005)

3.2.6.1 ความจำเพาะเจาะจง

1. วิเคราะห์สารละลายมาตรฐานแอนโดรกราโฟไลด์
2. วิเคราะห์น้ำยาบ้วนปากพื้น และน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร
3. เปรียบเทียบสเปกตรัม (spectrum) และระยะเวลาในการเคลื่อนที่ (retention time) ของแอนโดรกราโฟไลด์ที่ได้จากสารละลายมาตรฐาน และน้ำยาบ้วนปาก

3.2.6.2 ความเป็นเส้นตรงและช่วงของการใช้งาน

1. วิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน 7 ระดับความเข้มข้น และวิเคราะห์ซ้ำเป็นเวลา 3 วัน
2. ใช้ข้อมูลการวิเคราะห์ 3 วัน สร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์โดยกำหนดให้แกน x เป็นความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน และแกน y เป็นค่าสัญญาณที่วัดได้ (พื้นที่ใต้พีค)
3. วิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้น (regression line)
4. เกณฑ์การยอมรับ : R^2 ไม่น้อยกว่า 0.995

3.2.6.3 ความแม่นยำและความเที่ยง

1. เตรียมน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร (spiked sample) 3 ระดับความเข้มข้น (ต่ำ กลาง และสูง) ในช่วงของการใช้งาน
2. วิเคราะห์ความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ และวิเคราะห์ซ้ำเป็นเวลา 3 วัน
3. เกณฑ์การยอมรับ : %recovery อยู่ในช่วง 90-107 และ %RSD ไม่เกิน 5

3.2.6.4 ขีดจำกัดของการตรวจพบ

1. คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, $S_{y/x}$) ของจุดตัดแกน y (y-intercept) จากกราฟมาตรฐาน
2. คำนวณโดยใช้สูตร $LOD = y\text{-intercept} + 3S_{y/x}$
3. ยืนยัน LOD โดยวิเคราะห์น้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ความเข้มข้นใกล้เคียงกับ LOD จำนวน 6 ซ้ำ
4. เกณฑ์การยอมรับ : ต้องพบพีคของแอนโดรกราโฟไลด์ทั้ง 6 ซ้ำ

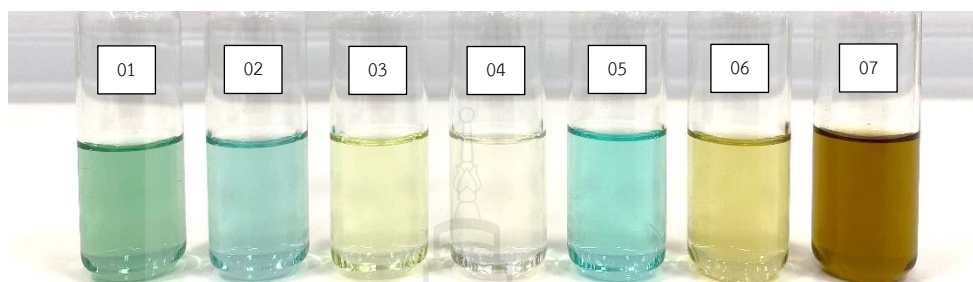
3.2.6.5 ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ

1. คำนวณโดยใช้สูตร $LOQ = y\text{-intercept} + 10S_{y/x}$
2. ยืนยัน LOQ โดยวิเคราะห์น้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ความเข้มข้นใกล้เคียงกับ LOQ จำนวน 6 ซ้ำ
3. เกณฑ์การยอมรับ : %recovery อยู่ในช่วง 90-107 และ %RSD ไม่เกิน 5

3.2.6.6 สรุปผลการทดสอบ

3.2.7 การวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำยาบ้วนปากที่จำหน่ายในท้องตลาด

นำวิธีที่พัฒนาขึ้นมาวิเคราะห์ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในน้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่จำหน่ายในท้องตลาด จำนวน 7 ตัวอย่าง



ภาพที่ 3.1 ตัวอย่างน้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่จำหน่ายในท้องตลาด

ตารางที่ 3.5 ตัวอย่างน้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่จำหน่ายในท้องตลาด

ตัวอย่าง	ประเภท	ลักษณะภายนอก	pH	ปริมาณ (ml)	ราคา (บาท)
01	มีแอลกอฮอล์	สารละลายใส สีเขียว	5.66 ± 0.03	200	145
02	มีแอลกอฮอล์	สารละลายใส สีฟ้า	4.90 ± 0.03	250	79
03	มีแอลกอฮอล์	สารละลายใส สีเขียวเหลือง	4.73 ± 0.02	250	80
04	ไม่มีแอลกอฮอล์	สารละลายใส สีเหลืองอ่อน	4.40 ± 0.01	350	350
05	ไม่มีแอลกอฮอล์	สารละลายใส สีฟ้า	5.58 ± 0.02	200	109
06	ไม่มีแอลกอฮอล์	สารละลายใส สีเขียว	6.24 ± 0.01	100	90
07	ไม่มีแอลกอฮอล์	สารละลายใส สีน้ำตาลเขียว	3.82 ± 0.04	50	19

3.2.8 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel 2019 ในการคำนวณสมการเส้นตรง R^2 SD %RSD %recovery LOD และ LOQ

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลการเตรียมสารสกัดฟ้าทะลายโจร

เมื่อสกัดผงสมุนไพรฟ้าทะลายโจรด้วย 95% เอทานอลและระเหยแห้ง ลักษณะสารสกัดที่ได้เป็นเกล็ดสีเขียวน้ำตาล ดังภาพที่ 4.1 ร้อยละผลผลิตที่ได้ เท่ากับ $14.623 \pm 0.347\%$ w/w

เมื่อพิจารณาข้อกำหนดคุณภาพของสมุนไพรฟ้าทะลายโจรใน THP 2021 ที่กำหนดปริมาณสารสกัดด้วย 85% เอทานอลไว้ไม่น้อยกว่า 13.0% w/w (Department of Medical Sciences, 2021) การศึกษาวิจัยนี้ใช้ตัวทำละลายเป็น 95% เอทานอล เนื่องจากมีการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่าตัวทำละลายที่สกัดแอนโดรกราโฟไลด์จากฟ้าทะลายโจรได้มากที่สุด คือ เอทานอลและเมทานอล (เมทินี หลิมศิริวงษ์ และคณะ, 2562) ซึ่งพบว่าสารสกัดฟ้าทะลายโจรในการศึกษานี้มีปริมาณสารสกัดมากกว่าเกณฑ์มาตรฐานของ THP 2021



ภาพที่ 4.1 สารสกัดฟ้าทะลายโจร

4.2 ผลการศึกษาสภาวะและการวิเคราะห์ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในสารสกัด

4.2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ช่วงความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เลือกใช้ คือ 0.001-0.1 mg/ml เนื่องจากให้กราฟมาตรฐานที่มีความเป็นเส้นตรงและครอบคลุมความเข้มข้นของตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ เตรียมโดยชั่งสารมาตรฐานแอนโดรกราโฟไลด์ 25 mg ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 ml ละลายด้วยเมทานอล 12.5 ml และปรับปริมาตรจนครบด้วยน้ำ ปิเปตสารละลายที่ได้ 0.01, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 ml ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 ml แต่ละขวด ปรับปริมาตรจนครบด้วย 50% เมทานอล กรองสารละลายที่ได้ผ่านหัวกรองอนุภาค ขนาด 0.22 μm ลงในขวดบรรจุสาร

4.2.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างที่เลือกใช้ คือ 1.0 mg/ml เนื่องจากให้ค่าสัญญาณของแอนโดรกราโฟไลด์อยู่ในช่วงการใช้งานของกราฟมาตรฐาน เตรียมโดยชั่งสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ได้จากข้อ 4.1 ประมาณ 25 mg ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 ml ละลายด้วยเมทานอล 12.5 ml และปรับปริมาตรจนครบด้วยน้ำ กรองสารละลายที่ได้ผ่านหัวกรองอนุภาค ขนาด 0.22 μm ลงในขวดบรรจุสาร

4.2.3 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในสารสกัดฟ้าทะลายโจรด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ประกอบด้วย

4.2.3.1 คอลัมน์ : C18 (2.1 $\times$ 50 mm, 1.9 μm)

4.2.3.2 วัฏภาคเคลื่อนที่ : A = เมทานอล และ B = น้ำ

เวลา (min)	A (%)	B (%)
0.0	40	60
2.5	40	60
3.5	60	40
7.0	60	40
8.0	40	60
10.0	40	60

4.2.3.3 อัตราการไหล : 0.4 mL/min

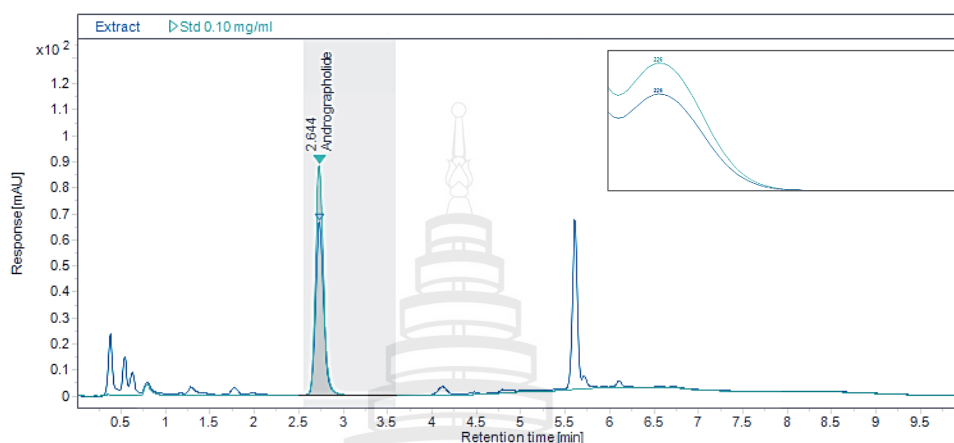
4.2.3.4 อุณหภูมิช่องตัวอย่าง : 25 $^{\circ}\text{C}$

4.2.3.5 อุณหภูมิคอลัมน์ : 40 $^{\circ}\text{C}$

4.2.3.6 ปริมาตรที่ฉีด : 1 μL

4.2.3.7 การตรวจวัด : PDA 224 nm

สภาวะนี้สามารถแยกพีคของแอนโดรกราโฟไลด์ออกจากพีคของสารอื่น ๆ ในสารสกัด ฟ้าทะลายโจรได้อย่างชัดเจน โดยมี retention time ตรงกับพีคของสารมาตรฐานแอนโดรกราโฟไลด์ และมีสเปกตรัมเหมือนกัน ดังภาพที่ 4.2



ภาพที่ 4.2 โครมาโทแกรมของสารสกัดฟ้าทะลายโจร ความเข้มข้น 0.4 g/ml (เส้นสีฟ้า) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานแอนโดรกราโฟไลด์ ความเข้มข้น 0.1 mg/ml (เส้นสีเขียว)

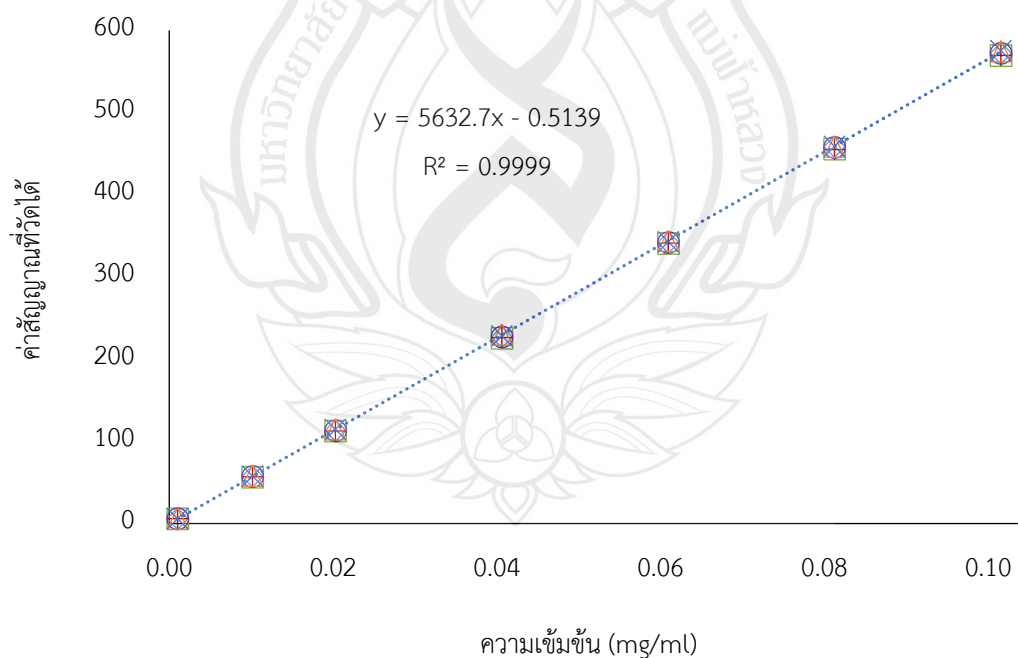
4.2.4 ผลการประเมินความเป็นเส้นตรง ชีตจำกัดของการตรวจพบ และชิตจำกัดของการวัดเชิงปริมาณของวิธีวิเคราะห์

4.2.4.1 ความเป็นเส้นตรงและช่วงของการใช้งาน

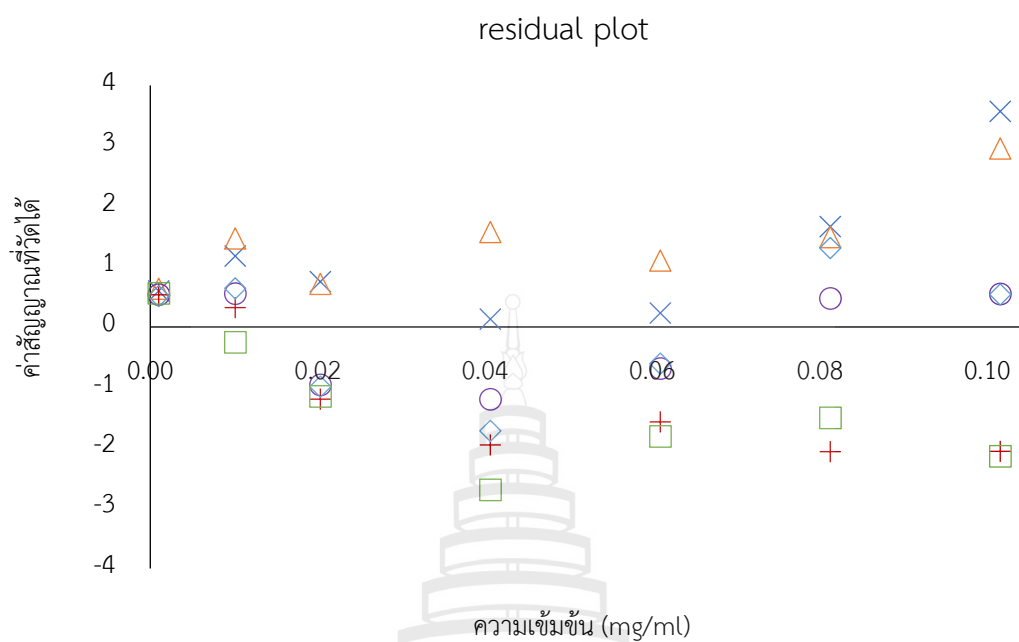
กราฟมาตรฐานของแอนโดรกราโฟไลด์ที่ได้จากการวิเคราะห์ 3 วัน โดยนำข้อมูลทั้งหมด 7 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ มาพล็อตรวมกัน พบว่า มีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.001-0.1 mg/ml โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 0.9999 ดังตารางที่ 4.1 และภาพที่ 4.3

ตารางที่ 4.1 ข้อมูลกราฟมาตรฐานของแอนโดรกราโฟไลด์

ความเข้มข้น (mg/ml)	ค่าสัญญาณที่วัดได้ (mAU x sec)						ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD
	วันที่ 1		วันที่ 2		วันที่ 3		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	
0.00102	5.803	5.840	5.745	5.719	5.739	5.766	5.769 $\pm$ 0.045
0.01016	57.866	58.160	57.248	57.331	57.011	56.438	57.342 $\pm$ 0.613
0.02031	114.647	114.608	112.941	112.907	112.702	112.751	113.426 $\pm$ 0.935
0.04062	228.440	229.879	227.113	226.587	226.355	225.616	227.332 $\pm$ 1.563
0.06094	342.951	343.819	342.033	342.114	341.147	340.910	342.162 $\pm$ 1.094
0.08125	458.794	458.618	457.606	458.441	455.066	455.632	457.360 $\pm$ 1.620
0.10156	575.112	574.499	572.094	572.080	569.485	569.403	572.112 $\pm$ 2.406
slope	5650.931		5637.246		5609.781		
intercept	-0.051		-0.796		-0.695		
R ²	0.99999		0.99998		0.99999		



ภาพที่ 4.3 กราฟมาตรฐานของแอนโดรกราโฟไลด์



ภาพที่ 4.4 residual plot ของกราฟมาตรฐาน

4.2.4.2 ขีดจำกัดของการตรวจพบ คำนวณดังนี้

$$\begin{aligned}
 \text{จากสูตร} \quad \text{LOD} &= \text{intercept} + (3S_{y/x}) \\
 &= -0.051 + (3 \times 0.7026) \\
 &= 2.0569
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{จากสมการเส้นตรง} \quad y &= 5650.931x - 0.051 \\
 2.0569 &= 5650.931x - 0.051 \\
 x &= 0.0004 \text{ mg/ml}
 \end{aligned}$$

4.2.4.3 ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ คำนวณดังนี้

$$\begin{aligned}
 \text{จากสูตร} \quad \text{LOQ} &= \text{intercept} + (10S_{y/x}) \\
 &= -0.051 + (10 \times 0.7026) \\
 &= 6.9748
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{จากสมการเส้นตรง} \quad y &= 5650.931x - 0.051 \\
 6.9748 &= 5650.931x - 0.051 \\
 x &= 0.0012 \text{ mg/ml}
 \end{aligned}$$

4.2.5 ผลการวิเคราะห์ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในสารสกัดฟ้าทะลายโจร

เมื่อนำสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ได้จากข้อ 4.1 มาวิเคราะห์ พบว่า มีปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ $13.818 \pm 0.332\%$ w/w เมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาของ Rafi et al. (2020) ที่ใช้วิธีการสกัดเดียวกันได้สารสกัดที่มีปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ $10.21 \pm 2.73\%$ w/w จะเห็นได้ว่าสารสกัดของเรา มีปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์มากกว่าเล็กน้อย ทั้งนี้ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์อาจแตกต่างกันได้ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ส่วนของฟ้าทะลายโจรที่ใช้ ระยะเก็บเกี่ยว วิธีการเก็บรักษา ลักษณะผง เป็นต้น (สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์, 2552)

4.3 ผลการพัฒนาตำรับน้ำยาบ้วนปากพื้นและทดสอบความคงตัว

4.3.1 ผลการพัฒนาตำรับน้ำยาบ้วนปากพื้น

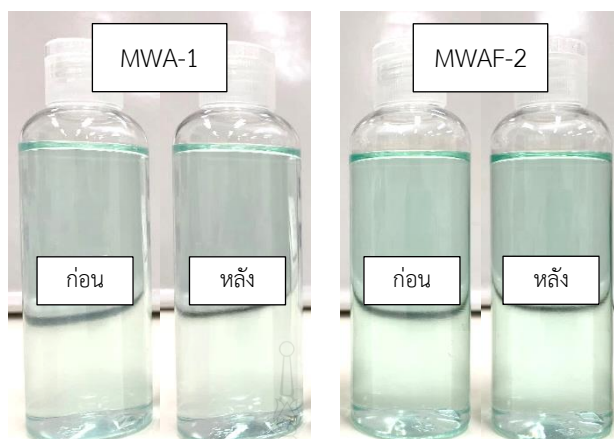
4.3.1.1 น้ำยาบ้วนปากพื้น สูตรมีแอลกอฮอล์ ได้แก่ MWA-1 ลักษณะตำรับที่ได้เป็นสารละลายใส ไม่มีตะกอน สีเขียวอมฟ้า กลิ่นเปปเปอร์มินต์ มี pH เท่ากับ 6.73 ± 0.02

4.3.1.2 น้ำยาบ้วนปากพื้น สูตรไม่มีแอลกอฮอล์ ได้แก่ MWA-1 และ MWA-2 ลักษณะตำรับที่ได้ทั้ง 2 ตำรับใกล้เคียงกัน คือเป็นสารละลายใส ไม่มีตะกอน สีเขียวอมฟ้า กลิ่นเปปเปอร์มินต์ มี pH เท่ากับ 6.19 ± 0.02 และ 6.16 ± 0.02 ตามลำดับ ทั้งนี้ผู้วิจัยเลือกเพียงตำรับ MWA-2 มาทดสอบความคงตัวต่อไป เนื่องจากมีโพรพิลีนไกลคอลที่ช่วยคงความชุ่มชื้นได้มากขึ้นและเป็นสารช่วยทำละลาย ซึ่งอาจจะช่วยเพิ่มการละลายของสารสกัดฟ้าทะลายโจรได้ดีขึ้นด้วย

4.3.2 ผลการทดสอบความคงตัวระยะสั้น

4.3.2.1 ลักษณะภายนอกของตำรับ MWA-1 เป็นสารละลายใส ไม่มีตะกอน สีและกลิ่นไม่เปลี่ยนแปลง pH เท่ากับ 6.30 ± 0.02 (pH ลดลงจากเดิม 6.4 ± 0.0 %)

4.3.2.2 ลักษณะภายนอกของตำรับ MWA-2 เป็นสารละลายใส ไม่มีตะกอน สีและกลิ่นไม่เปลี่ยนแปลง pH เท่ากับ 5.79 ± 0.01 (pH ลดลงจากเดิม 5.9 ± 0.1 %)



ภาพที่ 4.5 ลักษณะน้ำยาบ้วนปากพื้น MWA-1 และ MWA-F-2 ก่อนและหลังทดสอบความคงตัว

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบความคงตัวระยะสั้นของน้ำยาบ้วนปากพื้น MWA-1 และ MWA-F-2

ตำรับ	ลักษณะตำรับ	
	ก่อนทดสอบความคงตัว	หลังทดสอบความคงตัว
MWA-1	สารละลายใส ไม่มีตะกอน สีเขียวอมฟ้า กลิ่นเปปเปอร์มินต์ $\text{pH} = 6.73 \pm 0.02$	สารละลายใส ไม่มีตะกอน สีเขียวอมฟ้า กลิ่นเปปเปอร์มินต์ $\text{pH} = 6.30 \pm 0.02$
MWA-F-2	สารละลายใส ไม่มีตะกอน สีเขียวอมฟ้า กลิ่นเปปเปอร์มินต์ $\text{pH} = 6.16 \pm 0.02$	สารละลายใส ไม่มีตะกอน สีเขียวอมฟ้า กลิ่นเปปเปอร์มินต์ $\text{pH} = 5.79 \pm 0.01$

4.4 ผลการพัฒนาตำรับน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรและทดสอบความคงตัว

จากผลการศึกษาในข้อ 4.2.5 ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในสารสกัด เท่ากับ 13.818% w/w หากต้องการเตรียมตำรับ 100 g ที่มีปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ 0.0135% w/w เพื่อหวังผลในการต้านเชื้อไวรัส COVID-19 ตามการศึกษาของสุภาพร ภูมิอมร (2564) จะต้องชั่งสารสกัดมา 0.10 g ละลายในสารช่วยทำละลายเพื่อผสมลงในตำรับ

4.4.1 ผลการพัฒนาตำรับน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร

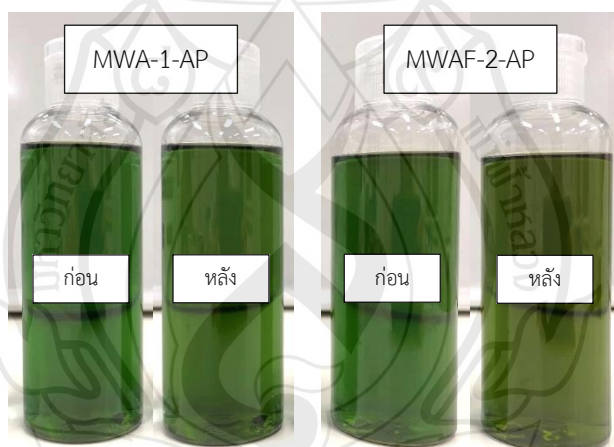
4.4.1.1 น้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร สูตรมีแอลกอฮอล์ ได้แก่ MWA-1-AP ลักษณะตำรับที่ได้เป็นสารละลายใส ไม่มีตะกอน สีเขียวแก่ กลิ่นเปปเปอร์มินต์ผสมกลิ่นสมุนไพร มี pH เท่ากับ 6.52 ± 0.02

4.4.1.2 น้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร สูตรไม่มีแอลกอฮอล์ ได้แก่ MWA-2-AP ลักษณะตำรับที่ได้เป็นสารละลายใส ไม่มีตะกอน สีเขียวแก่ กลิ่นเปปเปอร์มินต์ผสมกลิ่นสมุนไพร มี pH เท่ากับ 6.15 ± 0.02

4.4.2 ผลการทดสอบความคงตัวระยะสั้น

4.4.2.1 ลักษณะของตำรับ MWA-1-AP เป็นสารละลายใส ไม่มีตะกอน สีเขียวซีดลงเล็กน้อย pH เท่ากับ 6.13 ± 0.03 (pH ลดลงจากเดิม 5.9 ± 0.1 %)

4.4.2.2 ลักษณะของตำรับ MWA-2-AP เป็นสารละลายใส ไม่มีตะกอน สีเขียวอมเหลือง pH เท่ากับ 5.78 ± 0.01 (pH ลดลงจากเดิม 6.0 ± 0.2 %)



ภาพที่ 4.6 ลักษณะน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร MWA-1-AP และ MWA-2-AP ก่อนและหลังทดสอบความคงตัว

ตารางที่ 4.3 ผลการทดสอบความคงตัวของน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร
MWA-1-AP และ MWA-2-AP

ตำรับ	ลักษณะตำรับ	
	ก่อนทดสอบความคงตัว	หลังทดสอบความคงตัว
MWA-1-AP	สารละลายใส ไม่มีตะกอน สีเขียวแก่ กลิ่นเปปเปอร์มินต์ผสมกลิ่นสมุนไพร pH = 6.52 ± 0.02	สารละลายใส ไม่มีตะกอน สีเขียวซีดลงเล็กน้อย กลิ่นเปปเปอร์มินต์ผสมกลิ่นสมุนไพร pH = 6.13 ± 0.03
MWA-2-AP	สารละลายใส ไม่มีตะกอน สีเขียวแก่ กลิ่นเปปเปอร์มินต์ผสมกลิ่นสมุนไพร pH = 6.15 ± 0.02	สารละลายใส ไม่มีตะกอน สีเขียวอมเหลือง กลิ่นเปปเปอร์มินต์ผสมกลิ่นสมุนไพร pH = 5.78 ± 0.01

ลักษณะทางกายภาพของตำรับน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรนี้ไม่คงตัว สีของตำรับจะค่อย ๆ เปลี่ยนจากสีเขียวแก่เป็นสีเขียวมเหลืองเมื่อเวลาผ่านไป ทำให้ตำรับดูไม่สวยงามน่าใช้ จากข้อมูลก่อนหน้ามีรายงานว่าสารแอนโดรกราโฟไลด์เป็นสารที่มีสีขาว (Yan et al., 2018) ซึ่งสอดคล้องกับสีของสารมาตรฐานแอนโดรกราโฟไลด์ที่ใช้ในการศึกษานี้ ดังนั้นสีเขียวแก่ของตำรับน่าจะเป็นสีของคลอโรฟิลล์ในฟ้าทะลายโจร (Jeyaram & Geethakrishnan, 2019) แต่ทั้งนี้ยังไม่พบข้อมูลการศึกษาความคงตัวของคลอโรฟิลล์จากสารสกัดฟ้าทะลายโจร มีเพียงข้อมูลการศึกษาในสารสกัดสมุนไพรชนิดอื่น เช่น ใบเตย วอเตอร์เครส เป็นต้น ซึ่งให้ผลการศึกษาไปในแนวทางเดียวกันว่า สีเขียวของคลอโรฟิลล์สลายตัวได้ง่ายเมื่อเวลาผ่านไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งอุณหภูมิที่สูงขึ้นหรือ pH ที่เป็นกรดทำให้ความคงตัวของคลอโรฟิลล์ลดลง (ประพันธ์ ปิ่นศิริธม, 2546 และเมตตา เถาว์ชาลี, 2561)

นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาถึงความคงตัวของแอนโดรกราโฟไลด์ซึ่งพบข้อมูลว่ามีความคงตัวดีในช่วง pH 3-5 และความคงตัวลดลงเมื่อ pH สูงขึ้นหรืออยู่ในสภาวะที่เป็นด่าง (Yan et al., 2018) รวมทั้งยังมีความคงตัวลดลงเมื่ออยู่ในสารละลายที่เป็นน้ำ (บัณฑิตย เต็งเจริญกุล และคณะ, 2550) จึงอาจมีความเป็นไปได้ที่แอนโดรกราโฟไลด์จะไม่คงตัวในตำรับน้ำยาบ้วนปากที่เตรียมขึ้น

4.5 ผลการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในน้ำยาบ้วนปาก

4.5.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ใช้ช่วงความเข้มข้นเดียวกับการวิเคราะห์ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในสารสกัดฟ้าทะลายโจร ตามข้อ 4.2.1 คือ 0.001-0.1 mg/ml

4.5.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างที่เลือกใช้ คือ 0.4 g/ml เนื่องจากให้ค่าสัญญาณของแอนโดรกราโฟไลด์อยู่ในช่วงการใช้งานของกราฟมาตรฐาน เตรียมโดยชั่งตัวอย่างน้ำยาบ้วนปาก 2 g ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 5 ml ปรับปริมาตรจนครบด้วยเมทานอล เขย่าให้เข้ากัน กรองสารละลายที่ได้ผ่านหัวกรองอนุภาค ขนาด 0.22 μm ลงในขวดบรรจุสาร

4.5.3 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในน้ำยาบ้วนปาก สามารถใช้สภาวะเดียวกับการวิเคราะห์ในสารสกัดฟ้าทะลายโจร ตามข้อ 4.2.3 ได้ ประกอบด้วย

4.5.3.1 คอลัมน์ : C18 (2.1 $\times$ 50 mm, 1.9 μm)

4.5.3.2 วัฏภาคเคลื่อนที่ : A = เมทานอล และ B = น้ำ

เวลา (min)	A (%)	B (%)
0.0	40	60
2.5	40	60
3.5	60	40
7.0	60	40
8.0	40	60
10.0	40	60

4.5.3.3 อัตราการไหล : 0.4 ml/min

4.5.3.4 อุณหภูมิช่องตัวอย่าง : 25 $^{\circ}\text{C}$

4.5.3.5 อุณหภูมิคอลัมน์ : 40 $^{\circ}\text{C}$

4.5.3.6 ปริมาตรที่ฉีด : 1 μl

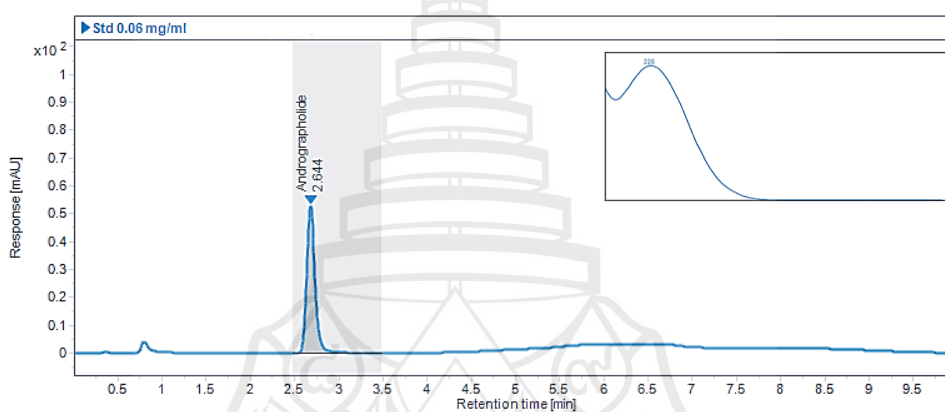
4.5.3.7 การตรวจวัด : PDA 224 nm

สภาวะนี้สามารถแยกพีคของแอนโดรกราโฟไลด์ออกจากพีคของสารอื่นในน้ำยาบ้วนปากได้อย่างชัดเจน โดยมี retention time ตรงกับพีคของสารมาตรฐานแอนโดรกราโฟไลด์ จึงมีความเหมาะสมที่จะทำการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ต่อไป

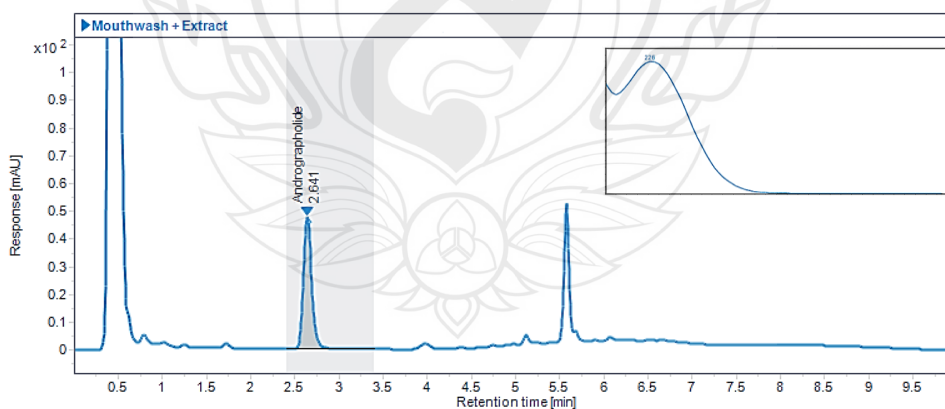
4.6 ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

4.6.1 ความจำเพาะเจาะจง

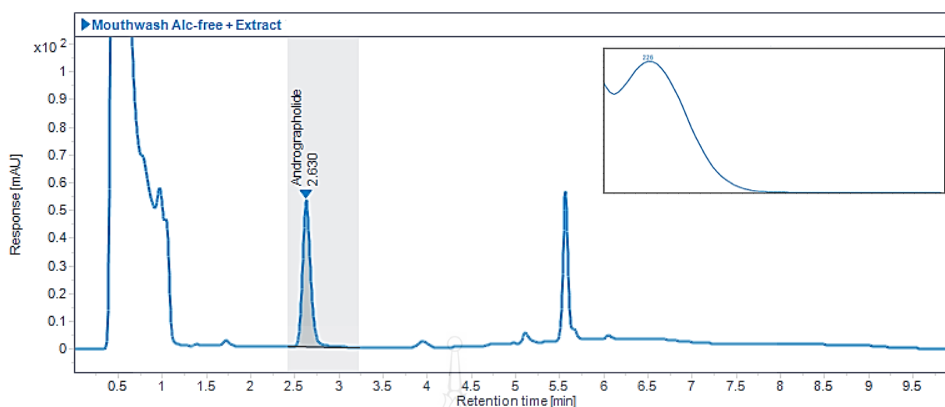
โครมาโทแกรมของน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่เตรียมขึ้น ทั้ง 2 ตำรับ ได้แก่ MWA-1-AP และ MWA-2-AP พบพีคของสารที่ตำแหน่ง retention time เดียวกันกับพีคของสารมาตรฐานแอนโดรกราโฟไลด์และมีสเปกตรัมเหมือนกัน และไม่พบพีคของสารอื่นรบกวนที่ตำแหน่ง retention time ของแอนโดรกราโฟไลด์



ภาพที่ 4.7 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานแอนโดรกราโฟไลด์ ความเข้มข้น 0.06 mg/ml



ภาพที่ 4.8 โครมาโทแกรมของน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร MWA-1-AP



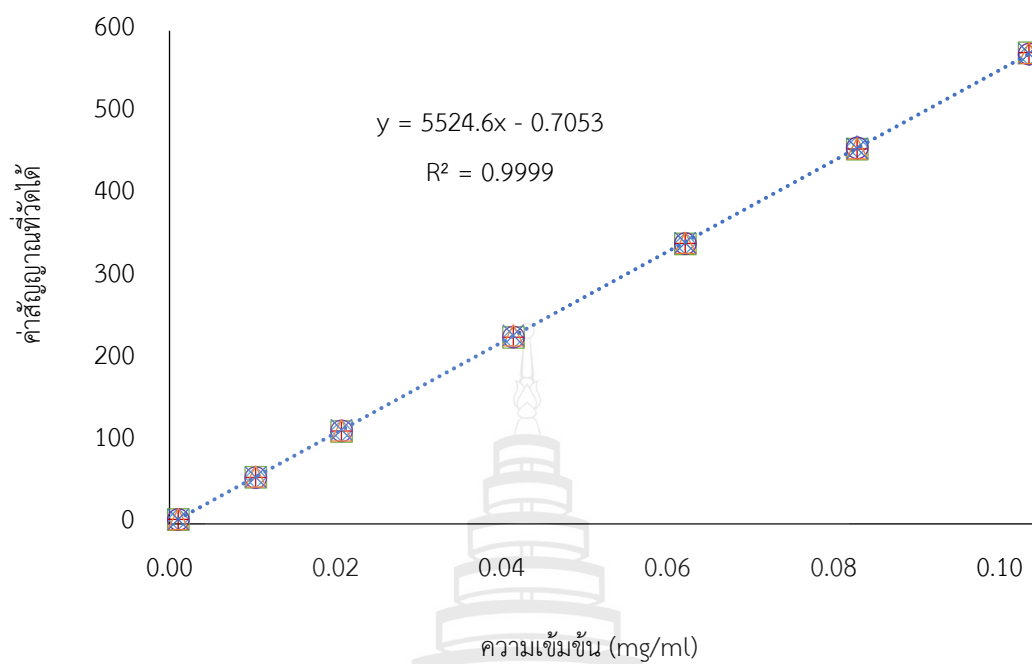
ภาพที่ 4.9 โครมาโทแกรมของน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร MWAF-2-AP

4.6.2 ความเป็นเส้นตรงและช่วงของการใช้งาน

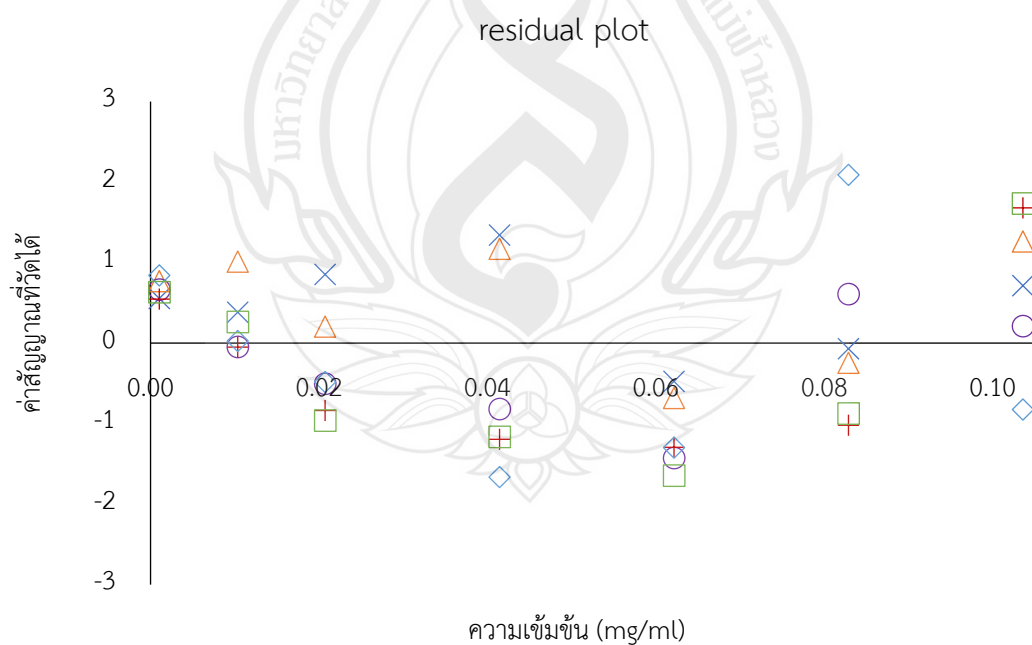
กราฟมาตรฐานของแอนโดรกราโฟไลด์ที่ได้จากการวิเคราะห์ 3 วัน โดยนำข้อมูลทั้งหมด 7 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ มาพล็อตรวมกัน พบว่า มีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.001-0.1 mg/ml โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 0.9999 ดังตารางที่ 4.4 และภาพที่ 4.10

ตารางที่ 4.4 ข้อมูลกราฟมาตรฐานของแอนโดรกราโฟไลด์

ความเข้มข้น (mg/ml)	ค่าสัญญาณที่วัดได้ (mAU x sec)						ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD
	วันที่ 1		วันที่ 2		วันที่ 3		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	
0.00104	5.573	5.788	5.682	5.856	5.562	5.651	5.685 $\pm$ 0.017
0.01036	56.901	57.530	56.473	56.543	56.467	56.780	56.782 $\pm$ 0.406
0.02072	114.594	113.946	113.235	113.258	112.903	112.779	113.453 $\pm$ 0.691
0.04143	229.526	229.356	227.366	226.520	226.990	227.023	227.797 $\pm$ 1.303
0.06215	342.153	341.947	341.203	341.331	341.333	340.986	341.492 $\pm$ 0.455
0.08286	457.003	456.829	457.683	459.164	456.053	456.199	457.155 $\pm$ 1.147
0.10358	572.231	572.780	571.730	570.694	573.199	573.255	572.315 $\pm$ 0.986
slope	5520.986		5524.032		5528.843		
intercept	-0.052		-0.865		-1.198		
R ²	0.99999		0.99998		0.99997		



ภาพที่ 4.10 กราฟมาตรฐานของแอนโดรกราโฟไลด์



ภาพที่ 4.11 residual plot ของกราฟมาตรฐาน

4.6.3 ความแม่นยำและความเที่ยง

เนื่องจากช่วงการใช้งานของกราฟมาตรฐานแอนโดรกราโฟไลต์ คือ 0.001-0.1 mg/ml จึงกำหนดความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงอยู่ที่ 0.004, 0.04, และ 0.09 mg/ml ซึ่งคำนวณกลับเป็นปริมาณแอนโดรกราโฟไลต์ในน้ำยาบ้วนปาก (ความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง) ได้เท่ากับ 0.0010, 0.0100 และ 0.0225% w/w ตามลำดับ จากนั้นเตรียมน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรตามความเข้มข้นที่คำนวณได้

ผลการวิเคราะห์น้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร จำนวน 3 ระดับความเข้มข้น ทั้งการวิเคราะห์ซ้ำภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน พบว่า มีค่า %recovery และ %RSD อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ ดังตารางที่ 4.5-4.10 แสดงว่า วิธีวิเคราะห์นี้มีความแม่นยำและความเที่ยง

นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาถึงผลการวิเคราะห์ซ้ำระหว่างวันซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกัน ก็แสดงว่า แอนโดรกราโฟไลต์ในตำรับน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่เตรียมขึ้นนี้ มีความคงตัวไม่น้อยกว่า 3 วัน

ตารางที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์น้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร MWA-1-AP ที่มีปริมาณแอนโดรกราโฟไลต์ 0.0010% w/w (ความเข้มข้นต่ำ)

ครั้งที่	ปริมาณแอนโดรกราโฟไลต์ (% w/w)		
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3
1	0.000975	0.000956	0.000967
2	0.000967	0.000952	0.000956
3	0.000961	0.000948	0.000946
4	0.000967	0.000952	0.000953
5	0.000957	0.000951	0.000955
6	0.000952	0.000964	0.000955
ค่าเฉลี่ย	0.000963	0.000954	0.000955
ภายในวัน	%Recovery	96.2	95.3
	%RSD	0.9	0.6
ระหว่างวัน	ค่าเฉลี่ย	0.000957	
	%Recovery	95.6	
	%RSD	0.5	

ตารางที่ 4.6 ผลการวิเคราะห์น้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร MWAF-2-AP ที่มีปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ 0.0010% w/w (ความเข้มข้นต่ำ)

ครั้งที่	ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ (% w/w)		
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3
1	0.000994	0.000998	0.001001
2	0.001004	0.001001	0.000996
3	0.001001	0.000999	0.001000
4	0.001003	0.001003	0.000989
5	0.001011	0.001008	0.000992
6	0.001012	0.001006	0.001002
ค่าเฉลี่ย	0.001004	0.001003	0.000997
ภายในวัน	%Recovery	98.3	98.1
	%RSD	0.7	0.5
ระหว่างวัน	ค่าเฉลี่ย	0.001001	
	%Recovery	98.0	
	%RSD	0.4	

ตารางที่ 4.7 ผลการวิเคราะห์น้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร MWA-1-AP ที่มีปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ 0.0100% w/w (ความเข้มข้นกลาง)

ครั้งที่	ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ (% w/w)		
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3
1	0.00970	0.00960	0.00957
2	0.00965	0.00964	0.00995
3	0.00969	0.00966	0.00961
4	0.00972	0.00959	0.00966
5	0.00969	0.00975	0.00965
6	0.00962	0.00955	0.00957
ค่าเฉลี่ย	0.00968	0.00963	0.00967
ภายในวัน	%Recovery	96.7	96.6
	%RSD	0.4	1.5
ระหว่างวัน	ค่าเฉลี่ย	0.00966	
	%Recovery	96.5	
	%RSD	0.3	

ตารางที่ 4.8 ผลการวิเคราะห์น้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร MWAF-2-AP ที่มีปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ 0.0100% w/w (ความเข้มข้นกลาง)

ครั้งที่	ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ (% w/w)		
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3
1	0.00985	0.00987	0.00990
2	0.00991	0.00995	0.00986
3	0.00987	0.00995	0.00984
4	0.01001	0.00996	0.00979
5	0.00998	0.00989	0.00994
6	0.00994	0.00987	0.00985
ค่าเฉลี่ย	0.00993	0.00992	0.00986
ภายในวัน	%Recovery	99.2	99.1
	%RSD	0.6	0.4
ระหว่างวัน	ค่าเฉลี่ย	0.00990	
	%Recovery	99.0	
	%RSD	0.3	

ตารางที่ 4.9 ผลการวิเคราะห์น้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร MWA-1-AP ที่มีปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ 0.0225% w/w (ความเข้มข้นสูง)

ครั้งที่	ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ (ร้อยละโดยน้ำหนัก)		
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3
1	0.02197	0.02206	0.02204
2	0.02186	0.02209	0.02198
3	0.02194	0.02196	0.02212
4	0.02202	0.02208	0.02197
5	0.02211	0.02189	0.02212
6	0.02193	0.02190	0.02206
ค่าเฉลี่ย	0.02197	0.02200	0.02205
ภายในวัน	%Recovery	97.5	97.6
	%RSD	0.4	0.3
ระหว่างวัน	ค่าเฉลี่ย	0.02201	
	%Recovery	97.6	
	%RSD	0.2	

ตารางที่ 4.10 ผลการวิเคราะห์นํ้ายาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร MWAF-2-AP ที่มีปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ 0.0225% w/w (ความเข้มข้นสูง)

ครั้งที่	ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ (ร้อยละโดยนํ้าหนัก)		
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3
1	0.02223	0.02224	0.02215
2	0.02219	0.02218	0.02229
3	0.02234	0.02222	0.02208
4	0.02246	0.02207	0.02238
5	0.02242	0.02232	0.02219
6	0.02256	0.02246	0.02210
ค่าเฉลี่ย	0.02237	0.02225	0.02220
ภายในวัน	%Recovery	98.8	98.1
	%RSD	0.6	0.5
ระหว่างวัน	ค่าเฉลี่ย	0.02227	
	%Recovery	98.4	
	%RSD	0.4	

4.6.4 ขีดจำกัดของการตรวจพบ

ค่า LOD ที่คำนวณได้จากกราฟมาตรฐานในข้อ 4.2.4.2 คือ 0.0004 mg/ml ซึ่งคำนวณกลับเป็นปริมาณแอนโดรกราโฟไลต์ในน้ำยาบ้วนปาก เท่ากับ 0.0001% w/w จากนั้นเตรียมน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรตามความเข้มข้นที่คำนวณได้

ผลการวิเคราะห์น้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่มีปริมาณแอนโดรกราโฟไลต์ 0.0001% w/w พบพีคของแอนโดรกราโฟไลต์ในตัวอย่างทั้ง 6 ซ้ำ ดังตารางที่ 4.11 จึงยอมรับให้ความเข้มข้น 0.0001% w/w เป็น LOD

ตารางที่ 4.11 ผลการวิเคราะห์น้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่มีปริมาณแอนโดรกราโฟไลต์ 0.0001% w/w (LOD)

ครั้งที่	MWA-1-AP		MWA-2-AP	
	ปริมาณแอนโดรกราโฟไลต์	%recovery	ปริมาณแอนโดรกราโฟไลต์	%recovery
	(% w/w)		(% w/w)	
1	0.000126	100.6	0.000125	97.8
2	0.000124	99.0	0.000123	96.2
3	0.000119	95.0	0.000129	100.9
4	0.000124	99.0	0.000129	100.9
5	0.000122	97.4	0.000128	100.2
6	0.000122	97.4	0.000129	100.9
ค่าเฉลี่ย	0.000123	98.1	0.000127	99.5
%RSD	-	2.0	-	2.0

4.6.5 ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ

ค่า LOQ ที่คำนวณได้จากกราฟมาตรฐานในข้อ 4.2.4.3 คือ 0.0012 mg/ml ซึ่งคำนวณกลับเป็นปริมาณแอนโดรกราโฟไลต์ในน้ำยาบ้วนปาก เท่ากับ 0.00025% w/w จากนั้นเตรียมน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรตามความเข้มข้นที่คำนวณได้

ผลการวิเคราะห์น้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่มีปริมาณแอนโดรกราโฟไลต์ 0.00025% w/w พบว่า มีค่า %recovery และ %RSD อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ ดังตารางที่ 4.12 แสดงว่า การวิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้นนี้มีความแม่นยำและความเที่ยง จึงยอมรับให้ความเข้มข้น 0.00025% w/w เป็น LOQ

ตารางที่ 4.12 ผลการวิเคราะห์น้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่มีปริมาณแอนโดรกราโฟไลต์ 0.00025% w/w (LOQ)

ครั้งที่	MWA-1-AP		MWA-2-AP	
	ปริมาณแอนโดรกราโฟไลต์ (% w/w)	%recovery	ปริมาณแอนโดรกราโฟไลต์ (% w/w)	%recovery
1	0.000242	96.7	0.000256	99.7
2	0.000243	97.1	0.000256	99.7
3	0.000237	94.7	0.000258	100.5
4	0.000241	96.3	0.000259	100.9
5	0.000245	97.9	0.000259	100.9
6	0.000248	99.1	0.000261	101.7
ค่าเฉลี่ย	0.000243	96.9	0.000258	100.6
%RSD	-	1.5	-	0.8

4.6.6 สรุปผลการทดสอบ

จากการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ พบว่า ผ่านเกณฑ์การยอมรับทุกรายการ ดังตารางที่ 4.13 ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในน้ำยาบ้วนปากด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงนี้ มีความเหมาะสมสามารถนำไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการวิเคราะห์ตัวอย่างได้

ตารางที่ 4.13 สรุปผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

รายการ	เกณฑ์การยอมรับ	ผลการทดสอบ		สรุปผล
		MWA-1-AP	MWAF-2-AP	
ความจำเพาะเจาะจง	retention time และสเปกตรัม ตรงกับสารมาตรฐาน ไม่พบพืคสารอื่นรบกวน	retention time และสเปกตรัม ตรงกับสารมาตรฐาน ไม่พบพืคสารอื่นรบกวน		ผ่าน
ความเป็นเส้นตรง (0.001-0.1 mg/ml)	$R^2 \geq 0.995$	0.9999		ผ่าน
ความแม่นยำ				
- ความเข้มข้นต่ำ		95.3-96.2	97.5-98.3	ผ่าน
- ความเข้มข้นกลาง	%recovery = 90-107	96.3-96.7	98.6-99.2	ผ่าน
- ความเข้มข้นสูง		97.5-97.8	98.1-98.8	ผ่าน
ความเที่ยง : ภายในวัน				
- ความเข้มข้นต่ำ		0.6-0.9	0.4-0.7	ผ่าน
- ความเข้มข้นกลาง	%RSD ≤ 5	0.4-1.5	0.4-0.6	ผ่าน
- ความเข้มข้นสูง		0.3-0.4	0.5-0.6	ผ่าน
ความเที่ยง : ระหว่างวัน				
- ความเข้มข้นต่ำ		0.5	0.4	ผ่าน
- ความเข้มข้นกลาง	%RSD ≤ 5	0.3	0.3	ผ่าน
- ความเข้มข้นสูง		0.2	0.4	ผ่าน
LOQ (0.00025% w/w)				
- ความแม่นยำ	%recovery = 90-107	96.9	100.6	ผ่าน
- ความเที่ยง	%RSD ≤ 5	1.5	0.8	ผ่าน
LOD (0.0001% w/w)	พบพืคของสาร ทั้ง 6 ซ้ำ	พบพืคของสาร ทั้ง 6 ซ้ำ		ผ่าน

4.7 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำยาบ้วนปากที่จำหน่ายในท้องตลาด

เมื่อนำวิธีที่พัฒนาขึ้นมาวิเคราะห์ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในน้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่จำหน่ายในท้องตลาด จำนวน 7 ตัวอย่าง พบว่า ตัวอย่างที่ 01-03 ซึ่งเป็นสูตรมีแอลกอฮอล์ ตรวจพบแอนโดรกราโฟไลด์ทั้ง 3 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่ 04-07 ซึ่งเป็นสูตรไม่มีแอลกอฮอล์ ตรวจพบแอนโดรกราโฟไลด์เพียง 1 ตัวอย่าง และไม่พบแอนโดรกราโฟไลด์ 3 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 4.14

ตารางที่ 4.14 ผลการวิเคราะห์น้ำยาบ้วนปากที่จำหน่ายในท้องตลาด

ตัวอย่างที่	ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ (% w/w)					
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD	%RSD
01	0.001170	0.001171	0.001168	0.001170	0.000002	0.1
02	0.000274	0.000275	0.000278	0.000276	0.000002	0.8
03	0.000560	0.000567	0.000572	0.000566	0.000005	1.1
04	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	-
05	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	-
06	0.008616	0.008594	0.008619	0.008610	0.000014	0.2
07	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	-

จะเห็นได้ว่า ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ที่พบในตัวอย่างน้อยกว่าปริมาณที่หวังผลในการต้านเชื้อไวรัส COVID-19 ตามการศึกษาของสุภาพร ภูมิอมร (2564) ค่อนข้างมาก ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากผลิตภัณฑ์เหล่านี้มีการเติมสารสกัดฟ้าทะลายโจรในปริมาณน้อย และแอนโดรกราโฟไลด์ก็สลายตัวได้เมื่ออยู่ในสารละลายที่เป็นน้ำ (บัณฑิตย เต็งเจริญกุล และคณะ, 2550) จึงทำให้ตรวจพบปริมาณน้อยมากหรือตรวจไม่พบเลย

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

5.1 ข้อสรุป

สารสกัดฟ้าทะลายโจรที่เตรียมได้มีลักษณะเป็นเกล็ดสีเขียว เหนียว ร้อยละผลผลิตที่ได้เท่ากับ $14.623 \pm 0.347\%$ w/w วิธีวิเคราะห์ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในสารสกัดฟ้าทะลายโจรทำโดยละลายสารสกัดฟ้าทะลายโจรใน 50% เมทานอลให้มีความเข้มข้น 1 mg/ml นำมาวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยวัฏภาคคงที่เป็นคอลัมน์ C18 วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นส่วนผสมของเมทานอลในน้ำ 40-60% ปรับสัดส่วนแบบเกรเดียนท์ อัตราการไหล 0.4 mL/min ตรวจวัดด้วยอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 224 nm โดยวิธีวิเคราะห์นี้ให้กราฟมาตรฐานของแอนโดรกราโฟไลด์ที่มีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.001-0.1 mg/mL โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 0.9999 และสามารถวิเคราะห์ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในสารสกัดฟ้าทะลายโจรได้เท่ากับ $13.818 \pm 0.332\%$ w/w

ลักษณะทางกายภาพของตำรับน้ำยาบ้วนปากพื้นที่เตรียมได้ ผ่านการทดสอบความคงตัว ทั้งสูตรมีแอลกอฮอล์และไม่มีแอลกอฮอล์ แต่ตำรับน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรไม่คงตัว ทั้ง 2 สูตร เนื่องจากสีของตำรับมีการเปลี่ยนแปลง

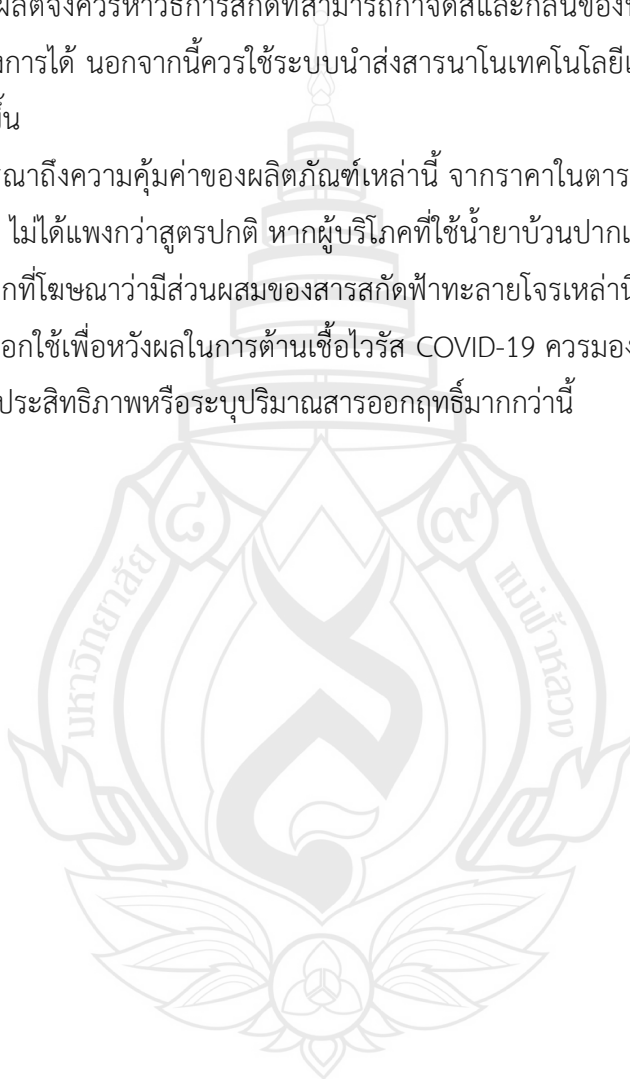
วิธีวิเคราะห์ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในน้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของสารสกัดฟ้าทะลายโจรสามารถทำได้โดยใช้สภาวะการวิเคราะห์เดียวกับวิธีวิเคราะห์สารสกัดฟ้าทะลายโจร แต่พัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างโดยเจือจางน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรใน 50% เมทานอลให้มีความเข้มข้น 0.4 g/mL ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธี พบว่า กราฟมาตรฐานแอนโดรกราโฟไลด์มีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.001-0.1 mg/mL มีค่า R^2 เท่ากับ 0.9999 มีความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ โดยมี %recovery อยู่ในช่วง 95.3-98.8 และ %RSD อยู่ในช่วง 0.2-1.5 ชัดจำกัดของการตรวจพบและชัดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณในน้ำยาบ้วนปาก เท่ากับ 0.0001 และ 0.00025% w/w ตามลำดับ สรุปได้ว่า วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีความแม่นยำและเที่ยง เมื่อนำมาวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่จำหน่ายในท้องตลาด จำนวน 7 ตัวอย่าง พบว่า มีปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์อยู่ในช่วง 0.0-0.0086% w/w

5.2 ข้อเสนอแนะ

วิธีวิเคราะห์นี้สามารถประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์แอนโดรกราโฟไลต์ในวัตถุดิบและสารสกัดฟ้าทะลายโจร รวมถึงเครื่องสำอางประเภทอื่น ๆ ได้โดยพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างให้เหมาะสม

การเติมสารสกัดฟ้าทะลายโจรลงในน้ำยาบ้วนปาก ทำให้สีและกลิ่นของผลิตภัณฑ์ไม่สวยงาม น่าใช้เท่าที่ควร ผู้ผลิตจึงควรหาวิธีการสกัดที่สามารถกำจัดสีและกลิ่นของฟ้าทะลายโจรแต่ยังคงไว้ซึ่งสารสำคัญที่ต้องการได้ นอกจากนี้ควรใช้ระบบนำส่งสารนาโนเทคโนโลยีเพื่อรักษาความคงตัวของสารสำคัญให้นานขึ้น

เมื่อพิจารณาถึงความคุ้มค่าของผลิตภัณฑ์เหล่านี้ จากราคาในตารางที่ 3.5 ถือว่าเป็นราคาทั่วไปในท้องตลาด ไม่ได้แพงกว่าสูตรปกติ หากผู้บริโภคที่ใช้น้ำยาบ้วนปากเป็นประจำแล้วจะเปลี่ยนมาใช้น้ำยาบ้วนปากที่โฆษณาว่ามีส่วนผสมของสารสกัดฟ้าทะลายโจรเหล่านี้ ก็ไม่ได้มีผลเสียอย่างใด แต่หากผู้บริโภคเลือกใช้เพื่อหวังผลในการต้านเชื้อไวรัส COVID-19 ความมอหาลผลิตภัณฑ์กลุ่มอื่นที่มีข้อมูลสนับสนุนถึงประสิทธิภาพหรือระบุปริมาณสารออกฤทธิ์มากกว่านี้





รายการอ้างอิง

รายการอ้างอิง

- กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. (2561). ฟ้าทะลายโจร. ใน *มาตรฐานสมุนไพรไทยทางเครื่องสำอาง* (เล่ม 1, หน้า 122-130). กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข.
- กิตติโชติ วรโชติกำจร. (2562). *น้ำยาบ้วนปาก (Mouthwashes)*.
<https://ccpe.pharmacycouncil.org/showfile.php?file=722>
- คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร. (ม.ป.ป.). *ข้อมูลพืชสมุนไพร ฟ้าทะลายโจร*.
http://pharmacy.su.ac.th/herbmed/herb/text/herb_detail.php?herbID=164
- จรงใจ อาริมิตร และบังอร ศรีพานิชกุลชัย. (2562). ข้อมูลของผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากเพื่อการพัฒนาต่อยอดสำหรับผู้มีปัญหาสุขภาพทางช่องปาก. *วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน*, 15(4), 75-86.
<https://he01.tci-thaijo.org/index.php/IJPS/article/view/177133/154630>
- ชูชาติ อารีจิตรานุสรณ์. (ม.ป.ป.). *บทที่ 16 โครมาโทกราฟีเหลวความดันสูง*.
<https://home.kku.ac.th/chuare/12/HPLC.pdf>
- ทิพวรรณ นิงน้อย. (2549). *แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว*. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข.
- บัณฑิตย เต็งเจริญกุล, วชิร คุณกิตติ และธานี เทศศิริ. (2550). *รายงานวิจัย โครงการการพัฒนาสมุนไพร ฟ้าทะลายโจรให้เป็นสารต้านแบคทีเรียสำหรับกึ่งกัมภกราม*. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- ประพันธ์ ปิ่นศิริโรตม. (2546). ผลของอุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง และเกลือสังกะสีคลอไรด์ต่อความคงตัวของสีเขียวของสารสกัดใบเตย. *วารสารอาหาร*, 33(4), 277-282.
https://kukr.lib.ku.ac.th/kukr_es/index.php?/kukr/search_detail/result/29449
- เมตตา เถาว์ชาลี. (2561). *ผลของ pH ที่มีต่อการย่อยสลายคลอโรฟิลล์และการหายไปของสีและระดับกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระในวอเตอร์เครส*. มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม.
<http://research.rmu.ac.th/rdi-mis//upload/fullreport/1632628269.pdf>

- เมทินี หลิมศิริวงศ์, อมร สหเมธาพัฒน์ และปิติกาญจน์ กาญจนภาพุณย์. (2562). การผลิตสารมาตรฐาน Andrographolide จากฟ้าทะลายโจร. *วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก*, 17(3), 365-375. <https://he01.tci-thaijo.org/index.php/JTTAM/article/view/232078/158441>
- เมทินี หลิมศิริวงศ์, อมร สหเมธาพัฒน์ และปิติกาญจน์ กาญจนภาพุณย์. (2562). การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องวิธีวิเคราะห์สาร Andrographolide จากฟ้าทะลายโจรด้วย UPLC. *วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก*, 17(2), 153-167. <https://he01.tci-thaijo.org/index.php/JTTAM/article/view/204996/145868>
- สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์. (2552). *เรื้องนำรู้เกี่ยวกับ "ฟ้าทะลายโจร"*. <https://www.cri.or.th/en/articles/20090729.php>
- สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. (2563). *แนวทางการจัดเตรียมและประเมินเอกสารผลิตภัณฑ์ที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัยสำหรับมือ*. [https://www.fda.moph.go.th/sites/Medical/relative/คู่มือการขออนุญาต/เอกสารต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์ที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัยสำหรับมือ \(Alcohol Gel\)/\(ร่าง\) แนวทางการจัดเตรียมและประเมินเอกสาร Alcohol Gel/\(ร่าง\) แนวทางการจัดเตรียมและประเมินเอกสาร Alcohol Gel.pdf](https://www.fda.moph.go.th/sites/Medical/relative/คู่มือการขออนุญาต/เอกสารต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์ที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัยสำหรับมือ (Alcohol Gel)/(ร่าง) แนวทางการจัดเตรียมและประเมินเอกสาร Alcohol Gel/(ร่าง) แนวทางการจัดเตรียมและประเมินเอกสาร Alcohol Gel.pdf)
- สุภาพร ภูมิอมร. (2564). *การศึกษาฤทธิ์ต้านไวรัสโควิด-19 ของพืชสมุนไพรฟ้าทะลายโจร*. ใน การเสนา วิชาการ ฟ้าทะลายโจร สมุนไพรไทยในวิกฤต COVID-19 กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก. <https://www.dtam.moph.go.th/images/download/dl0113-18062564-04.pdf>
- อัมพร เบญจพลพิทักษ์, ขวัญชัย วิศิษฐานนท์, จิตติ แสงธรรม, เทวัญ ธานีรัตน์ และกุลธนิช วนรัตน์. (2564). รายงานสังเขปผลการใช้ยาฟ้าทะลายโจรในการรักษาผู้ป่วย COVID-19. *วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก*, 19(1), 229-233. <https://he01.tci-thaijo.org/index.php/JTTAM/article/view/249140/168781>
- อารีย์ คมฤทธิ และปัทมา นพรัตน์. (2551). เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง Ultra Performance Liquid Chromatography, (UPLC). *วารสารกรมวิทยาศาสตร์บริการ*, 56(177), 16-19. http://lib3.dss.go.th/fulltext/dss_j/2551_56_177_P16_19.pdf

- Association of Official Analytical Chemists (AOAC) International. (2019). Appendix F: Guideline for Standard Method Performance Requirements. In Latimer, G. W. (Ed.), *Official Methods of Analysis of AOAC International* (Vol. 1, 21st ed.). AOAC International.
- Department of Medical Sciences. (2021). ฟ้าทะล่าย (FA THALAI). In *Thai Herbal Pharmacopoeia 2021*. (pp. 130-139). Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health.
- International Conference on Harmonization (ICH). (2005). *ICH harmonized tripartite guideline on validation of analytical procedures: Text and methodology*. European Medicines Agency. [https://database.ich.org/sites/default/files/Q2\(R1\)Guideline.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/Q2(R1)Guideline.pdf)
- Jebsen & Jessen. (2020). *Pro-health deep fresh mouthwash (OR-19003T)*. Jebsen & Jessen Group.
- Jeyaram, S., & Geethakrishnan, T. (2019). Linear and nonlinear optical properties of chlorophyll-a extracted from *Andrographis paniculata* leaves. *Optics & Laser Technology*, 116, 31-36. <https://doi.org/10.1016/j.optlastec.2019.03.013>
- Lomlim, L., Jirayupong, N., & Plubrukarn, A. (2003). Heat-Accelerated Degradation of Solid-State Andrographolide. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 51(1), 24-26. https://www.jstage.jst.go.jp/article/cpb/51/1/51_1_24/_pdf/-char/en
- Kanjanasirirat, P., Suksatu, A., Manopwisedjaroen, S., Munyoo, B., Tuchinda, P., Jearawuttanakul, K., . . . Thitithanyanont, A. (2020). High-content screening of Thai medicinal plants reveals *Boesenbergia rotunda* extract and its component Panduratin A as anti-SARS-CoV-2 agents. *Scientific Reports*, 10, 19963. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77003-3>

Rafi, M., Devi, A. F., Syafitri, U. D., Heryanto, R., Suparto, I. H., Amran, M. B., . . . Lim, L. W. (2020). Classification of *Andrographis paniculata* extracts by solvent extraction using HPLC fingerprint and chemometric analysis. *BMC Research Notes*, 13(56), 1-6. <https://doi.org/10.1186/s13104-020-4920-x>

The United States Pharmacopoeia Convention, Inc. (2016). *The United States pharmacopoeia, The national formulary 39th revision* (p. 6461, 6463). The United States Pharmacopoeia Convention, Inc.

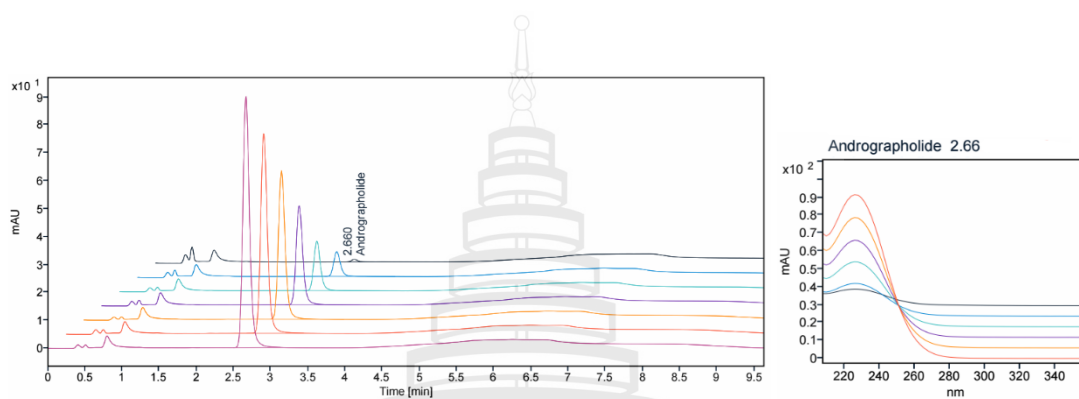
Yan, Y., Fang, L. H., & Du, G. H. (2018). Andrographolide. In *Natural Small Molecule Drugs from Plants*. (pp. 357-362). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8022-7_60



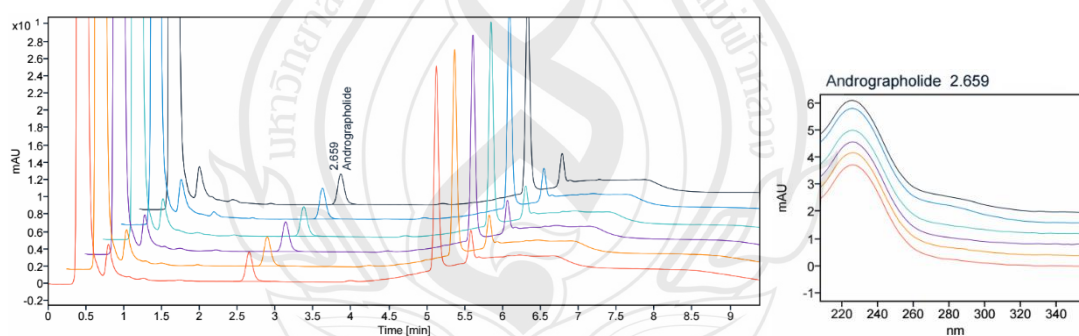


ภาคผนวก

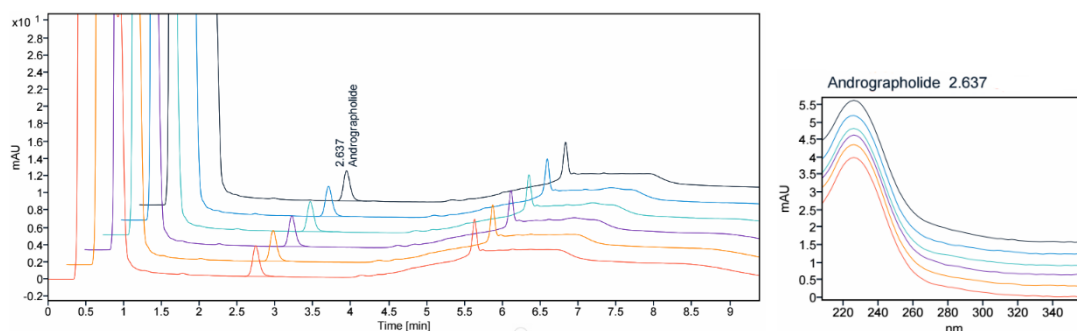
โครมาโทแกรม



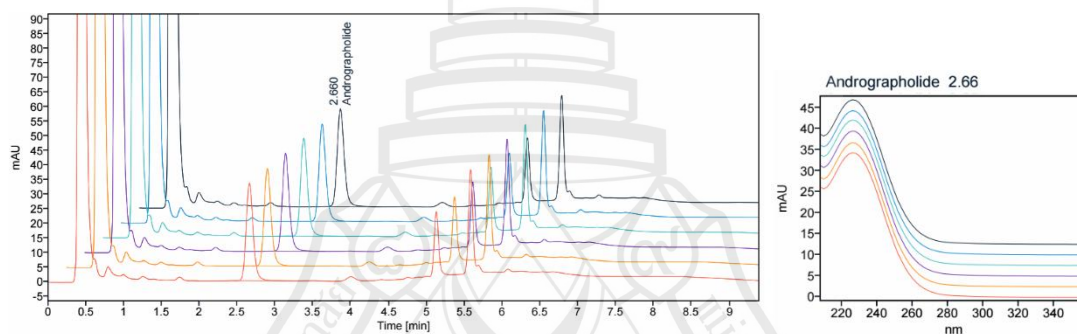
ภาพที่ 1 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานแอนโดรกราโฟไลด์ จำนวน 7 ระดับความเข้มข้น



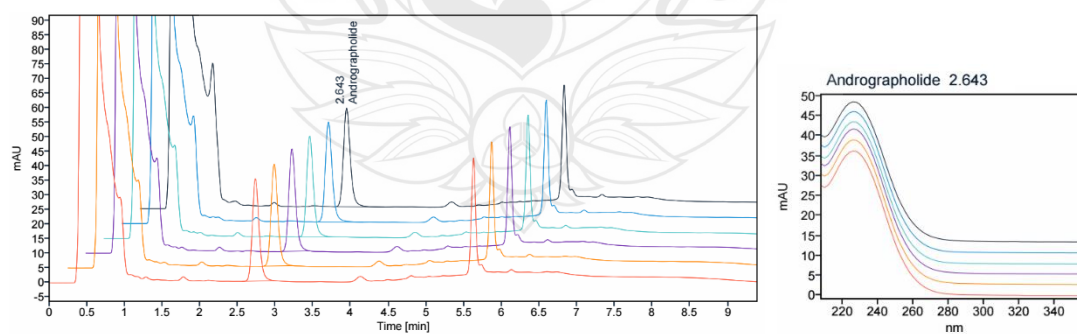
ภาพที่ 2 โครมาโทแกรมของน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร MWA-1-AP ที่มีปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ 0.0010% w/w (ความเข้มข้นต่ำ)



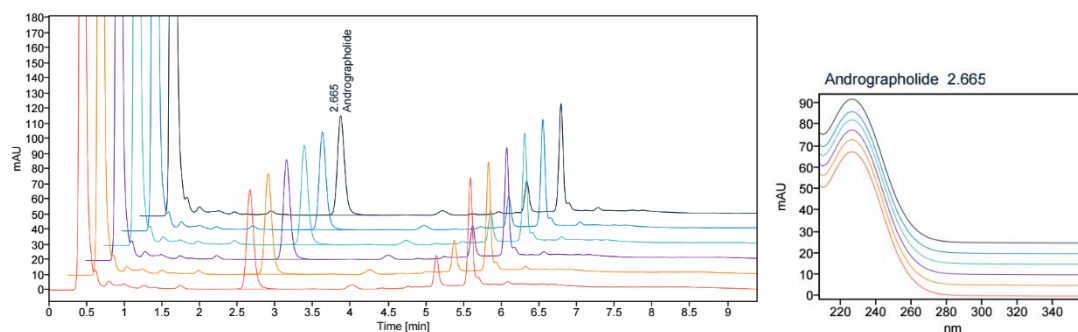
ภาพที่ 3 โครมาโทแกรมของน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร MWAf-2-AP ที่มีปริมาณ แอนโดรกราโฟไลด์ 0.0010% w/w (ความเข้มข้นต่ำ)



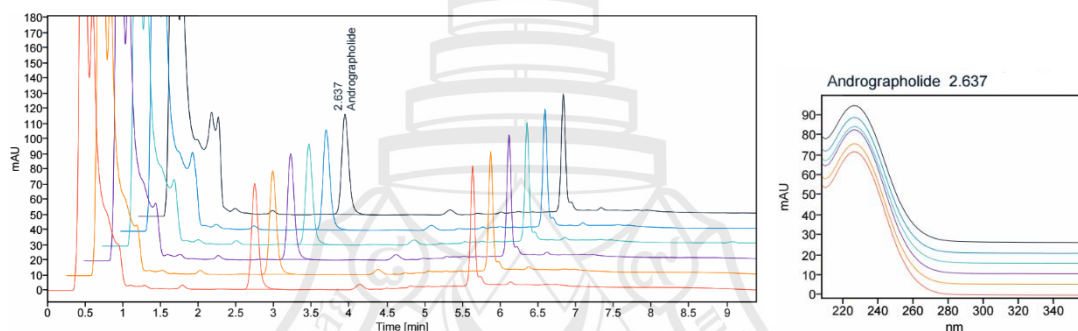
ภาพที่ 4 โครมาโทแกรมของน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร MWA-1-AP ที่มีปริมาณ แอนโดรกราโฟไลด์ 0.0100% w/w (ความเข้มข้นกลาง)



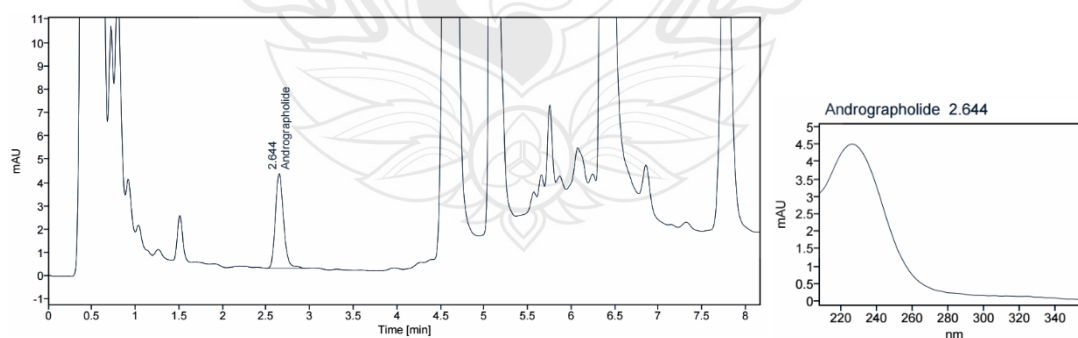
ภาพที่ 5 โครมาโทแกรมของน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร MWAf-2-AP ที่มีปริมาณ แอนโดรกราโฟไลด์ 0.0100% w/w (ความเข้มข้นกลาง)



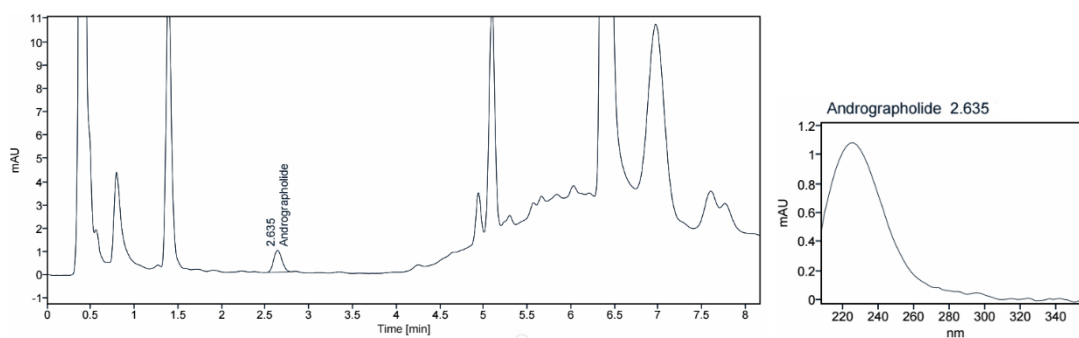
ภาพที่ 6 โครมาโทแกรมของน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร MWA-1-AP ที่มีปริมาณ แอนโดรกราโฟไลด์ 0.0225% w/w (ความเข้มข้นสูง)



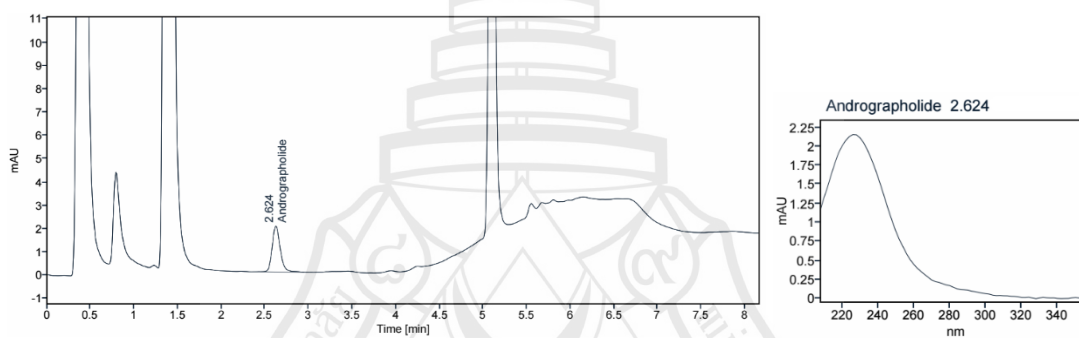
ภาพที่ 7 โครมาโทแกรมของน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร MWA-2-AP ที่มีปริมาณ แอนโดรกราโฟไลด์ 0.0225% w/w (ความเข้มข้นสูง)



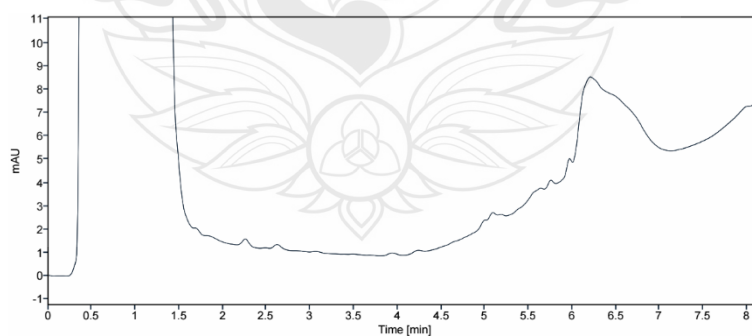
ภาพที่ 8 โครมาโทแกรมของน้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่จำหน่ายในท้องตลาด ตัวอย่างที่ 01



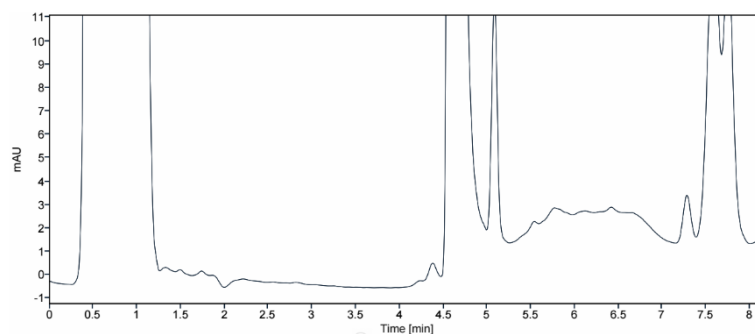
ภาพที่ 9 โครมาโทแกรมของน้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่จำหน่ายในท้องตลาด ตัวอย่างที่ 02



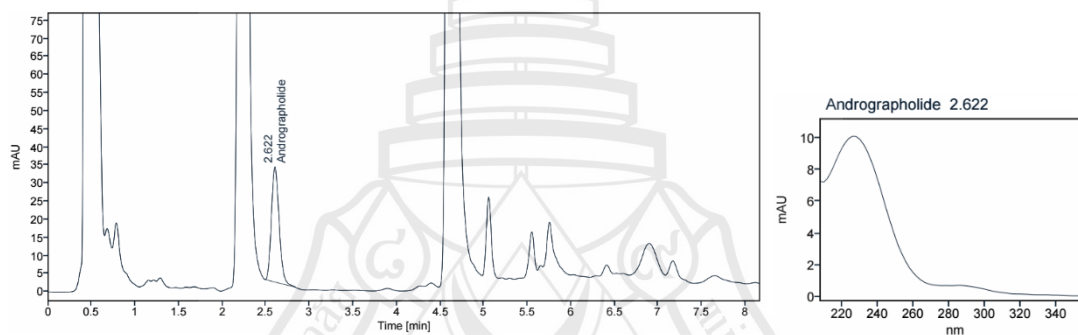
ภาพที่ 10 โครมาโทแกรมของน้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่จำหน่ายในท้องตลาด ตัวอย่างที่ 03



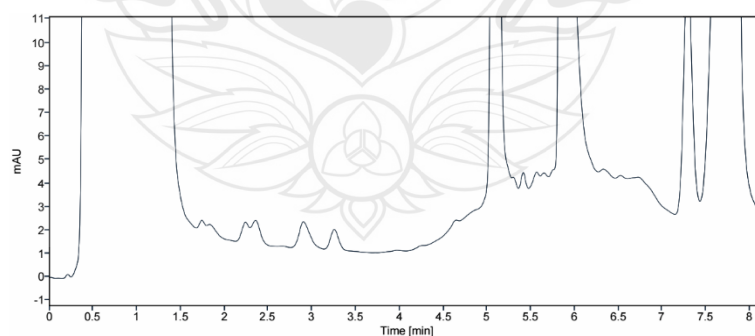
ภาพที่ 11 โครมาโทแกรมของน้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่จำหน่ายในท้องตลาด ตัวอย่างที่ 04



ภาพที่ 12 โครมาโทแกรมของน้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่จำหน่ายในท้องตลาด ตัวอย่างที่ 05



ภาพที่ 13 โครมาโทแกรมของน้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่จำหน่ายในท้องตลาด ตัวอย่างที่ 06



ภาพที่ 14 โครมาโทแกรมของน้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่จำหน่ายในท้องตลาด ตัวอย่างที่ 07