บทที่ 2

การทดลองและระเบียบวิธีวิจัย

2.1. สภาวะการทดลองทั่วไป

ในกรณีที่ไม่มีข้อกำหนดอื่นใด ตัวทำละลายและสารเคมีที่ใช้เพื่อการทดลองตลอดการวิจัยนี้ เป็นตัวทำละลายและสารเคมีระดับเพื่อการวิเคราะห์ (analytical grade; Merck) และใช้ในการศึกษาโดยไม่มีการทำให้บริสุทธิ์เพิ่มเติมใดๆ ส่วนตัวทำละลายที่ใช้เพื่อการวิเคราะห์โดยเทคนิคโครมาโตกราฟีสมรรถภาพสูง (HPLC) เป็นตัวทำละลายในระดับเพื่อ HPLC (Merck) ซึ่งกรองผ่านเมมเบรนขนาด 230 นาโนเมตร (Millipore) และกำจัดก๊าซโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูงก่อนใช้งาน

สารมาตรฐานแอนโดรกราโฟไลด์ที่ใช้ในการวิจัยนี้ เป็นแอนโดรกราโฟไลด์ที่เตรียมเพื่อใช้ในห้องปฏิบัติการของผู้วิจัยเอง ตามวิธีการสกัดแยกและการพิสูจน์เอกลักษณ์ตามที่รายงานโดย Cava et al (1962); Matsuda et al (1994) และ Lomlim et al (2003) การประเมินระดับความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน ใช้การประเมินจากสเปคตรัมของสารมาตรฐาน ทั้งนี้ สำหรับสารมาตรฐานที่ใช้ตลอดการทดลองนี้ ไม่มีการปนเปื้อนจากสารอื่นใดในระดับที่ตรวจวัดได้โดยเทคนิคทางสเปคโตรสโกปีที่ใช้ตามรายงานอ้างอิง

การวิเคราะห์ปริมาณสารตัวอย่างโดยเทคนิค HPLC ดำเนินการโดยใช้เครื่องโครมาโตกราฟีสมรรถภาพสูง Shimadzu (LC-10AD) ซึ่งประกอบกับส่วนควบคุมระบบ Shimadzu (SCL-10A) ใช้เครื่องฉีดสารตัวอย่างอัตโนมัติ Shimadzu (SIL-10AD) และต่อกับเครื่องตรวจวัดในระบบอัลตราไวโอเลต Shimadzu (SPD-10A)

2.2. ตัวอย่างสมุนไพร

ตัวอย่างสมุนไพรฟ้าทะลายโจรที่ใช้ในการวิจัยนี้ เป็นฟ้าทะลายโจรที่ปลูกในเรือนสมุนไพรของคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ พิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธานเป็น *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees. โดยผู้วิจัย (ถนอมจิต สุภาวิตา) ตัวอย่างอ้างอิงของพืชสมุนไพรเก็บรักษาไว้ที่ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ภายใต้รหัสตัวอย่าง SKP 001-01-16

การเก็บตัวอย่างพืชสมุนไพรเพื่อใช้ในการศึกษา เก็บในช่วงอายุประมาณ 3-4 เดือน (หรือก่อนดอกบาน; Dechatiwongse na Ayudhya et al, 1993) ตัวอย่างสมุนไพรที่เก็บเกี่ยวแล้ว นำมาล้างทำความสะอาด ผึ่งแห้งที่อุณหภูมิห้องประมาณ 24 ชั่วโมง และอบแห้งที่อุณหภูมิประมาณ 40-50°C นานประมาณ 18 ชั่วโมง หลังจากนั้น

จึงนำตัวอย่างสมุนไพรที่แห้งแล้วมาลดขนาด บดและแร่งผ่านตะแกรงขนาด 80 เก็บรักษาตัวอย่างสมุนไพรที่บดแล้วในถุงพลาสติกแห้งในห้องเก็บสมุนไพรที่ปรับอากาศในระยะเวลาไม่เกินกว่า 1 สัปดาห์ก่อนนำมาใช้งาน

2.3. การศึกษาความคงตัวในสภาวะเร่งด้วยความร้อน

สภาวะการทดลองเพื่อเร่งการสลายตัวของสมุนไพรด้วยความร้อนตามการวิจัยนี้ ศึกษาที่อุณหภูมิต่างๆ 3 อุณหภูมิ ได้แก่ 45, 60 และ 70°C โดยใช้ตู้อบ Memmert รุ่น BP600, B50 และ Pr402 ตามลำดับ ควบคุมความร้อนตามอุณหภูมิตามที่กำหนด (ระดับความเบี่ยงเบนประมาณ ±5°C) และควบคุมความชื้นของระบบโดยใช้ภาชนะปิดที่มีสารละลายที่อิ่มตัวของโซเดียมคลอไรด์ ซึ่งจะสร้างบรรยากาศภายในภาชนะที่มีความชื้นสัมพัทธ์ประมาณร้อยละ 75±10 เมื่ออยู่ที่อุณหภูมิตามที่กำหนดข้างต้น

ชั่งตัวอย่างสมุนไพรฟ้าทะลายโจรหลังจากบดและแร่งตามที่ระบุในข้อ 2.2. แล้ว อย่างถูกต้องแม่นยำประมาณ 5 กรัม ใส่ในห่อกระดาษขนาดประมาณ 5×5 เซนติเมตร ทั้งนี้เพื่อเปิดโอกาสให้ตัวอย่างสมุนไพรได้สัมผัสกับความร้อนและความชื้นอย่างอิสระ และเพื่อเลียนแบบวิธีการเก็บรักษาสมุนไพรในระดับต่ำกว่ามาตรฐานข้อกำหนดการเก็บรักษาสมุนไพร บรรจุของตัวอย่างสมุนไพรที่ชั่งและห่อแล้วทั้งหมดในภาชนะควบคุมความชื้นและวางในตู้อบตามกำหนดข้างต้น เก็บตัวอย่างแบบสุ่มซ้ำครั้งละ 3 ตัวอย่างตามกำหนดเวลาต่างๆ ดังนี้

- ตัวอย่างที่ 45°C; สุ่มเก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 12, 26, 40, 54, 82, 96, 110, 124 และ 138
- ตัวอย่างที่ 60°C; สุ่มเก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 2, 4, 8, 14, 18 และ 25
- ตัวอย่างที่ 70°C (ตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์); สุ่มเก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 2, 4 และ 8
- ตัวอย่างที่ 70°C (ตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์ปริมาณอนุพันธ์แลคโทนทั้งหมด); สุ่มเก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 15, 26, 40, 54 และ 68

ทั้งนี้ การสุ่มเก็บตัวอย่างสมุนไพรเพื่อการวิเคราะห์ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ที่แต่ละอุณหภูมิตามที่ระบุข้างต้น จะสิ้นสุดเมื่อปริมาณของแอนโดรกราโฟไลด์ที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ในแต่ละตัวอย่างอยู่ในระดับน้อยกว่าร้อยละ 25 ของปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้เมื่อเริ่มต้นการทดลอง (ผลการวิเคราะห์จากตัวอย่างที่สุ่มเมื่อวันที่ 0 ของการวิจัย) หรือเมื่อปริมาณตัวอย่างลดลงเทียบเท่ากับ 2 ช่วงของค่าครึ่งชีวิต

2.4. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความชื้นสัมพัทธ์กับการสลายตัวของแอนโดรกราโฟไลด์

สภาวะการทดลองเพื่อการศึกษาผลของความชื้นสัมพัทธ์ต่อการสลายตัวของแอนโดรกราโฟไลด์ในสมุนไพรฟ้าทะลายโจรเป็นสภาพบรรยากาศในภาชนะปิดสนิทที่ความชื้นสัมพัทธ์ต่างๆ 3 ค่า คือที่ร้อยละ 60, 75 และ 90 โดยใช้สารละลายอิ่มตัวของโซเดียมโบรไมด์ โซเดียมคลอไรด์ และโซเดียมอะซีเตต เป็นสารละลายควบคุมความชื้น และใช้อุณหภูมิห้องเป็นอุณหภูมิเพื่อการทดลอง

บรรจุซองตัวอย่างสมุนไพรตามที่เตรียมในลักษณะเดียวกับที่ระบุในข้อ 2.3. ในภาชนะปิดที่ควบคุมความชื้นตามที่ระบุข้างต้น โดยใช้อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ (ประมาณ 30-35°C) เป็นอุณหภูมิเพื่อการทดลอง สุ่มเก็บตัวอย่างจากแต่ละช่วงความชื้นสัมพัทธ์ ช่วงละ 3 ตัวอย่าง ในระยะเวลาต่างๆ ดังนี้; วันที่ 0, 12, 26, 40, 54, 68, 82, 96, 110, 124, 138, 152, 166, 180, 208, 222, 250 และ 260 เพื่อวิเคราะห์ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในตัวอย่าง และสุ่มตัวอย่างจากแต่ละช่วงความชื้นสัมพัทธ์ ช่วงละ 3 ตัวอย่าง ทุก 3 วัน เพื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณความชื้นในตัวอย่างโดยเครื่องวิเคราะห์ปริมาณความชื้น Sartorius Moisture Analyzer MA100

2.5. การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ

2.5.1. การสกัดสารสำคัญจากตัวอย่างสมุนไพร

กระบวนการสกัดสมุนไพรเพื่อการวิเคราะห์ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ พัฒนาขึ้นโดยผู้วิจัย ทั้งนี้ เพื่อสร้างวิธีการวิเคราะห์ที่สะดวกและรวดเร็ว รวมถึงเพื่อให้สามารถบริหารจัดการตัวอย่างสมุนไพรจำนวนมากโดยไม่สูญเสียความแม่นยำในการวิเคราะห์

กระจายผงตัวอย่างสมุนไพรจากที่สุ่มได้ตามข้อ 2.3 และ 2.4 ในเมธานอล (10 มิลลิลิตร) และรีฟลักซ์ตัวอย่างเป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง ตั้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง กรองสารละลายที่ได้ผ่านกระดาษกรองหมายเลข 4 (Whatman) ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร และล้างตะกอนผงสมุนไพร (รวม 3 ครั้ง) ด้วยเมธานอลปริมาตรรวมไม่เกิน 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมธานอล ในกรณีที่ยังไม่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างต่อไปได้ในทันที ให้เก็บสารละลายตัวอย่างที่ได้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะใช้งาน

สารละลายที่ได้จากการสกัดข้างต้น สมารถนำไปวิเคราะห์ปริมาณของแอนโดรกราโฟไลด์โดยเทคนิค HPLC ได้ทันทีโดยไม่ต้องผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์เพิ่มเติม วิธีการสกัดข้างต้น ให้ผลการวิเคราะห์ที่เป็นเส้นตรงกับการวิเคราะห์ตัวอย่างสมุนไพรอย่างน้อยในช่วง 0.2 – 0.7 กรัม (r^2 = 0.9965) และมีประสิทธิภาพใน

การสกัดแอนโดรกราโฟไลด์จากตัวอย่างสมุนไพรในช่วงประมาณ 58.01±3.40 มิลลิกรัมของแอนโดรกราโฟไลด์ต่อผงสมุนไพรฟ้าทะลายโจร 1 กรัม (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ร้อยละ 5.86)

2.5.2. การวิเคราะห์ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์โดยเทคนิค HPLC

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์โดยเทคนิค HPLC ตามที่ใช้ในการวิจัยนี้ พัฒนาจากวิธีการวิเคราะห์โดย Lomlim et al (2003) โดยใช้สารละลายตัวอย่างสมุนไพรฟ้าทะลายโจรตามที่สกัดได้ในข้อ 2.5.1 ข้างต้น เจือจางด้วยอะซีโตไนไทรล์อย่างถูกต้องแม่นยำให้ได้ความเข้มข้นสารละลายตัวอย่างที่เหมาะสมก่อนวิเคราะห์ (อัตราส่วนการเจือจางขึ้นกับความเข้มข้นของตัวอย่างแอนโดรกราโฟไลด์ที่มีในสารละลายตัวอย่างตั้งต้น)

สภาวะการแยกและการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC เป็นดังนี้; คอลัมน์ C-18 Thermo-Hypersil ขนาด 250×4.6 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาควัสดุดูดซับในคอลัมน์ 5 นาโนเมตร ดำเนินการทดลองที่อุณหภูมิห้อง ปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่ฉีดเข้าคอลัมน์ต่อครั้งเท่ากับ 20 ไมโครลิตร ระบบตัวทำละลายที่ใช้ชะคอลัมน์เป็นระบบเปลี่ยนความเข้มข้นแบบขั้นบันได เริ่มจากสารละลายอะซีโตไนไทรล์ในน้ำความเข้มข้นร้อยละ 27 โดยปริมาตร นาน 9 นาที ปรับเพิ่มความเข้มข้นเป็นสารละลายอะซีโตไนไทรล์ในน้ำความเข้มข้นร้อยละ 50 ภายใน 1 นาที และชะด้วยตัวทำละลายความเข้มข้นนี้อีกเป็นเวลา 7.5 นาที อัตราการไหลของตัวทำละลายในระบบเท่ากับ 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดปริมาณสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์โดยการวัดการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร สามารถตรวจวัดสัญญาณในโครมาโตแกรมของแอนโดรกราโฟไลด์ได้ที่เวลาคงค้างประมาณ 6.8 นาที

การประเมินประสิทธิภาพการวิเคราะห์ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์เป็นไปตามที่ระบุในรายงานโดย Lomlim et al. (2003) และประเมินความเป็นเส้นตรงของวิธีการวิเคราะห์ในช่วงซึ่งความเข้มข้นของแอนโดรกราโฟไลด์ในสารละลายตัวอย่างมีค่าเท่ากับ 1-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นประจำทุกวันที่มีปฏิบัติการวิเคราะห์ (r^2 อยู่ในช่วงสูงกว่า 0.998 ทุกครั้ง)

2.5.3. การวิเคราะห์ปริมาณแลคโทนทั้งหมด

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณแลคโทนทั้งหมดในตัวอย่างสมุนไพรฟ้าทะลายโจร ใช้วิธีการประเมินมาตรฐานสมุนไพรที่ระบุในเภสัชตำรับ Thai Herbal Pharmacopoeia (1998) วิธีการวิเคราะห์โดยย่อเป็นดังนี้

รีฟลักซ์สารละลายสมุนไพรฟ้าทะลายโจรจากการสุ่มตามข้อ 2.3. ในตัวทำละลายเอธานอล (ความเข้มข้นร้อยละ 85) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นาน 2 ชั่วโมง กรองสารละลายขณะร้อนผ่านกระดาษกรองและล้างตะกอนซ้ำหลายๆ ครั้งด้วยตัวทำละลายเอธานอลความเข้มข้นร้อยละ 85 รวมสารละลายที่กรองได้ทั้งหมด ตั้งไว้ให้เย็นแล้วเติมสารละลาย basic lead acetate ($Pb(OAc)_2.PbO$) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 15 นาทีแล้วกรองแยกตะกอนออก

เติมสารละลายโซเดียมซัลเฟตปริมาตร 1 มิลลิลิตร (ทีละหยด) แล้วตั้งสารละลายที่ได้ไว้อีก 1 ชั่วโมง จากนั้นรีฟลักซ์สารละลายนี้กับผงถ่าน (500 มิลลิกรัม) นาน 0 นาที กรองสารละลายที่ได้ และเติมน้ำ 20 มิลลิลิตร จากนั้นปรับให้สารละลายเป็นกลางต่อฟีนอล์ฟธาลีนด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เติมสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์เพิ่มอีก 5.0 มิลลิลิตร และรีฟลักซ์สารละลายนี้อีก 30 นาที ตั้งสารละลายนี้ไว้ให้เย็นและไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ จนถึงจุดยุติของฟีนอล์ฟธาลีน ปริมาณของแลคโทนทั้งหมด คำนวณในรูปของแอนโดรกราโฟไลด์โดยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ สมมูลกับแอนโดรกราโฟไลด์ 35.05 มิลลิกรัม