โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ ระบบกักเก็บสารสกัดฟ้าทะลายโจรและน้ำมันสมุนไพรลงในอนุภาคระดับนาโนเมตรของแคปปา-คาร์ราจีแนน

Nanoencapsulations of Andrographolide extract and herbal oil loaded in kappa-carrageenan

ชื่อนิสิต นางสาวธาริณี พนาสหธรรม เลขประจำตัว 6033042523

ภาควิชา เคมี

ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ระบบกักเก็บสารสกัดฟ้าทะลายโจรและน้ำมันสมุนไพรลงในอนุภาคระดับนาโนเมตรของแคปปา-คาร์ราจีแนน

Nanoencapsulations of Andrographolide extract and herbal oil loaded in kappa-carrageenan

โดย

นางสาวธาริณี พนาสหธรรม

รายงานนี้เป็นสวนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2563

โครงการ ระบบกักเก็บสารสกัดฟ้าทะลายโจรและน้ำมันสมุนไพรลงในอนุภาคระดับนาโนเมตรของแคปปา-คาร์ราจีแนน

โดย นางสาวธาริณี พนาสหธรรม

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

1. รองศาสตราจารย์ ดร.สมใจ เพ็งปรีชา ประธานกรรมการ
2. ศาสตราจารย์ ดร.อรวรรณ ชัยลภากุล กรรมการ
3. ศาสตราจารย์ ดร.นงนุช เหมืองสิน อาจารย์ที่ปรึกษา
4. รองศาสตราจารย์ ดร.ณรงค์ ประไพรักษ์สิทธิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

.....

(ศาสตราจารย์ ดร.นงนุช เหมืองสิน)
อาจารย์ที่ปรึกษา

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.วรวีร์ โฮเว่น)
หัวหน้าภาควิชาเคมี

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ณรงค์ ประไพรักษ์สิทธิ์)
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

วันที่ 14 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2564

ชื่อโครงการ ระบบกักเก็บสารสกัดฟ้าทะลายโจรและน้ำมันสมุนไพรลงในอนุภาคระดับนาโนเมตรของแคปปา-คาร์ราจีแนน
ชื่อนิสิตในโครงการ นางสาวธาริณี พนาสหธรรม เลขประจำตัว 6033042523
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ศาสตราจารย์ ดร.นงนุช เหมืองสิน
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ ดร.ณรงค์ ประไพรักษ์สิทธิ์
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2563

บทคัดย่อ

ฟ้าทะลายโจรเป็นสมุนไพรท้องถิ่นของประเทศไทย มีสรรพคุณในการรักษาโรคเจ็บคอ แก้ท้องเสียได้ แต่ฟ้าทะลายโจรยังมีปัญหาต่อผู้บริโภคในเรื่องของรสชาติที่มีความขม ซึ่งสามารถแก้ไขได้โดยการนำสาร Carrageenan มาห่อหุ้มสาร Andrographolide ด้วยวิธีการ Nanoencapsulation เพื่อนำไปทำเป็นเครื่องดื่มที่มีส่วนผสมของสารสกัดฟ้าทะลายโจร จะได้สารละลายที่อยู่ในรูปแบบของ Oil-in-water emulsions อีกทั้งยังทดสอบการสกัด Andrographolide จากฟ้าทะลายโจร ขั้นตอนแรกของการทดสอบการสกัด คือ สกัดฟ้าทะลายโจรด้วยวิธีการ Reflux ด้วยตัวทำละลาย 50% (v/v) Ethanol จากนั้นจึงทดสอบด้วย TLC เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร ซึ่งสรุปได้ว่าเป็นสารชนิดเดียวกัน เนื่องจากมีค่า R_f ใกล้เคียงกัน การทดสอบต่อไปคือการทำ NMR เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของ Andrographolide ของสารมาตรฐานกับ Crude ได้ผลคือมีค่าตรงกันที่ตำแหน่ง 3.5 ppm และ 2.5 ppm ตามทฤษฎี และขั้นตอนสุดท้ายของการทดสอบการสกัดคือการทดสอบปริมาณสาร Andrographolide โดยใช้ HPLC-UV Vis Spectroscopy สร้างสมการเส้นตรงที่มีค่า R^2 = 0.9994 ที่สามารถนำมาคำนวณปริมาณ Crude Andrographolide ได้ โดยในครั้งที่ 1 ค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 99.69 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และครั้งที่ 2 ค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 74.81 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อมาคือการทดลองการละลาย Carrageenan กับ KCl โดย K^+ จะเข้าไปจับตัวประจุลบของ Carrageenan ทำให้สารไม่เป็นเนื้อเจล สารละลายจะมีความข่นจากความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น สุดท้ายการทดลอง Oil-in-water emulsion จะสังเกตสี กลิ่น และความเป็นเนื้อเดียวกันโดยเปรียบเทียบจากการที่ผสมสาร Andrographolide และไม่ผสมสาร Andrographolide แนวโน้มว่าปริมาณ Tween80 ที่เพิ่มขึ้นจะทำให้มีกลิ่นหอมหวานขึ้น ในอัตราส่วน 1:2 ดีที่สุด เป็นเนื้อเดียวกัน ไม่แยกชั้นจากกัน สรุปผลการทดลองทั้งหมดสามารถทำให้เกิดเครื่องดื่มสารละลายที่อยู่ในรูปแบบของ oil-in-water emulsions

คำสำคัญ: การห่อหุ้มด้วยคาร์ราจีแนน, เครื่องดื่มที่ลดความขม, ฟ้าทะลายโจร

Project Title Nanoencapsulations of Andrographolide extract and herbal oil loaded in kappa-carrageenan
Student Name Miss Tarinee Panasahatham Student ID 603304252323
Advisor Name Professor Nongnuj Muangsin, Ph.D.
Co-advisor Name Associate Professor Narong Praphairaksit, Ph.D.
Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Year 2020

Abstract

Andrographis paniculata is a local herb of Thailand. It is used as a treatment for some symptoms such as sore throat, fever and diarrhea. However, the problem of this herb is the bitter taste from it. The aim of this study is to determine the factors influencing the efficiency of nano encapsulation, study the change of Andrographis paniculata %yield and also to encapsulated Andrographis paniculata by carrageenan nanoparticles to reduce the bitter taste. The first Andrographis extraction was Reflux using 50% (v/v) Ethanol solvent, then TLC test to prove its identity and the result can be concluded that it is the same substance since the R_f values are similar, the next experiment is to prove the identity of the Andrographolide using NMR. The first and second times of the standard and Crude are the same at 3.5 ppm and 2.5 ppm. The last one is the Andrographolide quantity test using HPLC-UV Vis Spectroscopy to generate a linear equation with R^2 = 0.9994 which can be used to calculate the amount of crude andrographolide, in the 1st time the mean was 99.69 Micrograms per milliliter and the second the mean was 74.81. Micrograms per milliliter Next is an experiment to dissolve Carrageenan with KCl, where K^+ binds to Carrageenan's anion, making it a gel-free substance. The solution will become turbid from the increased concentration. Finally, the oil-in-water emulsion experiment observed color, odor and homogeneity by comparing the mixture. Andrographolide and without andrographolide It is likely that the increased amount of Tween80 will produce a sweeter aroma in a 1: 2 ratios is best, homogeneous. Not separated from each other All results were able to produce oil-in-water emulsions.

Keyword: Andrographis paniculata, Beverage bitterness, Encapsulation carrageenan

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.นงนุช เหมืองสิน อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่ให้ความรู้ ความเมตตา คำแนะนำต่างๆ และแนวทางในการทำวิจัย อีกทั้งยังให้ความช่วยเหลือมาโดยตลอด ทำให้งานวิจัยเล่มนี้สำเร็จลุล่วงได้ดี รองศาสตราจารย์ ดร.ณรงค์ ประไพรักษ์สิทธิ์ช่วยเหลือในการตรวจทานเล่มให้มีความเรียบร้อยและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สมใจ เพ็งปรีชา และ ศาสตราจารย์ ดร.อรวรรณ ชัยลภากุล ที่กรุณาสละเวลาในการตรวจทานแก้ไขรายงานฉบับนี้ให้สมบูรณ์แบบมากยิ่งขึ้น ตลอดจนถึงการให้คำแนะนำและเป็นเกียรติเป็นคณะกรรมการในการสอบวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนสนับสนุนในการดำเนินงานวิจัยครั้งนี้ ขอขอบพระคุณพี่ในห้องปฏิบัติการที่ให้ความรู้ และเอื้อเฟื้อต่ออุปกรณ์ สารเคมีที่จำเป็นในการทำวิจัย ขอบคุณเพื่อนภาควิชาเคมี ที่ให้ความรู้จนสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานวิจัยนี้ รวมถึงกำลังใจจากครอบครัว คนสำคัญ เพื่อน ในภาควิชาเคมีทุกคน ที่ช่วยเหลืองานวิจัยนี้ผ่านลุล่วงไปได้ด้วยดี

ธาริณี พนาสหธรรม

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ค

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ง

กิตติกรรมประกาศ จ

สารบัญ ฉ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ 2

1.3 ขอบเขตงานวิจัย 2

1.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 2

1.5 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง 3

บทที่ 2 การทดลอง 9

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ 9

2.2 สารเคมี 9

2.3 วิธีการทดลอง 10

2.3.1 การสกัด Andrographolide 10

2.3.2 การทดสอบด้วย TLC 11

2.3.3 การทดสอบด้วย NMR 11

2.3.4 การทดสอบด้วย HPLC-UV Vis Spectroscopy 11

2.3.5 การเตรียม carrageenan 12

2.3.6 การเตรียมสารสกัดฟ้าทะลายโจรให้อยู่ในรูป oil-in-water emulsion 12

2.4 วิธีการคำนวณ 13

2.4.1 การหาค่า %yield 13

2.4.2 การหาค่า R_f ของ TLC 13

2.4.3 การแปลผลของ NMR 14

2.4.4 การวิเคราะห์ปริมาณของ Andrographolide จาก HPLC-UV Vis Spectroscopy 14

บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง.....16

3.1. ผลจากการสกัดฟ้าทะลายโจร..... 16

3.2. ผลการทดสอบจาก TLC..... 17

3.3. ผลการทดสอบจาก NMR..... 17

3.4. ผลการวิเคราะห์ปริมาณ Andrographolide จาก HPLC-UV Vis Spectroscopy..... 19

3.5. ผลการทดสอบจาก Carrageenan..... 20

3.6. ผลการตรวจสอบ Oil-in-water emulsions..... 20

บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง.....23

เอกสารอ้างอิง.....25

ประวัติผู้วิจัย.....26

สารบัญภาพ

รูปที่ 1.1 ขั้นตอนการเกิด Nanoencapsulation.....3

รูปที่ 1.2 โครงสร้างทางเคมีของสารสกัดต่าง ๆ จากสมุนไพรฟ้าทะลายโจร.....4

รูปที่ 1.3 Oil-in-water emulsion (O/W emulsion).....5

รูปที่ 1.4 รูปโครงสร้าง phospholipid.....6

รูปที่ 1.5 โครงสร้างทางเคมีของ Tween80.....7

รูปที่ 2.1 วิธีการทดลองหาสารสกัด Andrographolide จากผงฟ้าทะลายโจร.....10

รูปที่ 2.2 การวางแผ่น TLC ที่แต้มสารแล้วลงในบีกเกอร์.....11

รูปที่ 2.3 การเตรียมสาร carrageenan.....12

รูปที่ 2.4 ตัวอย่างแผ่น TLC ในการทดลอง.....13

รูปที่ 2.5 ตัวอย่าง 1H NMR สเปกตรัมของสารมาตรฐาน Andrographolide.....14

รูปที่ 2.6 ตัวอย่าง Chromatogram จากเครื่อง HPLC.....15

รูปที่ 3.1 สารสกัดจากฟ้าทะลายโจรครั้งที่ 1.....16

รูปที่ 3.2 สารสกัดจากฟ้าทะลายโจรครั้งที่ 2.....16

รูปที่ 3.3 ตัวอย่างผล TLC ของ Andrographolide.....17

รูปที่ 3.4 สารมาตรฐาน ^{1}H NMR Andrographolide.....18

รูปที่ 3.5 ^{1}H NMR Crude Andrographolide ครั้งที่ 1.....18

รูปที่ 3.6 ^{1}H NMR Crude Andrographolide ครั้งที่ 2.....19

รูปที่ 3.7 Calibration curve ของสาร Andrographolide จาก HPLC-UV Vis Spectroscopy.....19

รูปที่ 3.8 ตัวอย่าง carrageenan ที่มีการผสม KCl.....20

รูปที่ 3.9 ขั้นตอนการใช้เครื่อง Ultrasonic Homogenizer.....21

รูปที่ 3.10 ตัวอย่าง Oil-in-water emulsion ที่มี Andrographolide ผสมอยู่และไม่ผสม.....22

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1.1 ข้อมูลจำเพาะของสารสกัด Andrographolide.....5

ตารางที่ 1.2 ข้อมูลจำเพาะของ Tween80.....8

ตารางที่ 3.1 ปริมาณสารสกัด Andrographolide.....20

ตารางที่ 3.2 ผลการสังเกตจาก Carrageenan.....20

ตารางที่ 3.3 ผลการสังเกต Oil-in-water emulsion.....21

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ฟ้าทะลายโจรเป็นพืชสมุนไพรท้องถิ่นของประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีสรรพคุณในการรักษาโรคจากสารสกัดสำคัญที่สามารถสกัดได้จากส่วนใบ และ ลำต้น ในปัจจุบันมีการนำฟ้าทะลายโจรมาบริโภคหลากหลายรูปแบบ ไม่ว่าจะเป็นการนำใบและกิ่งไปต้มสดเพื่อดื่ม นำไปตากแห้งเพื่อต้มดื่ม บดเป็นผงผสมน้ำผึ้งเพื่อทำเป็นยาลูกกลอน บดเป็นผงบรรจุใส่แคปซูล สูดดมผง หรือนำสารสกัดฟ้าทะลายโจรมาบรรจุในแคปซูลเป็นต้น สารสกัดสำคัญของฟ้าทะลายโจรเป็นสารสกัดที่อยู่ในกลุ่ม diterpene lactones ประกอบไปด้วย andrographolide, neo-andrographolide, deoxy-andrographolide และ deoxy-didehydro andrographolide [1] ซึ่งมีฤทธิทางยาช่วยรักษาโรคท้องเสียชนิดที่ไม่เกิดจากการติดเชื้อ บรรเทาอาการโรคหวัด และ บรรเทาอาการเจ็บคอ [2]

ถึงแม้ว่าผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพรฟ้าทะลายโจรจะมีการใช้เพื่อการรักษาโรคอย่างแพร่หลาย เป็นที่รู้จักและถูกนำไปบริโภคในวงกว้าง แต่ฟ้าทะลายโจรยังมีปัญหาต่อผู้บริโภคในเรื่องของรสชาติที่มีความขม หรือผู้ป่วยไม่ยอมกินยา เนื่องจากเม็ดยามีขนาดใหญ่ เป็นปัญหาต่อผู้บริโภคเช่นเดียวกับตัวยาหรืออาหารเสริมอื่น ๆ เช่น อาหารเสริมวิตามิน โดยในปัจจุบันได้มีการแก้ปัญหาโดยนำมาทำในรูปของน้ำดื่มผสมวิตามินแทนวิตามินแบบเม็ดซึ่งสะดวกในการบริโภคมากกว่า เข้ากับกระแสการบริโภคเพื่อสุขภาพ ส่งผลให้เป็นที่นิยมอย่างมากจนทำให้มีผู้ประกอบการทำน้ำดื่มผสมวิตามินลงแข่งในตลาดมูลค่ากว่า 5.5 พันล้านบาทในปี 2020 [3] แต่เนื่องจากสารสกัดจากฟ้าทะลายโจรนั้นมีรสชาติขม การใส่สารสกัดลงไปละลายกับน้ำดื่มเพื่อบริโภคโดยตรงนั้นไม่สามารถแก้ไขปัญหาได้ จึงต้องใช้วิธีการอื่น คือ การห่อหุ้มสารสกัดฟ้าทะลายโจรด้วยสารที่ไม่มีรสชาติขม โดยใช้วิธีการ nanoencapsulation

การห่อหุ้มสารด้วยวิธี nanoencapsulation มีวิธีการหลากหลายรูปแบบ มีสารสกัดหลายชนิดที่สามารถถูกนำมาห่อหุ้มได้ เช่น beta-carotene, anthocyanin, caffeine และ andrographolide เป็นต้น โดย C. Soukoulis และคณะ [4] ได้ทำ nanoencapsulation โดยใช้สาร carrageenan เข้าไปห่อหุ้มสาร beta-carotene ได้สำเร็จด้วยวิธีการ magnetic stirring ซึ่งได้มีการกล่าวถึงตัวแปรสำคัญที่ส่งผลต่อการทำให้เกิด nanoencapsulation ประกอบไปด้วย อุณหภูมิ เวลา ความเข้มข้น ตัวแปรเหล่านี้ส่งผลโดยตรงต่อประสิทธิภาพในการทำ nanoencapsulation โดยหลังจากการทำ nanoencapsulation จะได้สารละลายที่อยู่ในรูปแบบของ oil-in-gel emulsions

ในงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นไปที่การแก้ไขปัญหาในการบริโภคฟ้าทะลายโจรโดยการนำสาร carrageenan มาห่อหุ้มสาร andrographolide ด้วยวิธีการ nanoencapsulation เพื่อนำไปทำเป็นเครื่องดื่มที่มีส่วนผสมของสารสกัดฟ้าทะลายโจร ทำการศึกษาตัวแปรที่มีผลต่อประสิทธิภาพ nanoencapsulation รวมไปถึงศึกษาการเปลี่ยนแปลง %yield ของสารสกัดฟ้าทะลายโจรเช่นกัน

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 ทดลองหาปริมาณสารสกัด Andrographolide ในฟ้าทะลายโจร

1.2.2 ห่อหุ้มสารสกัด Andrographolide ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ให้ประโยชน์ของฟ้าทะลายโจรเพื่อลดความขม โดยใช้วิธี Oil-in-water emulsion

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1.3.1 สกัด Andrographolide ในฟ้าทะลายโจร ด้วยตัวทำละลาย 50% Ethanol

1.3.2 พิสูจน์เอกลักษณ์สารสกัด Andrographolide ด้วย Thin Layer Chromatography (TLC), NMR Spectroscopy และ High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

1.3.3 ห่อหุ้มสารสกัด Andrographolide ด้วยวิธี Oil-in-water emulsion

1.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปี ค.ศ. 2019 เมทินี และคณะ [5] ได้ทำการสกัดสารมาตรฐาน Andrographolide จากฟ้าทะลายโจร เนื่องจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ผลิตสารสำคัญของฟ้าทะลายโจรโดยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย Chloroform, Ethanol และ Methanol แล้วนำมาแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกซ้ำด้วย ethanol นำสารที่สำคัญไปตรวจยืนยันเอกลักษณ์และความบริสุทธิ์ด้วยวิธี IR spectroscopy, mass spectrometry พบว่ามีความบริสุทธิ์โดยวิธี Ultra-Performance Liquid Chromatography เท่ากับ 98.2% และแยกสารโดยเทคนิคการละลายที่ใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสม ความสามารถในการแยก andrographolide ในฟ้าทะลายโจรออกจากกลุ่ม Diterpene Lactones ได้อย่างเฉพาะเจาะจงและมีประสิทธิภาพร้อยละ 0.18 และทดสอบสารสกัดที่ได้ ด้วยวิธีการต่าง ๆ เช่น Thin Layer Chromatography (TLC) และ NMR Spectroscopy เป็นต้น

Vinod และคณะ [6] ได้ทำการทดสอบ TLC กับสารสกัด Andrographolide ในฟ้าทะลายโจร โดยใช้ Mobile Phase ของการทดลองคือ Chloroform : Methanol (7:1) โดย R_f ของสารมาตรฐาน andrographolide มีค่าเท่ากับ 0.61 และ R_f ของสารสกัดฟ้าทะลายโจรมีค่าเท่ากับ 0.65 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน ดังนั้นวิธีการทดสอบ TLC กับสารสกัด Andrographolide เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพและสามารถทำการทดลองได้ผลที่น่าพึงพอใจ จึงทดสอบในเชิงปริมาณด้วยวิธี HPLC-UV Vis Spectroscopy จากงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ในปี ค.ศ. 2015 Sajeeb และคณะ [7] ได้ทำการทดลองแบบ External Calibration curve ผู้ทำการทดลองจึงทดลองตามงานวิจัยนี้ เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ Andrographolide วิธีการทดลองคือการนำสารมาตรฐาน Andrographolide มาทำเป็น External Calibration curve และสารสกัดเป็นตัวอย่างในการวิเคราะห์ จะได้กราฟโครมาโตแกรมของเครื่อง HPLC-UV Vis Spectroscopy

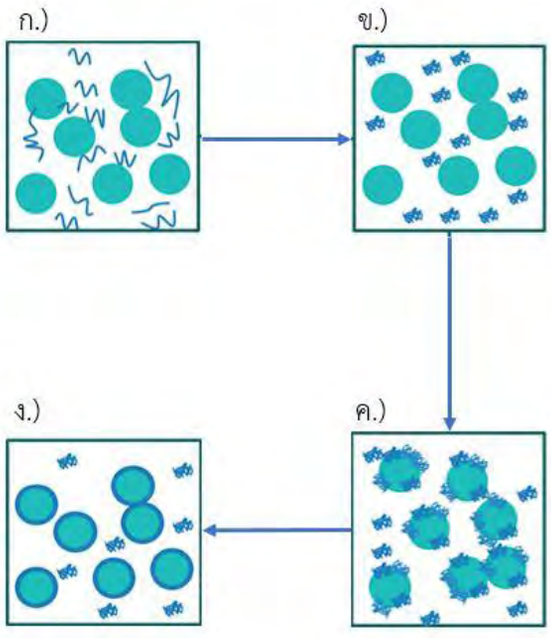
เมื่อได้สารสกัด Andrographolide จึงเริ่มต้นการห่อหุ้มสารสกัด Andrographolide โดยมีหลายวิธีการในการห่อหุ้ม เช่น Water-in-oil emulsion และ Oil-in-water emulsion โดยในปี ค.ศ. 2012 Hong

และคณะ [8] ได้ทำการทดสอบเปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่าง tween80 : ethanol ในช่วง 1:4 - 4:1 และน้ำมันเป็นอัตราส่วนของทั้งหมด 1:9 - 9:1 เทสารทั้งหมดลงในน้ำกลั่น ให้อยู่ในรูป Oil-in-water emulsion ด้วยการ หยดลงในสารละลายที่คนด้วย magnetic stirrer ที่ 37 องศาเซลเซียส โดยผลที่เกิด สามารถวัดขนาดของอนุภาคได้ 15.9 นาโนเมตร มีความเสถียรต่อสภาพแวดล้อม และสามารถดูดซึมเข้าร่างกายได้ดี ดังนั้นงานวิจัยทั้งหมดเพื่อให้เกิดการห่อหุ้มสารสกัดตามจุดประสงค์ของการทดลอง

1.5 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

1.5.1 การห่อหุ้มระดับนาโนเมตร (Nanoencapsulation)

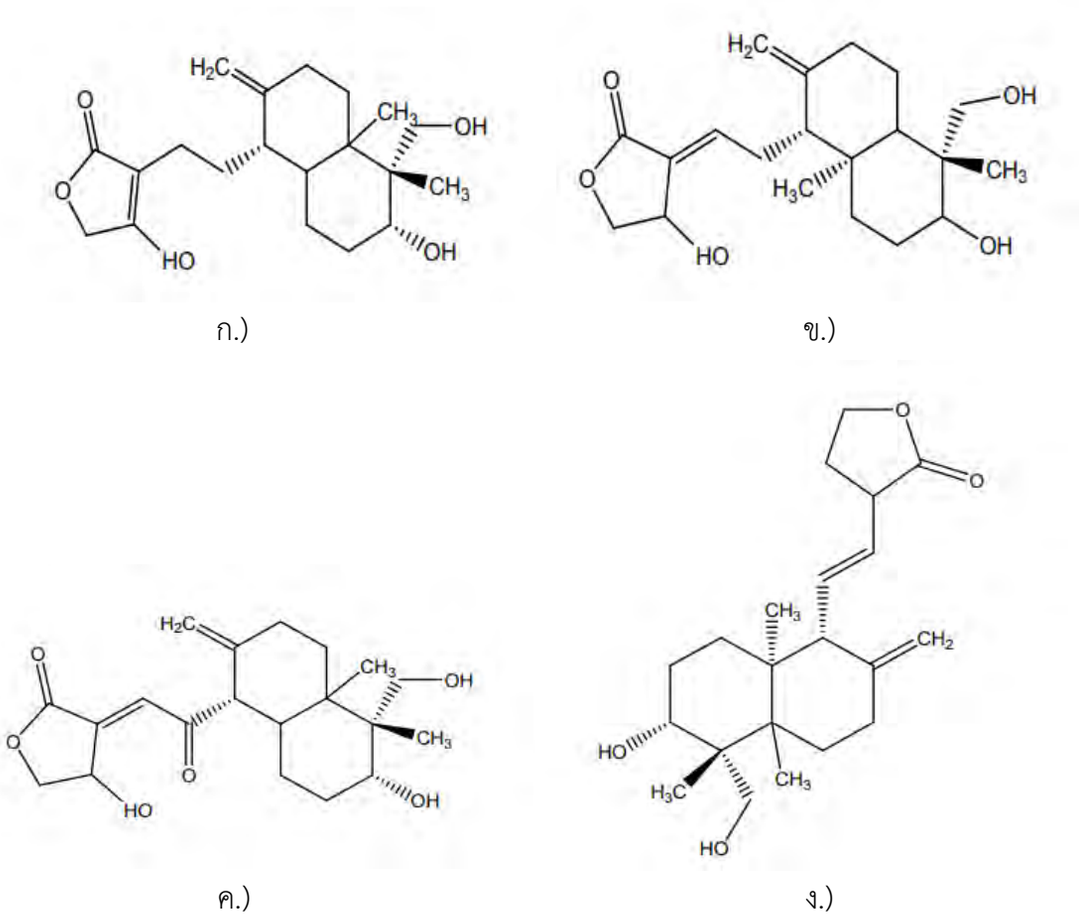
Nanoencapsulation คือ การกักเก็บสารสกัดให้มีเสถียรภาพในระดับนาโนที่สามารถนำสารสกัดเข้าสู่ชั้นผิวที่ลึกได้ตามความต้องการอย่างตรงจุด เพื่อเพิ่มความคงตัว (Stability) ของสารที่ถูกกักเก็บไว้ด้านในไม่ให้เกิดการออกซิเดชัน (Oxidation) หรือ การทำปฏิกิริยาเมื่อสารได้รับธาตุออกซิเจนส่งผลให้สารเหล่านั้นยังคงสภาพเดิมเมื่อต้องนำไปผสมในสูตร และปกป้องให้ผลิตภัณฑ์มีสภาพคงเดิมไม่เปลี่ยนสีหรือเสียคุณภาพ อีกทั้งยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการนำพาสารเข้าสู่ผิวได้ในชั้นที่ลึกตามความต้องการได้อย่างดีเยี่ยม



รูปที่ 1.1 ขั้นตอนการเกิด Nanoencapsulation ก.) การที่ Bio polymer ยังไม่จับตัวกันเป็นเส้นยาว ข.) Polymer เริ่มมีการจับตัวกัน ค.) เกิดการ Encapsulation ง.) Nanoencapsulation อย่างสมบูรณ์ [9]

1.5.2 สารสกัดจากฟ้าทะลายโจร

สมุนไพรฟ้าทะลายโจร หรือ *Andrographis paniculata* เป็นพืชสมุนไพรที่มีรสชาติขม ใช้บริโภคเพื่อจุดประสงค์ในการทานเป็นยารักษาโรค โดยมีสารสกัดสำคัญในกลุ่ม diterpene lactone ที่มีรสชาติขม เช่น 14-deoxy-11-oxo-andrographolide,14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide, 14-deoxy - andrographolide, andrographolide และสารสกัดที่ไม่มีรสชาติขม เช่น neoandrographolide, homoandrographolide, andrographosterol, andrographone, andrographane เป็นต้น ตัวอย่างโครงสร้างโมเลกุลของสารสกัดต่าง ๆ แสดงดังรูปที่ 1.2 โดยสารสกัดเหล่านี้เป็นสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ป้องกันการเกิดเซลล์มะเร็ง ช่วยปรับสมดุลไนตริกออกไซด์ในระบบไหลเวียนโลหิต และรักษาอาการติดเชื้อในทางเดินหายใจจากโรคไข้หวัด [10]



รูปที่ 1.2 โครงสร้างทางเคมีของสารสกัดต่าง ๆ จากสมุนไพรฟ้าทะลายโจร

ก.) 14-deoxyandrographolide ข.) Andrographolide

ค.) 14-deoxy-11-oxoandrographolide ง.) 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide

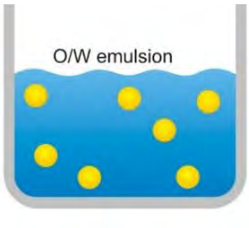
จากตัวอย่างสารสกัดต่าง ๆ ที่สามารถสกัดได้จากสมุนไพรฟ้าทลายโจร สารสกัด Andrographolide คือ สารสกัดที่สนใจในงานนี้ เพราะเป็นส่วนที่ให้ความขมของฟ้าทะลายโจรซึ่งมีฤทธิทางยาช่วยรักษาโรคท้องเสียชนิดที่ไม่เกิดจากการติดเชื้อ บรรเทาอาการโรคหวัด และ บรรเทาอาการเจ็บคอ และห่อหุ้มสารสกัด Andrographolide โดยข้อมูลจำเพาะของสารสกัด Andrographolide แสดงในตารางที่ 1.1

ตารางที่ 1.1 ข้อมูลจำเพาะของสารสกัด Andrographolide

ชื่อ IUPAC	2(5H)-Furanone, 3-[2-[(1R,4aS,5R,6R,8aS)-decahydro-6-hydroxy-5-(hydroxymethyl)-5,8a-dimethyl-2-methylene-1-naphthalenyl] ethyl]- (9CI, ACI)
สูตรโมเลกุล	$C_{20}H_{30}O_4$
มวลโมเลกุล	334.45 g/mol
จุดหลอมเหลว	170-172 °C
จุดเดือด	509.5 °C
ความหนาแน่น	1.15 g/cm^3
ลักษณะทางกายภาพ	เป็นผลึกสีขาว มีกลิ่นฉุนเหมือนต้นฟ้าทะลายโจร กลิ่นรู้สึกได้ถึงการกัดกร่อน
ความสามารถละลายในตัวทำละลาย	ละลายได้ในmethanol ethanol และ chloroform

1.5.3 อิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (Oil-in-water emulsion)

อิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (Oil-in-water emulsion, O/W) มีน้ำมันเป็นวัฏภาคภายใน และน้ำเป็นวัฏภาคภายนอก เช่น น้ำนม (milk) ข้อสังเกตุ หรือวิธีทดสอบอิมัลชันประเภทนี้คือ สามารถทำให้เจือจางได้ด้วยการเติมน้ำ มีค่าการนำไฟฟ้า (electrical conductivity) สูงกว่า ผสมได้กับสีชนิดที่ละลายน้ำ (water soluble dye)



รูปที่ 1.3 Oil-in-water emulsion (O/W emulsion) [11]

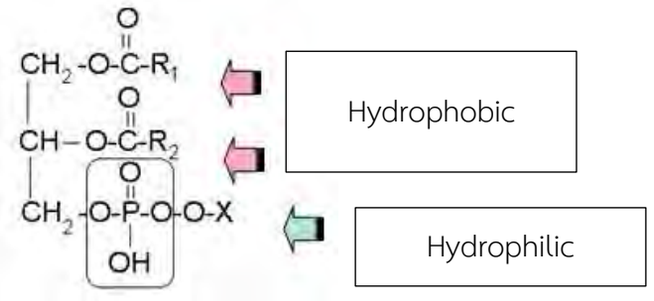
<u>กลไกการเกิดอิมัลชัน</u>

- การทำให้ของเหลวแตกตัว กระจายเป็นหยดขนาดเล็กๆ ช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างของเหลว 2 ชนิด สามารถทำได้ด้วยการใช้ แรงกล เช่น การผสม (mixing) ด้วยเครื่องผสม (mixer) การฮอโมจิไนซ์ (homogenization) ด้วยเครื่องฮอโมจิไนซ์ (homogenizer) เครื่องบดคอลลอยด์ (colloid mill)
- การทำให้อิมัลชันคงตัว เพื่อไม่ให้แยกชั้นเมื่อตั้งทิ้งไว้ ด้วยการลดแรงตึงผิวของของเหลวทั้งสองส่วน โดยการเติมสารอิมัลซิไฟเออร์ (emulsifier)

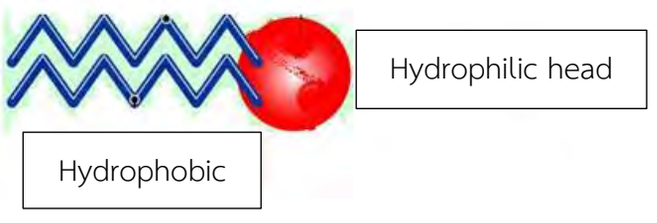
<u>การไม่คงตัวของอิมัลชัน</u>

การไม่คงตัวของอิมัลชัน อาจเกิดจากการรวมตัวกัน (coalescence) หรือการจับกลุ่ม (flocculation) ของวัฏภาคภายใน มีสาเหตุมาจากหลายประการ เช่น ในน้ำนม (milk) ความร้อน ทำลายฟิล์มโปรตีนที่ห่อหุ้มวัฏภาคภายใน ทำให้แยกชั้นครีม (cream)

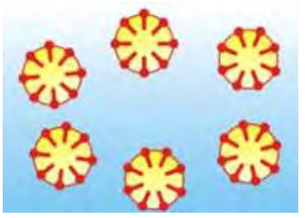
อิมัลซิไฟเออร์ (emulsifier) คือสารที่ใช้ลดแรงตึงผิว (surface tension) ของของเหลว โดยช่วยป้องกันอิมัลชันไม่ให้แยกเป็นชั้น ซึ่งในโมเลกุลของอิมัลซิไฟเออร์ มีทั้งส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) โดยจะหันส่วนที่ชอบน้ำเข้าหาน้ำ และหันส่วนที่ไม่ชอบน้ำเข้าหาน้ำมัน เกิดเป็นฟิล์มหุ้มส่วนที่เป็นวัฏภาคภายในไว้ ตัวอย่างของอิมัลซิไฟเออร์ ที่ใช้ในอาหาร เช่น มอโนกลีเซอไรด์ (monoglyceride) ไดกลีเซอไรด์ (diglyceride) ฟอสโฟลิพิด (phospholipid) เช่น เลซิทิน (lecithin)



ก.)



ข.)



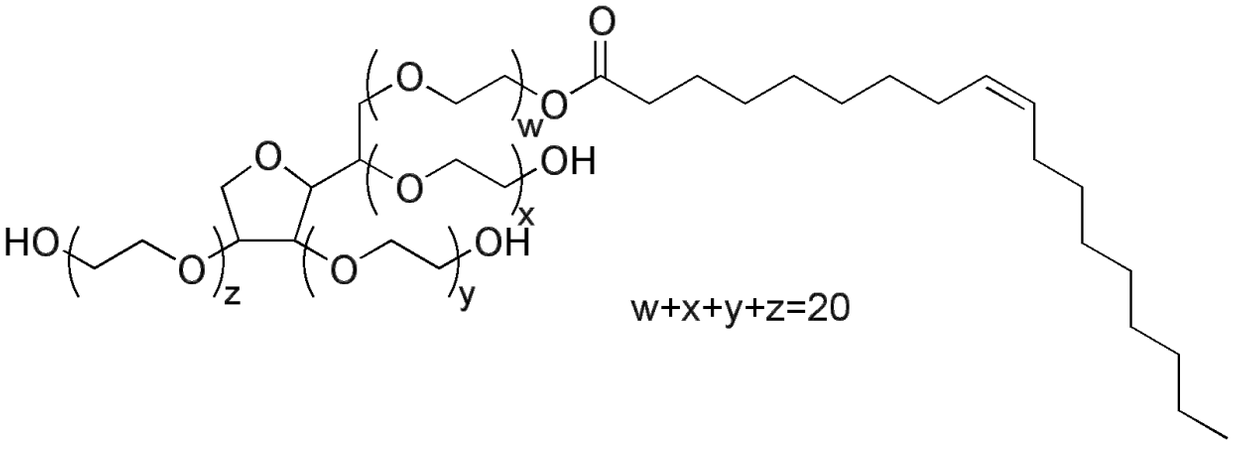
ค.)

รูปที่ 1.4 ก.) เป็นโครงสร้างทางเคมีของ Phospholipid ซึ่งเป็นตัวอย่างโมเลกุลของ Emulsifier ข.) ตัวอย่างภาพ Cell Hydrophobic tail และ Hydrophilic Head ค.) ตัวอย่างการเกิด Emulsifier ใน Oil-in-water emulsion Hydrophobic tail จะล้อมรอบสารที่ไม่ชอบน้ำ [11]

1.5.4 สารลดแรงตึงผิว (Surfactant)

สารลดแรงตึงผิว (Surfactant) หรือ surface active agent หรือ amphiphile คือ สารที่มีโมเลกุลหรือไอออนซึ่งประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่มีขั้วหรือส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และส่วนที่ไม่มีขั้ว หรือส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ซึ่งทั้ง 2 ส่วนนี้ต้องสมดุลกันทำให้ถูกดูดซับที่พื้นผิวหรือระหว่างพื้นผิวของของเหลว ทำให้ความเข้มข้นที่พื้นผิวสูงกว่าความเข้มข้นภายในเนื้อของของเหลวและแรงตึงผิวลดลง

สารที่เป็น surfactant ได้แก่ Tween80 (Polysorbate 80) ที่ใช้ในการทดลองนี้ ดังรูปที่ 1.5



รูปที่ 1.5 โครงสร้างทางเคมีของ Tween80 [12]

ตารางที่ 1.2 ข้อมูลจำเพาะของ Tween80

ชื่อ IUPAC	Polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate
สูตรโมเลกุล	$C_{64}H_{124}O_{26}$
มวลโมเลกุล	1310 g/mol
จุดเดือด	>100 °C
ความหนาแน่น	1.102 g/cm^3
ลักษณะทางกายภาพ	เป็นของเหลวสีเหลืองอำพัน มีกลิ่นหวานเฉพาะตัว
ความสามารถละลายในตัวทำละลาย	ละลายได้ใน ethanol, cottonseed oil, corn oil, ethyl acetate, methanol และ toluene

จากข้อมูลทั้งหมดสามารถทำให้เกิดประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับเป็นเครื่องดื่มฟ้าทะลายโจรที่สามารถลดสารที่มีฤทธิ์ขมได้ คือ ห่อหุ้มสาร Andrographolide ด้วย Carrageenan โดยให้เครื่องดื่มอยู่ในรูปของ Oil-in-water emulsion ก็จะได้เครื่องดื่มที่บริโภคได้อย่างแท้จริง

บทที่ 2

การทดลอง

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

Evaporator

Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (NMR)

HPLC-UV Vis spectroscopy

Ultrasonic Homogenizer

2.2 สารเคมี

สารสกัด Andrographolide

50% v/v Ethanol

สารมาตรฐาน Andrographolide

สารที่ใช้ในการทดสอบ TLC

Methanol

Chloroform

สารที่ใช้ในการทำ encapsulation

Kappa-Carrageenan

Tween80

Coconut Oil

Ethanol

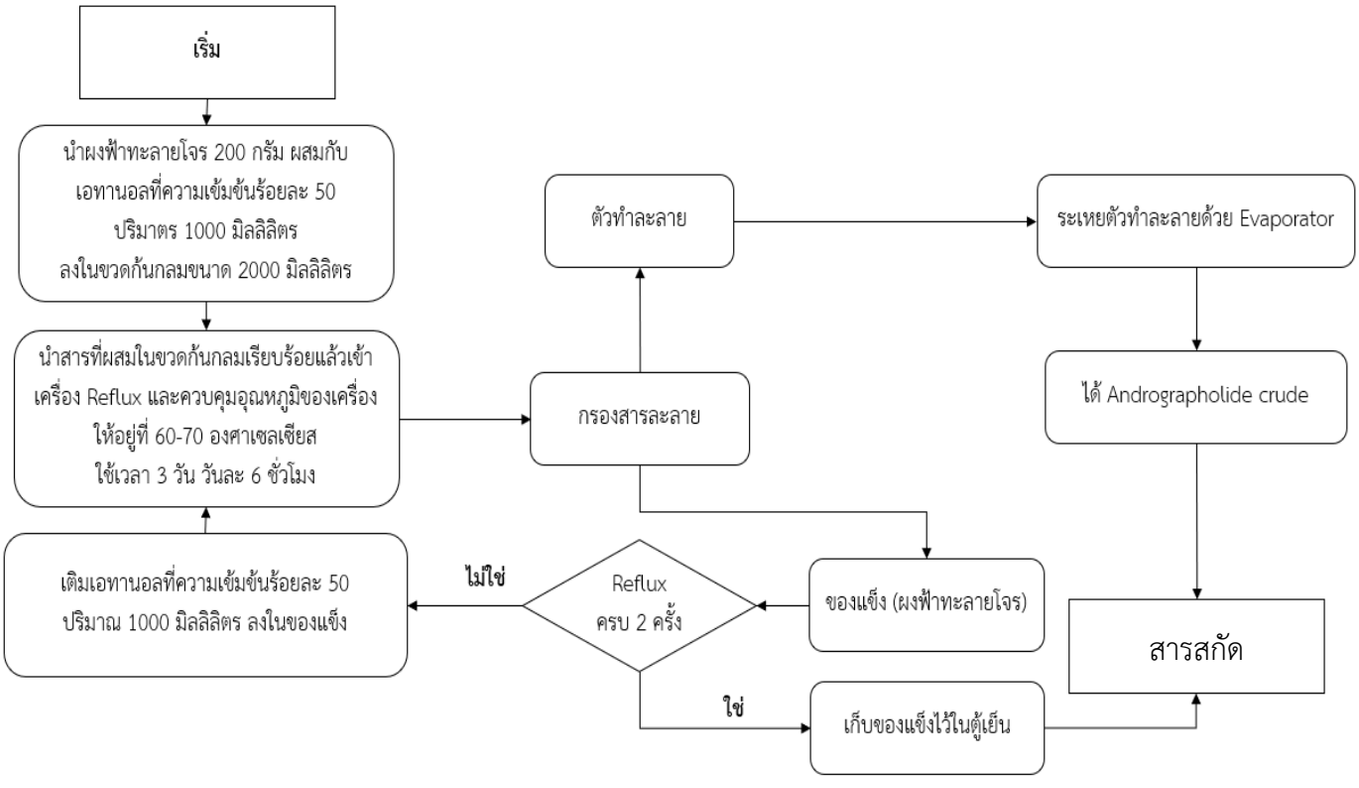
Deion Water

2.3 วิธีการทดลอง

การทดลองแบ่งออกเป็นสองส่วน คือ การทดลองหาสารสกัด Andrographolide จากผงฟ้าทะลายโจรเพื่อทำการทดสอบหาร้อยละของสารสกัด Andrographolide ที่สามารถสกัดออกมาได้ และ การทดลอง Nanoencapsulation สารสกัด Andrographolide ที่ได้จากขั้นตอนแรก ด้วยสาร Carrageenan เพื่อทำการทดสอบหาร้อยละของสารสกัด Andrographolide ที่ถูก Nanoencapsulation ด้วยสาร Carrageenan ในขั้นตอนสุดท้าย

2.3.1 การสกัด Andrographolide

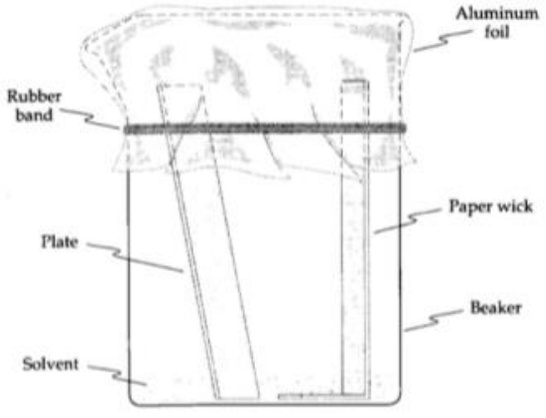
ในการทดลอง จะทำการสกัดสาร Andrographolide จากผงฟ้าทะลายโจรจำนวน 200 กรัม ด้วยวิธีการ Reflux จำนวนสองครั้งต่อหนึ่งการทดลอง โดยวิธีการทดลองแสดงดังรูปที่ 2.1 และทำการทดลองทั้งหมดตั้งแต่เริ่มจนจบทั้งหมดสองครั้ง จากนั้นทำการทดสอบสารสกัดด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) และหาร้อยละของสารสกัด Andrographolide ที่สามารถสกัดออกมาได้จากการทดลองทั้งสองครั้ง



รูปที่ 2.1 วิธีการทดลองหาสารสกัด Andrographolide จากผงฟ้าทะลายโจร

2.3.2 การทดสอบด้วย TLC

การทำ TLC เริ่มด้วยการเตรียมแผ่นที่มีวัฏภาคนิ่งเคลือบอยู่ โดยใช้ Zinc sulphide ซึ่งเป็นสารเรืองแสงเคลือบบนแผ่นอลูมิเนียมบาง ทำให้สังเกตตำแหน่งของสารโดยใช้แสง UV สะดวก เตรียมสารตัวอย่างให้อยู่ในรูปของสารละลายที่มีความเข้มข้นประมาณ 1% แล้วแต้มบน TLC ให้ห่างจากปลายด้านล่างขึ้นมาประมาณ 0.5 เซนติเมตร แล้วนำไปจุ่มลงในบีกเกอร์ที่มีตัวทำละลายใส่ไว้เพียงเล็กน้อยโดยให้ระดับตัวทำละลายสูงไม่เกินระดับที่แต้มสารตัวอย่าง แสดงดังรูปที่ 2.2 ตัวทำละลายที่ใช้ในวัฏภาคเคลื่อนที่ คือ Methanol และ Chloroform ในอัตราส่วน 1:12 คอยสังเกตรอยเปียกของตัวทำละลายซึมขึ้นด้านบนของแผ่น TLC ห่างประมาณ 0.5 เซนติเมตร รีบเอาแผ่นออก ปิดด้วยกระจกนาฬิกาให้อยู่ในระบบปิด และใช้ดินสอขีดรอย solvent front ไว้ เพื่อใช้ในการคำนวณค่า R_f (Retention factor) ของสาร ค่า R_f ของสารเป็นอัตราส่วนระหว่างระยะทางที่สารเคลื่อนที่จากจุดเริ่มต้น ไปยังตำแหน่งสุดท้าย



รูปที่ 2.2 การวางแผ่น TLC ที่แต้มสารแล้วลงในบีกเกอร์

2.3.3 การทดสอบด้วย NMR

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ Andrographolide จาก ^{1}H NMR Spectrum DMSO-D_6 400 MHz จากการนำสารมาตรฐาน Andrographolide มาละลายใน DMSO-D_6 และสารสกัด Andrographolide ไม่ละลายใน DMSO ทั้งหมดจึงมีการกรองด้วยกระดาษกรองที่มีรูขนาด 0.45 ไมครอน และนำไปเข้าเครื่อง NMR

2.3.4 การทดสอบด้วย HPLC-UV Vis Spectroscopy

การเตรียม Stock 1000 ppm โดยการชั่งสารมาตรฐาน Andrographolide 100 มิลลิกรัม ละลายใน Methanol 100 มิลลิลิตร จากการเจือจางเพื่อเตรียมช่วงความเข้มข้นของสารมาตรฐานดังนี้ 140, 120, 100, 60, 40 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยกรองด้วยกระดาษกรองที่มีรูขนาด 0.45 ไมครอน

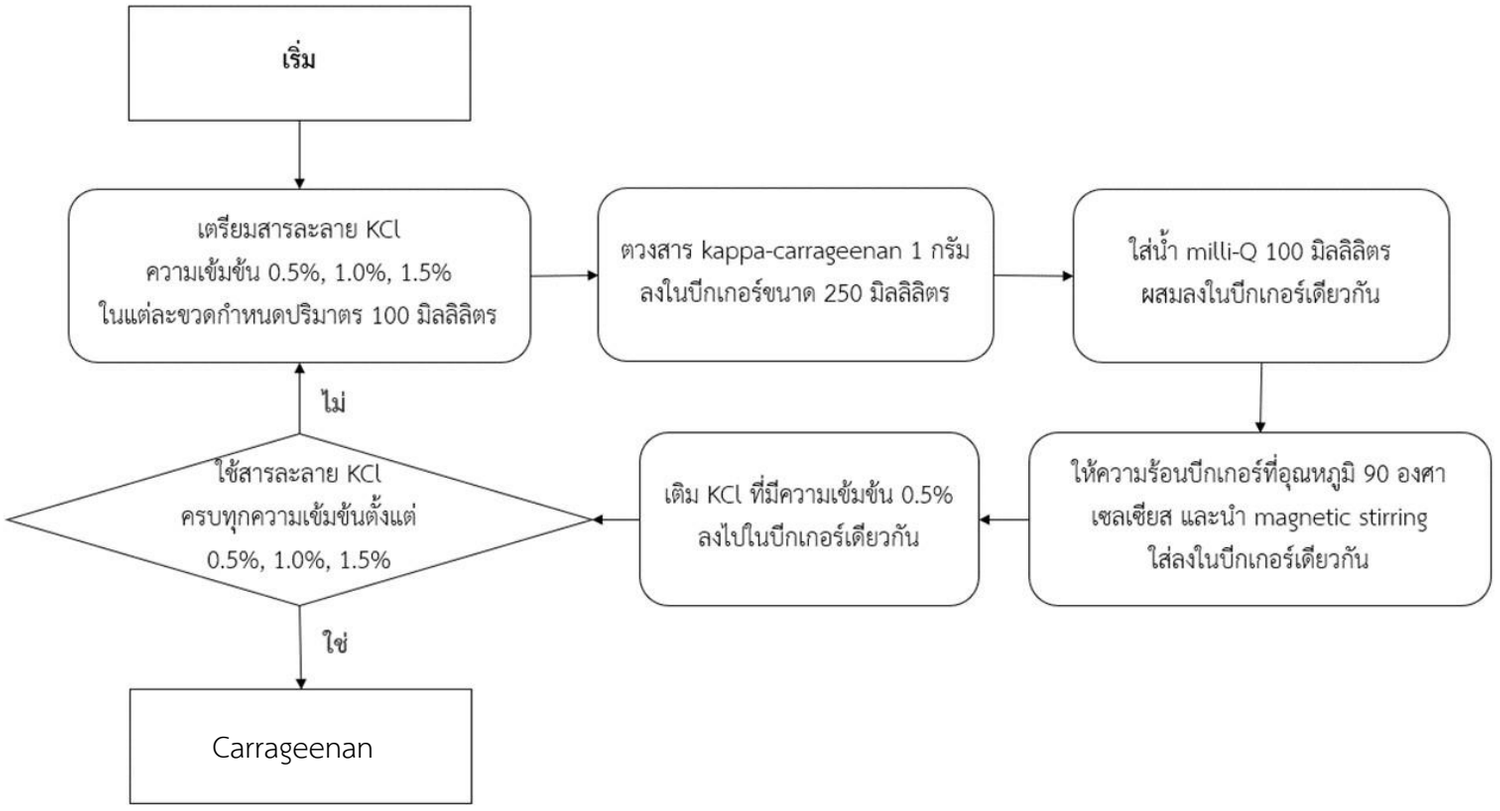
เงื่อนไขของเครื่อง HPLC คือ ต้องทำโดยใช้วิธีการ Reverse phase HPLC กับ Column : Eclipse XDB C_{18} 5 ไมโครเมตร 4.6 x 150 มิลลิเมตรเป็น Stationary phase และมี Mobile phase คือ Methanol และน้ำ ในอัตราส่วน 65:35 โดยใช้ Flow rate 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิของเครื่องในอุณหภูมิห้อง ใน

แต่ละการฉีด ใช้ 20 ไมโครลิตร ในการวิเคราะห์ สุดท้าย Detector คือ UV Vis Spectroscopy ที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 223 นาโนเมตร

การวัดปริมาณสารสกัด Andrographolide ในตัวอย่าง จะใช้วิธีเช่นเดียวกับสารมาตรฐาน แต่ในการฉีดจะใช้ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารตัวอย่างได้จาก Calibration Curve จากสารมาตรฐานทั้ง 6 ความเข้มข้น

2.3.5 การเตรียม carrageenan

การเตรียมสาร carrageenan ที่ความเข้มข้น โดยวิธีการทดลองแสดงดังรูปที่ 2.3 ทดสอบด้วยการสังเกต



รูปที่ 2.3 การเตรียมสาร carrageenan

2.3.6 การเตรียมสารสกัดฟ้าทะลายโจรให้อยู่ในรูป oil-in-water emulsion

การเตรียมสารมีองค์ประกอบห้าอย่าง หนึ่งสารสกัด Andrographolide, Ethanol, Tween80, Coconut oil และ Deion water (DI water) วิธีการเริ่มจากการผสมสาร Ethanol กับ Tween80 ให้เป็นอัตราส่วน 4:1, 3:1, 2:1 และ 1:1 ละลายสารสกัด Andrographolide 0.05 g ให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเติม Coconut oil กับ DI Water ในอัตราส่วน 1:9 จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง Ultrasonic Homogenizer เป็นเวลา 2 นาที

2.4 วิธีการคำนวณ

2.4.1 การหาค่า %yield

หลังจากการทำทดลองสกัดสาร Andrographolide จากผงฟ้าทะลายโจรจนครบสองครั้ง จะต้องทำการทดสอบหาร้อยละของสารสกัด Andrographolide ที่สามารถสกัดออกมาได้ หรือที่เรียกว่า %Yield โดยสามารถคำนวณได้ตามสมการที่ 2.1

$$\%Yield = \frac{Extracted\ mass}{Dry\ mass} \times 100\% \quad (2.1)$$

Extracted mass คือ Andrographolide crude

Dry mass คือ ผงฟ้าทะลายโจรจำนวน 200 กรัม

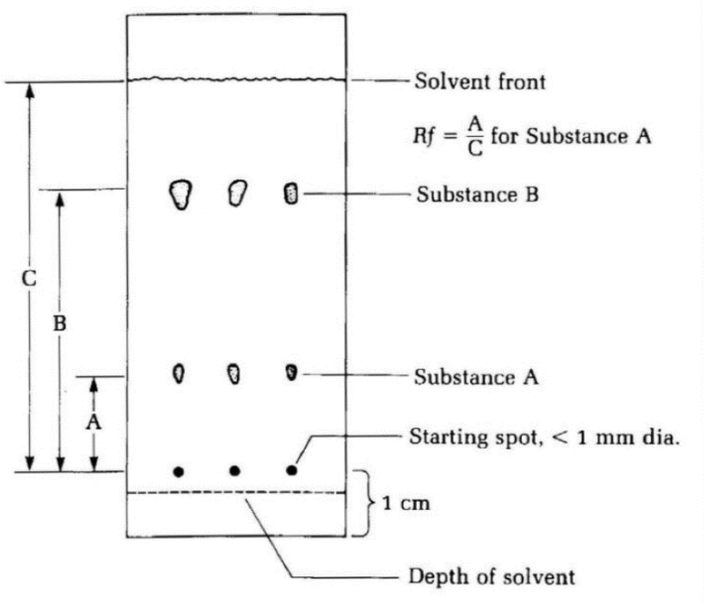
2.4.2 การหาค่า R_f ของ TLC

หลังจากสกัดสาร Andrographolide จนออกมาเป็น Crude นำสารสกัดมาละลายใน Chloroform และSpotting สารลงบนแผ่น TLC พร้อมสารมาตรฐาน Andrographolide เพื่อจะทดสอบว่าสารที่สกัดมาได้มีค่า R_f ใกล้เคียงกัน ดังรูปที่ 2.4 จากการสังเกตด้วยการส่องไฟ UV เพื่อให้เห็นจุดที่มีค่าใกล้เคียงกัน

$$Rf = \frac{spotting}{Solvent\ front}$$

Spotting คือ ค่าที่สารเคลื่อนที่ถึง

Solvent front คือ ค่าที่ทำการขีดเส้นจากแผ่น TLC



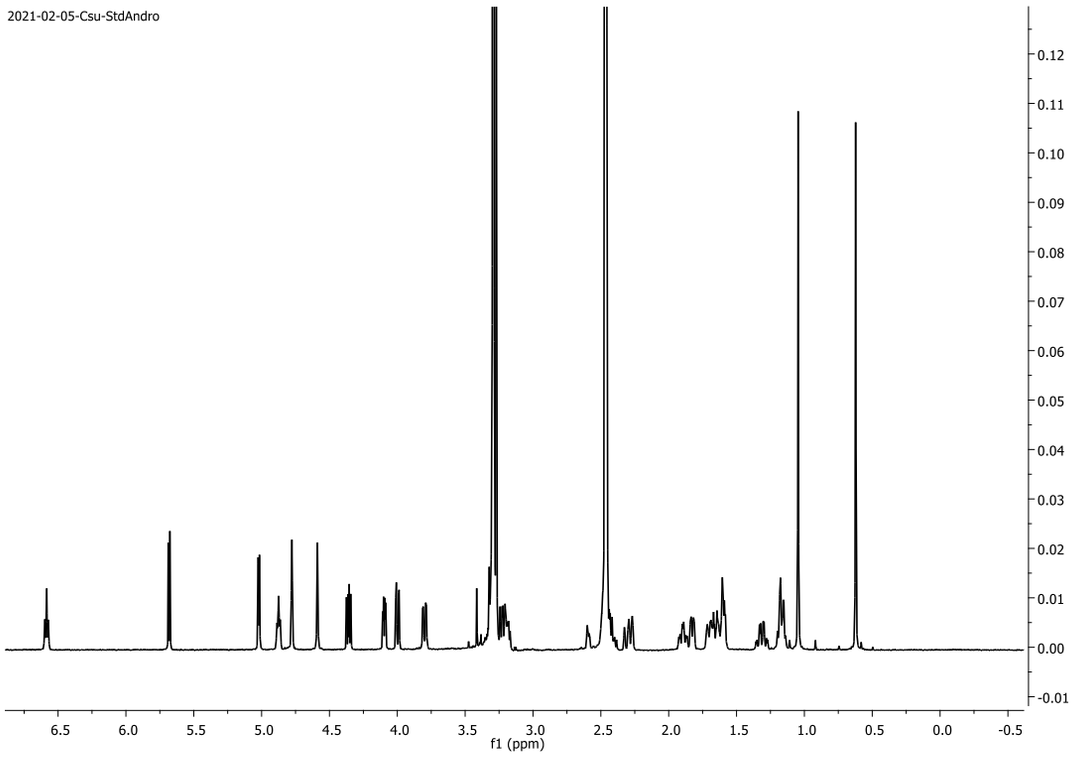
รูปที่ 2.4 ตัวอย่างแผ่น TLC ในการทดลอง

2.4.3 การแปลผลของ NMR

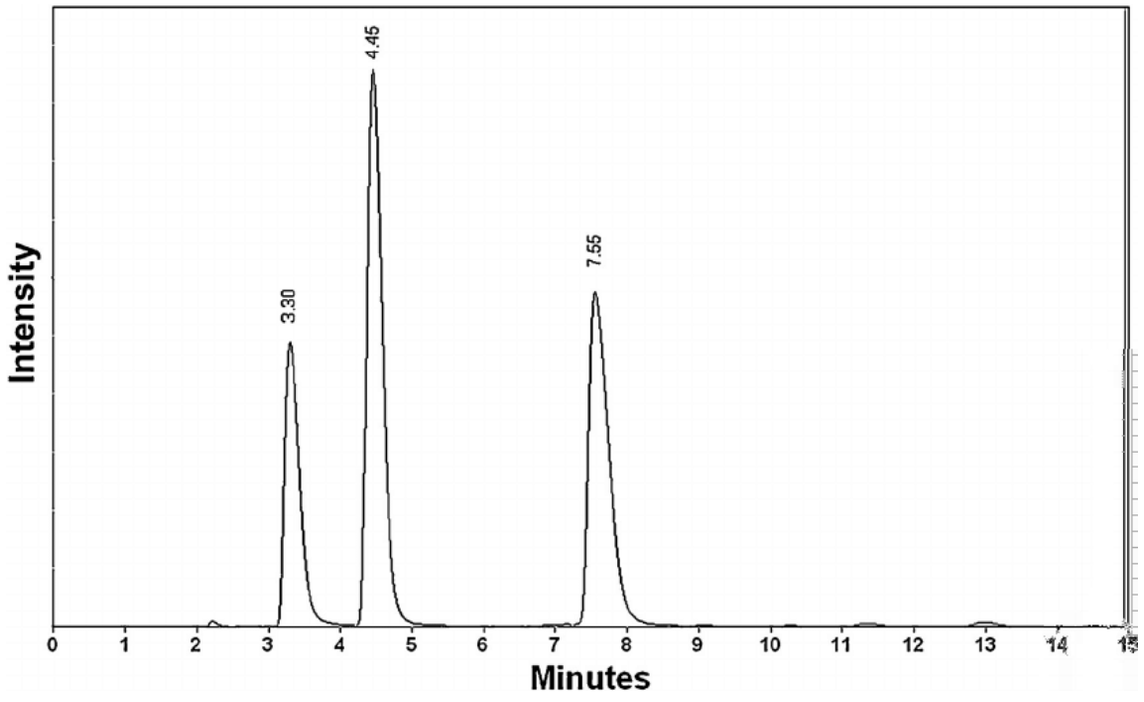
ผลจากเครื่อง NMR แสดงในรูปแบบของค่าความเข้มข้นของสัญญาณที่วัดได้ เทียบกับแต่ละค่า chemical shift ตัวอย่างดังรูปที่ 2.5 หากสารตัวอย่างแสดงสัญญาณตรงกับ chemical shift ของสารมาตรฐาน หมายความสารตัวอย่างกับสารมาตรฐานเป็นสารเคมีชนิดเดียวกัน

2.4.4 การวิเคราะห์ปริมาณของ Andrographolide จาก HPLC-UV Vis Spectroscopy

ผลจากเครื่อง HPLC-UV Vis Spectroscopy แสดงในรูปแบบของ Chromatogram ดังรูปที่ 2.6 โดยเฉพาะพีคที่ขึ้นของสาร Andrographolide มี Calibration curve เป็นการคำนวณความเข้มข้นของสารตัวอย่างได้



รูปที่ 2.5 ตัวอย่าง ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารมาตรฐาน Andrographolide



รูปที่ 2.6 ตัวอย่าง Chromatogram จากเครื่อง HPLC

บทที่ 3

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

3.1. ผลจากการสกัดฟ้าทะลายโจร

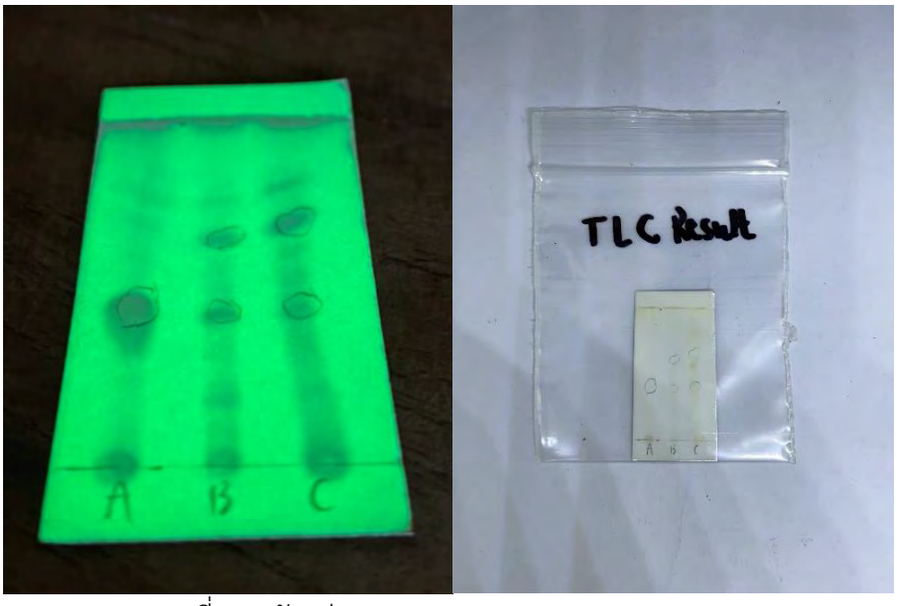
จากการทดลองสกัดสารจากฟ้าทะลายโจรด้วย 50% Ethanol วิธีการ Reflux ทิ้งไว้ 3 วันได้ Andrographolide ลักษณะสารเป็นสีดำเข้ม ครั้งที่ 1 %Yield = 19.78 % ครั้งที่ 2 %Yield = 2.77 %

รูปที่ 3.1 สารสกัดจากฟ้าทะลายโจรครั้งที่ 1

รูปที่ 3.2 สารสกัดจากฟ้าทะลายโจรครั้งที่ 2

3.2. ผลการทดสอบจาก TLC

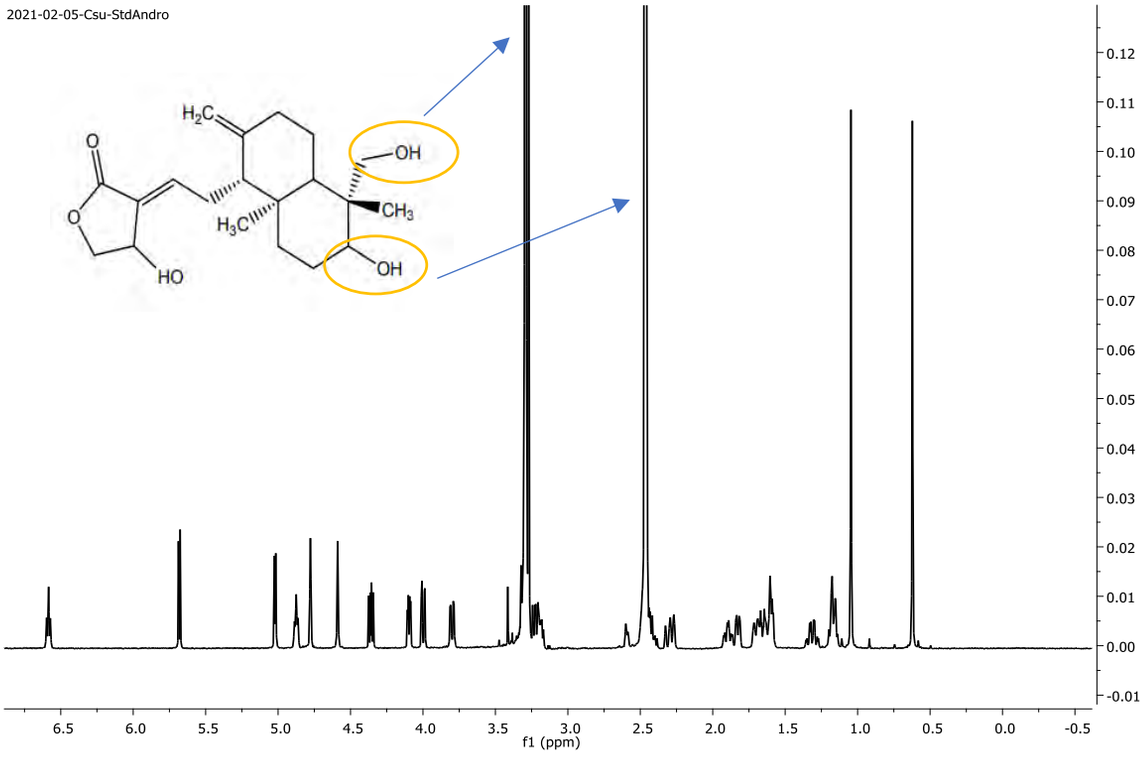
จากการทดสอบสาร A คือสารมาตรฐาน Andrographolide B คือ Crude Andrographolide ครั้งที่ 1 และ C คือ Crude Andrographolide ครั้งที่ 2 และมีค่า R_f ใกล้เคียงกัน A=0.40 B=0.38 และ C=0.40 ดังรูปที่ 3.3 ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเป็นสารชนิดเดียวกัน เพราะ TLC ทดสอบสารโดยการใช้สังเกตด้วยตาได้และยังมีค่า R_f พิสูจน์ได้ว่าใน Crude มีสาร Andrographolide อยู่จริงตามทฤษฎี ส่วนสารอื่นที่ปรากฏน่าจะเป็นสารในกลุ่ม Diterpene Lactone เช่นเดียวกับ Andrographolide เช่น 14-deoxyandrographolide



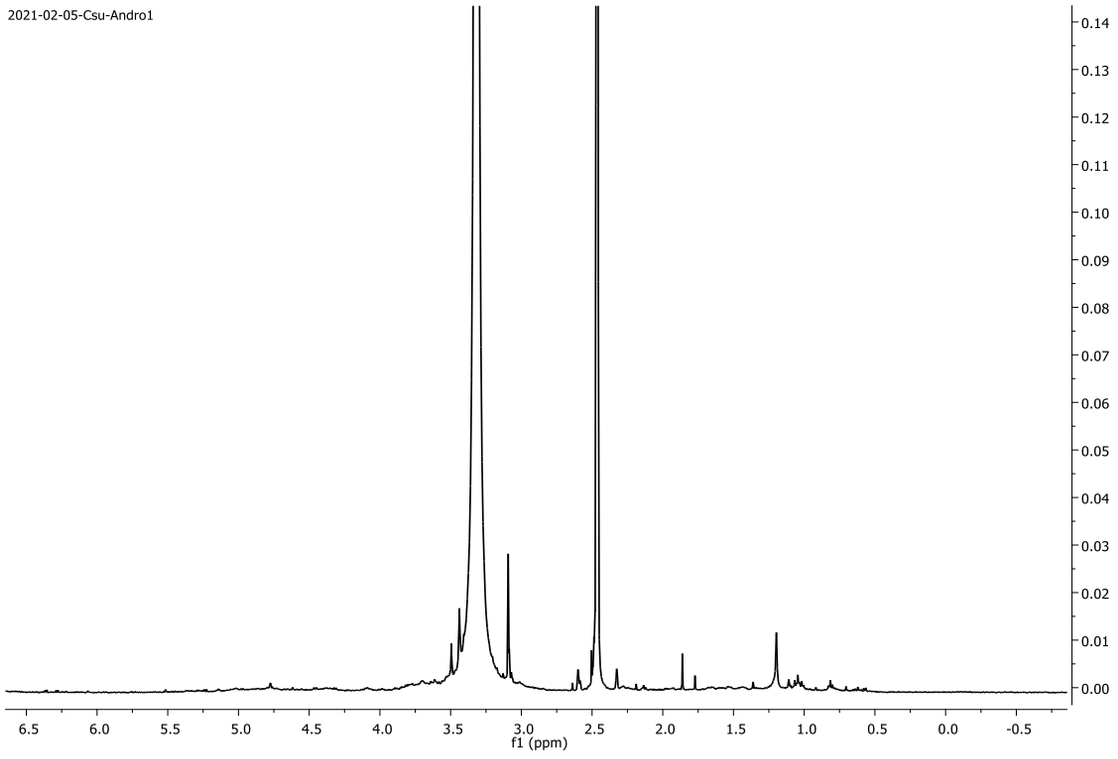
รูปที่ 3.3 ตัวอย่างผล TLC ของ Andrographolide

3.3.ผลการทดสอบจาก NMR

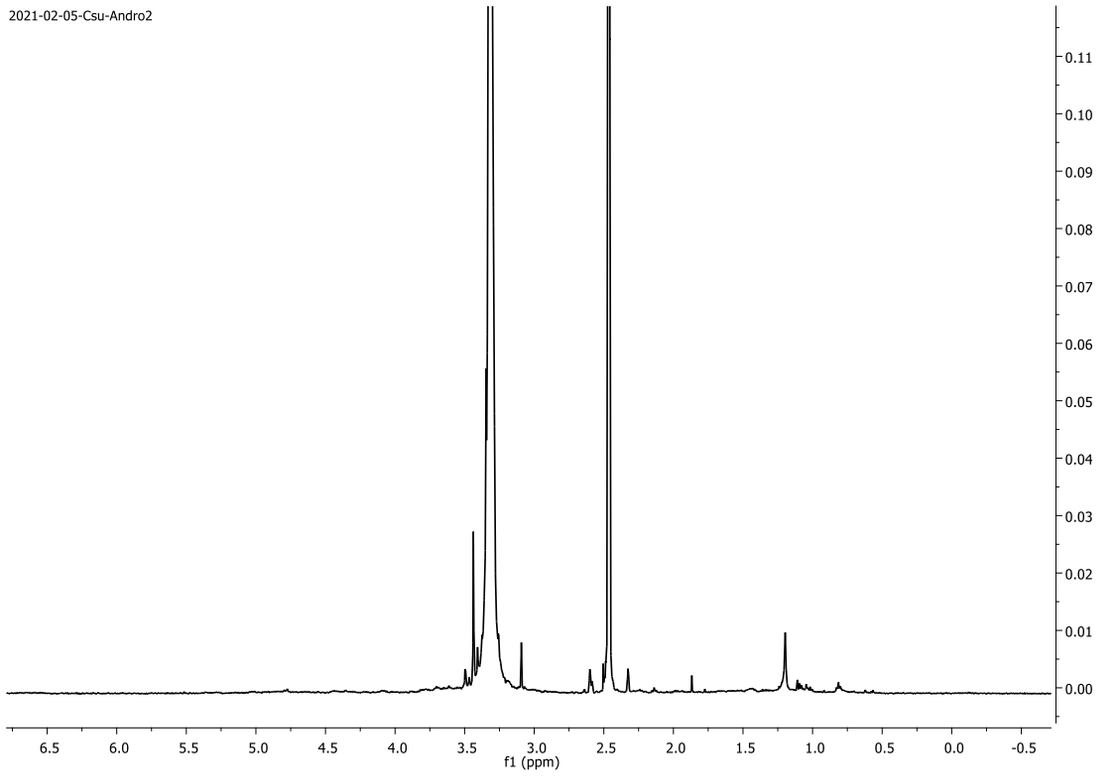
จากรูปผลการทดสอบ ดังรูปที่ 3.4 เป็นสารมาตรฐาน Andrographolide ซึ่งสารที่ใช้มีการปนเปื้อนจากหลอดที่ไม่สะอาดจึงทำให้มีพีคที่เกิดขึ้นมาก ถือว่าเป็นพีค Noise ซึ่งการทดสอบนี้ไม่ได้สนใจพีค Noise ที่เกิดขึ้น เพราะ การทดสอบนี้สนใจพีคที่เกิดขึ้นของ Andrographolide และตำแหน่งของหมู่ฟังก์ชัน OH เกิดขึ้นในตำแหน่ง 1.0-5.0 ppm และโดยพีคหลักที่เกิดขึ้นตรงกับตำแหน่ง 3.5 ppm และ 2.5 ppm ตรงกับพีคของ Crude Andrographolide ดังรูปที่ 3.5 และ 3.6



รูปที่ 3.4 สารมาตรฐาน ^{1}H NMR Andrographolide

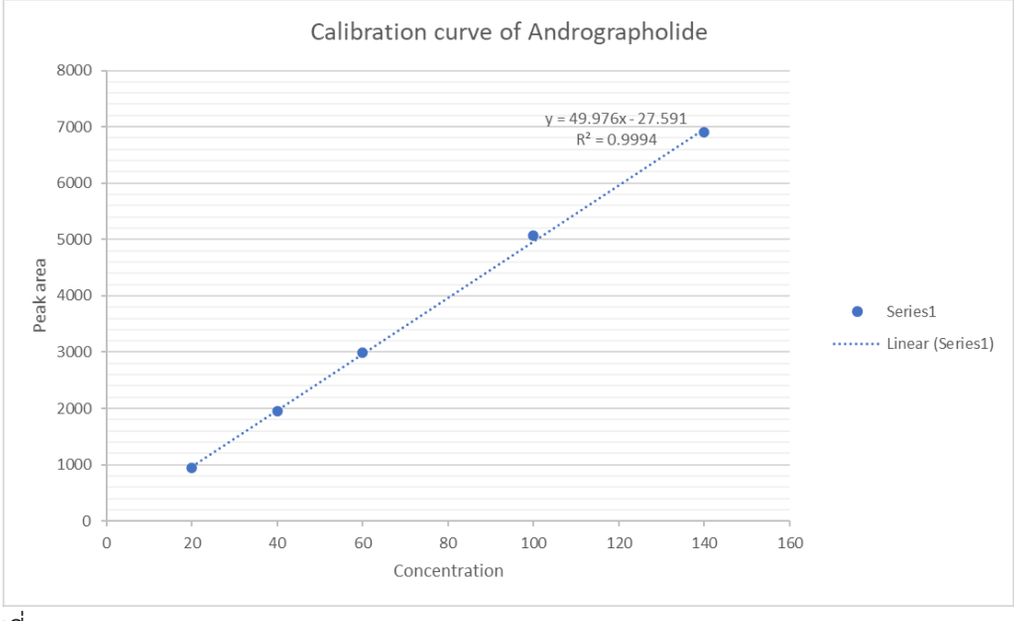


รูปที่ 3.5 ^{1}H NMR Crude Andrographolide ครั้งที่ 1



รูปที่ 3.6 ^{1}H NMR Crude Andrographolide ครั้งที่ 2

3.4. ผลการวิเคราะห์ปริมาณ Andrographolide จาก HPLC-UV Vis Spectroscopy



รูปที่ 3.7 Calibration curve ของสาร Andrographolide จาก HPLC-UV Vis Spectroscopy

จากกราฟด้านบน การทดสอบนี้จะสามารถคำนวณความเข้มข้นของ Andrographolide ที่เราสกัดมาได้ โดยคำนวณจากสมการ Y = 49.976X-27.591 มีค่า R^2 = 0.9994

ตารางที่ 3.1 ปริมาณสารสกัด Andrographolide

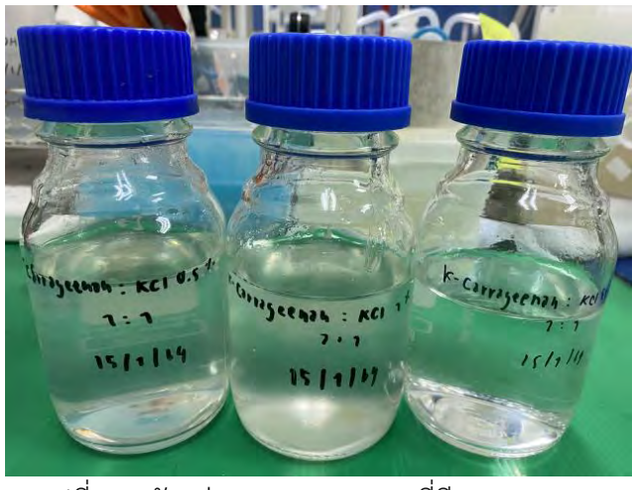
การฉีด HPLC	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย (µg/mL)
Crude ครั้งที่ 1	98.67503	99.94446	100.43719	99.68556
Crude ครั้งที่ 2	75.95711	73.22103	75.26101	74.81305

3.5. ผลการทดสอบจาก Carrageenan

จากการสังเกตด้วยตาของสาร Carrageenan ผสมกับ KCl ที่สามความเข้มข้นจะสังเกตตามตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.2 ผลการสังเกตจาก Carrageenan

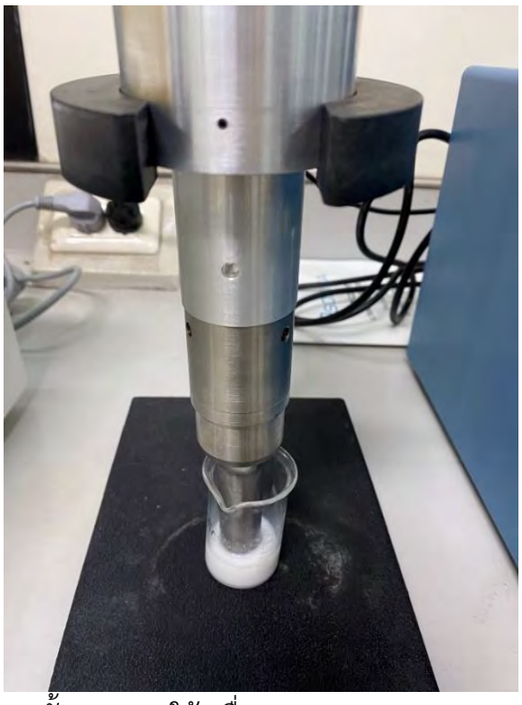
ความเข้มข้นของ KCl	0.5%	1.0%	1.5%
ลักษณะของสาร	สารละลายใส เป็นเนื้อเจล	สารละลายขุ่น ไม่เป็นเนื้อเจล	สารละลายใส ไม่เป็นเนื้อเจล



รูปที่ 3.8 ตัวอย่าง carrageenan ที่มีการผสม KCl

3.6. ผลการตรวจสอบ Oil-in-water emulsions

จากการทดสอบสารให้อยู่ในรูปของ Oil-in-water emulsion จะทดสอบจากการที่ผสมสาร Andrographolide เปรียบเทียบกับสารที่ไม่ผสม Andrographolide เพื่อสังเกตความเป็นเนื้อเดียวกัน และกลิ่นของสารที่ผสมเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน



รูปที่ 3.9 ขั้นตอนการใช้เครื่อง Ultrasonic Homogenizer

ตารางที่ 3.3 ผลการสังเกต Oil-in-water emulsion

ลักษณะของสาร	**1:4**	**1:3**	**1:2**	**1:1**
มี Andrographolide ผสมอยู่	เป็นเนื้อเดียวกัน มีกลิ่น EtOH มาก มีกลิ่นเหม็นเขียว เล็กน้อย	เป็นเนื้อเดียวกัน มีกลิ่น Tween80 มาก มีกลิ่นเหม็นเขียว เล็กน้อย	เป็นเนื้อเดียวกัน มีกลิ่น Tween80 กลาง มีกลิ่นเหม็นเขียว เล็กน้อย	ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน มีกลิ่น Tween80 น้อย มีกลิ่นเหม็นเขียว เล็กน้อย
ไม่มี Andrographolide ผสมอยู่	เป็นเนื้อเดียวกัน มีกลิ่น EtOH มาก ไม่มีกลิ่นเหม็นเขียว	เป็นเนื้อเดียวกัน มีกลิ่น Tween80 มาก ไม่มีกลิ่นเหม็นเขียว	เป็นเนื้อเดียวกัน มีกลิ่น Tween80 กลาง ไม่มีกลิ่นเหม็นเขียว	ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน มีกลิ่น Tween80 น้อย ไม่มีกลิ่นเหม็นเขียว

รูปที่ 3.10 ตัวอย่าง Oil-in-water emulsion ที่มี Andrographolide ผสมอยู่

รูปที่ 3.11 ตัวอย่าง Oil-in-water emulsion ที่ไม่มี Andrographolide ผสมอยู่

บทที่ 4
สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้พบว่าการเตรียมสกัดฟ้าทะลายโจรด้วยวิธีการ Reflux 3 วัน โดยใช้ 50%Ethanol จะส่งผลให้ % Yield ในการสกัดครั้งแรกมากถึง 19.78 % ส่วนครั้งที่สอง %Yield = 2.77 % น้อยลงมาก เนื่องจาก Ethanol ที่ใช้ในการสกัดนั้นมีน้ำเป็นองค์ประกอบ ในการ Reflux คือการที่นำไอน้ำและไอของ Ethanol สกัดออกมาจากของแข็ง คือผงฟ้าทะลายโจร ดังนั้นในการสกัดซ้ำจะทำให้ประสิทธิภาพในการสกัดลดลงตาม % Yield และนอกจากนั้นยังมีการใช้ Ethanol ซ้ำในการสกัด เพื่อลดปริมาณของเสียจากการกลั่นด้วยเครื่อง Evaporator ส่งผลให้ %Yield น้อยลงมาก ๆ จากที่ควรจะเป็น

จากนั้นจึงทดสอบด้วย TLC เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร โดยทำการทดสอบด้วยการละลายสารมาตรฐานและสารสกัด Crude Andrographolide ด้วย Chloroform จากนั้นทดสอบ Methanol : Chloroform ในอัตราส่วน 1:12 จะได้ผลลัพธ์ ทั้งสามาตรฐาน Andrographolide และ Crude Andrographolide ครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 และมีค่า R_f ใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเป็นสารชนิดเดียวกัน

การทดสอบต่อไปคือการทำ NMR เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของ Andrographolide ของสารมาตรฐานกับ Crude ครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 มีค่าตรงกัน เนื่องจากเครื่อง NMR ตั้งค่าแสดงผล ^{1}H NMR พีคที่ขึ้นมาตรงกับค่าเกิดขึ้นตรงกับตำแหน่ง 3.5 ppm และ 2.5 ppm ดังนั้น จึงพิสูจน์เอกลักษณ์ได้ว่า Crude Andrographolide เป็นไปตามสารมาตรฐาน ซึ่งมีอยู่จริงตามทฤษฎี โดยการใช้ NMR เป็นวิธีที่พิสูจน์ได้โดยสังเกตจากพีคที่ขึ้นตำแหน่งเดียวกันได้เลย

การทดสอบปริมาณ Andrographolide โดยใช้ HPLC-UV Vis Spectroscopy จะนำสารมาตรฐานมาสร้าง Calibration curve ที่ความเข้มข้นดังต่อไปนี้ 140, 120, 100, 60, 40 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถสร้างสมการเส้นตรงได้ คือ $Y = 49.976X-27.591$ มีค่า $R^2 = 0.9994$ สามารถคำนวณปริมาณ Crude Andrographolide ได้ครั้งที่ 1 โดยเฉลี่ยอยู่ที่ประมาณ 99.68556 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ครั้งที่ 2 โดยเฉลี่ยอยู่ที่ประมาณ 74.81305 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นที่ยอมรับได้เนื่องจากปริมาณละลาย Crude 0.5 กรัมใน 10 มิลลิลิตร

จากการทดลองละลาย Carrageenan ผสมกับ KCl 0.5% 1.0% และ 1.5% จากผลการสังเกตลักษณะของสาร Carrageenan ผสมกับ 0.5%KCl จะมีสารละลายใส เป็นเนื้อเจล ต่อมา Carrageenan ผสมกับ 1.0%KCl จะมีสารละลายขุ่น ไม่เป็นเนื้อเจล และสุดท้าย Carrageenan ผสมกับ 1.5%KCl จะมีสารละลายใส ไม่เป็นเนื้อเจล เนื่องจาก K^+ จะเข้าไปจับตัวประจุลบของ Carrageenan ทำให้สารไม่เป็นเนื้อเจล สารละลายจะมีความขุ่นจากความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น

จากการทดลองสารผสมให้อยู่ในรูปของ Oil-in-water emulsion จะสังเกตสี กลิ่น และความเป็นเนื้อเดียวกันโดยเปรียบเทียบจากการที่ผสมสาร Andrographolide และไม่ผสมสาร Andrographolide จะได้ผลตามนี้ Tween80:Ethanol ในอัตราส่วน 1:4 ถึง 1:1 ที่ผสม Andrographolide เป็นเนื้อเดียวกัน มีกลิ่น

Ethanol มาก มีกลิ่นเหม็นเขียวเล็กน้อย ในส่วนที่ไม่ผสม Andrographolide เป็นเนื้อเดียวกัน มีกลิ่น Ethanol มาก ไม่มีกลิ่นเหม็นเขียว ต่างกันส่วนที่มีกลิ่นเหม็นเขียว และแนวโน้มอัตราส่วนของ Ethanol มาก ทำให้มีกลิ่นโดดขึ้นมาเยอะกว่า ส่วนเนื่องจากอัตราส่วน Ethanol ลดลง ทำให้ได้กลิ่น Tween80 ชัดขึ้น เป็นเหมือนกลิ่นหอมหวาน จากน้ำมันมะพร้าวที่ไม่มีมีกลิ่น ส่วนผสมของ Tween80 กับ Ethanol อาจจะส่งผลให้น้ำมันมะพร้าวที่มี Fatty acid กระจายกลิ่นขึ้นมา ส่วนอัตราส่วนอื่นๆ Tween80:Ethanol ในอัตราส่วน 1:2 เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมสุด เนื่องจากอัตราส่วน Tween80 ที่เพิ่มขึ้น ทำให้ได้กลิ่นหอมหวานเช่นเดียวกัน ส่วน Tween80:Ethanol ในอัตราส่วน 1:1 ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน มาจากการที่อัตราส่วนที่ไม่ได้ ทำให้ไม่เกิด Oil-in-water emulsion แนวโน้มของสารเป็นไปตามอัตราส่วน Tween80 จะทำให้มีกลิ่นหอมขึ้นมา และอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดคือ อัตราส่วน 1:2 เพราะ เป็นเนื้อเดียวกัน ไม่แยกชั้นกันเมื่อตั้งทิ้งไว้เป็นเวลานาน ทั้งมีกลิ่นหอมหวาน กลิ่น Tween80 กลาง ๆ

เอกสารอ้างอิง

[1] มาตรฐานสมุนไพรเล่มที่ 1 ฟ้าทะลายโจร, โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก, กรุงเทพฯ, 1999

[2] บัญชียาหลักแห่งชาติ, ราชกิจจานุเบกษา (ลงวันที่ 23 มกราคม 2013)

[3] TCIJ, น้ำดื่มผสมวิตามิน Retrieved from. https://www.tcijthai.com/news/2020/12/scoop/11263 (accessed 20.01.2021)

[4] C. Soukoulis, M. Tsevdou, C.M. Andre, S. Cambier, L. Yonekura, P.S. Taoukis, L. Hoffmann. Modulation of chemical stability and in vitro bio accessibility of beta-carotene loaded in kappa-carrageenan oil-in-gel emulsions. Food Chemistry, 2017, 220, 208–218.

[5] เมทินี หลิมศิริวงษ์, อมร สหเมธาพัฒน์ และ ปิติกาญจน์ กาญจนาพฤกษ์, การผลิตสารมาตรฐาน Andrographolide จากฟ้าทะลายโจร, วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก, 2019, 17(3), 365-375

[6] V. K. Verma, Md. K. zaman, S. Verma, S. K. Verma, K. K. Sarwa, Role of semi-purified andrographolide from Andrographis paniculate extract as nano-phytovesicular carrier for enhancing oral absorption and hypoglycemic activity, Chinese Herbal Medicines, 2020, 142-155.

[7] H. Du, X. Yang, H. Li, L. Han, X. Li, X. Dong, Q. Zhu, M. Ye, Q. Feng, X. Niu, Preparation and evaluation of andrographolide-loaded microemulsion, Microencapsulation, 2012, 657-665.

[8] H. Du, X. Yang, H. Li, L. Han, X. Li, X. Dong, Q. Zhu, M. Ye, Q. Feng, X. Niu, Preparation and evaluation of andrographolide-loaded microemulsion, Microencapsulation, 2012, 657-665.

[9] M. A. Augustin, Y. Hemar, Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients, Chem. Soc. Rev., 2009, 38, 902–912.

[10] B. Deepak, S. Pramod, K. Nitin, D. Rupesh, B. Vvipin, Pharmacological Activity of Andrographis Paniculata: A Brief Review, 2011, 1-10.

[11] Food WIKI, Emulsion Retrieved from. http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0674/emulsion

[12] Wikipedia, Polysorbate80 Retrieved from. https://en.wikipedia.org/wiki/Polysorbate_80

ประวัติผู้วิจัย

นางสาวธาริณี พนาสหธรรม เกิดเมื่อวันที่ 12 เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2541 ที่จังหวัดระยอง สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนจุฬาภรณราชวิทยาลัย จังหวัดชลบุรี เมื่อปีการศึกษา 2559 ทุนการศึกษามัธยมปลาย เมื่อ พ.ศ. 2557 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2560 ทุนการศึกษาภาคปลาย เมื่อ พ.ศ. 2563 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 83/4 หมู่ 1 ตำบล สำนักทอง อำเภอ เมือง จังหวัด ระยอง รหัสไปรษณีย์ 21100 อีเมล tarinee.tp@gmail.com

ภาคผนวก ก

HPLC-UV Vis Spectroscopy

Method C:\HPCHEM\1\METHODS\ANDRO-1.M

Calibration T

Feruric Acid

Calib. Data Modified : 4/1/2021 1 41 PM

Calculate : External S ard
Based on : Peak Area

Rel. Reference Window : 15.000 %
Abs. Reference Window : 0.000 min
Rel. Non-ref. Window : 15.000 %
Abs. Non-ref. Window : 0.000 min
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Sample Amount : 0.00000
Use Multiplier & Dilution Factor with I Ds
Uncalibrated Peaks : not repor
Partial Calibration : Yes, ident ed peaks are recalibrated
Correct All Ret. Times: No, only f identified peaks

Curve Type : Linear
Origin : Ignored
Weight : Equal

Recalibration Settings:
Average Response : Average al libration
Average Retention Time: Floating A ge New 75%

Calibration Report Options :
Printout of recalibrations within a quence:
Calibration Table after Recalib ion
Normal Report after Recalibrati
If the sequence is done with bracketing:
Results of first cycle (ending previous bracket)

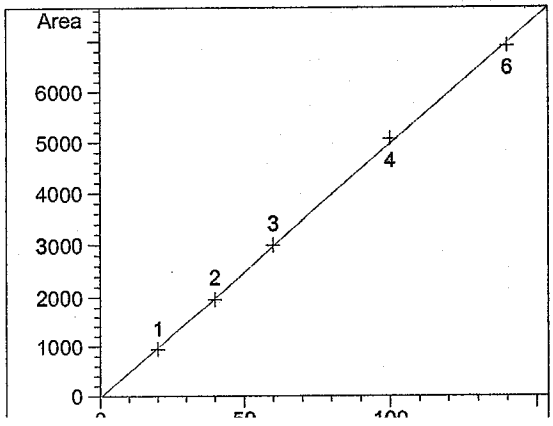
Signal 1: DAD1 A, Sig=223,4 Ref=360,100

RetTime [min]	Sig	Lvl	Amount [ug/ml]	Area	Amt/Area	Ref Grp	Name
2.429	1	1	20.00000	941.72070	2.12377e-2		andrographolide
		2	40.00000	1956.35522	2.04462e-2		
		3	60.00000	2987.78467	2.00818e-2		
		4	100.00000	5064.61035	1.97449e-2		
		6	140.00000	6902.81494	2.02816e-2		

Peak Sum Table

No Entries in table

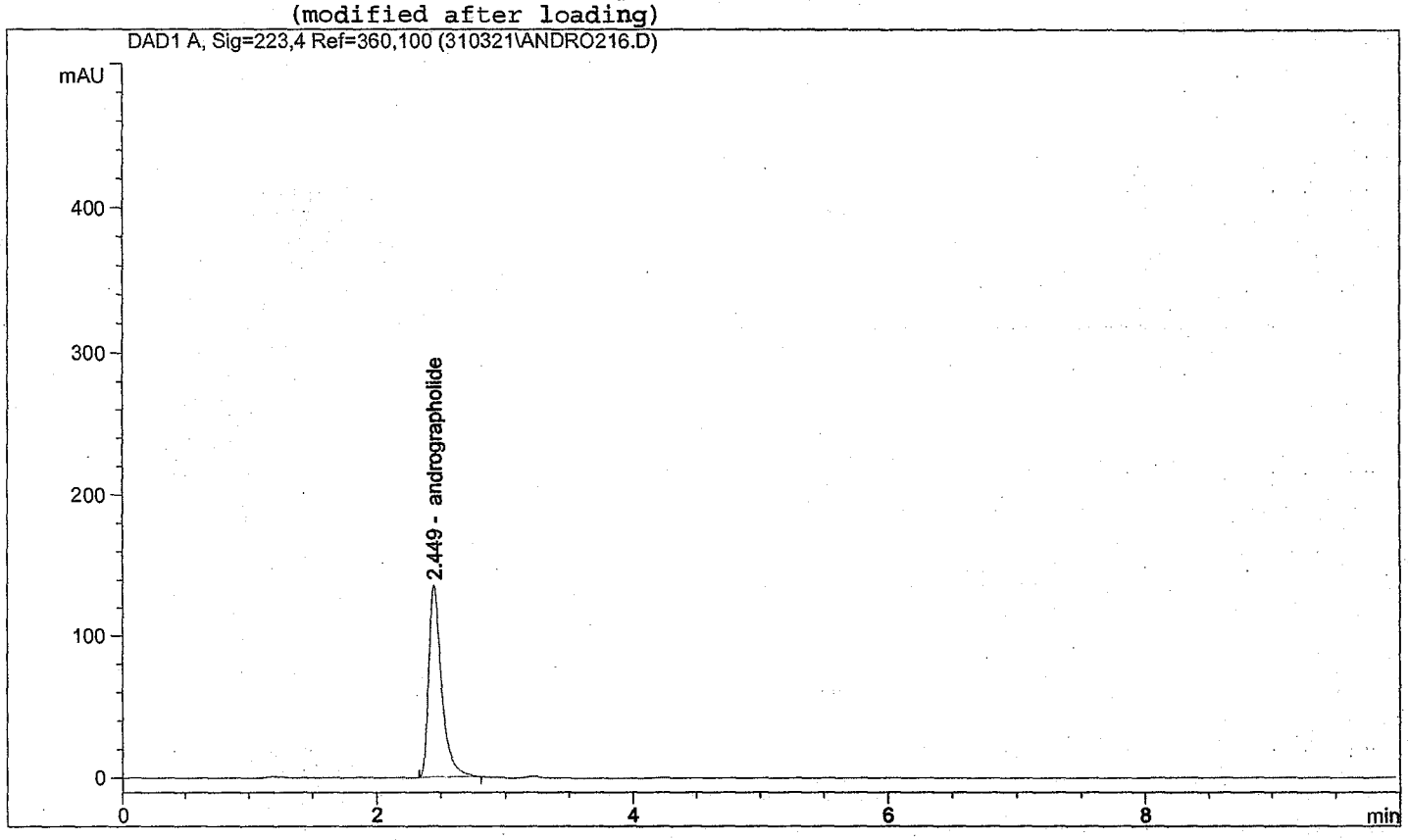
Calibration Curves



andrographolide at exp. RT: 2.429
DAD1 A, Sig=223,4 Ref=360,100
Correlation: 0.99968
Residual Std. Dev.: 70.14151
Formula: y = mx + b
m: 49.97567
b: -27.59128
x: Amount[ug/ml]
y: Area

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\310321\ANDRO216.D Sample Name: Std.20

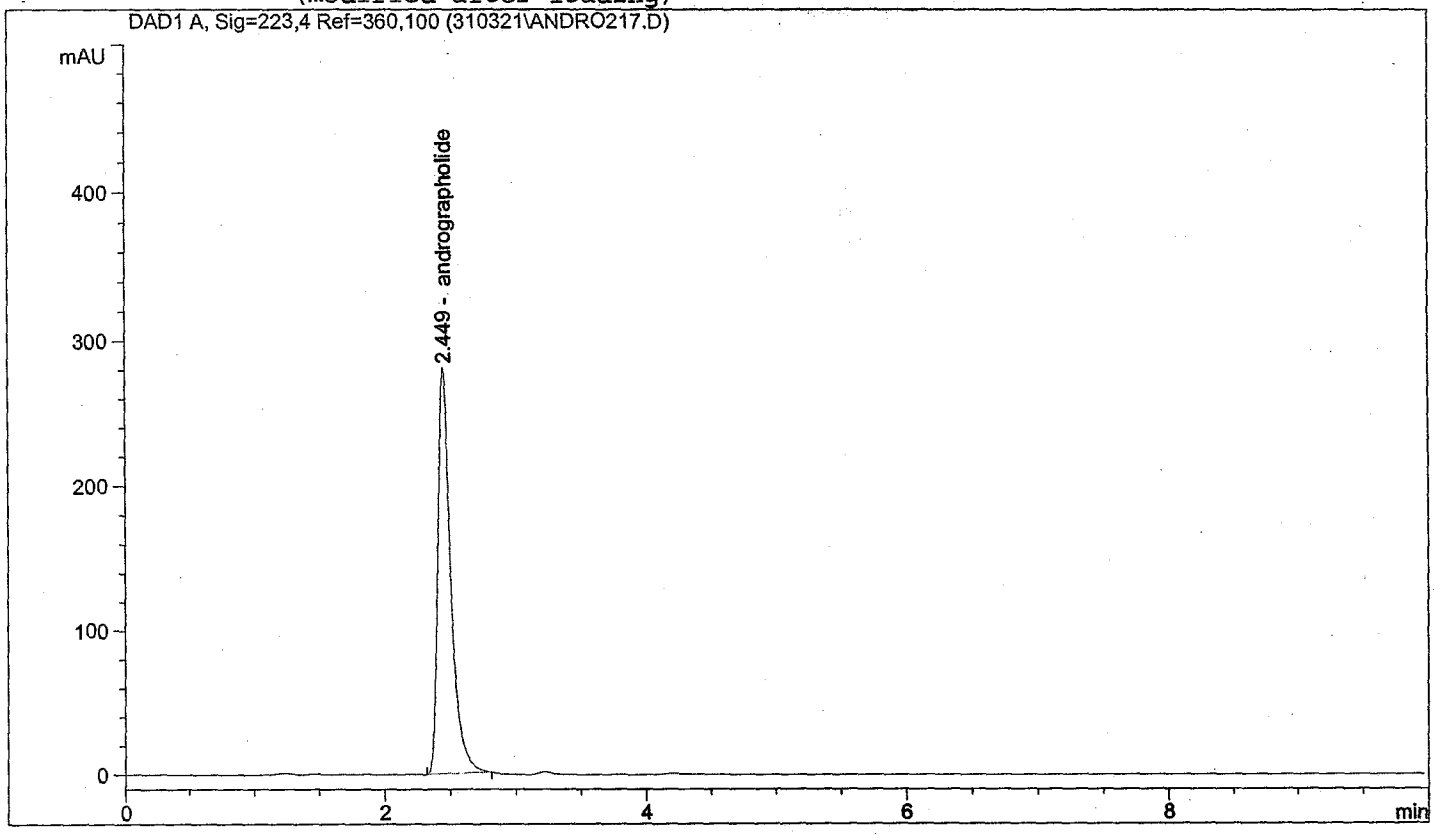
```
==========================================================================
Injection Date  : 3/31/2021 5:19:55 PM          Seq. Line :  17
Sample Name     : Std.20                        Location : Vial 1
Acq. Operator   : bussaba                           Inj :   1
                                                Inj Volume : 20 µl
Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\ANDROGRA.M
Last changed    : 3/31/2021 5:17:48 PM by bussaba
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\ANDRO-1.M
Last changed    : 4/1/2021 1:54:41 PM by bussaba
                  (modified after loading)
```




```
==========================================================================
                      External Standard Report
==========================================================================

Sorted By             :      Signal
Calib. Data Modified  :      4/1/2021 1:54:41 PM
Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=223,4 Ref=360,100

RetTime  Type     Area      Amt/Area    Amount    Grp   Name
 [min]          [mAU*s]                [ug/ml]
-------|------|----------|----------|----------|--|------------------
  2.449 BBA     941.72070 2.05960e-2   19.39568     andrographolide

Totals :                                19.39568

 Results obtained with enhanced integrator!
==========================================================================
                          *** End of Report ***
```

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\310321\ANDRO217.D Sample Name: Std.40

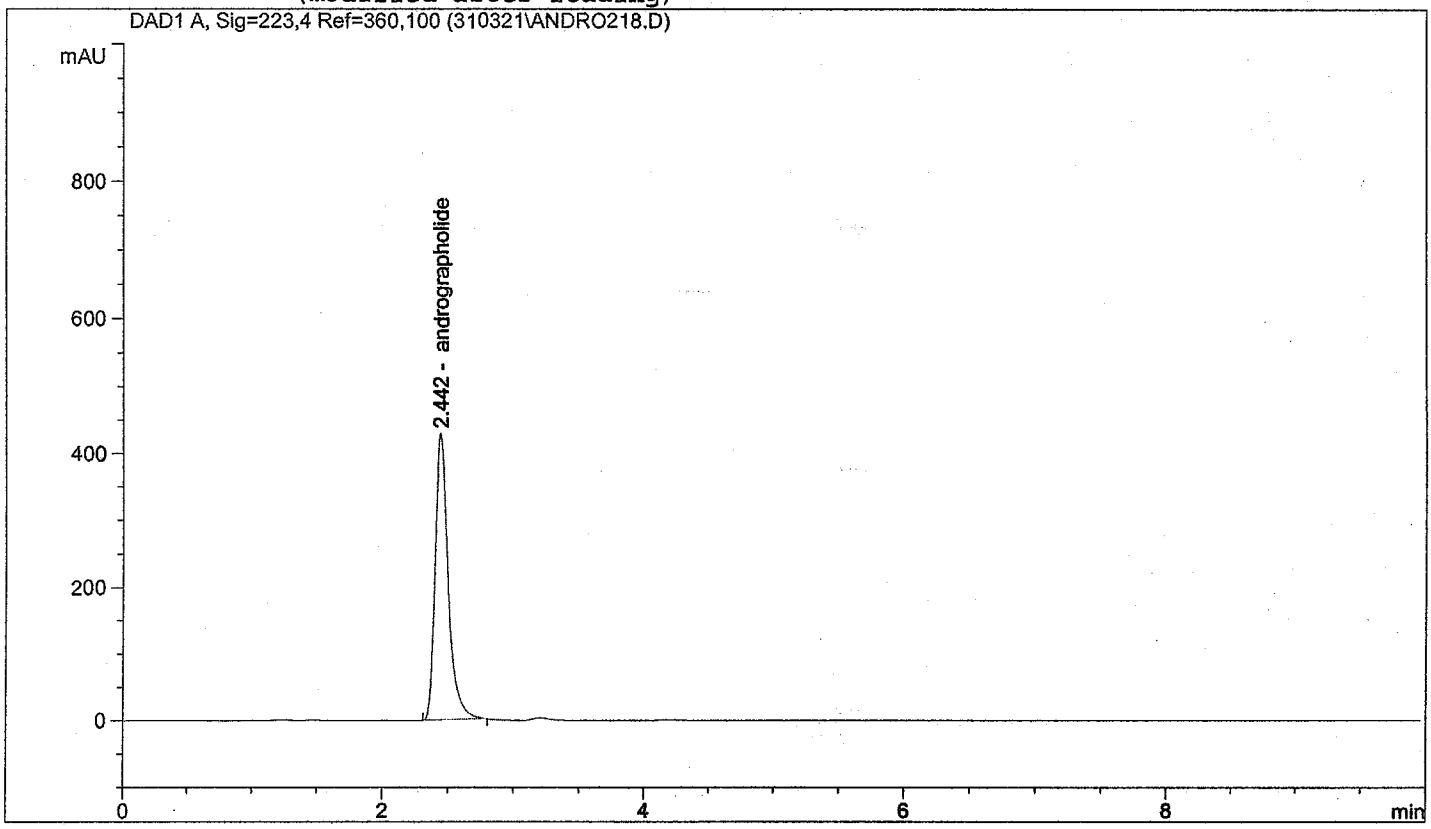
```
Injection Date  : 3/31/2021 5:32:16 PM          Seq. Line :  18
Sample Name     : Std.40                       Location : Vial 2
Acq. Operator   : bussaba                          Inj :   1
                                               Inj Volume : 20 µl
Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\ANDROGRA.M
Last changed    : 3/31/2021 5:30:08 PM by bussaba
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\ANDRO-1.M
Last changed    : 4/1/2021 1:54:41 PM by bussaba
                  (modified after loading)
```




```
=============================================================================
                        External Standard Report
=============================================================================

Sorted By             :      Signal
Calib. Data Modified  :      4/1/2021 1:54:41 PM
Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=223,4 Ref=360,100

RetTime  Type     Area      Amt/Area    Amount   Grp   Name
 [min]          [mAU*s]                [ug/ml]
-------|------|----------|----------|----------|--|------------------
  2.449 BBA    1956.35522 2.02919e-2   39.69824     andrographolide

Totals :                               39.69824

 Results obtained with enhanced integrator!
=============================================================================
                          *** End of Report ***
```

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\310321\ANDRO218.D Sample Name: Std.60

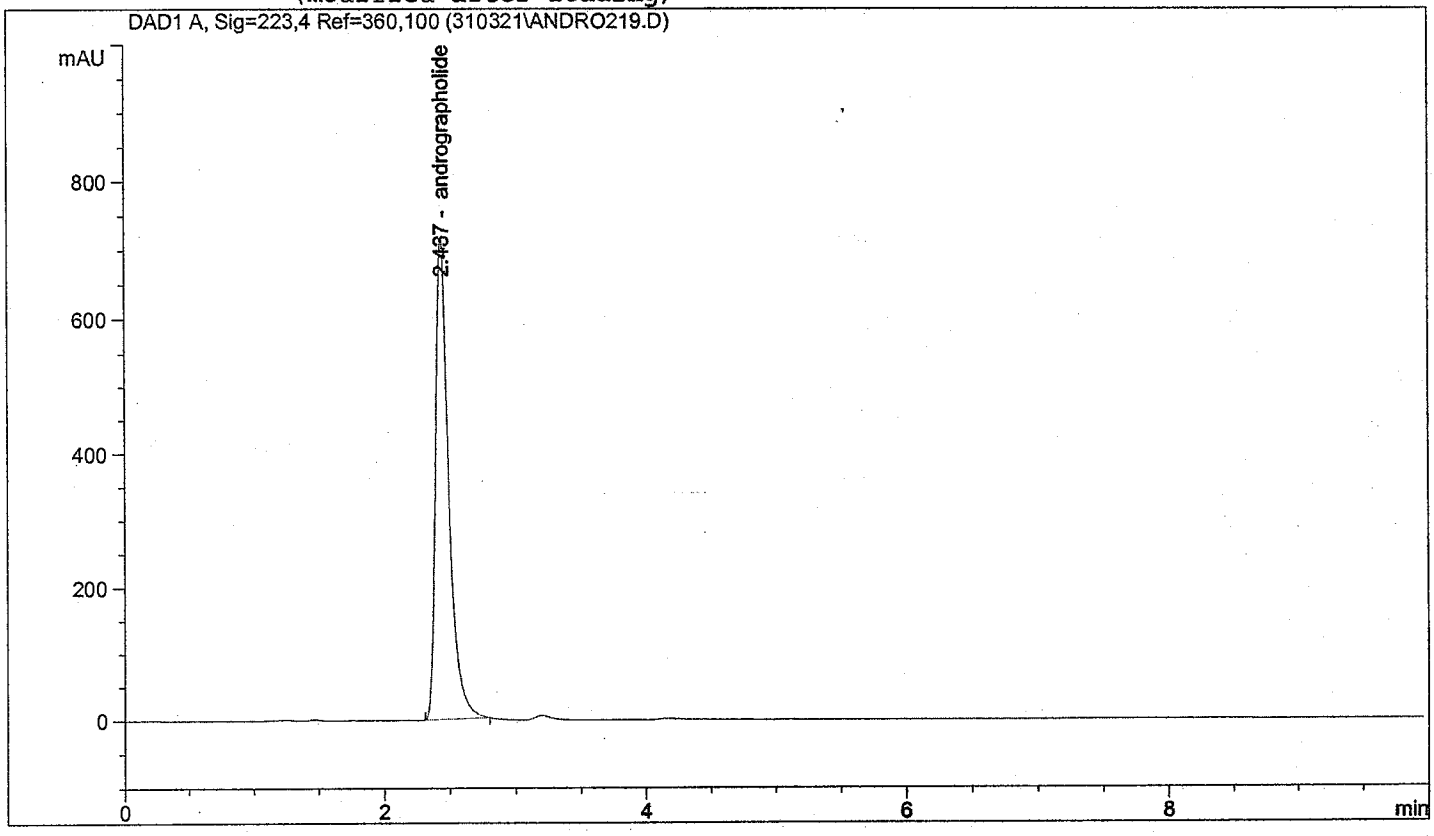
```
==========================================================================
Injection Date  : 3/31/2021 5:44:37 PM          Seq. Line :  19
Sample Name     : Std.60                        Location : Vial 3
Acq. Operator   : bussaba                           Inj :   1
                                               Inj Volume : 20 µl
Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\ANDROGRA.M
Last changed    : 3/31/2021 5:42:28 PM by bussaba
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\ANDRO-1.M
Last changed    : 4/1/2021 1:56:54 PM by bussaba
                  (modified after loading)
```




```
==========================================================================
                      External Standard Report
==========================================================================

Sorted By             :      Signal
Calib. Data Modified  :      4/1/2021 1:54:41 PM
Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=223,4 Ref=360,100

RetTime  Type     Area      Amt/Area    Amount   Grp   Name
 [min]          [mAU*s]                [ug/ml]
-------|------|----------|----------|----------|--|------------------
  2.442 BBA    2987.78467 2.01945e-2   60.33688     andrographolide

Totals :                                60.33688

 Results obtained with enhanced integrator!
==========================================================================
                          *** End of Report ***
```

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\310321\ANDRO219.D Sample Name: Std.100

```
==================================================================
Injection Date  : 3/31/2021 5:56:58 PM          Seq. Line :  20
Sample Name     : Std.100                       Location : Vial 4
Acq. Operator   : bussaba                           Inj :   1
                                                Inj Volume : 20 µl
Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\ANDROGRA.M
Last changed    : 3/31/2021 5:54:49 PM by bussaba
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\ANDRO-1.M
Last changed    : 4/1/2021 1:56:54 PM by bussaba
                  (modified after loading)
```



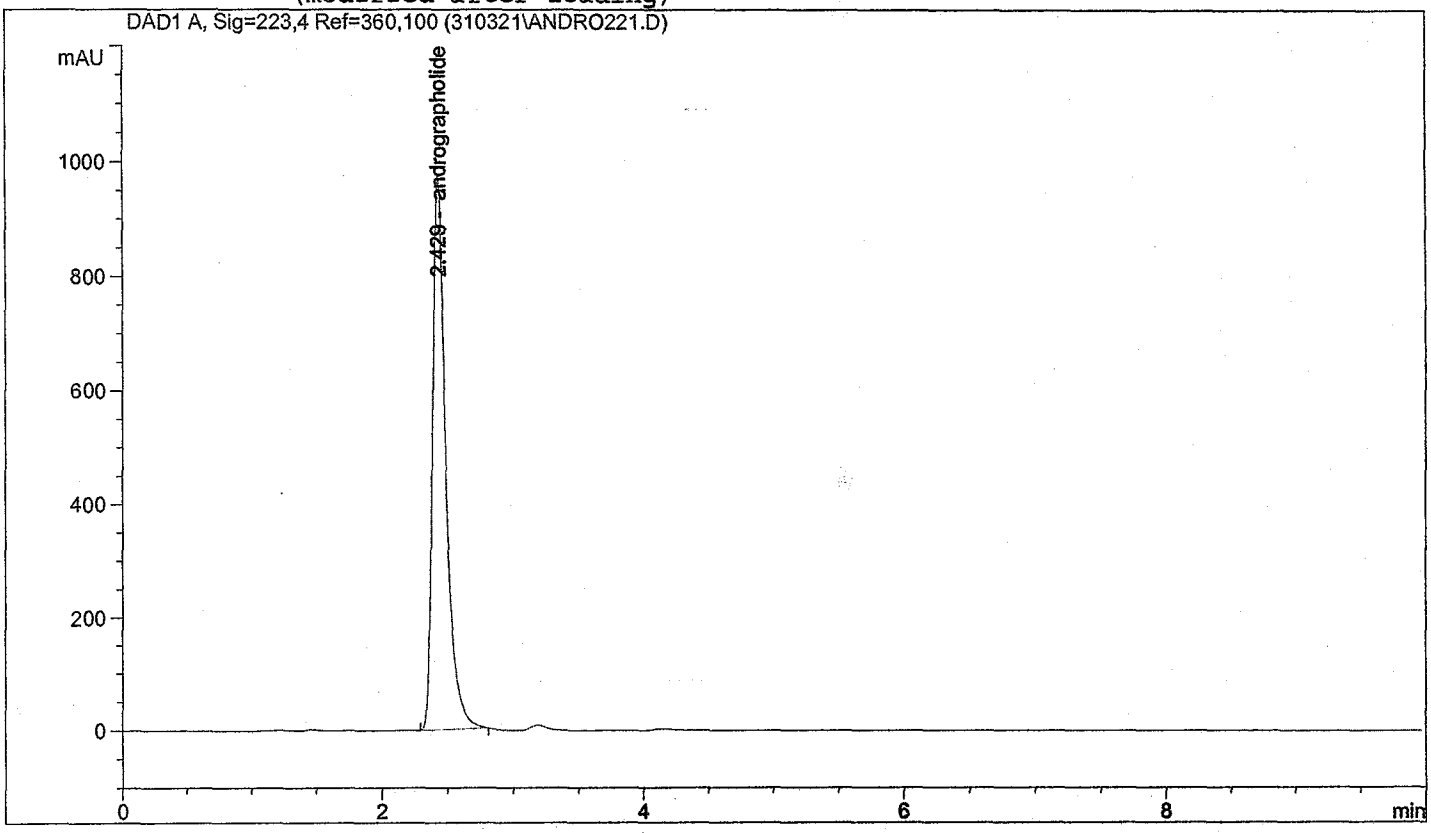

```
==================================================================
                    External Standard Report
==================================================================

Sorted By             :      Signal
Calib. Data Modified  :      4/1/2021 1:54:41 PM
Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=223,4 Ref=360,100
```

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
2.437	BBA	5064.61035	2.01187e-2	101.89361		andrographolide
Totals :				101.89361		

```
 Results obtained with enhanced integrator!
==================================================================
                        *** End of Report ***
```

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\310321\ANDRO221.D Sample Name: Std.140

```
==============================================================================
Injection Date  : 3/31/2021 6:21:39 PM          Seq. Line :  22
Sample Name     : Std.140                        Location : Vial 6
Acq. Operator   : bussaba                            Inj :   1
                                                 Inj Volume : 20 µl
Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\ANDROGRA.M
Last changed    : 3/31/2021 6:19:31 PM by bussaba
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\ANDRO-1.M
Last changed    : 4/1/2021 1:57:23 PM by bussaba
                  (modified after loading)
```

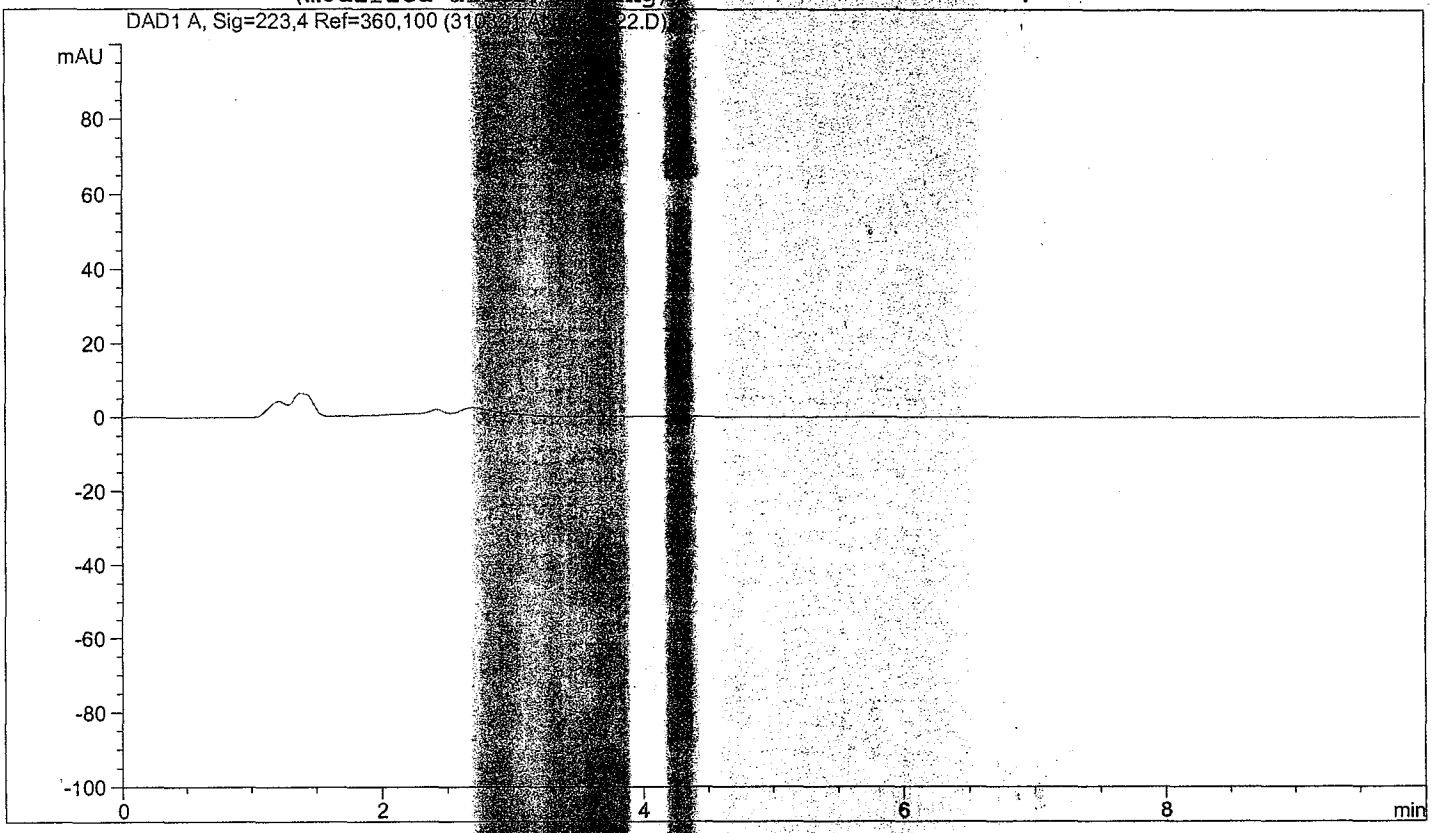



```
==============================================================================
                        External Standard Report
==============================================================================

Sorted By             :      Signal
Calib. Data Modified  :      4/1/2021 1:54:41 PM
Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=223,4 Ref=360,100

RetTime  Type     Area      Amt/Area    Amount   Grp   Name
 [min]           [mAU*s]                [ug/ml]
-------|------|----------|----------|----------|--|-----------------
  2.429 BBA    6902.81494 2.00897e-2  138.67560    andrographolide

Totals :                               138.67560

 Results obtained with enhanced integrator!
==============================================================================
                          *** End of Report ***
```

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\310321\ D Sample Name: Blank

Injection Date : 3/31/2021 6: Seq. Line : 23
Sample Name : Blank Location : Vial 11
Acq. Operator : bussaba Inj : 1
Inj Volume : 20 µl

Acq. Method : C:\HPCHEM\1\ NDR GRA.M
Last changed : 3/31/2021 6: by ussaba
(modified af ng)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\ NDR -1.M
Last changed : 4/1/2021 1:5 by bussaba
(modified af ng)



External Report

Sorted By : Signal
Calib. Data Modified : 4/1/202 :54:41 PM
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with STD

Signal 1: DAD1 A, Sig=223,4 Ref=360

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt	Amount [ug/ml]	Grp	Name
2.429	-					andrographolide

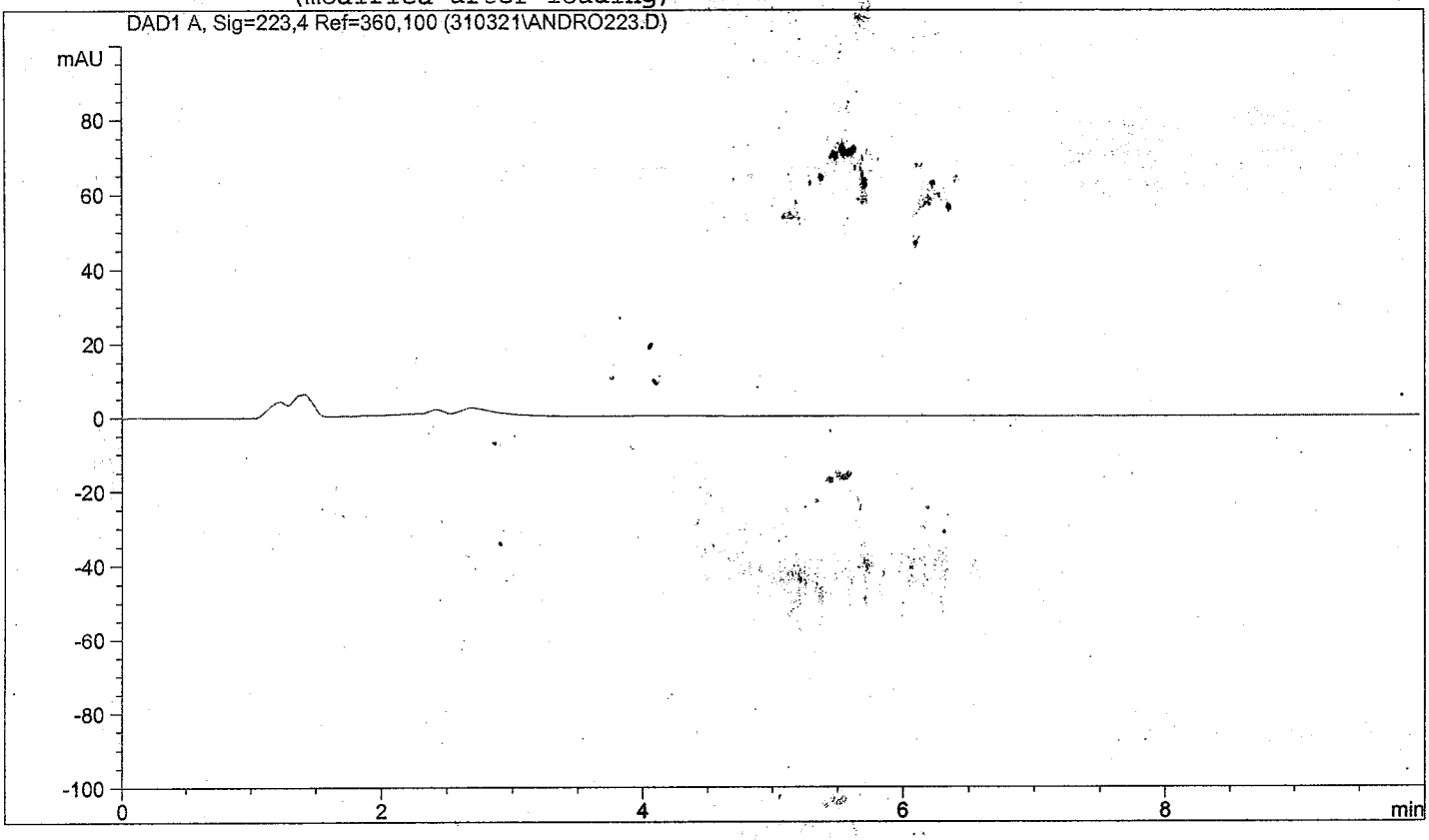
Totals : 0.0000

Results obtained with enhanced integrator.
1 Warnings or Errors :

Warning : Calibrated compound (und

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\310321\ANDRO223.D Sample Name: Blank

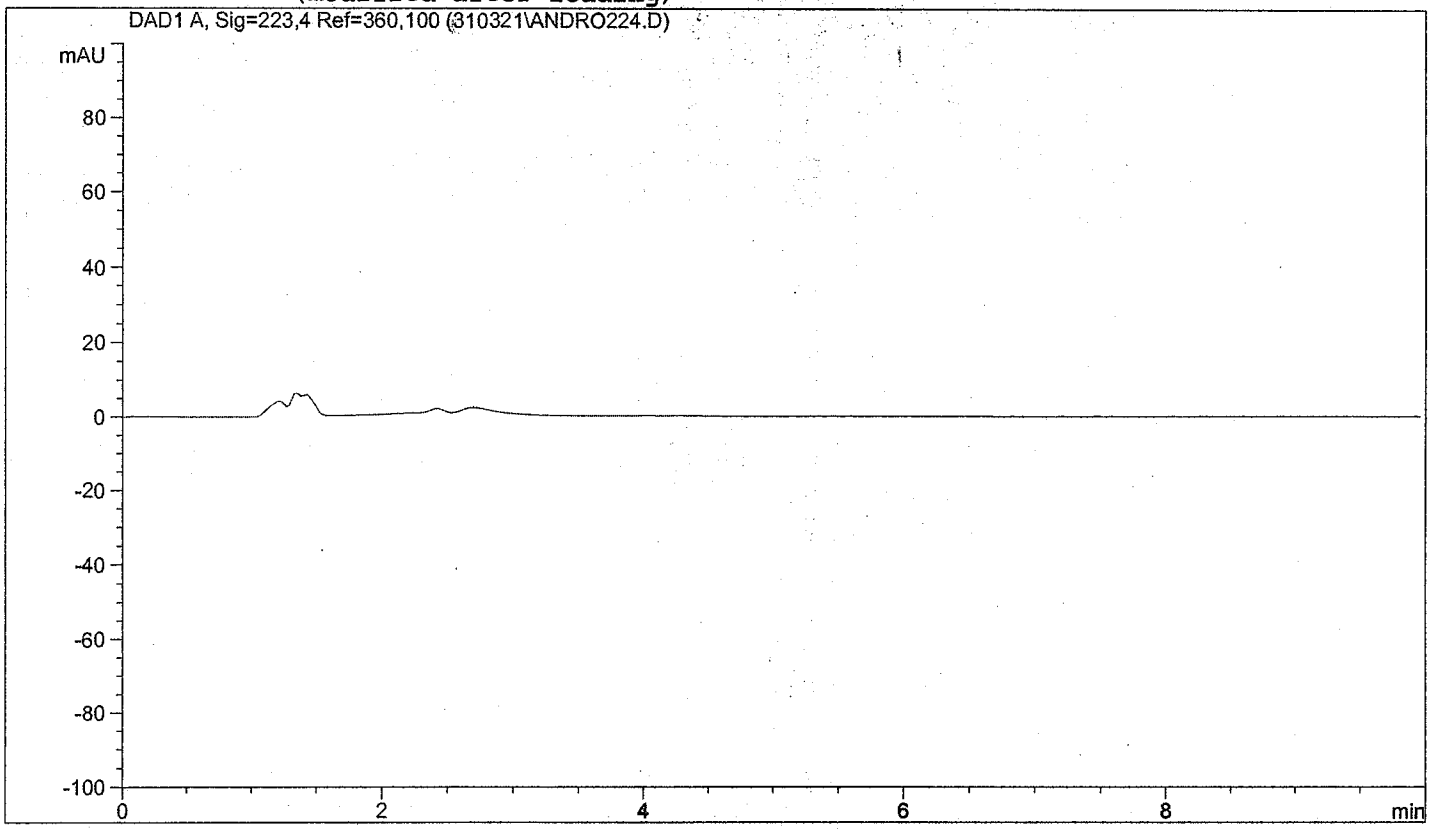
```
==========================================================================
Injection Date  : 3/31/2021 6:46:19 PM          Seq. Line :  24
Sample Name     : Blank                         Location : Vial 11
Acq. Operator   : bussaba                       Inj. :  1
                                                Inj Volume : 20 µl

Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\ANDROGRA.M
Last changed    : 3/31/2021 6:44:12 PM by bussaba
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\ANDRO-1.M
Last changed    : 4/1/2021 1:57:52 PM by bussaba
                  (modified after loading)
```




```
==========================================================================
                      External Standard Report
==========================================================================

Sorted By             :      Signal
Calib. Data Modified  :      4/1/2021 1:54:41 PM
Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=223,4 Ref=360,100

RetTime  Type      Area      Amt/Area    Amount    Grp  Name
 [min]           [mAU*s]                [ug/ml]
-------|------|----------|----------|----------|--|------------------
  2.429           -           -          -          andrographolide

Totals :                                  0.00000

 Results obtained with enhanced integrator!
1 Warnings or Errors :

Warning : Calibrated compound(s) not found

==========================================================================
```

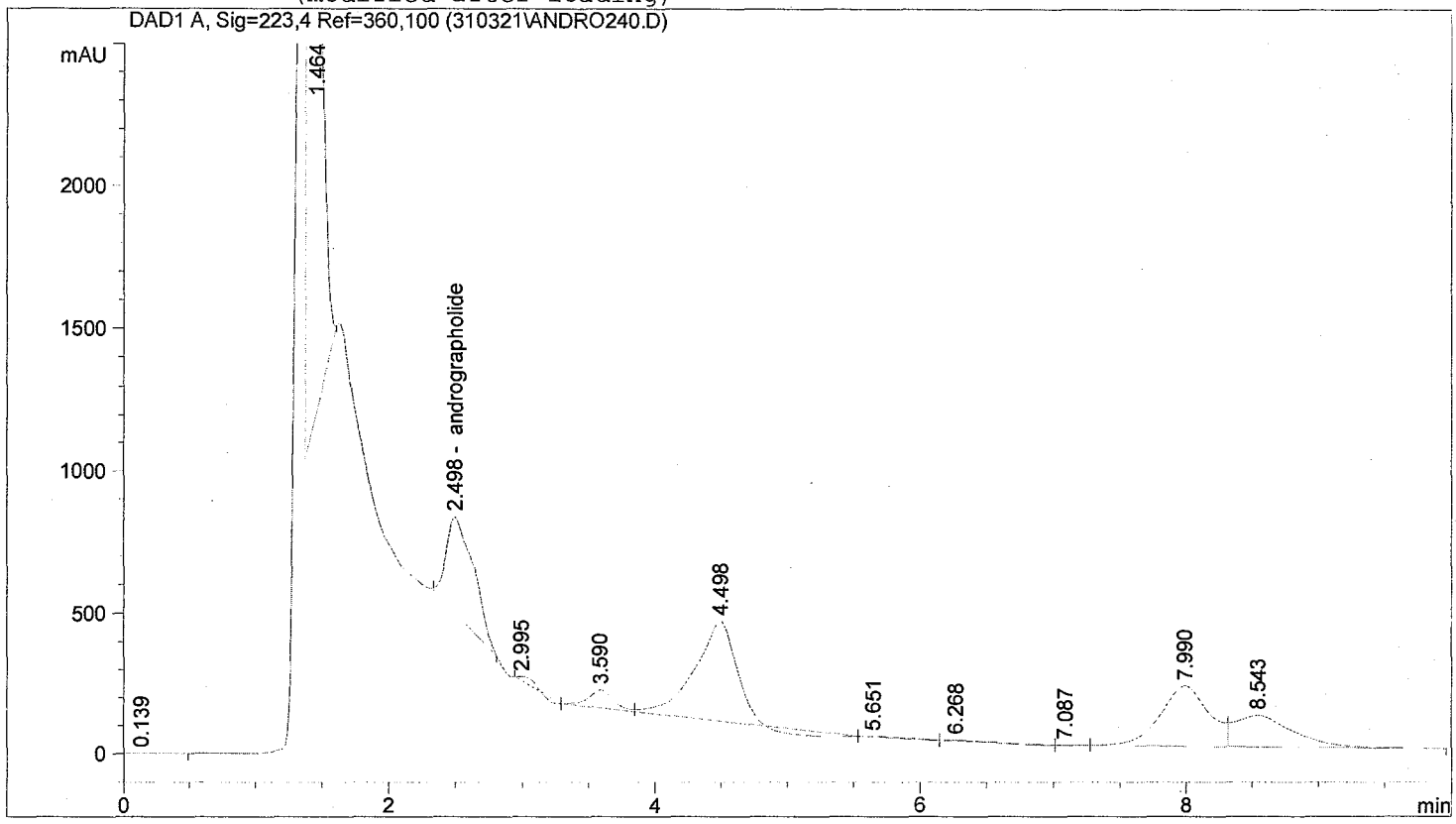
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\310321\ANDRO224.D Sample Name: Blank

```
==========================================================================
Injection Date  : 3/31/2021 6:58:39 PM          Seq. Line :  25
Sample Name     : Blank                         Location : Vial 11
Acq. Operator   : bussaba                          Inj :   1
                                                Inj Volume : 20 µl
Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\ANDROGRA.M
Last changed    : 3/31/2021 6:56:31 PM by bussaba
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\ANDRO-1.M
Last changed    : 4/1/2021 1:57:52 PM by bussaba
                  (modified after loading)
```



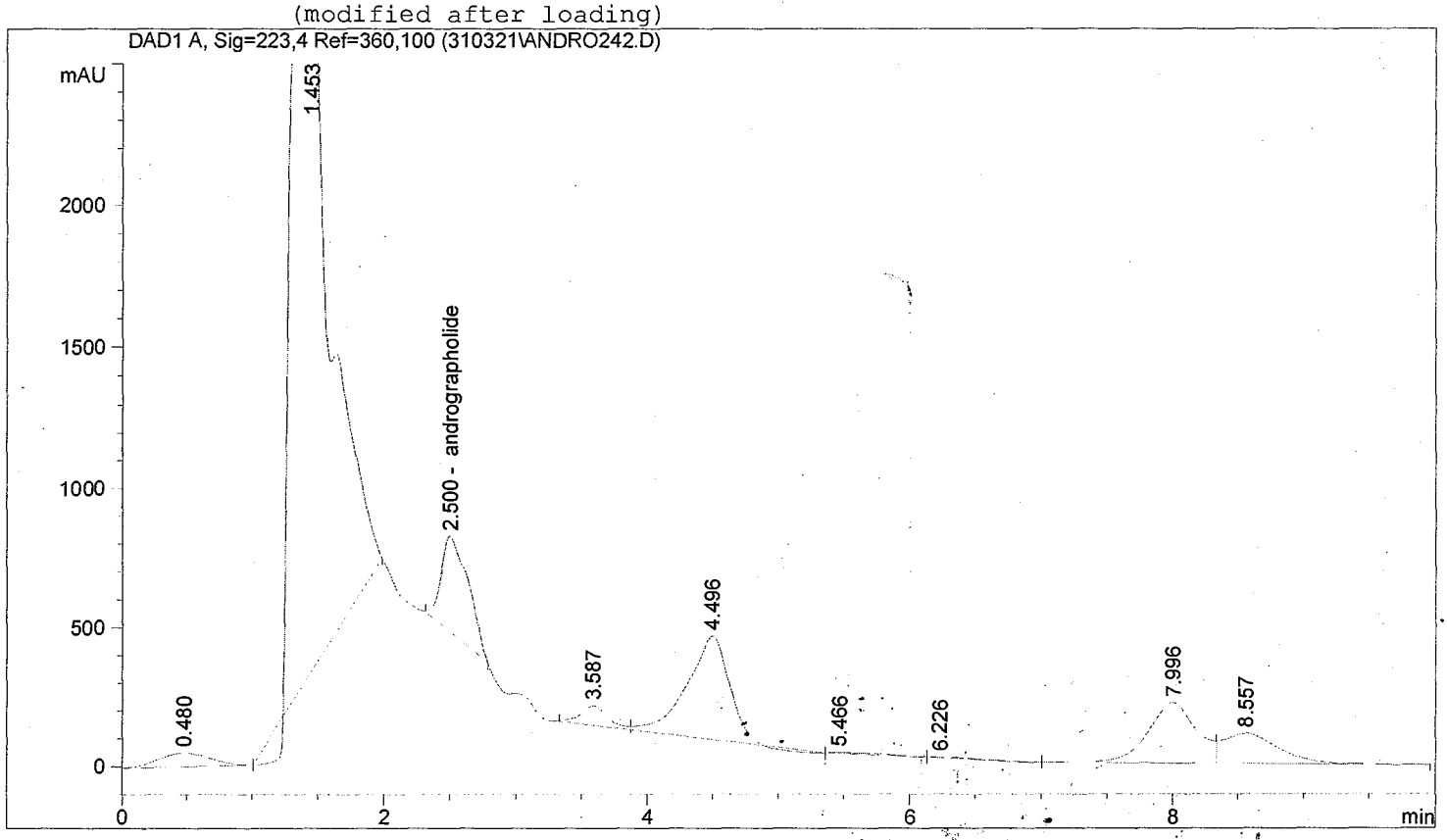

```
==========================================================================
                      External Standard Report
==========================================================================

Sorted By             :      Signal
Calib. Data Modified  :      4/1/2021 1:54:41 PM
Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=223,4 Ref=360,100

RetTime  Type      Area      Amt/Area    Amount    Grp   Name
 [min]           [mAU*s]                [ug/ml]
-------|------|----------|----------|----------|--|------------------
  2.429            -           -          -          androgrAPholide

Totals :                                  0.00000

 Results obtained with enhanced integrator!
1 Warnings or Errors :

Warning : Calibrated compound(s) not found

==========================================================================
```

```
==============================================================================
Injection Date  : 4/1/2021 11:09:27 AM          Seq. Line :   1
Sample Name     : Crude1_1                       Location : Vial 12
Acq. Operator   : bussaba                            Inj :   1
                                                 Inj Volume : 20 µl
Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\ANDROGRA.M
Last changed    : 4/1/2021 8:02:11 AM by bussaba
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\ANDRO-1.M
Last changed    : 4/1/2021 2:11:24 PM by bussaba
                  (modified after loading)
```




```
==============================================================================
                        External Standard Report
==============================================================================

Sorted By             :      Signal
Calib. Data Modified  :      4/1/2021 1:54:41 PM
Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=223,4 Ref=360,100

RetTime  Type     Area      Amt/Area    Amount    Grp   Name
 [min]          [mAU*s]                [ug/ml]
-------|------|----------|----------|----------|--|------------------
  2.498 BBA    4903.75977 2.01223e-2   98.67503     andrographolide

Totals :                                98.67503

 Results obtained with enhanced integrator!
==============================================================================
                          *** End of Report ***
```

```
Injection Date  : 4/1/2021 11:34:05 AM          Seq. Line :   3
Sample Name     : Crude1_3                      Location : Vial 12
Acq. Operator   : bussaba                          Inj :   1
                                               Inj Volume : 20 µl
Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\ANDROGRA.M
Last changed    : 4/1/2021 8:02:11 AM by bussaba
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\ANDRO-1.M
Last changed    : 4/1/2021 2:06:25 PM by bussaba
                  (modified after loading)
```

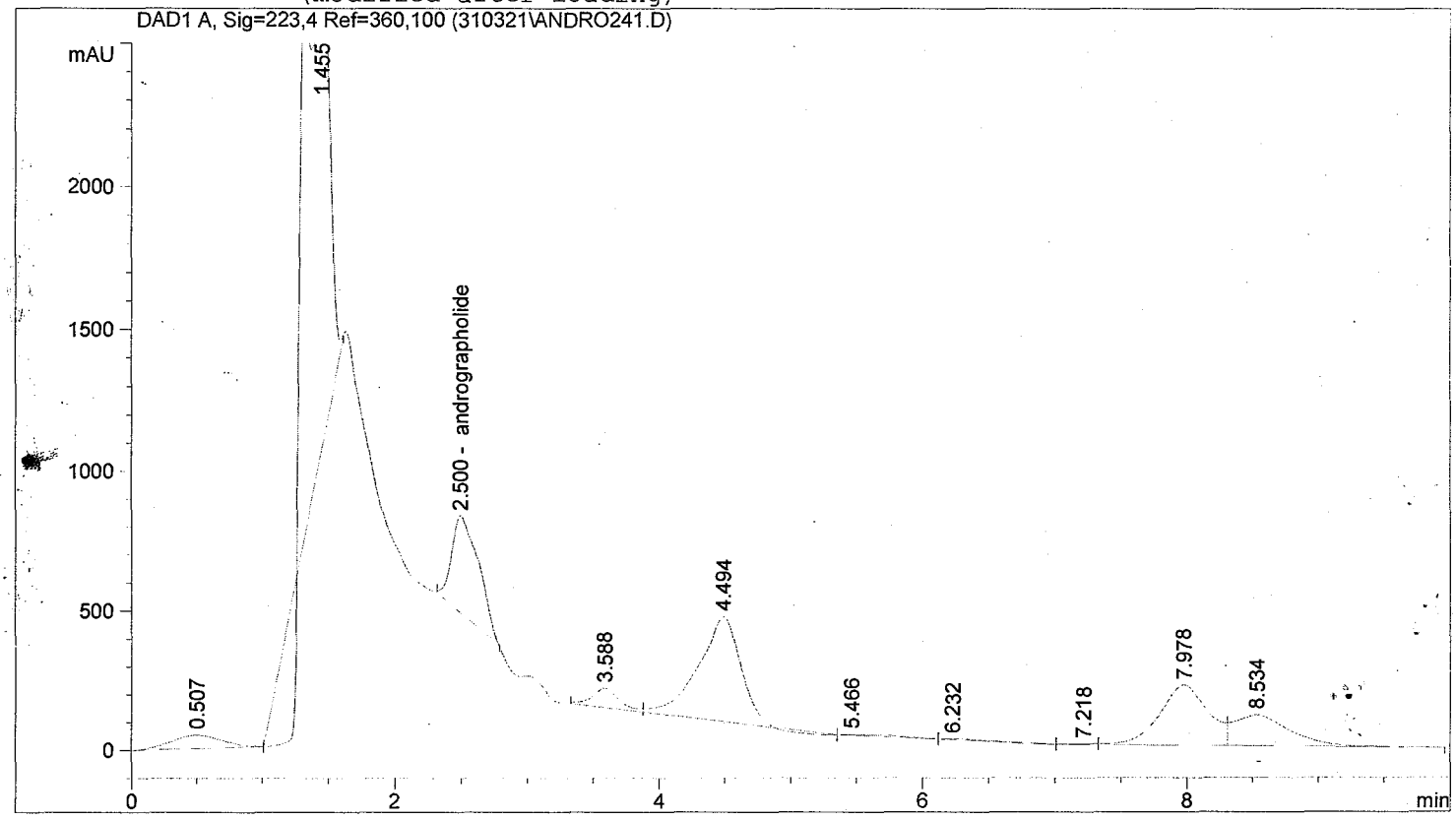


External Standard Report

```
Sorted By             :      Signal
Calib. Data Modified  :      4/1/2021 1:54:41 PM
Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=223,4 Ref=360,100

RetTime  Type     Area      Amt/Area    Amount    Grp   Name
 [min]          [mAU*s]                [ug/ml]
-------|------|----------|----------|----------|--|------------------
  2.500 BBA    4967.20020 2.01209e-2   99.94446     andrographolide

Totals :                               99.94446

 Results obtained with enhanced integrator!
```

*** End of Report ***

```
Injection Date  : 4/1/2021 11:21:46 AM          Seq. Line :   2
Sample Name     : Crude1_2                      Location : Vial 12
Acq. Operator   : bussaba                           Inj :   1
                                               Inj Volume : 20 µl
Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\ANDROGRA.M
Last changed    : 4/1/2021 8:02:11 AM by bussaba
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\ANDRO-1.M
Last changed    : 4/1/2021 2:06:25 PM by bussaba
                  (modified after loading)
```



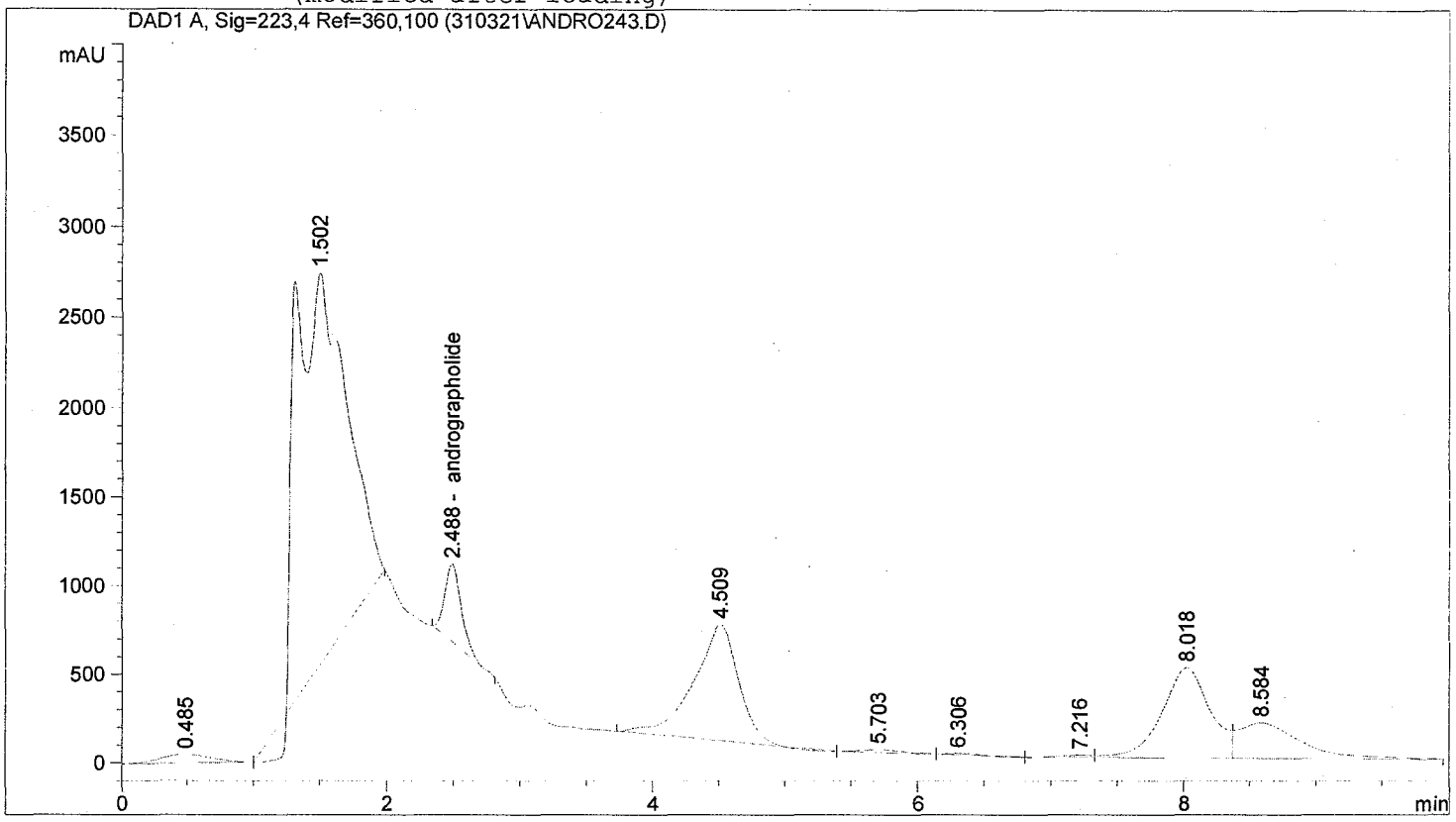
External Standard Report

```
Sorted By             :      Signal
Calib. Data Modified  :      4/1/2021 1:54:41 PM
Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=223,4 Ref=360,100

RetTime  Type     Area      Amt/Area    Amount   Grp   Name
 [min]          [mAU*s]                [ug/ml]
-------|------|----------|----------|---------|--|------------------
  2.500 BBA    4991.82471 2.01203e-2  100.43719    andrographolide

Totals :                               100.43719

 Results obtained with enhanced integrator!
```

*** End of Report ***

Injection Date : 4/1/2021 11:46:26 AM Seq. Line : 4
Sample Name : Crude2_1 Location : Vial 13
Acq. Operator : bussaba Inj : 1
Inj Volume : 20 µl

Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\ANDROGRA.M
Last changed : 4/1/2021 8:02:11 AM by bussaba
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\ANDRO-1.M
Last changed : 4/1/2021 2:11:51 PM by bussaba
(modified after loading)



External Standard Report

Sorted By : Signal
Calib. Data Modified : 4/1/2021 1:54:41 PM
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=223,4 Ref=360,100

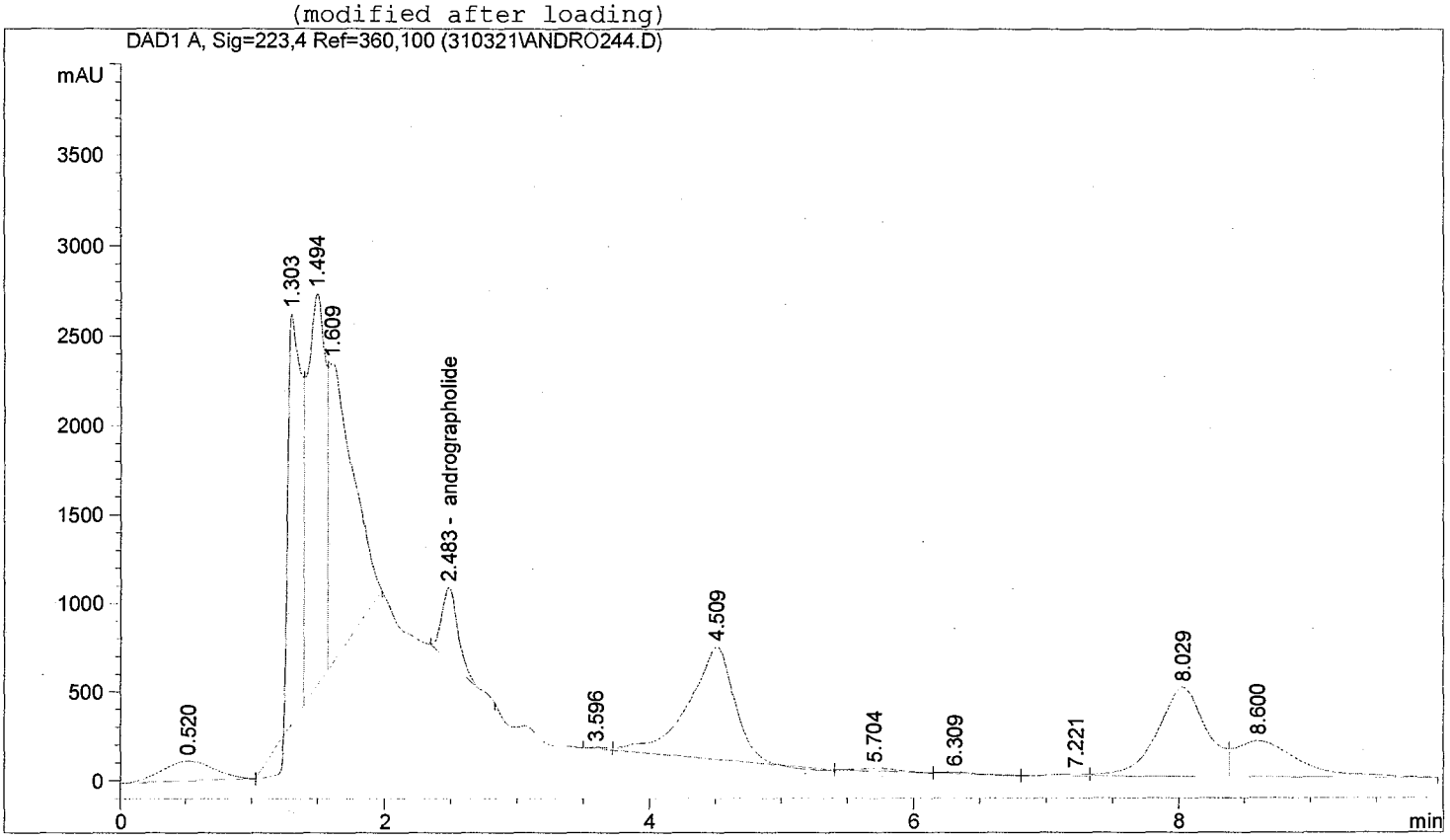
RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
2.488	BBA	3768.41626	2.01562e-2	75.95711		andrographolide

Totals : 75.95711

Results obtained with enhanced integrator!

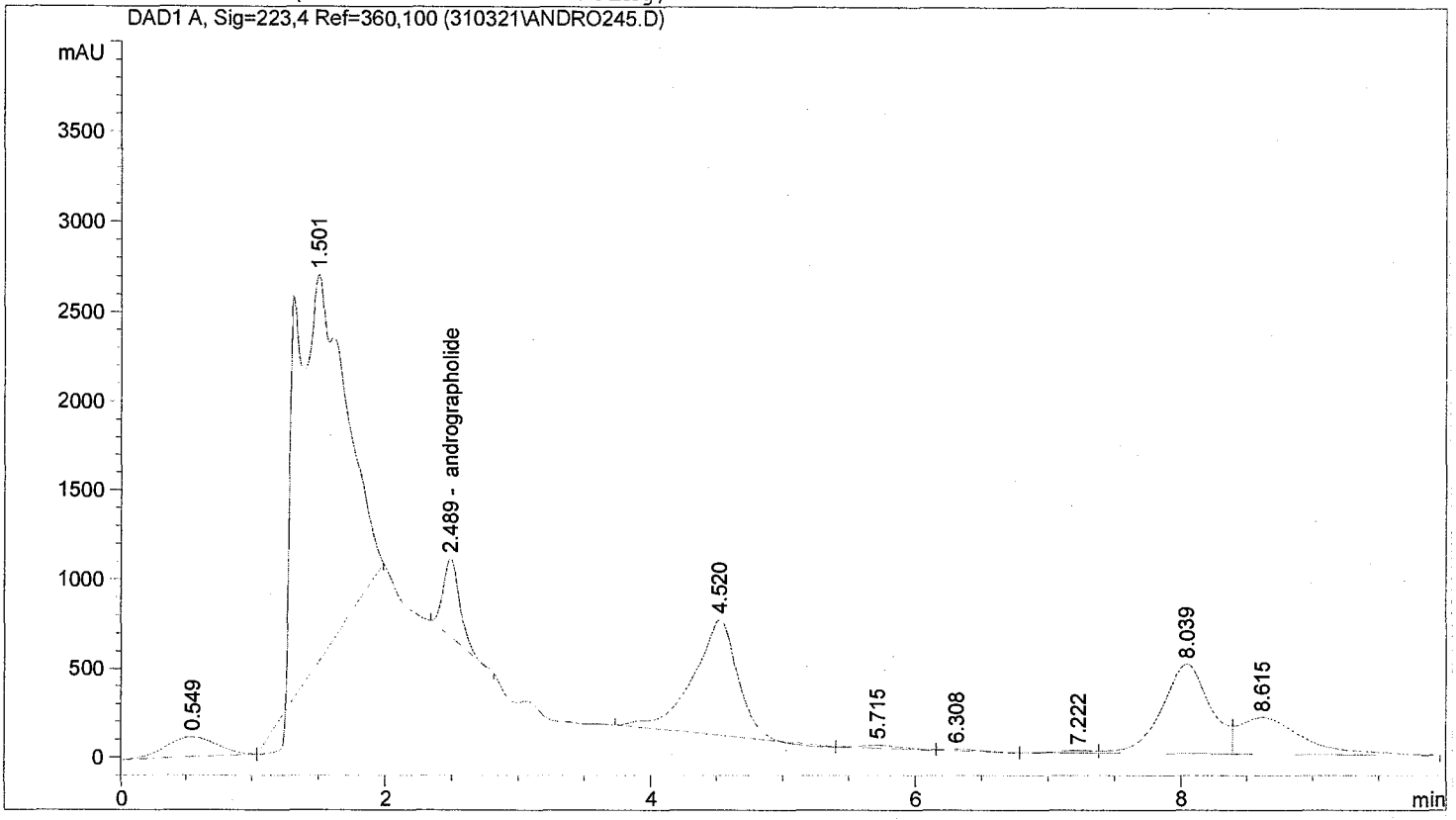
*** End of Report ***

```
==========================================================================
Injection Date  : 4/1/2021 11:58:46 AM          Seq. Line :   5
Sample Name     : Crude2_2                       Location : Vial 13
Acq. Operator   : bussaba                            Inj :   1
                                                Inj Volume : 20 µl
Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\ANDROGRA.M
Last changed    : 4/1/2021 8:02:11 AM by bussaba
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\ANDRO-1.M
Last changed    : 4/1/2021 2:15:10 PM by bussaba
                  (modified after loading)
```




```
==========================================================================
                      External Standard Report
==========================================================================

Sorted By             :      Signal
Calib. Data Modified  :      4/1/2021 1:54:41 PM
Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=223,4 Ref=360,100

RetTime  Type     Area      Amt/Area    Amount    Grp   Name
 [min]          [mAU*s]                [ug/ml]
-------|------|----------|----------|----------|--|-----------------
  2.483 BBA    3631.67896 2.01618e-2   73.22103     andrographolide

Totals :                               73.22103

 Results obtained with enhanced integrator!
==========================================================================
                        *** End of Report ***
```

```
Injection Date  : 4/1/2021 12:11:04 PM          Seq. Line :   6
Sample Name     : Crude2_3                     Location : Vial 13
Acq. Operator   : bussaba                          Inj :   1
                                             Inj Volume : 20 µl

Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\ANDROGRA.M
Last changed    : 4/1/2021 8:02:11 AM by bussaba
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\ANDRO-1.M
Last changed    : 4/1/2021 2:11:51 PM by bussaba
                  (modified after loading)
```



External Standard Report

```
Sorted By             :      Signal
Calib. Data Modified  :      4/1/2021 1:54:41 PM
Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=223,4 Ref=360,100
```

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
2.489	BBA	3733.62817	2.01576e-2	75.26101		andrographolide
Totals :				75.26101		

```
 Results obtained with enhanced integrator!
```

*** End of Report ***