บทที่ 5
สรุป อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

ปัจจุบันยาจากสมุนไพรในประเทศไทยส่วนใหญ่ยังไม่มีการควบคุมคุณภาพ เนื่องจากสารสำคัญจากสมุนไพรซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ไม่มีจำหน่ายในท้องตลาด (ที่มีจำหน่ายจะเป็นสารสำคัญจากสมุนไพรของต่างประเทศ) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการสกัดแยกเอง เพื่อใช้เป็นสารมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพ อีกทั้งเป็นการพัฒนายาจากสมุนไพรให้มีคุณภาพทัดเทียมยาแผนปัจจุบันและลดการนำเข้าบางส่วน

สรุปผลการวิจัย

1. **วัตถุประสงค์ของการวิจัย**

งานวิจัยนี้มุ่งทำการสกัดแยกสารสำคัญในกลุ่มไดเทอร์พีนอยด์ (diterpenoids) จากต้นฟ้าทะลายโจร คือ neoandrographolide เนื่องจากไม่มีจำหน่ายในท้องตลาด จึงต้องทำการสกัดแยกเอง ให้อยู่ในสภาพสารบริสุทธิ์ อีกทั้งในขั้นตอนการสกัด neoandrographolide จะได้ andrographolide ร่วมด้วย (by-product) แต่ต้องทำการแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ต่อไป เพื่อใช้เป็น chemical marker หรือ signature compound ในการควบคุมคุณภาพทั้งวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์

2. **วิธีดำเนินการวิจัย**

Andrographolide และ neoandrographolide ถูกสกัดจากต้นฟ้าทะลายโจรโดยใช้ ethanol นำน้ำยาสกัดอย่างหยาบ ethanol มาแยกองค์ประกอบอื่นๆ ออกไปด้วยวิธี partition ด้วย hexane และ ethyl acetate ตามลำดับ พบว่าทั้ง andrographolide และ neoandrographolide อยู่ในชั้น ethyl acetate จึงแยกสารทั้งสองออกจากองค์ประกอบอื่นๆ ด้วยวิธี column chromatography ซึ่งบรรจุ silica gel 60 ใน chloroform จากนั้นค่อยๆ เพิ่มความมีขั้ว (polarity) ของสารละลายโดยใช้ methanol จนกระทั่งความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายผสม chloroform : methanol = 85 : 15

การตรวจสอบว่ามี andrographolide และ neoandrographolide ใน fraction ใดใช้วิธี Thin Layer Chromatography (TLC : silica gel GF_{254}, DVS: chloroform : methanol = 85 : 15) เปรียบเทียบกับค่า hR_f ของสารทั้งสองกับสารมาตรฐาน andrographolide (Aldrich®) และ neoandrographolide ใน Thai Herbal Pharmacopoeia (Vol. I. 1995: 30)

Andrographolide ที่แยกได้ยังมีสารประกอบอื่นปนอยู่เล็กน้อย จึงทำให้บริสุทธิ์ด้วย silica gel column chromatogrphy (CH_3OH : MeOH = 85 : 15) นำ andrographolide fraction ที่แยกได้ทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นด้วยการตกผลึกซ้ำหลายๆ ครั้งด้วย methanol จนได้ผลึกสีขาวรูป plate

สำหรับ neoandrographolide ที่แยกได้ยังมีสารประกอบอื่นปนอยู่เล็กน้อย จึงทำให้บริสุทธิ์ด้วย silica gel column chromatogrphy (CH_3OH : MeOH = 80 : 20) นำ neoandrographolide fraction ที่แยกได้ทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นด้วยการตกผลึกซ้ำหลายๆ ครั้งด้วย chloroform และ hexane จนได้ผลึกสีขาวรูปเข็ม

ผลึก andrographolide และ neoandrographolide ที่แยกได้ นำไปตรวจเอกลักษณ์ด้วยวิธีการต่างๆ เพื่อยืนยันผล

3. **ผลการวิเคราะห์ข้อมูล**

จากการตรวจเอกลักษณ์ andrographolide ที่แยกได้ เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน andrographolide (Aldrich®) โดยการ

- วัดค่า melting point พบว่ามีค่าเท่ากันคือ 230-231°C
- วัดการดูดกลืนแสง UV พบว่ามีค่า UV_{max} เท่ากันคือ 222 nm
- ตรวจเอกลักษณ์ด้วยวิธี TLC โดยใช้ Developing Solvent System (DVS) ที่แตกต่างกัน 3 ระบบดังนี้

  A. chloroform : absolute ethanol = 85 : 15

  B. acetone : methanol = 90:10

  C. n-butanol : ethyl acetate = 20 : 80

  จากนั้นนำไปสเปรย์ด้วย Kedde reagent

  พบว่าทุก systems มี spot เดียว และมี hR, value เท่ากับสารมาตรฐาน andrographolide (Aldrich®) คือ 54, 21 และ 44 ตามลำดับ
- ตรวจเอกลักษณ์ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้ C-18 column (Luna®, 4.6 mm I.D. x 25 cm.), flow rate 1 ml/min., detector 254 nm และใช้ mobile phase ที่แตกต่างกันดังนี้

  A. MeOH : H_2O = 80 : 20

  B. MeOH : H_2O = 70 : 30

  C. MeOH : H_2O = 60 : 40

พบว่าทุกๆ สภาวะ andrographolide ที่แยกได้บริสุทธิ์ (มี peak เดียว) และเมื่อเปรียบเทียบ retention time กับสารมาตรฐาน andrographolide (Aldrich®) พบว่ามี retention time ที่ใกล้เคียงกันในทุกๆ systems

จากการตรวจเอกลักษณ์ neoandrographolide ที่แยกได้ เปรียบเทียบกับข้อมูลจากวารสาร โดยการ

- วัด melting point พบว่า m.p. ของ neoandrographolide ที่แยกได้ = 168-169°C [Lit.:168-169°C (A Dictionary of Chinese Materia medica, Supplement. 1979: 487); 169-171°C (Chen and Liang. 1982: 245-246)]
- วัดการดูดกลืนแสง UV พบว่า UV max ของผลึก neoandrographolide ที่แยกได้ใน methanol = 207 nm [Lit.: 205 nm (Chan et al. 1971: 5081-5091)]
- ตรวจเอกลักษณ์ด้วยวิธี TLC โดยใช้ Developing Solvent System (DVS) ที่แตกต่างกัน 3 ระบบดังนี้

  A. chloroform : absolute ethanol = 85 : 15 และสเปรย์ด้วย Kedde reagent

  พบว่ามี spot เดียวและเมื่อเปรียบเทียบกับ TLC profile ของน้ำยาสกัดจากฟ้าทะลายโจรใน Thai Herbal Pharmacopoeia (Vol. I, 1995: 30) และในวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (เย็นจิตร จิวเวชดำรงค์กุล. 2530: 235) พบว่ามีสีม่วงแดงเหมือนกันและ hR_f value เท่ากัน คือ 30

  B. chloroform : methanol = 7 : 1 และสเปรย์ด้วย 20% sulfuric acid in methanol ตามด้วยการทำ plate ให้ร้อนที่ 120°C เป็นเวลา 10 นาที

  พบว่ามี spot เดียวและเมื่อเปรียบเทียบกับ TLC profile ของน้ำยาสกัดจากฟ้าทะลายโจรใน Indian Herbal Pharmacopoeia (Vol. I. 1998: 24) พบว่ามีสีชมพูเหมือนกัน และมี hR_f value เท่ากัน คือ 39

  C. n-butanol : ethyl acetate = 20 : 80 และสเปรย์ด้วย Kedde reagent

  พบว่ามี spot เดียว สีม่วงแดง และ hR_f value เท่ากับ 25

- ตรวจเอกลักษณ์ด้วย 1D- / 2D-Proton-Nuclear Magnetic Resonance (1D-/ 2D-^{1}H NMR) Spectra โดยใช้ CD_3OD เป็นสารละลาย เปรียบเทียบข้อมูลที่ได้กับข้อมูลจากวารสาร (Chan et al. 1971: 5081-5091, Dual et al. 2003: 147-151 และ

Balmain and Connolly. 1973: 1247-1251) ทำให้สามารถทำนายสูตรโครงสร้างและลำดับการเชื่อมต่อของแต่ละส่วนของโมเลกุล neoandrographolide

อภิปรายผล

จากการตรวจเอกลักษณ์ andrographolide ที่แยกได้ เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน andrographolide (Aldrich®) ด้วยการวัดค่า melting point, วัดการดูดกลืนแสง UV, ตรวจเอกลักษณ์ด้วยวิธี TLC และ HPLC พบว่าได้ผลตรงกัน

ผลึก neoandrographolide ที่แยกได้ นำไปตรวจเอกลักษณ์โดยการเปรียบเทียบข้อมูลจากวารสาร ด้วยการวัดค่า melting point, วัดการดูดกลืนแสง UV, ตรวจเอกลักษณ์ด้วยวิธี TLC และ 1D-/ 2D- ^{1}H NMR พบว่าได้ผลตรงกัน

ข้อเสนอแนะ

1. **ข้อเสนอแนะจากผลการวิจัยที่พบและการนำผลการวิจัยไปใช้**

การวิจัยนี้เป็นการหาวิธีการสกัดและแยก andrographolide และ neoandrographolide จาก ต้นฟ้าทะลายโจรให้อยู่ในรูปสารบริสุทธิ์ วิธีการดังกล่าวสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการแยกสกัดสารสำคัญจากสมุนไพรชนิดอื่นๆ ได้ นอกจากนี้สามารถนำสารทั้งสองที่แยกสกัดได้นำไปใช้ในการควบคุมคุณภาพทั้งวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์จากต้นฟ้าทะลายโจรได้

2. **ข้อเสนอแนะในการวิจัยครั้งต่อไป**

ควรศึกษาวิธีพัฒนาวิธีวิเคราะห์ของ andrographolide และ neoandrographolide รวมทั้งการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ เพื่อนำไปใช้ในการควบคุมคุณภาพทั้งวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY