



โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การประยุกต์ใช้เทคนิค FTIR ร่วมกับ

เคโมเมตริกซ์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณแอนโดกราโฟไลด์ในผงฟ้าทะลายโจร

The application of FTIR spectroscopic techniques in combination with chemometrics for quantitative determination of andrographolide contents in *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Wall ex Nees. Powder

โดย

นสภ.สุภาวดี แสงพันธ์ 59210215

นสภ.กรกมล ธนาวิจิตรเจริญ 60210174

นสภ.พัทธธีรา รัชนิย์ 60210204

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2564

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การประยุกต์ใช้เทคนิค FTIR ร่วมกับ

เคโมเมตริกซ์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณแอนโดกราโฟไลด์ในผงฟ้าทะลายโจร

The application of FTIR spectroscopic techniques in combination with chemometrics for quantitative determination of andrographolide contents in *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Wall ex Nees. Powder

โดย

นสภ.สุภาวดี แสงพันธ์	59210215
นสภ.กรกมล ธนาวิจิตรเจริญ	60210174
นสภ.พัทธธีรา รัชนิย์	60210204

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2564

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คำนำ

จากสถานการณ์ปัจจุบันประเทศไทยได้มีการประกาศให้มีการใช้ ยาจากสารสกัดฟ้าทะลายโจรและยาจากผงฟ้าทะลายโจรเพิ่มขึ้นโดยกระตุ้นให้ประชาชนทั่วไปรวมถึงผู้ประกอบการมีการผลิตเพิ่มขึ้นจำนวนมาก จนเกิดปัญหาเรื่องการควบคุมคุณภาพของปริมาณสารสำคัญ

การควบคุมคุณภาพของยาสมุนไพรฟ้าทะลายโจรในปัจจุบันตามเป็นวิธีการที่ต้องมีการทำลายตัวอย่างและใช้ระยะเวลานานในการวิเคราะห์ เนื่องจากต้องเตรียมตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์หลายขั้นตอน และมีการใช้สารเคมีในปริมาณมากเพื่อสกัดสารออกมาวิเคราะห์ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม

ดังนั้นงานวิจัยในครั้งนี้เราจึงเล็งเห็นถึงความสำคัญของการหาวิธีวิเคราะห์ที่จะนำมาตรวจสอบพืชสมุนไพรฟ้าทะลายโจรที่มีความรวดเร็ว ประหยัด มีความแม่นยำ มีความจำเพาะ เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม และไม่ทำลายตัวอย่าง ด้วยเทคนิค FTIR (fourier transform infrared spectroscopy) ควบคู่กับการใช้ chemometric ชนิด partial least square regression (PLSR) ในการวิเคราะห์

คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ปีการศึกษา 2564

เรื่อง การประยุกต์ใช้เทคนิค FTIR ร่วมกับ เคมีเมตริกซ์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณแอนโดกราโฟไลด์ ในผงฟ้าทะลายโจร

ผู้จัดทำโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

- | | | |
|-----------------------------|------|----------|
| 1. นสภ.สุภาวดี แสงพันธ์ | รหัส | 59210215 |
| 2. นสภ.กรกมล ธนาวิจิตรเจริญ | รหัส | 60210174 |
| 3. นสภ.พัทธธีรา รัชนิย์ | รหัส | 60210204 |

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. ญญ.อ.ดร.พุทธิพร คงแก้ว (ที่ปรึกษาหลัก)
2. ภก.ผศ.ดร.วัชรพงษ์ แจ่มสว่าง (ที่ปรึกษาร่วม)

ในปัจจุบันการหาปริมาณสาร andrographolide ในผงฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata* (Burm.f.)) ตามวิธีมาตรฐานใน Thai herbal pharmacopoeia 2017 คือการใช้ high performance liquid chromatography (HPLC) ซึ่งวิธีการดังกล่าวเป็นวิธีการที่มีความถูกต้อง (accuracy) และแม่นยำ (precision) แต่อย่างไรก็ตามการใช้ HPLC ก็มีข้อเสีย เช่น ต้องมีการเตรียมสารตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ จึงส่งผลทำให้สารตัวอย่างถูกทำลาย, ใช้เวลานานในการวิเคราะห์, มีขั้นตอนในการวิเคราะห์หลายขั้นตอน, ใช้สารเคมีเป็นจำนวนมาก และก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ในงานวิจัยนี้จึงได้มีการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค FTIR spectroscopic ร่วมกับ chemometrics เพื่อหาปริมาณสาร andrographolide ในผงฟ้าทะลายโจร โดยแบบจำลองที่เหมาะสมที่สุดจะถูกพัฒนาโดยใช้ partial least square regression (PLSR) model จาก IR spectrum ในช่วง $4000-525\text{ cm}^{-1}$ และ pretreatment ข้อมูลโดยใช้ baseline correction โดยจากการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์พบว่าความเป็นเส้นตรง (linearity) มีค่า correlation coefficient (r) 0.9721, ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (accuracy) ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเทคนิค HPLC ที่ค่าความเชื่อมั่น 95% (p -value 0.94) โดยใช้ ANOVA, ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (precision) มีค่า HorRat 0.63 และ root mean square error of prediction (RMSEP) มีค่า 3.54% ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนั้นมีประสิทธิภาพและสามารถใช้เป็นทางเลือกในการวิเคราะห์หาปริมาณสาร andrographolide ในผงฟ้าทะลายโจรได้

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

ญญ.อ.ดร.พุทธิพร คงแก้ว

ABSTRACT

Senior Project Academic Year 2021

: The application of FTIR spectroscopic techniques in combination with chemometrics for quantitative determination of andrographolide contents in *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Wall ex Nees. Powder

By

- | | | |
|--------------------------------------|----|----------|
| 1. Miss. Supavadee Saengpan | ID | 59210215 |
| 2. Miss. Kornkamol Thanawinitcharoen | ID | 60210174 |
| 3. Miss. Patteera Ratchanee | ID | 60210204 |

Advisor:

1. Dr. Putthiporn Khongkaew
2. Dr. Watcharaphong Chaemsawang

Current standard method of quantitative analysis andrographolide in *Andrographis paniculata* (Burm.f.) powder according to Thai herbal pharmacopeia 2017 is High performance liquid chromatography (HPLC). This method is an efficient technique with high accuracy and precision. However, this method has some drawbacks i.e., it requires a sample preparation procedure prior to analysis where the sample is destroyed, takes a long time to analyze, uses several steps of analysis, uses a large number of chemicals, and the by-product is toxic to the environment. In this research, FTIR spectroscopic techniques in combination with the chemometrics methods were developed for the quantitative determination of andrographolide contents in *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Powder. The optimum developed model was obtained by constructing a partial least square regression (PLSR) model from IR spectrum range 4000-525 cm^{-1} and pretreatment data by baseline correction. The development method was validated. Linearity show correlation coefficient (r) 0.9721, accuracy was not significantly different with HPLC method at confident interval 95% (p-value 0.94) by ANOVA, precision was obtained with HorRat value 0.63 and root mean square error of prediction (RMSEP) of 3.54 %. This indicates that the developed analytical method is effective as an alternative to the primary quantitative analysis of andrographolide in *Andrographis paniculata* (Burm.f.) powder.

Major advisor

Putthiporn Khongkaew

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความกรุณาจาก เภสัชกรหญิง ดร. พุทธิพร คงแก้ว ซึ่งเป็นที่อาจารย์ที่ปรึกษาหลักในโครงการวิจัย ที่คอยให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะเพื่อแก้ปัญหา ตลอดจนปรับปรุงให้งานวิจัยในครั้งนี้มีความถูกต้อง ครบถ้วนสมบูรณ์ และขอกราบขอบพระคุณ เภสัชกร ผศ.ดร.วัชรพงษ์ แจ่มสว่าง ที่ให้ความกรุณาเป็นที่ปรึกษาร่วมทำให้งานวิจัยฉบับนี้มีความสมบูรณ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณในความกรุณาของอาจารย์ที่ปรึกษาทั้งสองท่าน

ขอกราบขอบพระคุณนางสาวรุจิภาญจน์ ทิวาวัลย์ นักวิทยาศาสตร์ที่ให้ความกรุณาในการสอนวิธีการใช้เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ และให้ข้อเสนอแนะต่างๆตลอดช่วงเวลาที่ทำการวิจัย

คณะผู้วิจัย

12 เมษายน 2565

สารบัญ

	หน้า
ปกใน	ก
คำนำ	ข
บทคัดย่อ	ค
ABSTRACT	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
วัตถุประสงค์	2
สมมติฐาน	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
กรอบแนวคิด	3
นิยามศัพท์	3
บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	5
ฟ้าทะลายโจร	5
ข้อมูลทั่วไป	5
สารสำคัญในฟ้าทะลายโจร	6
สรรพคุณของฟ้าทะลายโจรตามตำรายาไทย	6
รูปแบบยาและขนาดวิธีใช้ยา	6
ข้อห้ามใช้ ข้อควรระวัง และอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยาฟ้าทะลายโจร	7
Chemometric	8
Chemometric	8
Multivariate calibration methods in analytical chemistry	8

การพิสูจน์แบบจำลองทางเคมีเมตริกและการวิเคราะห์ด้วยตัวอย่างที่ไม่รู้ค่า	9
งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับวิธีการวิเคราะห์	10
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	12
พืช	12
สารเคมี	12
อุปกรณ์และเครื่องมือ	12
ระเบียบวิธีวิจัย	13
การพิสูจน์เอกลักษณ์ผงฟ้าทะลายโจร	13
วิธีการเตรียมสารตัวอย่าง	13
การวิเคราะห์ปริมาณสาร andrographolide โดยใช้เทคนิค HPLC	14
การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เพื่อหา	
ปริมาณ andrographolide ด้วยเทคนิค HPLC	15
การบันทึก IR spectrum ด้วยเครื่อง FTIR	16
การวิเคราะห์ปริมาณสาร andrographolide	
โดยใช้เทคนิค FTIR ร่วมกับ chemometrics	17
การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณ andrographolide	
ด้วยเทคนิค FTIR ร่วมกับ chemometrics	17
บทที่ 4 ผลการดำเนินการวิจัย	19
ลักษณะของผงฟ้าทะลายโจร	19
การตรวจสอบเอกลักษณ์ของผงฟ้าทะลายโจร (identification)	20
การวิเคราะห์ปริมาณสาร andrographolide ด้วยเทคนิค HPLC ในผงฟ้าทะลายโจร	22
การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ด้วยโดยใช้เทคนิค HPLC	23
การวิเคราะห์ผงฟ้าทะลายโจรโดยใช้เครื่อง Infrared spectroscopy	27
การเลือก model	27
การวิเคราะห์ปริมาณสาร andrographolide โดยใช้เทคนิค FTIR ร่วมกับ chemometrics	29

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค FTIR ร่วมกับ chemometrics	31
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการวิจัย	37
เอกสารอ้างอิง	40

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปภาพที่ 2.1 ลักษณะของต้นฟ้าทะลายโจร	5
รูปภาพที่ 2.2 โครงสร้างของสารสำคัญในฟ้าทะลายโจร	6
รูปภาพที่ 2.3 การประยุกต์ใช้ chemometrics	8
รูปภาพที่ 3.1 ภาพจำลองการเตรียมตัวอย่างสาร	14
รูปภาพที่ 4.1 เปรียบเทียบผงฟ้าทะลายโจรแบบที่ไม่มีการเติมและ มีการเติม standard andrographolide USP	19
รูปภาพที่ 4.2 แสดง standard andrographolide	19
รูปภาพที่ 4.3 แสดงผลการทดสอบของผงฟ้าทะลายโจร raw material	20
รูปภาพที่ 4.4 แสดงผลการทดสอบผงฟ้าทะลายโจรในแคปซูลฟ้าทะลายโจร ที่มีขายในท้องตลาด (authentic)	21
รูปภาพที่ 4.5 แสดงผลการทดสอบ standard andrographolide USP	21
รูปภาพที่ 4.6 Retention time ของ Standard andrographolide USP เปรียบเทียบกับผงฟ้าทะลายโจรจากการวัดด้วย HPLC	22
รูปภาพที่ 4.7 Standard curve ของ standard andrographolide USP สำหรับ validation	23
รูปภาพที่ 4.8 Standard curve ของ standard andrographolide USP	25
รูปภาพที่ 4.9 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ andrographolide	27
รูปภาพที่ 4.10 แสดง IR spectrum ที่ได้จากผงฟ้าทะลายโจร	27
รูปภาพที่ 4.11 แสดงช่วงของข้อมูลที่มีการนำไปใช้ในการ pretreatment ด้วยวิธี baseline	28
รูปภาพที่ 4.12 IR spectrum ของ Andrographolide จากข้อมูล Original โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่มตามความเข้มข้น	29
รูปภาพที่ 4.13 IR spectrum ของ Andrographolide จาก baseline pretreatment โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่มตามความเข้มข้น	30

รูปภาพที่ 4.14 การจัดกลุ่มข้อมูล original จากการวิเคราะห์ PCA	
ในรูปแบบ 2 มิติ และ 3 มิติ ตามลำดับ	30
รูปภาพที่ 4.15 การจัดกลุ่มข้อมูลที่ pretreatment ด้วยวิธี baseline	
จากการวิเคราะห์ PCA ในรูปแบบ 2 มิติ และ 3 มิติ ตามลำดับ	30
รูปภาพที่ 4.16 แสดงค่า correlation ที่ได้จากการ pretreatment ด้วยวิธี baseline	31

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงค่า retention time ของ sample และ retention time ของ standard	23
ตารางที่ 2 F-Test Two-Sample for Variances	24
ตารางที่ 3 t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances	24
ตารางที่ 4 แสดงค่า Accuracy และ Precision ของ HPLC method	25
ตารางที่ 5 แสดงค่าที่ได้จาก model แต่ละชนิดหลังจากการทำ pretreatment ด้วยวิธีการต่างๆ	28
ตารางที่ 6 แสดงค่าที่ใช้คำนวณหา linearity	32
ตารางที่ 7 แสดงค่า % recovery	33
ตารางที่ 8 ANOVA	33
ตารางที่ 9 แสดงค่าที่นำมาใช้ในการคำนวณ % RSD	34
ตารางที่ 10 แสดงข้อมูลที่นำมาใช้คำนวณ RMSEP	35

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

พืชสมุนไพร ถูกใช้เป็นยาชั้นพื้นฐานสำหรับการบำบัด บรรเทา หรือรักษาโรคมาอย่างยาวนานนับตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน องค์การอนามัยโลกคาดการณ์ว่าสามในสี่ของประชากรโลกในปัจจุบันใช้ยาสมุนไพรสำหรับการดูแลสุขภาพในเบื้องต้น ในประเทศไทยมีการนำพืชสมุนไพรมาใช้ในการรักษาโรคมามากมายหลายชนิดหนึ่งในนั้นคือ ฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Wall.ex Nees.)

สมุนไพรฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Wall.ex Nees.) เป็นพืชในวงศ์ Acanthaceae จัดเป็นสมุนไพรที่มีฤทธิ์เย็น มีรสขมที่ข้มมาก และมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอย่างมากมายได้แก่ ฤทธิ์แก้ไอ ฤทธิ์ต้านการอักเสบและแก้ปวด ฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสที่ก่อโรค เช่น ไข้หวัดใหญ่ และฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน(1,2) เป็นต้น สารสำคัญออกฤทธิ์ที่อยู่ในฟ้าทะลายโจรคือ สารกลุ่ม diterpenoid lactones โดยสารหลักคือ andrographolide, neoandrographolide, 14-deoxy-11, 12-didehydroandrographolide (dehydroandrographolide), dideoxyandrographolide (andrograpanin) (3)

ปัจจุบันประเทศไทยได้มีการประกาศให้มีการใช้ยาจากสารสกัดฟ้าทะลายโจรและยาจากผงฟ้าทะลายโจรเพิ่มขึ้นโดยกระตุ้นให้ประชาชนทั่วไปรวมถึงผู้ประกอบการมีการผลิตเพิ่มขึ้นจำนวนมาก ทำให้เกิดปัญหาเรื่องการควบคุมคุณภาพของปริมาณสารสำคัญซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อผู้ที่นำไปใช้เนื่องจากปริมาณสารสำคัญที่ได้รับไม่เพียงพอต่อการออกฤทธิ์ในการรักษาหรืออาจจะมากเกินไปเกินความต้องการได้

การควบคุมคุณภาพของยาสมุนไพรฟ้าทะลายโจรได้กำหนดไว้ใน Thai herbal pharmacopeia 2017 โดยการตรวจสอบความถูกต้องของสารสำคัญ andrographolide (identification) ได้ระบุให้ใช้วิธีการทำ TLC (thin layer chromatography) และตรวจสอบค่า hRf เทียบกับสารมาตรฐาน andrographolide การวิเคราะห์ปริมาณมีการทดสอบ 2 วิธี คือ 1) การหาปริมาณของ total lactones จะหาโดยวิธีการไทเทรต (titration) 2) การหาปริมาณของ andrographolide จะหาโดยวิธีการทำ HPLC (3)

การวิเคราะห์สำคัญในฟ้าทะลายโจรที่กล่าวข้างต้นเป็นวิธีการที่ต้องมีการทำลายตัวอย่างและใช้ระยะเวลานานในการวิเคราะห์ เนื่องจากต้องเตรียมตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์หลายขั้นตอน และมีการใช้สารเคมีในปริมาณมากเพื่อสกัดสารออกมาวิเคราะห์ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการทำงานวิจัยในครั้งนี้เราจึงเล็งเห็นถึงความสำคัญของการหาวิธีวิเคราะห์ที่จะนำมาตรวจสอบพืชสมุนไพรฟ้าทะลายโจรที่มีความรวดเร็ว ประหยัด มีความแม่นยำ มีความจำเพาะ เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม และไม่ทำลายตัวอย่างด้วยเทคนิค FTIR (fourier transform infrared spectroscopy) ควบคู่กับการใช้ chemometrics ชนิด partial least square regression (PLSR) ในการวิเคราะห์(4) โดย chemometrics เป็นวิธีการวิเคราะห์หารูปแบบ และเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลระหว่างสารที่ต้องการศึกษาด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปร (multivariable statistical analysis) เป็นวิธีการที่ใช้สถิติและคณิตศาสตร์มาใช้ในการให้ข้อมูลใหม่ทางเคมีโดยอาศัยข้อมูลทางเคมีที่มีอยู่เดิม

ในงานวิจัยนี้จึงได้ใช้เทคนิค chemometrics ร่วมกับวิธีการวิเคราะห์ด้วย FTIR ในการวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาปริมาณสาร andrographolide ในผงฟ้าทะลายโจรแทนการหาปริมาณด้วยเทคนิค HPLC ที่เป็นวิธีมาตรฐานเดิม เพื่อให้ได้วิธีที่มีความรวดเร็วและไม่ทำลายตัวอย่าง

วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสาร andrographolide ในผงฟ้าทะลายโจรที่สามารถวิเคราะห์สารได้อย่างสะดวก รวดเร็ว แม่นยำ ประหยัด เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม และไม่ทำลายตัวอย่าง

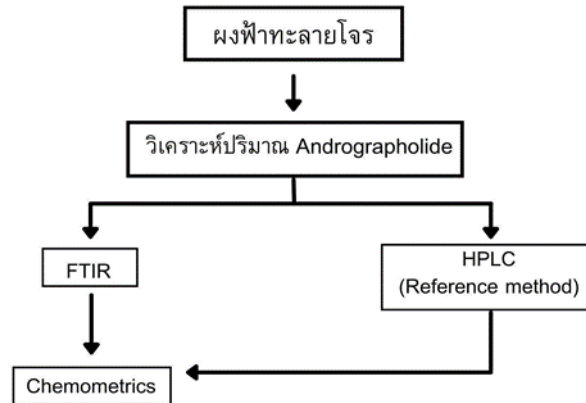
สมมติฐาน

ได้วิธีการวิเคราะห์ที่สามารถวิเคราะห์สาร andrographolide ในผงฟ้าทะลายโจร

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถนำวิธีการวิเคราะห์สารด้วยการใช้ FTIR ควบคู่กับการใช้ Chemometrics ไปประยุกต์ใช้ กับการวิเคราะห์สาร andrographolide ในผงฟ้าทะลายโจรได้
2. สามารถลดการใช้สารเคมีในการวิเคราะห์ทำให้ไม่เกิดของเสียจากสารเคมี
3. ได้วิธีการวิเคราะห์สารที่สามารถทำได้อย่างสะดวก รวดเร็ว แม่นยำ ประหยัด เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม และไม่ทำลายตัวอย่าง

กรอบแนวคิด



นิยามศัพท์

1. FTIR คือ เป็นเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาหมู่ฟังก์ชันของโมเลกุลของสาร โดยข้อมูลที่ได้สามารถเป็นได้ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ นิยมใช้วิเคราะห์ทดสอบสารอินทรีย์ ใช้ได้ดีกับสารตัวอย่างที่มีความบริสุทธิ์สูงทั้งในรูปแบบ ของแข็ง ของเหลว และ ก๊าซ โดยเทคนิคนี้เป็นเทคนิคการกระตุ้นสารด้วยพลังงานแสง เมื่อแสงอินฟราเรดที่มีความยาวคลื่นต่าง ๆ ผ่านเข้าสู่สารอินทรีย์ พันธะเคมีในโมเลกุลของสารจะดูดกลืนพลังงานที่ค่าความยาวคลื่นหนึ่ง จากนั้นข้อมูลนี้จะถูกประมวลผลโดยคอมพิวเตอร์ด้วยการใช้สมการเชิงอนุพันธ์ที่เรียกว่า Fourier Transform ซึ่งจากคำนวณพลังงานของแต่ละความยาวคลื่นและแปลผลออกมาเป็นสเปกตรัม เนื่องจากสารแต่ละชนิดให้สเปกตรัมที่มีลักษณะเฉพาะ จึงสามารถนำมาเปรียบเทียบกับสเปกตรัมของสารที่มีอยู่ในฐานข้อมูล (standard) เพื่อใช้ในการพิสูจน์และบ่งชี้ชนิดของสารตัวอย่างได้ รวมถึง FTIR เป็นเทคนิคที่ไม่ทำลายตัวอย่าง (nondestructive) กล่าวคือไม่มีการเปลี่ยนแปลง คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของตัวอย่างหลังจากการวัด นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็วไม่ยุ่งยาก และมีความปลอดภัยสูงอีกวิธีหนึ่ง (4)

2. Chemometrics คือ ศาสตร์ที่ผสมผสานระหว่างความรู้ทางสถิติ คณิตศาสตร์ และคอมพิวเตอร์ นำมาใช้ในการประมวลผลข้อมูลที่มีความซับซ้อนและยากต่อการพิจารณาแปลความหมาย ซึ่งปัจจุบันมีการศึกษาหาวิธีการสำหรับนำมาใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล เพื่อเพิ่มความแม่นยำและความถูกต้อง สามารถอธิบายความสัมพันธ์ของตัวแปรแบบองค์รวม ประหยัดเวลาเพิ่มประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ข้อมูล สามารถนำผลการวิเคราะห์ไปใช้ให้เกิดประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนางานวิจัยลำดับที่สูงขึ้น

3. PLS-R คือ วิธีการสองน้อยที่สุดบางส่วน (partial least squares: PLS) เป็นวิธีเชิงสถิติที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์หลายตัวแปรเพื่อสร้างแบบความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มของตัวแปรทำนาย

(predictor variable) โดยอาศัยตัวแปรแฝง (latent variable) PLS-R เป็นการพัฒนาให้สามารถจัดการกับปัญหาการวิเคราะห์การถดถอย (Regression Analysis) สามารถใช้กับการสร้างตัวแบบ chemometrics และ spectrometric

4. PCA (principal components analysis) หรือ การวิเคราะห์องค์ประกอบสำคัญเป็นการย่อเมตริกซ์สหสัมพันธ์ที่มีความซับซ้อนให้ง่ายต่อการอธิบายและเป็นวิธีหนึ่งของการวิเคราะห์องค์ประกอบว่า องค์ประกอบนั้นเป็นองค์ประกอบที่แท้จริง (real factor) ซึ่งได้จากการคำนวณจากเมตริกซ์สหสัมพันธ์โดยตรง

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

1. ฟ้ายะลวยโจร

1.1 ข้อมูลทั่วไป

ฟ้ายะลวยโจร มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Wall.ex Nees. เป็นพืชในวงศ์ Acanthaceae และมีชื่อเรียกที่สามารถเรียกได้แตกต่างกันไปตามแต่ละพื้นที่ (3) ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เป็นไม้ล้มลุก ลำต้นตั้งตรง สูงประมาณ 30 – 60 เซนติเมตร ทรงปลายกิ่งเป็นเหลี่ยม แตกกิ่งเล็ก ๆ ด้านข้างเป็นจำนวนมาก โดยกิ่งก้านจะมีสีเขียว ลักษณะเป็นพุ่ม แผ่นใบเรียบเนื้อเกลี้ยงมีสีเขียว ออกดอกเป็นช่อ โดยดอกจะมีขนาดเล็ก สีขาว มีกลีบรองดอก 5 กลีบ มีกลีบดอก 5 กลีบ เกสรมีสีม่วงแดงและมีขน เมื่อฝักแก่จะแตกออกเป็น 2 ซีก ซึ่งทำให้มองเห็นเมล็ดดวงอยู่ในผล ซึ่งเมล็ดด้านในจะมีสีน้ำตาลอ่อน (2)

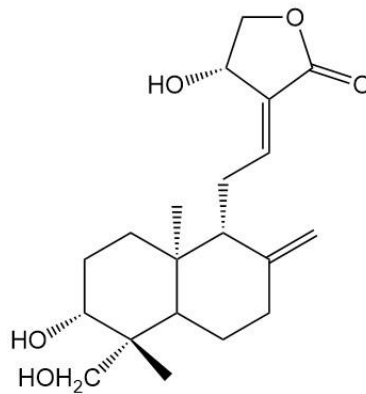


Fig. 1a *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees
1. flowering and fruiting plant 2. different views of flowers (a-d)
3. fruits in different stages (e), dehiscent fruit showing seeds (f) 4. crude drug

รูปภาพที่ 2.1 ลักษณะของต้นฟ้ายะลวยโจร

1.2 สารสำคัญในฟ้าทะลายโจร

สารสำคัญออกฤทธิ์ที่อยู่ในฟ้าทะลายโจรคือสารในกลุ่ม diterpenoid lactone โดยสารหลักคือ andrographolide, neoandrographolide, 14-deoxy-11, 12-didehydroandrographolide (dehydroandrographolide), dideoxyandrographolide (andrograpanin) เป็นต้น (3) ดังแสดงในรูปที่ 2.2 ส่วนที่จะนำมาใช้เป็นยาสมุนไพร ได้แก่ ใบสด ใบแห้ง และทั้งต้นของฟ้าทะลายโจร โดยเราสามารถเก็บส่วนต่าง ๆ ของต้นฟ้าทะลายโจรมาใช้ได้เมื่อต้นมีอายุได้ประมาณ 3-5 เดือน



รูปภาพที่ 2.2 โครงสร้างของสารสำคัญ andrographolide ในฟ้าทะลายโจร

1.3 สรรพคุณของฟ้าทะลายโจรตามตำรายาไทย

- 1.3.1 รักษาไข้หวัด ไข้หวัดใหญ่
- 1.3.2 ดับพิษร้อน รักษาอาการไข้
- 1.3.3 ระงับอาการอักเสบในการไอ เจ็บคอ คออักเสบ
- 1.3.4 ขับเสมหะ
- 1.3.5 ลดอาการบวม
- 1.3.6 แก้บิด แก้กระเพาะอาหารอักเสบ ลำไส้อักเสบ
- 1.3.7 รักษาโรคผิวหนัง ฝี
- 1.3.8 การติดเชื้อที่ทำให้มีอาการปวดท้อง ท้องเสีย บิด
- 1.3.9 ช่วยให้อาหาร (5)

1.4 รูปแบบยาและขนาดวิธีใช้ยา

- 1.4.1 เพื่อใช้ลดอาการของโรคหวัดและลดอาการเจ็บคอ รับประทานครั้งละ 1.5 – 3 กรัม วันละ 4 ครั้ง หลังอาหาร และก่อนนอน (6)
- 1.4.2 เพื่อใช้บรรเทาอาการท้องเสียไม่ติดเชื้อ รับประทานครั้งละ 500 มิลลิกรัม – 2000 มิลลิกรัม โดยแบ่งให้วันละ 4 ครั้ง รับประทาน หลังอาหารและก่อนนอน (6)

1.4.3 ใช้เพื่อรักษาฝีหรือแผลพุพอง ใช้ใบสดตำเพื่อพอกตรงบริเวณที่เป็นบ่อๆ หรือใช้คั้นให้น้ำมาทาตรงบริเวณที่เป็นบ่อๆ ถ้าใช้พอกฝีให้เปลี่ยนยา เช้า เย็น

1.4.4 ใช้บรรเทาอาการจากโรคโควิด 19 ที่มีความรุนแรงน้อย เพื่อลดการเกิดโรคที่รุนแรง รับประทานในขนาดยาที่มีปริมาณ andrographolide 180 มิลลิกรัมต่อวัน โดยแบ่งให้วันละ 3 ครั้ง เป็นระยะเวลา 5 วัน

1.5 ข้อห้ามใช้ ข้อควรระวัง และอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยาฟ้าทะลายโจร

1.5.1 ข้อห้ามใช้

- 1) ห้ามใช้ในผู้ที่มีอาการแพ้ฟ้าทะลายโจร
- 2) ห้ามใช้ในหญิงตั้งครรภ์และหญิงให้นมบุตรเนื่องจากอาจทำให้เกิดทารกวิรูป

1.5.2 ข้อควรระวัง

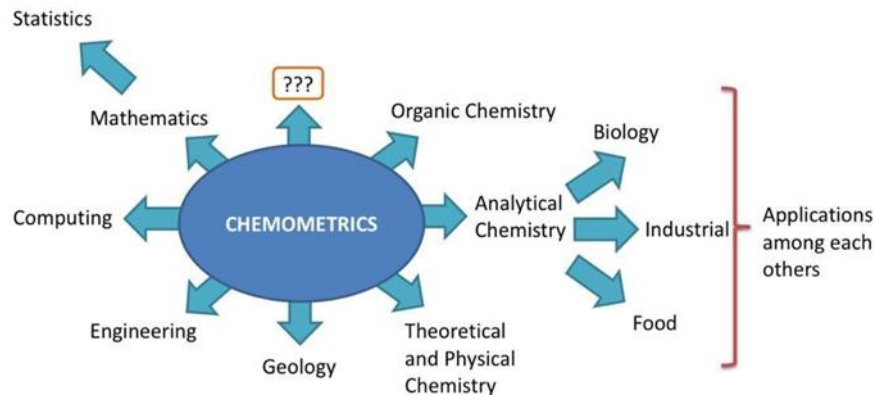
- 1) หากใช้ยานี้ติดต่อกันเป็นเวลานานอาจทำให้แขนขามีอาการชาหรืออ่อนแรง
- 2) หากใช้ฟ้าทะลายโจรติดต่อกัน 3 วัน แล้วไม่หาย หรือมีอาการรุนแรงขึ้นระหว่างใช้ยา ควรหยุดใช้และพบแพทย์
- 3) ควรระวังการใช้ยานี้ร่วมกับสารกันเลือดเป็นลิ่ม (anticoagulants) และยาต้านการจับตัวของเกล็ดเลือด (antiplatelets)
- 4) ควรระวังการใช้ยานี้ร่วมกับยาลดความดันเลือดเพราะอาจเสริมฤทธิ์กันได้
- 5) ควรระวังการใช้ยานี้ร่วมกับยาที่กระบวนการเมแทบอลิซึม ผ่านเอนไซม์ cytochrome P450 (CYP 450) เนื่องจากฟ้าทะลายโจรมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP 1A2, CYP 2C9 และ CYP 3A4

1.5.3 อาการไม่พึงประสงค์

อาจทำให้เกิดอาการผิดปกติของทางเดินอาหาร เช่น ปวดท้อง ท้องเดิน คลื่นไส้ เบื่ออาหาร วิงเวียนศีรษะ ใจสั่น และอาจเกิดลมพิษได้ (6)

2. chemometrics

2.1 chemometrics



รูปภาพที่ 2.3 การประยุกต์ใช้ chemometrics

Chemometrics ถูกนิยามเป็นเหมือนการประยุกต์คณิตศาสตร์และสถิติเพื่อกระบวนการวัดทางเคมี chemometrics คือการจัดระเบียบทางเคมี โดยใช้คณิตศาสตร์สถิติและตรรกศาสตร์ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล multivariate (ตัวแปรหลายตัวส่งผลต่อข้อมูล) เป็นข้อมูลที่มีความซับซ้อน chemometrics ในปัจจุบันหมายถึงวิธีการ multivariate calibration (ตัวแปรหลายตัว) ทั้งหมดในเคมีวิเคราะห์เมื่อเทียบกับการคาลิเบรชันแบบตัวแปรเดียวแบบดั้งเดิม (classical univariate calibration) จะพบว่า multivariate calibration ไม่เพียงแต่จะไม่ใช้ข้อมูลสเปกตรัมเพียงจุดเดียวในการคาลิเบรชันแต่จะใช้โครงสร้างทั้งหมดของสเปกตรัม ประโยชน์ของการคาลิเบรชันแบบนี้คือปริมาณข้อมูลของสเปกตรัมที่ใช้ ซึ่งถึงแม้จะมีความแตกต่างเล็กน้อย ในสเปกตรัมของตัวอย่างก็จะถูกระบุออกมา (7)

2.2 Multivariate calibration methods in analytical chemistry

2.2.1 การพิจารณาเชิงทฤษฎี (Theoretical Considerations)

โดยทั่วไปวิธีการวิเคราะห์เชิงปริมาณทุกอย่างมีวัตถุประสงค์เพื่อหาสมบัติของระบบ Y ซึ่งเป็นเชิงปริมาณ โดยหาจากพารามิเตอร์ที่วัดได้จากระบบ X ซึ่งการวิเคราะห์นี้ปกติจะต้องมีการทำ 2 ขั้นตอน คือการคาลิเบรชัน (calibration) และการวิเคราะห์ (prediction) ในระหว่างการคาลิเบรชันจะต้องหาค่าความสัมพันธ์ (correlation) ของค่าที่วัดได้ X และ สมบัติของระบบ Y ซึ่งความสัมพันธ์นี้จะอธิบายในแบบจำลองคาลิเบรชัน ดังต่อไปนี้

$$Y = X \cdot b \quad (2.1)$$

โดยที่ฟังก์ชันค่าลิเบอเรชัน b ซึ่งมักจะเรียกว่า regression coefficient หรือ b-coefficient สามารถแสดงได้ดังนี้

$$b = (X^T \cdot X)^{-1} \cdot X^T \cdot Y \quad (2.2)$$

ในหลายกรณีการค่าลิเบอเรชันแบบตัวแปรเดียวมีความสามารถในการทำนายไม่เพียงพอเนื่องจากมีข้อจำกัดหลายอย่าง เช่น

1. ความเข้มข้นของสารสัมพันธ์กับจุดเดี่ยวบนเส้นสเปกตรัม เพราะฉะนั้นเมื่อมีการประเมินตัวอย่างที่ไม่ทราบค่าตัวใหม่ ทั้งข้อมูลที่เกิดปกติ (Outlier) และองค์ประกอบที่เป็นสิ่งรบกวนที่ไม่รู้มาก่อนสามารถถูกรับรู้ได้ พื้นที่ของพีคจะไม่สามารถประมาณว่าโครงสร้างของสเปกตรัมที่วัดไว้สอดคล้องกับข้อมูลค่าลิเบอเรชัน ความแปรปรวนของสัญญาณทางสถิติ เช่น การที่ตัวตรวจวัด (detector) ถูกรบกวน ถูกรวมเข้าด้วยกันกับข้อมูลความเข้มข้น ผลลัพธ์ของความไม่แน่นอนที่เกิดขึ้น โดยปกติต้องถูกทำให้มีค่าต่ำสุดโดยการวัดตัวอย่างหลาย ๆ ตัวอย่างแล้วเฉลี่ยผลลัพธ์นั้น

2. การสร้างแบบจำลองที่น่าพอใจของระบบหลายองค์ประกอบ ต้องการจุดยอดของพีคที่แยกกันอย่างเพียงพอ

2.2.2 PLS-Regression

อัลกอริทึมของ PLS ถูกสร้างขึ้นเป็นวิธีหนึ่งที่ยอมรับใช้มากที่สุดดังนั้นจะอธิบายวิธีนี้เท่านั้น เนื่องจากขอบเขตและความซับซ้อนทางคณิตศาสตร์ของคำอธิบายทั้งหมดจะไม่ได้แสดงไว้เพื่อที่จะทำ PLS-Regression ของระบบใด ๆ ข้อมูลของสเปกตรัมของสารต้องถูกเปรียบเทียบกับข้อมูลความเข้มข้นของสารนั้นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นทั้งในโครงสร้างข้อมูลทั้งสองต้องได้รับการยอมรับและมีความสัมพันธ์ซึ่งกันและกันสำหรับวัตถุประสงค์นี้จำเป็นต้องวัดตัวอย่างจำนวนมาก

ความสำคัญพิเศษของ PLS regression สำหรับการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีเกิดจากการสร้างแฟคเตอร์ (Factorization) ของข้อมูล X และ Y โดยไม่เป็นอิสระต่อกันและเกิดขึ้นพร้อมกันเมื่อประเมินสเปกตรัมของการดูดซับที่สามารถที่จะประมาณว่าการเปลี่ยนแปลงของข้อมูลสเปกตรัมมีต้นกำเนิดจากความแปรปรวนของความเข้มข้นที่สอดคล้องกัน นั่นหมายความว่า การเปลี่ยนแปลงของข้อมูลสเปกตรัมควรจะนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงที่สอดคล้องกันของสเปกตรัม

2.3 การพิสูจน์แบบจำลองทาง chemometrics และการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ไม่รู้ค่า

วิธีการสร้างแบบจำลองค่าลิเบอเรชันโดยใช้ PLS Regression ของข้อมูลสเปกตรัมและข้อมูลความเข้มข้นที่สอดคล้องกัน แบบจำลองนี้ให้ค่าเวกเตอร์ของ score และ loading

จำนวนจำกัด โดยใช้ข้อมูลสเปกตรัมและข้อมูลความเข้มข้นเปลี่ยนเป็นรหัสข้อมูล ค่าเหล่านี้ถูกนำมาใช้คำนวณค่าค่าลิเบรชันฟังก์ชัน b ซึ่งนำมาใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ไม่รู้ค่า

$$Y \text{ matrix} = X \text{ matrix} \cdot b$$

โดย $X \text{ matrix}$: ข้อมูลสเปกตรัมของตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์

$Y \text{ matrix}$: ค่าความเข้มข้นของตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์

สำหรับวัตถุประสงค์นี้ แบบจำลองที่ต้องการต้องถูกพิสูจน์ (validate) การประเมินนี้ทำโดยใช้แบบจำลองทำนายตัวอย่างจำนวนหนึ่งที่รู้ค่าความเข้มข้น การเปรียบเทียบค่าที่ทำนายได้กับค่าจริงจะแสดงให้เห็นถึงความแม่นยำของแบบจำลอง ชุดของพารามิเตอร์ซึ่งแสดงถึงการทำนายที่มีข้อผิดพลาดน้อยสุดจะชี้ให้เห็นถึงวิธีการที่ดีที่สุด (4)

3. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาวิธีวิเคราะห์

จากงานวิจัยเรื่อง FTIR spectroscopy combined with partial least square for analysis of red fruit oil in ternary mixture system ทำการศึกษาการใช้ FTIR spectroscopy ควบคู่กับ PLSR (partial least square regression) เพื่อหาปริมาณของ red fruit oil ที่อยู่ในสารละลายผสมสามชนิดได้แก่ red fruit oil, corn oil และ soybean oil พบว่าเมื่อใช้ PLS calibration จะสามารถใช้ first derivative เพื่อหาปริมาณของ red fruit oil ได้ ในขณะที่สามารถใช้ second derivative ในการหาปริมาณของ corn oil และ soybean oil ได้ โดยมีค่า R^2 ระหว่างค่าจริงและค่าที่ได้จากการทำนายของ red fruit oil, corn oil และ soybean oil คือ 0.9863, 0.9276, และ 0.9693 ตามลำดับ และมีค่า root mean square error of calibration (RMSEC) ของ red fruit oil, corn oil และ soybean oil คือ 1.59, 1.72 และ 1.60% (v/v) ตามลำดับ จากผลที่ได้พบว่าวิธีนี้เป็นวิธีที่มีความถูกต้อง แม่นยำเที่ยงตรง และเชื่อถือได้ เพื่อใช้หาปริมาณของ red fruit oil, corn oil และ soybean oil ที่ผสมอยู่รวมกันได้ (8)

นอกจากนี้ยังพบว่าอ้างอิงจากงานวิจัยเรื่อง Discrimination and characterisation of extra virgin olive oils from three cultivars in different maturation stages using Fourier transform infrared spectroscopy in tandem with chemometrics ได้ทำการศึกษาการใช้เครื่อง Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) ร่วมกับวิธีวิเคราะห์ข้อมูล multivariate เพื่อตรวจสอบน้ำมันมะกอกบริสุทธิ์ที่ผลิตจากสามสายพันธุ์ที่แตกต่างกันในระยะการสุกที่ต่างกัน การวิเคราะห์องค์ประกอบหลักและการวิเคราะห์จำแนกใช้เพื่อสร้างแบบจำลองสำหรับจำแนกตัวอย่างน้ำมันมะกอก ซึ่งจะใช้ Partial least squares regression เพื่อสร้างแบบจำลองค่าลิเบรชันเพื่อกำหนดพารามิเตอร์ทางเคมี ประสิทธิภาพของแบบจำลองจะอ้างอิงจาก R^2 , RMSEC และ RMSECV เมื่อนำแบบจำลอง มาทำนายจะได้ค่า R^2

อยู่ในช่วง 0.93 ถึง 0.99, RMSEC อยู่ระหว่าง 1% ถึง 4% และ RMSECV มีค่า 2% ถึง 5% จากผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าการใช้ FTIR spectroscopy ควบคู่ไปกับ chemometrics ช่วยให้การสร้างแบบจำลองที่มีความถูกต้อง สามารถนำมาใช้ได้จริงและแม่นยำ (9)

จากงานวิจัยทั้งสองที่กล่าวข้างต้นยังพบว่าในงานวิจัยเรื่อง Rapid determination and classification of crude oils by ATR-FTIR spectroscopy and chemometric methods ได้ทำการศึกษาการใช้เครื่อง attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) ร่วมกับ chemometrics ในการวิเคราะห์ crude oil เพื่อตรวจสอบองค์ประกอบในน้ำมันดิบและการจัดกลุ่มแบ่งประเภท ซึ่งจากเดิมจะพิจารณาการแบ่งประเภทจาก API gravity เป็นการประมาณการวิธีการสกัด ความบริสุทธิ์ ความเป็นพิษ และราคาของน้ำมันดิบ แต่ได้พัฒนาวิธีการนี้ขึ้นเพื่อให้เกิดความรวดเร็ว ประหยัด และไม่ทำลายตัวอย่างของสาร โดยจะให้วิธีตรวจวัดโดย ATR-FTIR ร่วมกับ chemometrics โดยขึ้นอยู่กับการประเมินค่าจาก API ค่าความเข้าใกล้ PLSR และ support vector machine algorithm R (SVM-R algorithm) และวิเคราะห์มีการข้อมูลจากสเปกตรัมที่วัดได้ด้วย Partial least square discrimination analysis (PLS-DA) ในการแบ่งประเภทน้ำมันดิบ ผลการศึกษาพบว่าน้ำมันดิบแบ่งได้ 3 กลุ่มจากการประเมินด้วย API gravity ซึ่งโมเดล SVM-R ให้ผลดีกว่า PLS-R เมื่อ F-test ที่ 95% confidence interval และ ความถูกต้อง (accuracy) มีค่าเท่ากับ 100% ความผิดพลาดในการแบ่งกลุ่มมีค่าเท่ากับ 0 เมื่อเทียบกลุ่ม calibration set และ prediction set ในการวิเคราะห์ด้วย PLSR (10)

ดังนั้นจากข้อมูลที่กล่าวข้างต้นทำให้ผู้วิจัยมีความสนใจพัฒนาวิธีวิเคราะห์จากเทคนิค FTIR ร่วมกับ chemometrics เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ andrographolide ในผงฟ้าทะลายโจร

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

1. พืช ฟ้าทะลายโจรจากร้านสมุนไพรท่าพระจันทร์ (สิงหาคม 2564)

2. สารเคมี

2.1 Andrographolide standard

2.2 Methanol HPLC grade

2.3 Acetonitrile HPLC grade

2.4 Acetone HPLC grade

2.5 Distilled water HPLC grade

2.6 ผงฟ้าทะลายโจร

3. อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.1 เครื่องชั่งน้ำหนักดิจิทัล ทศนิยม 4 ตำแหน่ง

3.2 เครื่อง Fourier Transform Infrared Spectrometer

3.3 โปรแกรม Unscrambler X

3.4 Oscillator ขนาดตะแกรงแรงเบอร์ 63

3.5 เครื่อง High Performance Liquid Chromatography

3.6 คอมพิวเตอร์

3.7 Sonicator

3.8 volumetric flask ขนาด 10, 25, 100 ml

3.9 Beaker

3.10 pipette ขนาด 1, 5, 10 ml

3.11 nylon membrane ที่มีขนาดรูพรุน 0.45 micron

3.12 หลอดทดลอง

3.13 ช้อนเข

3.14 Aluminium foil

3.15 Hammer mill

3.16 ชุดกรองสุญญากาศ

3.17 ถุงพลาสติก

4. ระเบียบวิธีวิจัย

4.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์ผงฟ้าทะลายโจร

ผงฟ้าทะลายโจรที่ใช้ในงานวิจัยมาจากร้านสมุนไพรท่าพระจันทร์ (สิงหาคม 2564) นำมาพิสูจน์เอกลักษณ์ตามมาตรฐานของ Thai herbal pharmacopeia 2017() ด้วยวิธีทดสอบกับ specific reagent ดังต่อไปนี้

4.1.1 Method A : ชั่งตัวอย่างผงฟ้าทะลายโจร 1 g เติม ethanol 20 mL นำไปให้ความร้อนและทำการกรอง จากนั้นเติม decolorizing charcoal 300 mg แล้วนำไปกรอง (solution 1) จากนั้นนำ solution 1 มา 1 mL แล้วหยด 2% w/v 3,5-dinitrobenzoic acid in methanol 2 หยด และ 5.7% w/v potassium hydroxide in methanol 2 หยด จะเห็นเป็นสีม่วงแดง

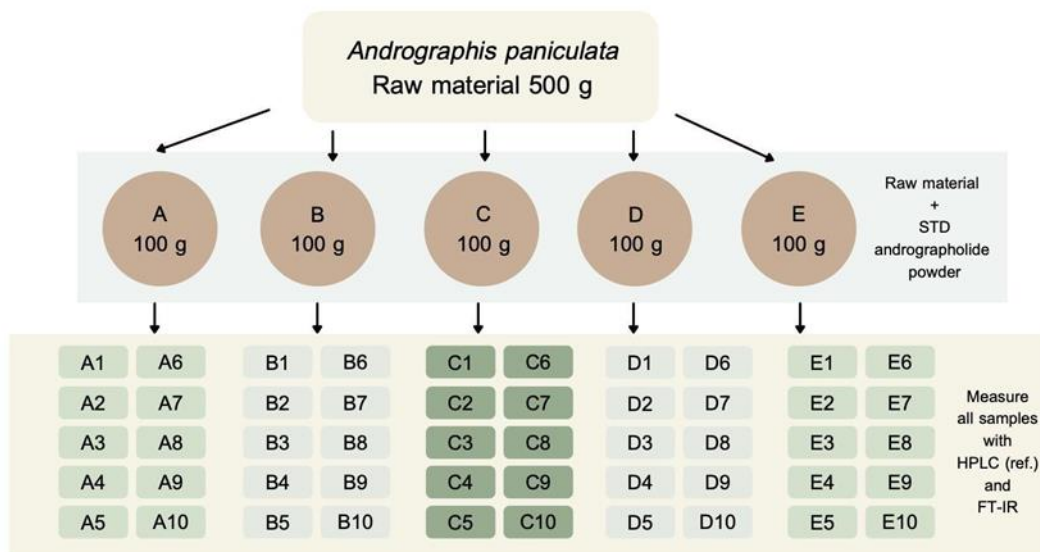
4.1.2 Method B : นำ solution 1 มา 1 mL หยด 6.5 %w/v potassium hydroxide in ethanol จนกว่าจะเห็นเป็นสีแดง ทิ้งไว้ 10-15 นาที จะเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง

4.2 วิธีการเตรียมสารตัวอย่าง

4.2.1 นำตัวอย่างผงฟ้าทะลายโจร (raw material) บดให้ละเอียดและนำมาลดขนาดด้วย oscillator ที่มีขนาดตะแกรงแรงเบอร์ 63 เพื่อให้ได้ผงฟ้าทะลายโจรที่มีความละเอียดสม่ำเสมอ

4.2.2 บด standard andrographolide ให้ละเอียดและนำไปลดขนาดเช่นเดียวกับผงฟ้าทะลายโจรผ่านแรงเบอร์ 63 เพื่อให้ได้ผง standard andrographolide มีความละเอียดสม่ำเสมอ

4.2.3 นำผงฟ้าทะลายโจร และ standard andrographolide ที่บดและแรงเรียบร้อมมาผสมในอัตราส่วนต่าง ๆ โดยใช้วิธี geometric dilution ให้มีความเข้มข้น 2-10 %w/w ของน้ำหนัก andrographolide ต่อน้ำหนักผงฟ้าทะลายโจร จำนวน 50 ตัวอย่าง (รูปที่ 3.1)



รูปภาพที่ 3.1 ภาพจำลองการเตรียมตัวอย่างสาร

4.3 การวิเคราะห์ปริมาณสาร andrographolide ด้วยเทคนิค HPLC

4.3.1 condition ที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

- 1) mobile phase acetonitrile : water (40 : 60)
- 2) flow rate 1 mL/min
- 3) column C18 ความยาว 25 cm
- 4) detection 224 nm
- 5) retention time 4.4 mins
- 6) injection volume 20 μ L
- 7) column temp room temp

4.3.2 การวิเคราะห์สารตัวอย่าง

- 1) ชั่งน้ำหนักตัวอย่างฟ้าทะลายโจรจำนวน 50 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 0.2 g
- 2) นำสารที่ชั่งได้ใส่ลงใน volumetric flask แล้วปรับปริมาณด้วย methanol จนครบ 100 ml
- 3) กรองผ่าน nylon filter 0.45 micron แล้วบรรจุลงใน HPLC vial
- 4) นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดย 1 ตัวอย่างทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง

4.3.3 การวิเคราะห์สารมาตรฐาน andrographolide

- 1) ชั่งสารมาตรฐาน andrographolide 0.1 g

2) นำสารที่ชั่งมาใส่ลงใน volumetric flask แล้วปรับปริมาณด้วย methanol จนครบ 100 mL ได้เป็น stock solution จากนั้น dilute ให้ได้ 6 ความเข้มข้น คือ 1, 10, 50, 100, 250 และ 300 mcg/mL ตามลำดับ

3) กรองผ่าน nylon filter 0.45 micron แล้วบรรจุลงใน HPLC vial

4) นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดย 1 ความเข้มข้นทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง

4.4 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณ andrographolide ด้วยเทคนิค HPLC

4.4.1 ความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ (Specificity)

พิจารณาจาก retention time เทียบระหว่าง sample กับ standard จะต้องไม่ significant ที่ค่าความเชื่อมั่น 99% (p-value มากกว่าหรือเท่ากับ 0.01)

4.4.2 ความสัมพันธ์อย่างเป็นเส้นตรง (linearity)

พิจารณาจากค่า r โดยดูจากสมการเส้นตรงของ standard curve ควรเข้าใกล้ 1

4.4.3 Range

ทำโดยการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณสารในช่วงความเข้มข้นต่าง ๆ กันและคำนวณค่าความเข้มข้นในช่วงที่ให้ accuracy และ precision ที่ยอมรับได้

4.4.4 ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (accuracy)

พิจารณาจากตัวอย่าง 10 ตัวอย่าง โดยนำมาจากตัวอย่างที่ spike standard solution 3 ช่วงความเข้มข้นคือ ความเข้มข้นสูง (52 mcg/mL), ความเข้มข้นกลาง (28 mcg/mL) และความเข้มข้นต่ำ (4 mcg/mL) ซึ่งรายงานเป็นค่า %recovery ซึ่งต้องมีค่าในช่วง 92-105% ตาม AOAC guideline ปี 2019 โดยสามารถคำนวณได้จากสูตร

$$\text{Recovery, \%} = (C_f - C_u) \times 100 / C_a$$

C_f = ความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน

C_u = ความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ไม่เติม

C_a = ค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติม

4.4.5 ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (precision)

พิจารณาจาก % RSD ไม่เกิน 2% โดยคำนวณจากสูตรต่อไปนี้

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

4.4.6 ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบได้ (limit of detection) และปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบเชิงปริมาณได้ (limit of quantitation)

ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบได้หรือค่า LOD (limit of detection) ใช้ค่าจาก calibration curve มาหาค่า limit of detection (LOD) จากสมการ

$$LOD = 3.3\sigma / S$$

σ = ค่า standard deviation

S = ค่าความชันของ calibration curve

ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบเชิงปริมาณได้หรือค่า LOQ (limit of quantitation) ใช้ค่าจาก calibration curve มาหาค่า limit of quantitation (LOQ) จากสมการ

$$LOQ = 10\sigma / S$$

σ = ค่า standard deviation

S = ค่าความชันของ calibration curve

4.5 การบันทึก IR spectrum ด้วยเครื่อง FTIR

4.5.1 นำสารตัวอย่างผงฟ้าทะลายโจรที่เตรียมขึ้นจำนวน 50 ตัวอย่างวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Attenuated Total Reflectance – Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) โดยใช้ condition

1) Detector	DTGS KBR
2) Source	IR
3) Window	Diamond
4) Range	4000-525 cm^{-1}
5) Gain	4.0
6) Optical velocity	0.4747 cm^{-1}
7) Aperture	100

4.5.2 บันทึก IR spectrum ของสารตัวอย่าง ตัวอย่างละ 3 ซ้ำเพื่อหาค่าเฉลี่ย

4.6 การวิเคราะห์ปริมาณสาร andrographolide โดยใช้เทคนิค FTIR ร่วมกับ chemometrics

4.6.1 การสร้าง calibration model

- 1) เลือกตัวอย่างโดยใช้ Kennard-Stone algorithm จำนวน 30 ตัวอย่างเพื่อใช้เป็น calibration set ในการสร้างโมเดล
- 2) สร้าง calibration model จาก IR spectrum กับ ปริมาณของ andrographolide ที่แท้จริงในผงฟ้าทะลายโจรที่วิเคราะห์ได้จากเทคนิค HPLC และทำ pretreatment data ได้แก่ 1st derivative, 2nd derivative, smoothing, standard normal variate (SNV), baseline correction และ normalize
- 3) เลือก calibration model ที่ดีที่สุดโดยพิจารณาจากค่า R^2 ของโมเดลที่ได้ให้ มีค่าเข้าใกล้ 1 และมีค่า Latent factor ต่ำ

4.6.2 การหาปริมาณ andrographolide ในผงฟ้าทะลายโจร

- 1) สารตัวอย่างที่เหลือ 20 ตัวอย่างนำมาใช้เป็น validation set
- 2) นำ IR spectrum ของสารตัวอย่างกลุ่ม validation set มาวิเคราะห์หาปริมาณ andrographolide โดยใช้ calibration model ที่ดีที่สุดที่สร้างขึ้น
- 3) เปรียบเทียบค่าที่ได้กับค่า reference concentrations

4.7 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณ andrographolide ด้วยเทคนิค FTIR ร่วมกับ chemometrics

การตรวจสอบความถูกต้องแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นโดยใช้ข้อมูลจากการวิเคราะห์สารตัวอย่างกลุ่ม validation set ดังนี้

4.7.1 ความสัมพันธ์อย่างเป็นเส้นตรง (linearity)

วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นต้องมีค่า correlation coefficient (r) มากกว่า 0.9 เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี HPLC

4.7.2 ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (accuracy)

คำนวณ linearity regression ระหว่างค่าความเข้มข้นที่ predict ได้กับค่าความเข้มข้นที่แท้จริงจากวิธีมาตรฐานจากตัวอย่างกลุ่ม validation set จำนวน 10 ตัวอย่าง โดยต้องมีค่าความเชื่อมั่น $\pm 95\%$ ของ slope คร่อม 1.0 บ่งบอกความถูกต้องของวิธีที่พัฒนาขึ้นเทียบกับวิธีมาตรฐาน

4.7.3 ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (precision)

วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นต้องมีค่า %RSD ไม่เกิน 2% และเมื่อคำนวณค่า HorRat โดยใช้สูตร $\text{HorRat} = \text{RSDr (found, \%)} / \text{RSDr (calculated, \%)}$ ควรมีค่าอยู่ในช่วง 0.5-2 ตามเกณฑ์ที่กำหนดใน AOAC guideline ปี 2019

4.7.4 Root mean squared error of prediction (RMSEP)

เป็นค่าพื้นฐานที่ใช้ประเมินความสามารถของวิธีวิเคราะห์ที่เป็น multivariate analysis สามารถคำนวณได้จาก

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum (\hat{y}_i - y_{i,\text{ref}})^2} \quad (1)$$

เมื่อ N = จำนวนตัวอย่างของ validation set

$\hat{y}_i$ = ปริมาณ Andrographolide ที่ได้จากโมเดล

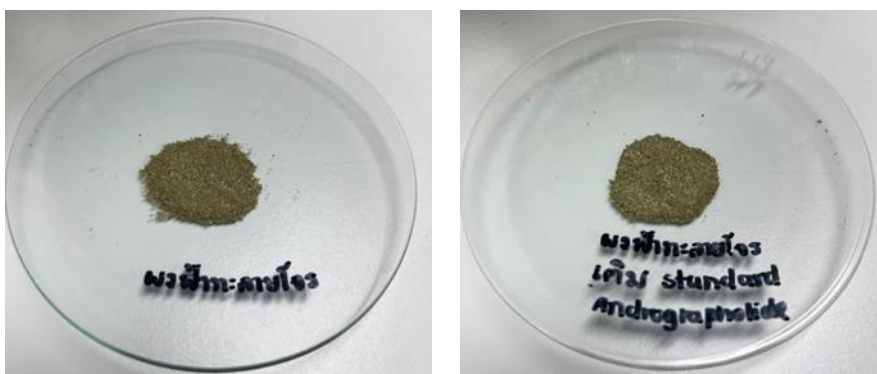
$y_{i,\text{ref}}$ = ปริมาณ Andrographolide จากวิธี reference

บทที่ 4

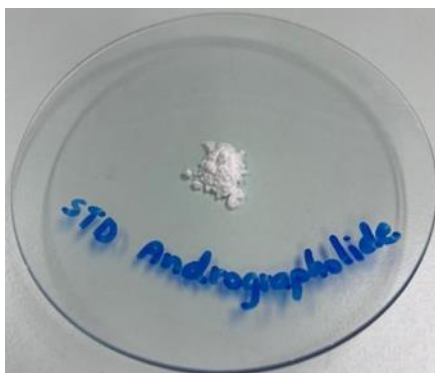
ผลและวิจารณ์การวิจัย

1. ลักษณะของผงฟ้าทะลายโจร

เปรียบเทียบผงฟ้าทะลายโจรที่ไม่มีการเติม standard andrographolide และผงฟ้าทะลายโจรที่มีการเติม standard andrographolide



รูปภาพที่ 4.1 เปรียบเทียบผงฟ้าทะลายโจรแบบที่ไม่มีการเติมและมีการเติม standard andrographolide



รูปภาพที่ 4.2 แสดง standard andrographolide

จากรูปจะเห็นได้ว่าทั้งสองชนิดจะมีลักษณะเป็นผงละเอียดสีขาวเข้ม ผงฟ้าทะลายโจรที่มีการเติม standard andrographolide จะมีสีจางและดูขาวกว่าเล็กน้อย

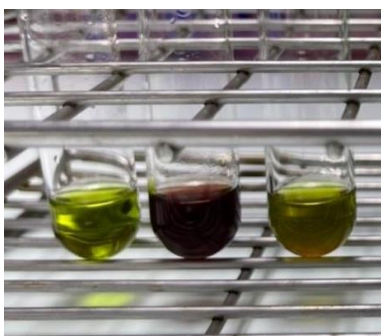
2. การตรวจสอบเอกลักษณ์ของผงฟ้าทะลายโจร (Identification)

นำตัวอย่างผงฟ้าทะลายโจรมาตรวจสอบเอกลักษณ์ด้วยวิธีการตาม method A และ B ที่ระบุใน Thai herbal pharmacopoeia 2017 โดยทำการทดสอบกับผงฟ้าทะลายโจร raw material, ผงฟ้าทะลายโจรในแคปซูลฟ้าทะลายโจรที่มีขายในท้องตลาดและ standard andrographolide

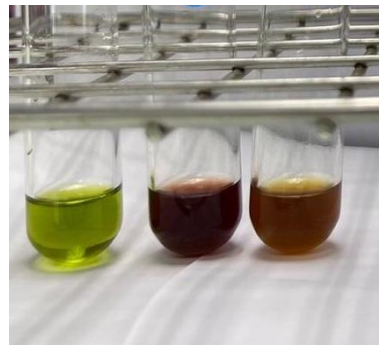
Method A : ชั่งตัวอย่างผงฟ้าทะลายโจรมา 1 g แล้วเติม ethanol 20 ml นำไปให้ความร้อนและทำการกรอง จากนั้นเติม decolorizing charcoal 300 mg แล้วนำไปกรอง (solution 1) จากนั้นนำ solution 1 มา 1 ml แล้วหยด 2% w/v 3,5-dinitrobenzoic acid in methanol 2 หยด และ 5.7% w/v potassium hydroxide in methanol 2 หยด จะเห็นเป็นสีม่วงแดง

Method B : นำ solution 1 มา 1 ml หยด 6.5% w/v potassium hydroxide in ethanol จนกว่าจะเห็นเป็นสีแดง ทิ้งไว้ 10-15 นาที จะเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง

หลังหยด reagent ทันที



หลังหยด reagent 10 นาที



รูปภาพที่ 4.3 แสดงผลการทดสอบของผงฟ้าทะลายโจร raw material

หลอดที่ 1 : มีเฉพาะตัวอย่างของผงฟ้าทะลายโจรเท่านั้น ไม่ได้มีการใส่ reagent พบว่ามีลักษณะเป็นสีเขียวอ่อน

หลอดที่ 2 : นำสารละลายของผงฟ้าทะลายโจร ทดสอบด้วย method A พบว่าสารละลายเป็นสีม่วงแดง

หลอดที่ 3 : นำสารละลายของผงฟ้าทะลายโจร ทดสอบด้วย method B พบว่าเมื่อผ่านไป 10 นาทีสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้ม

หลังหยด reagent ทันที



หลังหยด reagent 10 นาที



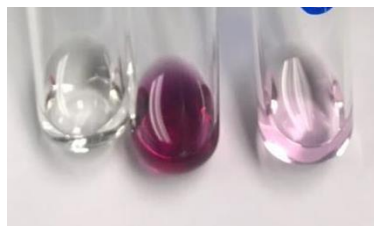
รูปภาพที่ 4.4 แสดงผลการทดสอบผงฟ้าทะลายโจรในแคปซูลฟ้าทะลายโจรที่มีขายในท้องตลาด

หลอดที่ 1 : มีเฉพาะตัวอย่างของผงฟ้าทะลายโจรเท่านั้น ไม่ได้มีการใส่ reagent พบว่ามีลักษณะเป็นสีเขียวอ่อน

หลอดที่ 2 : นำสารละลายของผงฟ้าทะลายโจร ทดสอบด้วย method A พบว่าสารละลายเป็นสีม่วงแดง

หลอดที่ 3 : นำสารละลายของผงฟ้าทะลายโจร ทดสอบด้วย method B พบว่าเมื่อผ่านไป 10 นาที สารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้ม

หลังหยด reagent ทันที



หลังหยด reagent 10 นาที



รูปภาพที่ 4.5 แสดงผลการทดสอบ standard andrographolide

หลอดที่ 1 : มีเฉพาะ standard andrographolide เท่านั้น ไม่ได้มีการใส่ reagent พบว่ามีลักษณะเป็นสีขาว

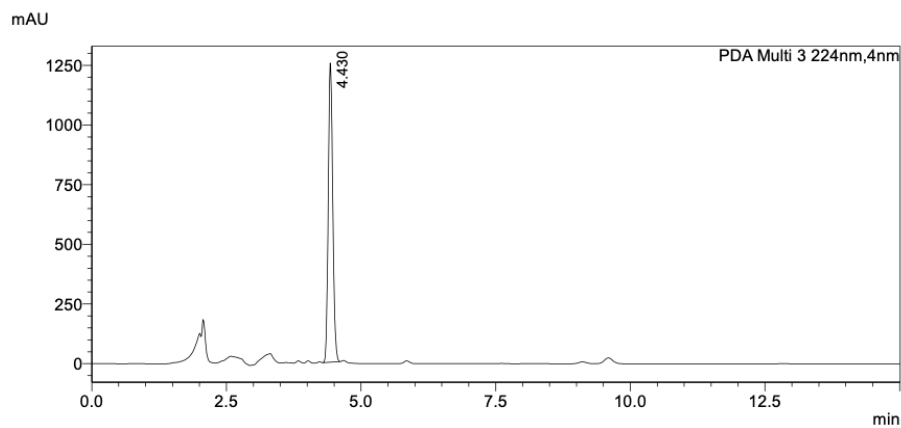
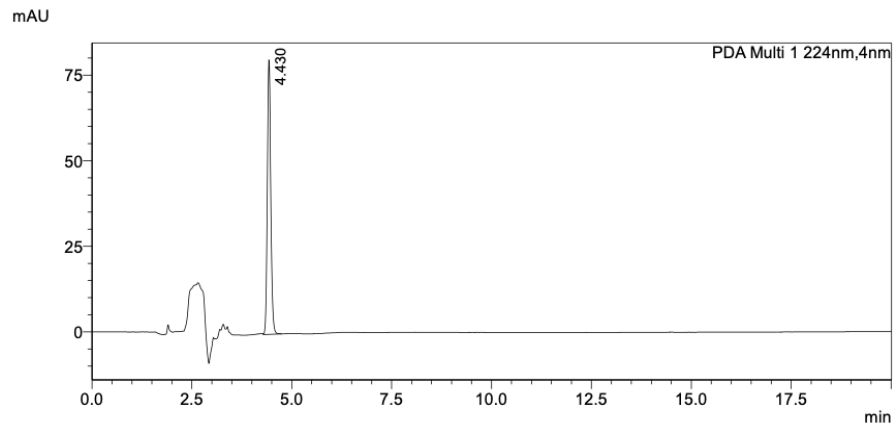
หลอดที่ 2 : นำสารละลายของผงฟ้าทะลายโจร ทดสอบด้วย method A พบว่าสารละลายเป็นสีแดง

หลอดที่ 3 : นำสารละลายของผงฟ้าทะลายโจร ทดสอบด้วย method B พบว่าเมื่อผ่านไป 10 นาที สารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอมส้ม

จากผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยวิธีข้างต้นแสดงให้เห็นว่าสารที่นำมาทดสอบทั้งสามชนิด ได้แก่ ผงฟ้าทะลายโจร Raw material, ผงฟ้าทะลายโจรในแคปซูลฟ้าทะลายโจรที่มีขายในท้องตลาด และ standard andrographolide เป็นผงฟ้าทะลายโจร

เมื่อใช้ HPLC เพื่อเปรียบเทียบ Retention time ระหว่าง standard andrographolide กับ sample solution ผลพบว่าทั้ง standard andrographolide และ sample solution ออกมา

ที่ retention time เดียวกัน คือ 4.430 min แสดงว่า sample solution มีสารที่เป็นองค์ประกอบเดียวกันกับ standard andrographolide

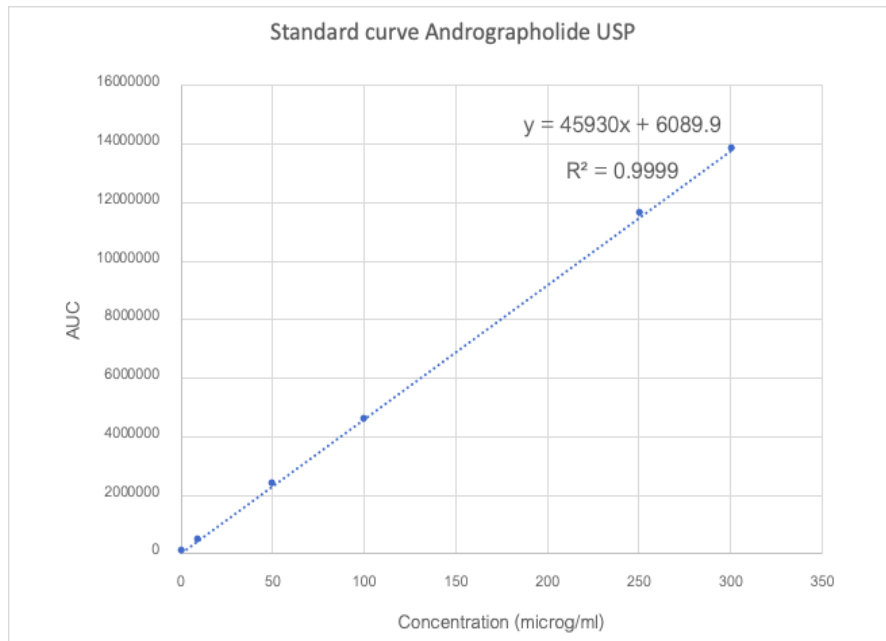


รูปภาพที่ 4.6 Retention time ของ Standard andrographolide เปรียบเทียบกับผงฟ้าทะลายโจรจากการวัดด้วย HPLC

3. การวิเคราะห์ปริมาณของ andrographolide ด้วยเทคนิค HPLC ในผงฟ้าทะลายโจร

หาปริมาณโดยการสร้าง standard curve จาก standard andrographolide โดยการวิเคราะห์ตัวอย่าง 50 ตัวอย่างด้วยเครื่อง HPLC ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ แล้วนำค่า AUC ของตัวอย่าง 50 ตัวอย่างที่ได้มาแทนค่าในสมการเส้นตรงที่ได้จาก standard andrographolide เพื่อหาความเข้มข้นที่แท้จริงของตัวอย่างทั้ง 50 ตัวอย่าง

โดย standard calibration curve ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC มีค่า R^2 เท่ากับ 0.9999



รูปภาพที่ 4.7 standard curve ของ standard andrographolide

4.การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค HPLC

4.1 ความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ (specificity)

พิจารณาจาก retention time ของ sample เทียบกับ standard พบว่าได้ค่า p two tail เท่ากับ 0.86 ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อถือ 99% (p-value มากกว่าหรือเท่ากับ 0.01)

ตารางที่ 1 แสดงค่า retention time ของ sample และ retention time ของ standard

retention time sample	retention time standard
4.427	4.413
4.428	4.425
4.423	4.429
4.419	4.433
4.425	4.428
4.421	4.424
4.429	4.436
4.430	4.426
4.427	4.406

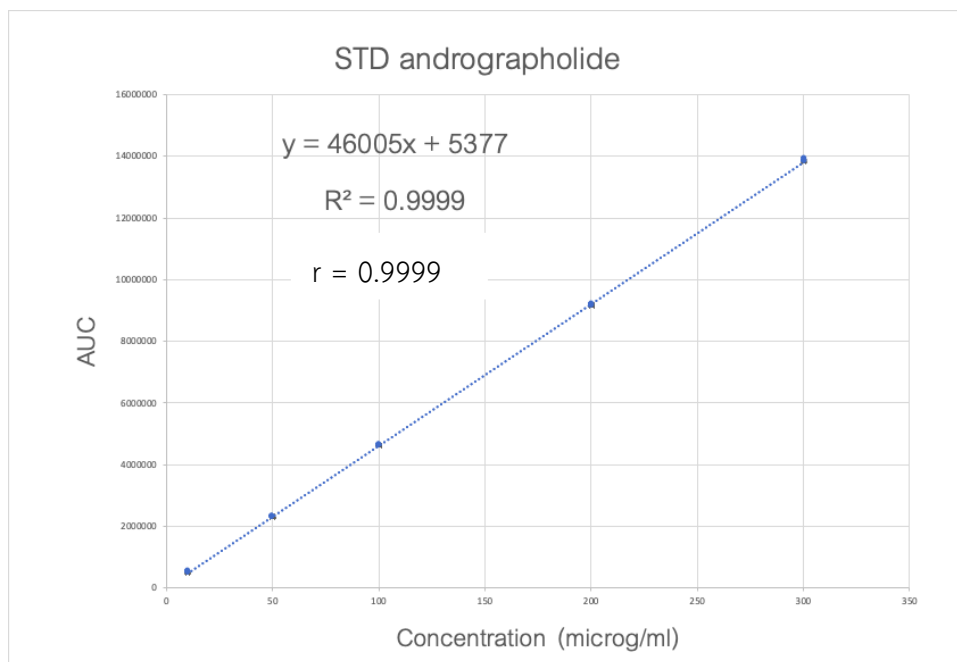
ตารางที่ 2 F-Test Two-Sample for Variances

	4.427	4.413
Mean	4.42525	4.425875
Variance	1.56429E-05	8.1E-05
Observations	8	8
Df	7	7
F	0.193164278	
P(F<=f) one-tail	0.022759832	
F Critical one-tail	0.264058226	

ตารางที่ 3 t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	4.427	4.413
Mean	4.42525	4.425875
Variance	1.56429E-05	8.1E-05
Observations	8	8
Hypothesized Mean Difference	0	
Df	10	
t Stat	-0.1798375	
P(T<=t) one-tail	0.430436028	
t Critical one-tail	1.812461123	
P(T<=t) two-tail	0.860872056	
t Critical two-tail	2.228138852	

4.2 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงและช่วงความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ (linearity and range)



รูปภาพที่ 4.8 standard curve ของ standard andrographolide

จากการวัด standard andrographolide ด้วย High Performance Liquid Chromatography โดยเป็นสร้าง standard curve โดยมีช่วงความเข้มข้นอยู่ที่ 10.02 ถึง 300.60 mcg/mL ได้สมการคือ $Y=46005x+5377$ มีค่า $R^2 = 0.9999$ และมีค่า $r = 0.9999$

4.3 การคำนวณหา accuracy และ precision ของ HPLC method

ตารางที่ 4 แสดงค่า accuracy และ precision ของ HPLC method

Andrographolide		Accuracy (%recovery $\pm$ SD)			
spike	concentrations	Intra-day			Inter-day (n=3)
		Day 1 (n=3)	Day 2 (n=3)	Day 3 (n=3)	
	4 mcg/ml	100.8 $\pm$ 0.4	97.2 $\pm$ 4.0	93.6 $\pm$ 0.2	97.2 $\pm$ 3.6
	28 mcg/ml	99.9 $\pm$ 1.2	94.8 $\pm$ 0.6	96.4 $\pm$ 2.8	96.8 $\pm$ 2.3
	52 mcg/ml	99.2 $\pm$ 0.9	97.5 $\pm$ 1.0	97.6 $\pm$ 1.1	98.1 $\pm$ 0.9
Precision %RSD		0.4	1.9	1.2	1.2

จากตารางแสดงการวัดปริมาณ andrographolide ความเข้มข้น 4 mcg/mL, 28 mcg/mL และ 52 mcg/mL ด้วย HPLC พบว่ามีความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ (accuracy) ซึ่งแสดงเป็นค่า %recovery inter-day มีค่า 97.2 ± 3.6 , 96.8 ± 2.3 และ 98.1 ± 0.9 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในช่วง 92-105% ตามข้อกำหนดของ AOAC guideline ปี 2019

พบว่าความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์ (precision) แสดงเป็นค่า %RSD คือ 0.4, 1.9 และ 1.2 ในวันที่ 1 ถึง 3 ตามลำดับ และค่าเฉลี่ย %RSD inter-day คือ 1.2 ซึ่งมีค่าน้อยกว่า 2 ตามที่กำหนดไว้

4.4 Limit of detection and limit of quantitation

การคำนวณหา limit of detection และ limit of quantitation ทำโดยการคำนวณจากสูตร

$$LOD = 3.3\sigma/s$$

เมื่อ σ คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของสัญญาณ

s คือ ความชันของกราฟมาตรฐาน

$$LOD = 3.3 (7326.95538)/46005 = 0.5256 \text{ mcg}$$

การคำนวณหาค่า limit of quantitation ทำโดยการคำนวณจากสูตร

$$LOQ = 10\sigma/s$$

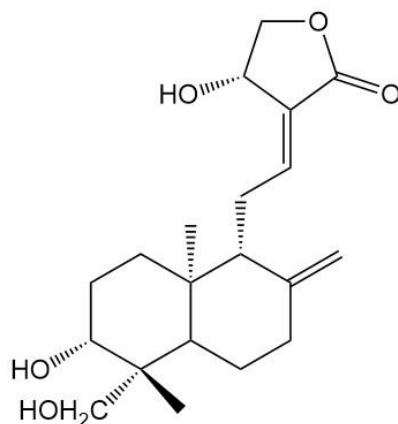
เมื่อ σ คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของสัญญาณ

s คือ ความชันของกราฟมาตรฐาน

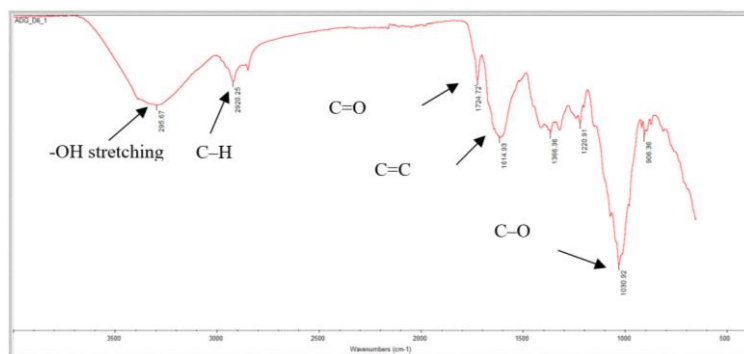
$$LOQ = 10 (7326.95538)/46005 = 1.5927 \text{ mcg}$$

limit of detection (LOD) หมายถึง ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัด andrographolide ได้ มีค่าเท่ากับ 0.5256 mcg และ limit of quantitation (LOQ) หมายถึง ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณ andrographolide ได้ มีค่าเท่ากับ 1.5926 mcg

5. การวิเคราะห์ผงฟ้าทะลายโจรโดยใช้เครื่อง Infrared spectroscopy



รูปภาพที่ 4.9 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ andrographolide



รูปภาพที่ 4.10 แสดง IR spectrum ที่ได้จากผงฟ้าทะลายโจร

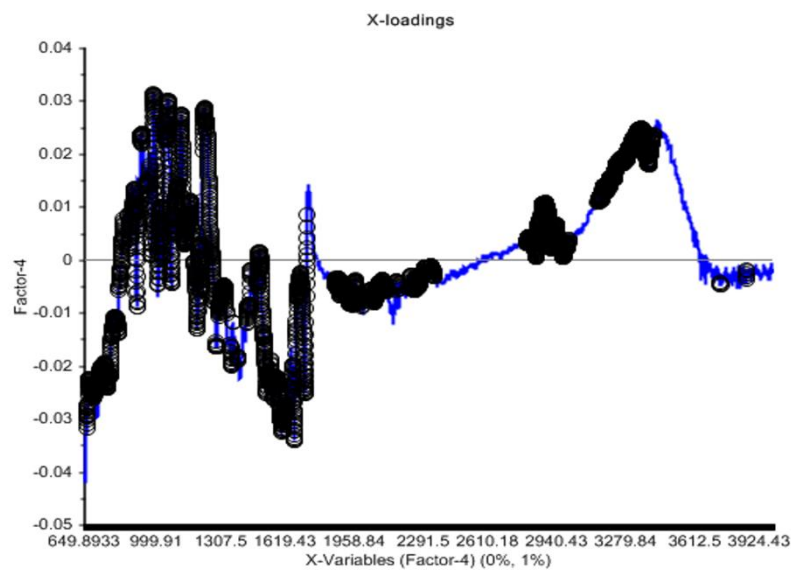
จาก IR spectrum ที่ wavenumber 1724 cm^{-1} แสดง C=O stretching และที่ 1030 cm^{-1} แสดง C-O stretching ซึ่งเป็นองค์ประกอบของ lactone ring ใน andrographolide นอกจากนี้บริเวณ wavenumber 3295 cm^{-1} แสดงให้เห็นลักษณะของ -OH stretching ในโครงสร้าง

6. การเลือก model

การสร้าง PLS-R model จากข้อมูล IR spectrum ทำโดยโปรแกรม Unscambler X โดยเมื่อนำข้อมูลมาลงในโปรแกรมจะทำการวิเคราะห์ PCA และทำการแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น calibration set จำนวน 30 sample และ validation set จำนวน 20 sample โดยใช้ Kennard-stone ในการจัดกลุ่ม จากนั้น calibration set วิเคราะห์ผลและสร้างเป็น PLSR model และนำ validation set ไปวิเคราะห์หาปริมาณ andrographolide จากโมเดลที่สร้างขึ้น และนำข้อมูลไป pretreatment ด้วยวิธี 1^{st} derivative, 2^{nd} derivative, smoothing, SNV, baseline correction และ normalize ผลที่ได้ดังแสดงในตาราง

ตารางที่ 5 แสดงค่าที่ได้จาก model แต่ละชนิดหลังจากการทำ pretreatment ด้วยวิธีการต่างๆ

Pretreatment	Range (cm ⁻¹)	factor	R ² model	R ² pearson	RMSEP	bias
Original	4000-525	3	0.9420	0.9367	3.5237	0.0497
1 st derivative	4000-525	3	0.9953	0.8448	13.6965	1.1420
2 nd derivative	4000-525	3	0.9961	NA	15.1932	-0.7684
Smoothing	4000-525	4	0.9622	0.9287	3.5588	0.0902
SNV	4000-525	6	0.9893	0.8991	5.3963	-0.7808
Normalize	4000-525	3	0.9467	0.9356	3.6599	-0.1090
Baseline correction	4000-525	4	0.9557	0.9449	3.5377	-0.1657
Baseline correction	661.4641-2354.176	3	0.9554	0.9964	3.7681	-0.4354
Baseline correction	661.4641-2354.176 2797.723-3005.515 3148.222-3417.243	3	0.9465	0.9491	3.8786	-0.4175
Baseline correction	661.4641-3417.243	3	0.9422	0.9598	3.7808	-0.3382
Baseline correction	4000-525 NOT E10, E6	3	0.9420	0.9398	4.0897	-0.0425
Baseline correction	4000-525 NOT E10_2	4	0.9568	0.9515	3.7665	-0.3261



รูปภาพที่ 4.11 แสดงช่วงของข้อมูลที่เป็นจุดสีดำจากการเลือกโดย Jackknife ที่มีการนำไปใช้ในการ pretreatment ด้วยวิธี baseline correction

จากการทำ pretreatment ด้วยวิธี 1st derivative, 2nd derivative, smoothing, SNV, baseline correction และ normalize เมื่อพิจารณาค่า R² pearson, R², RSEP, RMSEP, bias และ factor ของแต่ละโมเดลแล้วพบว่าโมเดลที่ดีที่สุดที่จะเลือกนำมาใช้คือการ pretreatment ด้วยวิธี baseline correction เนื่องจากโมเดลนี้ให้ค่า R² pearson ที่สูงที่สุด

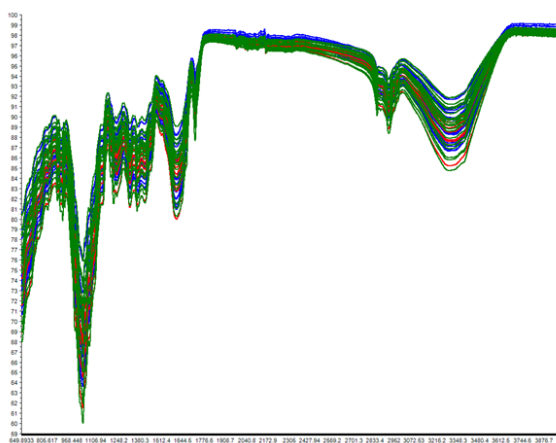
คือ 0.9449 และ R^2 model มากกว่า 0.9 รวมถึงยังมีค่า bias, RSEP, RMSEP ที่น้อย ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงเลือกใช้โมเดลที่ได้จากการ pretreatment ด้วยวิธี baseline correction

เมื่อผู้วิจัยเลือกวิธี baseline correction จึงนำโมเดลนี้มาหาวิธีการที่จะทำให้โมเดลสามารถทำนายค่าได้แม่นยำมากยิ่งขึ้นโดยการเลือกเฉพาะบางช่วงของ wavenumber มาสร้างโมเดลใหม่ โดยช่วงของ wavenumber ที่ทำการเลือกจะแสดงอยู่ในตารางที่ 5

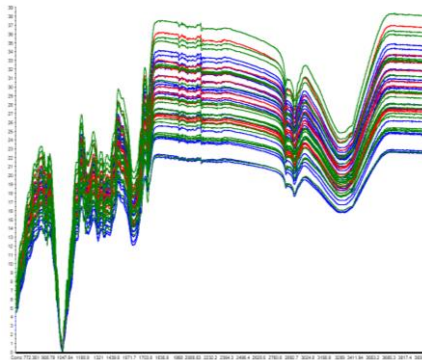
เมื่อพิจารณาค่า R^2 pearson, R^2 , RSEP, RMSEP, bias และ factor ของแต่ละโมเดลพบว่าโมเดลที่ได้จากการเลือกช่วง wavenumber ของ baseline correction model ดังแสดงในตารางที่ 4 ให้ค่า R^2 pearson สูงขึ้นมากกว่าการทำ baseline correction แบบไม่เลือกช่วง wavenumber แต่เนื่องจากข้อมูลที่ได้เกิดจากการจำกัดข้อมูล wavenumber เพียงบางช่วงเท่านั้นทำให้ไม่ครอบคลุมค่าทั้งหมด ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือก baseline correction model แบบไม่เลือกช่วง wavenumber

7. การวิเคราะห์ปริมาณสาร andrographolide โดยใช้เทคนิค FTIR ร่วมกับ chemometrics

7.1 ลักษณะสเปกตรัมของ andrographolide เมื่อวัดด้วยเครื่อง FTIR

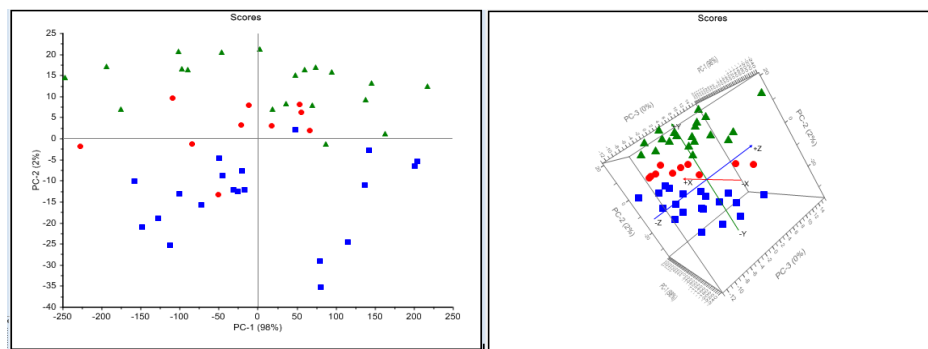


รูปภาพที่ 4.12 IR spectrum ของ andrographolide จากข้อมูล original โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่มตามความเข้มข้น ดังแสดงเป็นเส้นสีน้ำเงิน แดง และเขียว คือ 2.169-4.944, 4.944-7.720 และ 7.720-10.495 %w/w ตามลำดับ

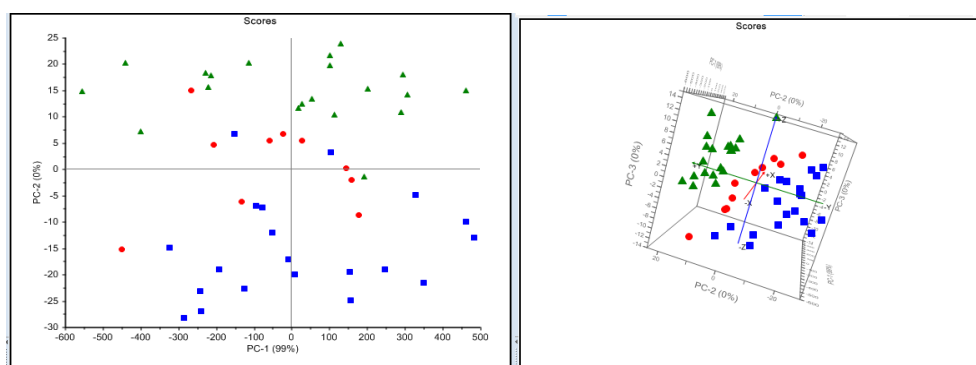


รูปภาพที่ 4.13 IR spectrum ของ andrographolide จาก baseline correction pretreatment โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่มตามความเข้มข้น ดังแสดงเป็นเส้นสีน้ำเงิน แดง และเขียว คือ 2.169 -4.944, 4.944-7.720 และ 7.720-10.495 %w/w ตามลำดับ

7.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบสำคัญด้วย Principle Component Analysis (PCA)



รูปภาพที่ 4.14 การจัดกลุ่มข้อมูล original จากการวิเคราะห์ PCA ในรูปแบบ 2 มิติ และ 3 มิติ ตามลำดับ

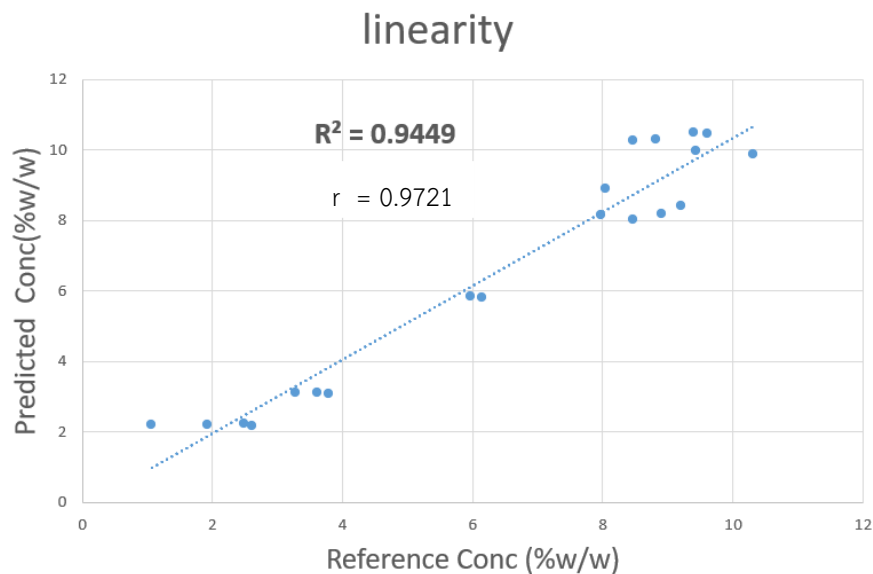


รูปภาพที่ 4.15 การจัดกลุ่มข้อมูลที่ pretreatment ด้วยวิธี baseline correction จากการวิเคราะห์ PCA ในรูปแบบ 2 มิติ และ 3 มิติ ตามลำดับ

8. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค FTIR ร่วมกับ chemometrics

8.1 ความสัมพันธ์อย่างเป็นเส้นตรง (linearity)

linearity จะพิจารณาจากค่า correlation coefficient (r) ของ validation set โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 0.9449 และมีค่า r เท่ากับ 0.9721 แสดงว่าค่าความเข้มข้นที่ predict ได้จาก PLSR model ของกลุ่มตัวอย่างกลุ่ม validation set กับค่าความเข้มข้นที่แท้จริงจากวิธีมาตรฐาน ซึ่งจะพิจารณาจากค่า correlation coefficient (r) ควรเข้าใกล้ 1.0 เพื่อบ่งบอกว่าวิธีพัฒนาขึ้นมีความเป็นเส้นตรงเมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน



รูปภาพที่ 4.16 แสดงค่า correlation ที่ได้จากการ pretreatment ด้วยวิธี baseline correction

ตารางที่ 6 แสดงค่าที่ใช้คำนวณหา linearity

Predicted	Reference
2.615768	2.169075
2.489175	2.240745
1.070307	2.213516
1.917723	2.209888
3.603598	3.100596
3.270412	3.109624
3.78735	3.096516
5.976295	5.851747
6.151753	5.829247
8.047758	8.89387
7.964489	8.139498
8.902031	8.175892
9.206451	8.415555
8.473055	8.020072
8.458178	10.27504
8.820818	10.28455
9.428759	9.963253
9.398397	10.4873
10.31384	9.860502
9.600073	10.47275

8.2 ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (accuracy)

คำนวณ linearity regression ระหว่างค่าความเข้มข้นที่ predict ได้กับกับค่าความเข้มข้นที่แท้จริงจากวิธีมาตรฐานจากตัวอย่างกลุ่ม validation set จำนวน 10 ตัวอย่าง โดยต้องมีค่าความเชื่อมั่น $\pm 95\%$ ของ slope คร่อม 1.0 บ่งบอกความถูกต้องของวิธีที่พัฒนาขึ้น เทียบได้กับวิธีมาตรฐาน

ตารางที่ 7 แสดงค่า % recovery

ลำดับที่	Reference	Prediction	% Recovery
1	2.2407	2.4892	111.0869
2	2.2099	1.9177	86.7792
3	3.1096	3.2704	105.1707
4	5.8517	5.9763	102.1284
5	5.8292	6.1518	105.5325
6	8.1395	7.9645	97.8499
7	8.0201	8.4731	105.6481
8	10.2750	9.3984	91.4682
9	10.2750	10.3138	100.3776
10	10.2750	9.6001	93.4310

ตารางที่ 8 ANOVA

การรายงานค่า accuracy = (Slope (± 95% CI)) = 0.9391 (0.8427-1.0356)

ANOVA						
	df	SS	MS	F	Significance F	
Regression	1	85.1217687	85.1217687	503.912455	1.6412E-08	
Residual	8	1.35137392	0.16892174			
Total	9	86.4731426				

	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%	Lower 95.0%
Intercept	0.3359932	0.30603359	1.0978965	0.30419187	-0.3697215	1.04170792	-0.369721515
X Variable 1	0.93913773	0.04183615	22.4479944	1.6412E-08	0.84266339	1.03561207	0.842663389

8.3 ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (precision)

พิจารณาจาก %RSD โดยจะนำค่า reference concentration และ prediction concentration ของ validation set ทั้งหมด 6 ค่า ของการวิเคราะห์ เพื่อนำมาคำนวณหา %recovery และคำนวณ %RSD ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงค่าที่นำมาใช้ในการคำนวณ % RSD

ลำดับที่	Reference	Prediction	%Recovery
1	3.1096	3.2704	105.1707
2	5.8518	5.9763	102.1284
3	5.8292	6.1518	105.5325
4	8.1759	8.9020	108.8815
5	8.4156	9.2065	109.3980
6	8.0201	8.4731	105.6481

พบว่า %RSD เท่ากับ 2.52 % จากนั้นคำนวณหาค่า HorRat โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{HorRat} = \text{RSDr (found, \%)} / \text{RSDr (calculated, \%)}$$

เมื่อคำนวณค่า HorRat แล้วพบว่าค่าอยู่ที่ 1.3 ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 0.5-2 ซึ่งเป็นช่วงที่ยอมรับได้ตามที่กำหนดใน AOAC guideline ปี 2019 ดังนั้นจึงถือว่าโมเดลนี้มีความแม่นยำ

8.4 Root mean squared error of prediction (RMSEP)

จากการวิเคราะห์หาปริมาณ andrographolide ด้วยวิธีการใช้ infrared spectroscopy ร่วมกับ chemometrics ด้วยวิธี baseline correction pretreatment ที่มี Latent Factor = 4 คำนวณได้ค่า RMSEP จากสูตรได้ค่าเท่ากับ 3.54 %

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum (\hat{y}_i - y_{i,\text{ref}})^2}$$

เมื่อ N = จำนวนตัวอย่างของ validation set

$\hat{y}_i$ = ปริมาณ Andrographolide ที่ได้จากโมเดล

$y_{i,\text{ref}}$ = ปริมาณ Andrographolide จากวิธี reference

ตารางที่ 10 แสดงข้อมูลที่น่ามาใช้คำนวณ RMSEP

ลำดับที่	Reference	Prediction
1	2.1692	2.6158
2	2.2407	2.4892
3	2.2135	1.0703
4	2.2099	1.9177
5	3.1006	3.6036
6	3.1096	3.2704
7	3.0965	3.7874
8	5.8517	5.9763
9	5.8292	6.1518
10	8.8939	8.0478
11	8.1395	7.9645
12	8.1759	8.9020
13	8.4156	9.2065
14	8.0201	8.4731
15	10.2750	8.4582
16	10.2846	8.8208
17	9.9633	9.4288
18	10.4873	9.3984
19	9.8605	10.3138
20	10.4728	9.6001

จากการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณ andrographolide ในผงฟ้าทะลายโจร ด้วยวิธีการใช้ FTIR ร่วมกับ chemometrics ชนิด PLSR เปรียบเทียบกับวิธีการมาตรฐาน คือ HPLC โดยการนำข้อมูลจาก IR spectrum มาสร้าง PLS-R model โดยใช้โปรแกรม Unscambler X เมื่อนำข้อมูลมาลงในโปรแกรมจะทำการวิเคราะห์ PCA และทำการแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น calibration set จำนวน 30 sample และ validation set จำนวน 20 sample โดยใช้ Kennard-stone ในการจัดกลุ่ม จากนั้นนำ calibration set มาวิเคราะห์ผล และสร้างเป็น PLSR model และนำ validation set ไปวิเคราะห์หาปริมาณ andrographolide จากโมเดลที่สร้างขึ้น และนำข้อมูลไป pretreatment ด้วยวิธี 1st derivative, 2nd derivative, smoothing, SNV, baseline correction และ normalize พบว่าโมเดลที่ดีที่สุดคือโมเดลที่ได้จากการ pretreatment ด้วยวิธี baseline correction และจากการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่ได้พบว่า ความสัมพันธ์อย่างเป็นเส้นตรง มีค่า R^2 เท่ากับ 0.9449 และ r เท่ากับ 0.9721 ซึ่งแสดงว่าค่าความเข้มข้นที่ predict ได้จากโมเดลที่สร้างขึ้น มีความสัมพันธ์

เป็นเส้นตรงกับค่าความเข้มข้น reference จากเทคนิค HPLC, ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ คำนวณ linearity regression ระหว่างค่าความเข้มข้นที่ predict ได้กับค่าความเข้มข้นที่ แท้จริงจากวิธีมาตรฐานโดยต้องมีค่าความเชื่อมั่น $\pm 95\%$ ของ slope คร่อม 1.0 พบว่าค่า accuracy คือ (Slope ($\pm 95\%$ CI)) เท่ากับ 0.9391 (0.8427-1.0356) แสดงให้เห็นว่าทั้งสอง ค่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าโมเดลมีความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ เมื่อเทียบกับวิธี HPLC, ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ มี %RSD เท่ากับ 2.52 % และมีค่า HorRat 1.3 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ AOAC guideline กำหนด ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่าโมเดลมีความ แม่นยำ และค่า RMSEP ของโมเดลมีค่า 3.54% จะเห็นได้ว่าโมเดลมีข้อผิดพลาดต่ำ ดังนั้นจึง สรุปได้ว่าโมเดลที่พัฒนาขึ้นมานั้นมีความถูกต้อง แม่นยำ และสามารถนำไปใช้ได้จริง

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

ผลการวิจัยการพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสาร andrographolide ในผงฟ้าทะลายโจรด้วยเทคนิค FTIR ควบคู่กับการใช้ chemometric ชนิด PLSR ในการวิเคราะห์ โดยวิธีการที่พัฒนาขึ้นได้มีการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ซึ่งประกอบด้วย ความสัมพันธ์อย่างเป็นเส้นตรง (linearity), ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (accuracy), ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (precision) และ root mean squared error of prediction (RMSEP)

การตรวจสอบเอกลักษณ์ของผงฟ้าทะลายโจร (Identification)

ผลการตรวจสอบเอกลักษณ์ของผงฟ้าทะลายโจร raw material เมื่อทดสอบด้วย method A สารละลายเปลี่ยนเป็นสีม่วงแดง และทดสอบด้วย method B สารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้มเมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ที่ Thai Herbal Pharmacopoeia 2017 กำหนดผลการตรวจสอบเอกลักษณ์ของผงฟ้าทะลายโจรในแคปซูลฟ้าทะลายโจรที่มีขายในท้องตลาด เมื่อทดสอบด้วย method A สารละลายเปลี่ยนเป็นสีม่วงแดง และทดสอบด้วย method B สารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้มเมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ที่ Thai Herbal Pharmacopoeia 2017 กำหนด

ผลการตรวจสอบเอกลักษณ์ของ standard andrographolide เมื่อทดสอบด้วย method A สารละลายเปลี่ยนเป็นสีแดง และทดสอบด้วย method B สารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอมส้มเมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ที่ Thai Herbal Pharmacopoeia 2017 กำหนด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารทั้งสามชนิดที่นำมาทดสอบซึ่งได้แก่ ผงฟ้าทะลายโจร raw material, ผงฟ้าทะลายโจรในแคปซูลฟ้าทะลายโจรที่มีขายในท้องตลาด และ standard andrographolide นั้นเป็นผงฟ้าทะลายโจรจริง ๆ

เมื่อเปรียบเทียบค่า retention time จากการวัดด้วยเครื่อง HPLC พบว่า standard andrographolide มีค่าอยู่ที่ 4.430 min และผงฟ้าทะลายโจร raw material มีค่าอยู่ที่ 4.430 min เท่ากัน แสดงให้เห็นว่าในผงฟ้าทะลายโจร raw material ที่นำมานั้นมี andrographolide เป็นองค์ประกอบ

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ HPLC

ความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ (specificity) ผลของค่า p two tail เท่ากับ 0.86 ซึ่งมีค่ามากกว่า 0.01 ที่ค่าความเชื่อมั่น 99% แสดงให้เห็นว่าค่า retention time ของ standard andrographolide และ sample ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงและช่วงความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ (linearity and range) ควร มีค่าเข้าใกล้ 1 (21) โดยค่า r ของ standard andrographolide ที่มีช่วงความเข้มข้นอยู่ที่ 10.02-300.60 mcg/ml เท่ากับ 0.9999

ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (accuracy) ช่วง %recovery ที่ยอมรับได้อยู่ที่ 92-105% (21) ซึ่งจากการวัดปริมาณ andrographolide ที่ความเข้มข้น 4 mcg/ml, 28 mcg/ml และ 52 mcg/ml ได้ค่า %recovery inter-day 97.2 ± 3.6 , 96.8 ± 2.3 และ 98.1 ± 0.9 ตามลำดับ ซึ่งผ่านเกณฑ์มาตรฐานทั้งหมด

ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (precision) ช่วง %RSD ที่ยอมรับได้คือน้อยกว่า 2% (21) โดยค่า %RSD intra-day ของวันที่ 1, วันที่ 2 และวันที่ 3 คือ 0.4, 1.9, และ 1.2 ตามลำดับ และ %RSD inter-day มีค่าเท่ากับ 1.2 ซึ่งทั้งสามค่าผ่านเกณฑ์มาตรฐานทั้งหมด

ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบได้ (limit of detection) คือ 0.5256 mcg/ml ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวัดในเชิงปริมาณได้ (limit of quantitation) คือ 1.5926 mcg/ml

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ โดยใช้เทคนิค chemometric ร่วมกับ FTIR

ความสัมพันธ์อย่างเป็นเส้นตรง (linearity) มีค่า correlation coefficient ของโมเดล เท่ากับ 0.9678 ซึ่งมีค่ามากกว่า 0.9 จึงแสดงให้เห็นว่าโมเดลมี linearity

ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (accuracy) คำนวณ linearity regression ระหว่างค่าความเข้มข้นที่ predict ได้กับกับค่าความเข้มข้นที่แท้จริงจากวิธีมาตรฐานโดยต้องมีค่าความเชื่อมั่น $\pm 95\%$ ของ slope คร่อม 1.0 พบว่าค่า accuracy คือ (Slope ($\pm 95\%$ CI)) เท่ากับ 0.9391 (0.8427-1.0356) แสดงให้เห็นว่าทั้งสองค่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าโมเดลมีความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์เมื่อเทียบกับวิธี HPLC

ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (precision) ช่วง %RSD ที่ยอมรับได้คือน้อยกว่า 2% (21) โดยผลที่ได้มีค่า %RSD อยู่ที่ 2.52% ซึ่งมากกว่า 2% ดังนั้นจึงมีการหาค่า HorRat และได้ค่าคือ 1.3 ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 0.5-2 ตามที่เกณฑ์ของ AOAC guideline ปี 2019 กำหนด ดังนั้นโมเดลนี้ จึงมีความแม่นยำในการทำนาย

Root mean square error of prediction (RMSEP) ค่า RMSEP ที่คำนวณได้จากสูตร มีค่าเท่ากับ 3.54 %

ข้อเสนอแนะ

จากการทดลองพบว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีความสามารถในการหาปริมาณสาร andrographolide ในผงฟ้าทะลายโจรได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ผ่านทุกหัวข้อ

แต่ด้วยด้วยวิธีการวิเคราะห์นี้เป็นการนำข้อมูลมา pretreatment ด้วยวิธีการต่างๆเช่น 1st derivative, 2nd derivative, smoothing, SNV, normalize และ baseline correction เพียงขั้นตอนเดียวเท่านั้น ดังนั้นเพื่อพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ให้ดียิ่งขึ้นไปจึงควรนำค่าที่ได้จากวิธีการที่ดีที่สุดไป pretreatment ซ้ำด้วยวิธีการต่าง ๆ ดังที่ได้กล่าวไปอีกครั้ง เพื่อหาโมเดลในการทำนายที่ดียิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. พระราชกิจจานุเบกษา เรื่อง บัญชียาหลักแห่งชาติด้านสมุนไพร(ฉบับที่2) พ.ศ.2564, ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 138, ตอนพิเศษ 120 ง (ลงวันที่ 4 มิถุนายน 2564).
2. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปกร. ข้อมูลพืชสมุนไพร ฟ้าทะลายโจร [ออนไลน์]. 2553 [เข้าถึงเมื่อ 30 ตุลาคม 2564]; Available from:
URL:http://pharmacy.su.ac.th/herbmed/herb/text/herb_detail.php?herbID=164.
3. Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. Thai Herbal Pharmacopoeia 2017. Bangkok: The Agricultural Co-operative Federation of Thailand., Ltd; 2017. FA THALAI; p.108. (in Thai)
4. Conzen J-P. Multivariate Calibration A practical guide for developing methods in the quantitative analytical chemistry [Online]. 2006 [cited 2020 Oct 29]; Available from: URL:<https://nirsresearch.com>.
5. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. ฐานข้อมูลเครื่องยาสมุนไพร ฟ้าทะลายโจร [ออนไลน์]. 2553 [เข้าถึงเมื่อ 30 ตุลาคม 2564]; Available from:
URL:<http://www.thaicrudedrug.com>.
6. พระราชกิจจานุเบกษา เรื่องบัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ.2563. ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 137, ตอนพิเศษ 254 ง (ลงวันที่ 29 ตุลาคม 2563).
7. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธีเคโมเมทริกซ์ (Chemometrics) [ออนไลน์]. 2562 [เข้าถึงเมื่อ 30 ตุลาคม 2564]; Available from:
URL:https://www.agri.cmu.ac.th/2017/webs/info_detail/20829.
8. Rohman A, Dwi L-R, Sugeng R. FTIR Spectroscopy Combined with Partial Least Square for Analysis of Red Fruit Oil in Ternary Mixture System [Internet]. 2014 [cited 2021 October 6]; Available from: <https://www.hindawi.com/journals/ijss/2014/785914/>.
9. Irene G, José M-A, Teresa C, Nelson M, Ana I-B. Discrimination and characterisation of extra virgin olive oils from three cultivars in different maturation stages using Fourier transform infrared spectroscopy in tandem with chemometrics [Internet]. 2015 [cited 4 October 2021]; Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030881461401766X>.
10. Mahsa M, Mohammadreza K-K, Ali V, Hossein G, Hamid V, Alireza B, et al. Rapid determination and classification of crude oils by ATR-FTIR spectroscopy and chemometric methods [Internet]. 2020 [cited 4 October 2014]; Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1386142520301359>.

11. AOAC International. AOAC guideline 2019 Appendix K: Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals 2019[online]; 2019 [cited 2022 Feb 20]. Available from: URL:https://www.eoma.aoac.org/app_k.pdf.
12. Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. Thai Herbal Pharmacopoeia 2017. Bangkok: The Agricultural Co-operative Federation of Thailand., Ltd; 2017. FA THALAI; p.108. (in Thai)
13. บทที่ 3 อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี [อินเทอร์เน็ต]. 2560 [เข้าถึงเมื่อ 29 ตุลาคม 2564]; Available from: file:///Users/apple/Downloads/116897-Article%20Text-301327-1-10-20180327.pdf.
14. Convention USP. The United States Pharmacopoeia and National Formulary. USP 39-NF 34, 2016. 6459-61 p.
15. จิราพร จรอนันต์, พัชรี เจียรนัยกุล, พัชรารณ ทิพย์วัฒน์. การประยุกต์ใช้เทคนิค FTIR ทางชีวการแพทย์. Thammasat Medical Journal. 2017;17(4):641-50.
16. ธรโชติ ธรรมชาติ. ฟ้ายะลายโจร [อินเทอร์เน็ต]. 2562 [เข้าถึงเมื่อ 30 ตุลาคม 2564]; Available from: <http://eto.ku.ac.th>
17. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. ฟ้ายะลายโจรสามารถนำมาใช้ในสถานการณ์ COVID-19 ระบาดได้จริงหรือ [อินเทอร์เน็ต]. ม.ป.ป. [เข้าถึงเมื่อ 29 ตุลาคม 2564]; Available from: <https://pharmacy.mahidol.ac.th/knowledge/files/0484.pdf>.
18. นพมาศ อัครจันทร์โชติ, กิตาการ สายธนู. การใช้การถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วนในกรณีการละเมิดข้อสมมุติของตัวแบบถดถอย [อินเทอร์เน็ต]. 2560 [เข้าถึงเมื่อ 29 ตุลาคม 2564]; Available from: <http://scijournal.hcu.ac.th>
19. วรางคณา อนุชิตไธพาร. FT-IR Imaging [อินเทอร์เน็ต]. 2546 [เข้าถึงเมื่อ 29 ตุลาคม 2564]; Available from: https://www2.mtec.or.th/th/e-magazine/admin/upload/212_67-70.pdf
20. ศูนย์รวมเครื่องมือ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. คู่มือการใช้เครื่องมือ Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FT-IR) [ออนไลน์]. 2564 [เข้าถึงเมื่อ 27 ตุลาคม 2564]; Available from: <http://cste.sut.ac.th/articles/?p=294>.
21. สถาบันมะเร็งแห่งชาติ. ฟ้ายะลายโจร สถาบันมะเร็งแห่งชาติ [ออนไลน์]. ม.ป.ป. [เข้าถึงเมื่อ 27 ตุลาคม 2564]; Available from: URL:https://www.nci.go.th/en/research/researchdivision/research_informationfarthalai.html.
22. สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน(องค์การมหาชน) กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. FTIR Micro-Spectrometer [ออนไลน์]. ม.ป.ป.[เข้าถึงเมื่อ 27 ตุลาคม 2564]; Available from: URL:<https://www.slri.or.th/bdd/th>.

ภาคผนวก

แบบฟอร์มรายงานการเงิน

รายงานสรุปการเงิน

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2564 มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ

การประยุกต์ใช้เทคนิค FTIR ร่วมกับ เคโมเมตริกซ์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณแอนโดกราฟโฟไลด์ในผงฟ้าทะลายโจร

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ญ.อ.ดร.พุทธิพร คงแก้ว

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 25 กรกฎาคม พ.ศ.2564 ถึงวันที่ 30 มีนาคม พ.ศ.2565

ระยะเวลาดำเนินการ 8 เดือน 5 วัน ตั้งแต่วันที่ 25 กรกฎาคม พ.ศ.2564

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ (100%) 15,000 บาท เมื่อวันที่ 21 มกราคม พ.ศ.2564

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
ค่าสารเคมี 1.Methanol HPLC grade 2.Acetonitrile HPLC grade 3.Acetone HPLC grade 4.Aluminium foil	9,000	9,000	0
ค่าจัดทำรูปเล่มรายงาน	1,000	1,000	0
ค่าวัสดุอุปกรณ์อื่นๆ	1,500	1,500	0
ค่าโปสเตอร์	500	500	0
ค่าเดินทาง	3,000	3,000	0
รวม	15,000	15,000	0

(.....)

ญ.อ.ดร.พุทธิพร คงแก้ว

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานวิจัย

Plagiarism Checking Report

Created on Apr 23, 2022 at 01:14 AM

[Print Report](#)[View Full Document](#)

Submission Information

ID	SUBMISSION DATE	SUBMITTED BY	ORGANIZATION	FILENAME	STATUS	SIMILARITY INDEX
2520337	Apr 23, 2022 at 01:14 AM	60210174@go.buu.ac.th	มหาวิทยาลัยบูรพา	Andrographolide_FTIRchemometrics_23:04:64.pdf	Completed	0.87 %