



การทำอพติไมเซชันปัจจัยด้านสูตรตำรับที่มีผลต่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจาก
สารสกัดฟ้าทะลายโจรโดยออกแบบการทดลองแบบเซ็นทรัลคอมโพสิต

THE OPTIMIZATION OF FORMULATION FACTORS AFFECTING THE DEVELOPMENT
OF SOLID DISPERSION FROM *Andrographis paniculata* EXTRACT USING CENTRAL
COMPOSITE DESIGN

ชณิชา นนทศิริญาณกุล

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2565

การทำอพติไมเซชันปัจจัยด้านสูตรตำรับที่มีผลต่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจาก
สารสกัดฟ้าทะลายโจรโดยออกแบบการทดลองแบบแฟกเตอร์ลคอมโพสิต



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2565
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

THE OPTIMIZATION OF FORMULATION FACTORS AFFECTING THE DEVELOPMENT
OF SOLID DISPERSION FROM *Andrographis paniculata* EXTRACT USING CENTRAL
COMPOSITE DESIGN



CHANICHA NONTASIRICHAYAKUL

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of MASTER OF SCIENCE
(Pharmaceutical Product Development)
Faculty of Pharmacy, Srinakharinwirot University

2022

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การทำออปติไมเซชันปัจจัยด้านสูตรตำรับที่มีผลต่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจาก
สารสกัดฟ้าทะลายโจรโดยออกแบบการทดลองแบบเซ็นทรัลคอมโพสิต

ของ

ชณิชา นนทศิริชญากุล

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร.ชุติมา วีรนิชพงศ์) (รองศาสตราจารย์ ดร.ชุตา จิตตสุโก)

..... ที่ปรึกษาร่วม กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วรพรรณ สิทธิถาวร) (รองศาสตราจารย์ ดร.วีระศักดิ์ สามี)

..... ที่ปรึกษาร่วม
(อาจารย์ ดร.ดวงรัตน์ ชูวิสิษฐกุล)

ชื่อเรื่อง	การทำออปติไมเซชันปัจจัยด้านสูตรตำรับที่มีผลต่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจากสารสกัดฟ้าทะลายโจรโดยออกแบบการทดลองแบบเซ็นทรัลคอมโพสิต
ผู้วิจัย	ชณิชา นนทศิริชญากุล
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2565
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. ชูติมา วีรนิชพงศ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. วรพรรณ สิทธิถาวร
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ ดร. ดวงรัตน์ ชูวิสิฐกุล

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาค่าที่เหมาะสมของปัจจัยด้านสูตรตำรับ ได้แก่ ร้อยละของเอทานอล (6.5-30%v/v) ร้อยละของแอนโดรกราโฟไลด์จากสารสกัดฟ้าทะลายโจร (0.25-0.5%v/v) และร้อยละของ poloxamer 188 (0.1-0.25%v/v) ที่มีผลต่อระยะเวลาที่ปลดปล่อยแอนโดรกราโฟไลด์ออกจากผลิตภัณฑ์ร้อยละ 95 ระยะเวลาที่ความเข้มข้นของแอนโดรกราโฟไลด์ที่ปลดปล่อยไม่น้อยกว่า MIC ความหนืดและความสามารถในการเปียกของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจากสารสกัดฟ้าทะลายโจรในโคโคซาน โดยออกแบบการทดลองด้วยวิธี central composite design (CCD) ผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจากสารสกัดฟ้าทะลายโจรในโคโคซานเตรียมด้วยกระบวนการพ่นให้แห้ง คัดเลือกสูตรตำรับที่เหมาะสมจากสูตรที่มีค่า desirability ใกล้เคียง 1 โดยใช้ปริมาณเอทานอลน้อยที่สุด และสามารถปลดปล่อยแอนโดรกราโฟไลด์ที่มีความเข้มข้นสูงกว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต (MIC) ของเชื้อรา ผลการศึกษาพบว่า ร้อยละของเอทานอลและแอนโดรกราโฟไลด์เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อระยะเวลาการปลดปล่อยแอนโดรกราโฟไลด์จนมีความเข้มข้นไม่น้อยกว่า MIC ของเชื้อราอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ ระดับความเชื่อมั่น 95% สูตรตำรับที่เหมาะสมที่สุดประกอบด้วยเอทานอล ร้อยละ 6.57 แอนโดรกราโฟไลด์ ร้อยละ 0.25 และ poloxamer 188 ร้อยละ 0.25 ทดสอบความคงสภาพของผลิตภัณฑ์ที่เก็บไว้ ณ อุณหภูมิ 5, 25, และ 30 °C เป็นเวลา 0, 3, และ 6 เดือน พบว่า ระยะเวลาเก็บรักษาที่นานขึ้นมีผลต่อปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ที่ลดลง และปริมาณน้ำในผลิตภัณฑ์ที่สูงขึ้น ส่งผลให้อนุภาคเกาะกลุ่มมากขึ้น ขนาดอนุภาคใหญ่ขึ้น ระยะเวลาในการผสมนานขึ้น ผลิตภัณฑ์ภายหลังผสมน้ำเปลี่ยนพฤติกรรมการไหลจากพลาสติกเทียมนเป็นพลาสติก ในขณะที่อุณหภูมิการเก็บรักษาที่สูงขึ้นทำให้แอนโดรกราโฟไลด์ในผลิตภัณฑ์มีความเป็นผลึกมากขึ้น ส่งผลให้อัตราการปลดปล่อยแอนโดรกราโฟไลด์ลดลง ผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจากสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่เก็บ ณ อุณหภูมิ 5 °C สามารถรักษาความคงสภาพได้นาน 3 เดือน โดยไม่เปลี่ยนแปลงความคงสภาพทางกายภาพ เคมี และชีวภาพ

คำสำคัญ : ฟ้าทะลายโจร, แอนโดรกราโฟไลด์, เซ็นทรัลคอมโพสิต, ของแข็งกระจายตัว, ความคงสภาพ

Title	THE OPTIMIZATION OF FORMULATION FACTORS AFFECTING THE DEVELOPMENT OF SOLID DISPERSION FROM <i>Andrographis paniculata</i> EXTRACT USING CENTRAL COMPOSITE DESIGN
Author	CHANICHA NONTASIRICHAYAKUL
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2022
Thesis Advisor	Associate Professor Dr. Chutima Wiranidchamong
Co Advisor	Associate Professor Dr. Worapan Sitthithaworn
Co Advisor	Dr. Duangratana Shuwisitkul

This study aims to optimize of following formulation factors: %ethanol (6.5-30%v/v), %AP from concentrated AP extract (0.25-0.5%v/v), and %poloxamer 188 (0.1-0.25%v/v) affected time to reach 95% AP release, time to reach above MIC, viscosity, mixing time of solid dispersion from *Andrographis paniculata* extract in chitosan using central composite design (CCD). Solid dispersion from *Andrographis paniculata* extract in chitosan was spray dried. The optimal formulation was selected by desirability value of almost 1.0 to release AP concentration above MIC of antifungal at the lowest level of ethanol. The result of CCD found that %ethanol and %AP from concentrated AP extract had a significant influence on time to reach above MIC of antifungal at 95% confidence interval. The optimum formulation composed of %ethanol of 6.57, %AP in concentrated AP extract of 0.25, and %poloxamer 188 of 0.25. Stability of product was studied at 5, 25, 30 °C for 0, 3, 6 months. The result of stability showed that the more storage time affects less assay and more loss on drying of product. The moisture in products induced drug agglomeration, which increased particle size, mixing time, and change rheology behavior of product from pseudoplastic to plastic flow. Moreover, the more storage temperature results in more crystallinity and less AP release. The optimal formulation of *Andrographis paniculata* extract solid dispersion could be stored as long as three months at 5 °C without any change in physical chemical and biological stability.

Keyword : *Andrographis paniculata*, Andrographolide, Solid dispersion, Stability, Central composite design

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ตามเป้าหมายจากความช่วยเหลือของรองศาสตราจารย์ ดร. ชูติมา วีรนิชพงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก รองศาสตราจารย์ ดร.วรพรรณ สิทธิถาวรและอาจารย์ ดร. ดวงรัตน์ ชูวิสิษฐกุล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ซึ่งอาจารย์ทุกท่านได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำในการวางแผนการทดลอง คำแนะนำการใช้เครื่องมือในการทดลอง และการวิเคราะห์แก้ไขปัญหาจากการทดลองที่ถูกต้องในทุกขั้นตอน ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณในความช่วยเหลือทุกอย่างเป็นอย่างสูง อีกทั้งขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ทุกท่านที่ให้ข้อเสนอแนะ แนวทางการแก้ไขงานวิจัยจนทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงด้วยดี นอกจากนี้ขอขอบพระคุณคุณสมชาย หลวงสนาม และเจ้าหน้าที่ในกองปฏิบัติการคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการจัดหาวัสดุ อุปกรณ์ สารเคมีและความช่วยเหลือในการทำปฏิบัติการ รวมทั้งอำนวยความสะดวกในการใช้งานห้องปฏิบัติการ สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณบริษัท ไบโอเมด จำกัด ที่ให้การสนับสนุนบรรจุภัณฑ์ สำหรับบรรจุตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองโดยไม่มีค่าใช้จ่ายและขอขอบคุณสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตรที่ให้การสนับสนุนโครงการวิจัยนี้ตลอดทั้งโครงการ

ชณิชา นนทศิริชญากุล

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง.....	ณ
สารบัญรูปภาพ	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
ความมุ่งหมายของงานวิจัย	3
ความสำคัญของงานวิจัย.....	3
ขอบเขตของการวิจัย.....	4
ตัวแปรที่ศึกษา	4
กรอบแนวคิดการวิจัย.....	6
สมมติฐานในการวิจัย	7
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	7
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	8
1. ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ของฟ้าทะลายโจร	8
2.ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดฟ้าทะลายโจร ⁽⁵⁾	14
3. ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราของสารสกัดฟ้าทะลายโจร.....	14
4. ผลึกภัณฑ์ของแข็งกระจายตัว (solid dispersion)	15
5. การพัฒนาผลึกภัณฑ์จากสารสกัดฟ้าทะลายโจรในรูปผงแห้ง	20

6. กระบวนการพ่นให้แห้ง.....	21
7. การออกแบบการทดลอง (Design of Experiment; DOE) ⁽²⁶⁾	21
8. การประยุกต์การออกแบบการทดลองกับการพัฒนาผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัว.....	24
9. ความคงสภาพของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจากสารสกัดฟ้าทะลายโจร	24
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	28
อุปกรณ์ เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	28
สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	29
วิธีดำเนินการวิจัย	30
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย	41
1. การวิเคราะห์ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในสารสกัดฟ้าทะลายโจรด้วยวิธี high performance thin layer chromatography (HPTLC)	41
2. การหาสูตรตำรับที่เหมาะสม สำหรับผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจากสารสกัดฟ้าทะลายโจรโดยออกแบบการทดลองด้วยวิธี central composite design (CCD) แบบ face centered	42
3. การศึกษาความคงสภาพของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจากสารสกัดฟ้าทะลายโจร..	64
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย	83
บรรณานุกรม	86
ประวัติผู้เขียน.....	92

สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 สารสำคัญในฟ้าทะลายโจรที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ⁽¹⁾	9
ตาราง 2 stability protocol	26
ตาราง 3 สูตรตำรับในการเตรียมผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจากสารสกัดฟ้าทะลายโจร จากการ ออกแบบการทดลองด้วย CCD	32
ตาราง 4 ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในสารสกัดฟ้าทะลายโจร	42
ตาราง 5 ผลการทดลองของสูตรตำรับที่มาจากการออกแบบการทดลองด้วยวิธี CCD	43
ตาราง 6 ผลของระยะเวลาที่ผลิตภัณฑ์ปลดปล่อยแอนโดรกราโฟไลด์ร้อยละ 95 ที่ได้จากการ ทดลองและการทำนาย.....	45
ตาราง 7 ค่าทางสถิติ ANOVA ของสมการถดถอยที่แสดงอิทธิพลของตัวแปรต้นต่อระยะเวลาที่ ผลิตภัณฑ์ปลดปล่อยแอนโดรกราโฟไลด์ร้อยละ 95.....	48
ตาราง 8 ผลของระยะเวลาที่ความเข้มข้นของแอนโดรกราโฟไลด์ที่ปลดปล่อยไม่น้อยกว่า MIC ที่ ได้จากการทดลองและการทำนาย	50
ตาราง 9 ค่าทางสถิติ ANOVA ของสมการถดถอยที่แสดงอิทธิพลของตัวแปรต้นต่อระยะเวลาที่ ความเข้มข้นของแอนโดรกราโฟไลด์ที่ปลดปล่อยไม่น้อยกว่า MIC	53
ตาราง 10 ผลของความหนืดของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทดลองและการทำนาย.....	55
ตาราง 11 ค่าทางสถิติ ANOVA ของสมการถดถอยที่แสดงอิทธิพลของตัวแปรต้นต่อความหนืด ของผลิตภัณฑ์.....	57
ตาราง 12 ผลของความสามารถในการเปียกของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทดลองและการทำนาย	59
ตาราง 13 ค่าทางสถิติ ANOVA ของสมการถดถอยที่แสดงอิทธิพลของตัวแปรต้นต่อความสามารถ ในการเปียกของผลิตภัณฑ์	62
ตาราง 14 ปริมาณน้ำในผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัว เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 0, 3, 6 เดือน.....	66

ตาราง 15 ความสามารถในการเปียกของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัว เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 0, 3, 6 เดือน.....	67
ตาราง 16 pH ของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัว เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 0, 3, 6 เดือน.....	68
ตาราง 17 ปริมาณตัวยาสำคัญของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัว เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 0, 3, 6 เดือน (n=3)	69
ตาราง 18 ร้อยละปริมาณ total lactone ที่ปลดปล่อยของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัว เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 0, 3, 6 เดือน.....	72
ตาราง 19 ขนาดอนุภาคของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัว เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 0, 3, 6 เดือน.....	79
ตาราง 20 ความหนืดของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัว เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 0, 3, 6 เดือน...	81



สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพประกอบ 1 Phase Diagram ของตัวยาและสารตัวพา ⁽²⁰⁾	17
ภาพประกอบ 2 ส่วนประกอบของเครื่อง spray dryer ⁽²⁵⁾	21
ภาพประกอบ 3 การออกแบบการทดลองเพื่อทดสอบขั้นสูง ⁽²⁸⁾	22
ภาพประกอบ 4 แบบจำลอง face centered CCD ⁽²⁹⁾	23
ภาพประกอบ 5 normal plot of residuals ของระยะเวลาที่ผลิตภัณฑ์ปลดปล่อยแอนโดรกราโฟไลด์ร้อยละ 95.....	46
ภาพประกอบ 6 residual plot ของระยะเวลาที่ผลิตภัณฑ์ปลดปล่อยแอนโดรกราโฟไลด์ร้อยละ 95	47
ภาพประกอบ 7 3D surface plot (A) และ contour plot (B) ของร้อยละปริมาณเอทานอลและร้อยละปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในสารสกัดฟ้าทะลายโจรต่อระยะเวลาที่ผลิตภัณฑ์ปลดปล่อยแอนโดรกราโฟไลด์ร้อยละ 95.....	49
ภาพประกอบ 8 normal plot of residuals ของระยะเวลาที่ความเข้มข้นของแอนโดรกราโฟไลด์ที่ปลดปล่อยไม่น้อยกว่า MIC	51
ภาพประกอบ 9 residual plot ของระยะเวลาที่ความเข้มข้นของแอนโดรกราโฟไลด์ที่ปลดปล่อยไม่น้อยกว่า MIC.....	52
ภาพประกอบ 10 3D surface plot (A) และ contour plot (B) ของร้อยละปริมาณเอทานอลและร้อยละปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในสารสกัดฟ้าทะลายโจรต่อระยะเวลาที่ความเข้มข้นของ แอนโดรกราโฟไลด์ที่ปลดปล่อยไม่น้อยกว่า MIC	54
ภาพประกอบ 11 normal plot of residuals ของความหนืดของผลิตภัณฑ์.....	56
ภาพประกอบ 12 residual plot ของความหนืดของผลิตภัณฑ์	56
ภาพประกอบ 13 3D surface plot (A) และ contour plot (B) ของร้อยละปริมาณเอทานอลและร้อยละปริมาณ poloxamer 188 ต่อความหนืดของผลิตภัณฑ์	58
ภาพประกอบ 14 normal plot of residuals ของความสามารถในการเปียกของผลิตภัณฑ์	60

ภาพประกอบ 15 residual plot ของความสามารถในการเปียกของผลิตภัณฑ์.....	61
ภาพประกอบ 16 3D surface plot (A) และ contour plot (B) ของร้อยละปริมาณ poloxamer 188 และร้อยละปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในสารสกัดฟ้าทะลายโจรต่อความสามารถในการเปียกของผลิตภัณฑ์.....	63
ภาพประกอบ 17 contour plot ของร้อยละปริมาณ poloxamer 188 และร้อยละปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ร้อยละปริมาณเอทานอลเป็น 6.57 ต่อความเข้มข้นของแอนโดรกราโฟไลด์ที่ปลดปล่อยมากกว่า MIC.....	64
ภาพประกอบ 18 ผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวที่เก็บรักษาเป็นเวลา 0 (A), 3 (B), 6 (C) เดือน ที่อุณหภูมิ 5, 25, 30 °C ตามลำดับจากซ้ายไปขวาของภาพ	64
ภาพประกอบ 19 diffractogram ของ standard AP (A), ไคโตซาน (B), placebo (C), ผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัว เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 0 (D), 3 (E-G), 6 (H-J) เดือน ที่อุณหภูมิ 5, 25, 30°C ตามลำดับ เรียงจากล่างขึ้นบนของเดือน 3 และ 6.....	71
ภาพประกอบ 20 release profile ของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัว เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 0 (A), 3 (B), 6 (C) เดือน	73
ภาพประกอบ 21 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการอากาศที่ปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัว เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 0 (A), 3 (B), 6 (C) เดือน และ negative control (-ve control)	75
ภาพประกอบ 22 ปริมาณเชื้อยีสต์และราทั้งหมดที่ปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัว เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 0 (A), 3 (B), 6 (C) เดือน และ negative control (-ve control).....	76
ภาพประกอบ 23 ปริมาณเชื้อ S. aureus ที่ปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัว เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 0 (A), 3 (B), 6 (C) เดือน และ negative control (-ve control)	77
ภาพประกอบ 24 ปริมาณเชื้อ P. aeruginosa ที่ปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัว เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 0 (A), 3 (B), 6 (C) เดือน และ negative control (-ve control).....	78
ภาพประกอบ 25 ขนาดอนุภาคของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัว เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 0 (A), 3 (B-D), 6 (E-G) เดือน ที่อุณหภูมิ 5, 25, 30 °C ตามลำดับตัวอักษรที่กำลังขยาย 20,000 เท่า..	80
ภาพประกอบ 26 พฤติกรรมการไหลของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัว เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 0 (A), 3 (B-D), 6 (E-G) เดือน ที่อุณหภูมิ 5, 25, 30 °C ตามลำดับตัวอักษร	82



บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ฟ้าทะลายโจร มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees สารสำคัญในฟ้าทะลายโจร คือ แอนโดรกราโฟไลด์ (andrographolide; AP)⁽¹⁾ เป็นสารที่มีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ (1.32×10^{-4} mol/L ที่ 25 °C)⁽²⁾ แต่มีความสามารถในการซึมผ่านสูง จัดประเภทตาม biopharmaceutics classification system (BCS) อยู่ในกลุ่มที่ 2 (class II)⁽³⁾ สรรพคุณในบัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2564 ใช้บรรเทาอาการท้องเสีย อาการของโรคหวัด อาการเจ็บคอ และลดอาการโรคโควิด 19 ที่มีความรุนแรงน้อย⁽⁴⁾ จากการศึกษาพบว่า สารสกัดฟ้าทะลายโจรที่สกัดจากตัวทำละลาย 95% ethanol สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Porphyromonas gingivalis* ในช่องปากได้⁽⁵⁾ จึงมีการพัฒนาเป็นเจลฟ้าทะลายโจรที่ใช้สำหรับการรักษาโรคปริทันต์อักเสบ ในรูปแบบอิมัลเจล (emulgel) ที่เกิดจากการผสมกันของ glyceryl monooleate และ triglyceride ทำให้เกิดเป็นผลึกเหลว (liquid crystal) ในน้ำ⁽⁶⁾ แต่ผลึกเหลวมีความหนืดน้อยเกินไป เกิดการไหลออกจากช่องปากปริทันต์อย่างรวดเร็ว ส่งผลให้ระดับสารสำคัญในช่องปากปริทันต์ต่ำกว่าระดับในการรักษา⁽⁷⁾ ในการศึกษาความคงสภาพของสารสกัดฟ้าทะลายโจร พบว่า สารสกัดฟ้าทะลายโจรที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลจะเกิดการเสื่อมสลายด้วยปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสในสารละลาย 1 N NaOH, 1 N HCl, แสง UV และความร้อน⁽⁸⁾ การพัฒนาตำรับของแข็งกระจายตัว (solid dispersion) จากสารสกัดฟ้าทะลายโจร ซึ่งเกิดจากการผสมกันของตัวยาและตัวพา (carrier) โดยใช้โคโตะซานเป็นตัวพาซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่สามารถยึดติดกับเยื่อเมือก (mucoadhesive) ในช่องปากได้ดีและมีความเป็นพิษต่ำ ทำให้ผลิตภัณฑ์ยึดเกาะช่องปากปริทันต์ได้มากขึ้น และใช้กระบวนการพ่นให้แห้ง ในการระเหยตัวทำละลายได้ผลิตภัณฑ์ในรูปแบบผงแห้งที่ช่วยลดการเสื่อมสลายของสารสกัดฟ้าทะลายโจรจากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส นอกจากนี้การพัฒนาผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวด้วยเทคนิคพ่นให้แห้งจะทำให้ตัวยาอยู่ในสถานะอสัณฐาน (amorphous) และมีอนุภาคขนาดเล็กลง จึงเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำของแอนโดรกราโฟไลด์ได้⁽⁹⁾

ทั้งนี้การพัฒนาผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวโดยใช้กระบวนการพ่นให้แห้ง จำเป็นต้องคำนึงถึงปัจจัยที่มีผลต่อคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่จำเป็นต่อการนำไปใช้ และการขยายขนาดการผลิตในระดับอุตสาหกรรม ปัจจัยด้านสูตรตำรับ (formulation variables) ที่ส่งผลต่อคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์และการผลิตด้วยกระบวนการพ่นให้แห้ง ได้แก่ (1) ปริมาณตัวยา

สำคัญในระบบของแข็งกระจายตัวส่งผลต่อร้อยละการปลดปล่อยยา โดยปริมาณตัวยาคสำคัญที่เพิ่มขึ้นจะส่งผลให้อัตราการละลายของตัวยาและความเข้มข้นของตัวยาที่ปลดปล่อยออกจากผลิตภัณฑ์มากขึ้น แต่ปริมาณตัวยาคสำคัญที่มากเกินไปอาจทำให้ตัวยาเกิดการอิ่มตัวยิ่งยวด (supersaturation) และเกิดการตกตะกอนออกจากระบบของแข็งกระจายตัวได้⁽¹⁰⁾, (2) ปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ส่งผลต่อความสามารถในการละลายของตัวยาที่ละลายน้ำได้น้อย ถ้าปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์น้อยลง ทำให้ตัวยาละลายได้น้อยลง เกิดการตกตะกอนหรือแยกชั้น (phase separation) ออกจากน้ำกระสายยามากขึ้น แต่ถ้าเติมปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์มากเกินไป จะเป็นอุปสรรคต่อการผลิตด้วยกระบวนการพ่นให้แห้งในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากอาจเกิดสารพิษตกค้างจากตัวทำละลายอินทรีย์⁽¹¹⁾, และ (3) ปริมาณสารลดแรงตึงผิว การเติมสารลดแรงตึงผิวซึ่งเป็นสารที่มีโครงสร้างโมเลกุลทั้งส่วนที่ชอบน้ำและส่วนที่ไม่ชอบน้ำ เรียกว่า แอมฟิฟิลิก (amphiphilic) จะช่วยในการละลายของตัวยาที่ละลายน้ำได้น้อย สารลดแรงตึงผิวจึงสามารถเพิ่มความสามารถในการละลายของตัวยาและลดการกลับเป็นผลึกของตัวยา (recrystallization) เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวจะสร้าง hydrophobic barrier บริเวณรอบอนุภาคของตัวยา เมื่อกระจายผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวลงในตัวกลางการละลาย ส่งผลให้ตัวยาลดการเกาะกลุ่มกัน (agglomeration) อีกทั้งสารลดแรงตึงผิวยังสามารถเพิ่มความสามารถในการเปียกน้ำของผลิตภัณฑ์ ทั้งนี้การเติมสารลดแรงตึงผิวอาจลดความคงสภาพของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจากการที่ตัวยาเกิดเป็นผลึกแยกตัวออกจากระบบของแข็งกระจายตัว และสารลดแรงตึงผิวบางชนิด เช่น poloxamer 188 เกิดการแยกชั้นจากของแข็งกระจายตัว^(12, 13) ดังนั้นปัจจัยเหล่านี้เป็นปัจจัยสำคัญที่ต้องศึกษาหาค่าเหมาะสมที่สุด (optimization) เพื่อให้ได้คุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ และสามารถผลิตในระดับอุตสาหกรรม

ในการออกแบบการทดลองเพื่อหาค่าเหมาะสมที่สุดของปัจจัยด้านสูตรตำรับหรือปัจจัยด้านกระบวนการ (process variables) ที่ส่งผลต่อคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ โดยการวิเคราะห์ทางสถิติจากความสัมพันธ์ของตัวแปรต้นและตัวแปรตามที่กำหนดค่าในช่วง (range) ที่ทำการทดลอง เรียกเทคนิคนี้ว่าการหาค่าเหมาะสมที่สุดหรือออปติไมเซชัน (optimization)⁽¹⁴⁾ ซึ่งวิธีการออกแบบการทดลองที่นิยมใช้ในการทำออปติไมเซชัน คือ วิธี central composite design (CCD) เป็นการออกแบบการทดลองสำหรับตัวแปรที่มีค่า 3 ระดับ ค่าแต่ละระดับของตัวแปรกำหนดเป็นจุดการทดลอง คือ จุดมุม จุดด้านข้าง (axial point) และจุดกลาง (center point) ของกล่องทรงลูกบาศก์ เพื่อทำนายความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต้นกับตัวแปรตามในรูปสมการอันดับสอง ทำให้จำนวนการทดลองน้อยกว่าวิธี full factorial design จึงช่วยลดค่าใช้จ่ายและความ

แปรปรวนในการทดลอง ค่าที่เหมาะสมของปัจจัยด้านสูตรตำรับ และ/หรือปัจจัยด้านกระบวนการ สามารถเพิ่มคุณภาพของผลิตภัณฑ์และปริมาณผลได้ของผลิตภัณฑ์⁽¹⁵⁾

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำออปติไมเซชันปัจจัยด้านสูตรตำรับที่มีผลต่อระยะเวลาที่ปลดปล่อยแอนโดรกราโฟไลด์ร้อยละ 95 ระยะเวลาปลดปล่อยแอนโดรกราโฟไลด์จนมีความเข้มข้นไม่น้อยกว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Porphyromonas gingivalis* (minimum inhibition concentration; MIC) ความหนืด และความสามารถในการเปียก (wettability) ของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจากสารสกัดฟ้าทะลายโจรโดยออกแบบการทดลองแบบเซ็นทรัล คอมโพสิต ให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณลักษณะเหมาะสมต่อการนำไปใช้ และสามารถผลิตในระดับอุตสาหกรรม

ความมุ่งหมายของงานวิจัย

1. เพื่อหาค่าที่เหมาะสมของปัจจัยด้านสูตรตำรับที่มีผลต่อการพัฒนาสูตรตำรับผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจากสารสกัดฟ้าทะลายโจร
2. เพื่อศึกษาความคงสภาพของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจากสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่สภาวะการเก็บรักษาแตกต่างกัน

ความสำคัญของงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาผลของปัจจัยด้านสูตรตำรับในกระบวนการพ่นให้แห้งต่อความสามารถในการปลดปล่อยแอนโดรกราโฟไลด์ออกจากผลิตภัณฑ์ ความหนืด และความสามารถในการเปียกของผลิตภัณฑ์ โดยใช้การออกแบบการทดลองด้วยวิธี central composite design แบบ face centered นำไปสู่การคัดเลือกสูตรตำรับผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจากสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่มีคุณลักษณะเหมาะสมต่อการนำไปใช้ประโยชน์ และทดสอบความคงสภาพของผลิตภัณฑ์ที่ผลิตด้วยสูตรตำรับดังกล่าว เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจากสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่มีประสิทธิภาพและความคงสภาพที่ดี อีกทั้งยังเกิดการใช้ประโยชน์จากสมุนไพรไทยมากขึ้น และเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับฟ้าทะลายโจรในอีกทางหนึ่งด้วย

ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ระยะ ดังนี้

ระยะที่ 1 ศึกษาผลของปัจจัยด้านสูตรตำรับ ได้แก่ ร้อยละของเอทานอล ร้อยละของ poloxamer และร้อยละของแอนโดรกราโฟไลด์จากสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์ โดยออกแบบการทดลองด้วยวิธี central composite design แบบ face centered จากนั้นเตรียมตำรับตามสูตรตำรับที่ออกแบบการทดลองไว้ นำไปผ่านกระบวนการพ่นให้แห้งได้เป็นผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจากสารสกัดฟ้าทะลายโจร ศึกษาการปลดปล่อยแอนโดรกราโฟไลด์ออกจากผลิตภัณฑ์ในตัวกลางการละลาย (dissolution medium) โดยใช้สารละลายเมทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 50 โดยปริมาตร จำนวน 200 mL ด้วยเครื่องทดสอบอัตราการละลาย (dissolution tester) ประกอบร่วมกับ enhancer cell เป็นเวลา 96 ชั่วโมง หลังจากนั้นทดสอบความหนืด และความสามารถในการเปียกของผลิตภัณฑ์ วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยด้านสูตรตำรับและคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ ได้แก่ ระยะเวลาที่ปลดปล่อยแอนโดรกราโฟไลด์ร้อยละ 95 ระยะเวลาปลดปล่อยแอนโดรกราโฟไลด์จนมีความเข้มข้นไม่น้อยกว่า MIC ความหนืด และความสามารถในการเปียก โดยใช้โปรแกรม design of expert (DOE) เพื่อคัดเลือกสูตรตำรับผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจากสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่มีคุณลักษณะเหมาะสมต่อการใช้ประโยชน์ และสามารถผลิตในระดับอุตสาหกรรม

ระยะที่ 2 ทดสอบความคงสภาพของผลิตภัณฑ์จากสูตรตำรับที่คัดเลือก โดยระยะเวลาเก็บรักษาเป็น 0-6 เดือน อุณหภูมิ 5, 25 และ 30 °C ความชื้น 60 และ 75%RH ตามลำดับ ทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ เคมีและชีวภาพ ได้แก่ ลักษณะภายนอก, ปริมาณน้ำ, pH, ความเป็นผลึก, การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์, ร้อยละการปลดปล่อยแอนโดรกราโฟไลด์ออกจากผลิตภัณฑ์, ความหนืด และความสามารถในการเปียกของผลิตภัณฑ์

ตัวแปรที่ศึกษา

ระยะที่ 1 ศึกษาค่าที่เหมาะสมของปัจจัยด้านสูตรตำรับต่อคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์

1. ตัวแปรต้น

- 1.1. ร้อยละของเอทานอล
- 1.2. ร้อยละของแอนโดรกราโฟไลด์จากสารสกัดฟ้าทะลายโจร
- 1.3. ร้อยละของ poloxamer

2. ตัวแปรตาม

- 2.1. ระยะเวลาที่ผลิตภัณฑ์ปลดปล่อยแอนโดรกราโฟไลด์ร้อยละ 95
- 2.2. ระยะเวลาที่ความเข้มข้นของแอนโดรกราโฟไลด์ที่ปลดปล่อยไม่น้อยกว่า MIC
- 2.3. ความหนืดของผลิตภัณฑ์
- 2.4. ความสามารถในการเปียกของผลิตภัณฑ์

ระยะที่ 2 ศึกษาความคงสภาพของผลิตภัณฑ์จากสูตรตำรับที่คัดเลือก

1. ตัวแปรต้น

- 1.1. ระยะเวลาการเก็บรักษา (0, 3, 6 เดือน)
- 1.2. สภาวะการเก็บรักษา ($5 \pm 3^{\circ}\text{C}$, $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ความชื้น $60 \pm 5\% \text{RH}$ และ $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ความชื้น $75 \pm 5\% \text{RH}$)

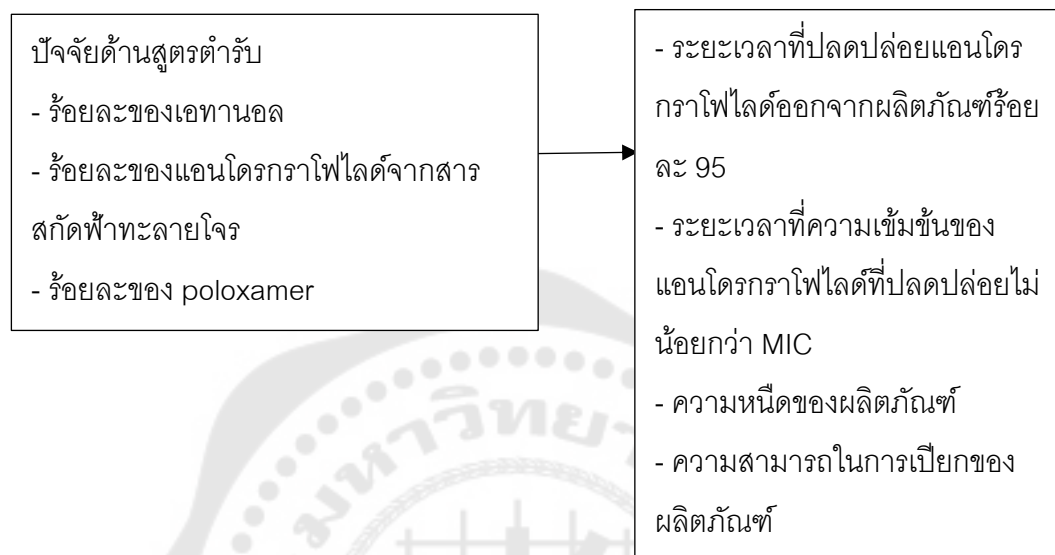
2. ตัวแปรตาม

- 2.1. ลักษณะภายนอกของผลิตภัณฑ์
- 2.2. ปริมาณน้ำในผลิตภัณฑ์ (loss on drying)
- 2.3. pH ของผลิตภัณฑ์
- 2.4. ความเป็นผลึก
- 2.5. ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน
- 2.6. ร้อยละการปลดปล่อยแอนโดรกราโฟไลด์ออกจากผลิตภัณฑ์
- 2.7. ความหนืดของผลิตภัณฑ์
- 2.8. ความสามารถในการเปียกของผลิตภัณฑ์
- 2.9. ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในผลิตภัณฑ์
- 2.10. ขนาดอนุภาคของผลิตภัณฑ์

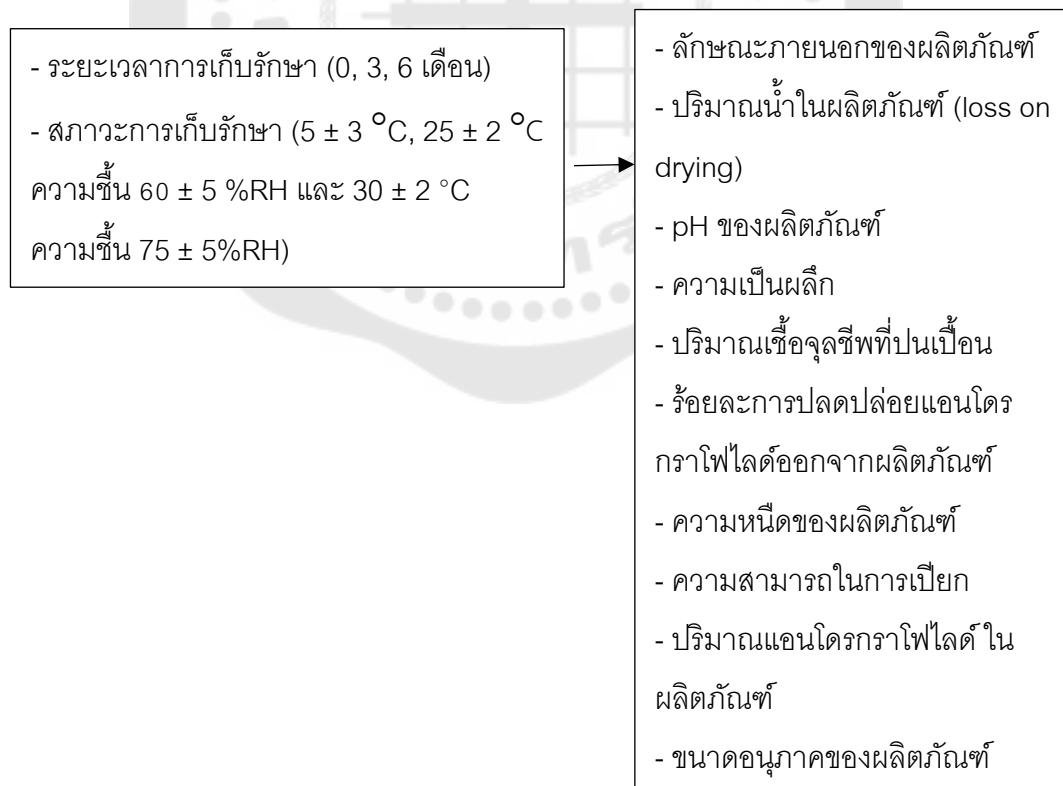
กรอบแนวคิดการวิจัย

งานวิจัยนี้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ระยะ ดังนี้

ระยะที่ 1 ศึกษาค่าที่เหมาะสมของปัจจัยด้านสูตรตำรับที่มีต่อคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์



ระยะที่ 2 ทดสอบความคงสภาพของผลิตภัณฑ์จากสูตรตำรับที่คัดเลือก



สมมติฐานในการวิจัย

ระยะที่ 1 ศึกษาค่าที่เหมาะสมของปัจจัยด้านสูตรตำรับที่มีต่อคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์

1. ปริมาณตัวยาสำคัญมีผลให้ระยะเวลาที่ปลดปล่อยแอนโดรกราโฟไลด์ออกจากผลิตภัณฑ์ร้อยละ 95 เพิ่มขึ้น
2. ปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์มีผลให้ระยะเวลาที่ความเข้มข้นของแอนโดรกราโฟไลด์ที่ปลดปล่อยไม่น้อยกว่า MIC ลดลง
3. ปริมาณสารลดแรงตึงผิวมีผลต่อความหนืดลดลงและความสามารถในการเปียกน้ำของผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้น

ระยะที่ 2 ทดสอบความคงสภาพของผลิตภัณฑ์จากสูตรตำรับที่คัดเลือก

สภาวะการเก็บรักษาไม่มีผลต่อความคงสภาพของผลิตภัณฑ์จากสารสกัดฟ้าทะลายโจรในรูปของแข็งกระจายตัวตามข้อกำหนดของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 6 เดือน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ผลิตภัณฑ์จากสารสกัดฟ้าทะลายโจรในรูปของแข็งกระจายตัวที่มีคุณลักษณะเหมาะสมต่อการนำไปใช้ และมีความคงสภาพ
2. เพื่อเป็นแนวทางการผลิตผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจากสารสกัดฟ้าทะลายโจรในระดับอุตสาหกรรม

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ของฟ้าทะลายโจร

ชื่อ	ฟ้าทะลายโจร
ชื่อวิทยาศาสตร์	<i>Andrographis paniculata</i> ⁽¹⁾
วงศ์	Acanthaceae ⁽¹⁾

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

เป็นพืชที่มีความสูง 30-110 เซนติเมตร ลำต้นตั้งตรง ใบมีลักษณะเรียวยาว ขอบใบเรียบ สีเขียวเข้ม จัดเรียงใบแบบตรงข้ามและตั้งฉากกัน ดอกมีขนาดเล็ก ดอกประกอบด้วยกลีบเลี้ยง 5 กลีบ กลีบดอกยาวสีขาวและมีจุดสีม่วง และเกสรเพศผู้มี 2 อัน ผลเป็นแคปซูลยาวเรียวมีความยาว 1-2 เซนติเมตร ความกว้าง 2-5 มิลลิเมตร เมล็ดมีลักษณะค่อนข้างเหลี่ยม สีน้ำตาลออกเหลือง (16, 17)

สรรพคุณ

ใช้บรรเทาอาการท้องเสีย อาการของโรคหวัด อาการเจ็บคอ และลดอาการโรคโควิด 19 ที่มีความรุนแรงน้อย⁽⁴⁾

สารสำคัญ

แบ่งประเภทตามโครงสร้างทางเคมี ได้แก่กลุ่ม ent labdane diterpenoids พบมากในส่วนเหนือดินของฟ้าทะลายโจร เช่น แอนโดรกราโฟไลด์ ซึ่งเป็นสารสำคัญที่พบมากที่สุดที่ฟ้าทะลายโจรและเป็นสารหลักในการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา กลุ่ม Flavonoids กลุ่ม Quinic acids และกลุ่ม xanthones ที่มักพบในส่วนรากโดยสารสำคัญแต่ละกลุ่มสามารถสกัดจากฟ้าทะลายโจรได้ด้วยตัวทำละลายต่างๆ และมีฤทธิ์ทางชีวภาพ ดังแสดงในตารางที่ 1⁽¹⁾

ตาราง 1 สารสำคัญในฟ้าทะลายโจรที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา⁽¹⁾

ประเภทสารสำคัญ	ชื่อสารสำคัญ	ส่วนที่พบในพืช	ตัวทำละลายที่ใช้สกัด	ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา
ent labdane diterpenoids	Andrographolide ⁽¹⁾	ใบ, ส่วนเหนือดิน, ราก	เมทานอล, เอทานอล, เฮกเซน, อะซิโตน-น้ำ	ฤทธิ์ต้านไวรัส, ฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งเซลล์ของเซลล์มะเร็ง, ฤทธิ์ต้านการอักเสบ, ฤทธิ์ต้านเบาหวาน, ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่, ฤทธิ์ป้องกันความเป็นพิษต่อตับ, ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์
	Neoandrographolide ⁽¹⁾	ใบ, ส่วนเหนือดิน, ราก	เมทานอล, อะซิโตน-น้ำ, เอทานอล	ฤทธิ์ต้านการอักเสบ, ฤทธิ์ต้านปรสิต, ฤทธิ์ป้องกันความเป็นพิษต่อตับ, ฤทธิ์ต้านไวรัสเริ่ม, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
14-deoxyandrographolide ⁽¹⁾		ใบ, ส่วนเหนือดิน	เมทานอล, อะซิโตน-น้ำ, เอทานอล, เฮกเซน	ฤทธิ์ป้องกันความเป็นพิษต่อตับ, ฤทธิ์การคลายตัวของหลอดเลือด, ฤทธิ์ต้านความดันโลหิตสูง, ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

ตาราง 1 (ต่อ)

ประเภทสารสำคัญ	ชื่อสารสำคัญ	ส่วนที่พบในพืช	ตัวทำละลายที่ใช้สกัด	ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา
ent labdane diterpenoids	14-deoxy 11,12-didehydroandrographolide ⁽¹⁾	ใบ, ส่วนเหนือดิน	เมทานอล, เอทานอล, เฮกเซน	ฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ฤทธิ์ป้องกัน ความเป็นพิษต่อตับ, ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง, ฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส, ฤทธิ์ต้าน เบาหวาน
	Andrographiside ⁽¹⁾	ใบ, ส่วนเหนือดิน	เมทานอล, เอทานอล, อะซิโตน-น้ำ	ฤทธิ์ป้องกันความเป็นพิษต่อตับ
	Isoandrographolide ⁽¹⁾	ใบ, ส่วนเหนือดิน, ราก	เมทานอล, เอทานอล, อะซิโตน-น้ำ	ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ <i>Bacillus subtilis</i> , ฤทธิ์ต้านการ อักเสบ, ฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งเซลล์ของ เซลล์มะเร็ง, ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อ เซลล์มะเร็ง
	Andrographolactone ⁽¹⁾	ส่วนเหนือดิน	เอทานอล	ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง
	3-oxo-14-deoxyandrographolide ⁽¹⁾	ส่วนเหนือดิน	เอทานอล	ฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งเซลล์ของ เซลล์มะเร็ง

ตาราง 1 (ต่อ)

ประเภทสารสำคัญ	ชื่อสารสำคัญ	ส่วนที่พบในพืช	ตัวอย่างการใช้สกัด	ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา
ent labdane diterpenoids	12-hydroxyandrographolide ⁽¹⁾	ส่วนเหนือดิน	เอทานอล	ฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งเซลล์ของเซลล์มะเร็ง
	3-oxo-14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide ⁽¹⁾	ส่วนเหนือดิน	เอทานอล	ฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งเซลล์ของเซลล์มะเร็ง
	7-hydroxy-14-deoxyandrographolide ⁽¹⁾	ส่วนเหนือดิน	เอทานอล	ฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งเซลล์ของเซลล์มะเร็ง
	8(17),13-ent-labda-diene-15,16,19-triol ⁽¹⁾	ส่วนเหนือดิน	เอทานอล	ฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งเซลล์ของเซลล์มะเร็ง
	15-methoxy-3,19-dihydroxy-8(17)11,13-entlabda-trien-16,15-olide ⁽¹⁾	ส่วนเหนือดิน	เอทานอล	ฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งเซลล์ของเซลล์มะเร็ง
	3-O- β -D-glucosyl-14-deoxyandrographolide ⁽¹⁾	ส่วนเหนือดิน	เมทานอล, เอทานอล	ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย, ฤทธิ์ต้านเชื้อรา
	14-Deoxy-12-hydroxyandrographolide ⁽¹⁾	ส่วนเหนือดิน	เมทานอล, อะซิโตน-น้ำ	ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์

ตาราง 1 (ต่อ)

ประเภทสารสำคัญ	ชื่อสารสำคัญ	ส่วนที่พบในพืช	ตัวทำละลายที่ใช้สกัด	ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา
ent labdane diterpenoids	3-O-beta-D-glucopyranosyl 14,19-dideoxy andrographolide ⁽¹⁾	ส่วนเหนือดิน	อะซิโตน-น้ำ	ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์
	3-O-beta-D-glucopyranosyl- andrographolide ⁽¹⁾	ส่วนเหนือดิน	อะซิโตน-น้ำ	ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์
	8,17-Epoxy-14- deoxyandrographolide ⁽¹⁾	ส่วนเหนือดิน	อะซิโตน-น้ำ	ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์
	14-Deoxy-17-beta- hydroxyandrographolide ⁽¹⁾	ส่วนเหนือดิน	อะซิโตน-น้ำ	ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์
	19-O-[beta-D-apiotofuranosyl- beta-D-glucopyranoyl]-3,14- dideoxyandrographolide ⁽¹⁾	ส่วนเหนือดิน	อะซิโตน-น้ำ	ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์
Flavonoids	apigenin ⁽¹⁾	ทุกส่วนของต้น	เมทานอล	ฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มเกล็ดเลือด
	7-O-methylwogonin ⁽¹⁾	ราก, ทุกส่วนของต้น	เมทานอล, เฮกเซน	ฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มเกล็ดเลือด

ตาราง 1 (ต่อ)

ประเภทสารสำคัญ	ชื่อสารสำคัญ	ส่วนที่พบในพืช	ตัวทำลายที่ใช้สกัด	ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา
Flavonoids	Onysilin ⁽¹⁾	ทุกส่วนของต้น	เมทานอล	ฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด
Quinic acids	3,4-dicaffeoylquinic acid ⁽¹⁾	ทุกส่วนของต้น	เมทานอล	ฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด
Xanthones	1,2-dihydroxy-6,8-dimethoxyxanthone ⁽¹⁾	ราก	ปิโตรเลียมอีเทอร์, เมทานอล, คลอโรฟอร์ม, น้ำ	ฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย
	1,8-dihydroxy-3,7-dimethoxyxanthone ⁽¹⁾	ราก	ปิโตรเลียมอีเทอร์, เมทานอล, คลอโรฟอร์ม, น้ำ	ฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย
	3,7,8-trimethoxy-1-hydroxyxanthone ⁽¹⁾	ราก	ปิโตรเลียมอีเทอร์, เมทานอล, คลอโรฟอร์ม, น้ำ	ฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย
	4,8-dihydroxy-2,7-dimethoxyxanthone ⁽¹⁾	ราก	ปิโตรเลียมอีเทอร์, เมทานอล, คลอโรฟอร์ม, น้ำ	ฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย

2. ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดฟ้าทะลายโจร⁽⁵⁾

จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดฟ้าทะลายโจรซึ่งสกัดจาก hexane, methylene chloride, 95% ethanol, และน้ำ ตามลำดับ ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Streptococcus mutans* สายพันธุ์ KPSK2, สายพันธุ์ GS-5 และ *Porphyromonas gingivalis* เปรียบเทียบกับ 5% chlorhexidine พบว่า ฟ้าทะลายโจรที่สกัดด้วย hexane, methylene chloride และ 95% ethanol มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Streptococcus mutans* สายพันธุ์ KPSK2 และสายพันธุ์ GS-5 ได้ โดยมีค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ของฟ้าทะลายโจรที่สกัดด้วย methylene chloride เท่ากับ 25 mg/ml และ 6.25 mg/ml ตามลำดับ มีประสิทธิภาพสูงกว่า ฟ้าทะลายโจรที่สกัดด้วย 95% ethanol ซึ่งมีค่า MIC เท่ากับ 27.5 mg/ml และ 27.5 mg/ml และ ฟ้าทะลายโจรที่สกัดด้วย hexane ซึ่งมีค่า MIC เท่ากับ 85 mg/ml และ 42.5 mg/ml ตามลำดับ นอกจากนี้ ฟ้าทะลายโจรที่สกัดด้วย 95% ethanol มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Porphyromonas gingivalis* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 55 mg/ml ดังนั้นฟ้าทะลายโจรที่สกัดด้วย 95% ethanol มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทั้ง *Streptococcus mutans* สายพันธุ์ KPSK2, สายพันธุ์ GS-5 และ *Porphyromonas gingivalis* ได้

จากการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของอนุพันธ์ที่ได้จากการสกัดฟ้าทะลายโจรด้วยเอทานอลและน้ำ พบว่า andrographanin, 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide, 14-deoxy-12-hydroxyandrographolide และ isoandrographolide สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus subtilis* ได้ โดยมีค่า MIC เป็น 10 µg/ml⁽¹⁸⁾

3. ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราของสารสกัดฟ้าทะลายโจร

จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่สกัดส่วนทั้งต้นฟ้าทะลายโจรด้วยตัวทำละลาย dichloromethane และเมทานอลต่อการยับยั้งเชื้อรา พบว่า 3-O-β-d-glucosyl-14-deoxyandrographiside ซึ่งเป็นอนุพันธ์ในกลุ่ม lactone ที่ได้จากการสกัดด้วยเมทานอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Microsporum canis* และ *Candida tropicalis* โดยมีค่า MIC เป็น 100 µg/ml ของทั้งสองเชื้อ และสาร 14-deoxyandrographolide ซึ่งเป็นอนุพันธ์ในกลุ่ม lactone ที่ได้จากการสกัดด้วยเมทานอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Microsporum canis* และ *Candida tropicalis* โดยมีค่า MIC เป็น 50 และ 150 µg/ml ตามลำดับ นอกจากนี้สารอนุพันธ์ในกลุ่ม lactone ที่สกัดจากตัวทำละลาย dichloromethane คือ 14-deoxy-11,12-dihydroandrographolide มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Microsporum canis*, *Aspergillus niger*, และ *Candida tropicalis* โดยมีค่า MIC เป็น 150,

100, และ 100 µg/ml ตามลำดับ ซึ่ง 14-deoxy-11,12-dihydrondrographolide เป็นสารที่มีค่า MIC มากที่สุด แต่สามารถออกฤทธิ์กว้าง เนื่องจากสามารถยับยั้งเชื้อราทุกชนิดที่นำมาทดสอบ⁽¹⁹⁾

4. ผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัว (solid dispersion)

Solid Dispersions คือ การกระจายตัวของตัวยาสำคัญหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งชนิดในตัวพาเฉื่อย (inert carrier) หรือเมทริกซ์ (matrix) โดยมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำของตัวยาหรือควบคุมการปลดปล่อยของตัวยาสำคัญ⁽²⁰⁾

กลไกการปลดปล่อยยาของระบบของแข็งกระจายตัว⁽⁹⁾

แบ่งออกเป็น 2 กลไกหลัก ได้แก่

1. การควบคุมการปลดปล่อยโดยตัวพา (carrier-controlled release) เกิดขึ้นเมื่อของแข็งกระจายตัวกระจายในน้ำ ตัวพาที่ขบ น้ำจะละลายหรือดูดซับน้ำไว้อย่างรวดเร็วเกิดเป็นชั้นเจลหรือ concentrated carrier layer ซึ่งถ้ายาสามารถละลายในชั้นเจลและชั้นเจลมีความหนืดเพียงพอ ชั้นเจลจะป้องกันการแพร่ของยา ทำให้การแพร่ของยาจากตัวพาไป bulk phase เป็นขั้นตอนดัดอัตรา (rate limiting step)

2. การควบคุมการปลดปล่อยโดยยา (drug-controlled release) เกิดขึ้นเมื่อยาไม่สามารถละลายหรือละลายได้น้อยในชั้นเจล ตัวยาจะปลดปล่อยออกมาได้เมื่อสัมผัสกับน้ำ ทำให้ความสามารถในการละลายขึ้นกับคุณสมบัติของอนุภาคยา เช่น รูปแบบพหุสัณฐาน ขนาดอนุภาค ความสามารถในการละลายน้ำ เป็นต้น กลไกการปลดปล่อยนี้จึงเป็นกลไกหลักของระบบของแข็งกระจายตัว

อย่างไรก็ตามกลไกการปลดปล่อยยาทั้งสองกลไกนี้สามารถเกิดขึ้นได้พร้อมกันเนื่องจากอาจมีตัวยาบางส่วนสามารถละลายน้ำได้ และอาจมีตัวยาที่ละลายในชั้นเจลได้ ดังนั้นจึงมีนักวิจัยจำนวนมากพยายามเพิ่มการละลายของยาด้วยการเพิ่มสัดส่วนของตัวพาในระบบของแข็งกระจายตัว ทำให้ตัวยาสามารถกระจายตัวได้ดีขึ้นและลดการเกิดผลึกของตัวยาได้ ส่งผลให้การละลายของยาเพิ่มขึ้น แต่การที่สัดส่วนของตัวพาเพิ่มขึ้นก็อาจทำให้เกิดการหน่วงการปลดปล่อยยาได้เช่นกัน

ประเภทของระบบของแข็งกระจายตัว แบ่งได้เป็น 4 รุ่น ตามชนิดของตัวพาที่ใช้ ดังนี้

1. รุ่นที่ 1 ของ Solid Dispersion

เป็นการผสมกันของตัวยาที่เป็น crystalline และตัวพาที่เป็น crystalline carrier จนได้ยูเทกติกมิกซ์เจอร์ (eutectic mixture) ซึ่งเป็นสารผสมที่เกิดจากการหลอม crystal เข้าด้วยกัน

โดยอุณหภูมิที่สารผสมหลอมเหลวทั้งหมด เรียกว่า eutectic point ซึ่งจะมีค่าน้อยกว่าจุดหลอมเหลวของสารบริสุทธิ์แต่ละชนิด⁽²¹⁾ สารตัวพาที่นิยมใช้ คือ ยูเรียและน้ำตาลหลายชนิด เช่น D-mannitol, D-fructose, D-dextrose, และ D-maltose เป็นต้น⁽²⁰⁾ วิธีนี้ช่วยให้เกิดการลดขนาดอนุภาค เพิ่มความสามารถในการเปียก และเกิดการเปลี่ยนสัณฐานของตัวยา ทำให้ความสามารถในการละลายและอัตราการละลายของยาเพิ่มขึ้น แต่อัตราการละลายจะเพิ่มขึ้นอย่างจำกัดและ Solid Dispersion ที่ได้มีความคงสภาพต่ำ⁽⁹⁾

2. รุ่นที่ 2 ของ Solid Dispersion⁽⁹⁾

เป็นการผสมกันของตัวยาและตัวพาที่เป็น amorphous carrier ถ้าตัวยาและตัวพา amorphous carrier ผสมเข้ากันได้ทั้งหมดในระดับโมเลกุล จะเรียกว่า amorphous solid solution แต่ถ้าตัวยาและตัวพาผสมแล้วเป็นสองเฟสแยกออกจากกัน เรียกว่า amorphous solid suspensions ซึ่งเกิดจากตัวยามีผลจำกัดความสามารถในการละลายของตัวพา หรือตัวยาอาจมีจุดหลอมเหลวที่สูงมากเกินไป ตัวพาที่เป็น amorphous carrier แบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ full synthesis polymer เช่น povidone (PVP), polyethylene glycol (PEG), polyvinylpyrrolidone-co-vinylacetate (PVPVA), polymethacrylates เป็นต้น และ natural product based polymer เช่น hydroxypropylcellulose (HPC) เป็นต้น โดยสารที่ได้รับความนิยมคือ HPMC, PEG และ PVP เพราะมีความสามารถละลายใน organic solvents ได้หลายชนิด จึงเหมาะสมกับการนำมาใช้เตรียม Solid Dispersion ด้วยวิธี solvent method ทั้งนี้พอลิเมอร์แต่ละชนิดจะมีการแบ่งประเภทย่อยตามน้ำหนักโมเลกุล พอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากขึ้น ทำให้มีความหนืดมากขึ้น จึงช่วยป้องกัน recrystallization ของตัวยาได้ แต่อาจชะลอการปลดปล่อยของตัวยาได้เช่นกัน การเลือกน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์จึงเป็นปัจจัยสำคัญที่ควรคำนึง Solid Dispersion ที่ได้ในรุ่นนี้ จะสามารถเพิ่มอัตราการละลายได้มากขึ้น แต่อาจเกิดการตกตะกอนของตัวยา หลังสัมผัสกับของเหลว เนื่องจากความอึดตัวยังยวดและปัญหาความคงสภาพที่ตัวยาสามารถ recrystallize ได้

3. รุ่นที่ 3 ของ Solid Dispersion⁽⁹⁾

จากปัญหาการตกตะกอนของตัวยาและการเกิด recrystallize ของตัวยาในรุ่นที่ 2 ตัวพาในรุ่นนี้จึงใช้สารลดแรงตึงผิวเป็นตัวพาหลักหรือเป็นสารช่วยเสริม เพื่อเพิ่มการละลายของตัวยา โดยสารลดแรงตึงผิวจะช่วยลด แรง interface ของตัวยา และช่วยให้ตัวยากับตัวพาผสมเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน (homogenous) มากขึ้น จึงลดอัตราการเกิด recrystallization ของตัวยาได้ เพิ่มความสามารถในการเปียก และป้องกันการตกตะกอนของตัวยาด้วยการดูดซึมตัวทำละลายไปที่ชั้นนอกของอนุภาคยาหรือสร้าง micelle เกิดเป็น encapsulation จึงสามารถเพิ่มความคงสภาพ

ทางเคมีและกายภาพมากขึ้น โดยสารลดแรงตึงผิวที่นิยมใช้เป็น carrier เช่น poloxamer และสารลดแรงตึงผิวที่ใช้เป็นสารช่วยในระบบของแข็งกระจายตัว เช่น sodium lauryl sulfate, polyethylene glycol เป็นต้น

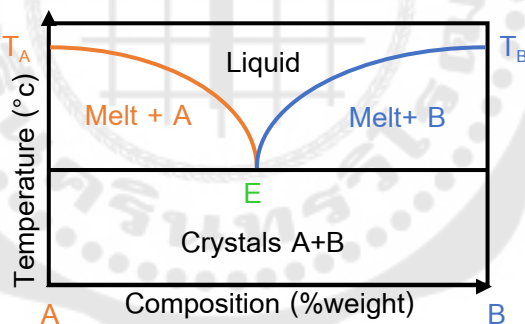
4. รุ่นที่ 4 ของ Solid Dispersion⁽⁹⁾

เป็นการผสมกันของตัวยาที่ไม่สามารถละลายน้ำได้และตัวพาที่ไม่สามารถละลายน้ำ (water insoluble polymers or swellable polymers) เพื่อเพิ่มความสามารถในการละลายของตัวยา และควบคุมการปลดปล่อยของตัวยาให้นานขึ้นซึ่งช่วยเพิ่มความร่วมมือในการใช้ยาของผู้ป่วย ลดอาการข้างเคียง และทำให้ตัวยาออกฤทธิ์ได้สม่ำเสมอมากขึ้น โดยตัวพาที่นิยมใช้ เช่น ethyl cellulose, Eudragit® RS, carboxyvinylpolymer เป็นต้น

รูปแบบของ Solid Dispersion แบ่งออกเป็น 2 ประเภท ตามโครงสร้างของระบบ ได้แก่

1. Eutectic Mixture

คือ การผสมสารบริสุทธิ์ crystal สองชนิดเข้าด้วยกันด้วยการหลอมเหลว โดยอุณหภูมิที่จุดหลอมเหลวของสารผสมจะมีค่าต่ำกว่าจุดหลอมเหลวของสารบริสุทธิ์ เรียกจุดหลอมเหลวของสารผสมนี้ว่า eutectic point⁽²⁰⁾



ภาพประกอบ 1 Phase Diagram ของตัวยาและสารตัวพา⁽²⁰⁾

2. Solid Solution

เป็นการรวมตัวกันของตัวพาและยาในระดับโมเลกุล ซึ่ง Solid Solution แบ่งได้โดยใช้นาขนาดของโมเลกุลเป็นเกณฑ์ ส่งผลให้เกิดสารผสมได้เป็น 2 แบบ ดังนี้ (1) Substitutional solid solution คือ ตัวยาไปแทนที่การจัดเรียงโมเลกุลของตัวพาโดยขนาดอนุภาคของตัวยากับตัวพาต้องต่างกันไม่เกิน 15%^(9, 20) (2) Interstitial solid solution คือ ตัวยาไปแทรกอยู่ในช่องว่างโมเลกุลของตัวพา

ข้อดีของ Solid Dispersions^(20, 21)

1. ตัวยาที่จับกับตัวพาที่เป็น hydrophilic จะทำให้ลดการเกาะกลุ่ม (agglomeration) ของตัวยา และสามารถปลดปล่อยยาในตัวทำละลายอิมัลชันตัวยังยวดได้ ตัวยาจึงเกิดการดูดซึมได้รวดเร็วขึ้นและสามารถเพิ่ม bioavailability
2. Solid Dispersions สามารถเพิ่มความสามารถในการเปียก (wettability) จากคุณสมบัติชอบน้ำของตัวพาและเพิ่มพื้นที่ผิวในการสัมผัสตัวทำละลายมากขึ้น เนื่องจากโมเลกุลของตัวทำละลายแทรกผ่านได้ดีขึ้นและอนุภาคที่ได้มีขนาดเล็ก ประมาณ 2-5 μm ส่งผลให้การละลายของยาเพิ่มขึ้น
3. Solid Dispersions สามารถนำมาผลิตเป็นยาเม็ดได้ ซึ่งทำให้ผู้ป่วยสามารถรับประทานยาได้สะดวกกว่ายาน้ำ
4. Solid Dispersions สามารถเตรียมได้ง่ายและใช้ได้กับตัวยาหลายชนิด โดยเฉพาะกับตัวยาที่ไม่ประจุ หรือมีสมบัติเป็นกลาง ในขณะที่การเพิ่มการละลายด้วยวิธีทำให้อยู่ในรูปของเกลือ (salt formation) จะใช้ได้กับตัวยาที่มีสมบัติเป็นกรดหรือเบสเท่านั้นและไม่สามารถเพิ่ม bioavailability ของตัวยาได้

ข้อเสียของ Solid Dispersions^(20, 21)

1. Solid Dispersions ที่เตรียมในรูปแบบ amorphous เมื่อสัมผัสกับความชื้นหรือความชื้นสูงจะเกิดการเคลื่อนที่ของโมเลกุลยา (drug mobility) ทำให้โมเลกุลยาเกิดการรวมตัวกันกลับเป็นผลึกอีกครั้ง (recrystallization) และส่วนใหญ่ตัวพาที่เป็นพอลิเมอร์จะสามารถดูดซับความชื้นได้ ทำให้เกิดการแยกชั้น (phase separation) ส่งผลให้ความสามารถในการละลายและ bioavailability ของตัวยาลดลง จึงเกิดปัญหาความคงสภาพขึ้น
2. กระบวนการผลิต Solid Dispersions อาจขยายกำลังการผลิตได้ยาก (poor scale-up)

วิธีการเตรียม Solid Dispersions

1. Melting Method

เป็นวิธีที่เตรียมโดยการผสมกันของตัวยาและตัวพาที่ละลายน้ำได้ด้วยการให้ความร้อนโดยตรงจนหลอมเหลวเป็นเนื้อเดียวกันที่อุณหภูมิสูงกว่า eutectic point เล็กน้อย จากนั้นคนผสมให้เย็นลงเป็นของแข็งอย่างรวดเร็วในถังน้ำแข็งแล้วจึงนำไปบดและแรงลดขนาด ข้อดีของวิธีนี้คือ สามารถทำได้ง่าย ประหยัดค่าใช้จ่าย และไม่มีสารพิษตกค้างจากตัวทำละลาย ข้อเสียคือยาบางชนิดอาจเกิดการสลายตัวเมื่อผ่านอุณหภูมิสูงและมีโอกาสที่ยากับตัวพาผสมกันไม่ได้ไม่ดี⁽²¹⁾ ยาที่

เหมาะสมกับการใช้วิธี นี้จึงเป็นยาที่มีจุดหลอมเหลวไม่สูงมากและสามารถผสมเข้ากันได้กับตัวพา (compatibility) เช่น Sulfathiazole, Clotrimazole, Albendazole, Furosemide เป็นต้น⁽²⁰⁾ ตัวพาที่นิยมใช้ เช่น polyethylene glycol, poloxamer โดยเครื่องมือผลิตสำหรับวิธีนี้ ได้แก่ Hot melt extrusion⁽⁹⁾

2. Solvent Evaporation Method^(9, 20)

เป็นวิธีที่ตัวยาและตัวพาถูกละลายด้วยตัวทำละลายจนเป็นสารเนื้อเดียว จากนั้นระเหยตัวทำละลายออก (evaporation) แล้วนำไปบดและแรงเพื่อลดขนาดอนุภาค ข้อดีของวิธีนี้คือ ทำให้ตัวยาและตัวพาเกิดการเชื่อมสลายด้วยความร้อนน้อยลง เนื่องจากตัวยาและตัวพาสัมผัสความร้อนต่ำระหว่างระเหยตัวทำละลาย เป็นระยะเวลาสั้น แต่ข้อเสียคือ อาจเกิดสารตกค้างจากตัวทำละลายที่ใช้ ค่าใช้จ่ายในการผลิตสูงขึ้นเนื่องจากต้องเพิ่มขั้นตอนการกำจัดตัวทำละลายออก ขยายกำลังการผลิตได้ยากและอาจหาตัวทำละลายที่เหมาะสมยาก เนื่องจากตัวทำละลายที่ใช้ต้องสามารถละลายได้ทั้งตัวยาและตัวพา โดยตัวทำละลายที่นิยมใช้ เช่น methanol, ethanol, ethyl acetate, methylene chloride, acetone, water เป็นต้น วิธีนี้เหมาะสำหรับยาที่สลายตัวด้วยความร้อน เช่น Dutasteride, Tadalafil, Glimepiride, Nimodipine, Diclofenac เป็นต้น

2.1 Freeze-Drying⁽²⁰⁾

กระบวนการ Freeze-Drying เป็นวิธีการทำให้ยาและตัวพาที่อยู่ในรูปสารละลายแข็งตัวด้วยการแช่เย็นที่อุณหภูมิ -80°C หรือ -20°C แล้วลดความดันเพื่อให้ผลึกแข็งของสารละลายระเหิดตัวทำละลายออกเป็นไอ วิธีนี้เหมาะสำหรับยาที่ไม่ทนความร้อนและไม่เสื่อมสลายจากการแช่เย็น เช่น Nifedipine, Sulfamethoxazole, Celecoxib, Meloxicam, Docetaxel เป็นต้น

2.2 Spray-Drying Method⁽²⁰⁾

เป็นการระเหยตัวทำละลายออกจากยาและตัวพาให้แห้ง โดยการใช้ปั๊มในการพ่นสารผสมเป็นละอองสัมผัสกับกระแสลมร้อนทำให้ตัวทำละลายระเหยออกได้อย่างรวดเร็ว ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นผงอนุภาคขนาดเล็ก ยาที่เหมาะสมกับการใช้วิธี Spray-Drying Method เช่น Valsartan, Naproxen เป็นต้น

3. Melting Solvent Method^(9, 20)

เป็นวิธีที่เกิดจากการรวมวิธี Melting Method และ Solvent Evaporation Method เข้าด้วยกัน โดยการ ละลายตัวยาด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมผสมกับตัวพาที่หลอมเหลวด้วย

ความร้อน แล้วนำไประเหยตัวทำละลายออก วิธีนี้สามารถใช้อุณหภูมิต่ำและระยะเวลาในการผสมที่น้อยกว่าวิธี Melting Method จึงเหมาะสมกับยาที่ไม่ทนความร้อนที่อุณหภูมิสูงและตัวยาที่มีจุดหลอมเหลวสูง อีกทั้งการผสมกับตัวพาที่หลอมเหลวจะช่วยให้ตัวยาระบายตัวและผสมเข้าเป็นเนื้อเดียวกันได้ง่ายกว่าวิธี Solvent Evaporation Method แต่ขั้นตอนในการเตรียมมากขึ้น จึงไม่เหมาะกับการขยายการผลิตในระดับอุตสาหกรรม

5. การพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสารสกัดฟ้าทะลายโจรในรูปแบบแข็ง

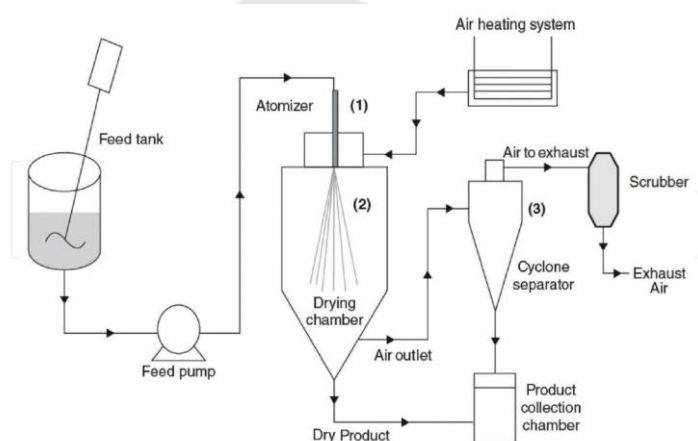
จากงานวิจัยของ Retno Sari และคณะ ในปี 2019 พบว่า ตำรับ solid dispersion ของแอนโดรกราโฟไลด์ โดยมีโคโคซานเป็นสารตัวพาและใช้วิธี ฟันให้แห้ง ในการเตรียมตำรับจะสามารถลดความเป็นผลึกของแอนโดรกราโฟไลด์ ลดจุดหลอมเหลว และมีอัตราการละลายของแอนโดรกราโฟไลด์สูงที่สุดในสูตรตำรับที่มีสัดส่วนของแอนโดรกราโฟไลด์ต่อโคโคซานเป็น 1: 5⁽²²⁾ ต่อมาในการพัฒนาตำรับ solid dispersion ของแอนโดรกราโฟไลด์ที่สารตัวพาเป็น polyvinylpyrrolidone (PVP K-30) ในสัดส่วนของแอนโดรกราโฟไลด์ต่อ PVP K-30 เป็น 1:4 พบว่าร้อยละการปลดปล่อยแอนโดรกราโฟไลด์ที่ระยะเวลา 5 นาทีใน 0.1 M HCl, phosphate buffer pH 6.8, และน้ำมากกว่าตำรับที่เป็น physical mixture และแอนโดรกราโฟไลด์เดี่ยวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อศึกษาความคงสภาพของผลิตภัณฑ์ พบว่า ตำรับ solid dispersion ที่เก็บในสภาวะ $40 \pm 2^{\circ}\text{C}/75 \pm 5\% \text{ RH}$ เป็นระยะเวลา 3 เดือน ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของ dissolution profile ใน 0.1 M HCl อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในการศึกษา in vivo ของตำรับ solid dispersion พบว่า ตำรับ solid dispersion มีค่าความเป็นพิษเฉียบพลัน 2000 mg/kg และมีประสิทธิภาพในการลดอาการบวมของหนูมากกว่ากลุ่มควบคุมและแอนโดรกราโฟไลด์เดี่ยวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ⁽²³⁾

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพัฒนาสูตรตำรับ solid dispersion tablet จากสารสกัดฟ้าทะลายโจร โดยใช้วิธีการเตรียม solid dispersion แบบ solvent evaporation ด้วย soluplus และ PEG 6000 และเตรียมตำรับยาเม็ดด้วยวิธี direct compression เนื่องจาก solid dispersion จากสารสกัดฟ้าทะลายโจรมีความสามารถในการไหล และ compressibility ที่ดี เมื่อทดสอบความสามารถในการละลาย พบว่า ยาเม็ด solid dispersion ที่ได้มีความสามารถในการละลายใน acidic buffer ที่ pH 1.2 มากกว่า phosphate buffer pH 6.8 อีกทั้ง ยาเม็ด solid dispersion ยังผ่านการทดสอบความแข็ง ความกรอบ ความเปื่อยเบนของน้ำหนักเม็ดยา ปริมาณตัวยาสสำคัญ และระยะเวลาในการแตกตัวตามเกณฑ์มาตรฐาน⁽²⁴⁾

6. กระบวนการพ่นให้แห้ง

หลักการทำงานของกระบวนการพ่นให้แห้ง⁽²⁵⁾

กระบวนการพ่นให้แห้งเป็นกระบวนการกำจัดตัวทำละลายออกด้วยการให้ความร้อนไปที่สารตัวอย่าง โดยเริ่มจากสารตัวอย่างจะถูกดูดด้วยปั๊มไปที่ atomizer เพื่อกระจายสารตัวอย่างจากของเหลวไปเป็นหยดขนาดเล็กด้วยการสเปรย์ จากนั้นหยดของเหลวจะเข้าสู่ drying gas chamber เพื่อระเหยตัวทำละลายออกด้วยการให้ความร้อน ทำให้เกิดการสร้างอนุภาคของแข็งแห้ง ไอของตัวทำละลายจะกำจัดออกจาก scrubber ส่วนอนุภาคของแข็งแห้งจะถูกลมเป่าให้เข้าสู่ cyclone separator และไปเก็บผลิตภัณฑ์ของแข็งแห้งที่ได้ที่ collector ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพประกอบ 2 ส่วนประกอบของเครื่อง spray dryer⁽²⁵⁾

7. การออกแบบการทดลอง (Design of Experiment; DOE)⁽²⁶⁾

เป็นแนวคิดในการจัดระบบเพื่อทำการทดลองและแปรผลการทดลองอย่างมีประสิทธิภาพ ร่วมกับการใช้หลักการวิเคราะห์ทางสถิติ โดยควบคุมการเปลี่ยนแปลงของตัวแปรต้น เรียกว่า "ปัจจัย" (factors) ของกระบวนการ เพื่อให้ได้ผลลัพธ์ซึ่งเป็นตัวแปรตอบสนองหรือตัวแปรตาม (Response) ที่ต้องการในกระบวนการ โดยพิจารณาจากความสัมพันธ์ของตัวแปรต้นและตัวแปรตามในรูปแบบสมการทำนาย รวมทั้งอาจมีการพิจารณาอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัย (Interaction)

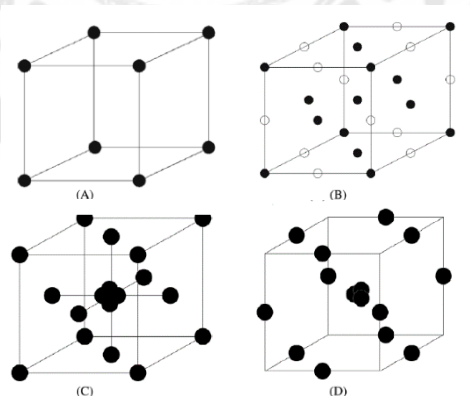
DOE จะแบ่งเป็นการออกแบบการทดลองเพื่อทดสอบเบื้องต้น สำหรับหาปัจจัยที่มีผลต่อตัวแปรตาม และการออกแบบการทดลองเพื่อทดสอบขั้นสูง สำหรับหาสูตรตำรับหรือสภาวะของกระบวนการที่ดีที่สุด โดยการวิเคราะห์ทางสถิติจากความสัมพันธ์ของตัวแปรต้นและตัวแปรตามที่ทดลอง เรียกเทคนิคนี้ว่า ออปติไมเซชัน (optimization)⁽¹⁴⁾

สำหรับการออกแบบการทดลองเพื่อทดสอบขั้นสูงที่นิยมใช้ในปัจจุบัน แบ่งออกเป็น 3 วิธี ได้แก่

1. Factorial Design คือ รูปแบบการทดลองที่มีวัตถุประสงค์หลักในการศึกษาผลกระทบหลัก (Main Effects) ที่เกิดขึ้นจากแต่ละปัจจัยหรือผลกระทบร่วมระหว่าง 2 ปัจจัย (Two-Factors or 2-Ways Interactions) หรือผลกระทบร่วม 3 ปัจจัย (Three-Factors or 3-ways Interactions) แบ่งเป็น 2 ประเภท ดังนี้

1.1. Full-Factorial Design เป็นการทดลองที่ศึกษาปัจจัยตั้งแต่ 2 ปัจจัยขึ้นไป สามารถศึกษาผลกระทบหลัก (Main Effect) ซึ่งเป็นผลกระทบของปัจจัยเดี่ยว (Main Factors) และผลกระทบร่วมระหว่างปัจจัย (Interaction Factors) โดยจำนวนวิธีทดลองทั้งหมด มีค่าเท่ากับ a^k โดยที่ a = จำนวนระดับของแต่ละปัจจัยที่ศึกษา k = จำนวนปัจจัยในการศึกษา ทั้งนี้วิธีการออกแบบการทดลองแบบ Full-Factorial Design จะครอบคลุมทุกจุดการทดลองที่เป็นไปได้ แต่ต้องใช้ค่าใช้จ่ายสูง ใช้เวลานาน และทรัพยากรจำนวนมาก เมื่อปัจจัยที่ศึกษามากกว่า 6 ปัจจัยขึ้นไป จึงอาจเปลี่ยนไปใช้วิธี Fractional factorial design ที่สามารถลดจำนวนการทดลองลงได้^(27, 28)

1.2. Fractional factorial design จะเหมือนกับวิธี Full-Factorial Design แต่จะลดจำนวนการทดลองลงโดยจำนวนการทดลองจะเป็นหนึ่งในสามของ Full-Factorial Design ซึ่งมักจะทำให้ในการศึกษาผลของปัจจัยที่มีต่อตัวแปรตาม วิธีนี้จะช่วยลดระยะเวลาและค่าใช้จ่ายในการทดลอง แต่จะได้ผลการทดลองที่ยังไม่ครอบคลุมและไม่ละเอียด⁽²⁷⁾

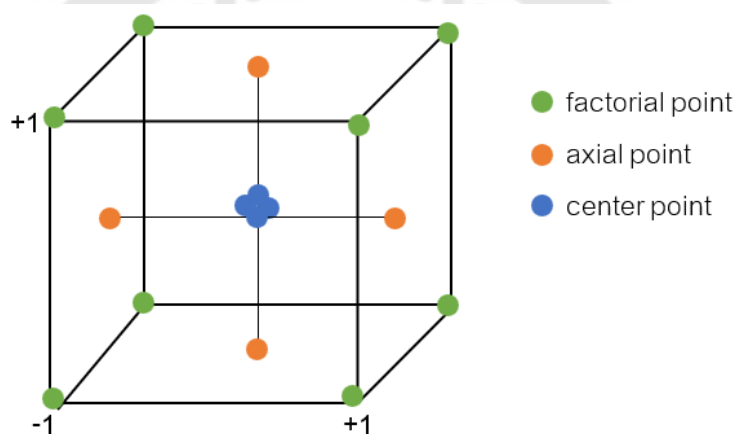


ภาพประกอบ 3 การออกแบบการทดลองเพื่อทดสอบขั้นสูง⁽²⁸⁾

(A) two level full factorial design; (B) three level full factorial design; (C) face centered central composite design; และ (D) Box-Behnken design

2. Central Composite designs (CCD) คือ รูปแบบการทดลองที่ใช้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต้นและตัวแปรตามในรูปแบบสมการพหุนามดีกรี 2 (Second-

order model) หรือ Quadratic Model โดยจำนวนวิธีทดลองทั้งหมดจะเป็นการรวมกันของจุด factorial point (ได้จากจุดการทดลองของ two level full factorial design หรือ Fractional factorial design), จุด axial point และจุด center point มีค่าเท่ากับ $a^k + ak + n_0$ เมื่อ a = จำนวนระดับของแต่ละปัจจัยที่ศึกษา k = จำนวนปัจจัยในการศึกษา n_0 คือ จำนวนการทดลองซ้ำที่ center point ดังแสดงใน ภาพที่ 4 ซึ่งระยะทางจากจุด center point ถึงจุด axial point (α) มีค่าเท่ากับ $(k)^{\frac{1}{2}}$ ถ้าทุกจุดการทดลองมีระยะห่างจากจุดศูนย์กลางเท่ากับ 1 จะเรียกว่า face centered CCD ซึ่งค่า α และ n_0 เป็นค่าที่ผู้วิจัยสามารถกำหนดเองได้ จึงทำให้แบบจำลองที่ออกแบบสามารถบิดหมุน (rotatable) ตามต้องการ และมีจำนวนการทดลองที่น้อยกว่าวิธี three level full-factorial design ส่งผลให้วิธีออกแบบการทดลองนี้เป็นที่นิยม⁽²⁷⁾



ภาพประกอบ 4 แบบจำลอง face centered CCD⁽²⁹⁾

3. Box-Behnken Design (BBD) คือ รูปแบบการทดลองที่ใช้ศึกษาตัวแปรต้นที่มี 3 ระดับ โดยจำนวนวิธีทดลองทั้งหมดจะเกิดจากการรวมกันของ two level full factorial design และ balanced incomplete block design มีค่าเท่ากับ $4k(k-1) + n_0$ เมื่อ k = จำนวนปัจจัยในการศึกษา n_0 คือ จำนวนการทดลองที่ center point ซึ่งจะมีจำนวนการทดลองน้อยกว่าวิธี three level full-factorial design และ Central Composite designs ข้อดีของวิธีนี้ คือ สามารถประหยัดค่าใช้จ่ายในการทดลองได้มากที่สุด จึงเหมาะกับการใช้ในกรณีที่ปัจจัยที่ศึกษามีราคาแพงมาก หรือมีจำนวนไม่เพียงพอ แต่อาจไม่ครอบคลุมทุกจุดการทดลองและแบบจำลองที่ออกแบบไม่สามารถบิดหมุนได้⁽³⁰⁾

8. การประยุกต์การออกแบบการทดลองกับการพัฒนาผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัว

จากงานวิจัยของ Ashok Mahajan และคณะในปี 2020 ที่ได้ออกแบบการทดลอง เพื่อหา Optimization ของสูตรตำรับ spray dried solid dispersion ของยา nevirapine พบว่า ตัวแปรที่สำคัญจากการทดสอบ Plackett and Burman screening design ได้แก่ สัดส่วนของตัวยาสำคัญ ต่อ polymer, ความเข้มข้นของ silicon dioxide, และ feed flow rate ซึ่งจะมีผลต่อผลได้จากการกระบวนการผลิตและร้อยละการปลดปล่อยยาที่ 60 นาที (Q60) โดยในการออกแบบการทดลองสำหรับหา Optimization ของสูตรตำรับจะใช้วิธี Central composite design (CCD) พบว่า สมการความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต้นกับตัวแปรตามเป็น quadratic model โดยสัดส่วนของตัวยาสำคัญต่อ polymer จะแปรผันตรงกับร้อยละการปลดปล่อยยาที่ 60 นาที ความเข้มข้นของ silicon dioxide จะแปรผันตรงกับผลได้จากการกระบวนการผลิตและ feed flow rate จะแปรผกผันกับผลได้จากการกระบวนการผลิต⁽¹⁵⁾

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ออกแบบการทดลอง เพื่อพัฒนาตำรับ solid dispersion ด้วยวิธี solvent evaporation ของยา ezetimibe ซึ่งตัวแปรที่ศึกษาเป็นปริมาณของ gelucire 50/13 และ polyvinyl pyrrolidone K30 ต่อย่อยละการปลดปล่อยยาที่ 5, และ 30 นาที โดยใช้วิธี Central composite design (CCD) ในการออกแบบการทดลอง⁽³¹⁾

9. ความคงสภาพของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจากสารสกัดฟ้าทะลายโจร

เมื่อพิจารณารูปแบบเภสัชภัณฑ์ของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจากสารสกัดฟ้าทะลายโจร พบว่า จากนิยามของ United States Pharmacopeia (USP)⁽³²⁾ Suspension เป็นผลิตภัณฑ์ที่มี 2 เฟส ประกอบด้วย อนุภาคของแข็งกระจายในเฟสของเหลว ซึ่งรูปแบบยานี้สามารถใช้กับวิธีการให้ยาทางปาก ทางการสูดดมและทางารฉีด เป็นต้น Powder for reconstitution เป็นผลิตภัณฑ์ผงแห้งที่จำเป็นต้องเติมน้ำหรือ diluent ก่อนการให้ยา ซึ่งรูปแบบยานี้มักใช้กับตัวยาสำคัญที่มีความคงสภาพทางกายภาพหรือทางเคมีลดลง เมื่อเตรียมในรูปแบบยาน้ำสารละลายหรือยาน้ำแขวนตะกอน ดังนั้นผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจากสารสกัดฟ้าทะลายโจรจึงคล้ายกับเภสัชภัณฑ์ในรูปแบบ Powder for reconstitution ขณะก่อนการผสมน้ำ และคล้ายกับเภสัชภัณฑ์ในรูปแบบยาน้ำแขวนตะกอน หลังการผสมน้ำ สำหรับการให้ยา

ในการขึ้นทะเบียนตำรับยาสมุนไพรในประเทศไทย ได้อ้างอิงหลักเกณฑ์และวิธีการศึกษาความคงสภาพเภสัชภัณฑ์จาก ASEAN Guidelines on Stability Study and Shelf-Life of Traditional Medicines โดยกำหนดพารามิเตอร์สำหรับทดสอบความคงสภาพของเภสัชภัณฑ์

รูปแบบผงรับประทาน ได้แก่ ลักษณะภายนอก ปริมาณตัวยาสำคัญ ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ และ ปริมาณน้ำ พารามิเตอร์สำหรับเภสัชภัณฑ์รูปแบบยาน้ำแขวนตะกอน ได้แก่ ลักษณะภายนอก ปริมาณตัวยาสำคัญ ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ ความหนืด pH ขนาดอนุภาค และ Resuspendability⁽³³⁾ เนื่องจากผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจากสารสกัดฟ้าทะลายโจรมีรูปแบบเภสัชภัณฑ์คล้ายกับ ยาน้ำแขวนตะกอนและยาน้ำแขวนตะกอน จึงต้องมีการทดสอบความคงสภาพตามพารามิเตอร์ของ ทั้งสองรูปแบบเภสัชภัณฑ์ และต้องกำหนดพารามิเตอร์เพิ่มเติมให้สอดคล้องกับวิธีการใช้และ คุณสมบัติทางกายภาพเคมีของผลิตภัณฑ์ เพื่อให้ครอบคลุมความคงสภาพของเภสัชภัณฑ์ทาง กายภาพ เคมี และชีวภาพ ในระหว่างการเก็บรักษา รวมทั้งกำหนดเกณฑ์ในการทดสอบและ วิธีการทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 2



ตาราง 2 stability protocol

Parameters	Acceptance Criteria	Method
ลักษณะภายนอก	ผงหยาบสีเขียวอมเหลือง	Visual method
ปริมาณน้ำ	NMT 5.0% ⁽³²⁾	Loss on drying ⁽³²⁾
ความสามารถในการเปียก	NMT 5 นาที	wettability method (Mixing time)
pH	6.2-7.4 ⁽³⁴⁾	pH
ปริมาณตัวยาสำคัญ	90-110%LA ⁽³²⁾	TLC-densitometry ⁽³⁵⁾
ความเป็นผลึก	ไม่เปลี่ยนแปลงจากเวลาเริ่มต้น	Powder X-ray diffraction ⁽²²⁾
ความสามารถในการปลดปล่อย แอนโดรกราโฟไลด์	ไม่เปลี่ยนแปลงจากเวลาเริ่มต้น	Dissolution method ^(36, 37)
ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์	-Total Aerobic Microbial Count ไม่เกิน 10 ² cfu/g -Total Yeast and Mold Count ไม่เกิน 10 cfu/g -ไม่พบ <i>S. aureus</i> -ไม่พบ <i>P. aeruginosa</i> ⁽³²⁾	Microbial limit test ⁽³²⁾
ขนาดอนุภาค	ไม่เปลี่ยนแปลงจากเวลาเริ่มต้น	Scanning electron microscopy
ความหนืด	ไม่เปลี่ยนแปลงจากเวลาเริ่มต้น	Viscosity (plate and plate viscometer)

สภาวะที่ใช้ในการทดสอบความคงสภาพของผลิตภัณฑ์

จาก ASEAN Guidelines on Stability Study and Shelf-Life of Traditional Medicines กำหนดสภาวะในการทดสอบความคงสภาพ ได้แก่ สภาวะที่ใช้ศึกษาในระยะยาว (long term stability test) ซึ่งจะมีระยะเวลาในการเก็บอย่างน้อย 12 เดือนและเก็บตัวอย่างทุก 3 เดือน

จำนวนรอบการผลิตอย่างน้อย 2 รอบการผลิต และสภาวะเร่ง (accelerated stability test) ซึ่งจะมีระยะเวลาในการเก็บอย่างน้อย 6 เดือนและเก็บตัวอย่างทุก 3 เดือน จำนวนรอบการผลิตอย่างน้อย 2 รอบการผลิต โดยถ้าผลิตภัณฑ์สามารถเก็บที่อุณหภูมิห้อง จะมีสภาวะในการเก็บรักษา ดังนี้ สภาวะที่ศึกษาระยะยาวเก็บที่อุณหภูมิ $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ และความชื้นสัมพัทธ์ $75 \pm 5\% \text{ RH}$ สภาวะเร่งเก็บที่อุณหภูมิ $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ และความชื้นสัมพัทธ์ $75 \pm 5\% \text{ RH}$ ถ้าผลิตภัณฑ์ต้องเก็บที่ตู้เย็นจะมีสภาวะในการเก็บรักษา ดังนี้ สภาวะที่ศึกษาระยะยาวเก็บที่อุณหภูมิ $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ และความชื้นสัมพัทธ์ $60 \pm 5\% \text{ RH}$ สภาวะเร่งเก็บที่อุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ความชื้นสัมพัทธ์ $60 \pm 5\% \text{ RH}$ ⁽³³⁾

จากการศึกษาความคงสภาพของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจากแอนโดรกราไฟไลด์ พบว่า ผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวของแอนโดรกราไฟไลด์ที่ใช้ตัวพาเป็น polyvinylpyrrolidone (PVP K-30) ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของความสามารถในการละลายใน 0.1 M HCl และความเป็นผลึกของผลิตภัณฑ์ เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ความชื้นสัมพัทธ์ $75 \pm 5\% \text{ RH}$ เป็นระยะเวลา 3 เดือน⁽²³⁾ นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ศึกษาความคงสภาพของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวของแอนโดรกราไฟไลด์กับ SiO_2 โดยเก็บที่อุณหภูมิ $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ความชื้นสัมพัทธ์ $75 \pm 5\% \text{ RH}$ เป็นระยะเวลา 3 เดือน พบว่า ปริมาณตัวยาสำคัญและความสามารถในการละลายใน 0.2% Sodium dodecyl sulfate และน้ำไม่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ⁽³⁾

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์ เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

- ข้อนเขา
- เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Sartorius, Germany)
- ถุงผ้าสมุนไพร
- เครื่องชั่งทศนิยม 5 ตำแหน่ง (Mettler Toledo, Switzerland)
- Beaker 50, 100, 250, 600, 1000 ml (Pyrex, Corning incorporated, USA)
- Cylinder (Pyrex, Corning incorporated, USA)
- Dialysis tubing (10000 MWCO, Lot # NK176444, SnakeSkin, USA)
- Filter paper (No.1, Whatman, England)
- Glass vacuum filter holders (Sartorius AG, Germany)
- Heating mantle (MTOPs, Korea)
- Hot plate stirrer (Jenway, England)
- Laboratory bottles 500 ml (Duran, Germany)
- Laboratory cutting mill (Pulverisette 15", Fritsch, Germany)
- Microcentrifuge tube 2 ml (no brand, Mexico)
- Magnetic stirrer (Jenway, England)
- Micropipette 20-200 μ l, 100-1000 μ l (Biohit Proline, Finland)
- Mini spray dryer (B-290, Buchi, Switzerland)
- Paraffin film (Bemis, USA)
- Pipette tip 1-200 μ l, 100-1000 μ l (Kirgen, China)
- Rotary evaporator (R-300, Buchi, Switzerland)
- Soxhlet extractor (Buchi, Switzerland)
- Syringe 5 ml (Nipro, Thailand)
- Syringe filter (nylon 0.45 μ m, ANPEL Laboratory Technologies Inc., China)
- Test tube 16x150 mm (Pyrex, Corning incorporated, Mexico)
- Test tube rack
- TLC-densitometer มีส่วนประกอบ ดังนี้

- Automatic developing chamber 2 (CAMAG, Switzerland)
- Semiautomatic TLC sampler (CAMAG, Switzerland)
- TLC scanner 4 (CAMAG, Switzerland)
- TLC visualizer 2 (CAMAG, Switzerland)
- HPTLC plate silica gel 60 F254 (20x10 cm) ขนาดอนุภาค 5-6 μm (Merck, Germany)
- Vacuum pump (Sartorius AG, Germany)
- Vortex mixer (Genie 2, Scientific Industries, USA)
- Rheometer (Thermo scientific, Germany)
- Dissolution tester
- Enhancer cell
- Petrifilm™ (3M, USA)

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

- ผงฟ้าทะลายโจรแห้ง (โครงการทับทิมสยาม 05 จ.สระแก้ว, ประเทศไทย)
- สารมาตรฐานแอนโดรกราโฟไลด์ (standard andrographolide) (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, ประเทศไทย)
- Andrographolide powder
- ไคโตซาน
- Potassium sorbate
- Ethyl acetate (JT Baker, USA)
- Formic acid (CARLO ERBA Reagents, France)
- Mannitol (Himedia, India)
- Methanol (RCI labscan, Bangkok, Thailand)
- Poloxamer 188 (MySkinRecipes, Thailand)
- Purified water
- Sucralose (PC drug center CO., Ltd, Thailand)
- Toluene (QReC, New Zealand)
- 99% Ethanol (EMSURE Merck KGaA, Germany)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การสกัดฟ้าทะลายโจรด้วยเครื่อง Soxhlet extractor

- 1.1. ลดขนาดส่วนเหนือดินของฟ้าทะลายโจรอบแห้งด้วยเครื่องบดสมุนไพร (laboratory cutting mill pulverisette 15”) ให้มีขนาด 0.5 mm โดยผ่านร่อนขนาด 30 mesh จำนวน 333.3 g
- 1.2. เตรียม 85 %v/v ethanol ปริมาตร 3,400 ml โดยตวง absolute ethanol ปริมาตร 2,892.9 ml และปรับปริมาตรจนครบ 3400 ml เหย้าให้เข้ากัน ตวง 85 %v/v ethanol ปริมาตร 3,333.3 ml สำหรับสกัดผงแห้งฟ้าทะลายโจรในอัตราส่วน ผงแห้งฟ้าทะลายโจร: 85 %v/v ethanol (1: 10) บรรจุในถังสแตนเลสขนาด 5,000 ml กวนผสมเป็นระยะๆ ประมาณ 1-2 ชั่วโมง
- 1.3. ประกอบเครื่อง Soxhlet extractor เทผงแห้งฟ้าทะลายโจรใน 85 %v/v ethanol ลงใน thimble (ถุงผ้า) ปลอ่ยให้ 85 %v/v ethanol ที่ผ่านถุงผ้าออกไปไหลลงสู่ round bottom flask ขนาด 5,000 ml มัดปากถุงให้แน่น เพื่อป้องกันไม่ให้ผงฟ้าทะลายโจรหลุดออกไปจากถุงผ้า
- 1.4. สกัดผงฟ้าทะลายโจรด้วยเครื่อง Soxhlet extractor ที่ระดับอุณหภูมิ เบอร์ 8 จนกระทั่งสีของตัวทำละลายสกัดเปลี่ยนจากสีเขียวเข้มเป็นสีเหลืองอ่อน (เวลาสกัด 5 วัน)
- 1.5. กรอง ethanolic extract ด้วยสำลี 2 รอบ กระดาษกรอง whatman No.1 จำนวน 2 รอบ และ 0.45 μ m membrane filter 1 รอบ ตามลำดับ ผ่านเครื่องกรองสุญญากาศ
- 1.6. นำ AP ethanolic extract ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator เป็นเวลา 70 นาที ภายใต้สภาวะ: ความดัน 190 mbar, อัตราเร็วในการหมุน 100 rpm, อุณหภูมิในเครื่องทำความร้อน 60 °C, อุณหภูมิในเครื่องทำความเย็น 4 °C, อุณหภูมิของไอระเหย 38 °C, และระยะเคลื่อนที่ของ round bottom flask 201 mm จนกระทั่งไม่พบตัวทำละลายสกัดระเหยออกไปได้ และบันทึกน้ำหนักสารสกัดหยาบฟ้าทะลายโจร (AP crude extract)
- 1.7. นำ AP crude extract ที่เหลือทั้งหมดละลายด้วย absolute ethanol จนได้ concentrated AP ethanolic extract จากนั้นเก็บในตู้ -20 °C หากมีตะกอนนอนก้น ให้กรองด้วย 0.45 μ m membrane filter ผ่านเครื่องกรองสุญญากาศ
- 1.8. วิเคราะห์ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ใน concentrated AP ethanolic extract และ crude extract ด้วย TLC- densitometer

2. การเตรียมผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจากสารสกัดฟ้าทะลายโจร
 - 2.1. ผสม Glacial acetic acid ในน้ำกลั่น 200 ml โปรมไคโตซานและคนด้วย magnetic stirrer จนไคโตซานละลายหมด ดังแสดงปริมาณสารที่ใช้ในตารางที่ 3
 - 2.2. แร้ง AP powder ผ่านแร้งที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางของรูเปิด 0.5 mm ละลายใน absolute ethanol
 - 2.3. ละลาย Poloxamer 188 ในน้ำกลั่น 16 ml คนจนละลายหมด เทผสมลงใน (2.2) คนผสมจนได้สารละลายโปร่งแสง
 - 2.4. ตวงสารสกัดหยาบฟ้าทะลายโจร (conc AP ethanolic extract; CAE) และเติม absolute ethanol ลงผสม คนให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปกรองผ่าน 0.45 μ m membrane filter ผสมลงใน (2.3)
 - 2.5. ชั่ง sucralose 1.2 g ละลายในน้ำ 20 ml จนได้สารละลายใส
 - 2.6. ชั่ง mannitol 1.2 g ละลายใน (2.5) จนได้สารละลายใส เทผสมลงใน (2.4)
 - 2.7. เติม potassium sorbate 0.012 g ผสมลงใน (2.6) คนผสมให้เข้ากัน
 - 2.8. ผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร (2.7) ลงในสารผสมไคโตซาน (2.1) ชะสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ติดตามภาชนะบรรจุด้วย absolute ethanol ผสมลงในสารผสมไคโตซานและปรับปริมาตรให้ครบ 400 ml ด้วยน้ำกลั่น
 - 2.9. นำสารละลายผสม (2.8) ไปผ่านกระบวนการพ่นให้แห้งด้วย Buchi mini spray dryer (Model B-290) โดยใช้ fluid nozzle atomization ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.0 mm ภายใต้สภาวะ: อุณหภูมิลมเข้า (inlet temperature) 140 °C, อุณหภูมิลมออก (outlet temperature) 85 °C, อัตราการพ่นสารละลาย (peristaltic pump flow) 22 %, อัตราการหมุนเวียนอากาศ (air flow rate) 60 L/hr, และ air aspiration rate 100% เก็บผลิตภัณฑ์ไว้ในตู้ -20 °C ระหว่างรอการวิเคราะห์ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ และศึกษาการปลดปล่อยแอนโดรกราโฟไลด์

ตาราง 3 สูตรตำรับในการเตรียมผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจากสารสกัดฟ้าทะลายโจร จากการออกแบบการทดลองด้วย CCD

Formulation	Ingredients									
	AP in CAE (g)	AP powder (g)	chitosan (g)	Glacial acetic acid (ml)	Poloxamer 188 (g)	Sucralose (g)	Mannitol (g)	Ethanol (ml)	Potassium sorbate (g)	Purified water qs. to
F1	1.5	2.5	4	8	0.7	1.2	1.2	73	0.012	400
F2	1.5	2.5	4	8	1	1.2	1.2	73	0.012	400
F3	2	2	4	8	1	1.2	1.2	120	0.012	400
F4	1.5	2.5	4	8	0.7	1.2	1.2	73	0.012	400
F5	1	3	4	8	0.4	1.2	1.2	26	0.012	400
F6	1.5	2.5	4	8	0.7	1.2	1.2	26	0.012	400
F7	1.5	2.5	4	8	0.7	1.2	1.2	120	0.012	400
F8	2	2	4	8	1	1.2	1.2	26	0.012	400
F9	1.5	2.5	4	8	0.7	1.2	1.2	73	0.012	400
F10	2	2	4	8	0.4	1.2	1.2	120	0.012	400
F11	1.5	2.5	4	8	0.7	1.2	1.2	73	0.012	400
F12	1	3	4	8	0.4	1.2	1.2	120	0.012	400
F13	1	3	4	8	1	1.2	1.2	26	0.012	400
F14	1.5	2.5	4	8	0.7	1.2	1.2	73	0.012	400
F15	1	3	4	8	0.7	1.2	1.2	73	0.012	400
F16	1.5	2.5	4	8	0.7	1.2	1.2	73	0.012	400
F17	2	2	4	8	0.4	1.2	1.2	26	0.012	400
F18	2	2	4	8	0.7	1.2	1.2	73	0.012	400
F19	1	3	4	8	1	1.2	1.2	120	0.012	400
F20	1.5	2.5	4	8	0.4	1.2	1.2	73	0.012	400

3. การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบชั้นบางและเครื่องเดนซิโตมิเตอร์ (Thin Layer Chromatography (TLC)-densitometer)

3.1. เตรียมสารมาตรฐานแอนโดรกราโฟไลด์ (standard andrographolide; std AP) ความเข้มข้น 1 mg/ml

3.1.1. ชั่งสารมาตรฐานแอนโดรกราโฟไลด์ 1 mg ใส่ microcentrifuge tube ขนาด 2 ml

3.1.2. ปิเปต methanol 1 ml ใส่ใน microcentrifuge tube เดิม เขย่าจนสารละลายได้

- 3.1.3. นำไป spot บนแผ่น TLC ปริมาตร 1, 2, 4, 6, 8 μl แต่ละตำแหน่งที่ spot จะมีปริมาณ std AP เท่ากับ 1, 2, 4, 6, 8 μg ตามลำดับ
- 3.1.4. หาคความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างปริมาณ std AP กับค่าการดูดกลืนแสง UV ที่ความยาวคลื่น 224 nm
- 3.2. เตรียมตัวอย่าง concentrated AP ethanolic extract
 - 3.2.1. ปิเปิด concentrated AP ethanolic extract 150 μl ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 2 ml
 - 3.2.2. ปิเปิด methanol 1,850 μl ใส่ใน microcentrifuge tube เดิม เขย่าให้สารตัวอย่างละลาย
 - 3.2.3. กรองผ่าน syringe filter ขนาด 0.45 μm บรรจุใน microcentrifuge tube ใหม่
 - 3.2.4. นำไป spot บนแผ่น TLC ปริมาตร 1 μl และ ปริมาตร 2 μl
- 3.3. เตรียมตัวอย่าง AP crude extract ความเข้มข้น 10 mg/ml
 - 3.3.1. ชั่ง AP crude extract 10 mg ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 2 ml
 - 3.3.2. ปิเปิด methanol 1,000 μl ใส่ใน microcentrifuge tube เดิม เขย่าให้สารตัวอย่างละลาย
 - 3.3.3. กรองผ่าน syringe filter ขนาด 0.45 μm บรรจุใน microcentrifuge tube ใหม่
 - 3.3.4. นำไป spot บนแผ่น TLC ปริมาตร 2 μl และ ปริมาตร 4 μl
- 3.4. เตรียมตัวอย่างผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจากสารสกัดฟ้าทะลายโจร ความเข้มข้น 7.5 mg/ml
 - 3.4.1. ชั่งสารตัวอย่าง 15 mg ใส่ microcentrifuge tube ขนาด 2 ml
 - 3.4.2. ปิเปิดน้ำกลั่น 300 μl ใส่ใน microcentrifuge tube เดิม เขย่าสารให้เป็นเนื้อเดียวกัน
 - 3.4.3. ปิเปิด methanol 1,700 μl ใส่ใน microcentrifuge tube เดิม ผสมให้เข้ากันและบดเจลที่เกิดจนขนาดเล็กลงด้วย stirring rod
 - 3.4.4. นำไป centrifuge ที่ 3000 rpm ณ อุณหภูมิ 25 C เป็นเวลา 30 นาที
 - 3.4.5. นำส่วน supernatant ไปกรองผ่าน syringe filter บรรจุใน microcentrifuge tube ใหม่
 - 3.4.6. นำไป spot บนแผ่น TLC ปริมาตร 1 μl และ ปริมาตร 2 μl

3.5. เตรียม mobile phase โดย toluene: ethyl acetate: formic acid (5: 3.5: 1.5; v/v/v)
40 ml

3.5.1. เติม ethyl acetate จำนวน 14 ml ลงในขวด Duran

3.5.2. เติม formic acid (88%) จำนวน 6 ml ลงในขวด Duran เขย่าให้เข้ากัน

3.5.3. เติม toluene จำนวน 20 ml ลงในขวด Duran เขย่าให้เข้ากัน

3.5.4. ปิดผนึกด้วย paraffin film เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3.6. วิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญด้วยเครื่อง TLC–densitometer ดังนี้

3.6.1. กำหนดสารที่ต้องการทดสอบและปริมาตรของสารที่ต้องการ spot ลงบน HPTLC silica gel G60 F254 glass plates (20 cm × 10 cm) ขนาดอนุภาค 5-6 μm ที่แห้งสนิท กำหนดให้ความหนาของแถบที่ spot คือ 6 mm และระยะห่างระหว่างแถบเท่ากับ 1.1 cm

3.6.2. ใช้ syringe ดูดสารมาตรฐานแอนโดรกราโฟไลด์ และสารตัวอย่างตามปริมาตรที่เครื่องระบุ

3.6.3. นำ syringe ที่ดูดสารแล้วใส่ในเครื่อง TLC–densitometer

3.6.4. เครื่อง TLC–densitometer จะเริ่ม spot บนแผ่น TLC โดยอัตโนมัติ

3.6.5. เมื่อ spot เรียบร้อยแล้ว นำแผ่น TLC ไปใส่ในเครื่อง TLC–chamber

3.6.6. เติม mobile phase ปริมาตร 10 ml และ 25 ml ตามลำดับ ลงในเครื่อง TLC–chamber กำหนดสภาวะดังนี้: ระยะของแผ่น TLC ที่จุ่มอยู่ใน chamber คือ 8.5 cm, เวลาในการควบคุมความชื้น คือ 5 นาที, เวลาในการให้ mobile phase อิ่มตัว คือ 15 นาที, เวลาในการทำให้แผ่นแห้งก่อนจุ่มในเฟสเคลื่อนที่ คือ 5 นาที, และเวลาในการทำให้แผ่นแห้งหลังจุ่มในเฟสเคลื่อนที่ คือ 5 นาที

3.6.7. รอจนเครื่องทำงานเสร็จเรียบร้อย นำแผ่น TLC มาส่องด้วยเครื่อง TLC visualizer ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 nm

3.6.8. นำแผ่น TLC มาสแกนด้วยเครื่อง TLC scanner ที่ความยาวคลื่น 224 nm, ขนาดของ slit คือ 4.0 mm × 0.3 mm และความเร็วที่ใช้ในการสแกน คือ 20 mm/s

3.6.9. สร้างกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่าง peak area กับปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ (μg)

3.6.10. วิเคราะห์ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในสารตัวอย่าง

4. การศึกษาการปลดปล่อยแอนโดรกราโฟไลด์ออกจากผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจากสารสกัดฟ้าทะลายโจร โดยใช้สารละลาย methanol 50%v/v เป็นตัวกลางในการปลดปล่อย (release medium) เนื่องจากความสามารถในการละลายของแอนโดรกราโฟไลด์ใน 50%v/v methanol เป็น 1.471 mg/ml ซึ่งถ้าปริมาตรตัวกลางในการปลดปล่อย 200 ml จะมีปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ที่ละลายได้เป็น 294.225 mg ซึ่งมากกว่าปริมาณ AP ในตัวอย่างทดสอบ 5.35 เท่า ดังนั้นสารตัวอย่างที่มีปริมาณ AP เทียบเท่า 55 mg จึงสามารถละลายใน 50%v/v methanol ได้ด้วยสภาวะที่เป็น sink condition จึงเลือก 50%v/v methanol เป็นตัวกลางในการปลดปล่อย โดยมีวิธีการทดสอบดังนี้
 - 4.1. ชั่งสารตัวอย่างให้มีปริมาณ AP เทียบเท่า 55 mg บรรจุในปิกเกอร์
 - 4.2. ปิเปตน้ำกลั่น 2 ml คนผสมจนสารตัวอย่างเกิดเป็นเจลอย่างสมบูรณ์ บรรจุเจลสารตัวอย่างใน enhancer cell หลังจากนั้นปิดด้วย artificial membrane made of regenerated cellulose (MW cut off 10,000 g/mol)
 - 4.3. ตวงสารละลาย 50 % MeOH ปริมาตร 200 ml บรรจุใน vessel ใส่ enhancer cell ลงใน vessel
 - 4.4. ศึกษาการปลดปล่อย AP ใน 50 % MeOH โดยเก็บ release medium ครั้งละ 5 ml แบบแทนที่ ณ เวลา 15 นาที – 96 ชั่วโมง และเติม 50 % MeOH ในอัตรา 0.5 - 1 ml/hr ภายหลัง collect sample หรือก่อน collect sample ในครั้งถัดไป เมื่อระดับ dissolution medium ลดลง
 - 4.5. สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง AP conc vs absorbance โดยชั่ง AP china ปริมาณ 50 mg ใส่ใน volumetric flask ขนาด 10 ml ปรับปริมาตรให้ครบ 10 ml ด้วย MeOH ปิเปตสารละลาย 5 mg/ml AP ปริมาตร 1 ml ใส่ใน volumetric flask ขนาด 10 ml ปรับปริมาตรให้ครบ 10 ml ด้วย 50 % MeOH ปิเปตสารละลาย 0.5 mg/ml AP ปริมาตร 200, 400, 800, 1,200, 1,600 μ l ใส่ใน volumetric flask ขนาด 10 ml ปรับปริมาตรให้ครบ 10 ml ด้วย 50 % MeOH จะได้สารละลาย AP ความเข้มข้น 10, 20, 40, 60, 80 μ g/ml ตามลำดับ นำไปวัดค่าดูดกลืนแสง UV ที่ 224 nm
 - 4.6. วัดค่าดูดกลืนแสง UV ที่ 224 nm ของ released medium ที่เก็บ ณ เวลาต่างๆ หากตัวอย่าง มีค่า absorbance ไม่อยู่ในช่วง standard curve ให้เจือจางด้วย 50 % MeOH
 - 4.7. วิเคราะห์ปริมาณ AP ที่เหลือในตัวอย่าง หลังจากศึกษาการปลดปล่อยเป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยกระจายสารตัวอย่างใน MeOH ปริมาตร 20 ml ใน centrifuge tube นำไป

centrifuge ที่ 6,000 rpm ณ อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 30 นาที นำส่วน supernatant วัดค่าดูดกลืนแสง UV ที่ 224 nm

5. การศึกษาความหนืดของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจากสารสกัดฟ้าทะลายโจร

ซึ่งสารตัวอย่าง 270 mg ละลายในน้ำกลั่น 2 ml คนผสมจนละลายเข้ากันทั้งหมดและบรรจุลงในช่องบรรจุตัวอย่าง วัดความหนืดของตัวอย่างด้วยเครื่อง plate and plate viscometer ที่อุณหภูมิ 25°C ระยะห่างระหว่าง plate เป็น 0.2 mm และที่ shear rate เป็น 10, 100, 1000 1/s หรือที่ shear stress เป็น 110, 330, 440 Pa ทดสอบซ้ำทั้งหมด 6 ครั้งและคำนวณค่าเฉลี่ยความหนืดของสารตัวอย่าง

6. การศึกษาความสามารถในการเปียกของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจากสารสกัดฟ้าทะลายโจร (wettability)

- 6.1. ซึ่งสารตัวอย่าง ปริมาณ 270 mg ลงในขวดบรรจุ
- 6.2. เติมน้ำกลั่น 2 ml ปิดฝาขวด
- 6.3. ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex เบอร์ 8 จนสารตัวอย่างเป็นเนื้อเดียวกัน
- 6.4. จับเวลาตั้งแต่เริ่มผสมจนถึงเวลาที่สารตัวอย่างเป็นเนื้อเดียวกัน บันทึกผลการทดลอง

7. การออกแบบการทดลอง สำหรับทำ optimization โดยใช้โปรแกรม design expert version 8

การออกแบบการทดลองนี้จะใช้วิธี central composite design แบบ face centered โดยมีตัวแปรต้นที่เป็นตัวแปรด้านสูตรตำรับของกระบวนการพ่นให้แห้ง ได้แก่ ร้อยละของปริมาณเอทานอล (6.50-30%) ร้อยละของปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในสารสกัดฟ้าทะลายโจร (0.25-0.5%) และร้อยละของปริมาณ poloxamer (0.1-0.25%) แต่ละตัวแปรจะมีทั้งหมด 3 ระดับและที่จุด center จะทำซ้ำ จำนวน 5 การทดลอง รวมจำนวนการทดลองทั้งหมดเป็น 20 การทดลอง รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 3

ตัวแปรตามที่ศึกษา มีดังนี้ ระยะเวลาที่ร้อยละ 95 ของแอนโดรกราโฟไลด์ที่ปลดปล่อยออกจากผลิตภัณฑ์ ระยะเวลาที่ความเข้มข้นแอนโดรกราโฟไลด์ที่ปลดปล่อยมากกว่าระดับ MIC ความหนืด และความสามารถในการเปียกของผลิตภัณฑ์ จากนั้นจะวิเคราะห์ผลการทดลองของแต่ละตัวแปร โดยสร้างสมการความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรตามและตัวแปรต้น จากนั้นสร้างแผนภาพแสดงชั้นความสูงซ้อนทับกัน (Contour overlay diagrams) สำหรับการทำ optimization เพื่อให้

ได้สูตรตำรับที่เป็นผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจากสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่มีคุณสมบัติทางกายภาพเคมีดีที่สุด โดยสถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล คือ ANOVA

8. การศึกษาความคงสภาพของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจากสารสกัดฟ้าทะลายโจร

นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์ในบรรจุภัณฑ์ที่ปิดสนิท (บรรจุผลิตภัณฑ์ให้มีปริมาณ AP เทียบเท่า 55 mg/vial) จำนวนรอบการผลิต อย่างน้อย 2 รอบการผลิต ใส่ในกล่องพลาสติกพร้อมเทอร์โมมิเตอร์และ NaCl อิมมัวที่มีความชื้นสัมพัทธ์ $60 \pm 5\%$ RH หรือ $75 \pm 5\%$ RH เก็บในตู้เย็น (5 ± 3 °C) หรือห้องควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 °C หรือที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 °C) เป็นระยะเวลา 6 เดือน โดยจะเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 3, 6 เดือน สำหรับทดสอบคุณภาพตามหัวข้อต่อไปนี้

8.1. ลักษณะภายนอก สี

สังเกตความเปลี่ยนแปลงของผลิตภัณฑ์ด้วยตาเปล่า โดยสังเกตลักษณะภายนอกและสีแล้วบันทึกผลการทดสอบ

8.2. ทดสอบหาปริมาณน้ำในผลิตภัณฑ์ ด้วยวิธี Loss on drying

8.2.1. ชั่งสารตัวอย่าง 1 g เป็นน้ำหนักเริ่มต้น

8.2.2. นำสารตัวอย่างไปอบใน hot air oven ที่ 105°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

8.2.3. นำสารตัวอย่างมาชั่งอีกครั้ง คำนวณหาน้ำหนักที่หายไป โดยใช้สูตร

$$\%W = (W1 - W2) / W1 \times 100$$

โดย %W คือ ร้อยละของน้ำหนักที่หายไป, W1 คือ น้ำหนักของตัวอย่างก่อนอบ, W2 คือ น้ำหนักของตัวอย่างหลังอบ

8.3. ทดสอบความสามารถในการเปียกของผลิตภัณฑ์ ตามวิธีทดสอบในข้อ 6

8.4. ทดสอบ pH ของผลิตภัณฑ์ ด้วยเครื่อง pH meter

8.4.1. เปิดเครื่อง pH meter

8.4.2. ล้างปลายอิเล็กโทรดด้วยน้ำกลั่นและเช็ดปลายอิเล็กโทรดให้แห้ง

8.4.3. จุ่มอิเล็กโทรดลงในบัฟเฟอร์มาตรฐาน pH 7.00

8.4.4. กดปุ่ม calibrate รอจนเครื่องอ่านค่าได้ pH 7.00

8.4.5. ล้างปลายอิเล็กโทรดด้วยน้ำกลั่นแล้วเช็ดให้แห้ง

8.4.6. ทำซ้ำข้อ 8.4.3-8.4.5 อีก 1 ครั้งด้วยการทดสอบในบัฟเฟอร์มาตรฐาน pH 4.00

8.4.7. จุ่มอิเล็กโทรดลงในสารตัวอย่าง บันทึกค่า pH ของผลิตภัณฑ์

8.4.8. ล้างอิเล็กโทรดด้วยน้ำกลั่นแล้วเช็ดให้แห้ง

8.4.9. แหะเล็กโทรดไว้ในน้ำกลั่น

8.5. วิเคราะห์ปริมาณตัวยาสำคัญของผลิตภัณฑ์ ตามวิธีทดสอบในข้อ 3

8.6. ทดสอบความเป็นผลึกของผลิตภัณฑ์ด้วยวิธี Powder X-ray diffraction (PXRD)

นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์ส่งวิเคราะห์ที่สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ด้วยเครื่อง Philips X'Pert X-ray diffractometer โดยกำหนดสภาวะดังนี้ แหล่งกำเนิดแสง คือ $K\alpha$ Cu, voltage คือ 40 kV, กระแสไฟฟ้า คือ 40 mA, Angle เป็น $5-40^\circ$ และสร้างกราฟ ความสัมพันธ์ระหว่าง 2θ และ intensity

8.7. ทดสอบความสามารถในการปลดปล่อยแอนโดรกราไฟไลต์ออกจากผลิตภัณฑ์ ตามวิธี

ทดสอบในข้อ 4

8.8. ทดสอบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์

8.8.1. การเตรียมตัวอย่าง โดยชั่งสารตัวอย่างหนัก 1 g ใส่ลงใน centrifuge tube ปราศจากเชื้อ แล้วเติม sterile buffer pH 7.0 ปริมาตร 9 ml ลงผสมให้เข้ากัน (หรือปริมาณที่สามารถทำให้สารตัวอย่างมีความหนืดที่สามารถดูได้ หากมากกว่า 9 ml ให้ทำการ diluted เพิ่ม)

8.8.2. การเตรียม negative control และ positive control โดยใช้ sterile buffer pH 7.0 เป็น negative control และใช้เชื้อแต่ละชนิดที่ทดสอบ เป็น positive control ซึ่งจะมีลักษณะโคโลนีที่จำเพาะในเชื้อแต่ละชนิด

8.8.3. วิธีตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด

8.8.3.1. ปิเปตตัวอย่าง 1:10 ปริมาตร 1 mL เปิดแผ่นฟิล์มอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ที่ต้องการอากาศด้านบนขึ้นและหยดตัวอย่างลงบนแผ่นด้วย aseptic technique ในตู้ BSC class II

8.8.3.2. ค่อย ๆ ปิดแผ่นฟิล์มลงเบา ๆ ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ

8.8.3.3. ใช้แท่งกด กดลงบนแผ่นฟิล์มด้านบน เพื่อให้สารทดสอบกระจายตัวลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่ด้านล่าง โดยกดไว้อย่างน้อย 1 นาที (ห้ามบิดหรือเลื่อนแท่งกดไปมา) เพื่อให้อาหารเลี้ยงเชื้อพองตัวและดูดซับสารทดสอบอย่างเต็มที่

8.8.3.4. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

8.8.3.5. บันทึกผลการทดลอง โดยสังเกตจุดสีแดง หากพบให้นับจำนวนดังกล่าว ภายในพื้นที่วงกลมที่เกิดจากรอยแท่งกด ซึ่งคิดเป็นพื้นที่ 20 ตาราง

เซนติเมตร คุณด้วย dilution factor คิดเป็นจำนวนโคโลนีของเชื้อทั้งหมด ในสารตัวอย่าง 1 g โดยเกณฑ์ผ่านการทดสอบคือ พบเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดไม่เกิน 10^2 cfu/g หรือ cfu/ml โดยที่ 10^2 cfu มีปริมาณเชื้อที่ยอมรับสูงสุด เท่ากับ 200 ตาม USP 41

8.8.4. วิธีทดสอบยีสต์และราทั้งหมด

- 8.8.4.1. ปิเปตตัวอย่าง 1:10 ปริมาตร 1 mL เปิดแผ่นฟิล์มอาหารเลี้ยงยีสต์และรา ด้านบนขึ้นและหยดตัวอย่างลงบนแผ่นด้วย aseptic technique ในตู้ BSC class II
- 8.8.4.2. ค่อยๆปิดแผ่นฟิล์มลงเบาๆ ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ
- 8.8.4.3. ใช้แท่นกด กดลงบนแผ่นฟิล์มด้านบน เพื่อให้สารทดสอบกระจายตัวลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่ด้านล่าง โดยกดไว้อย่างน้อย 1 นาที เพื่อให้อาหารเลี้ยงเชื้อพองตัวและดูดซับสารทดสอบอย่างเต็มที่
- 8.8.4.4. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
- 8.8.4.5. บันทึกผลการทดลอง โดยสังเกตจุดสีฟ้า หากพบให้นับจำนวนดังกล่าว ภายในพื้นที่วงกลมที่เกิดจากรอยแท่นกด ซึ่งคิดเป็นพื้นที่ 20 ตารางเซนติเมตร คุณด้วย dilution factor คิดเป็นจำนวนโคโลนีของเชื้อทั้งหมด ในสารตัวอย่าง 1 g โดยเกณฑ์ผ่านการทดสอบคือ พบเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดไม่เกิน 10^1 cfu/g หรือ cfu/ml โดยที่ 10^1 cfu มีปริมาณเชื้อที่ยอมรับสูงสุด เท่ากับ 20 ตาม USP 41

8.8.5. วิธีทดสอบเชื้อ *S. aureus*

- 8.8.5.1. ปิเปตตัวอย่าง 1:10 ปริมาตร 1 mL เปิดแผ่นฟิล์มอาหารเลี้ยงเชื้อ *S. aureus* ด้านบนขึ้นและหยดตัวอย่างลงบนแผ่นด้วย aseptic technique ในตู้ BSC class II
- 8.8.5.2. ค่อยๆปิดแผ่นฟิล์มลงเบาๆ ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ
- 8.8.5.3. ใช้แท่นกดกดลงบนแผ่นฟิล์มด้านบน เพื่อให้สารทดสอบกระจายตัวลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่ด้านล่าง โดยกดไว้อย่างน้อย 1 นาที เพื่อให้อาหารเลี้ยงเชื้อพองตัวและดูดซับสารทดสอบอย่างเต็มที่
- 8.8.5.4. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

8.8.5.5. บันทึกผลการทดลอง โดยสังเกตจุดสีม่วง หากพบภายในพื้นที่วงกลมที่เกิดจากรอยแท่นกด ซึ่งคิดเป็นพื้นที่ 20 ตารางเซนติเมตร แสดงว่าสารทดสอบไม่ผ่านมาตรฐานตาม USP 41

8.8.6. วิธีทดสอบเชื้อ *P. aeruginosa*

8.8.6.1. ปิเปตตัวอย่าง 1:10 ปริมาตร 1 mL หยดลงบน cetrimide agar plate

8.8.6.2. Spread ตัวอย่างให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย aseptic technique ในตู้ BSC class II

8.8.6.3. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

8.8.6.4. บันทึกผลการทดลอง โดยสังเกตการพบเชื้อขึ้นที่อาหารเลี้ยงเชื้อ หากพบภายในพื้นที่วงกลมของ plate ซึ่งคิดเป็นพื้นที่ 20 ตารางเซนติเมตร แสดงว่าสารทดสอบไม่ผ่านมาตรฐานตาม USP 41

8.9. ทดสอบขนาดอนุภาคของผลิตภัณฑ์ด้วยวิธี Scanning electron microscopy (SEM)

นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์ส่งวิเคราะห์ที่สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ด้วยเครื่อง Scanning electron microscope โดยกำหนดสภาวะดังนี้ voltage คือ 20 kV, กำลังขยาย คือ 20000, วัสดุที่ใช้เคลือบ เป็น gold-palladium

8.10. ทดสอบความหนืดของผลิตภัณฑ์ ตามวิธีทดสอบในข้อ 5

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

1. การวิเคราะห์ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในสารสกัดฟ้าทะลายโจรด้วยวิธี high performance thin layer chromatography (HPTLC)

จากผลการสกัดฟ้าทะลายโจรด้วยเครื่อง Soxhlet extractor โดยใช้อัตราส่วนผงแห้งฟ้าทะลายโจรต่อเอทานอล 85 %v/v เป็น 1: 10 ดังแสดงในตารางที่ 4 พบว่า ร้อยละของสารสกัดหยาบที่ได้ (%yield) อยู่ในช่วง 16.69-32.36%w/w เมื่อวิเคราะห์ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในสารสกัดฟ้าทะลายโจรด้วยวิธี HPTLC พบว่า ร้อยละปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในสารสกัดหยาบเฉลี่ยมีค่ามากกว่า 1 %w/w ในทุกครั้งของการสกัด แสดงว่าผงแห้งฟ้าทะลายโจรที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ตามเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดในตำรามาตรฐานสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia)⁽³⁸⁾ จากนั้นนำสารสกัดหยาบมาละลายด้วย absolute ethanol เป็นสารสกัดฟ้าทะลายโจรเหลวเข้มข้น (concentrated AP ethanolic extract) ซึ่งมีความเข้มข้นของแอนโดรกราโฟไลด์เป็น 35.76-63.21 mg/ml

อย่างไรก็ตามเมื่อนำสารสกัดฟ้าทะลายโจรเหลวเข้มข้นมาเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจากสารสกัดฟ้าทะลายโจร โดยไม่ผสมแอนโดรกราโฟไลด์บริสุทธิ์ พบว่า ผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจากสารสกัดฟ้าทะลายโจรไม่สามารถปลดปล่อยแอนโดรกราโฟไลด์ในปริมาณที่เพียงพอต่อการออกฤทธิ์ เนื่องจากแอนโดรกราโฟไลด์ที่พบในสารสกัดฟ้าทะลายโจรมีความเข้มข้นน้อย จึงต้องแก้ไขโดยการเติมแอนโดรกราโฟไลด์บริสุทธิ์ให้มีปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์รวมต่อหนึ่งหน่วยการใช้ยาเพียงพอต่อการออกฤทธิ์ ซึ่งสัดส่วนของปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์จากสารสกัดฟ้าทะลายโจรต่อปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์บริสุทธิ์ที่เหมาะสมต้องศึกษาเพิ่มเติมจากการหาค่าที่เหมาะสมของปัจจัยด้านสูตรตำรับด้วยวิธี central composite design

ตาราง 4 ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในสารสกัดฟ้าทะลายโจร

Extract no.	Dry AP powder (g)	Crude AP extract			conc AP ethanolic extract	
		Weight of crude (g)	% Yield of extract (% w/w)	% AP in crude (%) w/w (mean $\pm$ SD)	% Crude in concentrated AP extract (%) w/v	AP concentration (mg/ml) (mean $\pm$ SD)
1	333.3	107.87	32.36	10.05 $\pm$ 5.11	35.96	35.76 $\pm$ 1.89
2	333.3	69.35	20.81	15.46 $\pm$ 2.57	38.96	37.50 $\pm$ 2.41
3	333.3	55.64	16.69	13.72 $\pm$ 0.34	30.91	38.37 $\pm$ 2.94
4	333.3	75.79	22.74	21.49 $\pm$ 0.31	42.11	63.21 $\pm$ 8.30

2. การหาสูตรตำรับที่เหมาะสม สำหรับผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจากสารสกัดฟ้าทะลายโจรโดยออกแบบการทดลองด้วยวิธี central composite design (CCD) แบบ face centered

จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธี central composite design แบบ face centered โดยมีตัวแปรต้นด้านสูตรตำรับของกระบวนการพ่นให้แห้ง ได้แก่ (1) ปริมาณร้อยละเอทานอล (A) ส่งผลในการเพิ่มความสามารถในการละลายของแอนโดรกราโฟไลด์ ทำให้สารผสมสำหรับกระบวนการพ่นให้แห้งอยู่ในรูป solid solution ผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจึงสามารถเพิ่มร้อยละการปลดปล่อยแอนโดรกราโฟไลด์ได้ แต่ต้องเพิ่มการควบคุมไอระเหยของเอทานอลมากขึ้น จึงเกิดปัญหาในการขยายกำลังการผลิตระดับอุตสาหกรรม, (2) ปริมาณร้อยละแอนโดรกราโฟไลด์ในสารสกัดฟ้าทะลายโจร (B) ส่งผลต่อฤทธิ์ของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัว เนื่องจากสารสกัดฟ้าทะลายโจรมีอนุพันธ์ของแอนโดรกราโฟไลด์ที่สามารถเสริมฤทธิ์ที่ต้องการของแอนโดรกราโฟไลด์ได้^(18, 19) ทำให้ผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจากสารสกัดฟ้าทะลายโจรมีความสามารถในการออกฤทธิ์มากกว่าผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจากแอนโดรกราโฟไลด์บริสุทธิ์ แต่ถ้าสัดส่วนของสารสกัดฟ้าทะลายโจรต่อแอนโดรกราโฟไลด์บริสุทธิ์ในสารผสมสำหรับกระบวนการพ่นให้แห้งมากขึ้น จะส่งผลต่อความสามารถในการก่อเจลของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวเนื่องจากเศษสมุนไพรของสารสกัดฟ้าทะลายโจรอาจรบกวนการก่อเจลของไคโตซาน, (3) ปริมาณร้อยละของ poloxamer (C) ส่งผลให้ลดการกลับเป็นผลึกของแอนโดรกราโฟไลด์ ช่วยเพิ่มการละลายของแอนโดรกราโฟไลด์และเพิ่มความสามารถในการเปียกน้ำของ

ผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัว จึงทำให้ร้อยละการปลดปล่อยแอนโดรกราโฟไลด์เพิ่มขึ้น แต่ปริมาณ poloxamer ที่มากเกินไปจะทำให้ความสามารถในการคงรูปของเจลและความคงสภาพของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวลดลง เมื่อนำตัวแปรต้นดังกล่าวและตัวแปรตาม ได้แก่ ระยะเวลาที่ร้อยละ 95 ของแอนโดรกราโฟไลด์ที่ปลดปล่อยออกจากผลิตภัณฑ์ ระยะเวลาที่ความเข้มข้นแอนโดรกราโฟไลด์ที่ปลดปล่อยมากกว่าระดับ MIC ความหนืด และความสามารถในการเปียกของผลิตภัณฑ์ มาออกแบบการทดลอง จะได้จำนวนการทดลองทั้งหมดเป็น 20 การทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 5

ตาราง 5 ผลการทดลองของสูตรตำรับที่มาจากการออกแบบการทดลองด้วยวิธี CCD

Run no.	Independent variables			Responses			
	A	B	C	Time to reach 95% AP release (hr)	Time to reach above MIC (hr)	Viscosity (cP)	Mixing time (min)
1	18.25	0.375	0.175	84	96	352.37	1.98
2	18.25	0.375	0.25	96	20	201.32	2.18
3	30	0.5	0.25	72	20	115.07	1.88
4	18.25	0.375	0.175	96	6	496.88	2.25
5	6.5	0.25	0.1	72	72	172.98	2.12
6	6.5	0.375	0.175	96	16	306.77	1.53
7	30	0.375	0.175	72	48	84.11	1.38
8	6.5	0.5	0.25	84	12	83.72	2.81
9	18.25	0.375	0.175	84	84	164.15	2.23
10	30	0.5	0.1	96	12	279.85	1.93
11	18.25	0.375	0.175	84	20	101.11	1.32
12	30	0.25	0.1	72	6	112.71	5.02
13	6.5	0.25	0.25	72	6	202.87	3.08
14	18.25	0.375	0.175	72	30	127.28	1.61
15	18.25	0.25	0.175	96	16	71.42	3.03
16	18.25	0.375	0.175	84	30	83.18	2.70
17	6.5	0.5	0.1	84	12	89.07	3.43
18	18.25	0.5	0.175	96	16	134.90	3.37
19	30	0.25	0.25	96	24	65.84	2.97
20	18.25	0.375	0.1	72	16	76.00	2.92

*A= %ethanol (%v/v); B= %AGP from AP extract (%w/v); C= %poloxamer188 (%w/v)

2.1. การศึกษาปัจจัยด้านสูตรตำรับที่มีผลต่อระยะเวลาที่ผลิตภัณฑ์ปลดปล่อยแอนโดรกราโฟไลด์ร้อยละ 95

เมื่อพิจารณาปัจจัยด้านสูตรตำรับที่ส่งผลต่อระยะเวลาที่ผลิตภัณฑ์ปลดปล่อยแอนโดรกราโฟไลด์ร้อยละ 95 ได้แก่ ร้อยละของปริมาณเอทานอล ที่มีค่า P-value เป็น 0.0059 ซึ่งค่า P-value น้อยกว่า 0.05 แสดงว่า ร้อยละของปริมาณเอทานอลส่งผลต่อตัวแปรตามดังกล่าวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ขณะที่ร้อยละปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในสารสกัดฟ้าทะลายโจร และร้อยละปริมาณ poloxamer มีค่า P-value เป็น 0.1931 และ 0.3785 ตามลำดับ ซึ่งค่า P-value มากกว่า 0.05 แสดงว่า ร้อยละปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในสารสกัดฟ้าทะลายโจร และร้อยละปริมาณ poloxamer ไม่มีผลต่อตัวแปรตามดังกล่าว



ตาราง 6 ผลของระยะเวลาที่ผลิตภัณฑ์ปลดปล่อยแอนโดรกราโฟไลด์ร้อยละ 95 ที่ได้จากการทดลองและการทำนาย

Run no.	Time to reach 95% AP release (hr)	
	actual	predict
1	84	84
2	96	84
3	72	92.4
4	96	84
5	72	75.6
6	96	75.6
7	72	92.4
8	84	75.6
9	84	84
10	96	92.4
11	84	84
12	72	92.4
13	72	76.8
14	72	84
15	96	84
16	84	84
17	84	75.6
18	96	84
19	96	92.4
20	72	84

โดยความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยด้านสูตรตำรับและตัวแปรตาม ดังแสดงในสมการที่ 1

$$y = 84 + 8.4A - 3.6B - 2.4C \quad (1)$$

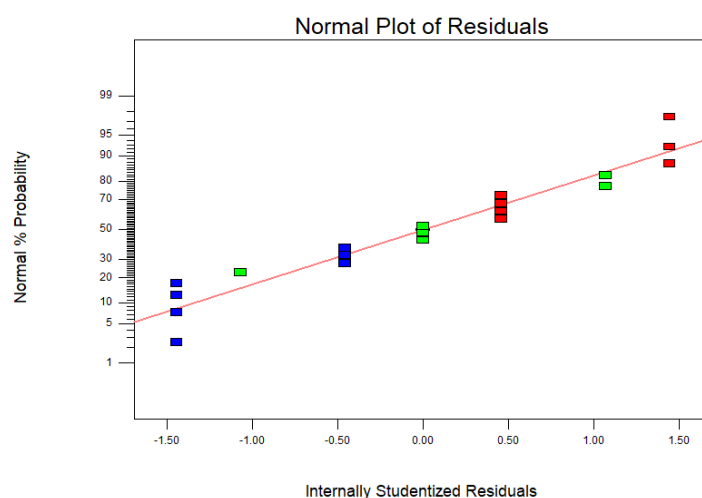
เมื่อ y คือ ระยะเวลาที่ผลิตภัณฑ์ปลดปล่อยแอนโดรกราโฟไลด์ร้อยละ 95

A คือ ร้อยละของปริมาณเอทานอล

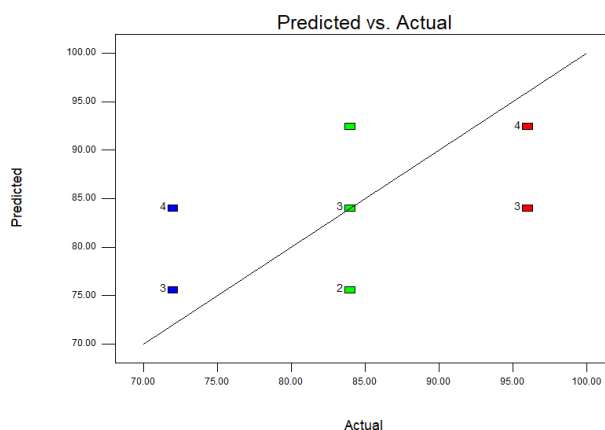
B คือ ร้อยละปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในสารสกัดฟ้าทะลายโจร

C คือ ร้อยละปริมาณ poloxamer 188

เมื่อพิจารณาการวิเคราะห์ค่าความคลาดเคลื่อน (residual analysis) ของค่าตัวแปรตามดังกล่าวที่ได้จากการทำนายของสมการถดถอย (predicted) และค่าตัวแปรตามที่ได้จากการทดลอง (actual) ดังตารางที่ 6 โดยแสดงในรูปแบบ normal plot of residuals ดังภาพที่ 5 จะเห็นได้ว่า ค่าความคลาดเคลื่อนของค่าตัวแปรตามที่ได้จากการทำนายและจากการทดลองกระจายอยู่ในแนวเส้นมาตรฐาน ดังนั้นค่าความคลาดเคลื่อนของค่าตัวแปรตามจึงมีการแจกแจงแบบปกติ แสดงว่า ค่าความคลาดเคลื่อนของค่าตัวแปรตามเป็นไปตามความเป็นจริง ไม่มีปัจจัยอื่นมากระทบ และการวิเคราะห์ค่าความคลาดเคลื่อนในรูปแบบ residual plot ระหว่างค่าตัวแปรตามที่ได้จากการทำนายและจากการทดลอง ดังภาพที่ 6 พบว่า ค่าตัวแปรตามที่ได้จากการทำนายและค่าตัวแปรตามที่ได้จากการทดลองมีการกระจายอย่างเป็นระบบ แสดงว่า ค่าตัวแปรตามที่ได้จากการทำนายและค่าตัวแปรตามที่ได้จากการทดลองมีการกระจายอย่างเป็นธรรมชาติ ดังนั้นช่วงตัวแปรต้นที่ศึกษาจึงไม่สามารถทำนายตัวแปรตามได้อย่างสมบูรณ์ โดยปัจจัยแฝงจะเป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อตัวแปรตาม



ภาพประกอบ 5 normal plot of residuals ของระยะเวลาที่ผลิตภัณฑ์ปลดปล่อยแอนโดรกราโฟไลด์ร้อยละ 95



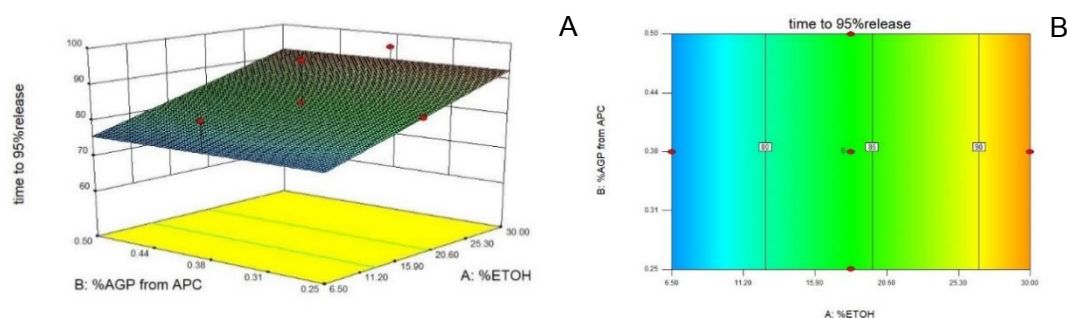
ภาพประกอบ 6 residual plot ของระยะเวลาที่ผลิตภัณฑ์ปลดปล่อยแอนโดรกราโฟไลด์ร้อยละ 95

เมื่อพิจารณาค่าทางสถิติ ANOVA ของสมการถดถอย (model) ที่แสดงอิทธิพลของปัจจัยด้านสูตรตำรับและระยะเวลาที่ผลิตภัณฑ์ปลดปล่อยแอนโดรกราโฟไลด์ร้อยละ 95 ดังแสดงในตารางที่ 7 พบว่า สำหรับการตรวจสอบความเหมาะสมของสมการถดถอย (lack of fit) จะมีค่า P-value เป็น 0.7711 ซึ่งค่า P-value มากกว่า 0.05 แสดงว่า ค่าความคลาดเคลื่อนไม่มีผลต่อตัวแปรตามอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % สำหรับการตรวจสอบความถูกต้องของสมการถดถอย พบว่า ค่า F-value และ P-value ของสมการถดถอยเป็น 4.24 และ 0.022 ตามลำดับ ซึ่งค่า P-value น้อยกว่า 0.05 แสดงว่า สมการถดถอยสามารถทำนายความสัมพันธ์ของตัวแปรต้นกับตัวแปรตามได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % อย่างไรก็ตามค่า correlation coefficient (R^2) ของสมการถดถอยเป็น 0.4429 แสดงว่า ความสัมพันธ์ของตัวแปรต้นในช่วงที่ศึกษาสามารถทำนายค่าตัวแปรตามได้อย่างถูกต้องประมาณ 44.29% ซึ่งอาจมีปัจจัยอื่นที่ส่งผลต่อตัวแปรตามได้มากกว่าตัวแปรต้นที่ศึกษา

ตาราง 7 ค่าทางสถิติ ANOVA ของสมการถดถอยที่แสดงอิทธิพลของตัวแปรต้นต่อระยะเวลาที่ผลิตภัณฑ์ปลดปล่อยแอนโดรกราโฟไลด์ร้อยละ 95

Source	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean Square	F-value	P-value
Model	3	892.8	297.6	4.24	0.022
A	1	705.6	705.6	10.05	0.0059
B	1	129.6	129.6	1.85	0.1931
C	1	57.6	57.6	0.82	0.3785
Residual	16	1123.2	70.2		
Lack of Fit	11	643.2	58.47	0.61	0.7711
Pure Error	5	480	96		
R ²					0.4429
Adjusted R ²					0.3384
Predicted R ²					0.2684

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยด้านสูตรตำรับและตัวแปรตาม ดังสมการที่ 1 และ ภาพที่ 7 พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์ของร้อยละปริมาณเอทานอลในสมการถดถอยเป็น 8.4 ซึ่งค่าสัมประสิทธิ์ที่เป็นบวก แสดงถึงความสัมพันธ์ของปัจจัยนั้นกับตัวแปรตามที่เป็นเชิงบวก กล่าวคือ ถ้าร้อยละปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้น จะทำให้ระยะเวลาที่ผลิตภัณฑ์ปลดปล่อยแอนโดรกราโฟไลด์ร้อยละ 95 เพิ่มขึ้น อาจเกิดจากปริมาณเอทานอลที่มากขึ้นส่งผลให้โคโคซานเกิดการแยกชั้น (phase separation) โดยจากการทดสอบผลของเอทานอลต่อความสามารถในการละลายของโคโคซาน พบว่า ความเข้มข้นเอทานอล 30%v/v จะทำให้ความสามารถในการละลายของโคโคซาน ลดลงเป็น 4 %w/v เมื่อเปรียบเทียบกับความสามารถละลายของโคโคซานในน้ำเป็น 10%w/v⁽³⁹⁾ ซึ่งทำให้สารผสมสำหรับกระบวนการพ่นให้แห้งไม่อยู่ในรูป solid dispersion ของแอนโดรกราโฟไลด์ในโคโคซาน จึงเป็นผลให้การละลายของแอนโดรกราโฟไลด์เกิดจากความสามารถในการละลายของแอนโดรกราโฟไลด์ ไม่ได้เกิดจากผลของ solid dispersion ดังนั้นการละลายของแอนโดรกราโฟไลด์จึงลดลง ส่งผลให้ระยะเวลาที่ปลดปล่อยแอนโดรกราโฟไลด์ออกจากผลิตภัณฑ์ถึง 95% มากขึ้น



ภาพประกอบ 7 3D surface plot (A) และ contour plot (B) ของร้อยละปริมาณเอทานอลและร้อยละปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในสารสกัดฟ้าทะลายโจรต่อระยะเวลาที่ผลิตภัณฑ์ปลดปล่อยแอนโดรกราโฟไลด์ร้อยละ 95

2.2. การศึกษาปัจจัยด้านสูตรตำรับที่มีผลต่อระยะเวลาที่ความเข้มข้นของแอนโดรกราโฟไลด์ที่ปลดปล่อยไม่น้อยกว่า MIC

เมื่อพิจารณาปัจจัยด้านสูตรตำรับที่ส่งผลต่อระยะเวลาที่ความเข้มข้นของแอนโดรกราโฟไลด์ที่ปลดปล่อยไม่น้อยกว่า MIC ได้แก่ ร้อยละของปริมาณเอทานอลและร้อยละปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในสารสกัดฟ้าทะลายโจร ที่มีค่า P-value เป็นน้อยกว่า 0.0001 และ 0.0011 ตามลำดับ ซึ่งค่า P-value น้อยกว่า 0.05 แสดงว่า ร้อยละของปริมาณเอทานอลและร้อยละปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในสารสกัดฟ้าทะลายโจรส่งผลต่อตัวแปรตามดังกล่าวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ขณะที่ร้อยละปริมาณ poloxamer มีค่า P-value เป็น 0.3597 ซึ่งค่า P-value มากกว่า 0.05 แสดงว่า ร้อยละปริมาณ poloxamer ไม่ส่งผลต่อตัวแปรตามดังกล่าว

ตาราง 8 ผลของระยะเวลาที่ความเข้มข้นของแอนโดรกราโฟไลด์ที่ปลดปล่อยไม่น้อยกว่า MIC ที่ได้จากาทดลองและการทำนาย

Run no.	Time to reach above MIC (hr)	
	actual	predict
1	96	17.6
2	20	20.6
3	20	21
4	6	17.6
5	72	92.2
6	16	64
7	48	13.2
8	12	51.3
9	84	17.6
10	12	-0.5
11	20	17.6
12	6	20.9
13	6	82.7
14	30	17.6
15	16	30.8
16	30	17.6
17	12	29.8
18	16	4.4
19	24	11.4
20	16	14.6

โดยความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยด้านสูตรตำรับและตัวแปรตาม ดังแสดงในสมการที่ 2

$$y = 17.6 - 25.4A - 13.2B + 3C + 10.25AB + 7.75BC + 21A^2 \quad (2)$$

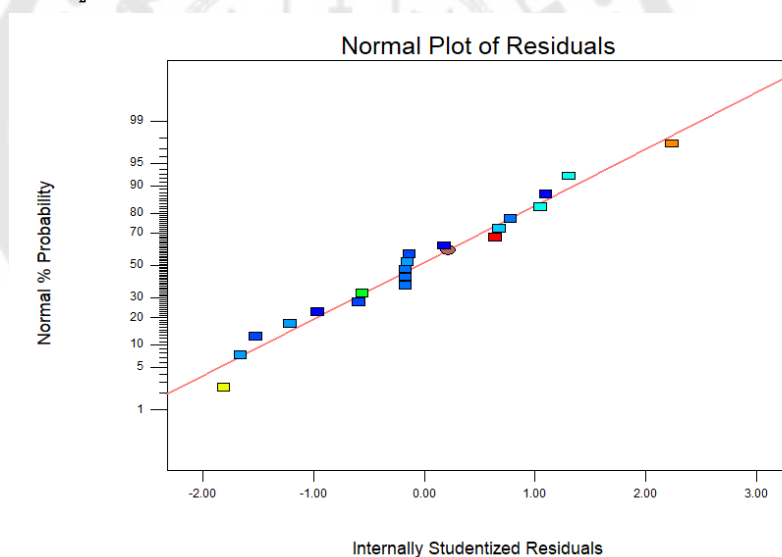
เมื่อ y คือ ระยะเวลาที่ความเข้มข้นของแอนโดรกราโฟไลด์ที่ปลดปล่อยไม่น้อยกว่า MIC

A คือ ร้อยละของปริมาณเอทานอล

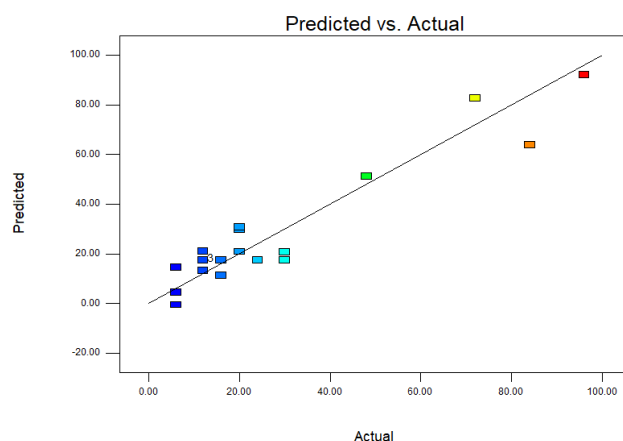
B คือ ร้อยละปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในสารสกัดฟ้าทะลายโจร

C คือ ร้อยละปริมาณ poloxamer 188

เมื่อพิจารณาการวิเคราะห์ค่าความคลาดเคลื่อน (residual analysis) ของค่าตัวแปรตามดังกล่าวที่ได้จากการทำนายของสมการถดถอย (predicted) และค่าตัวแปรตามที่ได้จากการทดลอง (actual) ดังตารางที่ 8 โดยแสดงในรูปแบบ normal plot of residuals ดังภาพที่ 8 จะเห็นได้ว่า ค่าความคลาดเคลื่อนของค่าตัวแปรตามที่ได้จากการทำนายและจากการทดลองกระจายอยู่ในแนวเส้นมาตรฐาน ดังนั้นค่าความคลาดเคลื่อนของค่าตัวแปรตามจึงมีการแจกแจงแบบปกติ แสดงว่า ค่าความคลาดเคลื่อนของค่าตัวแปรตามเป็นไปตามความเป็นจริง ไม่มีปัจจัยอื่นมากกระทบ และการวิเคราะห์ค่าความคลาดเคลื่อนในรูปแบบ residual plot ระหว่างค่าตัวแปรตามที่ได้จากการทำนายและจากการทดลอง ดังภาพที่ 9 พบว่า ค่าตัวแปรตามที่ได้จากการทำนายและค่าตัวแปรตามที่ได้จากการทดลองมีการกระจายอย่างไม่เป็นระบบ แสดงว่า ค่าตัวแปรตามที่ได้จากการทำนายและค่าตัวแปรตามที่ได้จากการทดลองมีการกระจายอย่างไม่เป็นธรรมชาติ ดังนั้นช่วงตัวแปรต้นที่ศึกษาจึงสามารถทำนายตัวแปรตามได้อย่างสมบูรณ์



ภาพประกอบ 8 normal plot of residuals ของระยะเวลาที่ความเข้มข้นของแอนโดรกราโฟไลด์ที่ปลดปล่อยไม่น้อยกว่า MIC



ภาพประกอบ 9 residual plot ของระยะเวลาที่ความเข้มข้นของแอนโดรกราโฟไลด์ที่ปลดปล่อยไม่น้อยกว่า MIC

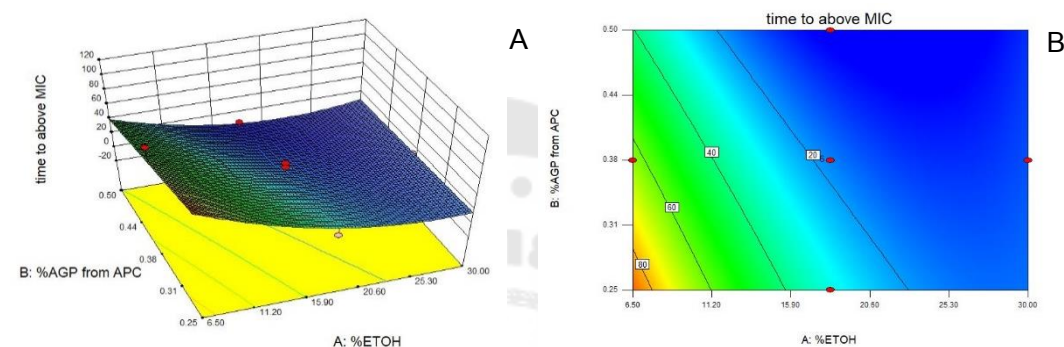
เมื่อพิจารณาค่าทางสถิติ ANOVA ของสมการถดถอย (model) ที่แสดงอิทธิพลของปัจจัยด้านสูตรตำรับและระยะเวลาที่ความเข้มข้นของแอนโดรกราโฟไลด์ที่ปลดปล่อยไม่น้อยกว่า MIC ดังแสดงในตารางที่ 9 พบว่า สำหรับการตรวจสอบความเหมาะสมของสมการถดถอย (lack of fit) จะมีค่า P-value เป็น 0.1188 ซึ่งค่า P-value มากกว่า 0.05 แสดงว่า ค่าความคลาดเคลื่อนไม่มีผลต่อตัวแปรตามอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % สำหรับการตรวจสอบความถูกต้องของสมการถดถอย พบว่า ค่า F-value และ P-value ของสมการถดถอยเป็น 19.72 และน้อยกว่า 0.0001 ตามลำดับ ซึ่งค่า P-value น้อยกว่า 0.05 แสดงว่า สมการถดถอยสามารถทำนายความสัมพันธ์ของตัวแปรต้นกับตัวแปรตามได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % อย่างไรก็ตามค่า correlation coefficient (R^2) ของสมการถดถอยเป็น 0.901 แสดงว่า ความสัมพันธ์ของตัวแปรต้นในช่วงที่ศึกษาสามารถทำนายค่าตัวแปรตามได้อย่างถูกต้องประมาณ 90.10% ซึ่งอาจมีปัจจัยอื่นที่ส่งผลต่อตัวแปรตามได้น้อยกว่าตัวแปรต้นที่ศึกษา

ตาราง 9 ค่าทางสถิติ ANOVA ของสมการถดถอยที่แสดงอิทธิพลของตัวแปรต้นต่อระยะเวลาที่ความเข้มข้นของแอนโดรกราโฟไลด์ที่ปลดปล่อยไม่น้อยกว่า MIC

Source	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean Square	F-value	P-value
Model	6	11810	1968.33	19.72	< 0.0001
A	1	6451.6	6451.6	64.63	< 0.0001
B	1	1742.4	1742.4	17.45	0.0011
C	1	90	90	0.9	0.3597
AB	1	840.5	840.5	8.42	0.0124
BC	1	480.5	480.5	4.81	0.047
A ²	1	2205	2205	22.09	0.0004
Residual	13	1297.8	99.83		
Lack of Fit	8	1075.8	134.47	3.03	0.1188
Pure Error	5	222	44.4		
R ²					0.901
Adjusted R ²					0.8553
Predicted R ²					0.6592

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยด้านสูตรตำรับและตัวแปรตาม ดังสมการที่ 2 และ ภาพที่ 10 พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์ของร้อยละปริมาณเอทานอลและร้อยละปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในสารสกัดฟ้าทะลายโจรในสมการถดถอยเป็น - 25.4 และ - 13.2 ตามลำดับ ซึ่งค่าสัมประสิทธิ์ที่เป็นลบ แสดงถึงความสัมพันธ์ของปัจจัยนั้นกับตัวแปรตามที่เป็นเชิงลบ กล่าวคือ ถ้าร้อยละปริมาณเอทานอลและร้อยละปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในสารสกัดฟ้าทะลายโจรเพิ่มขึ้น จะทำให้ระยะเวลาที่ความเข้มข้นของแอนโดรกราโฟไลด์ที่ปลดปล่อยไม่น้อยกว่า MIC ลดลง เนื่องจากปริมาณเอทานอลที่มากขึ้นส่งผลให้การละลายของแอนโดรกราโฟไลด์มากขึ้น ทำให้สารผสมสำหรับกระบวนการพ่นให้แห้งอยู่ในรูป solid solution ผลึกภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวมีร้อยละการปลดปล่อยแอนโดรกราโฟไลด์เพิ่มขึ้น ดังนั้นระยะเวลาที่ความเข้มข้นของแอนโดรกราโฟไลด์ที่ปลดปล่อยไม่น้อยกว่า MIC จึงลดลง นอกจากนี้เมื่อใส่ปริมาณสารสกัดฟ้าทะลายโจรในสารผสม

สำหรับกระบวนการพ่นให้แห้งเพิ่มขึ้น ทำให้สัดส่วนของแอนโดรกราโฟไลด์บริสุทธิ์ในสารผสมสำหรับกระบวนการพ่นให้แห้งลดลง ส่งผลให้สารผสมสำหรับกระบวนการพ่นให้แห้งมีสัดส่วนของ solid solution มากกว่า solid dispersion ช่วยให้อัตราการปลดปล่อยแอนโดรกราโฟไลด์เพิ่มขึ้น จึงทำให้ระยะเวลาที่ความเข้มข้นของแอนโดรกราโฟไลด์ที่ปลดปล่อยไม่น้อยกว่า MIC ลดลง



ภาพประกอบ 10 3D surface plot (A) และ contour plot (B) ของร้อยละปริมาณเอทานอลและร้อยละปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในสารสกัดฟ้าทะลายโจรต่อระยะเวลาที่ความเข้มข้นของแอนโดรกราโฟไลด์ที่ปลดปล่อยไม่น้อยกว่า MIC

2.3. การศึกษาปัจจัยด้านสูตรตำรับที่มีผลต่อความหนืดของผลิตภัณฑ์

เมื่อพิจารณาปัจจัยด้านสูตรตำรับที่ส่งผลต่อความหนืดของผลิตภัณฑ์ ได้แก่ ร้อยละปริมาณ poloxamer ที่มีค่า P-value เป็น 0.0345 ซึ่งค่า P-value น้อยกว่า 0.05 แสดงว่าร้อยละปริมาณ poloxamer ส่งผลต่อตัวแปรตามดังกล่าวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ขณะที่ร้อยละของปริมาณเอทานอลและร้อยละปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในสารสกัดฟ้าทะลายโจร มีค่า P-value เป็น 0.0792 และ 0.3558 ตามลำดับ ซึ่งค่า P-value มากกว่า 0.05 แสดงว่า ร้อยละของปริมาณเอทานอลและร้อยละปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในสารสกัดฟ้าทะลายโจรไม่มีผลต่อตัวแปรตามดังกล่าว

ตาราง 10 ผลของความหนืดของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทดลองและการทำนาย

Run no.	Viscosity (cP)	
	actual	predict
1	352.37	106.44
2	201.32	47.07
3	115.07	239.98
4	496.88	106.44
5	172.98	311.14
6	306.77	177.73
7	84.11	273.71
8	83.72	44.33
9	164.15	106.44
10	279.85	358.70
11	101.11	106.44
12	112.71	307.44
13	202.87	192.42
14	127.28	106.44
15	71.42	130.64
16	83.18	106.44
17	89.07	163.06
18	134.90	82.23
19	65.84	188.71
20	76.00	165.80

โดยความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยด้านสูตรตำรับและตัวแปรตาม ดังแสดงในสมการที่ 3

$$y = 106.44 + 47.99A - 24.21B - 59.36C + 49.84AB + 119.28A^2 \quad (3)$$

เมื่อ y คือ ความหนืดของผลิตภัณฑ์

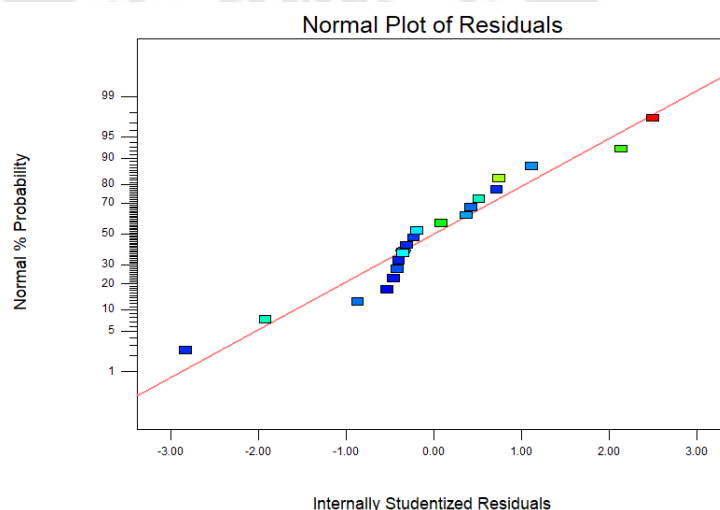
A คือ ร้อยละของปริมาณเอทานอล

B คือ ร้อยละปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในสารสกัดฟ้าทะลายโจร

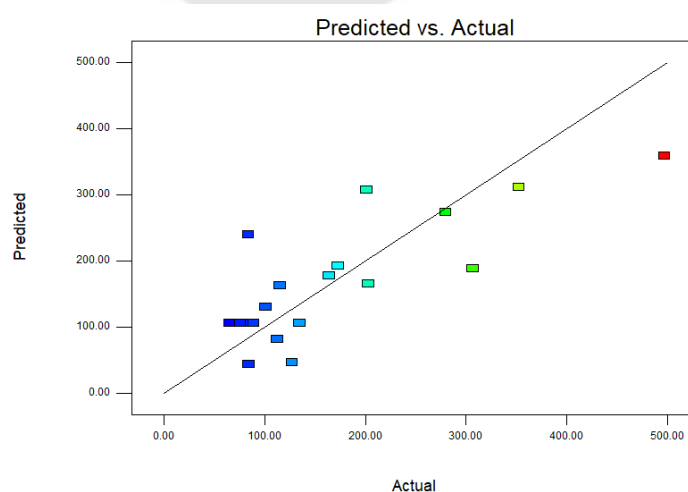
C คือ ร้อยละปริมาณ poloxamer 188

เมื่อพิจารณาการวิเคราะห์ค่าความคลาดเคลื่อน (residual analysis) ของค่าตัวแปรตามดังกล่าวที่ได้จากการทำนายของสมการถดถอย (predicted) และค่าตัวแปรตามที่ได้จาก

การทดลอง (actual) ดังตารางที่ 10 โดยแสดงในรูปแบบ normal plot of residuals ดังภาพที่ 11 จะเห็นได้ว่า ค่าความคลาดเคลื่อนของค่าตัวแปรตามที่ได้จากการทำนายและจากการทดลองกระจายอยู่ในแนวเส้นมาตรฐาน ดังนั้นค่าความคลาดเคลื่อนของค่าตัวแปรตามจึงมีการแจกแจงแบบปกติ แสดงว่า ค่าความคลาดเคลื่อนของค่าตัวแปรตามเป็นไปตามความเป็นจริง ไม่มีปัจจัยอื่นมากระทบ และการวิเคราะห์ค่าความคลาดเคลื่อนในรูปแบบ residual plot ระหว่างค่าตัวแปรตามที่ได้จากการทำนายและจากการทดลอง ดังภาพที่ 12 พบว่า ค่าตัวแปรตามที่ได้จากการทำนายและค่าตัวแปรตามที่ได้จากการทดลองมีการกระจายอย่างไม่เป็นระบบ แสดงว่า ค่าตัวแปรตามที่ได้จากการทำนายและค่าตัวแปรตามที่ได้จากการทดลองมีการกระจายอย่างไม่เป็นธรรมชาติ ดังนั้นช่วงตัวแปรต้นที่ศึกษาจึงสามารถทำนายตัวแปรตามได้อย่างสมบูรณ์



ภาพประกอบ 11 normal plot of residuals ของความหนืดของผลิตภัณฑ์



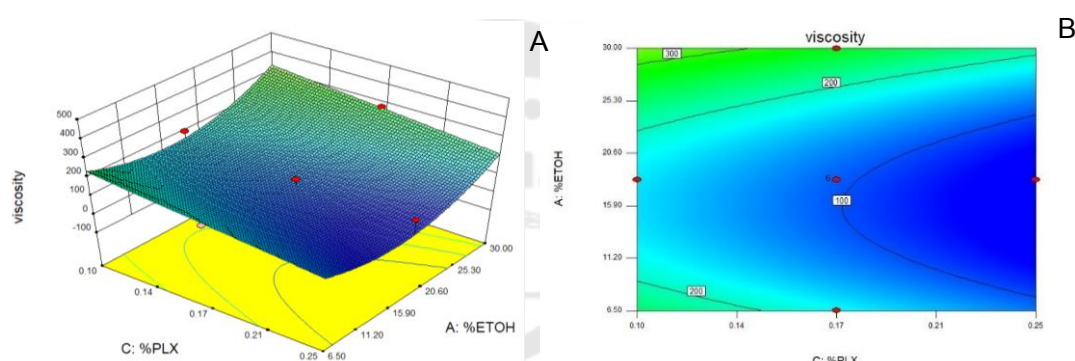
ภาพประกอบ 12 residual plot ของความหนืดของผลิตภัณฑ์

เมื่อพิจารณาค่าทางสถิติ ANOVA ของสมการถดถอย (model) ที่แสดงอิทธิพลของปัจจัยด้านสูตรตำรับและความหนืดของผลิตภัณฑ์ ดังแสดงในตารางที่ 11 พบว่า สำหรับการตรวจสอบความถูกต้องของสมการถดถอย พบว่า ค่า F-value และ P-value ของสมการถดถอยเป็น 4.83 และ 0.0089 ตามลำดับ ซึ่งค่า P-value น้อยกว่า 0.05 แสดงว่า สมการถดถอยสามารถทำนายความสัมพันธ์ของตัวแปรต้นกับตัวแปรตามได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % สำหรับการตรวจสอบความเหมาะสมของสมการถดถอย (lack of fit) จะมีค่า P-value เป็น 0.0038 ซึ่งค่า P-value น้อยกว่า 0.05 แสดงว่า ค่าความคลาดเคลื่อนมีผลต่อการทำนายตัวแปรตามอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ดังนั้นตัวแปรต้นในช่วงที่ศึกษาไม่เป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อตัวแปรตามอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งอาจมีปัจจัยอื่นที่ส่งผลต่อตัวแปรตามได้มากกว่าตัวแปรต้นที่ศึกษา เช่น ไซโตซาน เป็นต้น อย่างไรก็ตามค่า correlation coefficient (R^2) ของสมการถดถอยเป็น 0.633 แสดงว่า ความสัมพันธ์ของตัวแปรต้นในช่วงที่ศึกษาสามารถทำนายค่าตัวแปรตามได้อย่างถูกต้องประมาณ 63.30%

ตาราง 11 ค่าทางสถิติ ANOVA ของสมการถดถอยที่แสดงอิทธิพลของตัวแปรต้นต่อความหนืดของผลิตภัณฑ์

Source	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean Square	F-value	P-value
Model	5	155100	31028.1	4.83	0.0089
A	1	23027.2	23027.2	3.58	0.0792
B	1	5859.06	5859.06	0.91	0.3558
C	1	35240.84	35240.84	5.48	0.0345
AB	1	19870.21	19870.21	3.09	0.1005
A^2	1	71143.16	71143.16	11.07	0.005
Residual	14	89954.75	6425.34		
Lack of Fit	9	86830.41	9647.82	15.44	0.0038
Pure Error	5	3124.35	624.87		
R^2					0.633
Adjusted R^2					0.5019
Predicted R^2					-0.4404

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยด้านสูตรตำรับและตัวแปรตาม ดังสมการที่ 3 และ ภาพที่ 13 พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์ของร้อยละปริมาณ poloxamer 188 ในสมการถดถอยเป็น - 59.36 ซึ่งค่าสัมประสิทธิ์ที่เป็นลบ แสดงถึงความสัมพันธ์ของปัจจัยนั้นกับตัวแปรตามที่เป็นเชิงลบ กล่าวคือ ถ้าร้อยละปริมาณ poloxamer 188 เพิ่มขึ้น จะทำให้ความหนืดของผลิตภัณฑ์ลดลง เนื่องจากปริมาณ poloxamer 188 ที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้เพิ่มความสามารถในการเปียกน้ำของ ผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัว ทำให้ความสามารถในการคงรูปของเจลลดลง จึงส่งผลให้ความหนืดของผลิตภัณฑ์ลดลง



ภาพประกอบ 13 3D surface plot (A) และ contour plot (B) ของร้อยละปริมาณเอทานอลและ ร้อยละปริมาณ poloxamer 188 ต่อความหนืดของผลิตภัณฑ์

2.4. การศึกษาปัจจัยด้านสูตรตำรับที่มีผลต่อความสามารถในการเปียกของผลิตภัณฑ์

เมื่อพิจารณาปัจจัยด้านสูตรตำรับที่ส่งผลต่อความสามารถในการเปียกของผลิตภัณฑ์ได้แก่ ร้อยละของปริมาณเอทานอล ร้อยละปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในสารสกัดฟ้าทะลายโจร และร้อยละปริมาณ poloxamer ที่มีค่า P-value เป็น 0.6816, 0.1413, และ 0.4847 ตามลำดับ ซึ่งค่า P-value มากกว่า 0.05 แสดงว่า ปัจจัยด้านสูตรตำรับทั้งสามไม่ส่งผลต่อความสามารถในการเปียกของผลิตภัณฑ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % อาจเกิดจากมีปัจจัยอื่นที่ส่งผลต่อตัวแปรตามได้มากกว่าตัวแปรต้นในช่วงที่ศึกษา เช่น ปัจจัยในกระบวนการพ่นให้แห้ง เนื่องจากกระบวนการพ่นให้แห้งจะทำให้แอนโดรกราโฟไลด์อยู่ในสถานะอสัณฐาน (amorphous) และมีขนาดอนุภาคเล็กลง จึงเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำของแอนโดรกราโฟไลด์และทำให้ผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวสามารถละลายน้ำได้ง่ายขึ้น⁽⁹⁾

ตาราง 12 ผลของความสามารถในการเปียกของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทดลองและการทำนาย

Run no.	Mixing time (min)	
	actual	predict
1	1.98	2.99
2	2.18	2.28
3	1.88	2.70
4	2.25	2.99
5	2.12	2.02
6	1.53	2.09
7	1.38	2.31
8	2.81	1.87
9	2.23	2.99
10	1.93	2.88
11	1.32	2.99
12	5.02	1.63
13	3.08	1.43
14	1.61	2.99
15	3.03	2.87
16	2.70	2.99
17	3.43	2.18
18	3.37	3.71
19	2.97	1.17
20	2.92	2.66

โดยความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยด้านสูตรตำรับและตัวแปรตาม ดังแสดงในสมการที่ 4

$$y = 2.99 + 0.11A + 0.42B - 0.19C + 0.27AB + 0.033AC + 0.071BC - 0.79A^2 + 0.3B^2 - 0.52C^2 \quad (4)$$

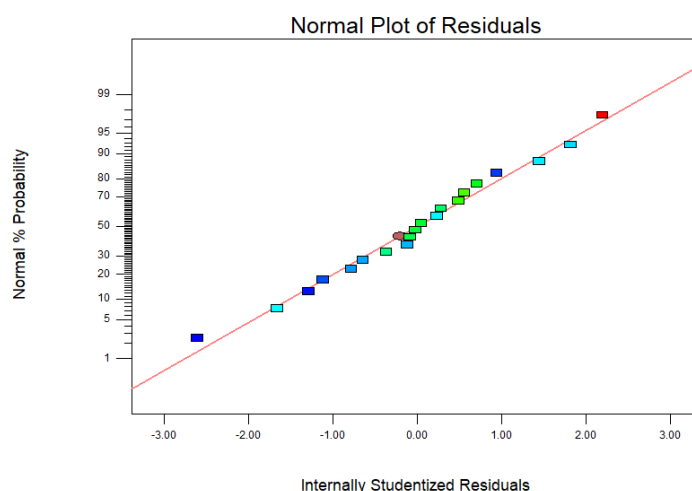
เมื่อ y คือ ความสามารถในการเปียกของผลิตภัณฑ์

A คือ ร้อยละของปริมาณเอทานอล

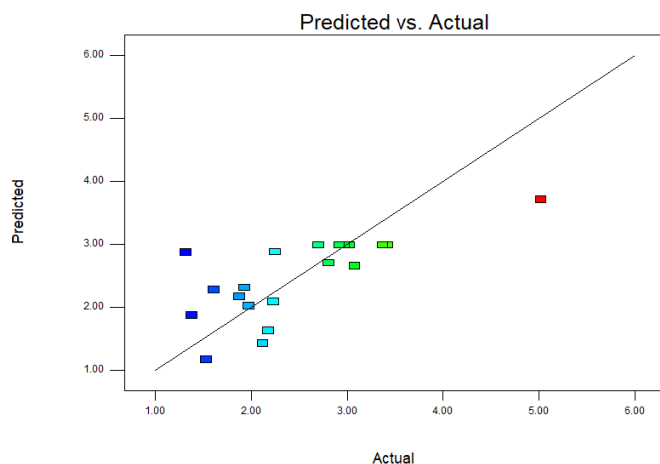
B คือ ร้อยละปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในสารสกัดฟ้าทะลายโจร

C คือ ร้อยละปริมาณ poloxamer 188

เมื่อพิจารณาการวิเคราะห์ค่าความคลาดเคลื่อน (residual analysis) ของค่าตัวแปรตามดังกล่าวที่ได้จากการทำนายของสมการถดถอย (predicted) และค่าตัวแปรตามที่ได้จากการทดลอง (actual) ดังตารางที่ 12 โดยแสดงในรูปแบบ normal plot of residuals ดังภาพที่ 14 จะเห็นได้ว่า ค่าความคลาดเคลื่อนของค่าตัวแปรตามที่ได้จากการทำนายและจากการทดลองกระจายอยู่ในแนวเส้นมาตรฐาน ดังนั้นค่าความคลาดเคลื่อนของค่าตัวแปรตามจึงมีการแจกแจงแบบปกติ แสดงว่า ค่าความคลาดเคลื่อนของค่าตัวแปรตามเป็นไปตามความเป็นจริง ไม่มีปัจจัยอื่นมากกระทบ และการวิเคราะห์ค่าความคลาดเคลื่อนในรูปแบบ residual plot ระหว่างค่าตัวแปรตามที่ได้จากการทำนายและจากการทดลอง ดังภาพที่ 15 พบว่าค่าตัวแปรตามที่ได้จากการทำนายและค่าตัวแปรตามที่ได้จากการทดลองมีการกระจายอย่างไม่เป็นระบบ แสดงว่า ค่าตัวแปรตามที่ได้จากการทำนายและค่าตัวแปรตามที่ได้จากการทดลองมีการกระจายอย่างไม่เป็นธรรมชาติ ดังนั้นช่วงตัวแปรต้นที่ศึกษาจึงสามารถทำนายตัวแปรตามได้อย่างสมบูรณ์



ภาพประกอบ 14 normal plot of residuals ของความสามารถในการเปียกของผลิตภัณฑ์



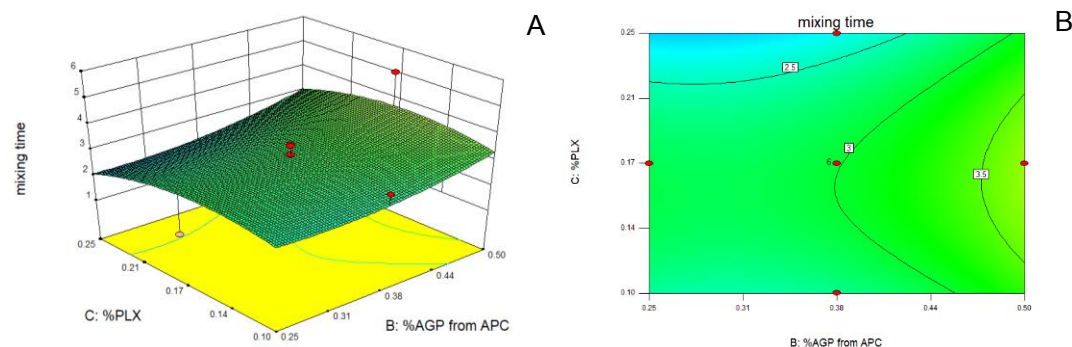
ภาพประกอบ 15 residual plot ของความสามารถในการเปียกของผลิตภัณฑ์

เมื่อพิจารณาค่าทางสถิติ ANOVA ของสมการถดถอย (model) ที่แสดงอิทธิพลของปัจจัยด้านสูตรตำรับและความสามารถในการเปียกของผลิตภัณฑ์ ดังแสดงในตารางที่ 13 พบว่า สำหรับการตรวจสอบความเหมาะสมของสมการถดถอย (lack of fit) จะมีค่า P-value เป็น 0.0037 ซึ่งค่า P-value น้อยกว่า 0.05 แสดงว่า ค่าความคลาดเคลื่อนมีผลต่อตัวแปรตามอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % สำหรับการตรวจสอบความถูกต้องของสมการถดถอย พบว่า ค่า F-value และ P-value ของสมการถดถอยเป็น 1.26 และ 0.3607 ตามลำดับ ซึ่งค่า P-value มากกว่า 0.05 แสดงว่า สมการถดถอยไม่สามารถทำนายความสัมพันธ์ของตัวแปรต้นกับตัวแปรตามได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ตาราง 13 ค่าทางสถิติ ANOVA ของสมการถดถอยที่แสดงอิทธิพลของตัวแปรต้นต่อความสามารถในการเปียกของผลิตภัณฑ์

Source	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean Square	F-value	P-value
Model	9	7.89	0.88	1.26	0.3607
A	1	0.12	0.12	0.18	0.6816
B	1	1.78	1.78	2.55	0.1413
C	1	0.37	0.37	0.53	0.4847
AB	1	0.6	0.6	0.86	0.3764
AC	1	0.008778	0.008778	0.013	0.9128
BC	1	0.04	0.04	0.057	0.8157
A ²	1	1.7	1.7	2.44	0.1495
B ²	1	0.25	0.25	0.37	0.5588
C ²	1	0.75	0.75	1.07	0.3252
Residual	10	6.96	0.7		
Lack of Fit	5	6.58	1.32	16.97	0.0037
Pure Error	5	0.39	0.077		
R ²					0.5311
Adjusted R ²					0.1091
Predicted R ²					-2.8905

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยด้านสูตรตำรับและตัวแปรตาม ดังสมการที่ 4 และ ภาพที่ 16 พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์ของร้อยละปริมาณเอทานอลและร้อยละปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในสารสกัดฟ้าทะลายโจรในสมการถดถอยเป็น 0.11 และ 0.42 ตามลำดับ ซึ่งค่าสัมประสิทธิ์ที่เป็นบวก แสดงถึงความสัมพันธ์ของปัจจัยนั้นกับตัวแปรตามที่เป็นเชิงบวก กล่าวคือ ถ้าร้อยละปริมาณเอทานอลและร้อยละปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในสารสกัดฟ้าทะลายโจรเพิ่มขึ้น จะทำให้ความสามารถในการเปียกของผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้น แต่ค่าสัมประสิทธิ์ของร้อยละปริมาณ poloxamer ในสมการถดถอยเป็น -0.19 ซึ่งค่าสัมประสิทธิ์ที่เป็นลบ แสดงถึงความสัมพันธ์ของปัจจัยนั้นกับตัวแปรตามที่เป็นเชิงลบ กล่าวคือ ถ้าร้อยละปริมาณ poloxamer เพิ่มขึ้น จะทำให้ความสามารถในการเปียกของผลิตภัณฑ์ลดลง ทั้งนี้ปัจจัยด้านสูตรตำรับทั้งสามไม่มีผลต่อตัวแปรตามดังกล่าวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

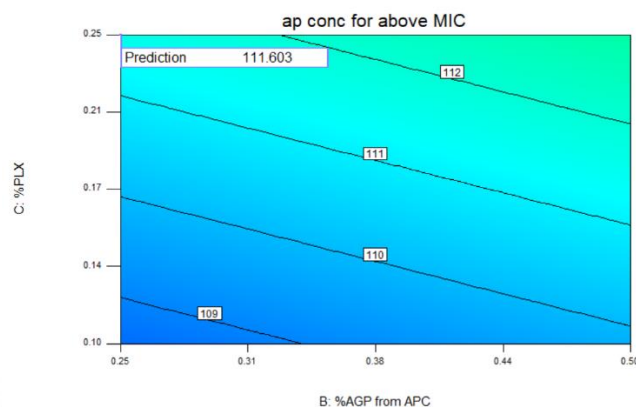


ภาพประกอบ 16 3D surface plot (A) และ contour plot (B) ของร้อยละปริมาณ poloxamer 188 และร้อยละปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในสารสกัดฟ้าทะลายโจรต่อความสามารถในการเปียกของผลิตภัณฑ์

2.5. การหาสูตรตำรับที่เหมาะสม (optimization) สำหรับผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจากสารสกัดฟ้าทะลายโจร

การหาสูตรตำรับที่เหมาะสมสำหรับผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจากสารสกัดฟ้าทะลายโจร จะพิจารณาจากสูตรตำรับที่สามารถปลดปล่อยแอนโดรกราโฟไลด์จนได้ความเข้มข้นของแอนโดรกราโฟไลด์มากกว่า MIC เป็นเป้าหมายของผลิตภัณฑ์ โดยที่ค่าตัวแปรต้นต้องเป็นไปตามเป้าหมาย ดังนี้ (1) ร้อยละปริมาณเอทานอลต้องมีค่าต่ำที่สุดที่สามารถช่วยละลายแอนโดรกราโฟไลด์และไม่เกิดปัญหาในการขยายกำลังการผลิตระดับอุตสาหกรรม (2) ร้อยละปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในสารสกัดฟ้าทะลายโจรต้องมีค่าต่ำที่สุดที่ทำให้ผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวสามารถออกฤทธิ์ได้ตามต้องการและสามารถก่อเจลได้อย่างสมบูรณ์ (3) ร้อยละปริมาณ poloxamer 188 ต้องมีค่าสูงที่สุดที่ช่วยเพิ่มการละลายของแอนโดรกราโฟไลด์และเพิ่มความสามารถในการเปียกน้ำของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัว แต่ยังทำให้คงรูปของเจลและไม่ลดความคงสภาพของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัว โดยค่าที่บ่งบอกสูตรตำรับที่เหมาะสมตามเป้าหมายทั้งหมดที่ต้องการจะแสดงให้เห็นจากค่า desirability ซึ่งค่า desirability ของสูตรตำรับที่เหมาะสมตามเป้าหมายที่สุดเป็น 0.998 โดยสูตรตำรับนี้ประกอบด้วยร้อยละปริมาณเอทานอลเท่ากับ 6.57, ร้อยละปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในสารสกัดฟ้าทะลายโจรเท่ากับ 0.25, และร้อยละปริมาณ poloxamer 188 เท่ากับ 0.25 ซึ่งสามารถทำนายผลได้ว่า ความเข้มข้นของแอนโดรกราโฟไลด์ที่ปลดปล่อยมากกว่า MIC เป็น 111.603 $\mu\text{g/ml}$ ดังภาพที่ 17 ดังนั้นสูตรตำรับของผลิตภัณฑ์

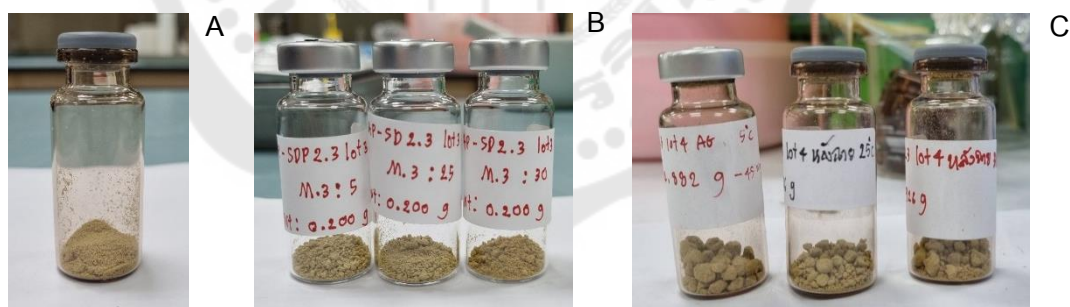
ของแข็งกระจายตัวจากสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่เหมาะสมที่สุดจึงเป็นสูตรที่สามารถให้ผลตามที่ต้องการ โดยใช้ตัวแปรต้นตามเป้าหมายที่กำหนดได้



ภาพประกอบ 17 contour plot ของร้อยละปริมาณ poloxamer 188 และร้อยละปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ร้อยละปริมาณเอทานอลเป็น 6.57 ต่อความเข้มข้นของแอนโดรกราโฟไลด์ที่ปลดปล่อยมากกว่า MIC

3. การศึกษาความคงสภาพของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจากสารสกัดฟ้าทะลายโจร

3.1. ลักษณะภายนอก สี



ภาพประกอบ 18 ผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวที่เก็บรักษาเป็นเวลา 0 (A), 3 (B), 6 (C) เดือน ที่อุณหภูมิ 5, 25, 30 °C ตามลำดับจากซ้ายไปขวาของภาพ

จากผลการทดลอง ดังภาพที่ 18 พบว่า ผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวที่เดือน 0 มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีขาวอมเหลือง ไม่มีการเกาะกลุ่มกันของผงยา เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 3 เดือน ผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจะมีลักษณะเป็นผงหยาบสีขาวอมเหลือง เริ่มมีการเกาะกลุ่มกันของผงยาบางส่วน โดยผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 5, 25, 30 °C มีลักษณะของผงยาไม่แตกต่างกัน เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 6 เดือน ผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจะมีลักษณะเป็นผงหยาบสีขาวอม

เหลือง มีการเกาะกลุ่มกันของผงยาเป็นส่วนใหญ่ โดยผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 5, 25, 30 °C มีลักษณะของผงยาไม่แตกต่างกัน แสดงว่า เมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลานานขึ้น จะมีผลให้ผงของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวเกาะกลุ่มกันมากขึ้น แต่สีของผลิตภัณฑ์ไม่เปลี่ยนแปลง ขณะที่ระยะเวลาเก็บรักษาเท่ากัน ที่อุณหภูมิแตกต่างกันจะไม่มีผลต่อลักษณะภายนอกและสีของผลิตภัณฑ์ เนื่องจาก poloxamer 188 มีคุณสมบัติเป็น hygroscopic โดยจากการทดสอบความสามารถในการดูดความชื้นของ poloxamer 188 ด้วยวิธี moisture adsorption isotherms พบว่า poloxamer 188 สามารถดูดซับน้ำได้ 1.5% ที่อุณหภูมิ 25°C⁽⁴⁰⁾ ซึ่งทำให้ผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวสามารถดูดซับความชื้นได้ดี ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวเกิดการเกาะกลุ่มเป็นก้อน เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลานานขึ้น ดังนั้นลักษณะภายนอกและสีของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจึงไม่ผ่านเกณฑ์การยอมรับที่กำหนดใน stability protocol ดังตารางที่ 2

3.2. ปริมาณน้ำในผลิตภัณฑ์

จากผลการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 14 พบว่า ผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวมีปริมาณน้ำในผลิตภัณฑ์เกินเกณฑ์การยอมรับของ United States pharmacopeia (USP) 41⁽³²⁾ ตั้งแต่ที่เดือน 0 ซึ่งกำหนดว่า ปริมาณน้ำในผลิตภัณฑ์ต้องไม่เกิน 5%w/w อย่างไรก็ตาม เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลานานขึ้น จะเห็นได้ว่า ปริมาณน้ำในผลิตภัณฑ์มีแนวโน้มสูงขึ้น โดยเมื่อเปรียบเทียบที่เวลาเดียวกัน ปริมาณน้ำในผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 5, 25, 30 °C จะมีค่าไม่แตกต่างกันมาก เนื่องจากผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวมีส่วนประกอบ คือ poloxamer 188 ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติ hygroscopic⁽⁴⁰⁾ ทำให้ผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวสามารถดูดซับความชื้นในบรรยากาศได้ดี จึงมีปริมาณน้ำในผลิตภัณฑ์สูงเกินเกณฑ์ที่กำหนดและมีปริมาณน้ำในผลิตภัณฑ์มากขึ้น เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลานานขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะภายนอกและสีของผลิตภัณฑ์ที่ผงยาเกิดการเกาะกลุ่มกันมากขึ้น

ตาราง 14 ปริมาณน้ำในผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัว เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 0, 3, 6 เดือน

สภาวะในการเก็บรักษา		น้ำหนักก่อน อบ (g)	น้ำหนักหลัง อบ (g)	ร้อยละปริมาณน้ำในเกสซ์ ภัณฑ์ (%w/w)
เดือน 0		1.000	0.906	9.4
	5°C	1.000	0.895	10.5
เดือน 3	25°C/ 60 %RH	1.000	0.900	10
	30°C/ 75 %RH	1.000	0.915	8.5
	5°C	1.000	0.880	12
เดือน 6	25°C/ 60 %RH	1.000	0.890	11
	30°C/ 75 %RH	1.000	0.901	9.9

3.3. ความสามารถในการเปียกของผลิตภัณฑ์

ความสามารถในการเปียกเป็นการวัดความสามารถของผงยาในการดูดซับน้ำกระสายยาด้วยแรง capillary ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่จะส่งผลต่อระยะเวลาในการผสมของผลิตภัณฑ์กับน้ำกระสายยา⁽⁴¹⁾ โดยถ้าความสามารถในการเปียกของผลิตภัณฑ์มากขึ้น ทำให้ผลิตภัณฑ์ผสมกับน้ำกระสายยาได้ดีขึ้น ส่งผลให้ระยะเวลาในการผสมของผลิตภัณฑ์กับน้ำกระสายยาลดลง จึงทำการวัดความสามารถในการเปียกในรูปแบบของระยะเวลาในการผสมของผลิตภัณฑ์กับน้ำกระสายยา ซึ่งระยะเวลาในการผสมของผลิตภัณฑ์กับน้ำจะส่งผลต่อความสะดวกในการใช้ยาของแพทย์ ดังนั้นระยะเวลาในการผสมควรจะน้อยที่สุดที่ผงยาสามารถกระจายตัวทั่วถึงในน้ำกระสายยา ทำให้ความสะดวกในการใช้ยาเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ความร่วมมือในการใช้ยาของแพทย์ผู้รักษาเพิ่มขึ้น โดยเกณฑ์ของระยะเวลาในการผสมขึ้นกับการกำหนดของผู้พัฒนาผลิตภัณฑ์⁽⁴²⁾ ซึ่งผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวในงานวิจัยนี้กำหนดให้ไม่เกิน 5 นาที จากตารางที่ 15 พบว่า เมื่อเตรียมผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวใหม่ (เดือน 0) จะมีระยะเวลาในการผสมเป็น 2.47 นาที เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลานานขึ้น ระยะเวลาในการผสมของผลิตภัณฑ์จะสูงขึ้นในทุกอุณหภูมิของการเก็บรักษา ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะภายนอกของผงยาที่จะเกาะกลุ่มกันเป็นก้อนใหญ่ เมื่อเก็บที่ระยะเวลานานขึ้น ทำให้พื้นผิวสัมผัสของน้ำกระสายยากับผงยาลดลง ส่งผลให้ระยะเวลาในการผสม

ของผลิตภัณฑ์นานขึ้น แต่เมื่อเปรียบเทียบที่ระยะเวลาเดียวกัน อุณหภูมิในการเก็บรักษาที่สูงขึ้น จะไม่มีผลต่อระยะเวลาในการผสมของผลิตภัณฑ์

ตาราง 15 ความสามารถในการเปียกของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัว เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 0, 3, 6 เดือน

สภาวะในการเก็บรักษา		ระยะเวลาในการผสม (นาที)
เดือน 0		2.47
เดือน 3	5°C	3.46
	25°C/ 60 %RH	3.31
	30°C/ 75 %RH	4.11
เดือน 6	5°C	5.46
	25°C/ 60 %RH	5.25
	30°C/ 75 %RH	5.42

3.4. pH ของผลิตภัณฑ์

จากผลการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 16 พบว่า pH ของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวมีค่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับของ pH ภายในช่องปาก เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 0, 3, 6 เดือน ในทุกอุณหภูมิ ซึ่งกำหนดไว้ว่า pH ของผลิตภัณฑ์ต้องมีค่าอยู่ในช่วง 6.2-7.4⁽³⁴⁾ โดยระยะเวลาในการเก็บรักษาและอุณหภูมิที่ต่างกันจะมีค่า pH ของผลิตภัณฑ์ไม่แตกต่างกันมาก ดังนั้นระยะเวลาในการเก็บรักษาและอุณหภูมิจึงไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่า pH ของผลิตภัณฑ์

ตาราง 16 pH ของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัว เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 0, 3, 6 เดือน

สภาวะในการเก็บรักษา		pH
เดือน 0		6.38
เดือน 3	5°C	6.32
	25°C/ 60 %RH	6.44
	30°C/ 75 %RH	6.50
เดือน 6	5°C	6.61
	25°C/ 60 %RH	6.65
	30°C/ 75 %RH	6.35

3.5. ปริมาณตัวยาสำคัญของผลิตภัณฑ์

เมื่อนำผลการวิเคราะห์ปริมาณตัวยาสำคัญของผลิตภัณฑ์ ดังตารางที่ 17 ไปทดสอบทางสถิติด้วย two way ANOVA พบว่า ระยะเวลาในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่มีผลต่อร้อยละปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p=0.004$) แต่คุณสมบัติในการเก็บรักษาไม่มีผลต่อร้อยละปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในผลิตภัณฑ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.791$) โดยร้อยละปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในผลิตภัณฑ์ที่เวลา 3 เดือนจะมีค่าไม่แตกต่างกับผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวที่เวลา 0 เดือนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.881$) ขณะที่ร้อยละปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในผลิตภัณฑ์จะมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 6 เดือน โดยเปรียบเทียบกับร้อยละปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในผลิตภัณฑ์ที่เวลา 0 และ 3 เดือน ซึ่งจะมีค่า p เป็น 0.021 และ 0.004 ตามลำดับ สอดคล้องกับงานวิจัยการทดสอบความคงสภาพของแอนโดรกราโฟไลด์ในผงสมุนไพรฟ้าทะลายโจร พบว่า ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในผงฟ้าทะลายโจรจะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง หลังจาก 3 เดือน โดยเมื่อคำนวณอายุของผงฟ้าทะลายโจรหรือระยะเวลาที่ผงฟ้าทะลายโจรยังคงเหลือแอนโดรกราโฟไลด์ 90% (shelf life) ที่อุณหภูมิ 25°C ตามทฤษฎีของ Arrhenius plot จะเท่ากับ 0.46 ปี⁽⁴³⁾ นอกจากนี้เมื่อคำนวณ % Labeled amount ของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัว พบว่า % Labeled amount ของเดือนที่ 3 และ 6 ไม่อยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับของ USP 41 ที่กำหนดไว้ว่า % Labeled amount ต้องมีค่าอยู่ในช่วง 90-110%

ยกเว้นผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวที่เดือน 3 อุณหภูมิ 30°C lot1 และ lot3 จะมีค่า % Labeled amount อยู่ในช่วงที่กำหนด โดย % Labeled amount ในเดือนที่ 3 ส่วนใหญ่จะมีค่าสูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับเดือน 0 อาจเกิดจากแอนโดรกราโฟไลด์เปลี่ยนรูปเป็นอนุพันธ์ที่ใกล้เคียงกัน คือ 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide⁽⁴³⁾ ทำให้เกิดการดูดกลืนแสง UV ที่ความยาวคลื่นเดียวกันมากขึ้น ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ที่วัดได้จึงสูงขึ้น ส่งผลให้ % Labeled amount มากขึ้น แต่ในเดือนที่ 6 % Labeled amount มีค่าลดลงในทุกอุณหภูมิจากการเสื่อมสลายของแอนโดรกราโฟไลด์ เมื่อเก็บผลิตภัณฑ์ที่ระยะเวลานานขึ้น

ตาราง 17 ปริมาณตัวยาสำคัญของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัว เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 0, 3, 6 เดือน (n=3)

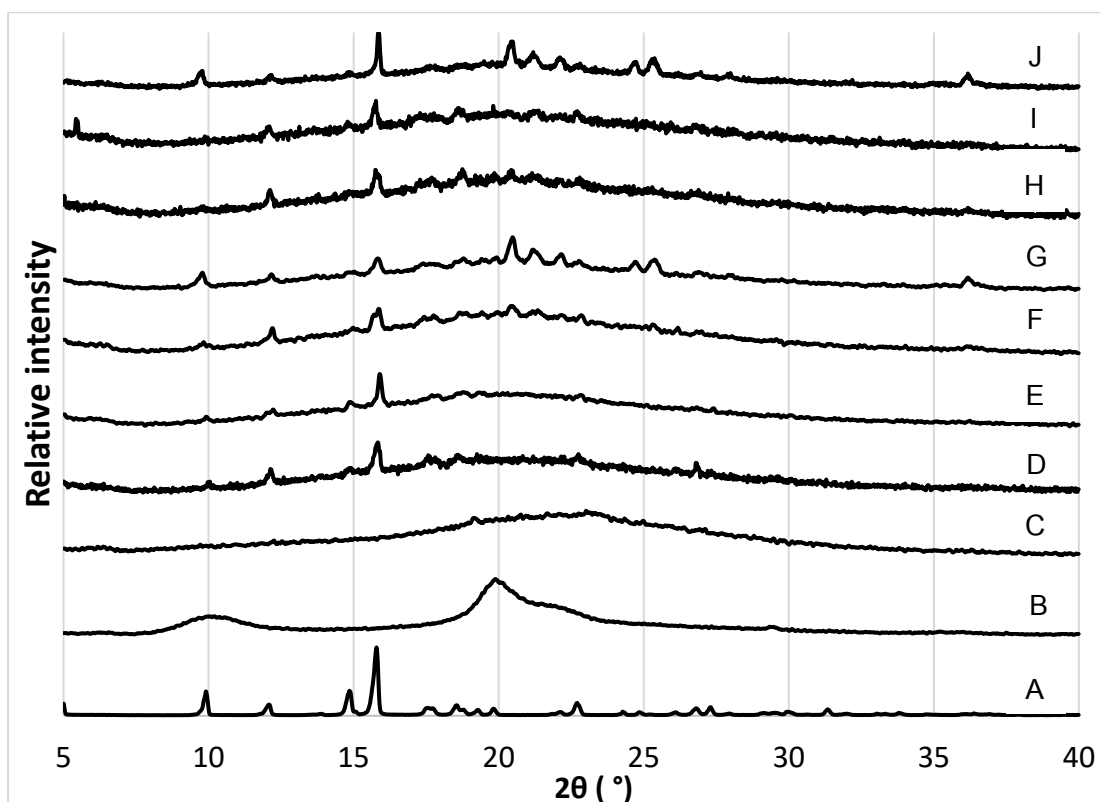
สภาวะในการเก็บรักษา		ร้อยละปริมาณ AGP ในผลิตภัณฑ์เฉลี่ย			% Labeled amount (%)		
		(%w/w) (mean±SD)					
		Lot 1 (n=3)	Lot 2 (n=3)	Lot 3 (n=3)	Lot 1	Lot 2	Lot 3
เดือน 0		7.37±0.16	7.55±0.31	5.38±0.13	100	100	100
เดือน 3	5°C	8.58±0.19	5.44±0.31	6.48±0.29	116.42	111.12	120.57
	25°C/ 60	8.65±0.52	3.72±0.01	5.95±0.49	117.34	67.36	110.68
	%RH						
	30°C/ 75	7.44±0.48	8.18±0.43	5.23±0.31	100.93	122.01	97.25
	%RH						
เดือน 6	5°C	4.59±0.60 ^{a, b}	4.66±0.47 ^{a, b}	4.17±1.18 ^{a, b}	62.31	61.82	77.61
	25°C/ 60	4.21±0.23 ^{a, b}	4.33±0.45 ^{a, b}	4.49±1.04 ^{a, b}	57.16	57.46	83.47
	%RH						
	30°C/ 75	4.36±0.50 ^{a, b}	4.28±0.20 ^{a, b}	4.81±0.36 ^{a, b}	59.10	56.78	89.51
	%RH						

^a แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อเทียบกับเดือน 0 (p=0.021)

^b แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อเทียบกับเดือน 3 (p=0.004)

3.6. ความเป็นผลึกของผลิตภัณฑ์

จากผลการทดลอง พบว่า diffractogram ของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวที่เดือน 3 มีแนวโน้มที่ค่า intensity ของ peak จะมีค่าลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวที่เดือน 0 และ 6 ดังนั้นผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวที่เดือน 3 จึงมีความเป็นผลึกของผลิตภัณฑ์ต่ำที่สุด ทำให้การปลดปล่อยแอนโดรกราโฟไลด์สูงขึ้น ขณะที่เมื่อพิจารณาผลิตภัณฑ์ที่เก็บเป็นระยะเวลาเท่ากัน อุณหภูมิที่มากขึ้นมีผลต่อการเพิ่มความเป็นผลึกของผลิตภัณฑ์ เนื่องจากอุณหภูมิที่มากขึ้นมีผลให้แอนโดรกราโฟไลด์ที่อยู่ในรูปอสัณฐานในผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวเกิดการกลับเป็นผลึกของแอนโดรกราโฟไลด์มากขึ้น⁽²¹⁾ ดังภาพที่ 19 พบว่า ผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวเมื่อเก็บเป็นเวลา 3 เดือน ที่ 10° จะมี intensity ของ characteristic peak สูงขึ้นอย่างชัดเจน เมื่ออุณหภูมิมากขึ้น ส่วนผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวเมื่อเก็บเป็นเวลา 6 เดือน ที่ 10° และ 16° มี intensity ของ characteristic peak สูงขึ้น เมื่ออุณหภูมิมากขึ้นเช่นเดียวกับผลิตภัณฑ์ที่ระยะเวลา 3 เดือน เมื่อพิจารณา diffractogram ของไคโตซานที่ 20° มี intensity สูงเล็กน้อย เนื่องจากไคโตซานมีคุณสมบัติเป็น semi-crystalline⁽⁴⁴⁾ เมื่อนำไคโตซานและสารช่วยในตำรับมาผ่านกระบวนการพ่นให้แห้งเป็น placebo จะเห็นได้ว่า x-ray pattern ของ placebo อยู่ในรูปแบบ halo pattern แสดงว่า กระบวนการพ่นให้แห้งมีผลให้ผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวที่ได้อยู่ในรูปอสัณฐาน เมื่อเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวที่เดือน 0 จึงทำให้แอนโดรกราโฟไลด์เปลี่ยนจากรูปผลึกเป็นรูปอสัณฐาน ส่งผลให้ diffractogram ของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวที่เดือน 0 มี intensity ของ characteristic peak ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับ intensity ของแอนโดรกราโฟไลด์มาตรฐาน⁽²²⁾



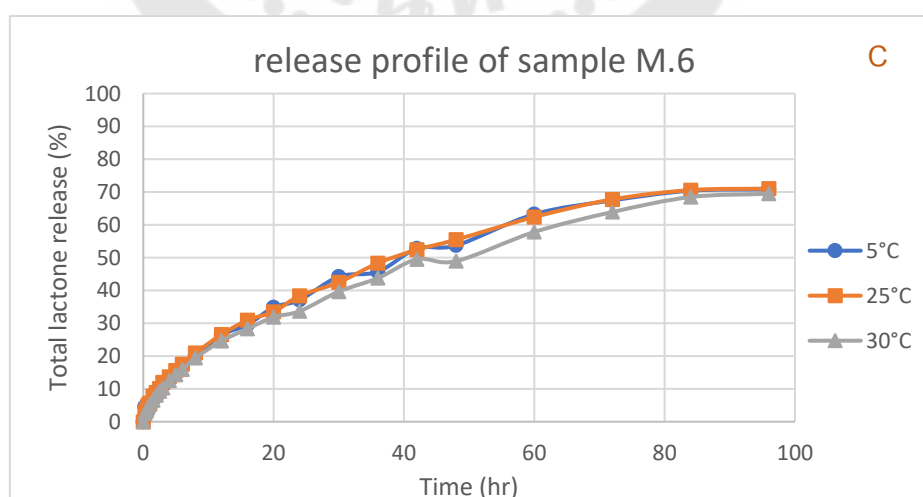
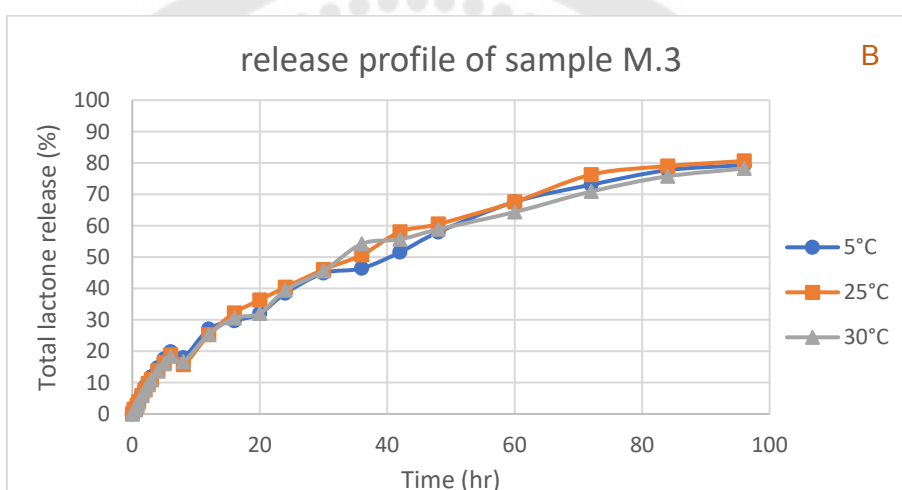
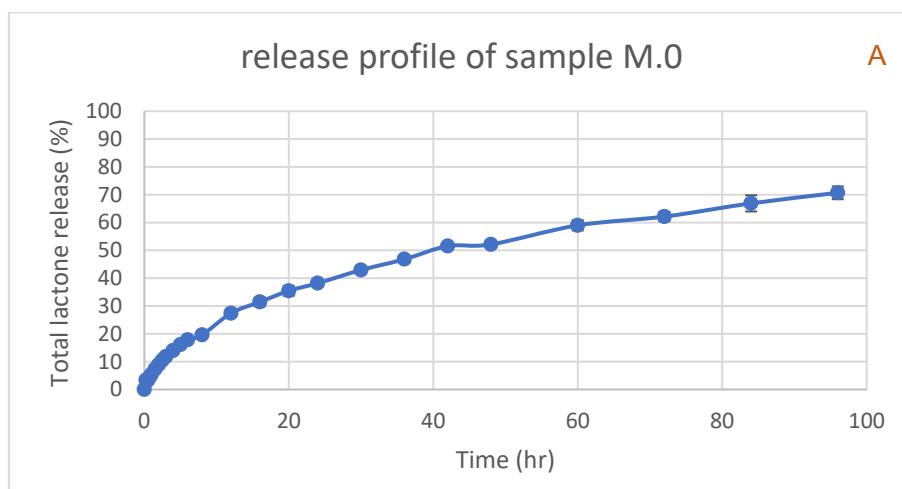
ภาพประกอบ 19 diffractogram ของ standard AP (A), ไคโตซาน (B), placebo (C), ผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัว เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 0 (D), 3 (E-G), 6 (H-J) เดือน ที่อุณหภูมิ 5, 25, 30°C ตามลำดับ เรียงจากล่างขึ้นบนของเดือน 3 และ 6

3.7. ความสามารถในการปลดปล่อยแอนโดรกราโฟไลด์ของผลิตภัณฑ์

จากผลการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 18 และภาพที่ 20 พบว่า ความสามารถในการปลดปล่อยแอนโดรกราโฟไลด์ที่แสดงในรูปแบบร้อยละปริมาณ total lactone ที่ปลดปล่อยของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจะมีค่าไม่แตกต่างกัน เมื่อเก็บที่ระยะเวลา 0 และ 6 เดือน แต่ร้อยละปริมาณ total lactone ที่ปลดปล่อยของผลิตภัณฑ์มีค่าสูงขึ้น เมื่อเก็บที่ระยะเวลา 3 เดือน ซึ่งจะสอดคล้องกับ diffractogram ของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัว เนื่องจากผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวที่เดือน 3 มีความเป็นผลึกลดลง ทำให้แอนโดรกราโฟไลด์สามารถปลดปล่อยออกมาจากผลิตภัณฑ์มากขึ้น ส่งผลให้ร้อยละปริมาณ total lactone ที่ปลดปล่อยของผลิตภัณฑ์มีค่าสูงขึ้น โดยร้อยละปริมาณ total lactone ที่ปลดปล่อยของผลิตภัณฑ์ที่เวลาเดียวกันจะมีค่าไม่แตกต่างกันในทุกอุณหภูมิ ดังนั้นอุณหภูมิและระยะเวลาเก็บรักษาจึงไม่มีผลต่อร้อยละปริมาณ total lactone ที่ปลดปล่อยของผลิตภัณฑ์ ซึ่งจะสอดคล้องกับกราฟ release profile ในภาพที่ 20

ตาราง 18 ร้อยละปริมาณ total lactone ที่ปลดปล่อยของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัว เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 0, 3, 6 เดือน

สภาวะในการเก็บรักษา		ร้อยละปริมาณ total lactone ที่ปลดปล่อย สะสม (%w/w)
เดือน 0		70.68
เดือน 3	5°C	79.31
	25°C/ 60 %RH	80.62
	30°C/ 75 %RH	78.22
เดือน 6	5°C	70.80
	25°C/ 60 %RH	71.04
	30°C/ 75 %RH	69.47



ภาพประกอบ 20 release profile ของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัว เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 0 (A),
3 (B), 6 (C) เดือน

3.8. ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์

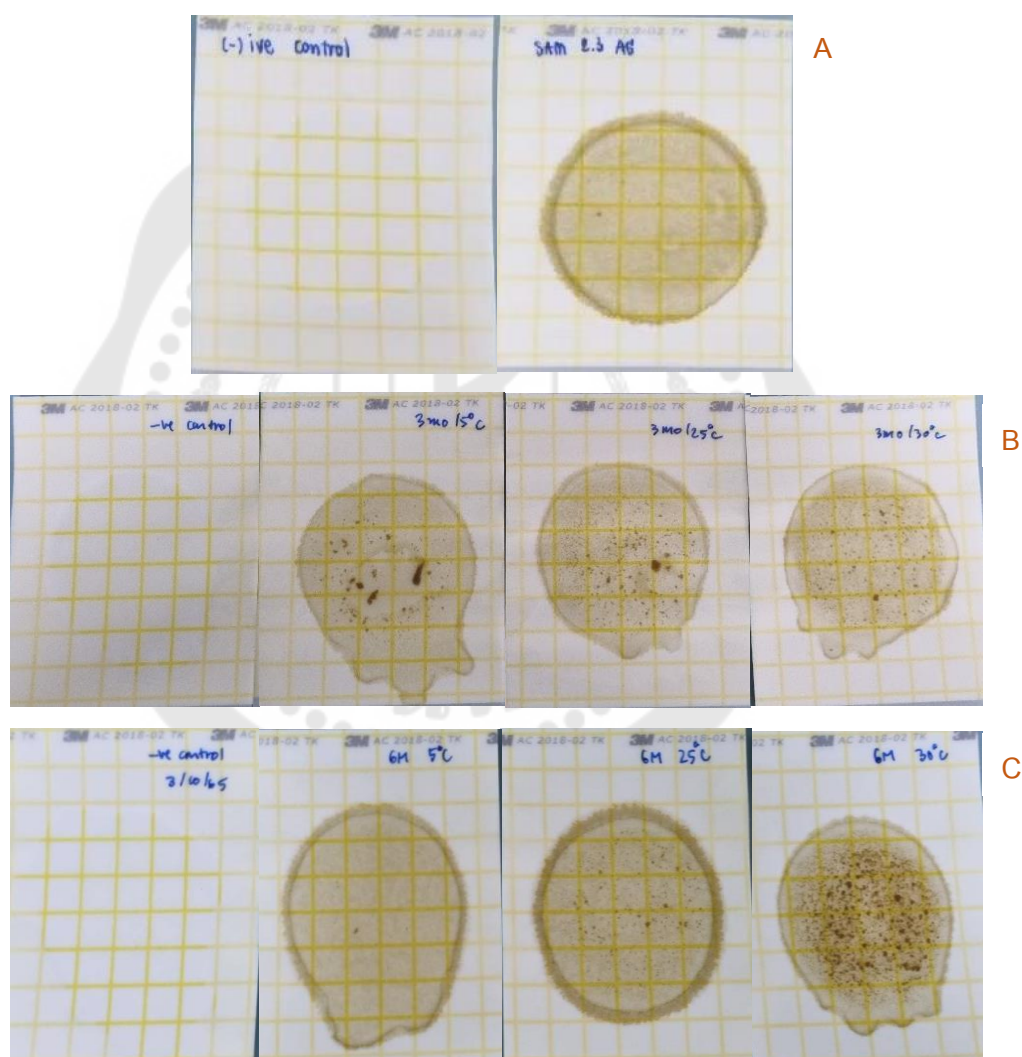
จากผลการทดลอง ดังภาพที่ 21-24 พบว่า เมื่อทดสอบการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการอากาศ ผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวที่เก็บเป็นเวลา 0, 3, 6 เดือนไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อที่บริเวณแผ่นทดสอบในทุกอุณหภูมิและไม่พบเชื้อในแผ่นทดสอบ negative control แสดงว่า sterile buffer pH 7.0 ที่ใช้เป็นตัวทำลายผลิตภัณฑ์ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการอากาศและผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวที่เก็บรักษาในระยะเวลาและอุณหภูมิที่ศึกษามีปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการอากาศที่ปนเปื้อนไม่เกิน 10^2 cfu/g

เมื่อทดสอบการปนเปื้อนเชื้อยีสต์และราทั้งหมด ผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวที่เก็บเป็นเวลา 0, 3, 6 เดือนไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อที่บริเวณแผ่นทดสอบในทุกอุณหภูมิและไม่พบเชื้อในแผ่นทดสอบ negative control แสดงว่า sterile buffer pH 7.0 ที่ใช้เป็นตัวทำลายผลิตภัณฑ์ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อยีสต์และราทั้งหมดและผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวที่เก็บรักษาในระยะเวลาและอุณหภูมิที่ศึกษามีปริมาณเชื้อยีสต์และราทั้งหมดที่ปนเปื้อนไม่เกิน 10 cfu/g

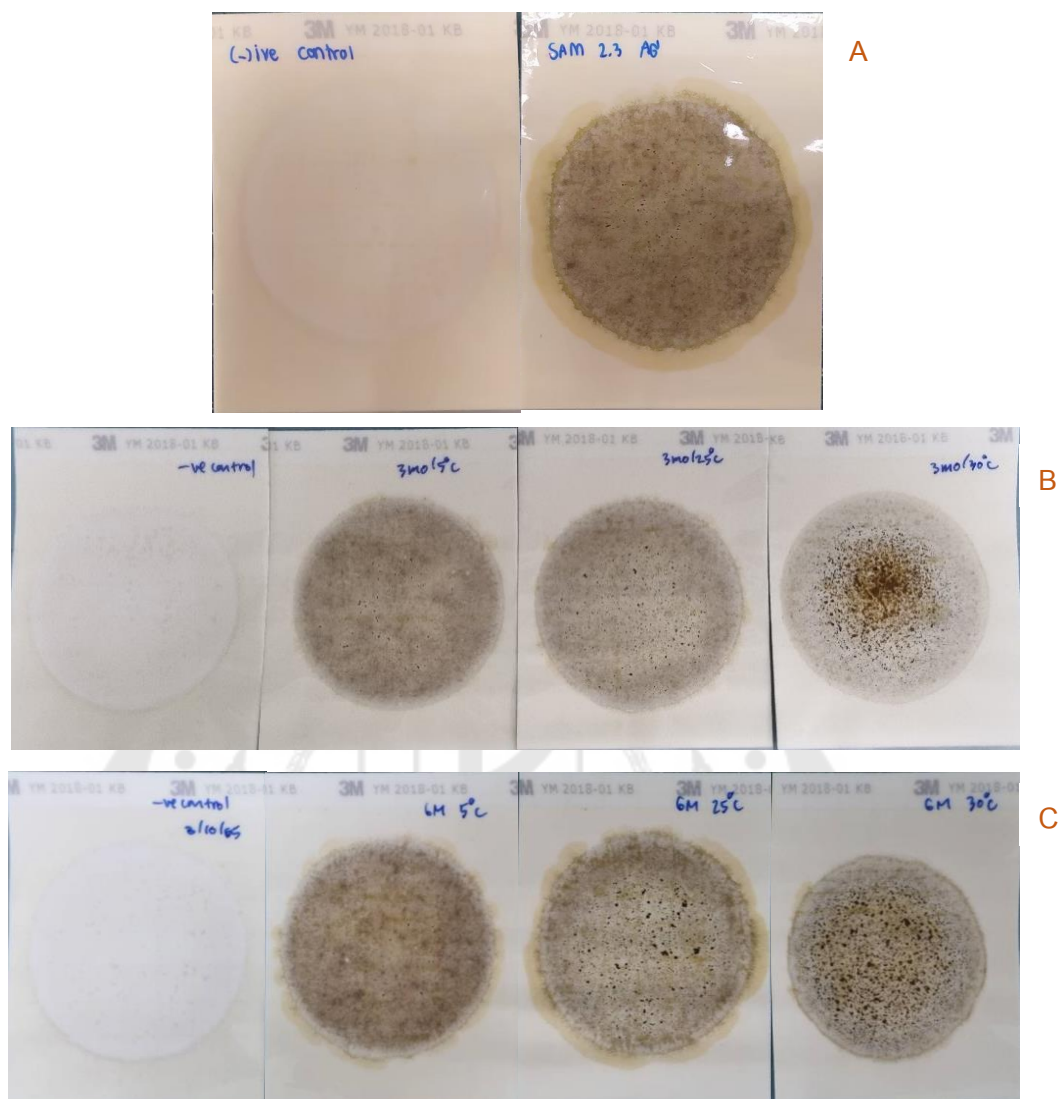
เมื่อทดสอบการปนเปื้อนเชื้อ *S. aureus* ผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวที่เก็บเป็นเวลา 0, 3, 6 เดือนไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อที่บริเวณแผ่นทดสอบในทุกอุณหภูมิและไม่พบเชื้อในแผ่นทดสอบ negative control ของเดือน 0 และ 6 แต่พบเชื้อในแผ่นทดสอบ negative control ของเดือน 3 แสดงว่า sterile buffer pH 7.0 ที่ใช้เป็นตัวทำลายผลิตภัณฑ์ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อ *S. aureus* ในเดือน 0 และ 6 แต่พบการปนเปื้อนของเชื้อ *S. aureus* ในเดือน 3 ซึ่งอาจเกิดจากสภาพแวดล้อมที่ใช้ในการทดสอบมีการปนเปื้อนเชื้อ *S. aureus* หรือเทคนิคในการทดลองยังไม่ชำนาญ ทำให้ปรากฏการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* ใน negative control แสดงว่าสภาวะที่ใช้ในการทดสอบสามารถทำให้เชื้อ *S. aureus* เจริญเติบโตได้ หากมีเชื้อ *S. aureus* ปนเปื้อน อย่างไรก็ตามควรทดสอบการปนเปื้อนเชื้อ *S. aureus* ใน negative control ซ้ำที่สภาพแวดล้อมเดิม จำนวน 3 ครั้ง เพื่อยืนยันผลการทดสอบ ขณะที่ผลิตภัณฑ์ที่ทดสอบในสภาวะเดียวกันไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อเลย

เมื่อทดสอบการปนเปื้อนเชื้อ *P. aeruginosa* ผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวที่เก็บเป็นเวลา 0, 3, 6 เดือนไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อที่บริเวณจานอาหารเลี้ยงเชื้อในทุกอุณหภูมิและไม่พบเชื้อในจานอาหารเลี้ยงเชื้อของ negative control แสดงว่า sterile buffer pH 7.0 ที่ใช้เป็นตัวทำลายผลิตภัณฑ์ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อ *P. aeruginosa* และผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวที่เก็บรักษาในระยะเวลาและอุณหภูมิที่ศึกษาไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อ *P. aeruginosa*

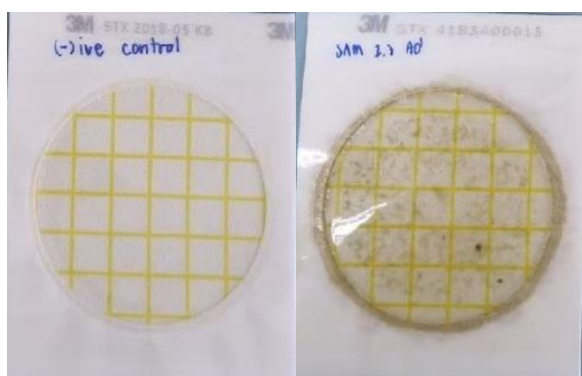
ดังนั้นผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวที่เก็บรักษาในสภาวะที่ศึกษามีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดของ USP 41 เนื่องจากกระบวนการเตรียมผลิตภัณฑ์มีการใช้เทคนิคปราศจากเชื้อ (aseptic technique) เพื่อป้องกันการปนเปื้อนเชื้อจากผู้ปฏิบัติงาน อุปกรณ์บรรจุภัณฑ์ และสถานที่ อีกทั้งผลิตภัณฑ์ยังผ่านการฉายรังสีแกมมา ด้วยความเข้มรังสี 4 kGy เพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวมีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนตามเกณฑ์ที่กำหนด



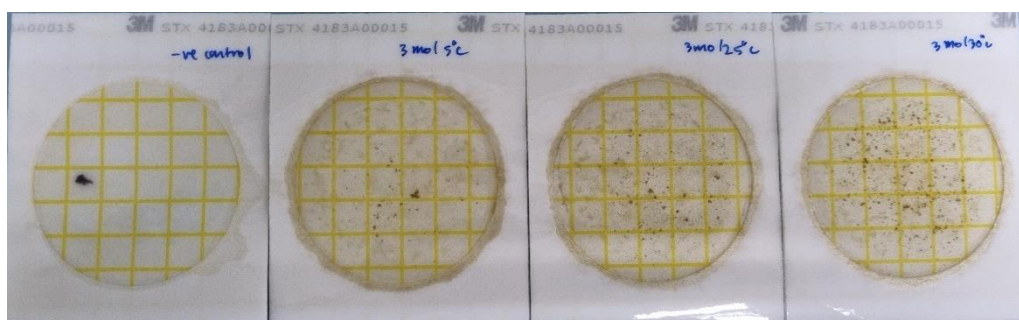
ภาพประกอบ 21 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียต้องการอากาศที่ปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัว เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 0 (A), 3 (B), 6 (C) เดือน และ negative control (-ve control)



ภาพประกอบ 22 ปริมาณเชื้อยีสต์และราทั้งหมดที่ปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัว เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 0 (A), 3 (B), 6 (C) เดือน และ negative control (-ve control)



A

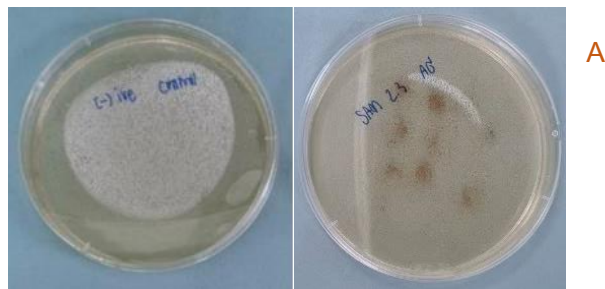


B

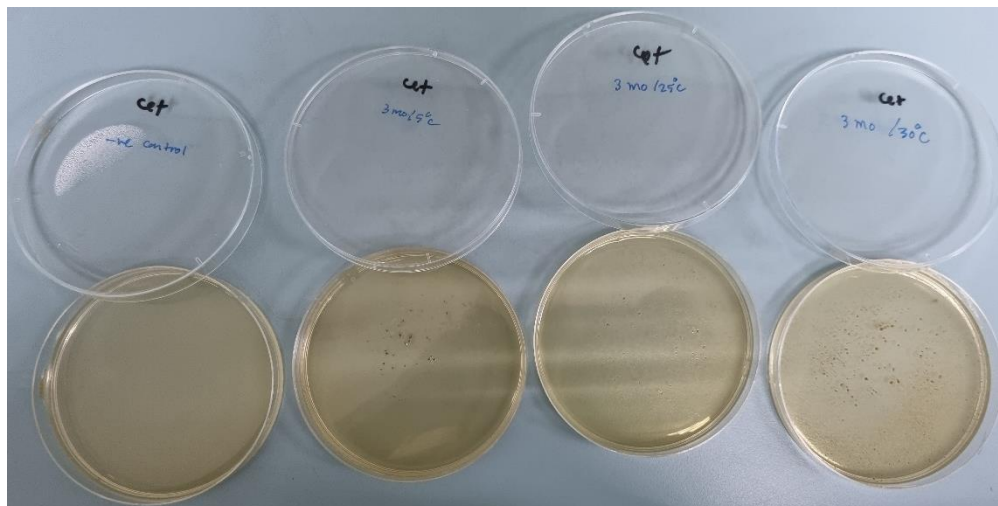


C

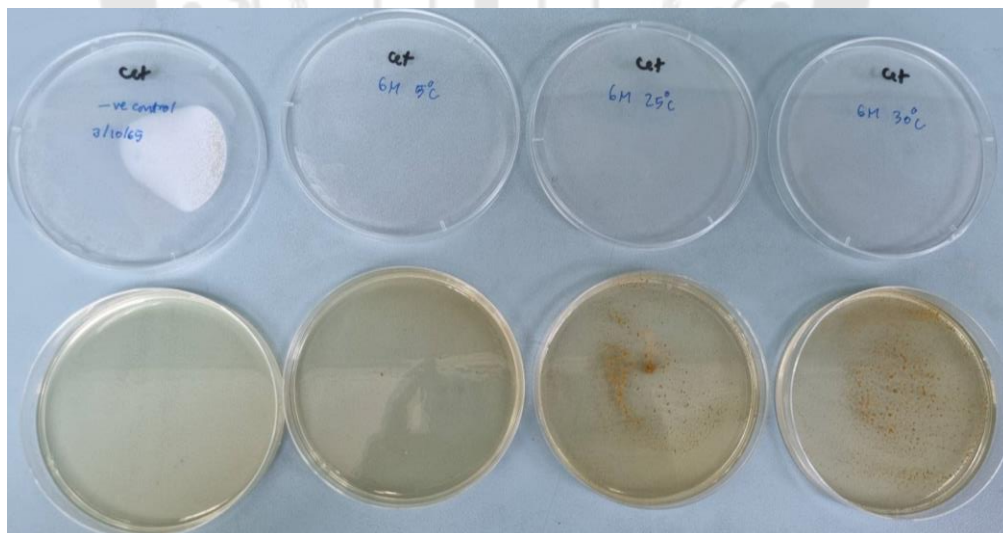
ภาพประกอบ 23 ปริมาณเชื้อ *S. aureus* ที่ปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัว เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 0 (A), 3 (B), 6 (C) เดือน และ negative control (-ve control)



A



B



C

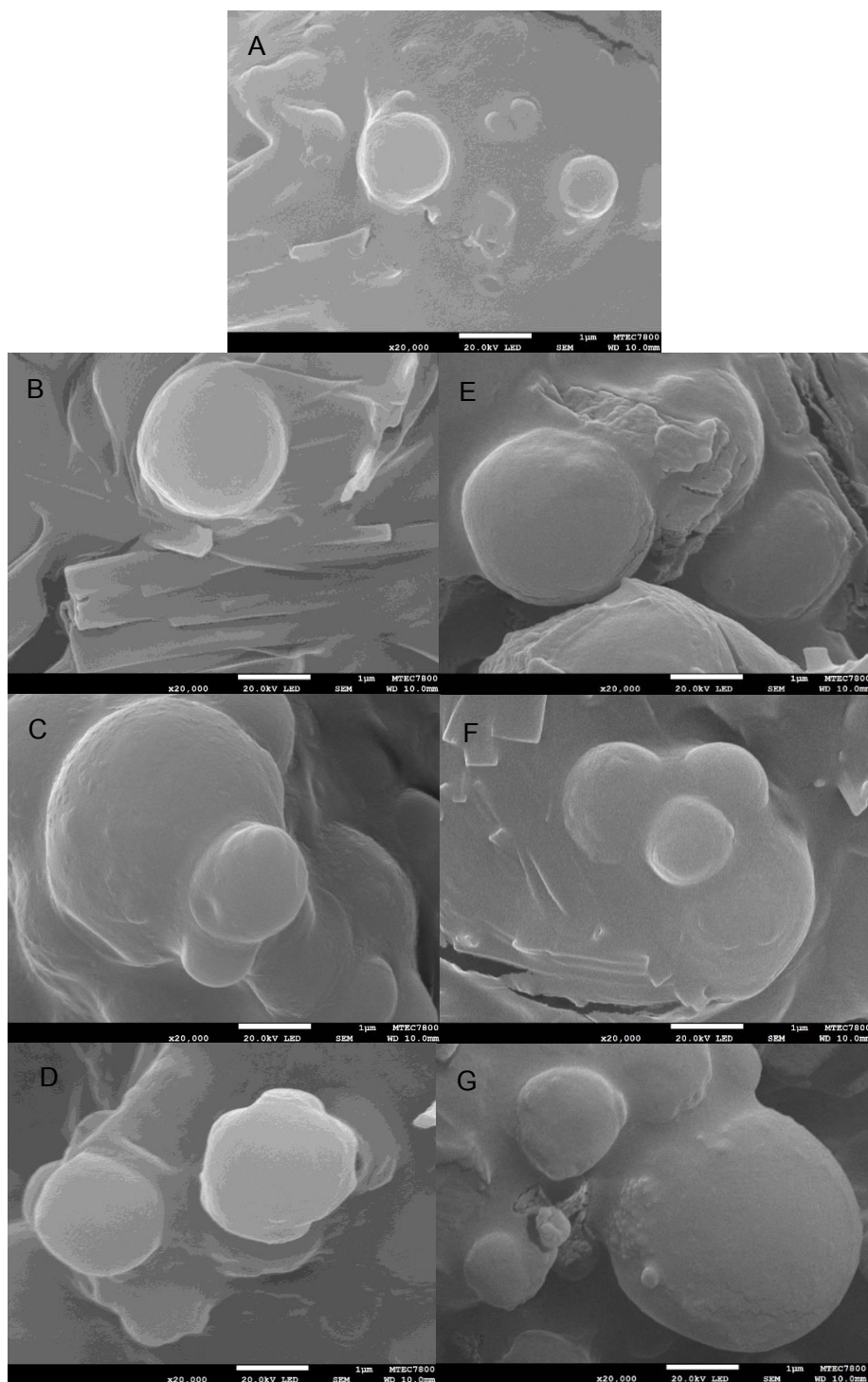
ภาพประกอบ 24 ปริมาณเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัว เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 0 (A), 3 (B), 6 (C) เดือน และ negative control (-ve control)

3.9. ขนาดอนุภาคของผลิตภัณฑ์

จากผลการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 19 และภาพที่ 25 พบว่า ผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวมีขนาดอนุภาคมากขึ้น และเกิดการเกาะกลุ่มกันของอนุภาคมากขึ้น เมื่อเก็บเป็นเวลานานขึ้น เนื่องจาก chitosan ที่เป็นส่วนประกอบหลักในตำรับมีหมู่ฟังก์ชันอะมิโน เมื่อผสม chitosan กับ สารละลายกรด หมู่อะมิโนจะเกิดการรับโปรตอนเป็นประจุบวก ($-\text{NH}_3^+$) ซึ่งทำให้ chitosan อยู่ในรูปที่แตกตัวเป็นไอออน (ionized form) ส่งผลให้ chitosan สามารถเกิดปฏิกิริยากับน้ำได้ดีขึ้นเป็น chitosan ที่ละลายน้ำได้ (water soluble chitosan)⁽⁴⁵⁾ ดังนั้นเมื่อนำ chitosan ที่ละลายน้ำได้ไปผ่านกระบวนการพ่นให้แห้ง chitosan จึงสามารถดูดความชื้นได้ ทำให้อนุภาคของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวเกิดการเกาะกลุ่มเป็นก้อน และมีขนาดอนุภาคมากขึ้น เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลานานขึ้น อีกทั้งผลิตภัณฑ์ยังมี poloxamer 188 ในสูตรตำรับซึ่งมีคุณสมบัติเป็น hygroscopic⁽⁴⁰⁾ ทำให้อนุภาคของผลิตภัณฑ์สามารถดูดซับความชื้นได้ดี และกระบวนการพ่นให้แห้งยังมีผลต่อการเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสของอนุภาคผลิตภัณฑ์กับน้ำ จึงทำให้อนุภาคของผลิตภัณฑ์ดูดซับความชื้นได้ดีเช่นกัน ซึ่งเป็นไปตามผลการทดสอบลักษณะภายนอกและปริมาณน้ำในผลิตภัณฑ์ โดยเมื่อพิจารณาผลิตภัณฑ์ที่เก็บเป็นระยะเวลาเท่ากัน ขนาดอนุภาคของผลิตภัณฑ์จะไม่แตกต่างกันมาก เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น แต่อนุภาคเกิดการเกาะกลุ่มกันเป็นก้อนมากขึ้น เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 25 และ 30°C เนื่องจากอุณหภูมิที่สูงขึ้นมีความสัมพันธ์โดยตรงกับความชื้นในอากาศที่มากขึ้น ทำให้อนุภาคของผลิตภัณฑ์ดูดซับความชื้นมากขึ้น ส่งผลให้อนุภาคเกิดการเกาะกลุ่มกันเป็นก้อนมากขึ้น

ตาราง 19 ขนาดอนุภาคของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัว เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 0, 3, 6 เดือน

สภาวะในการเก็บรักษา	ขนาดอนุภาคของผลิตภัณฑ์เฉลี่ย (μm) (mean $\pm$ SD)
เดือน 0	0.92 $\pm$ 0.43
5°C	1.89 $\pm$ 0.23
เดือน 3	25°C/ 60 %RH 1.96 $\pm$ 1.23
30°C/ 75 %RH	1.75 $\pm$ 0.44
5°C	2.20 $\pm$ 0.41
เดือน 6	25°C/ 60 %RH 1.70 $\pm$ 0.65
30°C/ 75 %RH	2.10 $\pm$ 1.22



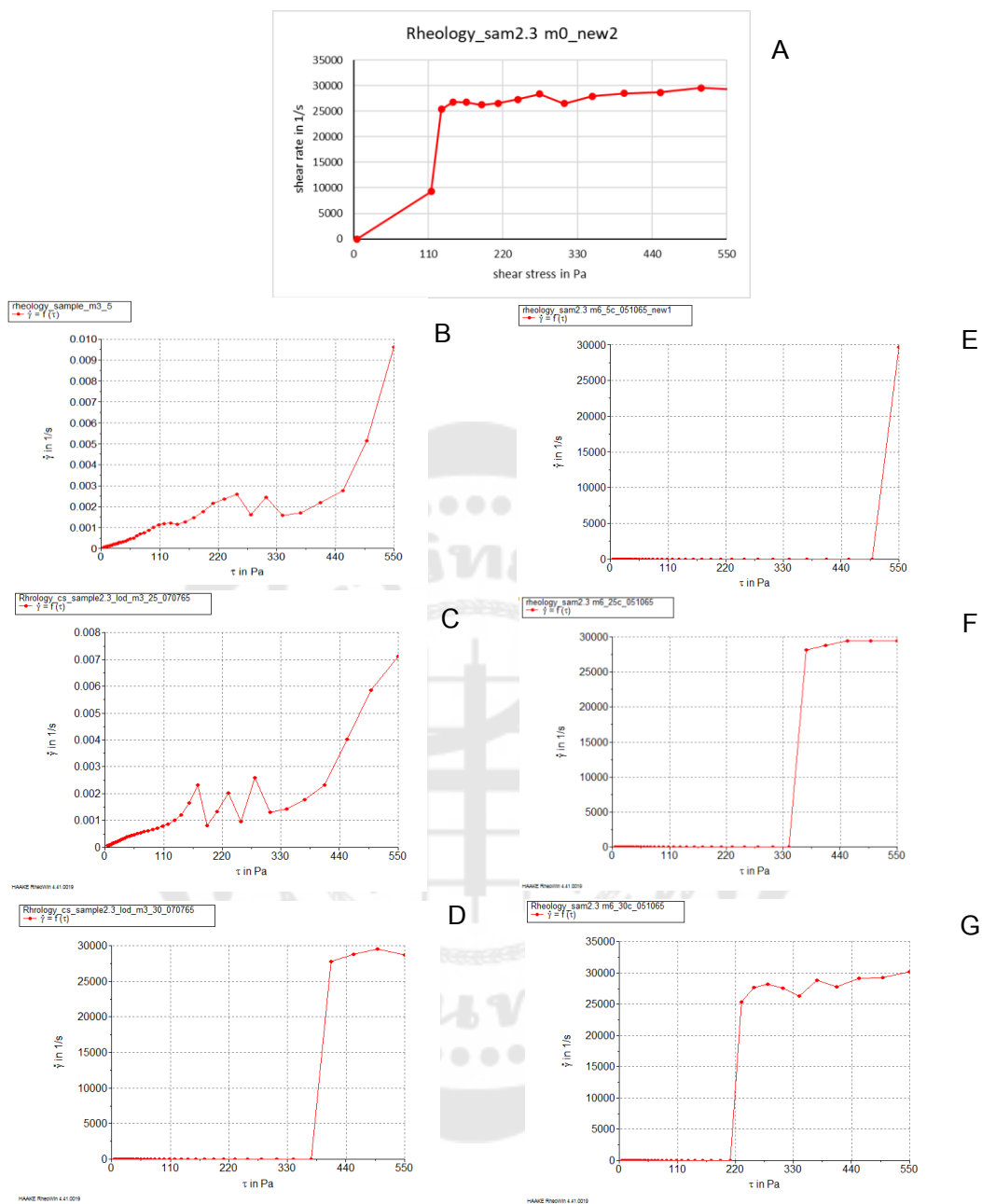
ภาพประกอบ 25 ขนาดอนุภาคของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัว เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 0 (A), 3 (B-D), 6 (E-G) เดือน ที่อุณหภูมิ 5, 25, 30 °C ตามลำดับตัวอักษร ที่กำลังขยาย 20,000 เท่า

3.10. ความหนืดของผลิตภัณฑ์

จากผลการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 20 และภาพที่ 26 พบว่า พฤติกรรมการไหลของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวที่เดือน 0 เป็นแบบพลาสติกเทียม (pseudoplastic) เนื่องจากอนุภาคแอนโดรกราไฟไลต์ในผลิตภัณฑ์จะกระจายตัวในโคโคซานซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบหลักของตำรับ ทำให้สมบัติการไหลเป็นไปตามโคโคซานที่มีพฤติกรรมการไหลแบบพลาสติกเทียม⁽⁴⁶⁾ เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 3 เดือน อนุภาคของผลิตภัณฑ์เริ่มมีขนาดใหญ่ขึ้น แต่ไม่เกิดการเกาะกลุ่มกัน พฤติกรรมการไหลของผลิตภัณฑ์จึงเป็นไปตามโคโคซานที่เป็นแบบพลาสติกเทียม แต่เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ทำให้อนุภาคของผลิตภัณฑ์ดูดซับความชื้นมากขึ้น ส่งผลให้อนุภาคเกิดการเกาะกลุ่มกันเป็นก้อน ซึ่งสอดคล้องกันกับผลการทดสอบขนาดอนุภาคของผลิตภัณฑ์ จึงต้องให้แรงเฉือนมากเพียงพอที่จะทำให้แรงยึดเกาะระหว่างอนุภาค โดยที่แรงเฉือนต้องมากกว่าจุด yield value เพื่อให้ ผลิตภัณฑ์สามารถไหลได้ พฤติกรรมการไหลของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจึงเปลี่ยนจากพลาสติกเทียมเป็นพลาสติก เมื่อพิจารณาผลิตภัณฑ์ที่เก็บเป็นเวลา 6 เดือน พฤติกรรมการไหลของผลิตภัณฑ์จะเป็นแบบพลาสติกในทุกอุณหภูมิ โดยอุณหภูมิที่ต่างกันไม่มีผลต่อพฤติกรรมการไหลของผลิตภัณฑ์ เนื่องจากอนุภาคเกิดการเกาะกลุ่มกันเป็นส่วนใหญ่ ทำให้แรงยึดเกาะระหว่างอนุภาคสูง ทำให้ต้องใช้แรงเฉือนมากกว่าจุด yield value จึงสามารถไหลได้ ส่งผลให้พฤติกรรมการไหลของผลิตภัณฑ์เป็นแบบพลาสติก ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่มีค่า yield value มาก แสดงว่า ผลิตภัณฑ์เกิดการเกาะกลุ่มกันมาก

ตาราง 20 ความหนืดของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัว เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 0, 3, 6 เดือน

สภาวะในการเก็บรักษา		ความหนืดของผลิตภัณฑ์ (cP)		
		110 Pa	330 Pa	440 Pa
เดือน 0		10.81	12.35	15.14
เดือน 3	5°C	5.65	8.00×10^{12}	1.75×10^{12}
	25°C/ 60 %RH	6.73×10^7	12.25	15.05
	30°C/ 75 %RH	2.27×10^8	2.15×10^8	2.29×10^8
เดือน 6	5°C	3.01×10^8	2.69×10^8	3.97×10^8
	25°C/ 60 %RH	1.25×10^7	4.03×10^{14}	2.44×10^9
	30°C/ 75 %RH	10.33	12.16	15.10



ภาพประกอบ 26 พฤติกรรมการไหลของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัว เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 0 (A), 3 (B-D), 6 (E-G) เดือน ที่อุณหภูมิ 5, 25, 30 °C ตามลำดับตัวอักษร

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาค่าที่เหมาะสมของปัจจัยด้านสูตรตำรับที่มีผลต่อการพัฒนาสูตรตำรับผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจากสารสกัดฟ้าทะลายโจรด้วยการออกแบบการทดลองแบบ face centered central composite design ให้ได้สูตรตำรับผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวที่มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ตามต้องการ และเพื่อศึกษาความคงสภาพของสูตรตำรับผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจากสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่เหมาะสมที่สุด โดยกำหนดระยะเวลาในการเก็บรักษา (0, 3, 6 เดือน) และอุณหภูมิในการเก็บรักษา (5, 25, 30 °C)

จากการศึกษาปัจจัยด้านสูตรตำรับที่มีผลต่อคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจากสารสกัดฟ้าทะลายโจรด้วยวิธี face centered central composite design พบว่า ปัจจัยด้านสูตรตำรับที่ส่งผลต่อระยะเวลาที่ผลิตภัณฑ์ปลดปล่อยแอนโดรกราโฟไลด์ร้อยละ 95 อย่างมีนัยสำคัญ ได้แก่ ร้อยละของปริมาณเอทานอล โดยร้อยละปริมาณเอทานอลที่มากขึ้นส่งผลให้ไคโตซานเกิดการแยกชั้น (phase separation) ออกจากสารผสมสำหรับกระบวนการพ่นให้แห้ง ดังนั้นการละลายของแอนโดรกราโฟไลด์จะขึ้นกับความสามารถในการละลายของแอนโดรกราโฟไลด์ การละลายของแอนโดรกราโฟไลด์จึงลดลง ส่งผลให้ระยะเวลาที่ปลดปล่อยแอนโดรกราโฟไลด์ออกจากผลิตภัณฑ์ถึง 95% มากขึ้น เมื่อพิจารณาปัจจัยด้านสูตรตำรับที่ส่งผลต่อระยะเวลาที่ความเข้มข้นของแอนโดรกราโฟไลด์ที่ปลดปล่อยไม่น้อยกว่า MIC อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ได้แก่ ร้อยละของปริมาณเอทานอลและร้อยละปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์จากสารสกัดฟ้าทะลายโจร โดยปริมาณเอทานอลที่มากขึ้นส่งผลให้การละลายของแอนโดรกราโฟไลด์ในสารผสมสำหรับกระบวนการพ่นให้แห้งอยู่ในรูป solid solution ผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจึงมีร้อยละการปลดปล่อยแอนโดรกราโฟไลด์เพิ่มขึ้น และเมื่อปริมาณสารสกัดฟ้าทะลายโจรเพิ่มขึ้น ทำให้สัดส่วนของแอนโดรกราโฟไลด์บริสุทธิ์ในสารผสมสำหรับกระบวนการพ่นให้แห้งลดลง ส่งผลให้สารผสมสำหรับกระบวนการพ่นให้แห้งมีสัดส่วนของ solid solution มากกว่า solid dispersion ช่วยให้มีร้อยละการปลดปล่อยแอนโดรกราโฟไลด์เพิ่มขึ้น ทั้งสองปัจจัยจึงทำให้ระยะเวลาที่ความเข้มข้นของแอนโดรกราโฟไลด์ที่ปลดปล่อยไม่น้อยกว่า MIC ลดลง เมื่อพิจารณาปัจจัยด้านสูตรตำรับที่ส่งผลต่อความหนืดของผลิตภัณฑ์ พบว่า ค่าความคลาดเคลื่อนมีผลต่อการทำนายตัวแปรตามอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นตัวแปรต้นในช่วงที่ศึกษาจึงไม่เป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อความหนืด ซึ่งอาจมีปัจจัยอื่นที่ส่งผลต่อตัวแปรตามได้มากกว่าตัวแปรต้นที่ศึกษา เช่น ไคโตซาน เป็นต้น

นอกจากนี้ยังไม่มีปัจจัยด้านสูตรตำรับที่ส่งผลต่อความสามารถในการเปียกของผลิตภัณฑ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากการหาสูตรตำรับที่เหมาะสมสำหรับผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจากสารสกัดฟ้าทะลายโจร โดยพิจารณาจากความเข้มข้นของแอนโดรกราโฟไลด์ที่ปลดปล่อยมากกว่า MIC เป็นเป้าหมายสำคัญของผลิตภัณฑ์และค่าตัวแปรต้นที่กำหนด ดังนี้ ร้อยละปริมาณเอทานอลและร้อยละปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในสารสกัดฟ้าทะลายโจรต้องมีค่าต่ำที่สุด แต่ร้อยละปริมาณ poloxamer 188 ต้องมีค่าสูงที่สุด พบว่า สูตรตำรับที่เหมาะสมที่สุดประกอบด้วยร้อยละปริมาณเอทานอลเท่ากับ 6.57, ร้อยละปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในสารสกัดฟ้าทะลายโจรเท่ากับ 0.25, และร้อยละปริมาณ poloxamer 188 เท่ากับ 0.25 ซึ่งสามารถทำนายความเข้มข้นของแอนโดรกราโฟไลด์ที่ปลดปล่อยมากกว่า MIC เป็น 111.603 $\mu\text{g/ml}$

จากการศึกษาความคงสภาพของสูตรตำรับผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจากสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่เหมาะสมที่สุด พบว่า ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในผลิตภัณฑ์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเก็บผลิตภัณฑ์เป็นระยะเวลา 6 เดือน และพบปัญหาความชื้นในผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้นที่เกิดจากการดูดความชื้นของแท่งละลายน้ำได้และ poloxamer 188 ซึ่งจะเห็นได้จากผลการทดสอบปริมาณน้ำในผลิตภัณฑ์ที่ไม่ผ่านเกณฑ์การยอมรับของ USP 41 เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลานานขึ้น ส่งผลให้อนุภาคของผลิตภัณฑ์เกิดการเกาะกลุ่มกันมากขึ้น ดังแสดงในผลการทดสอบลักษณะภายนอกของผลิตภัณฑ์และขนาดอนุภาคของผลิตภัณฑ์ ทำให้ระยะเวลาในการผสมของผลิตภัณฑ์กับน้ำเพิ่มขึ้นและพฤติกรรมการไหลของผลิตภัณฑ์เปลี่ยนจากพลาสติกเทียมนเป็นพลาสติก ที่ระยะเวลา 3 เดือน อุณหภูมิ 30 °C และที่ระยะเวลา 6 เดือน เนื่องจากอนุภาคที่เกิดการเกาะกลุ่มกันเป็นส่วนใหญ่ทำให้แรงยึดเกาะระหว่างอนุภาคสูง ส่งผลให้ต้องใช้แรงเฉือนมากกว่าจุด yield value จึงสามารถไหลได้ พฤติกรรมการไหลของผลิตภัณฑ์จึงเป็นแบบพลาสติก นอกจากนี้เมื่อพิจารณาผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อความคงสภาพของผลิตภัณฑ์ อุณหภูมิที่มากขึ้นมีผลให้แอนโดรกราโฟไลด์ที่อยู่ในรูปอสัณฐานในผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวเกิดการกลับเป็นผลึกของแอนโดรกราโฟไลด์มากขึ้น ทำให้ความเป็นผลึกของผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ความสามารถในการปลดปล่อยแอนโดรกราโฟไลด์ลดลง และอุณหภูมิที่สูงขึ้นทำให้เกิดความชื้นในอากาศมากขึ้น อนุภาคเกิดการเกาะกลุ่มกันเป็นก้อนมากขึ้นจึงมีขนาดอนุภาคของผลิตภัณฑ์ใหญ่ขึ้น ทั้งนี้ระยะเวลาและอุณหภูมิในการเก็บรักษาไม่มีผลต่อ pH ของผลิตภัณฑ์และปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์ ซึ่งทั้งสองหัวข้อผ่านเกณฑ์การยอมรับของ USP 41 ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวสามารถเก็บรักษาได้เป็นเวลา 3 เดือน ที่อุณหภูมิ 5°C

โดยที่ปริมาณแอนโดรกราโฟไลด์ในผลิตภัณฑ์ ความเป็นผลึก ความสามารถในการปลดปล่อยแอนโดรกราโฟไลด์ pH ของผลิตภัณฑ์และปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์ไม่เปลี่ยนแปลง อีกทั้งยังไม่เกิดปัญหาความขึ้นในผลิตภัณฑ์จึงไม่เกิดการเกาะกลุ่มกันของอนุภาค ทำให้ลักษณะภายนอกของผลิตภัณฑ์ ขนาดอนุภาคของผลิตภัณฑ์ ระยะเวลาในการผสมของผลิตภัณฑ์กับน้ำ และพฤติกรรมกรไหลของผลิตภัณฑ์ไม่เปลี่ยนแปลง

จากการศึกษาวิจัยมีข้อเสนอแนะ ดังนี้

- จากการหาสูตรตำรับที่เหมาะสมสำหรับผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจากสารสกัดฟ้าทะลายโจรควรมีการทดสอบสูตรตำรับผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจากสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่เหมาะสมที่สุดซ้ำ เพื่อทดสอบความถูกต้องของสมการทำนายความสัมพัทธ์
- จากการศึกษาคงสภาพของสูตรตำรับผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวจากสารสกัดฟ้าทะลายโจรควรเพิ่มการทดสอบคงสภาพของรุ่นการผลิตจำนวน 3 รุ่นการผลิตขึ้นไป เพื่อให้สอดคล้องกับข้อกำหนดของ ASEAN guideline on stability and shelf life of TMHS
- จากการวิเคราะห์ปริมาณ total lactone ที่ปลดปล่อยของผลิตภัณฑ์ของแข็งกระจายตัวด้วยวิธี UV spectroscopy ที่ความยาวคลื่น 224 nm พบว่า วิธีวิเคราะห์นี้อาจไม่สามารถวิเคราะห์ปริมาณ total lactone อย่างครอบคลุมทุกสาร เนื่องจากมีสารกลุ่ม lactone ที่ไม่ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 224 nm แต่ดูดกลืนแสง UV ที่ความยาวคลื่นอื่น เช่น dehydroandrographolide ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 248 nm neoandrographolide และ deoxyandrographolide-19- β -D glucoside ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 205 nm เป็นต้น⁽⁴⁷⁾ ทำให้ปริมาณสารกลุ่ม lactone ที่วัดได้อาจไม่แสดงถึงปริมาณ total lactone ทั้งหมด จึงควรเปลี่ยนเป็นการวิเคราะห์ปริมาณ total lactone ด้วยวิธีใดก็ตามที่กำหนดในตำรามาตรฐานสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia)⁽³⁸⁾ ที่สามารถวัดปริมาณ total lactone ทั้งหมดได้อย่างครอบคลุมและถูกต้อง
- จากการทดสอบปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์ควรเพิ่มการทดสอบกลุ่มควบคุมบวก (positive control) เพื่อช่วยยืนยันว่า แผ่นทดสอบหรืออาหารเลี้ยงเชื้อสามารถทำให้เชื้อจุลินทรีย์เจริญเติบโตได้ หากมีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์
- จากการศึกษางานวิจัยนี้จะเห็นว่า ผลิตภัณฑ์เกิดปัญหาความขึ้นในผลิตภัณฑ์สูง ทำให้อนุภาคของผลิตภัณฑ์เกิดการเกาะกลุ่มกัน ซึ่งอาจแก้ไขโดยการเปลี่ยนบรรจุภัณฑ์ที่สามารถป้องกันความขึ้นจากอากาศได้ เช่น ampule เป็นต้น และควบคุมความขึ้นในระหว่างการเตรียมผลิตภัณฑ์

บรรณานุกรม

1. Subramanian R, Zaini Asmawi M, Sadikun A. A bitter plant with a sweet future? A comprehensive review of an oriental medicinal plant: *Andrographis paniculata*. *Phytochemistry Reviews*. 2011;11(1):39-75.
2. Meili C CX, Longxiao L. Solubility of andrographolide in various solvents from (288.2 to 323.2) k. *J Chem Eng Data*. 2010;55:5297-8.
3. Yang M, Han L, Zhang D, Lin J, Zhang F, Han X, et al. Preparation and evaluation of andrographolide solid dispersion vectored by silicon dioxide. *Pharmacognosy Magazine*. 2016;0(0).
4. กระทรวงสาธารณสุข. ประกาศคณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ เรื่อง บัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. ๒๕๖๔. 2564.
5. ชลธิชา อมรฉัตร, เพชรรัตน์ ไกรวพันธุ์, วีระชัย ไกรวพันธุ์, เทิดพงษ์ ตีร์รัตน์.ฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียในช่องปากของสารสกัดจากฟ้าทะลายโจร. *วิทยาศาสตร์* 2534;41(4):178-85.
6. ปลื้มจิตต์ ไรจนพันธุ์, มัลลิกา ศิริรัตน์, ชลธิชา อมรฉัตร, วันดี กฤษณพันธุ์, inventors. เจลฟ้าทะลายโจรเพื่อใช้เสริมการรักษาโรคปริทันต์อักเสบ. ประเทศไทย patent. 2550.
7. Rassameemasmaung S. Subgingival administration of *andrographis paniculata* gel as an adjunct in the treatment of adult periodontitis. Mahidol University. 1996.
8. Chanchal Garg PS, Saurabh Satija, Munish Garg. Stability indicating studies of *andrographis paniculata* extract by validate hptlc protocol. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2016;5(6):337-44.
9. Vo CL, Park C, Lee BJ. Current trends and future perspectives of solid dispersions containing poorly water-soluble drugs. *Eur J Pharm Biopharm*. 2013;85(3 Pt B):799-813. 2013/09/24.
10. Schneider D. Development of predictive tools for amorphous solid dosage forms. Denmark: Johannes Gutenberg Universität; 2016.
11. Bhujbal SV, Mitra B, Jain U, Gong Y, Agrawal A, Karki S, et al. Pharmaceutical amorphous solid dispersion: A review of manufacturing strategies. *Acta Pharm Sin*

- B. 2021;11(8):2505-36. 2021/09/16.
12. Chaudhari SP, Dugar RP. Application of surfactants in solid dispersion technology for improving solubility of poorly water soluble drugs. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2017;41:68-77.
 13. Dave RH, Patel AD, Donahue E, Patel HH. To evaluate the effect of addition of an anionic surfactant on solid dispersion using model drug indomethacin. *Drug Dev Ind Pharm*. 2012;38(8):930-9. 2011/11/17.
 14. จอมใจ พีรพัฒนา. แนวทางใหม่ในการพัฒนาเภสัชภัณฑ์และกระบวนการผลิต. พิมพ์ครั้งที่ 2. ขอนแก่น: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2563.
 15. Mahajan A, Surti N, Patel P, Gheewala N, Patel A, Shah D. Optimization of formulation and process variables using central composite design for the production of nevirapine spray dried solid dispersion. *Drying Technology*. 2021:1-14.
 16. มหาวิทยาลัยศิลปากร. ฟ้าทะลายโจร. 2565 [2 ม.ค.2565]. Available from: http://pharmacy.su.ac.th/herbmed/herb/text/herb_detail.php?herbID=164
 17. Hossain S, Urbi Z, Karuniawati H, Mohiuddin RB, Moh Qrimida A, Allzrag AMM, et al. *Andrographis paniculata* (burm. F.) wall. Ex nees: An updated review of phytochemistry, antimicrobial pharmacology, and clinical safety and efficacy. *Life* (Basel). 2021;11(4).
 18. Yun HS, Rong TL, Wei LX, Gang X, Zhong WL, Qin SZ, et al. Ent-labdane diterpenoids from *andrographis paniculata*. *J Nat Prod*. 2006;69(3):319-22.
 19. Sule A, Ahmed QU, Latip J, Samah OA, Omar MN, Umar A, et al. Antifungal activity of *andrographis paniculata* extracts and active principles against skin pathogenic fungal strains in vitro. *Pharm Biol*. 2012;50(7):850-6.
 20. Tran P, Pyo YC, Kim DH, Lee SE, Kim JK, Park JS. Overview of the manufacturing methods of solid dispersion technology for improving the solubility of poorly water-soluble drugs and application to anticancer drugs. *Pharmaceutics*. 2019;11(3). 2019/03/22.
 21. Vasconcelos T, Sarmiento B, Costa P. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. *Drug Discov Today*. 2007;12(23-

- 24):1068-75. 2007/12/07.
22. Retno S, Dwi S, Dini R, Ririn P. Development of andrographolide-chitosan solid dispersion system: Physical characterization, solubility, and dissolution testing. *Asian Journal of Pharmaceutics*. 2019;13(1):5-9.
 23. Bothiraja C, Shinde MB, Rajalakshmi S, Pawar AP. Evaluation of molecular pharmaceutical and in-vivo properties of spray-dried isolated andrographolide-pvp. *J Pharm Pharmacol*. 2009;61(11):1465-72. 2009/11/12.
 24. Nitave SA, Chougule NB, Koumaravelou K. Formulation and evaluation of solid dispersion tablet of andrographis paniculata extract. *Pharmacognosy Journal*. 2018;10(5):1047-54.
 25. Santos D, Maurício AC, Sencadas V, Santos JD, Fernandes MH, Gomes PS. Spray drying: An overview. *Biomaterials - physics and chemistry - new edition*. 2018.
 26. Gujral G, Kapoor D, Jaimini M. An updated review on design of experiment (doe) in pharmaceuticals. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 2018;8(3).
 27. Angela D, Max M, John S, Derek B. *Handbook of design and analysis of experiments*. Newyork: CRC Press; 2015.
 28. Rakić T, Kasagić-Vujanović I, Jovanović M, Jančić-Stojanović B, Ivanović D. Comparison of full factorial design, central composite design, and box-behnken design in chromatographic method development for the determination of fluconazole and its impurities. *Analytical Letters*. 2014;47(8):1334-47.
 29. Hazir E, Koc KH, Baray SA, Esnaf S. Improvement of adhesion strength for wood-based material coating process using design of experiment methodology. *European Journal of Wood and Wood Products*. 2020;78(2):301-12.
 30. Ait-Amir B, Pougnet P, El Hami A. Meta-model development. *Embedded mechatronic systems 2*. 2015. 151-79.
 31. Neelam S, Sukhbir S. Central composite designed ezetimibe solid dispersion for dissolution enhancement: Synthesis and in vitro evaluation. *Ther Deliv*. 2019;10(10):643–58.
 32. The United States Pharmacopoeia Conventions. *United states pharmacopoeia*. 41st ed.

Rockville (MD): The Convention; 2018.

33. Association of South East Asian Nations. Asean guidelines on stability study and shelf-life of traditional medicines 2013.
34. Aframian DJ, Davidowitz T, Benoliel R. The distribution of oral mucosal ph values in healthy saliva secretors. *Oral Dis.* 2006;12(4):420-3. 2006/06/24.
35. Phattanawasin P, Burana-Osot J, Sotanaphun U, Kumsum A. Stability-indicating tlc—image analysis method for determination of andrographolide in bulk drug and andrographis paniculata formulations. *Acta Chromatographica.* 2016;28(4):525-40.
36. Liebenberg W, Engelbrecht E, Wessels A, Devarakonda B, Yang W, De VMM. A comparative study of the release of active ingredients from semisolid cosmeceuticals measured with franz, enhancer or flow-through cell diffusion apparatus. *Journal of Food and Drug Analysis.* 2003;11(4).
37. Nastri L, De Rosa A, De Gregorio V, Grassia V, Donnarumma G. A new controlled-release material containing metronidazole and doxycycline for the treatment of periodontal and peri-implant diseases: Formulation and in vitro testing. *Int J Dent.* 2019;2019:9374607. 2019/04/09.
38. Thai herbal pharmacopoeia. Bangkok: Department of Medical Sciences; 2020. 112-21.
39. Sano M, Hosoya O, Taoka S, Seki T, Kawaguchi T, Sugibayashi K, et al. Relationship between solubility of chitosan in alcoholic solution and its gelation. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin.* 1999;47(7):1044-6.
40. Wu Q, Kennedy MT, Nagapudi K, Kiang YH. Humidity induced phase transformation of poloxamer 188 and its effect on physical stability of amorphous solid dispersion of amg 579, a pde10a inhibitor. *Int J Pharm.* 2017;521(1-2):1-7.
41. Pradip H, Aeshna A, Lokesh K, Bansal AK. Variables affecting reconstitution time of dry powder for injection. *Pharmaceutical Technology.* 2008;32(7):62-8.
42. Casilda B, Geeverghese R. Reconstitutable oral suspensions (dry syrups): An overview. *World Journal of Pharmaceutical Research.* 2015;4(3):462-84.
43. Plubrukarn A, Pinsuwan S, Ingkatawornwong S, Supavita T. Stability of andrographolide in powdered andrographis herb under accelerated conditions.

- Planta Med. 2006;72(10):954-6.
44. Estevinho BN, Rocha F, Santos L, Alves A. Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications – a review. Trends in Food Science & Technology. 2013;31(2):138-55.
45. Yaneva Z, Ivanova D, Nikolova N, Tzanova M. The 21st century revival of chitosan in service to bio-organic chemistry. Biotechnology & Biotechnological Equipment. 2020;34(1):221-37.
46. Yahaya AHB, Mainal A, Elgannoudi ES, El-Hafian EA. Characterization of chitosan in acetic acid: Rheological and thermal studies. Turkish Journal of Chemistry. 2010.
47. Patarapanich C, Laungcholatan S, Mahaverawat N, Chaichantipayuth C, Pummangura S. Hplc determination of active diterpene lactones from andrographis paniculata nees planted in various seasons and regions in thailand. Thai J Pharm Sci. 2007;31:91-9.

ประวัติผู้เขียน

