

การศึกษาคุณภาพของเมล็ดช่อยแห้ง

ดวงพร เข้มทอง นवलพรรณ ไพบูลย์ศรีนครา และนันทนา กลิ่นสุนทร

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 5 สมุทรสงคราม กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ อำเภอเมือง สมุทรสงคราม 75000

บทคัดย่อ ช่อย (Koi หรือ tooth brush tree) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Streblus asper* Lour. วงศ์ Moraceae ตำราสรรพคุณยาไทยใช้ส่วนเมล็ดบรรเทาอาการท้องเสีย ฆ่าเชื้อโรคในช่องปากและทางเดินอาหาร ซึ่งปัจจุบันยังไม่มีข้อกำหนดมาตรฐานในตำรายาสมุนไพรไทย การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสนับสนุนข้อมูลเพื่อจัดทำข้อกำหนดมาตรฐานของเมล็ดช่อย ผู้วิจัยได้ศึกษาคุณภาพของเมล็ดช่อยแห้ง จำนวน 16 ตัวอย่าง แบ่งเป็นตัวอย่างที่ซื้อจากร้านจำหน่ายสมุนไพร และจากนักพฤกษศาสตร์ โดยทำการศึกษาเอกลักษณ์ทางพฤกษเคมี ทดสอบคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพ รวมทั้งการปนเปื้อนโลหะหนัก ผลจากการศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมีของตัวอย่างเมล็ดช่อยแห้งที่สกัดด้วยเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 โดยวิธีโครมาโทกราฟีชนิดผิวบางที่ใช้แผ่นอะลูมิเนียมฉาบด้วยซิลิกาเจล (Silica Gel 60 F₂₅₄) ทำการเปรียบเทียบระหว่างน้ำยาแยกที่มีส่วนผสมของ heptane-ethyl acetate-glacial acetic acid ในอัตราส่วน 7:3:0.2 (ชนิดที่ 1) และอัตราส่วน 10:1:0.2 (ชนิดที่ 2) ตรวจสอบด้วยน้ำยาฟอสฟอรัสเจือจางความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร พบว่า น้ำยาแยกชนิดที่ 1 สามารถแยกจำนวนแถบของสารสกัดเอทานอลของเมล็ดช่อยแห้งได้ดีกว่าน้ำยาแยกชนิดที่ 2 โดยเฉพาะสาร β -sitosterol และ lupeol ผลการทดสอบคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพพบว่า เมล็ดช่อยแห้งมีค่าเฉลี่ยของปริมาณความชื้น เถ้ารวม เถ้าที่ไม่ละลายในกรด สารสกัดด้วยน้ำ สารสกัดด้วยเอทานอล และน้ำมันจากเมล็ด คิดเป็นร้อยละ 7.79 ± 0.85 , 5.26 ± 1.00 , 1.40 ± 0.84 , 14.90 ± 3.43 , 5.28 ± 0.94 และ 3.80 ± 0.48 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ และผลการปนเปื้อนโลหะหนัก พบว่ามีการปนเปื้อนแคดเมียมเกินเกณฑ์มาตรฐานที่ระบุไว้ในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย จำนวน 1 ตัวอย่าง ผลการศึกษานี้สามารถนำไปใช้ประกอบการพิจารณาจัดทำข้อกำหนดมาตรฐานทางเคมีและกายภาพของเมล็ดช่อยแห้ง เพื่อประโยชน์ในการควบคุมวัตถุดิบเข้าตำรับยาต่อไป

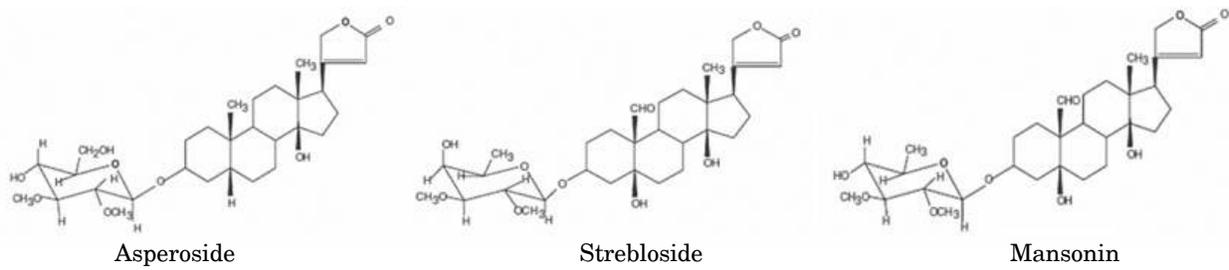
บทนำ

ช้อย มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Streblus asper* Lour. อยู่ในวงศ์ Moraceae มีชื่ออังกฤษ คือ Siamese rough bush, Tooth brush tree ชื่ออื่น เช่น กักไม้ฝอย (ภาคเหนือ) สัมพอ (เลย) สะนาย (เขมร) Kalios (ฟิลิปปินส์) และ Kensinal tree (มาเลเซีย) เป็นไม้พุ่มหรือไม้ต้นขนาดกลาง สูง 10-15 เมตร เปลือกสีเทาอมเขียว เปลือกในสีขาวหนา ผิวเรียบบาง มักมีขนอยู่โดยทั่วไป มียางขาวข้น แตกกิ่งก้านหนาแน่น ใบเดี่ยว เรียงสลับ แผ่นใบรูปรีหรือรูปไข่กลับ กว้าง 2-4 เซนติเมตร ยาว 4-8 เซนติเมตร ปลายแหลมและมีติ่งแหลมสั้น โคนสอบแคบ ผิวใบทั้งด้านบนและด้านล่างหนาและสาบคายเหมือนกระดาษทราย ขอบใบหยักฟันเลื่อย ก้านใบสั้นมาก ยาว 1-3 มิลลิเมตร หูใบรูปหอก ยาว 2-5 มิลลิเมตร มีขนราบ หลุดร่วงง่าย เส้นใบที่โคนมี 1 คู่ เส้น ไม่มีต่อม ดอกสีเขียวอ่อน มีกลิ่นหอม ออกเป็นช่อตามซอกใบ ดอกย่อยมีขนาดเล็กมาก ดอกแยกเพศ ดอกเพศผู้และดอกเพศเมียอยู่ต่างต้นกัน ช่อดอกเพศผู้เป็นกระจุกกลม มี 5-15 ดอก เส้นผ่านศูนย์กลางยาว 6-10 มิลลิเมตร ก้านช่อดอกยาว 3-15 มิลลิเมตร มีขนเล็กน้อยหรือเกลี้ยง มีใบประดับเล็ก ๆ 1-2 ใบ ที่โคนก้านใบ บางครั้งพบมีอีก 1 ใบ บนก้าน และมีใบประดับเล็ก ๆ อีก 2-3 ใบที่ปลายก้าน ดอกเพศผู้มีก้านสั้น กลิ่นหอม มีส่วนต่าง ๆ จำนวน 4 วงกลีบรวม ยาว 1 มิลลิเมตร มีขนเล็กน้อย เกสรเพศผู้สีขาว ดอกเพศเมียออกเดี่ยว มีก้านยาว กลีบดอกสีเขียวปนเหลือง มีก้านดอกเล็กยาว 1-4 มิลลิเมตร มีขนเล็กน้อย ใบประดับมี 2 ใบ รูปไข่ ปลายแหลมยาว 1-2 มิลลิเมตร แนบไปกับวงกลีบรวม วงกลีบรวมยาว 2 มิลลิเมตร รูปไข่แหลม มีขนเล็กน้อย ก้านเกสรเพศเมียยาว 1 มิลลิเมตร และยาวขึ้นถึง 6-12 มิลลิเมตร ผลเกลี้ยงรูปกลม หรือรูปไข่ ขนาดประมาณ 0.8 เซนติเมตร มีเมล็ดเดี่ยว ผลแก่สีเหลืองหรือส้ม ฉ่ำน้ำ เมล็ดกลม กว้าง 4-5 มิลลิเมตร สีขาวแกมเทา ช้อยมีเขตการกระจายพันธุ์กว้าง พบตั้งแต่อินเดีย ศรีลังกา ภูฏาน บังกลาเทศ จีนตอนใต้ พม่า และมาเลเซีย จนถึงฟิลิปปินส์ ในไทยพบทุกภาคตามที่ลุ่ม ป่าเบญจพรรณทั่วไป และป่าละเมาะ ออกดอกเดือนเมษายนถึงพฤษภาคม⁽¹⁻³⁾ (ภาพที่ 1)

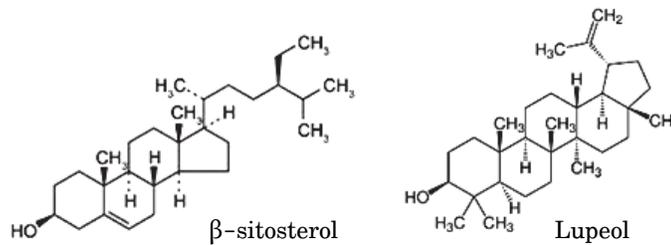


ภาพที่ 1 ต้น เปลือก ใบ ดอก และผลของช้อย

สารเคมีที่พบในช้อย ประกอบด้วยสารกลุ่ม Cardiac glycosides ที่สำคัญ คือ asperoside, strebloside และ mansonin⁽⁴⁾ ส่วนในเมล็ดพบ β -sitosterol และ lupeol (ภาพที่ 2)



A โครงสร้างของสารกลุ่ม Cardiac glycosides



B สารที่ใช้เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบของเมล็ดช้อยแห้ง

ภาพที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของสารที่พบในเมล็ดช้อย

ในตำราสรรพคุณยาไทย⁽¹⁾ ใช้เมล็ดช้อยที่มีรสเมามันร้อน เป็นยาอายุวัฒนะ บำรุงธาตุเจริญอาหาร ขับผายลม ขับลมในลำไส้ แก้ท้องอืดเฟ้อ แก้โลหิตและลม และในตำรายาล้านนา⁽¹⁾ ใช้เมล็ดช้อยรักษาอาการไอ ขับเสมหะ แก้เจ็บคอ รักษาเหงือก และแก้ปวดฟัน นอกจากนี้ในตำรายาอินเดีย^(2, 5) มีการนำเมล็ดช้อยมาใช้บรรเทาอาการเลือดกำเดาไหล บรรเทาอาการท้องเสีย และทำเป็นยาทารักษาโรคต่างขาว (Leucoderma หรือ Vitiligo) เนื่องจากยังไม่มีข้อกำหนดคุณภาพของเมล็ดช้อยในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย การศึกษานี้จึงจัดทำขึ้นเพื่อศึกษาเอกลักษณ์ทางพฤกษเคมี ตรวจคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพ รวมทั้งตรวจการปนเปื้อนโลหะหนักของเมล็ดช้อย ภายใต้โครงการวิจัยการพัฒนาศักยภาพของสมุนไพรที่มีการใช้ในท้องถิ่น เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการจัดทำข้อกำหนดมาตรฐานสำหรับการควบคุมคุณภาพของเมล็ดช้อยแห้งในประเทศไทย ซึ่งจะประโยชน์แก่ผู้ผลิตยาจากสมุนไพรและผู้บริโภคต่อไป

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างสมุนไพร

สมุนไพรช้อยที่ใช้ในการศึกษาคือ เมล็ดแห้ง ที่เก็บจากแหล่งธรรมชาติผ่านการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเภสัชเวทเปรียบเทียบกับตัวอย่างจริง (authentic) ว่าเป็นเมล็ดของต้นช้อย *Streblus asper* Lour. วงศ์ Moraceae จากนักพฤกษศาสตร์ จำนวน 3 ตัวอย่าง และซื้อจากร้านจำหน่ายเครื่องยาสมุนไพรในประเทศไทย จำนวน 13 ตัวอย่าง รวม 16 ตัวอย่าง ในช่วงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2556 ถึงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2557 ซึ่งเตรียมโดยการนำตัวอย่างเมล็ดช้อยแห้งไปอบฆ่าที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บดเป็นผงละเอียด ผ่านร่อนเบอร์ 80 บรรจุในขวดแก้วสีชาที่มีฝาปิดสนิท ปิดฉลากระบุชื่อและรหัสของตัวอย่างสมุนไพร

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น LA 230 S ของบริษัท Sartorius
 ตู้อบร้อน รุ่น FED 115 ของบริษัท Binder
 เตาเผาอุณหภูมิสูง รุ่น CWF 13/23/201 ของบริษัท CARBOLITE
 เตาไฟฟ้า รุ่น SH 1 ของบริษัท STUART SCIENTIFIC
 เตาไฟฟ้าบุนวม รุ่น LG 2/ER ของบริษัท IsopadTM
 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิของบริษัท Memmert
 อ่างน้ำความถี่สูงควบคุมอุณหภูมิ รุ่น 575 HTAE ของบริษัท CREST
 เครื่องเขย่า รุ่น HS 501 digital ของบริษัท IKA®-WERKE
 เครื่องระเหยสุญญากาศ ประกอบด้วยอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ รุ่น B-480, เครื่อง Rotavapor รุ่น R-114, เครื่อง Aspirator รุ่น B-169 ของบริษัท Buchi และเครื่องทำน้ำเย็นหมุนเวียน รุ่น RTE-111 ของบริษัท Neslab
 เครื่องย่อยสลายระบบไมโครเวฟ รุ่น SPEEDWAVE4 ของบริษัท BERGHOF
 แผ่นอะลูมิเนียมเคลือบซิลิกาเจล (Silica Gel 60 F₂₅₄) ขนาด 20 × 20 เซนติเมตร ความหนา 0.25 มิลลิเมตร ของบริษัท Merck
 อะตอมมิคแอบซอร์พชั่นสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น Analyst 600 ของบริษัท Perkin Elmer
 สารมาตรฐานและสารเคมี
 β-sitosterol ความบริสุทธิ์ร้อยละ 79.7 ของบริษัท Sigma-Aldrich
 lupeol ความบริสุทธิ์ร้อยละ 94 ของบริษัท Aldrich
 สารหนู ความบริสุทธิ์ร้อยละ 99.9 ของบริษัท Perkin Elmer
 ตะกั่ว ความบริสุทธิ์ร้อยละ 99.9 ของบริษัท Perkin Elmer
 แคดเมียม ความบริสุทธิ์ร้อยละ 99.6 ของบริษัท Perkin Elmer
 สารเคมีอื่น ๆ ใช้ชนิดสำหรับการวิเคราะห์ (analytical grade) ได้แก่ ethanol, heptane, chloroform, ethyl acetate, petroleum ether (40-60 °C), conc. hydrochloric acid, conc. sulfuric acid, glacial acetic acid, conc. nitric acid, 3% hydrogen peroxide, acetic anhydride, sodium hydroxide, magnesium ribbon, ferric chloride เป็นต้น

วิธีการ

1. การตรวจคัดกรองทางพิษเคมี ปฏิบัติการทำให้เกิดสี⁽⁶⁾

โดยนำผงเมล็ดช่อย 10 กรัม (Authentic 3 ตัวอย่าง และจากร้านยาสมุนไพร 1 ตัวอย่าง) บรรจุในขวดแก้ว ก้นกลม เต็มคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ต้มบนอ่างอังไอน้ำด้วยวิธี reflux นาน 30 นาที จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง และเก็บสารละลายที่กรองได้ (filtrate 1) เป็นสารสกัดในคลอโรฟอร์ม จากนั้นนำกากที่เหลือจากการกรอง มาสกัดต่อด้วยเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร นาน 30 นาที ด้วยวิธีการเดียวกัน จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง และเก็บสารละลายที่กรองได้ (filtrate 2) เป็นสารสกัดในเอทานอล จากนั้นนำกากที่เหลือจากการกรอง มาสกัดต่อด้วยน้ำ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร นาน 10 นาที ด้วยวิธีการเดียวกัน จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง และเก็บสารละลายที่กรองได้ (filtrate 3) เป็นสารสกัดในน้ำ และแบ่งสารสกัดที่ได้ใส่หลอดทดลอง หลอดละ 2 มิลลิลิตร เพื่อทำการทดสอบ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 รายการทดสอบของสารสกัดหยาบในตัวทำละลาย 3 ชนิด

Chloroform extract	Ethanol extract	Water extract
Steroids & Terpenoids	Steroids & Terpenoids	Alkaloids
Alkaloids	Alkaloids	Flavonoids
Fixed oil	Flavonoids	Phenolic compounds & Tannins
	Phenolic compounds & Tannins	Amino acids
	Amino acids	Saponin
		Organic acids

ตรวจสอบสารกลุ่ม Steroids & Terpenoids

นำสารสกัด 2 มิลลิลิตร มาระเหยแห้งบนอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เติม acetic anhydride 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เอียงหลอดค่อยๆ เติมกรดกำมะถันเข้มข้นลงข้างๆ หลอดแก้ว 1 มิลลิลิตร สังเกตการเปลี่ยนแปลง

ตรวจสอบสารกลุ่ม Alkaloids

นำสารสกัด 2 มิลลิลิตร มาเติม Dragendorff's reagent 3 หยด เขย่าให้เข้ากัน สังเกตการเปลี่ยนแปลง

ตรวจสอบสารกลุ่ม Flavonoids

นำสารสกัด 2 มิลลิลิตร มาเติมเอทานอล 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกรดเกลือ 2 มิลลิลิตร และค่อยๆ หย่อนแผ่นแมกนีเซียม 1 ชิ้น ลงไป จากนั้นนำไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ สังเกตสีของสารละลาย

ตรวจสอบสารกลุ่ม Phenolic compounds & Tannins

นำสารสกัด 2 มิลลิลิตร มาเติมสารละลาย 1% $FeCl_3$ 3 หยด สังเกตสีที่เปลี่ยนแปลง

ตรวจสอบสารกลุ่ม Amino acids

นำสารสกัด 2 มิลลิลิตร มาเติมสารละลาย ninhydrin TS 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน อุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ สังเกตสีที่เปลี่ยนแปลง

ตรวจสอบสารกลุ่ม Fixed oil

วิธีที่ 1 นำสารสกัด 2 มิลลิลิตร มาหยดสารละลาย 10% phosphomolybdic acid ใน ethanol 2 หยด อุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ สังเกตสีที่เปลี่ยนแปลง

วิธีที่ 2 หยดสารสกัดลงบนกระดาษกรอง ทำให้แห้ง สังเกตคราบบนกระดาษกรอง

ตรวจสอบสารกลุ่ม Saponin

นำสารสกัด 2 มิลลิลิตร มาเขย่าอย่างรุนแรง ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที สังเกตความสูงและความคงตัวของฟอง

ตรวจสอบสารกลุ่ม Organic acids

หยดสารสกัด 2 หยด ลงบนกระดาษลิตมัส สังเกตการเปลี่ยนแปลงของกระดาษลิตมัส

2. การศึกษาทางพฤกษเคมีเบื้องต้น

2.1 ปฏิกริยาทำให้เกิดสี⁽⁶⁾

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง โดยนำผงเมล็ดข่อยแห้งตัวอย่างละ 5 กรัม เติมหอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 จำนวน 10 มิลลิลิตร มาสกัดในอ่างน้ำความถี่สูงควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 30 นาที และกรองผ่านกระดาษกรอง (Whatman No. 4) จากนั้นนำไปตรวจสอบสารกลุ่ม Steroids & Terpenoids, Alkaloids, Flavonoids และ Phenolic compounds & Tannins

การทดสอบ **cardiac glycoside** ซึ่งตัวอย่าง 5 กรัม เติม 70% ethanol 40 มิลลิลิตร นำไปอุ่นบนหม้ออังไอน้ำ พร้อมคนตลอดเวลา 10-15 นาที จากนั้นกรองด้วยสำลี เติม 10% lead acetate จำนวน 25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ให้ความร้อนพร้อมคนตลอดเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็น กรองและสกัดส่วนที่กรองได้ด้วยคลอโรฟอร์ม 3 ครั้ง ครั้งละ 30, 20 และ 20 มิลลิลิตร ตามลำดับ ไซชั่นคลอโรฟอร์มเก็บไว้ใน Erlenmeyer flask กรองผ่านกระดาษกรองที่เติม anhydrous sodium sulfate ใส่ใน evaporating dish ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร วางบนหม้ออังไอน้ำ เพื่อระเหย CHCl_3 การทำให้เข้มข้นนี้ประมาณ 1/10 ของปริมาณเดิม ทำให้เย็นแล้วนำมาทำการทดสอบต่อไปนี้

- ตรวจสอบ unsaturated lactone ที่ C-17 (butenolide) นำสารสกัดเข้มข้น 2 มิลลิลิตร ใส่ใน evaporating dish ระเหยบนหม้ออังไอน้ำให้ได้สารสกัดที่เกือบแห้ง ทำให้เย็น เติม Kedde's reagent 0.5 มิลลิลิตร และหยด 1 N NaOH ลงไป 2-3 หยด

- ตรวจสอบ deoxysugars (Keller-Killiani test) นำสารสกัดเข้มข้น 3 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง เติม FeCl_3 reagent (0.3 มิลลิลิตร ของ 10% FeCl_3 ใน glacial acetic acid 50 มิลลิลิตร) 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้สักครู่ เอียงหลอดแก้วมุม 45 องศา ค่อย ๆ หยด conc. sulfuric acid 1-2 มิลลิลิตร ลงไปข้าง ๆ หลอดแก้ว และให้แยกออกเป็น 2 ชั้น ตั้งหลอดแก้วให้ตรง สังเกตการเกิดสีตรงรอยต่อระหว่างสารละลายทั้งสองชั้น และสารละลายชั้นบน

2.2 การทดสอบเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดผิบบาง (Thin layer chromatography)

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง โดยนำผงเมล็ดข่อยแห้งตัวอย่างละ 1 กรัม เติมหอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 จำนวน 5 มิลลิลิตร มาสกัดในอ่างน้ำความถี่สูงควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 30 นาที และกรองผ่านกระดาษกรอง (Whatman No. 4)

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน โดยนำ β -sitosterol 5 มิลลิกรัม ละลายด้วยเอทานอล 1 มิลลิลิตร และ lupeol 5 มิลลิกรัม ละลายด้วยเอทานอล 1 มิลลิลิตร

การเตรียมน้ำยาแยก (developing solvent) ชนิดที่ 1 ผสม heptane-ethyl acetate-glacial acetic acid อัตราส่วน 7:3:0.2 ให้เข้ากัน นำสารละลายมาใส่ในถังทำโครมาโทกราฟี แล้วทิ้งไว้ให้มืดอย่างน้อย 1 ชั่วโมงก่อนใช้ และชนิดที่ 2 ทำเช่นเดียวกับน้ำยาแยกชนิดที่ 1 แต่เปลี่ยนเป็นอัตราส่วน 10:1:0.2 แทน

การเตรียมน้ำยาพ่นกรดกำมะถันเจือจางความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร เตรียมโดยนำกรดกำมะถันผสมกับน้ำ อัตราส่วน 1 ต่อ 9

วิธีการ นำสารละลายมาตรฐานและตัวอย่างที่จะทดสอบชนิดละ 2 และ 5 ไมโครลิตร ตามลำดับ มาแยกแถมบนแผ่นอะลูมิเนียมฉาบด้วยซิลิกาเจล (Silica Gel 60 F₂₅₄) ในแนวระดับเดียวกัน โดยให้ห่างจากขอบล่าง 2.5 เซนติเมตร ขอบบน 2.5 เซนติเมตร และให้มีระยะห่างระหว่างสารละลายแต่ละจุดไม่น้อยกว่า 0.5 เซนติเมตร ผึ่งให้แห้ง นำไปตั้งในถังทำโครมาโทกราฟีที่มีน้ำยาแยก ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง รอให้น้ำยาแยกซึมขึ้นไปตามผิวที่ฉาบถึงขีดที่กำหนด (ระยะการเคลื่อนที่ของน้ำยาแยก 15 เซนติเมตร) นำแผ่น TLC ออกจากถัง ผึ่งไว้ให้แห้งในตู้ดูดควัน แล้วนำไปตรวจสอบ

การตรวจสอบ โดยนำแผ่น TLC ไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และ 366 นาโนเมตร สังเกตผล แล้วนำมาพ่นด้วยน้ำยาพ่นกรดกำมะถันเจือจางความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร ผึ่งไว้ให้แห้ง จากนั้นให้ความร้อนแก่แผ่น TLC ด้วยเตาไฟฟ้า สังเกตแถบสีที่เกิดขึ้นภายใต้แสงธรรมชาติ เทียบกับสารมาตรฐานจากการตรวจสอบด้วยวิธีดังกล่าวทั้งสามจะปรากฏจุดสีต่างๆ บนแผ่นอะลูมิเนียมฉาบสารดูดซับ และแสดงด้วยค่า hR_f (ค่า $hR_f = 100 R_f$) โดยที่ R_f (retardation factor) หมายถึง อัตราส่วนของระยะทางที่สารเคลื่อนที่ต่อระยะทางที่น้ำยาแยกเคลื่อนที่ และโครมาโทแกรมที่ได้จะถูกบันทึกโดยกล้องถ่ายภาพ Sony รุ่น Nex-C3

3. การศึกษาข้อกำหนดทางเคมีและกายภาพ

3.1 การหาปริมาณความชื้น

ตามวิธีที่กำหนดไว้ในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย⁽⁷⁾ โดยชั่งผงเมล็ดช่อยที่ทราบน้ำหนักแน่นอน 5 กรัม ลงในขวดชั่งที่ทราบน้ำหนักคงที่ (อภาชนะที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็น บันทึกน้ำหนัก) นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็น นำไปชั่งน้ำหนัก บันทึกค่าน้ำหนักที่ได้ นำไปอบซ้ำอีกครั้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็น นำไปชั่งน้ำหนัก (น้ำหนักที่ได้จากการชั่งน้ำหนัก 2 ครั้ง มีค่าต่างกันไม่เกิน 12.5 มิลลิกรัม) บันทึกค่าน้ำหนักที่ได้ คำนวณหาค่าร้อยละของปริมาณความชื้น

3.2 การหาปริมาณเถ้ารวม

ตามวิธีการที่ระบุไว้ในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย⁽⁸⁾ โดยชั่งผงเมล็ดช่อยที่ทราบน้ำหนักแน่นอน 2 กรัม ลงในถ้วยกระเบื้องที่ทราบน้ำหนักคงที่ (เผาจนที่อุณหภูมิ 450 องศาเซลเซียส นาน 8 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็น บันทึกน้ำหนัก) นำไปเผาที่อุณหภูมิ 450 องศาเซลเซียส นาน 8 ชั่วโมง ได้เถ้าที่ปราศจากสีดำ ทิ้งให้เย็น นำไปชั่งน้ำหนัก บันทึกค่าน้ำหนักที่ได้ คำนวณหาค่าร้อยละของปริมาณเถ้ารวม

3.3 การหาปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด

ตามวิธีการที่ระบุไว้ในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย⁽⁸⁾ โดยนำเถ้ารวมในถ้วยกระเบื้องมาเติมกรดเกลือเจือจาง (10% w/v) 25 มิลลิลิตร และนำไปต้มบนเตาไฟฟ้า 5 นาที เริ่มจับเวลาเมื่อเถ้าในถ้วยกระเบื้องเริ่มพองขึ้น กรองด้วยกระดาษกรองชนิดที่ปราศจากเถ้า (Whatman No. 41) ล้างตะกอนด้วยน้ำร้อน จนน้ำล้างตะกอนเปลี่ยนจากกรดเป็นกลาง นำเถ้าที่กรองได้และกระดาษกรองใส่ลงในถ้วยกระเบื้องใบเดิม ทำให้แห้งบนเตาไฟฟ้า และนำไปเผาในเตาเผาอุณหภูมิสูงที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส ทิ้งให้เย็น นำไปชั่งน้ำหนัก บันทึกค่าน้ำหนักที่ได้ คำนวณหาค่าร้อยละของปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด

3.4 การหาปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ

ตามวิธีการที่ระบุไว้ในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย⁽⁸⁾ โดยหั่นผงเมล็ดช่อย 5 กรัม ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน ด้วยน้ำที่อิมัลชันด้วยคลอโรฟอร์ม จำนวน 100 มิลลิลิตร ในขวดแก้วมีฝาปิด (glass-stopper conical flask) เขย่าด้วยเครื่องเขย่า 6 ชั่วโมง และตั้งทิ้งไว้อีก 18 ชั่วโมง แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง จากนั้นนำสารละลายที่กรองได้ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่ลงใน evaporating dish ที่ทราบน้ำหนักคงที่ (อภาชนะที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็น บันทึกน้ำหนัก) แล้วนำไประเหยบนอ่างอังไอน้ำจนแห้ง นำ dish ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็น นำไปชั่งน้ำหนัก บันทึกค่าน้ำหนักที่ได้ นำไปอบซ้ำอีกครั้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็น นำไปชั่งน้ำหนัก (น้ำหนักที่ได้จากการชั่งน้ำหนัก 2 ครั้ง มีค่าต่างกันไม่เกิน 2.5 มิลลิกรัม) บันทึกค่าน้ำหนักที่ได้ คำนวณหาค่าร้อยละของปริมาณสารสกัดด้วยน้ำที่ได้

3.5 การหาปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอล

ทำเช่นเดียวกับการหาปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ แต่เปลี่ยนใช้ตัวทำละลายเป็นเอทานอลเข้มข้น ร้อยละ 95 และคำนวณหาค่าร้อยละของปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอลที่ได้⁽⁸⁾

3.6 การหาปริมาณน้ำมันจากเมล็ด

ซึ่งผงเมล็ดช้อยให้มีน้ำหนักที่แน่นอน 5 กรัม ใส่ลงใน thimble สกัดด้วย petroleum ether (จุดเดือด 40 - 60 องศาเซลเซียส) ในเครื่อง soxlet เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำ thimble ขึ้นตั้งกล่าวมาทำให้แห้ง และบดตัวอย่างให้ละเอียด บรรจุใน thimble ขึ้นใหม่ สกัดต่ออีก 1 ชั่วโมง จากนั้นนำของเหลวที่ได้ไประเหยแห้งในขวดก้นกลม คำนวณหาปริมาณน้ำมันที่เหลือติดค้างในขวดก้นกลม⁽⁹⁾

4. การหาปริมาณโลหะหนัก โดย Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometry

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง ใช้ผงสมุนไพรเมล็ดช้อยแห้ง 0.2 กรัม ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน ใส่ใน microwave vessel เติมน้ำกลั่นในปริมาณ 6 มิลลิลิตร เติม 3% hydrogen peroxide 2 มิลลิลิตร ปิดฝา vessel ขึ้นสกรูให้แน่น แล้วประกอบเข้ากับตัวเครื่องย่อยสลายระบบไมโครเวฟ ตั้งอุณหภูมิและความดันที่เหมาะสม ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นถ่ายสารละลายลงในขวดปรับปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตร ด้วยน้ำบริสุทธิ์

การเตรียมสารละลายแปลงค์ วิธีเตรียมเช่นเดียวกับการเตรียมสารละลายตัวอย่างแต่ไม่ต้องมีส่วนผสมของสารตัวอย่าง

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน เตรียมสารละลายมาตรฐานให้ความเข้มข้นของสารหนู 10 ส่วนในล้านส่วน ตะกั่ว 40 ส่วนในล้านส่วน และแคดเมียม 4 ส่วนในล้านส่วน

วิธีการตรวจ

1. สร้างกราฟมาตรฐานจากสารละลายมาตรฐาน แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง และความเข้มข้นของสารหนู 2.5, 5, 7.5 และ 10 ส่วนในล้านส่วน ตะกั่ว 10, 20, 30 และ 40 ส่วนในล้านส่วน ความเข้มข้นของแคดเมียม 1, 2, 3 และ 4 ส่วนในล้านส่วน โดยตั้งระบบการทำงานของเครื่องให้เจือจางสารละลายมาตรฐานอัตโนมัติ และกำหนดให้ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานอย่างน้อยเท่ากับ 0.995

2. วิเคราะห์หาปริมาณสารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม ในสารละลายตัวอย่างโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

ผล

ผลการตรวจคัดกรองศึกษาทางพฤกษเคมี และการศึกษาทางพฤกษเคมีเบื้องต้น

โดยวิธีปฏิกิริยาทำให้เกิดสี โดยใช้ผงเมล็ดช้อยแห้ง 4 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างอ้างอิง (PMJ01-03) และตัวอย่างจากร้านจำหน่ายเครื่องยาสมุนไพร (PMJ04) พบว่า ตัวอย่างทั้งสิ้นประกอบด้วยกลุ่มสาร 5 กลุ่ม (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยปฏิกิริยาเกิดสี

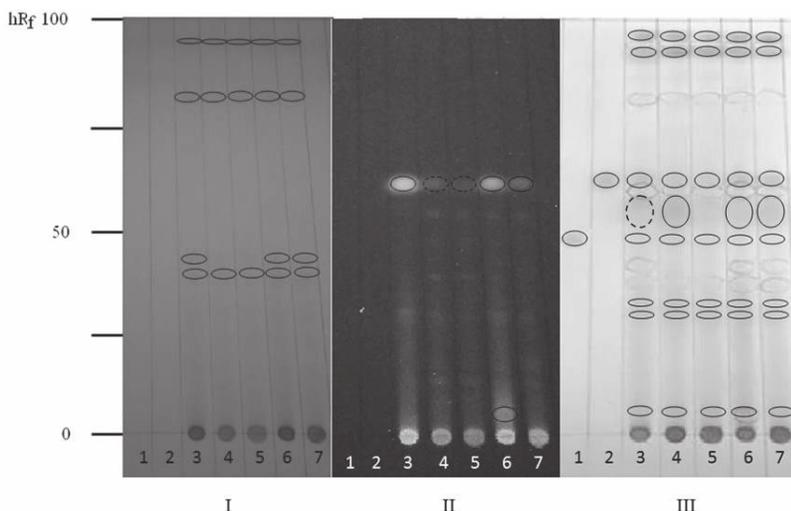
ส่วนประกอบทางเคมี	วิธีทดสอบ	ผลการทดสอบ
Steroids & Terpenoids	Liebermann-Burchard test	ได้วงแหวนสีม่วงแดง และสารละลายชั้นบนเป็นสีชมพู
Alkaloids	Dragendorff's test	ได้ตะกอนสีส้ม
Fixed oils	Phosphomolybdic acid test	ได้สารละลายสีน้ำเงินแกมเขียวและมีคราบน้ำมันบนกระดาษกรอง
Flavonoids	Shinoda's test	ได้สารละลายสีแดง
Phenolic compounds & Tannins	Ferric chloride test	ได้สีน้ำเงินเข้ม
Amino acids	Ninhydrin test	ได้ผลลบ
Saponins	Froth test	ได้ผลลบ
Organic acids	Litmus test	ได้ผลลบ

เมื่อนำเมล็ดช่อย 16 ตัวอย่าง มาสกัดด้วยเอทานอลแล้วตรวจสอบกลุ่มสารอีกครั้ง พบว่า ประกอบด้วยสารกลุ่ม Steroids & Terpenoids, Alkaloids, Flavonoids, Phenolic compounds & Tannins และ Cardiac glycoside โดยตัวอย่าง PMJ ที่ 01-05 เกิดวงแหวนสีน้ำตาลแดงตรงรอยต่อระหว่างสารละลาย และสารละลายชั้นบนมีสีเขียว แสดงว่ามีสารกลุ่ม Steroids ส่วนตัวอย่าง PMJ 06-16 เกิดวงแหวนสีน้ำตาลแดงตรงรอยต่อระหว่างสารละลาย และสารละลายชั้นบนมีสีน้ำตาลแดง แสดงว่ามีสารกลุ่ม Terpenoids แต่ในขั้นตอนคัดกรองตัวอย่างที่ใช้ตัวอย่างเพียง 4 ตัวอย่าง (PMJ 01-04) ให้ผลที่ตรงกันข้าม คือ ให้ผลเป็นพบสารกลุ่ม Terpenoids แสดงว่าในเมล็ดช่อยมีสารทั้งกลุ่ม Steroids และ Terpenoids ซึ่งตัวอย่าง PMJ 01-04 อาจจะมีปริมาณ Steroids ที่มากกว่า terpenoids เมื่อใช้ตัวอย่างในการสกัดเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบสารสกัดด้วยเอทานอลของเมล็ดช่อยแห้งทั้ง 16 ตัวอย่าง

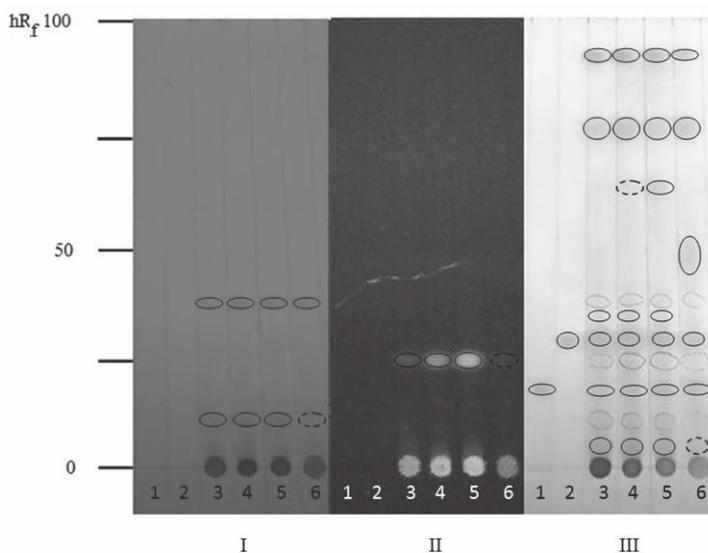
ตัวอย่าง	Steroids & Terpenoids	Alkaloids	Phenolic compound & Tannins	Flavonoids (Shinoda test)	Cardiac glycoside
PMJ 01-05	พบ Steroids	พบ	พบ	พบ	พบ
PMJ 06-16	พบ Terpenoids	พบ	พบ	พบ	พบ

ส่วนการตรวจสอบโดยวิธีโครมาโทกราฟีชนิดผิวบาง ในน้ำยาแยก heptane-ethyl acetate-glacial acetic acid ทั้ง 2 อัตราส่วน พบว่า สามารถแยกสารได้ดี โดยอัตราส่วน 7:3:0.2 (ชนิดที่ 1) สารสกัดเอทานอลของเมล็ดช่อยทั้ง 16 ตัวอย่าง แสดงแถบของสารที่ตำแหน่งเดียวกัน 13 แถบ มีค่า R_f ในช่วง 4-7, 27-30, 31-33, 34-37, 38-41, 45-49, 50-57, 57-60, 60-63, 78-81, 91-93, 93-94 และ 94-97 ยกเว้น PMJ 08 มีแถบสารที่ R_f ในช่วง 3-6 เพิ่มอีก 1 ตำแหน่ง เมื่อนำสารสกัดดังกล่าวไปทดสอบในน้ำยาแยกอัตราส่วน 10:1:0.2 (ชนิดที่ 2) แสดงแถบของสารที่ตำแหน่งเดียวกัน 11 แถบ มีค่า R_f ในช่วง 3-6, 9-12, 15-18, 22-25, 25-32, 27-30, 33-34, 36-38, 60-63, 74-77 และ 91-93 ยกเว้น PMJ 11 มีแถบสารที่ R_f ในช่วง 42-51 เพิ่มอีก 1 ตำแหน่ง และหากนำสารสกัดนี้มาทดสอบเทียบกับสารสำคัญ คือ β -sitosterol และ lupeol พบว่า น้ำยาแยกชนิดที่ 1 แยกสารสำคัญทั้ง 2 ได้ดีกว่าชนิดที่ 2 (ภาพที่ 3 และ 4) โดย β -sitosterol มีค่า R_f อยู่ในช่วง 45-49 และ 15-18 ตามลำดับ และ lupeol มีค่า R_f อยู่ในช่วง 60-63 และ 27-30 ตามลำดับ (ตารางที่ 4 และ 5)



ภาพที่ 3 ลักษณะทางโครมาโทแกรมชนิดผิวนางของน้ำยาตัวอย่างที่สกัดจากเมล็ดข่อยแห้ง น้ำยาแยกที่มีส่วนผสมของ heptane-ethyl acetate-glacial acetic acid ในอัตราส่วน 7:3:0.2

- 1 = สารมาตรฐาน β -sitosterol
 - 2 = สารมาตรฐาน lupeol
 - 3 = ตัวอย่างผงเมล็ดข่อยแห้งหมายเลข PMJ 09
 - 4 = ตัวอย่างผงเมล็ดข่อยแห้งหมายเลข PMJ 10
 - 5 = ตัวอย่างผงเมล็ดข่อยแห้งหมายเลข PMJ 11
 - 6 = ตัวอย่างผงเมล็ดข่อยแห้งหมายเลข PMJ 08
 - 7 = ตัวอย่างผงเมล็ดข่อยแห้งหมายเลข PMJ 02 (authentic)
- I = ตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร
 II = ตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร
 III = ตรวจสอบด้วยน้ำยาฟ่นกรดกำมะถันเจือจาง (10%v/v) ให้ความร้อนด้วยเตาไฟฟ้า



ภาพที่ 4 ลักษณะทางโครมาโทแกรมชนิดผิวนางของน้ำยาตัวอย่างที่สกัดจากเมล็ดข่อยแห้ง น้ำยาแยกที่มีส่วนผสมของ heptane-ethyl acetate-glacial acetic acid ในอัตราส่วน 10:1:0.2

- 1 = สารมาตรฐาน β -sitosterol
 - 2 = สารมาตรฐาน lupeol
 - 3 = ตัวอย่างผงเมล็ดข่อยแห้งหมายเลข PMJ 02 (authentic)
 - 4 = ตัวอย่างผงเมล็ดข่อยแห้งหมายเลข PMJ 08
 - 5 = ตัวอย่างผงเมล็ดข่อยแห้งหมายเลข PMJ 09
 - 6 = ตัวอย่างผงเมล็ดข่อยแห้งหมายเลข PMJ 11
- I = ตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร
 II = ตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร
 III = ตรวจสอบด้วยน้ำยาฟ่นกรดกำมะถันเจือจาง (10%v/v) ให้ความร้อนด้วยเตาไฟฟ้า

ตารางที่ 4 ค่า hR_f และผลการตรวจสอบองค์ประกอบต่างๆ ในน้ำยาตัวอย่างที่สกัดจากผงเมล็ดช้อยแห้ง ในน้ำยาแยกที่มีส่วนผสมของ heptane-ethyl acetate-glacial acetic acid ในอัตราส่วน 7:3:0.2

จุด	ค่า hR_f	การตรวจสอบ		
		แสงยูวี 254 นาโนเมตร	แสงยูวี 366 นาโนเมตร***	น้ำยาพ่นกรดกำมะถันเจือจาง
1	3-6	-	เขียวฟ้า**	-
2	4-7	-	-	ม่วงดำ
3	27-30	-	-	ม่วงอ่อน
4	31-33	-	-	ม่วงอ่อน
5	34-37	ทึบแสง*	-	-
6	38-41	ทึบแสง*	-	-
7	45-49	-	-	ม่วง
8	50-57	-	-	เหลืองน้ำตาล*
9	57-60	-	ฟ้า	-
10	60-63	-	-	ม่วงแดง
11	78-81	ทึบแสง	-	-
12	91-93	-	-	ส้มแดง
13	93-94	ทึบแสง	-	-
14	94-97	-	-	ม่วงแดง

* อาจปรากฏแถบขึ้นได้บางตัวอย่างขึ้นกับปริมาณสาร

** ปรากฏแถบเฉพาะตัวอย่าง PMJ 08

*** เรืองแสง (fluorescence)

ตารางที่ 5 ค่า hR_f และผลการตรวจสอบองค์ประกอบต่างๆ ในน้ำยาตัวอย่างที่สกัดจากผงเมล็ดช้อยแห้ง ในน้ำยาแยกที่มีส่วนผสมของ heptanes-ethyl acetate-glacial acetic acid ในอัตราส่วน 10:1:0.2

จุด	ค่า hR_f	การตรวจสอบ		
		แสงยูวี 254 นาโนเมตร	แสงยูวี 366 นาโนเมตร***	น้ำยาพ่นกรดกำมะถันเจือจาง
1	3-6	-	-	ม่วง*
2	9-12	ทึบแสง*	-	-
3	15-18	-	-	ม่วง
4	22-25	-	ฟ้า	-
5	25-32	-	-	เหลืองน้ำตาล*
6	27-30	-	-	ม่วงแดง
7	33-34	-	-	ม่วงอ่อน*
8	36-38	ทึบแสง	-	-
9	42-51	-	-	น้ำตาล**
10	60-63	-	-	ม่วงเทา*
11	74-77	-	-	ม่วงแดง
12	91-93	-	-	ม่วงดำ

* อาจปรากฏแถบขึ้นได้บางตัวอย่างขึ้นกับปริมาณสาร

** ปรากฏแถบเฉพาะตัวอย่าง PMJ 11

*** เรืองแสง (fluorescence)

ผลการศึกษาค่ากำหนดทางเคมีและกายภาพ

ผลการศึกษาปริมาณความชื้น เถ้ารวม เถ้าที่ไม่ละลายในกรด สารสกัดด้วยน้ำ สารสกัดด้วยเอทานอล และน้ำมันจากเมล็ดของตัวอย่างผงเมล็ดช้อยแห้งทั้ง 16 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 7.79 ± 0.85 , 5.26 ± 1.00 , 1.40 ± 0.84 , 14.90 ± 3.43 , 5.28 ± 0.94 และ 3.80 ± 0.48 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 ผลการศึกษาค่ากำหนดทางเคมีและกายภาพของผงเมล็ดช้อยแห้ง

ตัวอย่าง	ปริมาณความชื้น (% w/w)	ปริมาณเถ้ารวม (% w/w)	ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (% w/w)	ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ (% w/w)	ปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอล (% w/w)	ปริมาณน้ำมันจากเมล็ด (% w/w)
PMJ 01 (นักพฤกษศาสตร์)	8.1152	4.4576	0.9357	18.6115	5.2774	3.28
PMJ 02 (นักพฤกษศาสตร์)	8.0120	4.8038	1.1183	20.1809	5.0754	3.34
PMJ 03 (นักพฤกษศาสตร์)	7.7801	4.6757	0.7507	18.2646	4.7914	3.73
PMJ 04 ร้านค้าจาก กทม.	7.2732	3.7134	0.2447	14.3080	5.3256	3.86
PMJ 05 ร้านค้าจากนครปฐม	7.1318	5.0442	1.2486	13.1500	4.6738	4.11
PMJ 06 ร้านค้าจากนครสวรรค์	7.0521	4.6706	0.8591	12.1493	3.9832	3.55
PMJ 07 ร้านค้าจากนครสวรรค์	7.2154	4.8682	1.0664	12.5285	4.4139	3.37
PMJ 08 ร้านค้าจากอุทัยธานี	6.9889	5.2797	1.2863	14.1832	4.0823	3.53
PMJ 09 ร้านค้าจากเชียงใหม่	8.4557	5.2804	0.9573	13.0240	4.8349	2.79
PMJ 10 ร้านค้าจากสงขลา	7.1211	3.7674	0.3762	12.9067	6.3305	4.14
PMJ 11 ร้านค้าจากนครราชสีมา	8.6839	7.2295	3.1807	12.5777	6.4535	4.21
PMJ 12 ร้านค้าจากนครราชสีมา	7.1845	5.5244	1.5993	23.4675	6.4107	4.33
PMJ 13 ร้านค้าจากบุรีรัมย์	Outlier	6.0233	1.8758	12.8673	6.5735	4.40
PMJ 14 ร้านค้าจากสุราษฎร์ธานี	7.0445	7.0935	3.0768	15.7349	6.7733	4.60
PMJ 15 อ.อรัญประเทศ สระแก้ว	9.3274	5.4878	1.7162	11.3864	5.0557	3.85
PMJ 16 อ.ตาพระยา สระแก้ว	9.4610	6.1805	2.0676	13.1122	4.4493	3.81
ค่าเฉลี่ย	7.7898	5.2562	1.3975	14.9003	5.2815	3.8053
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.8510	1.0051	0.8378	3.4328	0.9351	0.4822

ตามข้อกำหนดมาตรฐานทางเคมีและกายภาพ ปริมาณที่ระบุว่า “ไม่มากกว่า” จะนำค่าเฉลี่ยที่ได้บวกด้วยค่าเบี่ยงเบนเฉลี่ย ได้แก่ ปริมาณความชื้น เถ้ารวม และเถ้าที่ไม่ละลายในกรด ส่วนปริมาณที่ระบุว่า “ไม่น้อยกว่า” จะนำค่าเฉลี่ยที่ได้ลบด้วยค่าเบี่ยงเบนเฉลี่ย ได้แก่ ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ สารสกัดด้วยเอทานอล และน้ำมันจากเมล็ด (ตารางที่ 7)

ผลการศึกษาการปนเปื้อนโลหะหนัก

การหาปริมาณการปนเปื้อนสารหนู ตะกั่ว และแคดเมียมของตัวอย่างเมล็ดช้อยแห้งจำนวน 10 ตัวอย่าง พบว่ามี 1 ตัวอย่าง จาก 10 ตัวอย่างที่ไม่เข้ามาตรฐาน เนื่องจากมีแคดเมียมเกินค่าที่แนะนำไว้ในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทยที่กำหนดไว้ไม่เกิน 0.3 ในหน่วยของส่วนในล้านส่วน หรือพีพีเอ็ม (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 7 ผลการประเมินข้อกำหนดทางเคมีและกายภาพของผงเมล็ดช้อยแห้ง

ประเภทของการทดสอบ (หน่วย)	ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนเฉลี่ย ($\bar{x} \pm SD$; n =16)	เกณฑ์กำหนด ค่าบน ($\bar{x} \pm SD$)	เกณฑ์กำหนด ค่าล่าง ($\bar{x} \pm SD$)
ปริมาณความชื้น (% w/w)	7.79 \pm 0.85	8.64	
ปริมาณเถ้ารวม (% w/w)	5.26 \pm 1.00	6.26	
ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (% w/w)	1.40 \pm 0.84	2.24	
ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ (% w/w)	14.90 \pm 3.43		11.47
ปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอล (% w/w)	5.28 \pm 0.94		4.34
ปริมาณน้ำมันจากเมล็ด (% w/w)	3.80 \pm 0.48		3.32

หมายเหตุ ปริมาณความชื้น n = 15 เนื่องจากตัดค่าที่เป็น outlier ออก

ตารางที่ 8 ผลการศึกษาปริมาณโลหะหนัก จำแนกตามชนิดของโลหะหนัก

ชนิดโลหะ	เกณฑ์ของตำรามาตรฐาน ยาสมุนไพรไทย (พีพีเอ็ม)	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง ที่ตรวจพบ	ปริมาณ ต่ำสุด-สูงสุด (พีพีเอ็ม)
สารหนู	4	10	10	0.038-0.286
ตะกั่ว	10	10	10	0.760-3.752
แคดเมียม	0.3	10	10	0.035-1.317

วิจารณ์

ผลการตรวจคัดกรองศึกษาทางพฤกษเคมี และการศึกษาทางพฤกษเคมีเบื้องต้นของเมล็ดช้อยแห้งทั้ง 16 ตัวอย่าง พบว่า ประกอบด้วยสารกลุ่ม Steroids & Terpenoids, Alkaloids, Flavonoids, Phenolic compounds & Tannins และ Cardiac glycoside สอดคล้องกับผลที่เคยมีการศึกษามาก่อน⁽⁴⁾

การทดสอบเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดผิวบาง ซึ่งเป็นข้อมูลของทั้ง 16 ตัวอย่าง แต่แสดงผลให้เห็นเพียง 4-5 ตัวอย่าง โดยเลือกตัวอย่าง Authentic 1 ตัวอย่าง (PMJ 02) ตัวอย่างที่มีแถบของสารต่างจากตัวอย่างอื่น 2 ตัวอย่าง (PMJ 08 และ PMJ 11) และตัวอย่างอื่นๆ ที่อยู่ใกล้เคียงกัน เพื่อให้ได้ภาพถ่ายที่เห็นแถบของสารอย่างชัดเจน โดยศึกษาเปรียบเทียบกับยาแยกที่มีส่วนผสมของ heptane-ethyl acetate-glacial acetic acid 2 อัตราส่วน คือ 7:3:0.2 และ 10:1:0.2 โดยใช้ β -sitosterol และ lupeol เป็นสารเทียบ (markers) หลังตรวจสอบด้วยน้ำยาฟันทกรดกำมะถัน เจือจาง (10% v/v) อังความร้อนจากเตาไฟฟ้า พบว่า β -sitosterol ที่มีแถบสีม่วงอยู่ต่ำกว่าแถบสีม่วงแดงของ lupeol ส่วนการตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และ 366 นาโนเมตร นั้นในตำแหน่งนี้จะไม่เห็นแถบของทั้งสารเทียบและสารสกัดด้วยเอทานอล เนื่องจากสารเทียบทั้งสองเป็นสารกลุ่ม Steroids และ Terpenoids ที่ไม่มีคุณสมบัติเรืองแสงใน UV 366 และไม่ปรากฏแถบที่บ่งแสงบนพื้น fluorescence สีเขียวสว่างบนแผ่น TLC

ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่แสดงในการศึกษาข้อกำหนดทางเคมีและกายภาพ ได้ตัดค่าที่อยู่นอกช่วง (outlier) ออกไปก่อน โดยคำนวณตามวิธี Grubbs' test, Dixon test หรือ Q-test และ Rule of the Huge Error และตัดค่าดังกล่าวออกไปหากผลของการคำนวณ 2 ใน 3 วิธี พบว่าเป็น outlier อาจจะใช้โปรแกรม SPSS ในการคำนวณค่า outlier ก็ได้ (ถ้ามี)

การปนเปื้อนโลหะหนัก พบเพียง 1 ตัวอย่าง (จาก 10 ตัวอย่าง) ที่มีปริมาณแคดเมียมเกินค่ามาตรฐานที่กำหนดไว้ในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากการปนเปื้อนของแคดเมียมในแหล่งปลูกหรือระหว่างขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบของเกษตรกร

สรุป

ตัวอย่างเมล็ดช่อยแห้งที่นำมาศึกษาทั้ง 16 ตัวอย่าง มีลักษณะของผงยาและองค์ประกอบทางเคมีคล้ายคลึงกันเกือบทุกตัวอย่าง โดยพบสารกลุ่ม Steroids & Terpenoids, Alkaloids, Flavonoids, Phenolic compounds & Tannins และ Cardiac glycoside จากผลการศึกษาลักษณะทางเคมีของตัวอย่างเมล็ดช่อยแห้งที่สกัดด้วยเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 โดยวิธีโครมาโทกราฟี ชนิดผิวบางที่ใช้แผ่นอะลูมิเนียมฉาบด้วยซิลิกาเจล (Silica Gel 60 F₂₅₄) อัตราส่วน 7:3:0.2 แยกสาร β -sitosterol และ lupeol ได้ดี มีค่า R_f อยู่ในช่วง 45-49 และ 60-63 ตามลำดับ และจากผลการศึกษาคณสมบัติทางเคมีและกายภาพ สรุปได้ว่า เมล็ดช่อยแห้งควรมีข้อกำหนดมาตรฐานทางเคมีและกายภาพ ดังนี้

ปริมาณความชื้น ไม่มากกว่า 9.0% โดยน้ำหนัก

ปริมาณเถ้ารวม ไม่มากกว่า 6.0% โดยน้ำหนัก

ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด ไม่มากกว่า 2.0% โดยน้ำหนัก

ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ ไม่น้อยกว่า 11.0% โดยน้ำหนัก

ปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอล ไม่น้อยกว่า 4.0% โดยน้ำหนัก

ปริมาณน้ำมันจากเมล็ด ไม่น้อยกว่า 3.0% โดยน้ำหนัก

หากนำเสนอข้อมูลผลการศึกษานี้โดยละเอียดต่อคณะกรรมการจัดทำตำรายา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะกรรมการฯ สามารถนำไปใช้ประกอบการพิจารณาจัดทำข้อกำหนดมาตรฐานของเมล็ดช่อยแห้งเพื่อประโยชน์ในการควบคุมวัตถุดิบเข้าตำรับยาต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากสำนักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ และฝึกอบรมเทคนิคการทดสอบตามข้อกำหนดมาตรฐานในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทยจากสถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ รวมทั้งคำแนะนำจากคณะที่ปรึกษาโครงการ ตลอดจนความร่วมมือในการจัดหาตัวอย่างจากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ทั่วประเทศ และการตรวจสอบพรรณไม้จากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

1. ฐานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. ช่อย. [ออนไลน์]. 2553; [สืบค้น 3 ส.ค. 2558]; [3 หน้า]. เข้าถึงได้ที่ : URL: <http://phargarden.com/main.php?action=viewpage&pid=21>
2. Kalios. *Streblus asper* Lour. [online] January 2015; [cited 2015 Aug 3]; [7 screens]. Available from: URL: <http://www.stuartxchange.com/Kalios.html>
3. Reynole sioson. Native wild edible: *Streblus asper*. [online] June 2012. [cited 2015 Aug 3]. Available from: URL: <http://www.balinghasai-farms.info/2012/06/29/native-wild-edible-streblus-asper>
4. Rastogi S, Kulshreshtha DK, Rawat AKS. *Streblus asper* Lour. (Shakhotaka): A review of its chemical, pharmacological and ethnomedicinal properties. *Evid Based Complement Alternat Med* 2006; 3(2): 217-22.

5. Useful plants of India. New Delhi: NISCOM; 1992. p. 603-4.
 6. วารุณี จิรวัดนาพงศ์, สุพรรณ ภัทรพรชัยวัฒน์, ภูริทัต รัตนสิริ และนิธิตา พลโคตรต. การควบคุมคุณภาพและการจัดทำข้อกำหนดมาตรฐานทางเคมีของสมุนไพร : เอกสารประกอบการอบรมเชิงปฏิบัติการ 30 เมษายน - 4 พฤษภาคม 2555. นนทบุรี : สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2555.
 7. Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. Thai herbal pharmacopoeia Vol. I. 2nd ed. Appendices 4.15 Loss on drying. Bangkok: Prachachon; 1998. p. 123-4.
 8. Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. Thai herbal pharmacopoeia Vol. II. 2nd ed. Appendices 7.6 Acid-insoluble ash, 7.7 Total ash and 7.12 Extractives. Bangkok: Prachachon; 2000. p. 108, 141.
 9. Garratt DC. The qualitative analysis of drugs. 3rd ed. Tokyo, Japan: Chapman & Hall; 1964.
-

Quality Study of Dried Koi Seed

(*Streblus asper* Lour.)

Tuangpon Khemthong Nuanpan Paiboonsrinakra and Nantana Klinsunthorn
*Regional Medical Sciences Center 5 Samut Songkhram, Department of Medical Sciences, Amphoe Mueang,
Samut Songkhram 75000 Thailand.*

ABSTRACT *Streblus asper* Lour. or as called tooth brush tree or Koi in Thai is classified in Moraceae family. Its dried seed has been using in Thai traditional medicine for treating diarrhea as well as other pathogenic bacteria in oral cavity and alimentary canal. However, standard specification of tooth brush tree in Thai Herbal Pharmacopeia is not yet available. Thus, the present studies were under taken to collect the base-line datas for supporting those specification. The studies comprised phytochemical screening, physico-chemical specifications and heavy metal contamination by using dried seed of 16 samples of authentic and commercials. Results obtained from the chemical study indicated that, between the 2 mobile phases, a mixture of heptane-ethyl acetate-glacial acetic acid in the ratio 7:3:0.2 showed better potential in separation of the band from the ethanolic extract of dried seeds. The means values of moisture, total ash, acid insoluble ash, water soluble extractive, ethanol soluble extractive and fixed oil were found to be 7.79 ± 0.85 , 5.26 ± 1.00 , 1.40 ± 0.84 , 14.90 ± 3.43 , 5.28 ± 0.94 and 3.80 ± 0.48 % w/w, respectively. One tested sample did not meet the suggested maximum amount of cadmium as stated in Thai Herbal Pharmacopoeia. The results of this study will be useful for setting up the physico-chemical specifications of dried Koi seed for the purpose of quality control of its crude drug thereafter.

Key words: *Streblus asper* Lour., Quality, Dried koi seed