
การตรวจเอกลักษณ์ทางเคมี-ฟิสิกส์ของเทียนแดง

จิตรรา ชัยวัฒน์

สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ เทียนแดง คือเมล็ดแก่แห้งของ *Lepidium sativum* L. (Garden Cress) ใช้ผสมในยาแผนโบราณที่ขึ้นทะเบียนในประเทศไทยมากกว่า 80 ตำรับ ได้ศึกษาวิธีตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีและฟิสิกส์ของเทียนแดง พบว่าการทดสอบต่อไปนี้สามารถใช้ตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีและฟิสิกส์ของเทียนแดงได้ คือ การพองตัวของ Mucliage เมื่อถูกน้ำและเกิดสีกับ ruthenium red TS, การทำปฏิกิริยาเกิดสีกับ dilute nitric acid, sodium hydroxide TS และ ninhydrin TS, การทำปฏิกิริยาเกิดตะกอนกับ acetic potassium iodobismuthate TS, การทดสอบอนุมูล cyanide และ sulfide โดยวิธี paper strip และการเปรียบเทียบ Thin-layer Chromatogram ของสารสกัดกับสารมาตรฐาน sinapic acid นอกจากนี้ตามที่มีรายงานระบุว่าพบ lepidine ในเทียนแดง จึงได้ศึกษาเปรียบเทียบ Thin-layer Chromatogram ของสารสกัดจากเมล็ดเทียนแดงกับ lepidine ปรากฏว่าไม่พบ lepidine ในตัวอย่างที่นำมาศึกษา และในรายงานที่พบสารชื่อ lepidine นั้น แสดงสูตรโครงสร้างของสารดังกล่าวเป็นกลุ่ม imidazole alkaloid ซึ่งมีสูตรโครงสร้างแตกต่างจาก lepidine ที่ปรากฏใน Merck index

บทนำ

เทียนทั้งเก้า คือ เทียนขาว เทียนดำ เทียนแดง เทียนขาวเปลือก เทียนตาตักแตน เทียนยาวพาดิ เทียนสัตตบุษย์ เทียนตากบ และเทียนเกล็ดหอย เป็นสมุนไพรที่ได้รับการคัดเลือกเพื่อจัดทำมาตรฐานในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia) และเป็นสมุนไพรที่ใช้อยู่ในอุตสาหกรรมผลิตยาแผนโบราณ เทียนแดงที่โบราณใช้ทำยามีสรรพคุณแก้เสมหะ ลม และดีระคนกันซึ่งเรียกว่าสันนิบาต แก้ลมเสียดแทงในลำไส้ แก้ลมคลื่นเหียน โดยใช้ร่วมกับสมุนไพรเทียนชนิดอื่นในพิกัดเทียนทั้งห้าและเทียนทั้งเก้า ซึ่งสรรพคุณโดยรวมมีรสขม ทำให้ร่างกายอยู่ในสมดุล คือไม่ร้อนหรือเย็นเกินไป⁽¹⁾

เทียนแดงเป็นเครื่องยาที่มีการพิสูจน์เอกลักษณ์และจัดทำข้อมูลทางเภสัชเวท⁽²⁾ จากเมล็ดแก่แห้งของพืชที่มีชื่อพฤกษศาสตร์ว่า *Lepidium sativum* L. ในวงศ์ Cruciferae (Brassicaceae) มีชื่อสามัญว่า Garden Cress⁽³⁾ เป็นพืชพื้นเมืองของเอเชียตะวันตกและแพร่ไปสู่ประเทศทางยุโรปตะวันตก เมล็ดเทียนแดงที่จำหน่ายตามร้านขายยาสมุนไพรในประเทศไทยเป็นสมุนไพรนำเข้าจากต่างประเทศ ข้อมูลการนำเข้าสมุนไพรที่ได้รับการควบคุมจากสำนักงานศุลกากรนำเข้าท่าเรือกรุงเทพ แจ้งว่าประเทศที่ผลิตสินค้าคือ ปากีสถาน อินเดีย และอัฟกานิสถาน พืชที่ให้เมล็ดเทียนแดงเป็นพืชขนาดเล็ก อายุ 1 ปี ดอกเป็นช่อ ออกรวมกันเป็นกระจุกที่ปลายยอดในช่วงเดือนมิถุนายน-กรกฎาคม ดอกมีขนาดเล็กมาก ประมาณ 3-5 มิลลิเมตร สมบูรณ์เพศ สีม่วงอ่อน ผลแบบผลฝักกด เมื่อสุกแตกเป็นสองแฉกยึดติดกันด้วยแกนที่ติดตั้ง ไขลักษณะคล้ายปีกแยกไปทั้งสองข้าง เมล็ดมีสีน้ำตาลขนาดเล็กคล้ายรูปไข่ ผิวมันลื่น เรียบ ไม่มีขน ปลายข้างหนึ่งเรียวยาวมีลักษณะเป็นร่องตามแนวสันๆ เปลือกเมล็ดจะพองตัวเมื่อถูกความชื้น⁽²⁾ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 เมล็ดเทียนแดง

จากงานวิจัยที่ศึกษาตัวอย่างเมล็ดเทียนแดงที่จำหน่ายในประเทศไทย ยังให้ข้อมูลด้านคุณภาพทางเคมีไม่เพียงพอสำหรับการจัดทำมาตรฐานในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย ได้ศึกษาคุณลักษณะเฉพาะตัวและรายงานการวิจัยที่พบสารประกอบในเมล็ดเทียนแดงระบุว่า มี edible oil สูงถึงร้อยละ 58⁽³⁾ และพบสารประกอบต่างๆ เช่น benzyl cyanide, benzyl isothiocyanate, allyl glucosinolate, amino acids, sinapic acid, sinapine และ lepidine^(2, 4, 5) เพื่อนำมาใช้ในการทดสอบเอกลักษณ์ทางเคมี-ฟิสิกส์ของเมล็ดเทียนแดงโดยอาศัยปฏิกิริยาทางเคมีระหว่างสารประกอบในเมล็ดเทียนแดงกับสารเคมีที่เติมลงไปทำปฏิกิริยาเพื่อพิสูจน์ว่ามีสารประกอบชนิดนั้น

อยู่จริง ซึ่งปฏิกิริยาทางเคมีดังกล่าวจะเฉพาะเจาะจงกับสารประกอบที่มีในเมล็ดเทียนแดง เช่น ปฏิกิริยาการทำให้เกิดสี การทำให้เกิดการตกตะกอน นอกจากนี้วิธีการตรวจเอกลักษณ์ของเมล็ดเทียนแดงโดย Thin-layer Chromatography (TLC) ที่มีผู้รายงานไว้แล้วนั้น^(2, 7) ยังไม่มีสารสำหรับเปรียบเทียบค่า Rf จึงได้ศึกษาสารประกอบในเมล็ดเทียนแดงที่อาจนำมาใช้เป็นสารเปรียบเทียบ (marker) เพื่อนำข้อมูลผลการทดสอบไปประกอบการพิจารณาในหัวข้อการตรวจเอกลักษณ์ทางเคมี-ฟิสิกส์ของเทียนแดงเพื่อบรรจุในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างสมุนไพร

เมล็ดแก่แห้งของเทียนแดงจำนวน 15 ตัวอย่าง ซึ่งจากร้านขายส่งและขายปลีกสมุนไพร ในเขตกรุงเทพมหานคร จำนวน 10 ตัวอย่าง และในส่วนภูมิภาคจำนวน 5 ตัวอย่าง คือ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ชลบุรี ขอนแก่น และสงขลา จังหวัดละ 1 ตัวอย่าง ทุกตัวอย่างได้ผ่านการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเภสัชเวทว่ามาจากพืชชื่อ *Lepidium sativum* L. ในวงศ์ Cruciferae (Brassicaceae), Crude Drug Number: DMSc 431

เครื่องมือและอุปกรณ์

- Electronic analytical balance, A&D รุ่น ER180A
- Thin-layer Chromatography Apparatus : TLC tank, silica gel GF254 precoated plate, microcapillary tube ขนาด 2, 5, 10 ไมโครลิตร
- เครื่องถ่ายภาพโครมาโตแกรมชนิดผิวบาง บริษัท CAMAG
- อุปกรณ์และเครื่องแก้วอื่นๆ ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น กระบอกตวงกรวยแยก ปิเปต กระดาษกรอง water bath และ centrifuge tube เป็นต้น

สารมาตรฐาน

- lepidine ($C_{10}H_9N$) ความบริสุทธิ์ >97% GC, Fluka Chemie AG Switzerland
- sinapic acid ($C_{11}H_{12}O_5$) ความบริสุทธิ์ >99% GC, Fluka Chemie AG Switzerland

สารเคมี (AR grade)

ethanol, methanol, ruthenium red, nitric acid, sodium hydroxide, sulfuric acid, zinc powder, iron (III) chloride, iron (II) sulfate, hydrochloric acid, ninhydrin, petroleum ether ($40^\circ - 60^\circ$), chloroform, ethyl acetate, ammonia solution, iodine, chloroplatinic acid, potassium iodide, bismuth oxynitrate, glacial acetic acid

น้ำยาทดสอบ

Ruthenium red TS, acetic potassium iodobismuthate TS, sodium hydroxide TS, iron (II) sulfate TS, dilute nitric acid, 10% w/v sodium hydroxide, 6M hydrochloric acid, iron (III) chloride TS, ninhydrin TS, anisaldehyde TS, dragendorff TS, lodoplatinate TS.

วิธีเตรียมน้ำยาทดสอบ

เตรียมน้ำยาทดสอบ (Test Solution, TS) ตามวิธีที่ระบุใน Thai Pharmacopoeia^(8, 9)

วิธีการตรวจเอกลักษณ์ทางเคมี-ฟิสิกส์

1. การทดสอบ **mucilage**⁽⁹⁾

ตัวอย่างเมล็ดเทียนแดงน้ำหนัก 1 กรัม ใส่ในกระบอกตวงที่มีจุลปิดขนาด 25 มิลลิลิตร ทำให้ตัวอย่างเปียกทั่วกันด้วย ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำจนครบ 25 มิลลิลิตร ปิดจุกและเขย่าแรงๆ 5 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง โดยเขย่าเป็นครั้งคราว เติม ruthenium red TS ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน

2. การทดสอบปฏิกิริยากับ **acetic potassium iodobismuthate TS**⁽¹⁰⁾

ตัวอย่างเมล็ดเทียนแดงบดละเอียดน้ำหนัก 1 กรัม ใส่ใน centrifuge tube เติม ethanol 3 มิลลิลิตร ปิดจุกเขย่านาน 3 นาทีแล้วกรอง สารละลายที่กรองได้เติม acetic potassium iodobismuthate TS 2-3 หยด

3. การทดสอบปฏิกิริยากับกรดและด่าง

3.1 ตัวอย่างเมล็ดเทียนแดงบดละเอียดน้ำหนัก 0.1 กรัม เติม dilute nitric acid ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วทำให้อุ่นบน water bath

3.2 ตัวอย่างเมล็ดเทียนแดงบดละเอียด 0.1 กรัม เติม sodium hydroxide TS ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

4. การทดสอบอนุมูล **sulfide** และ **cyanide** โดยวิธี **paper strip**^(11, 12)

เตรียม iron (II) sulfate strip โดยนำกระดาษกรองขนาดกว้าง 2-3 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 10 มิลลิเมตร ชุบ iron (II) sulfate TS ทำให้แห้ง แล้วชุบซ้ำในสารละลาย 10% w/v sodium hydroxide ทำให้แห้งอีกครั้งหนึ่ง แล้วนำมาใช้ทันที โดยสอดไว้ในหลอดแก้วซึ่งติดอยู่กับจุกยาง

ใส่ตัวอย่างเมล็ดเทียนแดงบดละเอียดน้ำหนัก 5 กรัม ลงในขวดแก้วขนาด 100 มิลลิลิตร เติมผงสังกะสี 3 กรัม และ dilute sulfuric acid ปริมาตร 30 มิลลิลิตร แล้วปิดจุกยางที่มีหลอดแก้วและ iron (II) sulfate strip สอดอยู่ทันที (ภาพที่ 2) เขย่าเบาๆ ให้เมล็ดเทียนแดงบดละเอียด ผงสังกะสี และ dilute sulfuric acid เข้ากัน แล้วนำไปวางบน water bath โดยเปลี่ยน paper strip ทุกๆ 15 นาที และค่อยๆ หยดน้ำยาที่ประกอบด้วย 6M hydrochloric acid 1 มิลลิลิตร และ iron (III) chloride TS 2-3 หยดลงบน paper strip ที่นำออกมาจากหลอดที่เวลาประมาณ 45 นาที (ทำใน hood)



ภาพที่ 2 ขวดบรรจุตัวอย่างและหลอดแก้วทดสอบพร้อม paper strip

5. การทดสอบปฏิกิริยากับ ninhydrin TS

ตัวอย่างเมล็ดเทียนแดงบดละเอียด 0.5 กรัม ใส่ใน centrifuge tube เติม ethanol ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ปิดจุกเขย่านาน 5 นาที กรองด้วยสำลี นำสารละลายที่กรองได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองเติม ninhydrin TS 2 หยด ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปทำให้ร้อนใน water bath เป็นเวลา 2-3 นาที

6. Thin-layer Chromatographic Test

สารละลายมาตรฐาน

- sinapic acid: ละลาย sinapic acid น้ำหนัก 10 มิลลิกรัม ในน้ำ 0.5 มิลลิลิตร เติม methanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

- lepidine: ปิเปต lepidine 10 ไมโครลิตร เติม methanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

สารละลายตัวอย่าง

1. ตัวอย่างเมล็ดเทียนแดงบดละเอียด 1 กรัม เติม ethanol ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่านาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน สารละลายส่วนใสนำไปทดสอบต่อในข้อ 6.1 และ 6.2

2. ตัวอย่างเมล็ดเทียนแดงบดละเอียด 5 กรัม ใส่ในกรวยแยก เติม petroleum ether (40° - 60°) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เขย่านาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน แยกชั้น petroleum ether ออก นำไปดำเนินการต่อตามวิธีในข้อ 3 ส่วนกากนำไปสกัดด้วย methanol 2 ครั้ง ครั้งละ 25 มิลลิลิตร แต่ละครั้งกรองแล้วนำสารสกัดที่ได้มารวมกัน นำไประเหยแห้งบน water bath ละลาย residue ด้วย dilute hydrochloric acid ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ถ่ายใส่กรวย แยกสกัดด้วย ethyl acetate 2 ครั้ง ครั้งละ 30 มิลลิลิตร รวมชั้น ethyl acetate นำไประเหยแห้งบน water bath ละลาย residue ด้วย methanol ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (สารละลายตัวอย่าง A) ชั้น aqueous ทำให้เป็นด่างด้วย ammonia TS และสกัดด้วย chloroform 2 ครั้ง ครั้งละ 30 มิลลิลิตร รวมชั้น chloroform นำไประเหยแห้งบน water bath ละลาย residue ด้วย methanol ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (สารละลายตัวอย่าง B)

3. ชั้น petroleum ether จากข้อ 2 นำไประเหยแห้งบน water bath ละลาย residue ด้วย methanol ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (สารละลายตัวอย่าง C)

4. ตัวอย่างเมล็ดเทียนแดงบดละเอียด 5 กรัม เติมสารละลายมาตรฐาน lepidine ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง ผสมให้เข้ากัน สกัดด้วย petroleum ether (40° - 60°) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เขย่านาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน แยกชั้น petroleum ether ออก นำไประเหยแห้งบน water bath ละลาย residue ด้วย methanol ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (สารละลายตัวอย่าง D)

6.1 การทดสอบด้วยทางโครมาโตแกรมชนิดผิวบาง (Thin-Layer Chromatography, TLC) ของสารสกัดจากเมล็ดเทียนแดงด้วย ethanol และใช้น้ำยาแยก toluene : ethyl acetate (9:1)

นำสารสกัดจากเมล็ดเทียนแดงด้วย ethanol ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แต้มบนแผ่น TLC ที่ฉาบด้วย silica gel GF254 นำแผ่น TLC ใส่ใน tank ที่มีน้ำยาอิมมัตวประกอบด้วย toluene : ethyl acetate (9:1) ปิดฝา tank เมื่อน้ำยาเคลื่อนที่ได้ระยะทาง 10 เซนติเมตร จากจุดเริ่มต้น นำแผ่น TLC ออกจาก tank ฝั่งให้แห้งใน hood แล้วนำไปตรวจสอบด้วยน้ำยาฟอสฟอรัส anisaldehyde TS แล้วอบที่ 105 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

6.2 การทดสอบด้วยโครมาโตแกรมชนิดผิวบาง (TLC) ของสารสกัดจากเมล็ดเทียนแดงด้วย ethanol และใช้น้ำยาแยก acetic acid : toluene : ether : methanol (18:120:60:1)

นำสารละลายมาตรฐาน lepidine ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และสารสกัดจากเมล็ดเทียนแดงด้วย ethanol ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แต้มบนแผ่น TLC ที่ฉาบด้วย silica gel GF254 นำแผ่น TLC ใส่ใน tank ที่มีน้ำยาอิมมัตวประกอบด้วย acetic acid : toluene : ether : methanol (18:120:60:1) ปิดฝา tank เมื่อน้ำยาเคลื่อนที่

ได้ระยะทาง 10 เซนติเมตร จากจุดเริ่มต้น นำแผ่น TLC ออกจาก tank ฝั่งให้แห้งใน hood แล้วนำไปตรวจสอบด้วย น้ำยาฟันทัน anisaldehyde TS แล้วอบที่ 105 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และตรวจสอบด้วยน้ำยาฟันทัน dragendorff TS

6.3 การทดสอบด้วยโครมาโตแกรมชนิดผิวบาง (TLC) ของสารสกัดจากเมล็ดเทียนแดงเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน **sinapic acid** และใช้น้ำยาแยก **chloroform : methanol (9:1)**

นำสารละลายมาตรฐาน sinapic acid ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และสารละลายตัวอย่าง A ปริมาตร 5 ไมโครลิตร แต้มบนแผ่น TLC ที่ฉาบด้วย silica gel GF254 นำแผ่น TLC ใส่ใน tank ที่มีน้ำยาอิมมัลชันประกอบด้วย chloroform : methanol (9:1) ปิดฝา tank เมื่อน้ำยาเคลื่อนที่ได้ระยะทาง 10 เซนติเมตร จากจุดเริ่มต้น นำแผ่น TLC ออกจาก tank ฝั่งให้แห้งใน hood แล้วนำไปตรวจสอบโดยอ้อมของ iodine ทำการทดสอบต่อโดยการสกัดสาร จากจุด (spot) ที่ Rf value ตรงกับ sinapic acid ด้วย methanol แล้วเปรียบเทียบ ultraviolet spectrum ของสารสกัดดังกล่าวกับสารมาตรฐาน sinapic acid

6.4 การทดสอบด้วยโครมาโตแกรมชนิดผิวบาง (TLC) ของสารสกัดจากเมล็ดเทียนแดง (สารละลาย ตัวอย่าง B) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน **lepidine** และใช้น้ำยาแยก **chloroform : methanol : ammonia (90:9:1)**

นำสารละลายมาตรฐาน lepidine ปริมาตร 2 ไมโครลิตร แต้มบนแผ่น TLC ที่ฉาบด้วย silica gel GF254 และสารละลายตัวอย่าง B ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แต้มบนแผ่น TLC ที่ฉาบด้วย silica gel GF254 ให้เป็นแถบยาว ประมาณ 2 เซนติเมตร นำแผ่น TLC ใส่ใน tank ที่มีน้ำยาอิมมัลชันประกอบด้วย chloroform : methanol : ammonia (90:9:1) ปิดฝา tank เมื่อน้ำยาแยกเคลื่อนที่ได้ระยะทาง 10 เซนติเมตร จากจุดเริ่มต้น นำแผ่น TLC ออกจาก tank ฝั่งให้แห้งใน hood แล้วนำไปตรวจสอบโดยฟันทันด้วยน้ำยา iodoplatinate TS

6.5 การทดสอบด้วยโครมาโตแกรมชนิดผิวบาง (TLC) ของสารสกัดจากเมล็ดเทียนแดง (สารละลาย ตัวอย่าง C และ D) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน **lepidine** และใช้น้ำยาแยก **chloroform : methanol : ammonia (90:9:1)**

นำสารละลายมาตรฐาน lepidine ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และสารละลายตัวอย่าง C ปริมาตร 10 ไมโครลิตร แต้มบนแผ่น TLC ที่ฉาบด้วย silica gel GF254 นำแผ่น TLC ใส่ใน tank ที่มีน้ำยาอิมมัลชันประกอบด้วย chloroform : methanol : ammonia (90:9:1) ปิดฝา tank เมื่อน้ำยาแยกเคลื่อนที่ได้ระยะทาง 10 เซนติเมตร จากจุดเริ่มต้น นำแผ่น TLC ออกจาก tank ฝั่งให้แห้งใน hood แล้วนำไปตรวจสอบโดยฟันทันด้วยน้ำยา iodoplatinate TS

ผล

1. การทดสอบ mucilage เกิดการพองตัวของ mucilage และเมื่อเติม ruthenium red TS mucilage จะเป็นสีชมพู

2. การทดสอบปฏิกิริยากับ acetic potassium iodobismuthate TS เกิดตะกอนสีส้ม

3. การทดสอบปฏิกิริยากับกรดและด่าง

3.1 การทดสอบปฏิกิริยากับ dilute nitric acid เกิดสีน้ำตาลแดง และเมื่อทำให้ร้อนต่อไปสีน้ำตาลแดง จะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

3.2 การทดสอบปฏิกิริยากับ sodium hydroxide TS เกิดสีเหลืองขึ้นทันที

4. การทดสอบอนุมูล cyanide และ sulfide เกิดสีดำบน strip และ strip ที่นำออกมาจากหลอดที่เวลา 45 นาที เมื่อค่อยๆ หยดน้ำยาที่ประกอบด้วย 6M hydrochloric acid 1 มิลลิลิตร และ iron (III) chloride TS 2-3 หยด ลงบน strip สีดำ บน strip จะหายไปพร้อมกับเกิดฟองก๊าซและมีกลิ่น hydrogen sulfide และเกิดสีน้ำเงิน หรือสีเขียวที่ปลาย strip

5. การทดสอบปฏิกิริยากับ ninhydrin TS เกิดสีม่วงน้ำเงิน

6. Thin-layer Chromatographic Test

6.1 ลักษณะทางโครมาโตแกรมของสารสกัดจากเมล็ดเทียนแดงด้วย ethanol โดยใช้ น้ำยาแยก toluene : ethyl acetate (9:1) พบจุดสีม่วงชัดเจนจำนวน 6 ตำแหน่ง (ภาพที่ 3)

6.2 ลักษณะทางโครมาโตแกรมของสารสกัดจากเมล็ดเทียนแดงด้วย ethanol โดยใช้ น้ำยาแยก acetic acid : toluene : ether : methanol (18:120:60:1) เมื่อตรวจสอบด้วยน้ำยาพ่น anisaldehyde TS สารสกัดจากเมล็ดเทียนแดงพบจุดสีม่วงชัดเจนจำนวน 4 ตำแหน่ง และตรวจสอบด้วยน้ำยาพ่น dragendorff TS สารสกัดจากเมล็ดเทียนแดงพบจุดสีม่วง 1 ตำแหน่ง และจุดสีเหลืองเข้มบนพื้นสีเหลืองจำนวน 4 ตำแหน่ง ไม่พบจุดสีส้มที่ตำแหน่งตรงกับ lepidine (ภาพที่ 4)

6.3 ลักษณะทางโครมาโตแกรมของสารสกัดจากเมล็ดเทียนแดงเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน sinapic acid ใช้ น้ำยาแยก chloroform : methanol (9:1) เมื่อตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (ultraviolet) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร พบว่ามีจุดที่บ่งชี้ตำแหน่งตรงกับสารมาตรฐาน sinapic acid (ภาพที่ 5) และให้สีน้ำตาลอมชมพูกับไอของ iodine เหมือนกันกับสารมาตรฐาน sinapic acid (ภาพที่ 6) และ ultraviolet spectrum ของสารสกัดจากจุดดังกล่าวมี maximum absorption ที่ 310 นาโนเมตร ตรงกันกับสารมาตรฐาน sinapic acid (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 3 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากเมล็ดเทียนแดงด้วย ethanol ตรวจสอบด้วยน้ำยาพ่น anisaldehyde TS



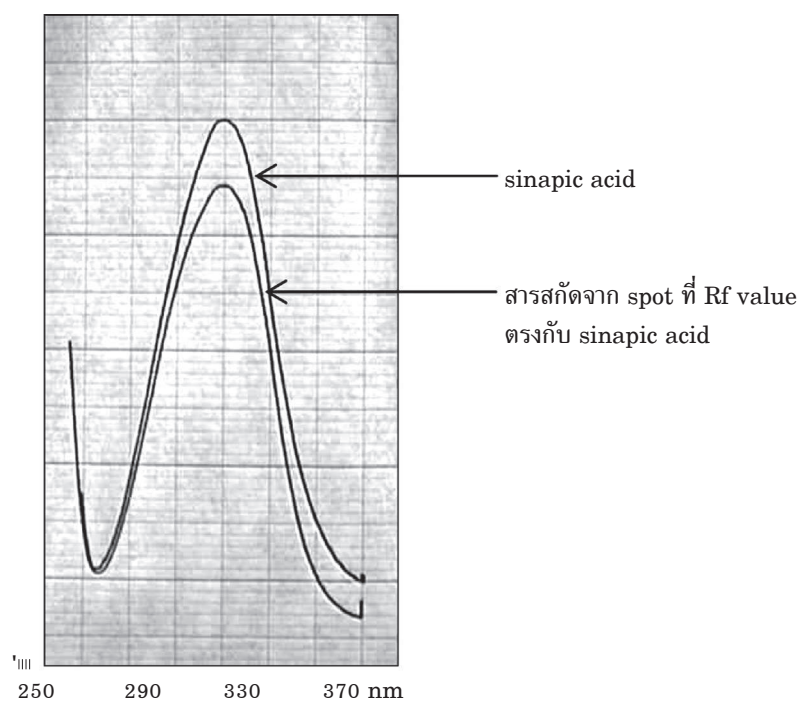
ภาพที่ 4 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากเมล็ดเทียนแดงด้วย ethanol ตรวจสอบด้วยน้ำยาพ่น anisaldehyde TS (ทางซ้ายมือ) และน้ำยาพ่น dragendorff TS (ทางขวามือ)



ภาพที่ 5 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากเมล็ดเทียนแดง (สารละลายตัวอย่าง A) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน sinapic acid ตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร



ภาพที่ 6 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากเมล็ดเทียนแดง (สารละลายตัวอย่าง A) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน sinapic acid ตรวจสอบโดยการอ้งไอของ iodine



ภาพที่ 7 เปรียบเทียบ Ultraviolet spectrum ระหว่าง sinapic acid และสารสกัดจาก spot ที่ Rf value ตรงกับ sinapic acid ในสารสกัดจากเมล็ดเทียนแดง

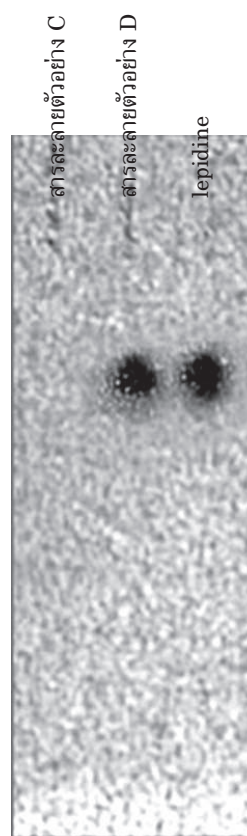
6.4 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากเมล็ดเทียนแดง (สารละลายตัวอย่าง B) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน lepidine ไม่พบจุดที่ตำแหน่งตรงกับ lepidine (ภาพที่ 8)

6.5 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากเมล็ดเทียนแดง (สารละลายตัวอย่าง C) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน lepidine ไม่พบจุดที่ตำแหน่งตรงกับ lepidine (ภาพที่ 9)

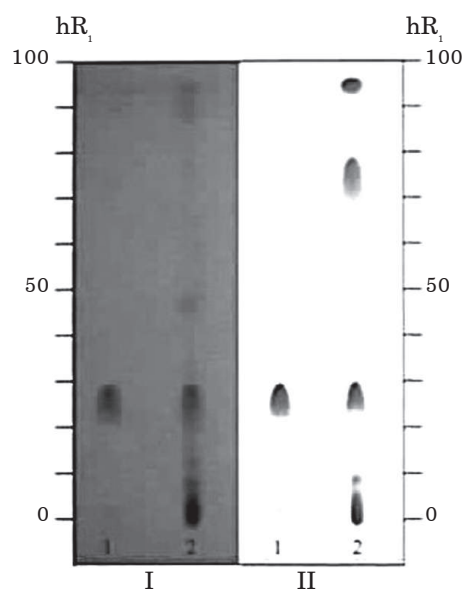
6.6 ลักษณะทางโครมาโตแกรมของสารสกัดจากเมล็ดเทียนแดง (acid fraction) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน sinapic acid โดยใช้ยาแยกที่มีส่วนผสมของ chloroform และ methanol อัตราส่วน 9:1 (ภาพที่ 10) และค่า R_f ที่แสดงไว้ในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia Volume III, 2009) ตารางที่ 1



ภาพที่ 8 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากเมล็ดเทียนแดง (สารละลายตัวอย่าง B) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน lepidine ตรวจสอบด้วยน้ำยาฟันทิโอดิแพลทินาต TS



ภาพที่ 9 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากเมล็ดเทียนแดง (สารละลายตัวอย่าง C และ D) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน lepidine ตรวจสอบด้วยน้ำยาฟันทิโอดิแพลทินาต TS



ภาพที่ 10 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน sinapic acid เปรียบเทียบกับสารสกัดจากเมล็ดเทียนแดง (acid fraction) โดยใช้ยาแยกที่มีส่วนผสมของ Chloroform และ Methanol อัตราส่วน 9:1

- 1 = สารละลายมาตรฐาน sinapic acid
 2 = สารสกัดจากเมล็ดเทียนแดง (acid fraction)
 I = ส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร
 II = อังไอ iodine

ตารางที่ 1 แสดงค่า hRf ของสารสกัดเมล็ดเทียนแดง *Lepidium sativum* L.

จุด	ค่า hRf	การตรวจสอบ	
		แสงอัลตราไวโอเล็ต 254 นาโนเมตร	ตรวจสอบด้วยไอ Iodine
1	7-9	ทึบแสง	สีน้ำตาล
2	12-13	ทึบแสง	-
3*	27-29	ทึบแสง	สีน้ำตาลอมชมพู
4	42-44	-	สีเหลืองอ่อน
5	45-47	ทึบแสง	-
6	75-77	ทึบแสง	สีน้ำตาล
7	86-88	ทึบแสง	สีเหลืองอ่อน
8	94-97	ทึบแสง	สีน้ำตาล

*sinapic acid

วิจารณ์

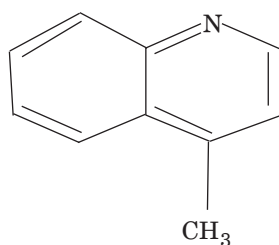
จากข้อมูลทางเภสัชเวทผิวของเทียนแดงประกอบด้วย mucilageous cells ผลการทดสอบพบว่า mucilage ของเทียนแดงจะเกิดการพองตัวเมื่อถูกกับน้ำ และทำปฏิกิริยากับ ruthenium red TS ให้สีชมพู สารอื่นๆ ที่มีรายงานว่าพบในเทียนแดง เช่น สารประกอบในกลุ่ม alkaloids จะทำปฏิกิริยากับ acetic potassium iodobismuthate TS เกิดเป็นตะกอนสีส้มและสารกลุ่ม isothiocyanate ซึ่งจะแตกตัวให้อนุมูล sulfide และ cyanide ทำการทดสอบโดยใช้ paper strip ถ้าเป็นอนุมูล sulfide จะเกิดสีดำที่เกิดขึ้นบน strip ตั้งแต่ 5 นาทีแรกเท่านั้น ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาของอนุมูล sulfide และ sodium hydroxide และ iron (II) sulfate ที่ซึบอยู่บน strip เกิดเป็น iron (II) sulfide เมื่อถูกกรด จึงให้แก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่มีกลิ่นเฉพาะ ส่วนอนุมูล cyanide จะทำปฏิกิริยากับ sodium hydroxide, iron (II) sulfate, iron (III) chloride TS และ hydrochloric acid (Prussian Blue Test) ให้สีเขียวหรือสีน้ำเงินที่ปลาย strip และจะพบบน strip เมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 45 นาที ในการทดสอบจึงต้องเปลี่ยน strip ทุก 15 นาที เพื่อให้มี iron (II) sulfate เพียงพอสำหรับทำปฏิกิริยากับอนุมูล cyanide การเกิดสีเขียวหรือสีน้ำเงินขึ้นอยู่กับปริมาณ cyanide ที่มีในตัวอย่าง ถ้าตัวอย่างมีปริมาณ cyanide น้อยจะได้สีเขียว ถ้าตัวอย่างมีปริมาณ cyanide มากจะได้สีน้ำเงิน นอกจากนี้สารประกอบในเทียนแดงยังทำปฏิกิริยากับ dilute nitric acid เกิดสีน้ำตาลแดง และทำปฏิกิริยากับ ninhydrin TS เกิดสีม่วง น้ำเงิน อาจเกิดจากองค์ประกอบที่เป็นโปรตีนซึ่งพบเป็นปกติในเมล็ดพืช

การตรวจเอกลักษณ์ทางเคมี-ฟิสิกส์ของเทียนแดงโดยวิธี Thin-layer Chromatography (TLC) พบว่าลักษณะทางโครมาโตแกรมของสารสกัดจากเมล็ดเทียนแดงด้วย ethanol โดยใช้ น้ำยาแยก toluene : ethyl acetate (9:1) เมื่อตรวจสอบด้วยน้ำยาพ่น anisaldehyde TS พบจุดสีม่วงชัดเจนจำนวน 6 ตำแหน่ง ส่วนน้ำยาแยก acetic acid : toluene : ether : methanol (18:120:60:1) เมื่อตรวจสอบด้วยน้ำยาพ่น anisaldehyde TS พบจุดสีม่วงชัดเจนจำนวน 4 ตำแหน่ง ซึ่งสามารถใช้บอกลักษณะทางโครมาโตแกรมของสารสกัดจากเมล็ดเทียนแดงได้ ในกรณีที่ไม่มีการมาตรฐานเปรียบเทียบ

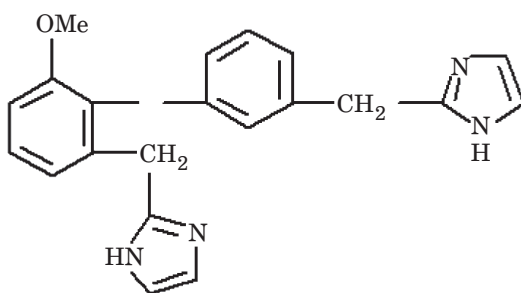
เนื่องจากในเมล็ดเทียนแดงมีปริมาณ edible oil สูง การตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีโดยวิธี Thin-layer Chromatography (TLC) จึงเตรียมสารละลายตัวอย่างโดยการสกัด edible oil ออกก่อนด้วย petroleum ether (40° - 60°) แล้วสกัดตัวอย่างต่อเนื่องนำ acid fraction และ basic fraction ไปทดสอบว่าในเมล็ดเทียนแดงมีสารประกอบ sinapic acid และ lepidine อยู่หรือไม่ โดยการเปรียบเทียบ Thin-layer Chromatogram ของสารสกัดใน acid fraction กับสารมาตรฐาน sinapic acid และสารสกัดใน basic fraction กับสารมาตรฐาน lepidine จากการเปรียบเทียบ Thin-layer Chromatogram ของสารสกัดใน acid fraction กับสารมาตรฐาน sinapic acid พบว่าเมื่อตรวจสอบโดยส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร สารสกัดของเมล็ดเทียนแดงพบจุดทึบแสงที่มีค่า Rf ตรงกับสารมาตรฐาน sinapic acid และให้สีน้ำตาลปนชมพูเมื่ออ้อมของ iodine เช่นเดียวกันกับสารมาตรฐาน sinapic acid เมื่อนำจุดดังกล่าวมาทดสอบต่อโดยการสกัดด้วย methanol และนำไป scan ด้วย UV spectrophotometer พบว่าจุดดังกล่าวมี maximum absorption ที่ 310 nm ตรงกันกับสารมาตรฐาน sinapic acid แสดงว่าสามารถใช้ sinapic acid เป็นสารเปรียบเทียบ (marker) ในการตรวจเอกลักษณ์เมล็ดเทียนแดงโดย Thin-layer Chromatography ได้ส่วนการเปรียบเทียบ Thin-layer Chromatogram ของสารสกัดจากเมล็ดเทียนแดงใน basic fraction กับสารมาตรฐาน lepidine ปรากฏว่าไม่พบ lepidine ในสารสกัดจากเมล็ดเทียนแดงตามรายงานที่ระบุว่าตรวจพบ alkaloids 7 ชนิดในเมล็ดเทียนแดง⁽⁶⁾ แถบที่ติดสีน้ำตาลกับ iodoplatinate TS อาจเป็น alkaloids ชนิดอื่นที่พบในเมล็ดเทียนแดง

จากคุณสมบัติของ lepidine ที่ละลายใน petroleum ether (40° - 60°) ในการทดสอบได้เติมสารมาตรฐาน lepidine ลงในตัวอย่างเมล็ดเทียนแดงบดละเอียด แล้วทำการสกัดด้วย petroleum ether (40° - 60°) โดยทดสอบควบคู่กันไปกับตัวอย่างที่ไม่ได้เติมสารดังกล่าว ผลการศึกษาไม่พบ lepidine ในตัวอย่างที่ศึกษา ในรายงานที่ระบุว่าในเมล็ด

เทียนแดงมี lepidine นั้นระบุว่าเป็น imidazole alkaloid lepidine^(6, 14) ซึ่งมีสูตรโครงสร้างแตกต่างจากสูตรโครงสร้างของ lepidine (4-methylquinoline) ที่ปรากฏใน Merck Index⁽¹³⁾ แต่ผู้ที่อ้างงานวิจัยนี้ต่อมาได้ตัดคำ imidazole alkaloid ออก เหลือแต่ lepidine จึงทำให้เกิดการเข้าใจผิดได้สูตรโครงสร้างของ lepidine (4-methylquinoline) และ imidazole alkaloid lepidine รูปที่ 11 และ 12 ข้อมูลผลการทดสอบทางเคมี-ฟิสิกส์ที่ทำการศึกษานี้จะนำไปประกอบการพิจารณาในหัวข้อการตรวจเอกลักษณ์ทางเคมี-ฟิสิกส์ของเมล็ดเทียนแดง เพื่อบรรจุในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทยต่อไป



ภาพที่ 11 สูตรโครงสร้างของ lepidine (4- methylquinoline) ตามที่ปรากฏใน Merck Index⁽¹³⁾



ภาพที่ 12 สูตรโครงสร้างของ lepidine ในเทียนแดงเป็น imidazole alkaloid^(6, 14)

สรุป

วิธีตรวจเอกลักษณ์ทางเคมี-ฟิสิกส์ของเทียนแดง โดยทำให้เกิดการพองตัวของ mucilage เมื่อถูกน้ำและเกิดสีชมพูกับ ruthenium red TS, การทำปฏิกิริยาเกิดสีกับ dilute nitric acid, sodium hydroxide TS และ ninhydrin TS, การทำปฏิกิริยาเกิดตะกอนกับ acetic potassium iodobismuthate TS, การทดสอบอนุมูล cyanide และ sulfide โดยวิธี paper strip และการเปรียบเทียบ Thin-layer Chromatogram ของสารสกัดกับสารมาตรฐาน sinapic acid สามารถใช้เป็นวิธีตรวจเอกลักษณ์ของสมุนไพรเทียนแดงได้ และในตัวอย่างที่นำมาศึกษาไม่พบ lepidine ที่มีสูตรโครงสร้างเป็น 4-methylquinoline

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณนางสาวสุภาภรณ์ สันธูณิชย์ ที่เป็นผู้ช่วยในการทดสอบวิธีตรวจเอกลักษณ์ทางเคมี-ฟิสิกส์ของเทียนแดง

เอกสารอ้างอิง

1. ชุนโสภิตบรรณลักษณ์. คัมภีร์แพทย์ไทยแผนโบราณ เล่ม 1. พระนคร : สมาคมเภสัชและอายุรเวชโบราณแห่งประเทศไทย วัดสามพระยา; 2505. หน้า 45.
2. ประนอม เดชวิศิษฐ์สกุล, ลัดดาวัลย์ บุญรัตนกรกิจ. การพิสูจน์เอกลักษณ์และจัดทำข้อมูลจำเพาะทางเภสัชเวทของเทียนทั้ง 9 [วิทยานิพนธ์ดีเด่น ปีการศึกษา 2537]. กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2537. หน้า 211-29
3. Plants For A Future Database. *Lepidium sativum*. [online]. 2002; [cited 2002 May 2]; [4 screen]. Available from: URL: http://www.comp.leeds.ac.uk/cgi-bin/pfaf/arr_html?Lepidium+sativum&CAN=LATIND
4. Gil V, MacLeod AJ. Studies on glucosinolate degradation in *Lepidium sativum* seed extracts. *Phytochemistry* 1980; 19(7): 1369-74.
5. นันทวัน บุญยะประภัศร, บรรณาธิการ. สมุนไพรไม้พุ่มบ้าน 2. กรุงเทพฯ : สำนักงานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล; 2541: 403-6.
6. Maier UH, Gundlach H, Zenk MH. Seven imidazole alkaloids from *Lepidium sativum*. *Phytochemistry* 1998; 49(6): 1791-5.
7. Jewwachdamrongkul Y, Dechatiwongse T, Pecharaply D, Bansiddhi J, Kanchanapee P. Identification of Some Thai Medicinal Plants. *Mahidol University J Pharm Sci* 1982; 9(3): 65-73.
8. Department of Medical Sciences. Thai pharmacopoeia Vol. 1 Part 1. Nonthaburi: Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health; 1987.
9. Department of Medical Sciences. Thai pharmacopoeia Vol. 1 Part 2. Nonthaburi: Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health; 1997.
10. Curry A. Poison detection in human organs. 2nd ed. Springfield: Charles C. Thomas; 1969. p. 47-9.
11. เกริก รัตอามา, กิจชัย ศิริวัฒน์, วิไลวรรณ ต้นจ้อย. คู่มือการตรวจสอบสารพิษอย่างง่าย. กองพิษวิทยา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2531. หน้า 51.
12. The Merck Index. 7th ed. New Jersey: Merck & Co., Inc.; 1989. p. 321.
13. Farnsworth NR. Biological and phytochemical screening of plants. *J Pharm Sci* 1966; 55(3): 225-76.
14. Shukla A, Singh CS, Bigoniya P. Phytochemical and CNS activity of *Lepidium sativum* Linn. seeds total alkaloid. *Scholars Research Library Der Pharmacia Lettre* 2011; 3(2): 226-37.

Physico-chemical Identification of THIAN DAENG

Chitra Chaiyawat

Bureau of Drug and Narcotic, Department of Medical Sciences. Tiwanond Road, Nonthaburi 11000 Thailand.

ABSTRACT THIAN DAENG is the dried mature seed of *Lepidium sativum* L. (Garden Cress). It has been prescribed in over 80 traditional medicines registered in Thailand. Various chemical identification tests have been conducted and the following tests were found applicable as methods for identification of THIAN DAENG: swelling test of mucilage in water; color tests with ruthenium red, with nitric acid, with sodium hydroxide, and with ninhydrin; precipitation test with acetic potassium iodobismuthate; tests for cyanide and sulfide ions using paper strip method; and Thin-layer chromatographic fingerprint of THIAN DAENG extract compared to that of sinapic acid. To confirm the presence of lepidine in THIAN DAENG as reported in the previous studies, the Thin-layer chromatography technique was applied. By comparing the chromatogram of the sample extract with that of lepidine, it showed that lepidine was absent in the studied samples. It was also found that the chemical structure of lepidine reported in the previous studies belonged to imidazole alkaloid group which was different from the chemical structure of lepidine existing in Merck index.

Key words: THIAN DAENG, Lepidine, Physico-chemical Identification