



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences



คู่มือ การตรวจวิเคราะห์ด้านเคมี ของสมุนไพร (เล่ม 1)



สถาบันวิจัยสมุนไพร
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences

คู่มือ การตรวจวิเคราะห์ด้านเคมี ของสมุนไพร (เล่ม 1)

สถาบันวิจัยสมุนไพร
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
2564



ที่ปรึกษา

ศิริวรรณ
วารุณี

ชัยสมบูรณ์พันธ์
จิรวัฒนาพงศ์

ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยสมุนไพร

คณะผู้นิพนธ์

สมจิตร
อภิรักษ์
นวรรตน์
สุนันทา
เสกธชตกร
ธิษณิน
นิชาภัทร
สิริกานูจน์
วิไลลักษณ์
สราวุธ

เนียมสกุล
ศักดิ์เพชร
จัดเจน
ศรีโสภณ
บัวเบา
สุภาไชยกิจ
ปัตตะพงศ์
ธนอริยโรจน์
ชื่นนางซี
จันทร์โคตรแก้ว

ผู้ประสานการจัดทำ

พัฒนจักร

การวุฒิ



ข้อมูลทางบรรณานุกรมของสำนักหอสมุดแห่งชาติ

คู่มือการตรวจวิเคราะห์ด้านเคมีของสมุนไพร (เล่ม 1).- - นนทบุรี : สถาบันวิจัยสมุนไพร

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข, 2564.

55 หน้า.

1. พืชสมุนไพร. 2. สารสกัดจากพืช. I. สมจิตร เนียมสกุล. II. ชื่อเรื่อง.

615.321

ISBN 978-616-11-4680-1

พิมพ์ครั้งที่ 1

สิงหาคม 2564

จัดพิมพ์เผยแพร่โดย

สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

กระทรวงสาธารณสุข อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000

<http://mpri.dmsc.moph.go.th>

e-mail : qa.mpri2017@gmail.com

โทรศัพท์ 0-2951-0491 โทรสาร 0-2589-9866



สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีบทบาทและภารกิจในการศึกษาวิจัย พัฒนาการองค์ความรู้และนวัตกรรม เป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงด้านการตรวจวิเคราะห์สมุนไพร โดยให้บริการตรวจวิเคราะห์และรับรองคุณภาพวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรด้วยวิธีที่เป็นมาตรฐาน มีผลการตรวจวิเคราะห์ที่น่าเชื่อถือในการเลือกใช้ผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรที่มีคุณภาพ ทั้งนี้ยังนำระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการตามมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025:2017 Quality Management System (QMS) มาบริหารจัดการห้องปฏิบัติการเพื่อให้งานตรวจวิเคราะห์มีคุณภาพมาตรฐานเป็นที่ยอมรับในระดับสากล คู่มือเล่มนี้มีเนื้อหาสำคัญของวิธีการตรวจวิเคราะห์สมุนไพร จำนวน 10 ชนิด ประกอบด้วยวิธีการตรวจเอกลักษณ์ทางเคมี การตรวจสอบเบื้องต้น การตรวจสอบเพื่อยืนยันผล วิธีการดำเนินการตรวจวิเคราะห์ หาปริมาณความชื้น ปริมาณเถ้ารวม ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด ปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอล และปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ เป็นต้น

หวังเป็นอย่างยิ่งว่า คู่มือการตรวจวิเคราะห์ด้านเคมีของสมุนไพร เล่มนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้องที่จะนำไปใช้เป็นแนวทางในการปฏิบัติงาน และใช้อ้างอิงได้อย่างมีประสิทธิภาพตรงตามวัตถุประสงค์ต่อไป

สิงหาคม 2564

▪ กระชายดำ <i>Kaempferia parviflora</i> Wall. Ex Baker	2
▪ ขมิ้นชัน <i>Curcuma longa</i> L.	4
▪ ชุมเห็ดเทศ <i>Senna alata</i> (L.) Roxb.	8
▪ ดีปลี <i>Piper retrofractum</i> Vahl	12
▪ บัวบก <i>Centella asiatica</i> (L.) Urban	15
▪ พริกไทยดำ <i>Piper nigrum</i> L.	20
▪ ฟ้าทะลายโจร <i>Andrographis paniculata</i> (Burm. f.) Nees	24
▪ มะขามป้อม <i>Phyllanthus emblica</i> L.	30
▪ สมอไทย <i>Terminalia chebula</i> Retz.	33
▪ สมอพิเภก <i>Terminalia bellirica</i> (Gaertn.) Roxb.	39
ภาคผนวก 1 ปริมาณความชื้น	43
ภาคผนวก 2 ปริมาณเถ้า	47
ภาคผนวก 3 ปริมาณสารสกัด	50
ภาคผนวก 4 ปริมาณน้ำมันหอมระเหย	53
ภาคผนวก 5 การเตรียมสารละลาย	55

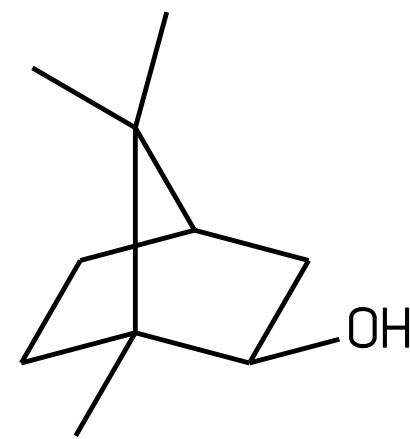


- ชื่อวิทยาศาสตร์ *Kaempferia parviflora* Wall. Ex Baker
- ชื่อพ้อง *Kaempferia rubromarginata* (S. Q. Tong) R. J. Searle, *Stahlianthus rubromarginatus* S. Q. Tong
- วงศ์ Zingiberaceae

▪ สารสำคัญ

1. น้ำมันหอมระเหย

Borneol



Borneol

$C_{10}H_{18}O$

Mol. Wt.: 154.25

C, 77.87; H, 11.76; O, 10.37

▪ เอกลักษณะทางเคมี

1. การตรวจสอบเบื้องต้น

การเตรียมสารละลาย A	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ ชั่งผงสมุนไพร 1 กรัม ลงในขวดก้นกลม ขนาด 50 มิลลิลิตร ▪ เติม ethanol ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ต้มบนอ่างอังไอน้ำ เป็นเวลา 5 นาที และกรอง ▪ นำสารละลายที่กรองได้ (สารละลาย A) มาใช้ในการตรวจสอบ 1 ถึง 4 	
การตรวจสอบ 1	ข้อกำหนด
<ul style="list-style-type: none"> ▪ เติมสารละลาย A ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 25 มิลลิลิตร ▪ เติมผงถ่าน 1 กรัม เขย่าให้เข้ากัน และกรอง ▪ เติมสารละลาย vanillin-sulfuric acid TS1 2 หยด เขย่าให้เข้ากัน และต้มในอ่างอังไอน้ำ เป็นเวลา 2 นาที 	สารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน
การตรวจสอบ 2	ข้อกำหนด
<ul style="list-style-type: none"> ▪ เติมสารละลาย A ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ▪ เติมสารละลาย 5% w/v potassium hydroxide 1 หยด (1) ▪ เติมสารละลาย 20% v/v sulfuric acid 1 หยด (2) 	(1) สารละลายเปลี่ยนเป็นสีเขียว หรือสีน้ำเงิน (2) สารละลายเปลี่ยนเป็นสีแดง
การตรวจสอบ 3	ข้อกำหนด
<ul style="list-style-type: none"> ▪ หยดสารละลาย A 2 หยด ลงบนกระดาษกรอง และรอจนแห้ง ▪ หยดสารละลาย ninhydrin-ethanol TS 1 หยด 	กระดาษกรองเปลี่ยนเป็นสีม่วง
การตรวจสอบ 4	ข้อกำหนด
<ul style="list-style-type: none"> ▪ เติมสารละลาย A ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ▪ ใส่ magnesium ribbon 1 ชิ้น ▪ หยด hydrochloric acid 2 หยด และเขย่า 	สารละลายเปลี่ยนเป็นสีแดง

2. การตรวจสอบเพื่อยืนยันผล

2.1. การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

2.1.1. ชั่งผงสมุนไพร 0.5 กรัม ลงในขวดก้นกลม ขนาด 25 มิลลิลิตร

2.1.2. เติม methanol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร สกัดโดยวิธี reflux เป็นเวลา 5 นาที และกรอง

2.2. ระบบ TLC

หัวข้อ	รายละเอียด	วิธีดำเนินการ
เฟสคงที่	แผ่นกระดาษสารดูดซับ ประเภท silica gel GF ₂₅₄	
เฟสเคลื่อนที่	n-Hexane : ethyl acetate : formic acid (60 : 30 : 5)	1) ผสมและเทเฟสเคลื่อนที่ ลงในถัง TLC ให้มีความสูง ประมาณ 1 เซนติเมตร 2) ปิดฝาดัง TLC ให้สนิท ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 1 ชั่วโมง
ปริมาตรที่ใช้	5 ไมโครลิตร	3) Spot สารละลายที่เตรียมได้ (2.1) ลงบนเฟสคงที่
ระยะทางของ เฟสเคลื่อนที่	10 เซนติเมตร	4) วางเฟสคงที่ในแนวระดับ ในถัง TLC ที่เตรียมไว้ 5) ปลอ่ยให้เฟสเคลื่อนที่ซึมขึ้นไปตามผิวของเฟสคงที่ สูง 10 เซนติเมตร
การตรวจวัด	(i) UV ₂₅₄ (ii) UV ₃₆₆ (iii) Natural product (NP) TS; polyethylene glycol (PEG) TS with UV ₃₆₆	6) นำเฟสคงที่ออกจากถัง TLC ตั้งทิ้งไว้จนแห้ง 7) ส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร 8) ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ผ่านขณะร้อนด้วยสารละลาย NP TS และ ผ่านทับด้วยสารละลาย PEG TS ส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร

2.3. ผล TLC

Spot	ค่า R _f	ผลการตรวจวัด		
		(i)	(ii)	(iii)
1	17-26	น้ำเงิน	น้ำเงิน	น้ำเงิน
2	29-35	น้ำเงิน	น้ำเงิน	น้ำเงิน
3	36-40	น้ำเงิน	น้ำเงิน	น้ำเงิน
4	41-46	น้ำเงิน	น้ำเงิน	น้ำเงิน
5	46-52	น้ำเงิน	น้ำเงิน	น้ำเงิน
6	64-69	ทึบแสง	-	เหลือง
7	74-78	ทึบแสง	-	เหลือง-เขียว
8	78-82	ทึบแสง	-	เหลือง
9	83-86	ทึบแสง	-	เหลือง
10	87-90	ทึบแสง	-	ส้ม

- ปริมาณความชื้น (ภาคผนวก 1B)
ต้องไม่เกินร้อยละ 10.0 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก
- ปริมาณเถ้ารวม (ภาคผนวก 2.1)
ต้องไม่เกินร้อยละ 6.0 โดยน้ำหนัก
- ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (ภาคผนวก 2.2)
ต้องไม่เกินร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนัก
- ปริมาณสารสกัดด้วย ethanol (ภาคผนวก 3A) ตัวทำละลาย คือ 95% v/v ethanol
ต้องไม่น้อยกว่าร้อยละ 8.0 โดยน้ำหนัก
- ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ (ภาคผนวก 3A) ตัวทำละลาย คือ น้ำที่อิมัลชันด้วย chloroform
ต้องไม่น้อยกว่าร้อยละ 17.0 โดยน้ำหนัก

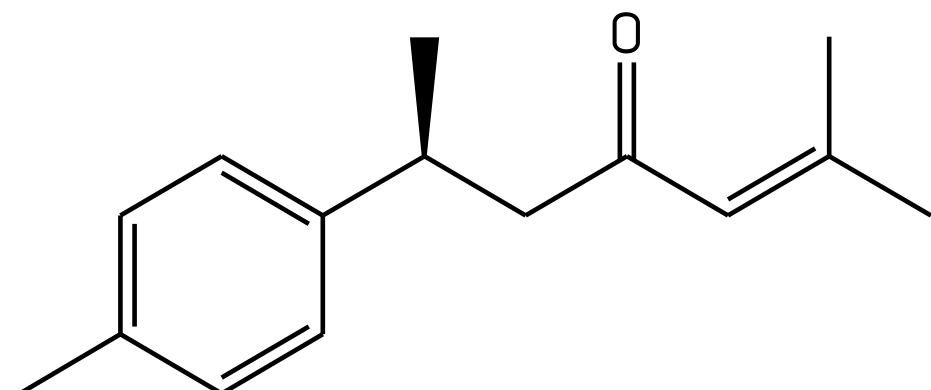


- ชื่อวิทยาศาสตร์ *Curcuma longa* L.
- ชื่อพ้อง *Curcuma domestica* Valetton
- วงศ์ Zingiberaceae

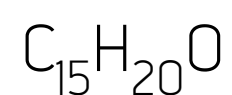
▪ สารสำคัญ

1. น้ำมันหอมระเหย

Turmerone และ zingiberene

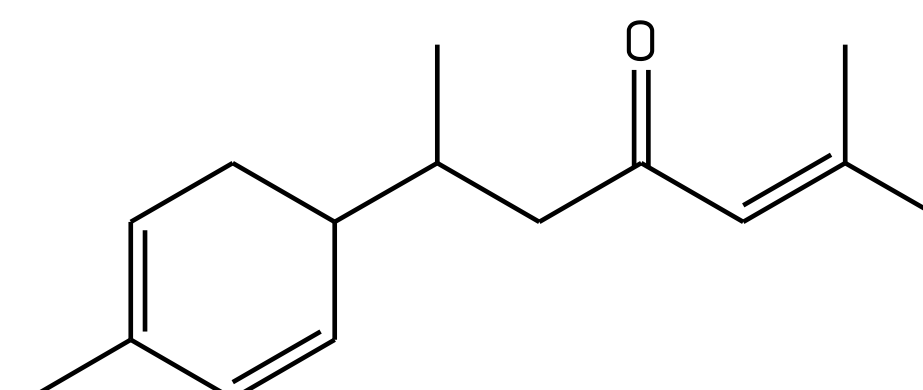


(+)-ar-Turmerone

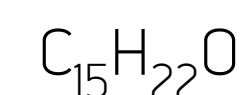


Mol. Wt.: 216.32 g/mol

C, 83.28; H, 9.32; O, 7.40

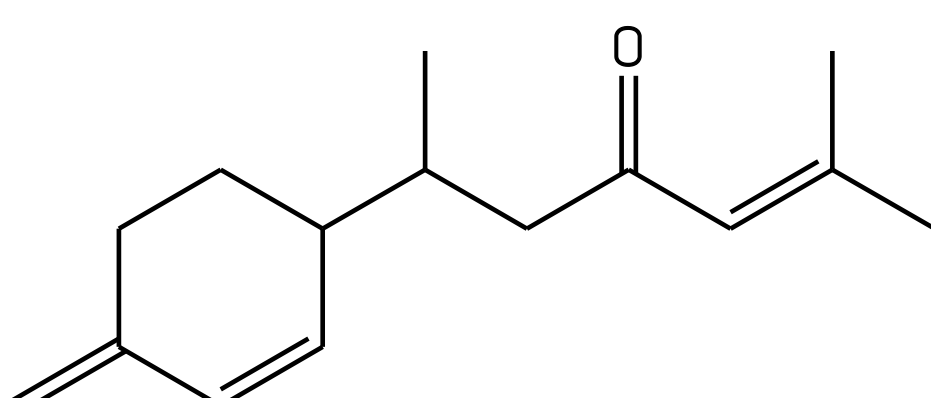


α -Turmerone

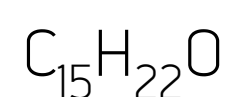


Mol. Wt.: 218.33

C, 82.52; H, 10.16; O, 7.33

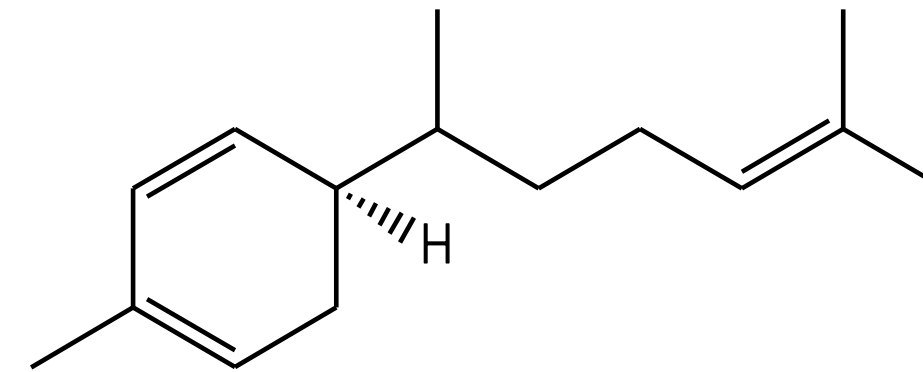


β -Turmerone

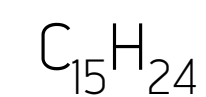


Mol. Wt.: 218.33

C, 82.52; H, 10.16; O, 7.33



α -Zingiberene

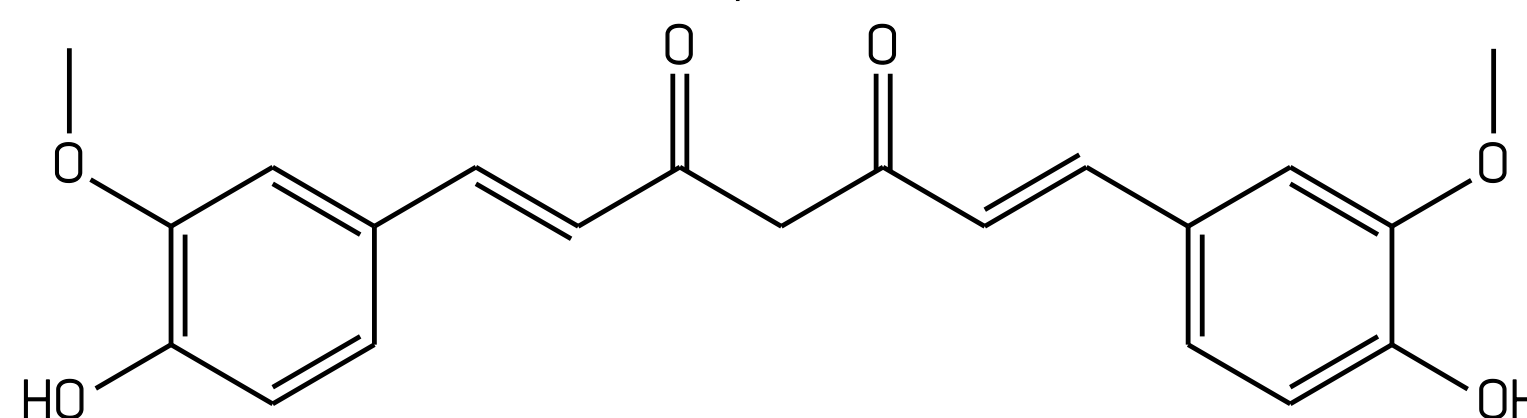


Mol. Wt.: 204.35

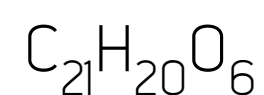
C, 88.16; H, 11.84

2. สารกลุ่ม curcuminoids

Curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin

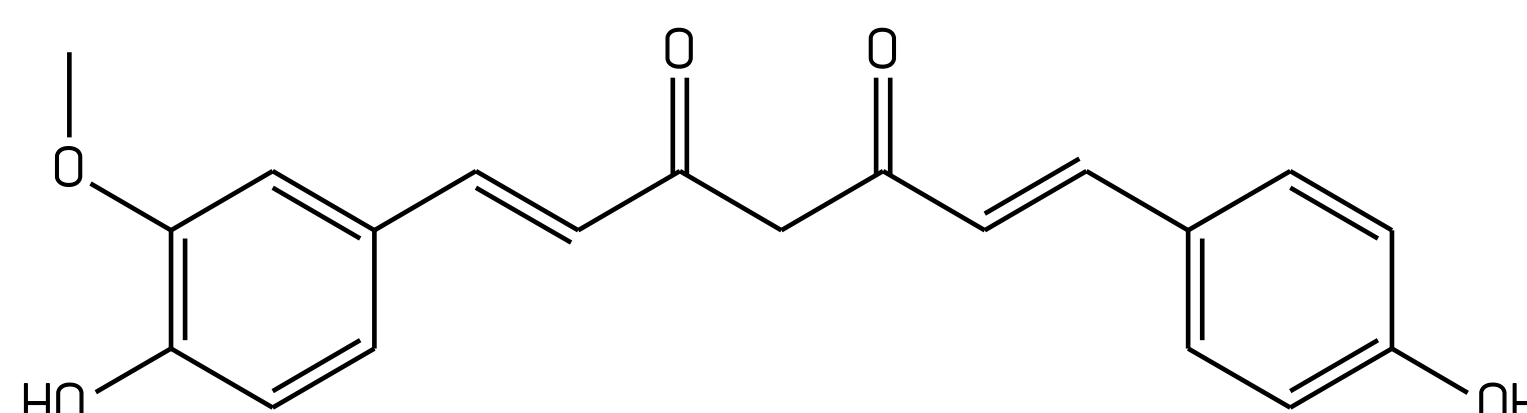


Curcumin

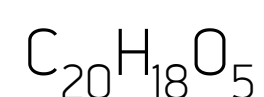


Mol. Wt.: 368.38

C, 68.47; H, 5.47; O, 26.06

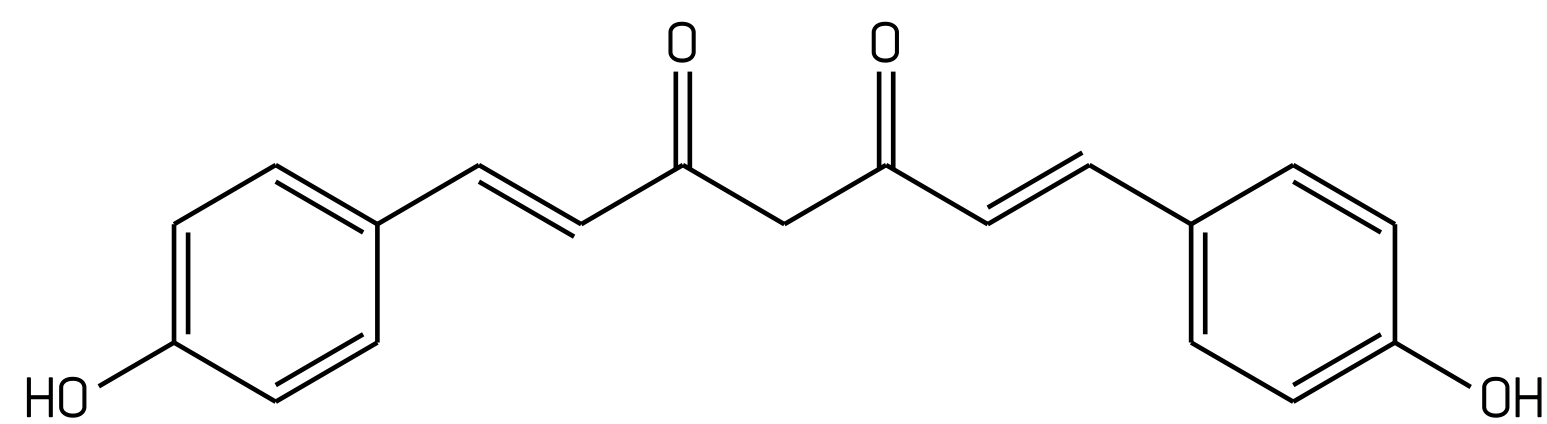


Desmethoxycurcumin



Mol. Wt.: 338.35

C, 70.99; H, 5.36; O, 23.64



Bisdesmethoxycurcumin
 $C_{19}H_{16}O_4$
 Mol. Wt.: 308.33
 C, 74.01; H, 5.23; O, 20.76

▪ เอกลักษณ์ทางเคมี

1. การตรวจสอบเบื้องต้น

การตรวจสอบ	ข้อกำหนด
<ul style="list-style-type: none"> ▪ ชั่งผงสมุนไพร 10 มิลลิกรัม ลงในหลอดทดลอง ▪ เติม acetic anhydride ปริมาตร 2 มิลลิตร เขย่าให้เข้ากัน ▪ เติม sulfuric acid 3-4 หยด เขย่าให้เข้ากัน ส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร 	สารละลายเรืองแสงสีแดงเลือด

2. การตรวจสอบเพื่อยืนยันผล

2.1. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

2.1.1. ละลายสารมาตรฐาน curcumin 1 มิลลิกรัม ใน methanol ปริมาตร 1 มิลลิตร

2.2. การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

2.2.1. ชั่งผงสมุนไพร 1 กรัม ลงในหลอดทดลองชนิดที่มีฝาปิด

2.2.2. เติม methanol ปริมาตร 3 มิลลิตร ปิดฝาขวดให้สนิท สกัดโดยวิธีการหมัก เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และกรอง

2.3. ระบบ TLC

หัวข้อ	รายละเอียด	วิธีดำเนินการ
เฟสคงที่	แผ่นกระดาษสารดูดซับ ประเภท silica gel G	
เฟสเคลื่อนที่	Benzene : chloroform : ethanol (49 : 49 : 2)	1) ผสมและเทเฟสเคลื่อนที่ ลงในถัง TLC ให้มีความสูง ประมาณ 1 เซนติเมตร 2) ปิดฝาดัง TLC ให้สนิท ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 1 ชั่วโมง
ปริมาตรที่ใช้	3 ไมโครลิตร (สารละลาย มาตรฐาน) 5 ไมโครลิตร (สารละลาย ตัวอย่าง)	3) Spot สารละลายที่เตรียมได้ (2.1 และ 2.2) ลงบน เฟสคงที่ในแนวระดับเดียวกัน
ระยะทางของ เฟสเคลื่อนที่	17 เซนติเมตร	4) วางเฟสคงที่ในแนวระดับ ในถัง TLC ที่เตรียมไว้ 5) ปลอ่ยให้เฟสเคลื่อนที่ซึมขึ้นไปตามผิวของเฟสคงที่ สูง 17 เซนติเมตร
การตรวจวัด	(i) UV ₃₆₆ (ii) 10% w/v phosphomolybdic acid ใน ethanol	6) นำเฟสคงที่ออกจากถัง TLC ตั้งทิ้งไว้จนแห้ง 7) ส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร 8) พ่นด้วยสารละลาย 10% w/v phosphomolybdic acid ใน ethanol และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

2.4. ผล TLC

Spot	ค่า R _f	ผลการตรวจวัด	
		(i)	(ii)
1	5-8	น้ำตาลอ่อน	น้ำตาล
2 (bisdesmethoxycurcumin)	11-15	เหลือง-น้ำตาล	ส้ม
3 (desmethoxycurcumin)	17-20	เหลือง-น้ำตาล	ส้ม-น้ำตาล
4	21-24	น้ำเงิน-เขียว	น้ำเงิน
5 (curcumin)	28-34	เหลือง-น้ำตาล	ส้ม-น้ำตาล
6	35-38	น้ำเงิน-เขียว	น้ำเงิน
7	39-42	เหลือง	เหลืองอ่อน
8	44-46	-	น้ำเงิน
9	48-51	-	น้ำเงิน
10 (curcumol)	52-53	-	น้ำเงิน
11	57-60	-	น้ำเงิน
12	62-66	-	น้ำเงิน
13	71-74	-	น้ำเงิน
14 (<i>d</i> -turmerone)	80-85	-	น้ำเงิน
15 (<i>ar</i> -curcumene)	87-90	-	น้ำเงิน

- ปริมาณความชื้น (ภาคผนวก 1B)
ต้องไม่เกินร้อยละ 10.0 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก
- ปริมาณเถ้ารวม (ภาคผนวก 2.1)
ต้องไม่เกินร้อยละ 8.0 โดยน้ำหนัก
- ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (ภาคผนวก 2.2)
ต้องไม่เกินร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนัก
- ปริมาณสารสกัดด้วย ethanol (ภาคผนวก 3A) ตัวทำละลาย คือ 95% v/v ethanol
ต้องไม่น้อยกว่าร้อยละ 10.0 โดยน้ำหนัก
- ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ (ภาคผนวก 3A) ตัวทำละลาย คือ น้ำที่อิมัลชันด้วย chloroform
ต้องไม่น้อยกว่าร้อยละ 9.0 โดยน้ำหนัก
- ปริมาณน้ำมันหอมระเหย (ภาคผนวก 4) ใช้ผงสมุนไพร 10 กรัม
ต้องไม่น้อยกว่าร้อยละ 6.0 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก
- ปริมาณ curcuminoids
ต้องไม่น้อยกว่าร้อยละ 5.0 โดยน้ำหนัก
 1. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน
 - 1.1. Stock standard solution
 - 1.1.1. ชั่งสารมาตรฐานสมมูลกับ curcumin 25 มิลลิกรัม ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 250 มิลลิลิตร
 - 1.1.2. ละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol
 - 1.2. Working standard solution
 - 1.2.1. ตูตสารละลาย stock standard solution ปริมาตร 1, 2, 3, 4, 5, และ 6 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร แต่ละขวด ตามลำดับ
 - 1.2.2. ปรับปริมาตรด้วย methanol

2. การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

- 2.1. ชั่งผงสมุนไพร 0.3 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ชนิดมีฝาปิด ขนาด 25 มิลลิลิตร
- 2.2. เติม methanol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปิดฝาขวดให้สนิท สกั้ดโดยวิธีการหมัก เป็นเวลา 6 ชั่วโมง
- 2.3. ดูดสารละลายใสเหนือตะกอน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วย methanol
- 2.4. ดูดสารละลายที่ได้อ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วย methanol

3. ระบบ UV-Vis spectrophotometer

หัวข้อ	รายละเอียด
สารละลายเปรียบเทียบ	Methanol
ความยาวคลื่น	420 นาโนเมตร

4. การคำนวณ

$$\text{Curcuminoids} = \frac{C_{\text{Sample}} \times V_{\text{Sample}} \times 10^{-3}}{W_{\text{Sample}}} \times 100$$

โดยที่

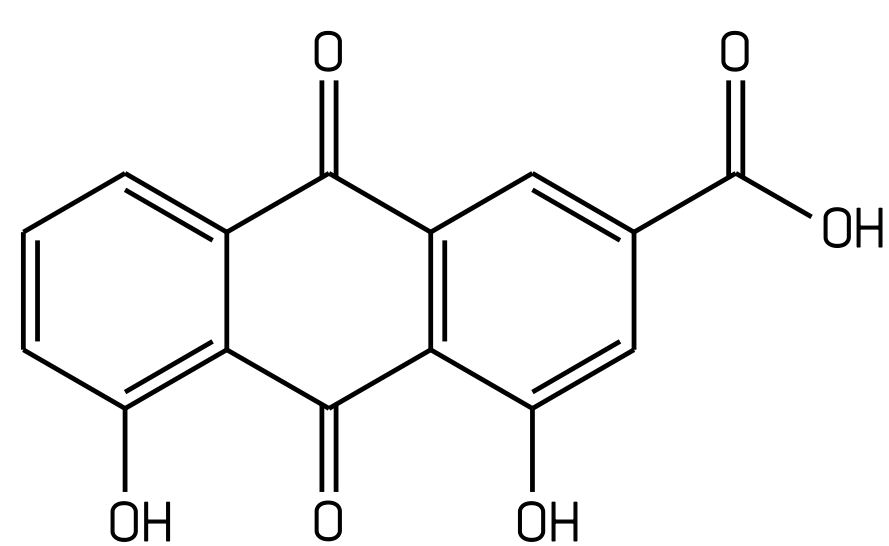
- Curcuminoids คือ ปริมาณ curcuminoids (ร้อยละโดยน้ำหนัก)
- C_{Sample} คือ ความเข้มข้นของ curcumin ในสารละลายตัวอย่าง (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
- V_{Sample} คือ ปริมาตรของสารละลายตัวอย่าง (มิลลิลิตร)
- W_{Sample} คือ น้ำหนักของผงสมุนไพร (มิลลิกรัม)

- ชื่อวิทยาศาสตร์ *Senna alata* (L.) Roxb.
- ชื่อพ้อง *Cassia alata* L., *Herpetica alata* (L.) Raf., *Cassia bracteata* L. f.
- วงศ์ Leguminosae

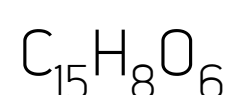
▪ สารสำคัญ

1. สารกลุ่ม anthraquinones

Rhein, rhein-8-glucoside, emodin, aloe-emodin

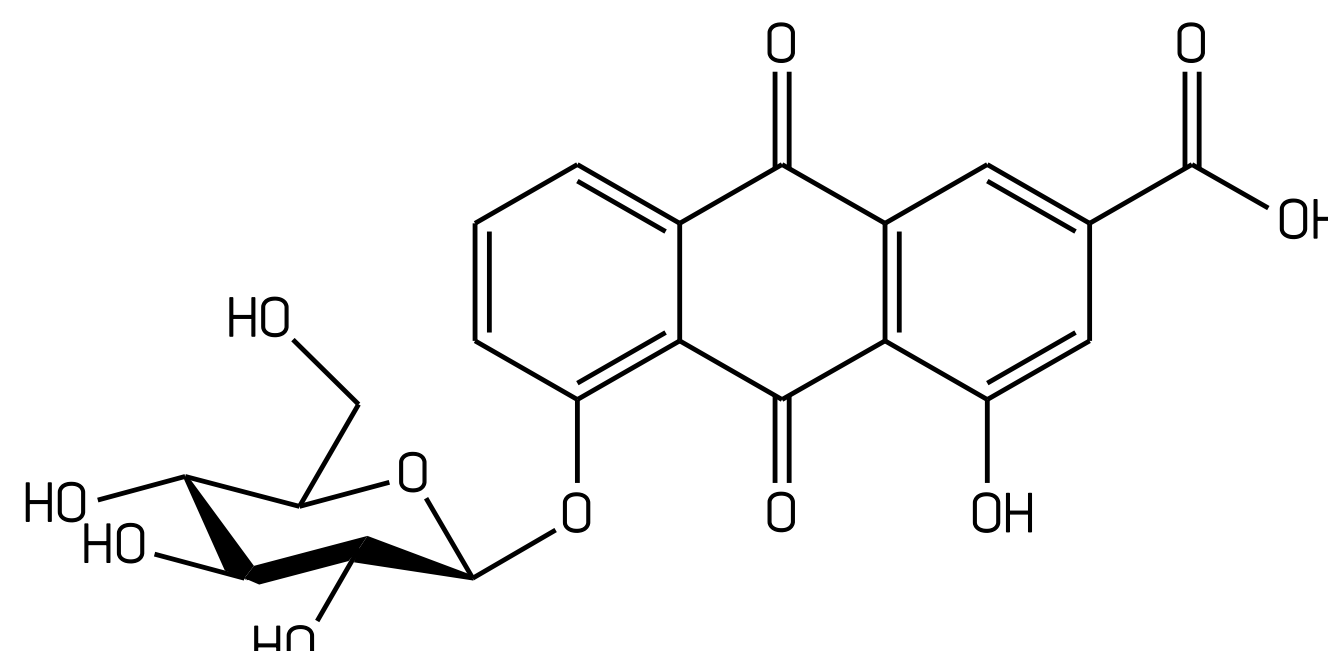


Rhein

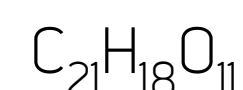


Mol. Wt.: 284.22

C, 63.39; H, 2.84; O, 33.78

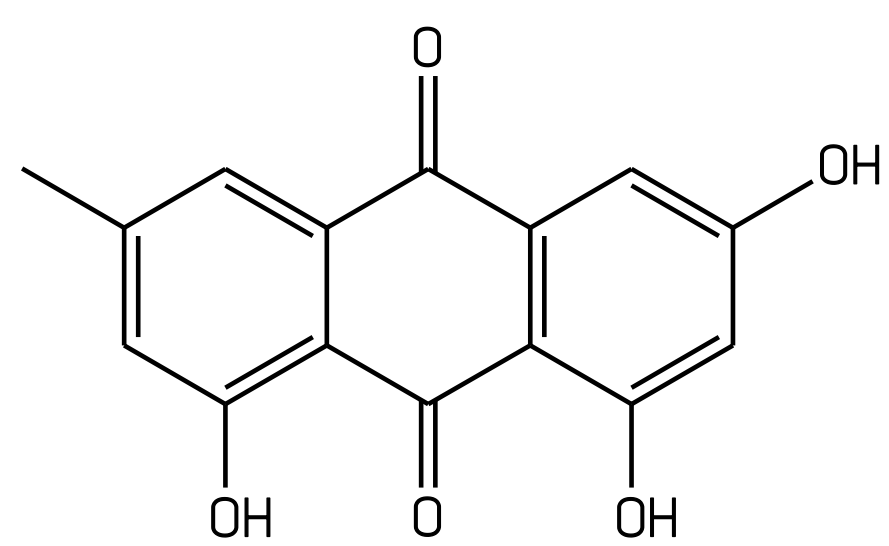


Rhein-8-glucoside

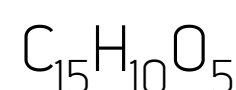


Mol. Wt.: 446.36

C, 56.51; H, 4.06; O, 39.43

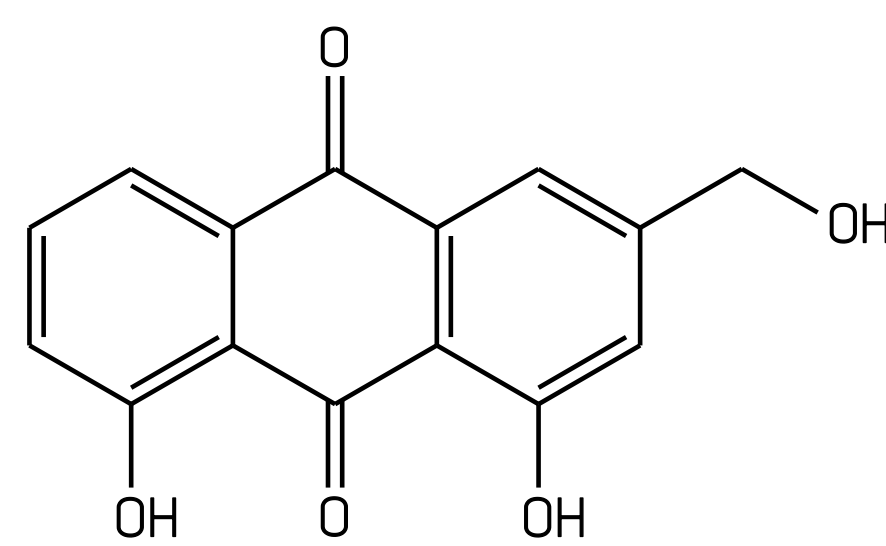


Emodin

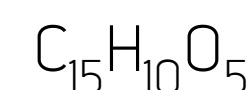


Mol. Wt.: 270.24

C, 66.67; H, 3.73; O, 29.60



Aloe-emodin



Mol. Wt.: 270.24

C, 66.67; H, 3.73; O, 29.60

▪ เอกลักษณ์ทางเคมี

1. การตรวจสอบเบื้องต้น

การตรวจสอบ	ข้อกำหนด
<ul style="list-style-type: none"> ▪ ชั่งผงสมุนไพร 0.1 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 50 มิลลิลิตร ▪ เติม 2M hydrochloric acid ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ต้มบนอ่างอังไอน้ำ เป็นเวลา 15 นาที กรองผ่านสำลี ใสลงในกรวยแยก ตั้งทิ้งไว้จน อุณหภูมิสารละลายเท่ากับอุณหภูมิห้อง ▪ เติม ether ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และสกัดเก็บชั้น ether (ชั้นบน) ▪ เติมสารละลาย ammonia TS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และเขย่า 	สารละลายชั้นล่างเปลี่ยนเป็นสีแดง

2. การตรวจสอบเพื่อยืนยันผล

2.1. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

2.1.1. ละลายสารมาตรฐาน rhein 1 มิลลิกรัม ใน methanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

2.2. การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

2.2.1. สารละลายตัวอย่าง A

- 1) ชั่งผงสมุนไพร 0.1 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 100 มิลลิลิตร
- 2) เติม chloroform ปริมาตร 50 มิลลิลิตร สกัดโดยวิธี reflux เป็นเวลา 15 นาที และกรอง
- 3) นำสารละลายที่กรองได้ มาระเหยแห้ง
- 4) ละลายส่วนที่เหลือจากการระเหยด้วย chloroform ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

2.2.2. สารละลายตัวอย่าง B

- 1) เติม 2M hydrochloric acid ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงในภาชนะที่เหลือจากการเตรียมสารละลายตัวอย่าง A ต้มบนอ่างอังไอน้ำ เป็นเวลา 15 นาที
- 2) กรองผ่านสำลี ละคร้อน ลงในกรวยแยก ขนาด 100 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิสารละลายเท่ากับอุณหภูมิห้อง
- 3) สกัดด้วย ether ปริมาตร 20 มิลลิลิตร
- 4) นำสารสกัดชั้น ether (ชั้นบน) ที่ได้ มาระเหยแห้ง
- 5) ละลายส่วนที่เหลือจากการระเหยด้วย ether ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

2.3. ระบบ TLC

หัวข้อ	รายละเอียด	วิธีดำเนินการ
เฟสคงที่	แผ่นกระดาษสารดูดซับ ประเภท silica gel G	
เฟสเคลื่อนที่	Petroleum ether (40-60 องศาเซลเซียส) : ethyl acetate : anhydrous formic acid (75 : 25 : 1)	1) ผสมและเทเฟสเคลื่อนที่ ลงในถัง TLC ให้มีความสูงประมาณ 1 เซนติเมตร 2) ปิดฝาดัง TLC ให้สนิท ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 1 ชั่วโมง
ปริมาตรที่ใช้	5 ไมโครลิตร	3) Spot สารละลายที่เตรียมได้ (2.1 และ 2.2) ลงบนเฟสคงที่ในแนวระดับเดียวกัน
ระยะทางของเฟสเคลื่อนที่	10 เซนติเมตร	4) วางเฟสคงที่ในแนวระดับ ในถัง TLC ที่เตรียมไว้ 5) ปลอ่ยให้เฟสเคลื่อนที่ซึมขึ้นไปตามผิวของเฟสคงที่ สูง 10 เซนติเมตร
การตรวจวัด	(i) UV ₃₆₆ (ii) Ammonia vapour	6) นำเฟสคงที่ออกจากถัง TLC ตั้งทิ้งไว้จนแห้ง 7) ส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร 8) อังไของ ammonia

2.4. ผล TLC

Solution	Spot	ค่า R _f	ผลการตรวจวัด	
			(i)	(ii)
A	1	4-8	-	เขียวอ่อน
	2	25-28	-	เหลือง
	3	29-32	-	เหลือง
	4 (rhein)	34-38	ส้ม	แดง
	5	53-58	-	เขียวอ่อน
	6	60-64	-	เขียวอ่อน
	7	74-77	-	เขียวอ่อน
	8	78-80	-	เขียวอ่อน
B	1	2-4	-	น้ำตาลอ่อน
	2	25-28	-	เหลือง
	3 (rhein)	34-38	ส้ม	แดง

- ปริมาณความชื้น (ภาคผนวก 1A)
ต้องไม่เกินร้อยละ 11.0 โดยน้ำหนัก

- ปริมาณเด็กรวม (ภาคผนวก 2.1)
ต้องไม่เกินร้อยละ 9.0 โดยน้ำหนัก
- ปริมาณเด็กที่ไม่ละลายในกรด (ภาคผนวก 2.2)
ต้องไม่เกินร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนัก
- ปริมาณสารสกัดด้วย 50% v/v ethanol (ภาคผนวก 3A) ตัวทำละลาย คือ 50% v/v ethanol
ต้องไม่น้อยกว่าร้อยละ 21.0 โดยน้ำหนัก
- ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ (ภาคผนวก 3A) ตัวทำละลาย คือ น้ำที่อิมัลชันด้วย chloroform
ต้องไม่น้อยกว่าร้อยละ 18.0 โดยน้ำหนัก
- ปริมาณ hydroxyanthracene derivatives
ต้องไม่น้อยกว่าร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนัก
 1. การเตรียมสารละลายตัวอย่าง
 - 1.1. ชั่งผงสมุนไพร 150 มิลลิกรัม ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 50 มิลลิลิตร
 - 1.2. เติมน้ำ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ต้มบนอ่างอังไอน้ำ เป็นเวลา 15 นาที นำมาแยกตะกอน โดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยง
 - 1.3. นำสารละลายใสเหนือตะกอน ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่ลงในกรวยแยก ขนาด 150 มิลลิลิตร
 - 1.4. เติม 2M hydrochloric acid ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร
 - 1.5. เติม chloroform ปริมาตร 15 มิลลิลิตร และสกัดทิ้งชั้น chloroform จำนวน 3 ครั้ง
 - 1.6. นำสารละลายชั้นน้ำ มาเติม sodium hydrogen carbonate 100 มิลลิกรัม เขย่า เป็นเวลา 3 นาที และนำมาแยกตะกอน โดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยง
 - 1.7. ดูดสารละลายใสเหนือตะกอน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 100 มิลลิลิตร
 - 1.8. เติมสารละลาย 10.5% w/v iron(III) chloride ผสมให้เข้ากัน ต้มพร้อมเขย่าในอ่างอังไอน้ำ เป็นเวลา 20 นาที และตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิสารละลายเท่ากับอุณหภูมิห้อง
 - 1.9. เติม hydrochloric acid ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต้มพร้อมเขย่าในอ่างอังไอน้ำ เป็นเวลา 20 นาที และตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิสารละลายเท่ากับอุณหภูมิห้อง
 - 1.10. เทสารละลายทั้งหมดลงในกรวยแยก ขนาด 150 มิลลิลิตร
 - 1.11. เติม ether ปริมาตร 25 มิลลิลิตร และสกัดเก็บชั้น ether จำนวน 3 ครั้ง
 - 1.12. รวมสารละลายชั้น ether (ชั้นบน) ใส่ลงในกรวยแยก ขนาด 150 มิลลิลิตร
 - 1.13. เติมน้ำ ปริมาตร 15 มิลลิลิตร และสกัดทิ้งชั้นน้ำ จำนวน 2 ครั้ง
 - 1.14. รวมสารละลายชั้น ether (ชั้นบน) ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วย ether
 - 1.15. ดูดสารละลาย ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ลงในถ้วยระเหย และระเหยแห้ง
 - 1.16. ละลายส่วนที่เหลือจากการระเหย ด้วยสารละลาย 0.5% w/v magnesium acetate ใน methanol ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร
 - 1.17. ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย 0.5% w/v magnesium acetate ใน methanol

2. ระบบ UV-Vis spectrophotometer

หัวข้อ	รายละเอียด
สารละลายเปรียบเทียบ	0.5% w/v magnesium acetate ใน methanol
ความยาวคลื่น	515 นาโนเมตร

3. การคำนวณ

$$\text{Hydroxyanthracene} = \frac{A_{\text{Sample}} \times 0.4283}{W_{\text{Sample}}}$$

โดยที่

Hydroxyanthracene

คือ ปริมาณ hydroxyanthracene derivatives (ร้อยละโดยน้ำหนัก)

A_{Sample}

คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ anthraquinones ในสารละลายตัวอย่าง

W_{Sample}

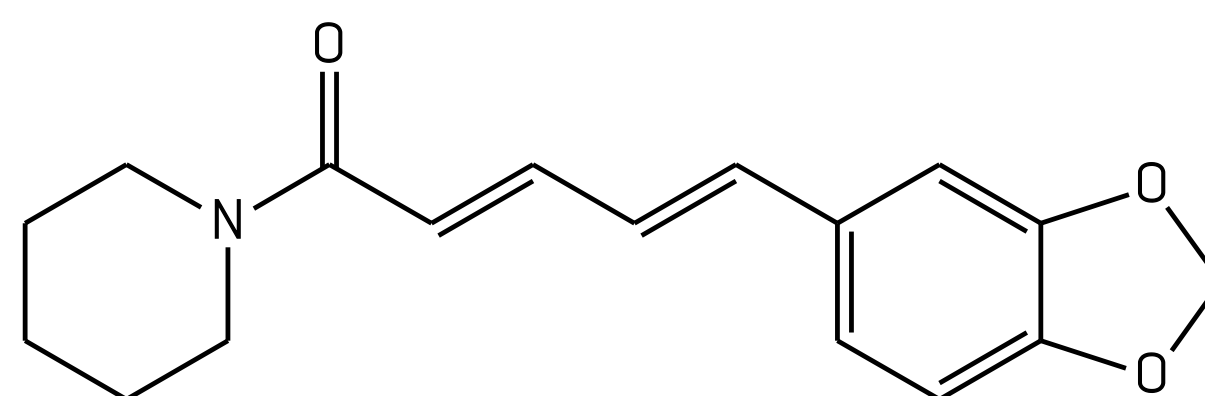
คือ น้ำหนักของผงสมุนไพร (กรัม)

- ชื่อวิทยาศาสตร์ *Piper retrofractum* Vahl
- ชื่อพ้อง *Piper chaba* Hunter
- วงศ์ Piperaceae

▪ สารสำคัญ

1. สารกลุ่ม alkaloids

Piperine



Piperine

$C_{17}H_{19}NO_3$

Mol. Wt.: 285.34

C, 71.56; H, 6.71; N, 4.91; O, 16.82

▪ เอกลักษณะทางเคมี

1. การตรวจสอบเบื้องต้น

การเตรียมสารละลาย A	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ ชั่งผงสมุนไพร 1 กรัม ลงในขวดก้นกลม ขนาด 50 มิลลิลิตร ▪ เติม ethanol ปริมาตร 25 มิลลิลิตร สก๊ตโดยวิธี reflux เป็นเวลา 10 นาที และกรอง ▪ นำสารละลายที่กรองได้ (สารละลาย A) มาใช้ในการตรวจสอบ 1 ถึง 3 	
การตรวจสอบ 1	ข้อกำหนด
<ul style="list-style-type: none"> ▪ เติมสารละลาย A ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ▪ เติมสารละลาย ninhydrin TS 1-2 หยด ต้มบนอ่างอังไอน้ำ เป็นเวลา 2-3 นาที 	สารละลายเปลี่ยนเป็นสีม่วง
การตรวจสอบ 2	ข้อกำหนด
<ul style="list-style-type: none"> ▪ เติมสารละลาย A ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในถ้วยระเหย และระเหยแห้ง ▪ ละลายส่วนที่เหลือจากการระเหย ด้วย acetic anhydride ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ▪ เติม sulfuric acid ปริมาตร 1 มิลลิลิตร อย่างช้า ๆ 	เกิดวงแหวนสีน้ำตาลระหว่างรอยต่อของสารละลายทั้งสองชั้น
การตรวจสอบ 3	ข้อกำหนด
<ul style="list-style-type: none"> ▪ เติมสารละลาย A ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ระเหยให้สารละลายเข้มข้นขึ้น ▪ เติม Marquis reagent 1-2 หยด 	สารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดง
การตรวจสอบ 4	ข้อกำหนด
<ul style="list-style-type: none"> ▪ ชั่งผงสมุนไพร 0.1 กรัม ลงในหลอดทดลอง ▪ เติม sulfuric acid ปริมาตร 1 มิลลิลิตร 	สารละลายเปลี่ยนเป็นสีแดงเข้ม และค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดง และสีน้ำตาล ตามลำดับ

2. การตรวจสอบเพื่อยืนยันผล

2.1. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

2.1.1. ละลายสารมาตรฐาน piperine 2 มิลลิกรัม ใน chloroform ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

2.2. การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

2.2.1. ชั่งผงสมุนไพร 0.5 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 50 มิลลิลิตร

2.2.2. เติม chloroform ปริมาตร 25 มิลลิลิตร สก๊ตโดยวิธีการหมัก เป็นเวลา 15 นาที และกรอง

2.2.3. นำสารละลายที่กรองได้ มาระเหยแห้ง

2.2.4. ละลายส่วนที่เหลือจากการระเหย ด้วย chloroform ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

2.3. ระบบ TLC

หัวข้อ	รายละเอียด	วิธีดำเนินการ
เฟสคงที่	แผ่นกระจกอบสารดูดซับ ประเภท silica gel GF ₂₅₄	
เฟสเคลื่อนที่	n-Hexane : ethyl acetate (70 : 30)	1) ผสมและเทเฟสเคลื่อนที่ ลงในถัง TLC ให้มีความสูง ประมาณ 1 เซนติเมตร 2) ปิดฝาถัง TLC ให้สนิท ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 1 ชั่วโมง
ปริมาตรที่ใช้	5 ไมโครลิตร	3) Spot สารละลายที่เตรียมได้ (2.1 และ 2.2) ลงบน เฟสคงที่ในแนวระดับเดียวกัน
ระยะทางของ เฟสเคลื่อนที่	12 เซนติเมตร	4) วางเฟสคงที่ในแนวระดับ ในถัง TLC ที่เตรียมไว้ 5) ปลอ่ยให้เฟสเคลื่อนที่ซึมขึ้นไปตามผิวของเฟสคงที่ สูง 12 เซนติเมตร
การตรวจวัด	(i) UV ₂₅₄ (ii) Modified Dragendorff TS2 (iii) Anisaldehyde TS	6) นำเฟสคงที่ออกจากถัง TLC ตั้งทิ้งไว้จนแห้ง 7) ส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร 8) พ่นด้วยสารละลาย modified Dragendorff TS2 9) พ่นด้วยสารละลาย anisaldehyde TS และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

2.4. ผล TLC

Spot	ค่า R _f	ผลการตรวจวัด		
		(i)	(ii)	(iii)
1	5-6	-	-	ม่วงอ่อน
2 (piperine)	20-22	ทึบแสง	ส้ม	เขียว
3	25-27	ทึบแสง	ส้มอ่อน	เขียว
4	31-33	ทึบแสง	-	ม่วง
5	36-38	ทึบแสง	-	ม่วง
6	43-44	ทึบแสง	-	ม่วง
7	50-51	ทึบแสง	-	-
8	58-59	-	-	ม่วงอ่อน
9	60-61	ทึบแสง	-	-
10	64-66	-	-	ม่วง
11	66-69	ทึบแสง	-	-
12	74-77	ทึบแสง	-	น้ำเงิน
13	91-95	-	-	ม่วง

- ปริมาณความชื้น (ภาคผนวก 1B)
ต้องไม่เกินร้อยละ 13.0 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก
- ปริมาณเถ้ารวม (ภาคผนวก 2.1)
ต้องไม่เกินร้อยละ 7.5 โดยน้ำหนัก

- ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (ภาคผนวก 2.2)
ต้องไม่เกินร้อยละ 0.4 โดยน้ำหนัก
- ปริมาณสารสกัดด้วย 95% v/v ethanol (ภาคผนวก 3A) ตัวทำละลาย คือ 95% v/v ethanol
ต้องไม่น้อยกว่าร้อยละ 10.0 โดยน้ำหนัก
- ปริมาณน้ำมันหอมระเหย (ภาคผนวก 4) ใช้ผงสมุนไพร 25 กรัม
ต้องไม่น้อยกว่าร้อยละ 1.0 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก
- ปริมาณ alkaloids
ต้องไม่น้อยกว่าร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนัก
 1. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน
 - 1.1. Stock standard solution
 - 1.1.1. ชั่งสารมาตรฐาน piperine 30 มิลลิกรัม ลงในขวดวัดปริมาตรชนิดกันแสง ขนาด 500 มิลลิลิตร
 - 1.1.2. ละลายและปรับปริมาตรด้วย ethanol
 - 1.1.3. ดูดสารละลาย stock standard solution ปริมาตร 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรชนิดกันแสง ขนาด 50 มิลลิลิตร แต่ละขวดตามลำดับ
 - 1.1.4. ปรับปริมาตรด้วย ethanol
 2. การเตรียมสารละลายตัวอย่าง
 - 2.1. ชั่งผงสมุนไพร 0.4 กรัม ลงในขวดกันกลมชนิดกันแสง ขนาด 100 มิลลิลิตร
 - 2.2. เติม ethanol ปริมาตร 25 มิลลิลิตร สกัดโดยวิธี reflux เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และกรอง
 - 2.3. นำสารละลายที่กรองได้ ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรชนิดกันแสง ขนาด 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วย ethanol
 - 2.4. ดูดสารละลายที่ได้ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรชนิดกันแสง ขนาด 50 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วย ethanol

3. ระบบ UV-Vis spectrophotometer

หัวข้อ	รายละเอียด
สารละลายเปรียบเทียบ	Ethanol
ความยาวคลื่น	341 นาโนเมตร

4. การคำนวณ

$$\text{Alkaloids} = \frac{C_{\text{Sample}} \times V_{\text{Sample}} \times 10^{-3}}{W_{\text{Sample}}} \times 100$$

โดยที่

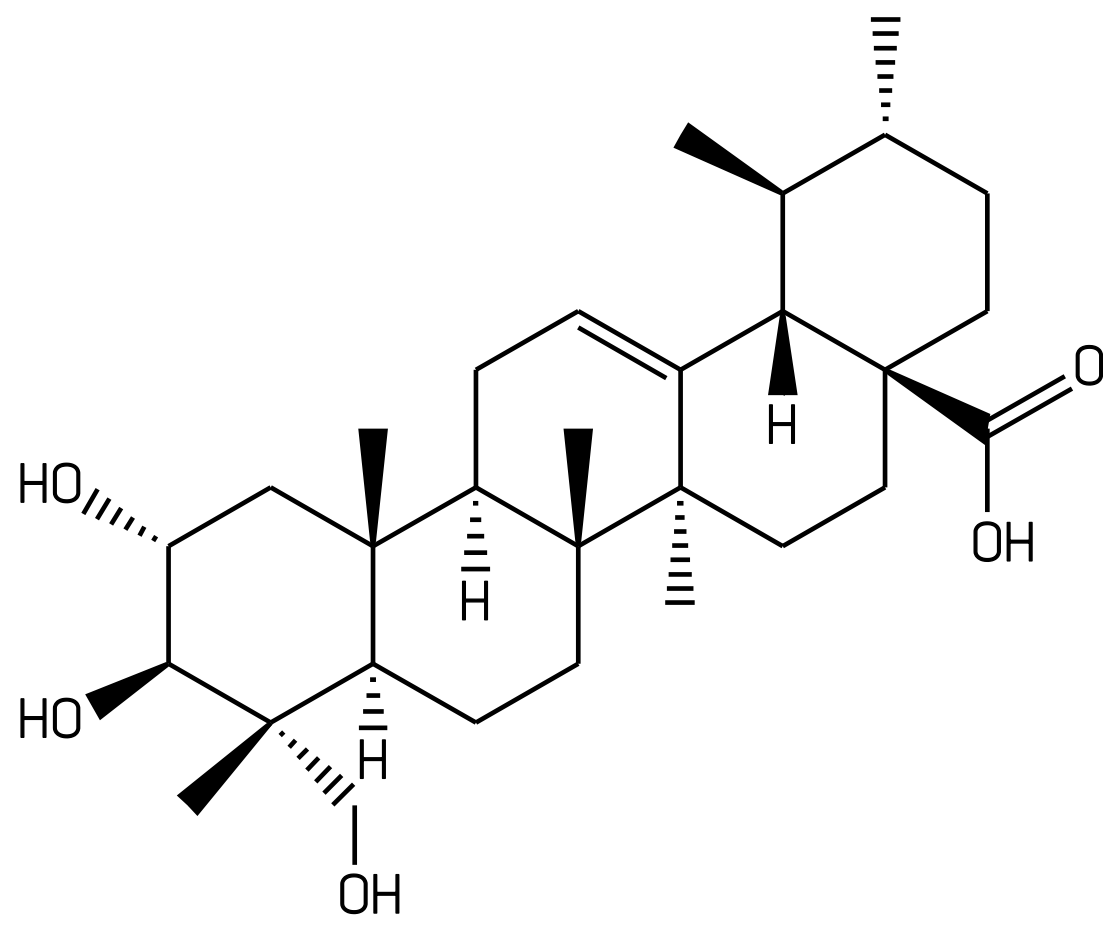
- Alkaloids คือ ปริมาณ alkaloids (ร้อยละโดยน้ำหนัก)
- C_{Sample} คือ ความเข้มข้นของ piperine ในสารละลายตัวอย่าง (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
- V_{Sample} คือ ปริมาตรของสารละลายตัวอย่าง (มิลลิลิตร)
- W_{Sample} คือ น้ำหนักของผงสมุนไพร (มิลลิกรัม)

- ชื่อวิทยาศาสตร์ *Centella asiatica* (L.) Urban
- ชื่อพ้อง *Centella coriacea* Nannf., *Hydrocotyle asiatica* L., *Hydrocotyle lunata* Lam., *Trisanthus cochinchinensis* Lour.
- วงศ์ Umbelliferae

▪ สารสำคัญ

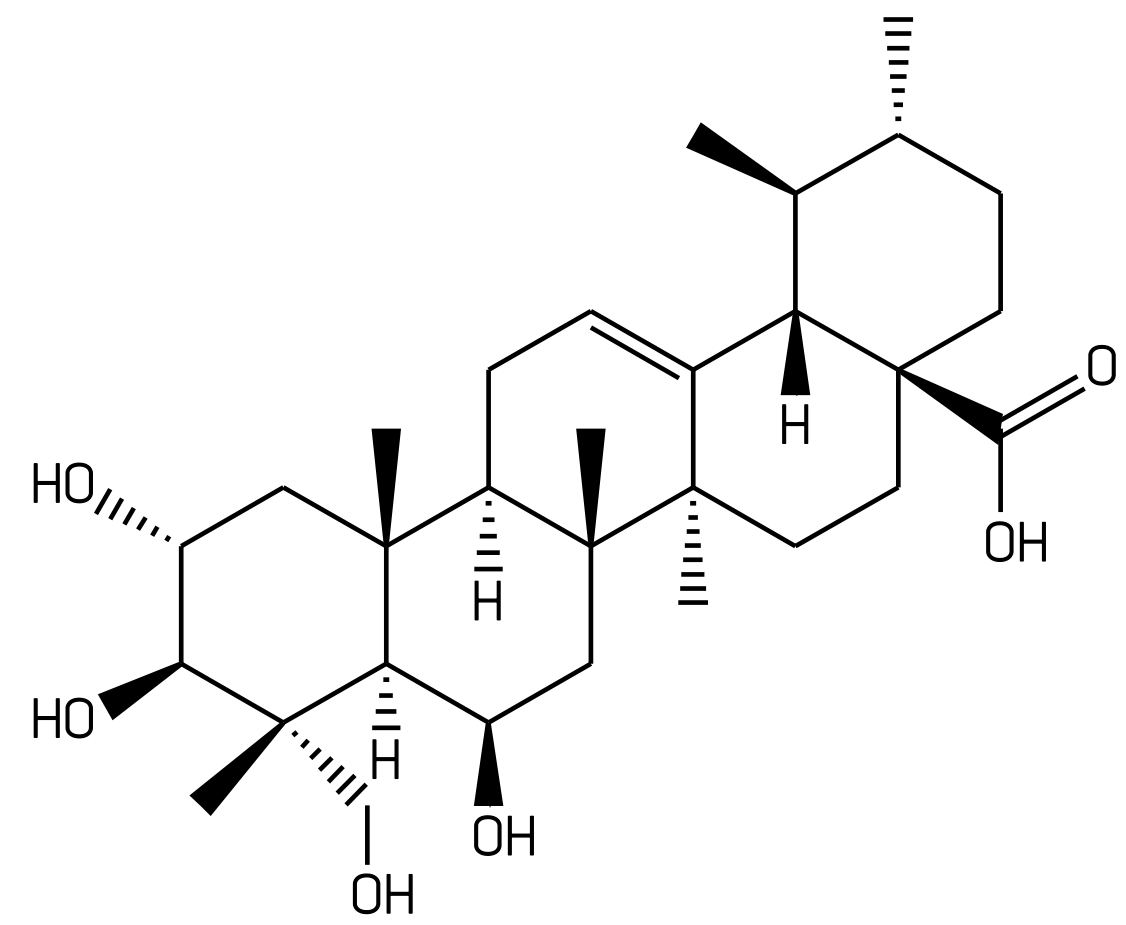
1. สารกลุ่ม triterpenoid saponins

Asiatic acid, asiaticoside, madecassic acid และ madecassoside



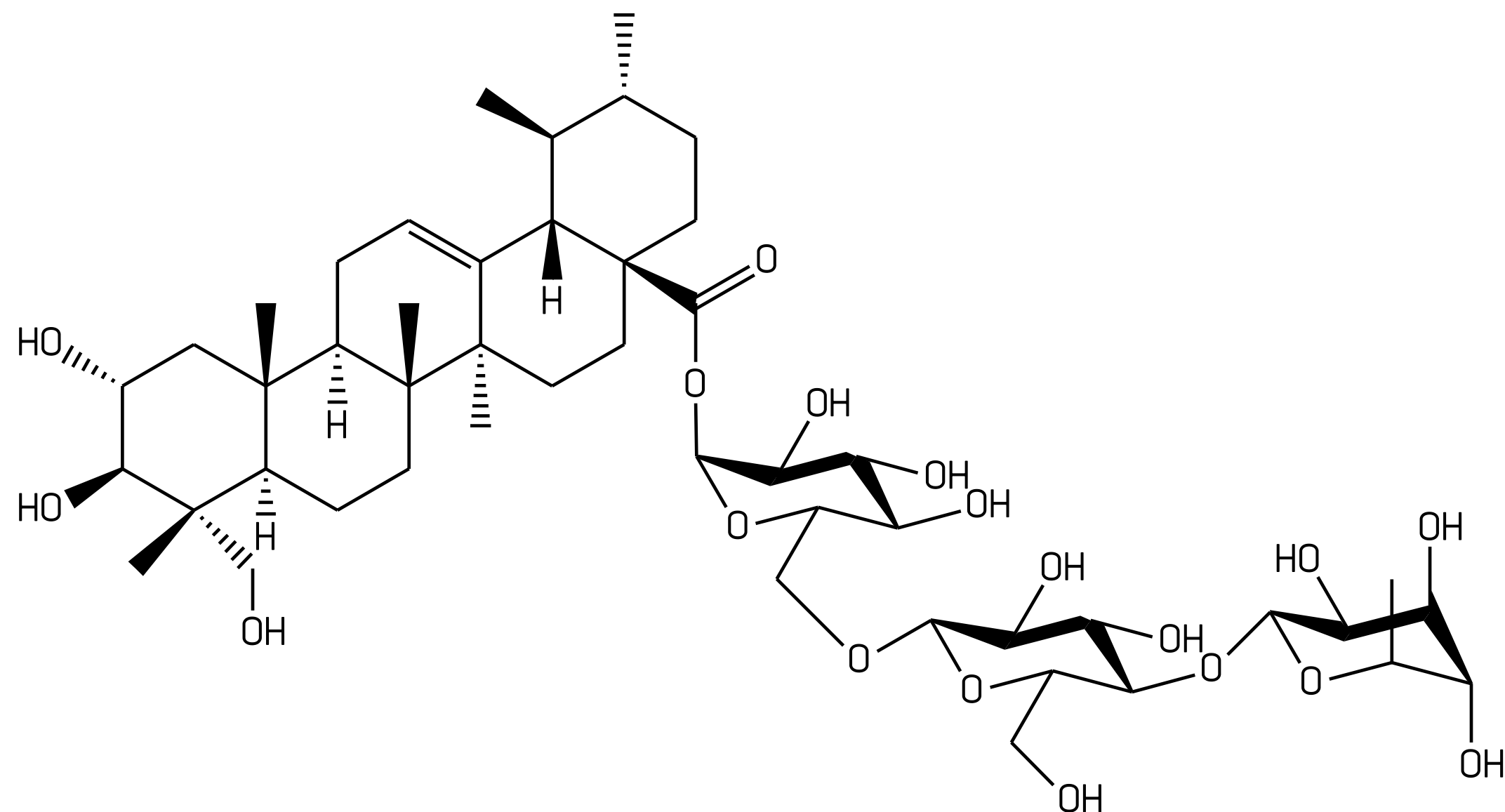
Asiatic acid

$C_{30}H_{48}O_5$
Mol. Wt.: 488.7
C, 73.73; H, 9.90; O, 16.37



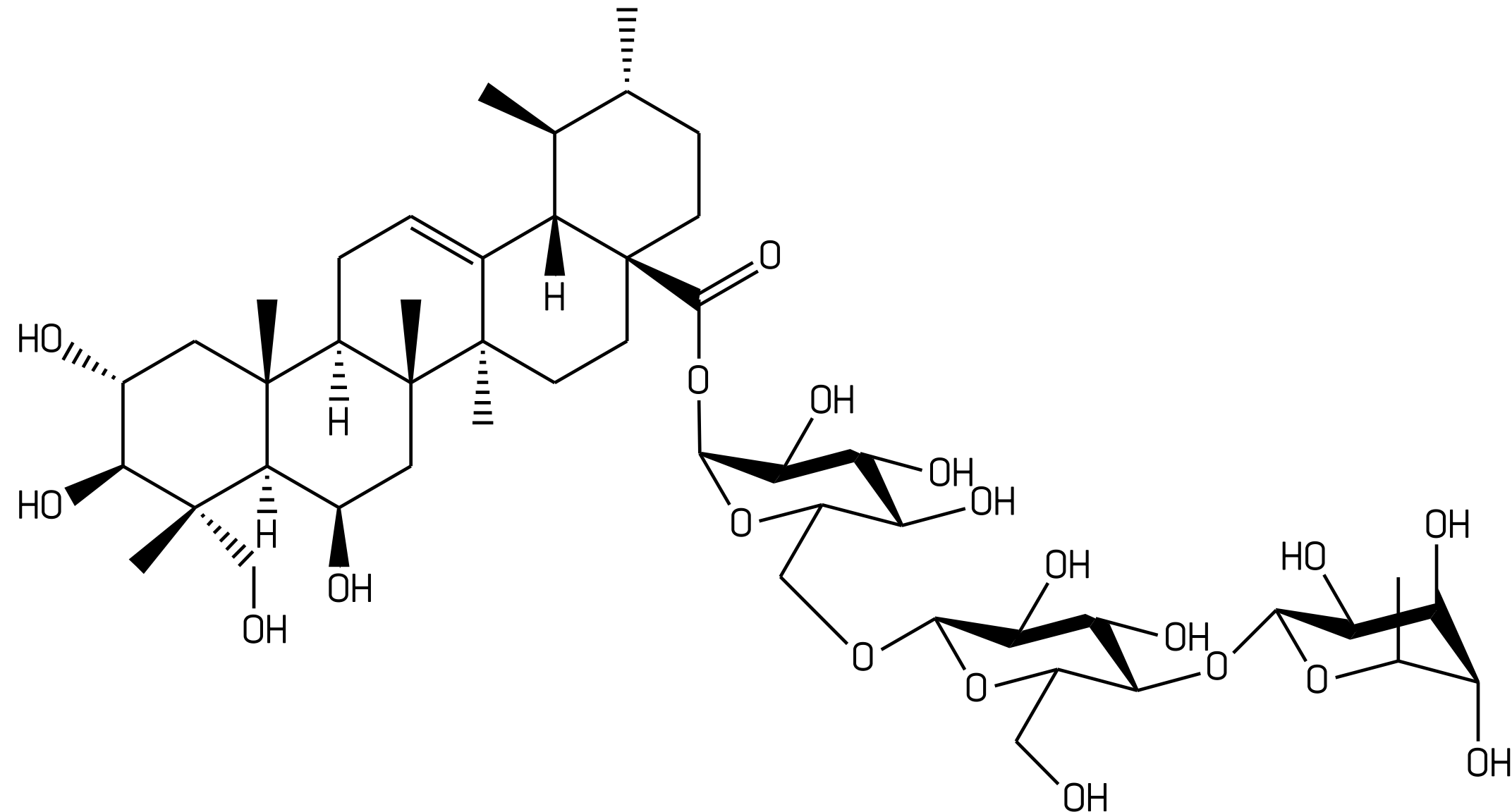
Madecassic acid

$C_{30}H_{48}O_6$
Mol. Wt.: 504.7
C, 71.39; H, 9.59; O, 19.02



Asiaticoside

$C_{48}H_{78}O_{19}$
Mol. Wt.: 959.12
C, 60.11; H, 8.20; O, 31.69



Madecassoside
 $C_{48}H_{78}O_{20}$
 Mol. Wt.: 975.12
 C, 59.12; H, 8.06; O, 32.82

▪ เอกลักษณ์ทางเคมี

1. การตรวจสอบเบื้องต้น

การเตรียมสารละลาย A	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ ชั่งผงสมุนไพร 0.5 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 25 มิลลิลิตร ▪ เติม ethanol ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ต้มบนอ่างอังไอน้ำ เป็นเวลา 5 นาที ▪ นำสารละลายใสเหนือตะกอนที่ได้ (สารละลาย A) มาใช้ในการตรวจสอบ 1 และ 2 	
การตรวจสอบ 1	ข้อกำหนด
<ul style="list-style-type: none"> ▪ เติมสารละลาย A ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ▪ เติม sulfuric acid 2-3 หยด 	สารละลายเปลี่ยนเป็นสีเขียว
การตรวจสอบ 2	ข้อกำหนด
<ul style="list-style-type: none"> ▪ เติมสารละลาย A ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในถ้วยระเหย และระเหยแห้ง ▪ ละลายส่วนที่เหลือจากการระเหย ด้วย acetic anhydride ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ▪ เติม sulfuric acid ปริมาตร 1 มิลลิลิตร อย่างช้า ๆ 	สารละลายชั้นบนเปลี่ยนเป็นสีเขียว และเกิดวงแหวนสีน้ำตาลแดงระหว่างรอยต่อของสารละลายทั้งสองชั้น
การตรวจสอบ 3	ข้อกำหนด
<ul style="list-style-type: none"> ▪ ชั่งผงสมุนไพร 0.5 กรัม ลงในหลอดทดลองชนิดที่มีฝาปิดสนิท ▪ เติมน้ำ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปิดฝาและเขย่าต่อเนื่องจนเกิดฟอง 	ฟองคงทนต่อเนื่อง นาน 20 นาที

2. การตรวจสอบเพื่อยืนยันผล

2.1. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

2.1.1. Asiatic acid

ละลายสารมาตรฐาน asiatic acid 1 มิลลิกรัม ใน ethanol ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

2.1.2. Asiaticoside

ละลายสารมาตรฐาน asiaticoside 1 มิลลิกรัม ใน ethanol ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

2.2. การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

2.2.1. ชั่งผงสมุนไพร 1 กรัม ลงในขวดก้นกลม ขนาด 50 มิลลิลิตร

2.2.2. เติม ethanol ปริมาตร 20 มิลลิลิตร สก๊าดโดยวิธี reflux เป็นเวลา 10 นาที และกรอง

2.2.3. นำสารละลายที่กรองได้ มาระเหยแห้ง

2.2.4. ละลายส่วนที่เหลือจากการระเหย ด้วย ethanol ปริมาตร 4 มิลลิลิตร

2.3. ระบบ TLC

หัวข้อ	รายละเอียด	วิธีดำเนินการ
เฟสคงที่	แผ่นกระดาษสารดูดซับ ประเภท silica gel G	
เฟสเคลื่อนที่	Chloroform : methanol : water (15 : 7 : 1)	1) ผสมและเทเฟสเคลื่อนที่ ลงในถัง TLC ให้มีความสูง ประมาณ 1 เซนติเมตร 2) ปิดฝาดัง TLC ให้สนิท ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 1 ชั่วโมง
ปริมาตรที่ใช้	5 ไมโครลิตร	3) Spot สารละลายที่เตรียมได้ (2.1) ลงบนเฟสคงที่ใน แนวระดับเดียวกัน
ระยะทางของ เฟสเคลื่อนที่	10 เซนติเมตร	4) วางเฟสคงที่ในแนวระดับ ในถัง TLC ที่เตรียมไว้ 5) ปลอ่ยให้เฟสเคลื่อนที่ซึมขึ้นไปตามผิวของเฟสคงที่ สูง 10 เซนติเมตร
การตรวจวัด	Anisaldehyde TS	6) นำเฟสคงที่ออกจากถัง TLC ตั้งทิ้งไว้จนแห้ง 7) พ่นด้วยสารละลาย anisaldehyde TS และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

2.4. ผล TLC

Spot	ค่า R_f	ผลการตรวจวัด
1	2	เขียว
2	5	เขียว
3	8	เขียว
4	16	เขียว
5 (asiaticoside)	27-28	ม่วงแดง
6	33-34	ม่วงน้ำเงิน
7	43	ม่วงน้ำเงิน
8	63-64	ม่วงน้ำเงิน
9	67	เขียว
10 (asiatic acid)	72-74	ม่วงน้ำเงิน
11	79-80	ม่วงอมน้ำตาล
12	84	เขียวอมน้ำตาล
13	87-88	เขียวอมม่วง
14	91-92	เขียว

- ปริมาณความชื้น (ภาคผนวก 1A)
ต้องไม่เกินร้อยละ 14.0 โดยน้ำหนัก

- ปริมาณเถ้ารวม (ภาคผนวก 2.1)
ต้องไม่เกินร้อยละ 17.0 โดยน้ำหนัก

- ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (ภาคผนวก 2.2)
ต้องไม่เกินร้อยละ 7.0 โดยน้ำหนัก
- ปริมาณสารสกัดด้วย ethanol (ภาคผนวก 3A) ตัวทำละลาย คือ 95% v/v ethanol
ต้องไม่น้อยกว่าร้อยละ 15.0 โดยน้ำหนัก
- ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ (ภาคผนวก 3A) ตัวทำละลาย คือ น้ำที่อิมัลชันด้วย chloroform
ต้องไม่น้อยกว่าร้อยละ 24.0 โดยน้ำหนัก
- ปริมาณ asiatic acid, asiaticoside, madecassic acid และ madecassoside
 1. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน
 - 1.1. Stock standard solution
 - 1.1.1. Asiatic acid
 - 1) ชั่งสารมาตรฐาน asiatic acid 30 มิลลิกรัม ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร
 - 2) ละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol
 - 1.1.2. Asiaticoside
 - 1) ชั่งสารมาตรฐาน asiaticoside 25 มิลลิกรัม ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร
 - 2) ละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol
 - 1.1.3. Madecassic acid
 - 1) ชั่งสารมาตรฐาน madecassic acid 30 มิลลิกรัม ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร
 - 2) ละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol
 - 1.1.4. Madecassoside
 - 1) ชั่งสารมาตรฐาน madecassoside 30 มิลลิกรัม ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร
 - 2) ละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol
 - 1.2. Working standard solution
 - 1.2.1. Asiatic acid, asiaticoside และ madecassic acid
 - 1) ดูดสารละลาย stock standard solution ปริมาตร 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร แต่ละขวด ตามลำดับ
 - 2) ปรับปริมาตรด้วย methanol
 - 3) กรองสารละลายที่ได้ ผ่านตัวกรองอนุภาค ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงใน vial
 - 1.2.2. Madecassoside
 - 1) ดูดสารละลาย stock standard solution ปริมาตร 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร แต่ละขวด ตามลำดับ
 - 2) ปรับปริมาตรด้วย methanol
 - 3) กรองสารละลายที่ได้ ผ่านตัวกรองอนุภาค ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงใน vial
 2. การเตรียมสารละลายตัวอย่าง
 - 2.1. ชั่งผงสมุนไพร 0.2 กรัม ลงในขวดก้นกลม ขนาด 50 มิลลิลิตร
 - 2.2. เติมน methanol ปริมาตร 25 มิลลิลิตร สกัดโดยวิธี reflux เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
 - 2.3. กรองสารละลายที่ได้ ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 50 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วย methanol
 - 2.4. กรองสารละลายที่ได้ ผ่านตัวกรองอนุภาค ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงใน vial

3. ระบบ UPLC

หัวข้อ	รายละเอียด				
เฟสคงที่	คอลัมน์ Acquity® BEH C ₁₈ 2.1 x 50 มิลลิเมตร, 1.7 ไมโครเมตร อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส				
เฟสเคลื่อนที่	A: Acetonitrile B: Water				
	เวลา (นาที)	อัตราการไหล (มิลลิลิตร/นาที)	A (%)	B (%)	Gradient profile
	0.0	0.6	15	85	-
	1.5	0.6	60	40	6
	2.0	0.6	0	100	6
	3.0	0.6	0	100	6
4.0	0.6	15	85	6	
ปริมาตรที่ใช้/injection	4 ไมโครลิตร				
ระยะเวลา/injection	2.5 นาที (Post run 2.5 นาที)				
การตรวจวัด	UV ที่ความยาวคลื่น 205 นาโนเมตร				

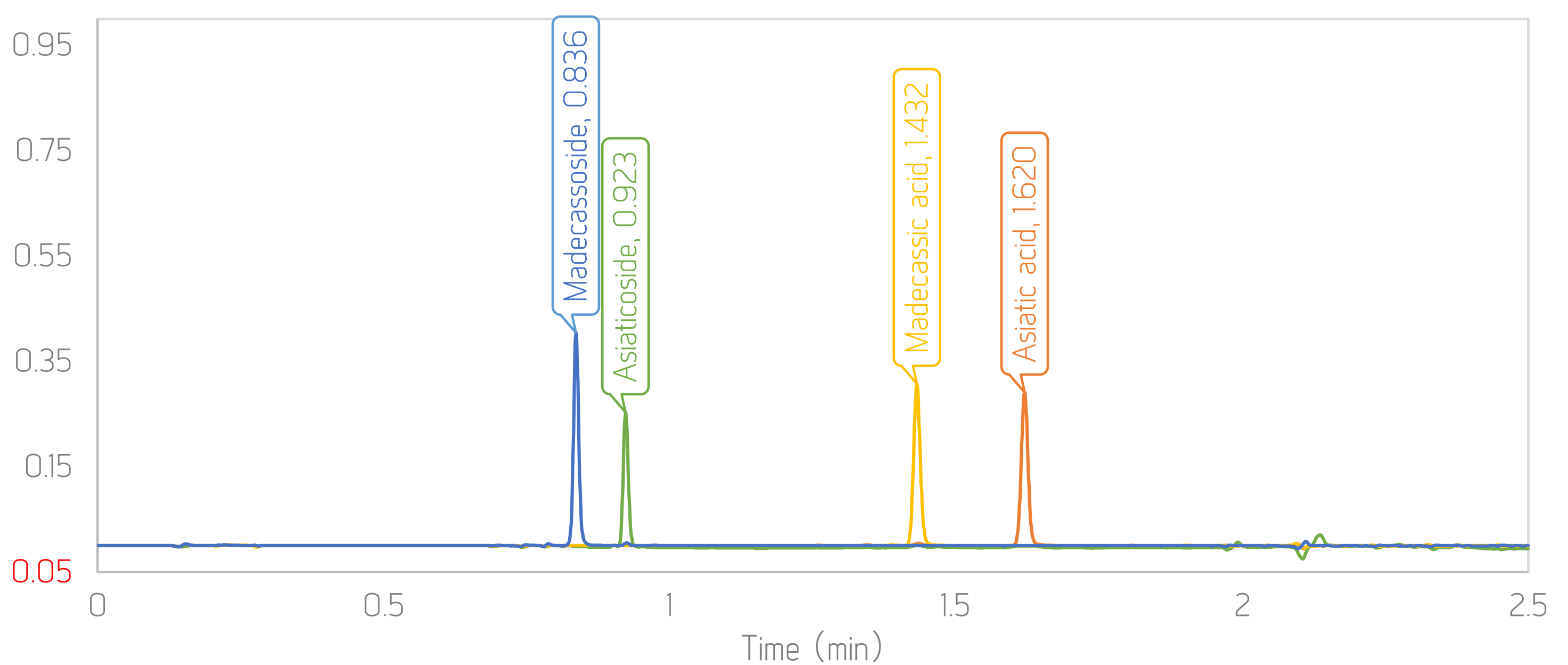
4. การคำนวณ

$$\text{Content} = \frac{C_{\text{Sample}} \times V_{\text{Sample}} \times 10^{-3}}{W_{\text{Sample}}} \times 100$$

โดยที่

- Content คือ ปริมาณสารสำคัญ ได้แก่ asiatic acid, asiaticoside, madecassic acid และ madecassoside (ร้อยละโดยน้ำหนัก)
- C_{Sample} คือ ความเข้มข้นของสารสำคัญในสารละลายตัวอย่าง (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
- V_{Sample} คือ ปริมาตรของสารละลายตัวอย่าง (มิลลิลิตร)
- W_{Sample} คือ น้ำหนักของผงสมุนไพร (มิลลิกรัม)

5. Chromatogram

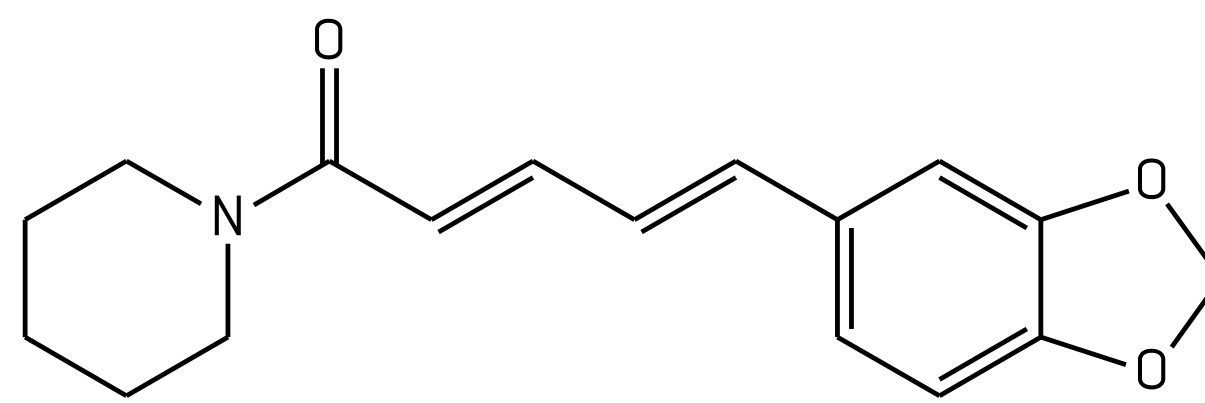




- ชื่อวิทยาศาสตร์ *Piper nigrum* L.
- วงศ์ Piperaceae

▪ สารสำคัญ

1. สารกลุ่ม alkaloids
Piperine



Piperine
 $C_{17}H_{19}NO_3$
 Mol. Wt.: 285.34
 C, 71.56; H, 6.71; N, 4.91; O, 16.82

▪ เอกลักษณะทางเคมี

1. การตรวจสอบเบื้องต้น

การเตรียมสารละลาย A	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ ชั่งผงสมุนไพร 1 กรัม ลงในขวดก้นกลม ขนาด 50 มิลลิลิตร ▪ เติม chloroform ปริมาตร 20 มิลลิลิตร สก๊ัดโดยวิธี reflux เป็นเวลา 15 นาที และกรอง ▪ นำสารละลายที่กรองได้ (สารละลาย A) มาใช้ในการตรวจสอบ 1 ถึง 3 	
การตรวจสอบ 1	ข้อกำหนด
<ul style="list-style-type: none"> ▪ เติมสารละลาย A ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในถ้วยระเหย และระเหยแห้ง ▪ ละลายส่วนที่เหลือจากการระเหย ด้วย acetic anhydride ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ▪ เติม sulfuric acid ปริมาตร 1 มิลลิลิตร อย่างช้า ๆ 	เกิดวงแหวนสีน้ำตาลบริเวณรอยต่อระหว่างชั้นของสารละลาย
การตรวจสอบ 2	ข้อกำหนด
<ul style="list-style-type: none"> ▪ เติมสารละลาย A ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง และระเหยแห้ง ▪ ละลายส่วนที่เหลือจากการระเหย ด้วย ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ▪ เติม sulfuric acid ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร 	สารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดง และค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล
การตรวจสอบ 3	ข้อกำหนด
<ul style="list-style-type: none"> ▪ เติมสารละลาย A ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง และระเหยแห้ง ▪ ละลายส่วนที่เหลือจากการระเหยด้วย ethanol ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ▪ เติมสารละลาย potassium iodobismuthate-acetic acid TS 4-5 หยด 	สารละลายเกิดตะกอนสีส้ม

2. การตรวจสอบเพื่อยืนยันผล

2.1. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

2.1.1. ละลายสารมาตรฐาน piperine 1 มิลลิกรัม ใน chloroform ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

2.2. การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

2.2.1. ชั่งผงสมุนไพร 0.5 กรัม ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 5 มิลลิลิตร

2.2.2. ปรับปริมาตรด้วย chloroform สกัดโดยวิธีการหมัก และกรอง

2.2.3. นำสารละลายที่กรองได้ มาระเหยแห้ง

2.2.4. ละลายส่วนที่เหลือจากการระเหย ด้วย chloroform ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

2.3. ระบบ TLC

หัวข้อ	รายละเอียด	วิธีดำเนินการ
เฟสคงที่	แผ่นกระดาษสารดูดซับ ประเภท silica gel GF ₂₅₄	
เฟสเคลื่อนที่	Hexane : ethyl acetate (60 : 40)	1) ผสมและเทเฟสเคลื่อนที่ ลงในถัง TLC ให้มีความสูง ประมาณ 1 เซนติเมตร 2) ปิดฝาดัง TLC ให้สนิท ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 1 ชั่วโมง
ปริมาตรที่ใช้	5 ไมโครลิตร	3) Spot สารละลายที่เตรียมได้ (2.1 และ 2.2) ลงบน เฟสคงที่ในแนวระดับเดียวกัน
ระยะทางของ เฟสเคลื่อนที่	12 เซนติเมตร	4) วางเฟสคงที่ในแนวระดับ ในถัง TLC ที่เตรียมไว้ 5) ปลอ่ยให้เฟสเคลื่อนที่ซึมขึ้นไปตามผิวของเฟสคงที่ สูง 12 เซนติเมตร
การตรวจวัด	(i) UV ₂₅₄ (ii) Potassium iodobismuthate-acetic acid TS (iii) 50% v/v sulfuric acid ใน methanol	6) นำเฟสคงที่ออกจากถัง TLC ตั้งทิ้งไว้จนแห้ง 7) ส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร 8) พ่นด้วยสารละลาย potassium iodobismuthate- acetic acid TS 9) พ่นด้วยสารละลาย 50% v/v of sulfuric acid ใน methanol และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 110 องศา เซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

2.4. ผล TLC

Spot	ค่า R_f	ผลการตรวจวัด		
		(i)	(ii)	(iii)
1	1-7	กึ่งแสง	ส้มอ่อน	-
2	8-12	กึ่งแสง	ส้ม	ขอบเหลือง, น้ำตาล ตรงกลาง
3	10-15	กึ่งแสง	ส้ม	ม่วงอ่อน
4	15-19	กึ่งแสง	ส้ม	ม่วงอ่อน
5	21-23	-	-	น้ำเงิน
6	25-28	-	-	น้ำเงิน
7 (piperine)	28-38	กึ่งแสง	ส้มเข้ม	ขอบเหลือง, น้ำตาล ตรงกลาง
8	39-46	กึ่งแสง	ส้ม	ขอบเหลือง, น้ำตาล ตรงกลาง
9	47-50	กึ่งแสง	ส้ม	ขอบเหลือง, น้ำตาล ตรงกลาง
10	49-51	-	-	น้ำเงิน
11	53-57	กึ่งแสง	-	ม่วงอมน้ำเงิน
12	59-63	กึ่งแสง	-	ม่วงอมน้ำเงิน
13	64-68	กึ่งแสง	ส้มอ่อน	ม่วงอมน้ำเงิน
14	71-76	กึ่งแสง	-	ม่วงอ่อน
15	78-83	กึ่งแสง	-	ม่วงอ่อน
16	85-90	-	-	-
17	96-99	-	-	ม่วงอ่อน

- ปริมาณความชื้น (ภาคผนวก 1B)
ต้องไม่เกินร้อยละ 14.0 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก
- ปริมาณเถ้ารวม (ภาคผนวก 2.1)
ต้องไม่เกินร้อยละ 7.0 โดยน้ำหนัก
- ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (ภาคผนวก 2.2)
ต้องไม่เกินร้อยละ 1.5 โดยน้ำหนัก
- ปริมาณน้ำมันหอมระเหย (ภาคผนวก 4) ใช้ผงสมุนไพร 50 กรัม
ต้องไม่น้อยกว่าร้อยละ 1.0 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก

▪ ปริมาณ alkaloids

ต้องไม่เกินร้อยละ 5.0 โดยน้ำหนัก

1. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

1.1. Stock standard solution

1.1.1. ชั่งสารมาตรฐาน piperine 30 มิลลิกรัม ลงในขวดวัดปริมาตรชนิดกันแสง ขนาด 500 มิลลิลิตร

1.1.2. ละลายและปรับปริมาตรด้วย ethanol

1.1.3. ดูดสารละลาย stock standard solution ปริมาตร 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรชนิดกันแสง ขนาด 50 มิลลิลิตร แต่ละขวดตามลำดับ

1.1.4. ปรับปริมาตรด้วย ethanol

2. การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

2.1. ชั่งผงสมุนไพร 0.4 กรัม ลงในขวดกันกลมชนิดกันแสง ขนาด 100 มิลลิลิตร

2.2. เติมน ethanol ปริมาตร 25 มิลลิลิตร สกัดโดยวิธี reflux เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และกรอง

2.3. นำสารละลายกรองที่ได้ ใส่นลงในขวดวัดปริมาตรชนิดกันแสง ขนาด 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วย ethanol

2.4. ดูดสารละลาย ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรชนิดกันแสง ขนาด 50 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วย ethanol

3. ระบบ UV-Vis spectrophotometer

หัวข้อ	รายละเอียด
สารละลายเปรียบเทียบ	Ethanol
ความยาวคลื่น	341 นาโนเมตร

4. การคำนวณ

$$\text{Alkaloids} = \frac{C_{\text{Sample}} \times V_{\text{Sample}} \times 10^{-3}}{W_{\text{Sample}}} \times 100$$

โดยที่

Alkaloids คือ ปริมาณ alkaloids (ร้อยละโดยน้ำหนัก)

C_{Sample} คือ ความเข้มข้นของ piperine ในสารละลายตัวอย่าง (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

V_{Sample} คือ ปริมาตรของสารละลายตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

W_{Sample} คือ น้ำหนักของผงสมุนไพร (มิลลิกรัม)

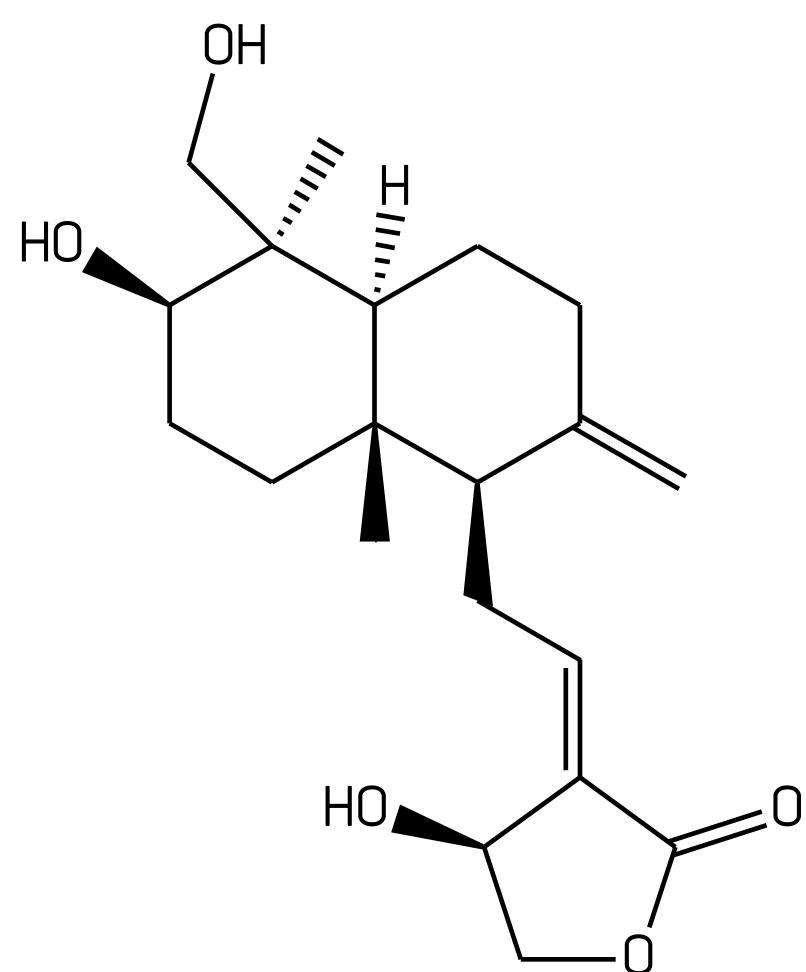


- ชื่อวิทยาศาสตร์ *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees
- ชื่อพ้อง *Justicia paniculata* Burm. f.
- วงศ์ Acanthaceae

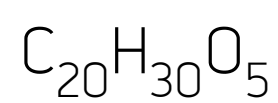
▪ สารสำคัญ

1. สารกลุ่ม lactones

Andrographolide, neoandrographolide และ dehydroandrographolide

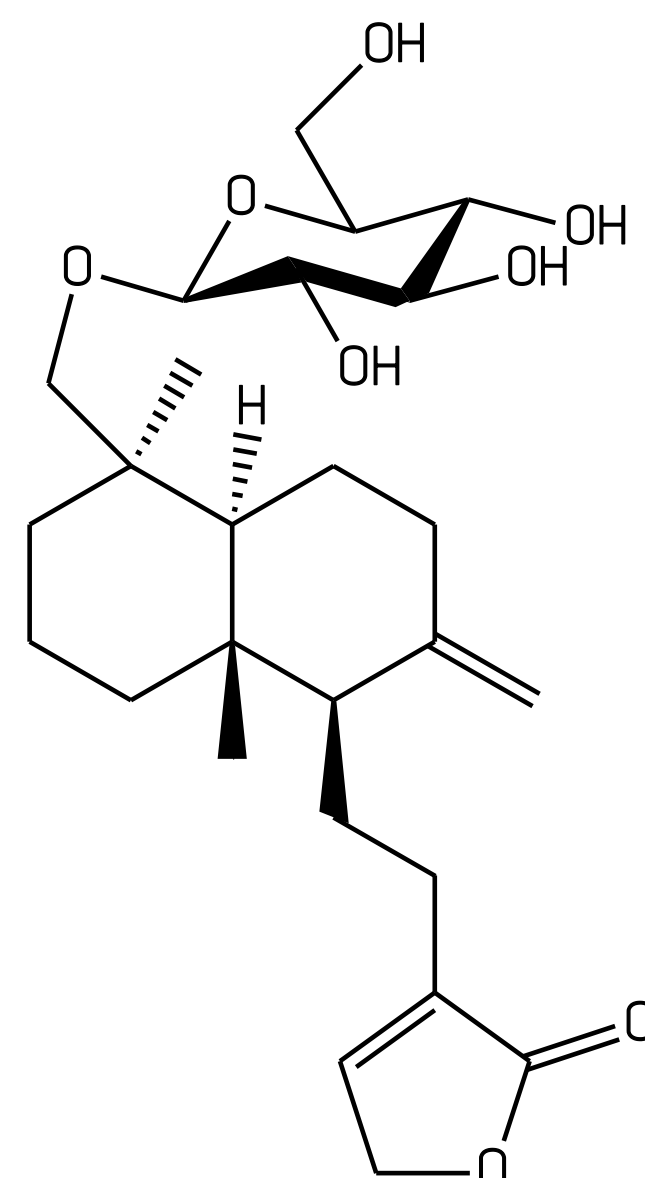


Andrographolide

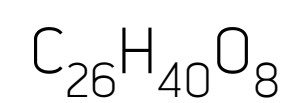


Mol. Wt.: 350.45

C, 68.54; H, 8.63; O, 22.83

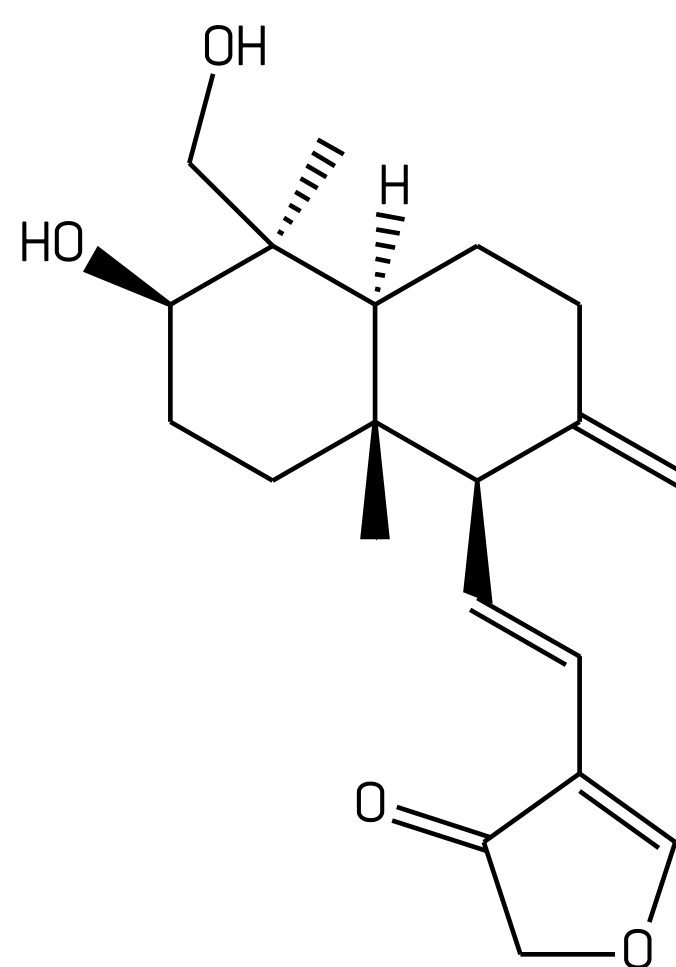


Neoandrographolide

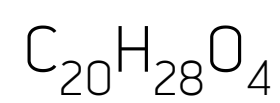


Mol. Wt.: 480.59

C, 64.98; H, 8.39; O, 26.63



Dehydroandrographolide



Mol. Wt.: 332.43

C, 72.26; H, 8.49; O, 19.25

- เอกลักษณะทางเคมี

1. การตรวจสอบเบื้องต้น

การเตรียมสารละลาย A	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ ชั่งผงสมุนไพร 1 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 50 มิลลิลิตร ▪ เติม ethanol ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ต้มบนอ่างอังไอน้ำ เป็นเวลา 5 นาที และกรอง ▪ นำสารละลายที่กรองได้ มาเติมผงถ่าน 0.3 กรัม เขย่าให้เข้ากัน และกรอง ▪ นำสารละลายที่กรองได้ (สารละลาย A) มาใช้ในการตรวจสอบ 1 และ 2 	
การตรวจสอบ 1	ข้อกำหนด
<ul style="list-style-type: none"> ▪ เติมสารละลาย A ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ▪ เติมสารละลาย 2% w/v 3,5-dinitrobenzoic acid ใน methanol 2 หยด ▪ เติมสารละลาย 5.7% w/v potassium hydroxide ใน methanol 2 หยด 	สารละลายเปลี่ยนเป็นสีม่วงแดง
การตรวจสอบ 2	ข้อกำหนด
<ul style="list-style-type: none"> ▪ เติมสารละลาย A ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ▪ เติมสารละลาย potassium hydroxide-ethanol TS ทีละหยด (1) ▪ ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10-15 นาที (2) 	(1) สารละลายเปลี่ยนเป็นสีแดง (2) สารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

2. การตรวจสอบเพื่อยืนยันผล

- 2.1. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

- 2.1.1. ละลายสารมาตรฐาน andrographolide 2 มิลลิกรัม ใน ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

- 2.2. การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

- 2.2.1. ชั่งผงสมุนไพร 1 กรัม ลงในขวดก้นกลม ขนาด 50 มิลลิลิตร

- 2.2.2. เติม ethanol ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ต้มบนอ่างอังไอน้ำ เป็นเวลา 5 นาที และกรอง

- 2.2.3. นำสารละลายที่กรองได้ มาเติมผงถ่าน 0.3 กรัม เขย่าให้เข้ากัน และกรอง

- 2.2.4. นำสารละลายที่กรองได้ มาระเหยแห้ง

- 2.2.5. ละลายส่วนที่เหลือจากการระเหย ด้วยสารละลาย 80% v/v ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

2.3. ระบบ TLC

หัวข้อ	รายละเอียด	วิธีดำเนินการ
เฟสคงที่	แผ่นกระดาษสารดูดซับ ประเภท silica gel GF ₂₅₄	
เฟสเคลื่อนที่	Chloroform : ethanol, absolute (17 : 3)	1) ผสมและเทเฟสเคลื่อนที่ ลงในถัง TLC ให้มีความสูง ประมาณ 1 เซนติเมตร 2) ปิดฝาดัง TLC ให้สนิท ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 1 ชั่วโมง
ปริมาตรที่ใช้	5 ไมโครลิตร	3) Spot สารละลายที่เตรียมได้ (2.1 และ 2.2) ลงบน เฟสคงที่ในแนวระดับเดียวกัน
ระยะทางของ เฟสเคลื่อนที่	15 เซนติเมตร	4) วางเฟสคงที่ในแนวระดับ ในถัง TLC ที่เตรียมไว้ 5) ปลอ่ยให้เฟสเคลื่อนที่ซึมขึ้นไปตามผิวของเฟสคงที่ สูง 15 เซนติเมตร
การตรวจวัด	(i) UV ₂₅₄ (ii) 2% w/v 3,5-dinitrobenzoic acid ใน methanol; 5.7% w/v potassium hydroxide ใน methanol	6) นำเฟสคงที่ออกจากถัง TLC ตั้งทิ้งไว้จนแห้ง 7) ส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร 8) พ่นด้วยสารละลาย 2% w/v 3,5- dinitrobenzoic acid ใน methanol และพ่นทับด้วยสารละลาย 5.7% w/v potassium hydroxide ใน methanol

2.4. ผล TLC

Spot	ค่า R _f	ผลการตรวจวัด	
		(i)	(ii)
1	1-5	-	ม่วงเข้ม
2	11-15	ทึบแสง	ม่วง
3	18-22	ทึบแสง	ม่วง
4 (neoandrographolide)	28-32	-	ม่วงเข้ม
5	49-51	-	ม่วง
6 (andrographolide)	52-56	ทึบแสง	ม่วงเข้ม
7	57-59	ทึบแสง	ม่วง
8	66-68	-	ม่วง
9 (dehydroandrographolide)	69-71	ทึบแสง	ม่วงเข้ม

- ปริมาณความชื้น (ภาคผนวก 1A)
ต้องไม่เกินร้อยละ 11.0 โดยน้ำหนัก
- ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (ภาคผนวก 2.2)
ต้องไม่เกินร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนัก
- ปริมาณสารสกัดด้วย 85% v/v ethanol (ภาคผนวก 3A) ตัวทำละลาย คือ 85% v/v ethanol
ต้องไม่น้อยกว่าร้อยละ 13.0 โดยน้ำหนัก
- ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ (ภาคผนวก 3A) ตัวทำละลาย คือ น้ำที่อิมัลชันด้วย chloroform
ต้องไม่น้อยกว่าร้อยละ 18.0 โดยน้ำหนัก

▪ ปริมาณ total lactones

ต้องไม่น้อยกว่าร้อยละ 6.0 โดยน้ำหนัก

1. สารละลายตัวอย่าง

- 1.1. ชั่งผงสมุนไพร 1 กรัม ลงในขวดก้นกลม ขนาด 100 มิลลิลิตร
- 1.2. เติมสารละลาย 85% v/v ethanol ปริมาตร 50 มิลลิลิตร สกัดโดยวิธี reflux เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และกรองผ่าน Buchner funnel
- 1.3. นำสารละลายที่กรองได้ มาเติมสารละลาย basic lead acetate ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที และกรองผ่าน Buchner funnel
- 1.4. นำสารละลายที่กรองได้ มาเติมสารละลาย 25% w/v sodium sulfate ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยเติมทีละหยด พร้อมเขย่าต่อเนื่อง ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง
- 1.5. เติมผงถ่าน 0.5 กรัม และนำไป reflux เป็นเวลา 10 นาที และกรองผ่าน Buchner funnel ที่บรรจุผงถ่าน 0.5 กรัม
- 1.6. นำสารละลายที่กรองได้ มาเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิสารละลายเท่ากับอุณหภูมิห้อง
- 1.7. เติมสารละลาย phenolphthalein TS 2-3 หยด และปรับ pH ให้เป็นกลาง ด้วยสารละลาย 0.1M sodium hydroxide
- 1.8. เติมสารละลาย 0.1M sodium hydroxide ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และนำไป reflux เป็นเวลา 30 นาที ตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิสารละลายเท่ากับอุณหภูมิห้อง
- 1.9. นำสารละลายที่ได้ มา titrate กับสารละลาย 0.05M hydrochloric acid จนถึงจุดยุติ (end point)

2. สารละลายเปรียบเทียบ

- 2.1. เติมสารละลาย 85% v/v ethanol ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในขวดก้นกลม ขนาด 100 มิลลิลิตร
- 2.2. สกัดโดยวิธี reflux เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และกรองผ่าน Buchner funnel
- 2.3. ดำเนินการตามวิธีการเตรียมสารละลายตัวอย่าง ข้อ 1.3 ถึง 1.9

3. การคำนวณ

$$\text{Lactones} = \frac{C_{\text{HCl}} \times (V_{\text{HCl(Bik)}} - V_{\text{HCl(Sample)}}) \times 350.45}{W_{\text{Sample}}} \times 100$$

โดยที่

Lactones	คือ	ปริมาณ total lactones (ร้อยละโดยน้ำหนัก)
C_{HCl}	คือ	ความเข้มข้นของ hydrochloric acid (โมลาร์)
$V_{\text{HCl(Bik)}}$	คือ	ปริมาตรของ hydrochloric acid ที่ใช้ titrate สารละลายเปรียบเทียบ (มิลลิลิตร)
$V_{\text{HCl(Sample)}}$	คือ	ปริมาตรของ hydrochloric acid ที่ใช้ titrate สารละลายตัวอย่าง (มิลลิลิตร)
W_{Sample}	คือ	น้ำหนักของผงสมุนไพร (มิลลิกรัม)

- ปริมาณ andrographolide

ต้องไม่น้อยกว่าร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนัก

1. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

- 1.1. Stock standard solution

- 1.1.1. ชั่งสารมาตรฐาน andrographolide 30 มิลลิกรัม ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 50 มิลลิลิตร

- 1.1.2. ละลายด้วย methanol ปริมาตร 25 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำ

- 1.2. Working standard solution

- 1.2.1. ดูดสารละลาย stock standard solution ปริมาตร 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร แต่ละขวด ตามลำดับ

- 1.2.2. ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย 50% v/v methanol

- 1.2.3. กรองสารละลายที่ได้ ผ่านตัวกรองอนุภาค ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงใน vial

2. การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

- 2.1. ชั่งผงสมุนไพร 0.4 กรัม ลงในขวดก้นกลม ขนาด 100 มิลลิลิตร

- 2.2. เติมสารละลาย dichloromethane : methanol (1 : 1) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร สกัดโดยวิธี reflux เป็นเวลา 30 นาที และกรอง

- 2.3. นำสารละลายที่กรองได้ มาระเหยแห้ง

- 2.4. ละลายส่วนที่เหลือจากการระเหย ด้วย methanol ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำ

- 2.5. กรองสารละลายที่ได้ ผ่านตัวกรองอนุภาค ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงใน vial

3. ระบบ HPLC

หัวข้อ	รายละเอียด
เฟสคงที่	คอลัมน์ C ₁₈ 3.9 x 150 มิลลิเมตร, 5 ไมโครเมตร
เฟสเคลื่อนที่	50% v/v methanol อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตร/นาที
ปริมาตรที่ใช้/injection	25 ไมโครลิตร
ระยะเวลา/injection	14 นาที
การตรวจวัด	UV ที่ความยาวคลื่น 224 นาโนเมตร

4. การคำนวณ

$$\text{Andrographolide} = \frac{C_{\text{Sample}} \times V_{\text{Sample}}}{W_{\text{Sample}}} \times 100$$

โดยที่

Andrographolide

คือ ปริมาณ andrographolide (ร้อยละโดยน้ำหนัก)

C_{Sample}

คือ ความเข้มข้นของ andrographolide ในสารละลายตัวอย่าง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

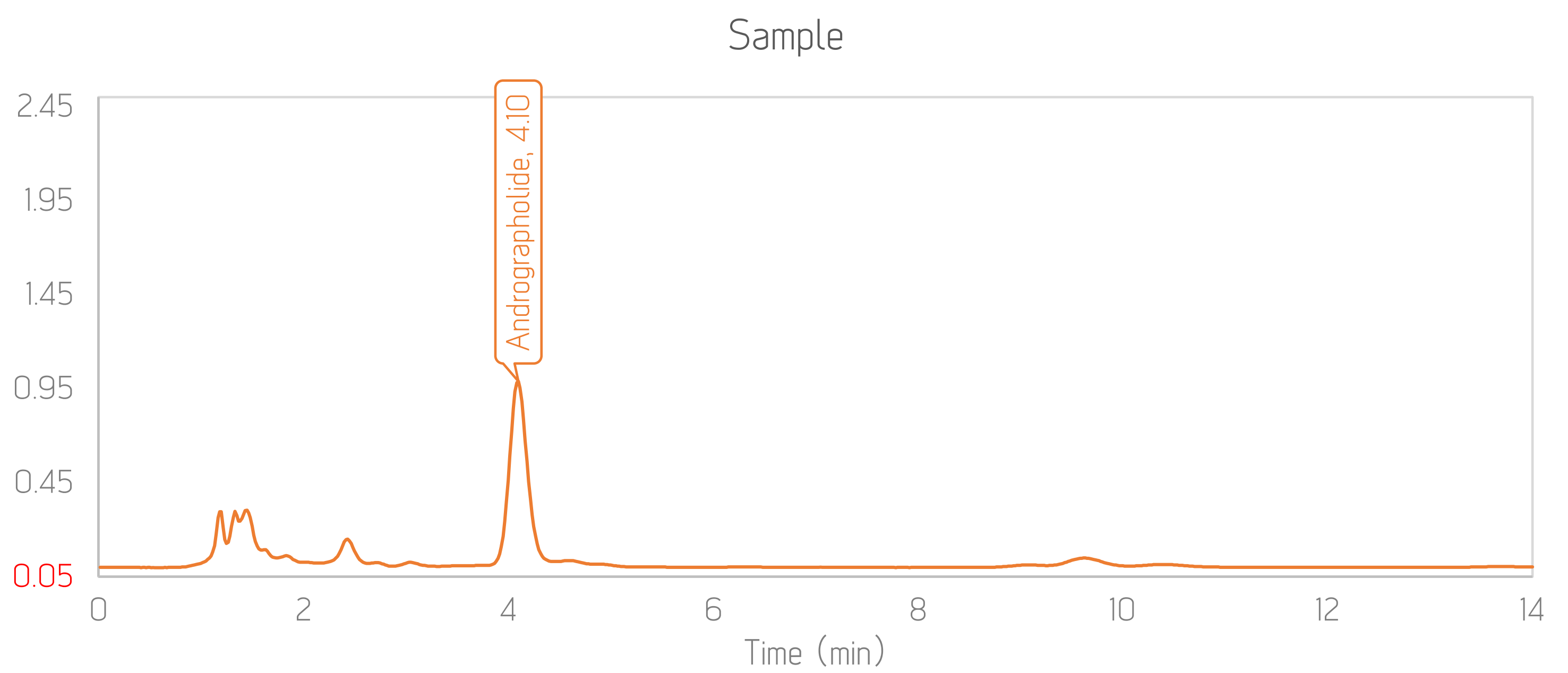
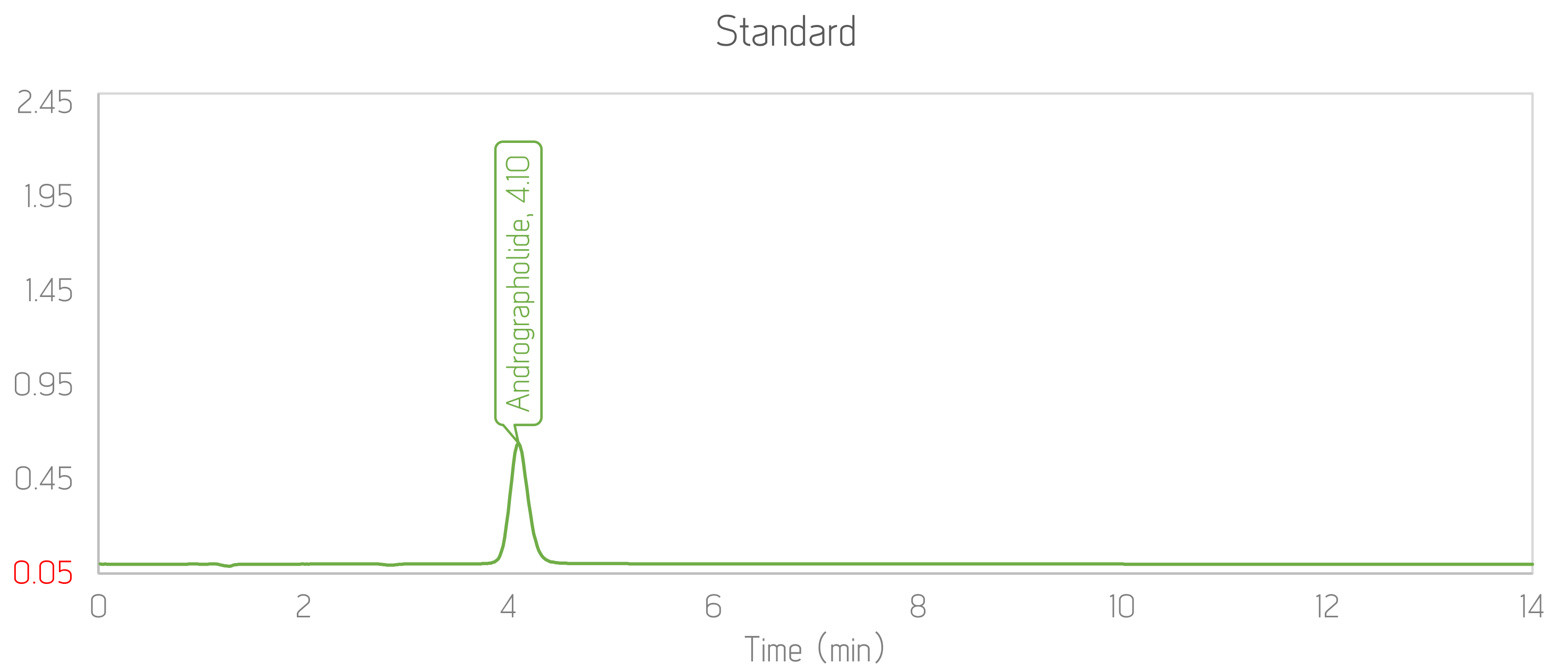
V_{Sample}

คือ ปริมาตรของสารละลายตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

W_{Sample}

คือ น้ำหนักของผงสมุนไพร (มิลลิกรัม)

5. Chromatogram



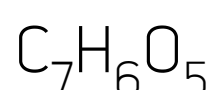
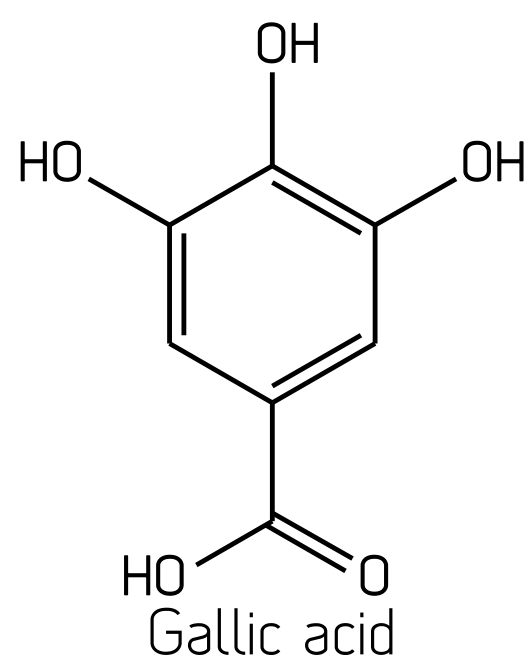


- ชื่อวิทยาศาสตร์ *Phyllanthus emblica* L.
- ชื่อพ้อง *Emblia officinalis* Gaertn.
- วงศ์ Euphorbiaceae

▪ สารสำคัญ

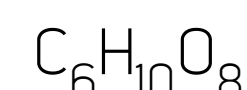
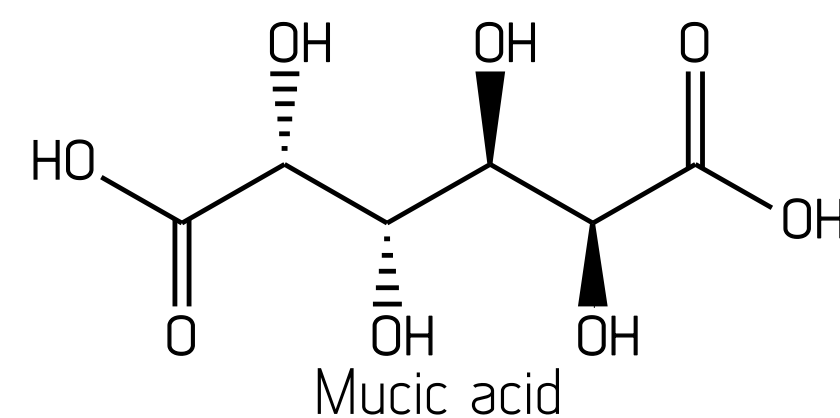
1. สารกลุ่ม tannins

Gallic acid และ mucic acid



Mol. Wt.: 170.12

C, 49.42; H, 3.55; O, 47.02



Mol. Wt.: 210.14

C, 34.29; H, 4.80; O, 60.91

▪ เอกลักษณ์ทางเคมี

1. การตรวจสอบเบื้องต้น

การเตรียมสารละลาย A	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ ชั่งผงสมุนไพร 1 กรัม ลงในขวดกักตม ขนาด 50 มิลลิลิตร ▪ เติมน้ำ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ต้มบนอ่างอังไอน้ำ เป็นเวลา 10 นาที และกรอง ▪ นำสารละลายที่กรองได้ (สารละลาย A) มาใช้ในการตรวจสอบ 1 และ 2 	
การตรวจสอบ 1	ข้อกำหนด
<ul style="list-style-type: none"> ▪ เติมน้ำสารละลาย A ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ▪ เติมน้ำสารละลาย sodium hydrogen carbonate TS 2-3 หยด ▪ เติมน้ำสารละลาย iron(II) sulfate TS 2-3 หยด (1) ▪ เติมน้ำสารละลาย 6% v/v sulfuric acid ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (2) 	(1) สารละลายเปลี่ยนเป็นสีม่วงเข้ม (2) สีม่วงเข้มของสารละลายจางหายไป
การตรวจสอบ 2	ข้อกำหนด
<ul style="list-style-type: none"> ▪ เติมน้ำสารละลาย A ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ▪ เติมน้ำ ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน 	เกิดวุ้นสีขาว
การเตรียมสารละลาย B	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ ชั่งผงสมุนไพร 1 กรัม ลงในขวดกักตม ขนาด 50 มิลลิลิตร ▪ เติมน้ำ ethanol ปริมาตร 25 มิลลิลิตร สกัดโดยวิธี reflux เป็นเวลา 15 นาที และกรอง ▪ นำสารละลายที่กรองได้ (สารละลาย B) มาใช้ในการตรวจสอบ 3 และ 4 	
การตรวจสอบ 3	ข้อกำหนด
<ul style="list-style-type: none"> ▪ เติมน้ำสารละลาย B ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ▪ เติมน้ำสารละลาย iron(III) chloride TS 2-3 หยด 	สารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน-ดำ
การตรวจสอบ 4	ข้อกำหนด
<ul style="list-style-type: none"> ▪ เติมน้ำสารละลาย B ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ▪ เติมน้ำ nitric acid ลงไป 2-3 หยด 	สารละลายเปลี่ยนเป็นสีแดง

2. การตรวจสอบเพื่อยืนยันผล

2.1. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

2.1.1. ละลายสารมาตรฐาน gallic acid 3 มิลลิกรัม ใน ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

2.2. การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

2.2.1. ชั่งผงสมุนไพร 0.5 กรัม ลงในขวดก้นกลม ขนาด 50 มิลลิลิตร

2.2.2. เติม ethanol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ต้มบนอ่างอังไอน้ำ เป็นเวลา 10 นาที และกรอง

2.2.3. นำสารละลายที่กรองได้ มาเติมผงถ่าน 0.5 กรัม

2.2.4. ต้มบนอ่างอังไอน้ำ เป็นเวลา 3 นาที กรองสารละลายที่ได้ ใสลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วย ethanol

2.3. ระบบ TLC

หัวข้อ	รายละเอียด	วิธีดำเนินการ
เฟสคงที่	แผ่นกระจกอบสารดูดซับ ประเภท silica gel GF ₂₅₄	
เฟสเคลื่อนที่	Toluene : ethyl formate : formic acid (5 : 4 : 1)	1) ผสมและเทเฟสเคลื่อนที่ ลงในถัง TLC ให้มีความสูง ประมาณ 1 เซนติเมตร 2) ปิดฝาดัง TLC ให้สนิท ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 1 ชั่วโมง
ปริมาตรที่ใช้	1 ไมโครลิตร (สารละลาย มาตรฐาน) 20 ไมโครลิตร (สารละลาย ตัวอย่าง)	3) Spot สารละลายที่เตรียมได้ (2.1 และ 2.2) ลงบน เฟสคงที่ในแนวระดับเดียวกัน
ระยะทางของ เฟสเคลื่อนที่	10 เซนติเมตร	4) วางเฟสคงที่ในแนวระดับ ในถัง TLC ที่เตรียมไว้ 5) ปลอ่ยให้เฟสเคลื่อนที่ซึมขึ้นไปตามผิวของเฟสคงที่ สูง 10 เซนติเมตร
การตรวจวัด	(i) UV ₂₅₄ (ii) Iron(III) chloride TS	9) นำเฟสคงที่ออกจากถัง TLC ตั้งทิ้งไว้จนแห้ง 10) ส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร 11) พ่นด้วยสารละลาย iron(III) chloride TS

2.4. ผล TLC

Spot	ค่า R _f	ผลการตรวจวัด	
		(i)	(ii)
1	4-6	ทึบแสง	น้ำเงิน-ดำ
2 (gallic acid)	43-44	ทึบแสง	น้ำเงิน-ดำ

- ปริมาณความชื้น (ภาคผนวก 1A)
ต้องไม่เกินร้อยละ 9.0 โดยน้ำหนัก
- ปริมาณเถ้ารวม (ภาคผนวก 2.1)
ต้องไม่เกินร้อยละ 4.0 โดยน้ำหนัก
- ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (ภาคผนวก 2.2)
ต้องไม่เกินร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนัก
- ปริมาณสารสกัดด้วย ethanol (ภาคผนวก 3A) ตัวทำละลาย คือ 95% v/v ethanol
ต้องไม่น้อยกว่าร้อยละ 16.0 โดยน้ำหนัก

- ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ (ภาคผนวก 3A) ตัวทำละลาย คือ น้ำที่อิมัลชันด้วย chloroform ต้องไม่น้อยกว่าร้อยละ 26.0 โดยน้ำหนัก
- ปริมาณ tannins ต้องไม่น้อยกว่าร้อยละ 20.0 โดยน้ำหนัก
 1. สารละลายตัวอย่าง
 - 1.1. ชั่งผงสมุนไพร 4 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร
 - 1.2. เติมน้ำ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ต้มบนอ่างอังไอน้ำ เป็นเวลา 30 นาที
 - 1.3. กรองสารละลายที่ได้ ใสลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 250 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำ
 2. ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ (T₁)
 - 2.1. ดูดสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงในถ้วยระเหย
 - 2.2. นำถ้วยระเหยที่บรรจุสารสกัด มาระเหยแห้ง
 - 2.3. อบถ้วยระเหยที่บรรจุสารสกัด ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จนได้น้ำหนักคงที่
 - 2.4. นำถ้วยระเหยที่บรรจุสารสกัด วางในโถดูดความชื้น ตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิขวดซึ่งเท่ากับอุณหภูมิห้อง (ใช้เวลาประมาณ 30-60 นาที)
 - 2.5. ชั่งถ้วยระเหยที่บรรจุสารสกัด และบันทึกค่าน้ำหนักที่ได้ (T₁)
 3. ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำที่ปราศจาก tannins (T₂)
 - 3.1. ดูดสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ชนิดมีฝาปิด ขนาด 250 มิลลิลิตร
 - 3.2. เติม hide powder 3 กรัม เขย่าต่อเนื่อง เป็นเวลา 60 นาที และกรองผ่าน Buchner funnel
 - 3.3. ดูดสารละลายที่กรองได้ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงในถ้วยระเหย
 - 3.4. ดำเนินการตามวิธีการหาปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ ข้อ 2.2 ถึง 2.4
 - 3.5. ชั่งถ้วยระเหยที่บรรจุสารสกัด และบันทึกค่าน้ำหนักที่ได้ (T₂)
 4. สารละลายเปรียบเทียบ (T₀)
 - 4.1. ดูดน้ำ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ชนิดมีฝาปิด ขนาด 250 มิลลิลิตร
 - 4.2. เติม hide powder 3 กรัม เขย่าต่อเนื่อง เป็นเวลา 60 นาที และกรองผ่าน Buchner funnel
 - 4.3. ดูดสารละลายที่กรองได้ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงในถ้วยระเหย
 - 4.4. ดำเนินการตามวิธีการหาปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ ข้อ 2.2 ถึง 2.4
 - 4.5. ชั่งถ้วยระเหยที่บรรจุสารสกัด และบันทึกค่าน้ำหนักที่ได้ (T₀)
 5. การคำนวณ

$$\text{Tannins} = \frac{T_1 - T_2 + T_0}{W_{\text{Sample}}} \times 500$$

โดยที่

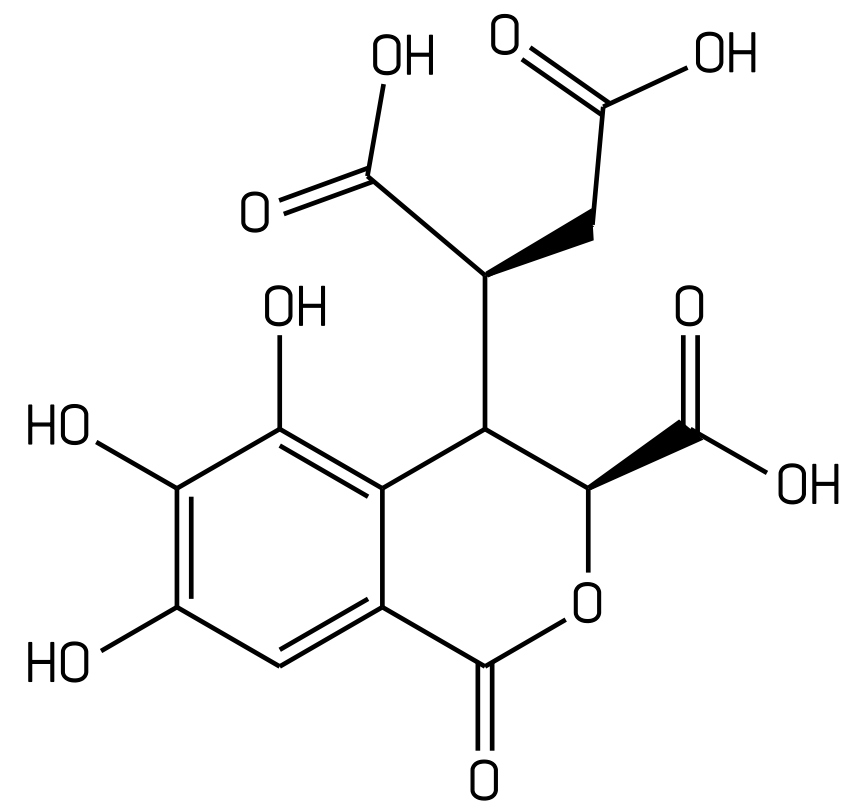
Tannins คือ ปริมาณ tannins (ร้อยละโดยน้ำหนัก)
 W_{Sample} คือ น้ำหนักของผงสมุนไพร (กรัม)

- ชื่อวิทยาศาสตร์ *Terminalia chebula* Retz.
- วงศ์ Combretaceae

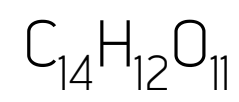
▪ สารสำคัญ

1. สารกลุ่ม tannins

Chebulinic acid, chebulic acid, gallic acid และ tannic acid

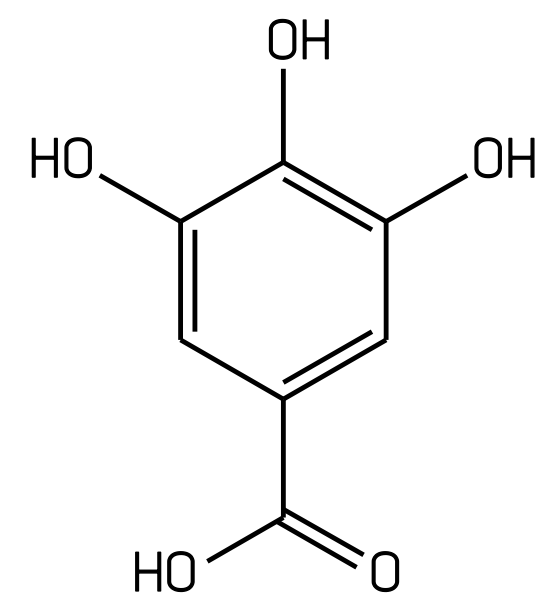


Chebolic acid

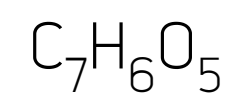


Mol. Wt.: 356.24

C, 47.20; H, 3.40; O, 49.40

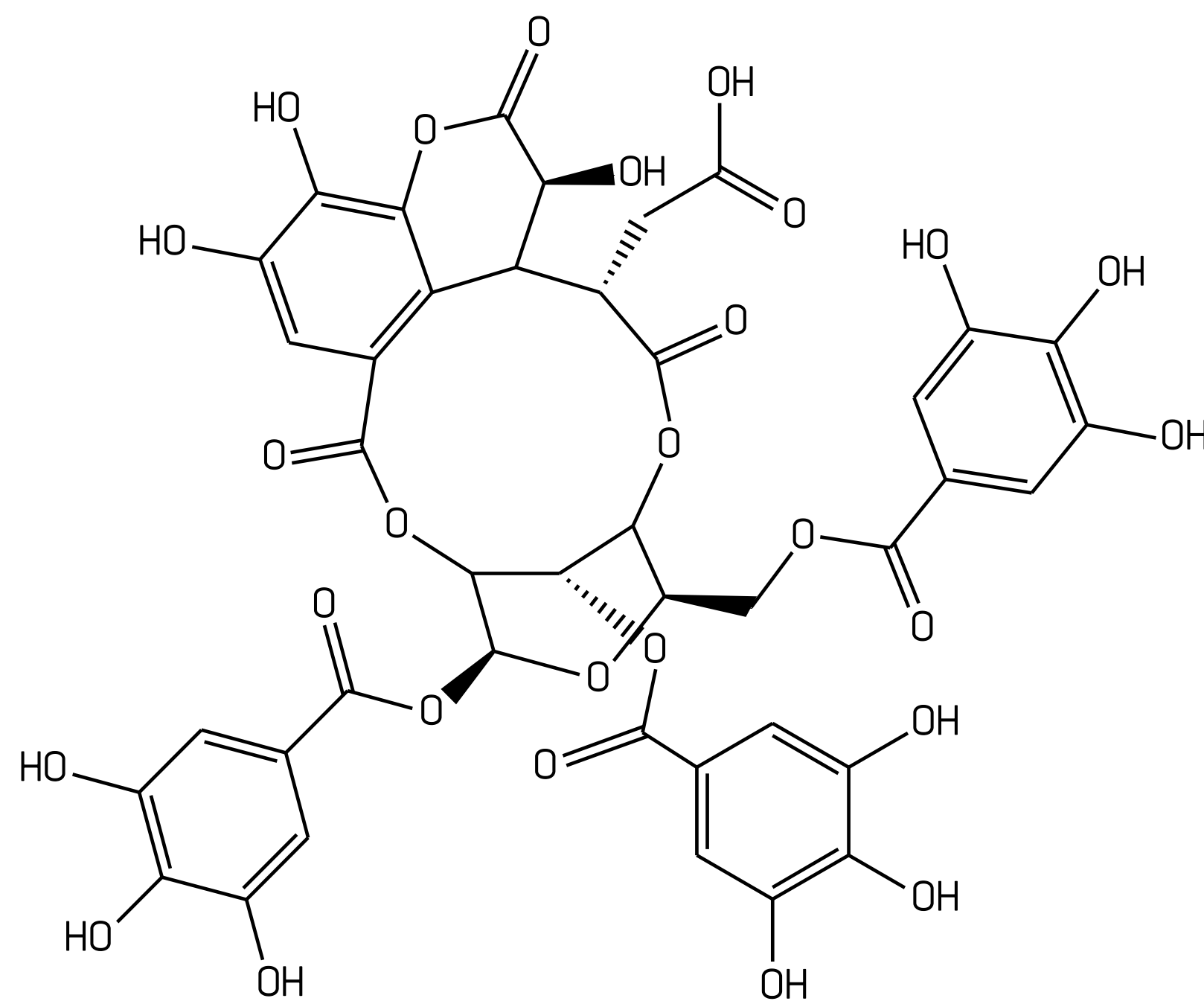


Gallic acid

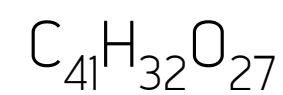


Mol. Wt.: 170.12

C, 49.42; H, 3.55; O, 47.02

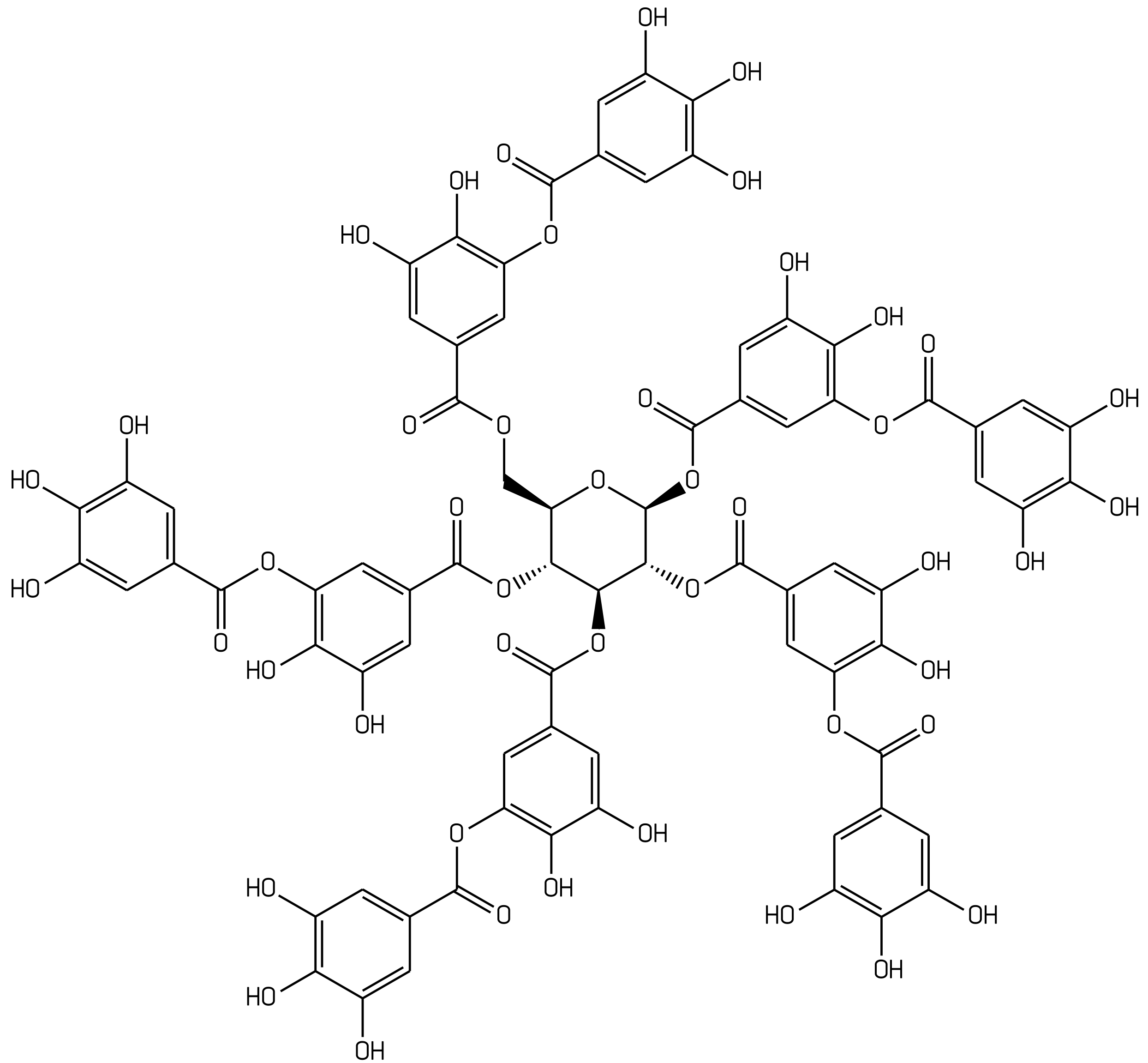


Chebulinic acid



Mol. Wt.: 956.68

C, 51.47; H, 3.37; O, 45.15



Tannic acid
 $C_{76}H_{52}O_{46}$
 Mol. Wt.: 1701.2
 C, 53.66; H, 3.08; O, 43.26

▪ เอกลักษณ์ทางเคมี

1. การตรวจสอบเบื้องต้น

การเตรียมสารละลาย A	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ ชั่งผงสมุนไพร 0.2 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 50 มิลลิลิตร ▪ เติมน้ำ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ต้มในอ่างอังไอน้ำ เป็นเวลา 5 นาที และกรอง ▪ นำสารละลายที่กรองได้ (สารละลาย A) มาใช้ในการตรวจสอบ 1 และ 2 	
การตรวจสอบ 1	ข้อกำหนด
<ul style="list-style-type: none"> ▪ เติมน้ำ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ▪ เติมน้ำสารละลาย iron(III) chloride TS 2-3 หยด 	สารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้ม
การตรวจสอบ 2	ข้อกำหนด
<ul style="list-style-type: none"> ▪ เติมน้ำสารละลาย A ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองชนิดที่มีฝาปิดสนิท และเขย่า เป็นเวลา 2-3 นาที 	ฟองคงทนต่อเนื่อง นาน 30 นาที

การตรวจสอบ 3	ข้อกำหนด
<ul style="list-style-type: none"> ▪ ชั่งผงสมุนไพร 0.5 กรัม ลงในขวดก้นกลม ขนาด 50 มิลลิลิตร ▪ เติม chloroform ปริมาตร 15 มิลลิลิตร สก๊าดโดยวิธี reflux เป็นเวลา 15 นาที และกรอง ▪ นำสารละลายที่กรองได้ มาระเหยแห้ง ▪ ละลายส่วนที่เหลือจากการระเหย ด้วย acetic anhydride ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ▪ เติม sulfuric acid ปริมาตร 1 มิลลิลิตร อย่างช้า ๆ 	<p>สารละลายชั้นบนเปลี่ยนเป็นสีเขียว และเกิดวงแหวนสีน้ำตาลระหว่างรอยต่อของสารละลายทั้งสองชั้น</p>
การตรวจสอบ 4	ข้อกำหนด
<ul style="list-style-type: none"> ▪ ชั่งผงสมุนไพร 0.5 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 50 มิลลิลิตร ▪ เติม ethanol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ต้มในอ่างอังไอน้ำ เป็นเวลา 20 นาที และกรอง ▪ ดูดสารละลายที่กรองได้ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ▪ เติมสารละลาย ninhydrin TS ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ต้มบนอ่างอังไอน้ำ เป็นเวลา 2-3 นาที 	<p>สารละลายเปลี่ยนเป็นสีม่วง</p>

2. การตรวจสอบเพื่อยืนยันผล

2.1. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

2.1.1. ละลายสารมาตรฐาน gallic acid 2 มิลลิกรัม ในสารละลาย 50% v/v ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

2.2. การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

2.2.1. ชั่งผงสมุนไพร 0.1 กรัม ลงในขวดก้นกลม ขนาด 50 มิลลิลิตร

2.2.2. เติมน้ำ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ต้มในอ่างอังไอน้ำ เป็นเวลา 15 นาที และกรอง

2.2.3. นำสารละลายที่กรองได้ มาระเหยแห้ง

2.2.4. ละลายส่วนที่เหลือจากการระเหย ด้วยน้ำ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

2.3. ระบบ TLC

หัวข้อ	รายละเอียด	วิธีดำเนินการ
เฟสคงที่	แผ่นกระดาษสารดูดซับ ประเภท silica gel GF ₂₅₄	
เฟสเคลื่อนที่	Toluene : ethyl acetate : formic acid (50 : 45 : 10)	1) ผสมและเทเฟสเคลื่อนที่ ลงในถัง TLC ให้มีความสูง ประมาณ 1 เซนติเมตร 2) ปิดฝาดัง TLC ให้สนิท ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 1 ชั่วโมง
ปริมาตรที่ใช้	2 ไมโครลิตร (สารละลาย มาตรฐาน) 4 ไมโครลิตร (สารละลาย ตัวอย่าง)	3) Spot สารละลายที่เตรียมได้ (2.1 และ 2.2) ลงบน เฟสคงที่ในแนวระดับเดียวกัน
ระยะทางของ เฟสเคลื่อนที่	12 เซนติเมตร	4) วางเฟสคงที่ในแนวระดับ ในถัง TLC ที่เตรียมไว้ 5) ปล่อยให้เฟสเคลื่อนที่ซึมขึ้นไปตามผิวของเฟสคงที่ สูง 12 เซนติเมตร
การตรวจวัด	(i) UV ₂₅₄ (ii) Anisaldehyde TS with UV ₃₆₆ (iii) Potassium hexacyanoferrate(III) TS; iron(III) chloride TS	6) นำเฟสคงที่ออกจากถัง TLC ตั้งทิ้งไว้จนแห้ง 7) ส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร 8) พ่นด้วยสารละลาย anisaldehyde TS และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร 9) พ่นด้วยสารละลาย potassium hexacyanoferrate(III) TS และพ่นทับด้วย สารละลาย iron(III) chloride TS

2.4. ผล TLC

Spot	ค่า R _f	ผลการตรวจวัด		
		(i)	(ii)	(iii)
1	1-7	-	ม่วง	-
2	8-12	กึ่งแสง	-	-
3	10-15	-	-	น้ำเงิน
4	15-19	กึ่งแสง	แดง	น้ำเงิน
5	21-23	กึ่งแสง	-	-
6	25-28	กึ่งแสง	ม่วง	น้ำเงิน
7 (gallic acid)	28-38	กึ่งแสง	ม่วง	น้ำเงิน
8	39-46	-	-	ขาว
9	47-50	กึ่งแสง	-	-
10	49-51	กึ่งแสง	-	น้ำเงิน

- ปริมาณความชื้น (ภาคผนวก 1A)
ต้องไม่เกินร้อยละ 11.0 โดยน้ำหนัก
- ปริมาณเถ้ารวม (ภาคผนวก 2.1)
ต้องไม่เกินร้อยละ 3.5 โดยน้ำหนัก

- ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (ภาคผนวก 2.2)
ต้องไม่เกินร้อยละ 0.6 โดยน้ำหนัก
- ปริมาณสารสกัดด้วย 70% v/v ethanol (ภาคผนวก 3A) ตัวทำละลาย คือ 70% v/v ethanol
ต้องไม่น้อยกว่าร้อยละ 29.0 โดยน้ำหนัก
- ปริมาณสารสกัดด้วย ethanol (ภาคผนวก 3A) ตัวทำละลาย คือ 95% v/v ethanol
ต้องไม่น้อยกว่าร้อยละ 20.0 โดยน้ำหนัก
- ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ (ภาคผนวก 3A) ตัวทำละลาย คือ น้ำที่อิมัลชันด้วย chloroform
ต้องไม่น้อยกว่าร้อยละ 28.0 โดยน้ำหนัก

- ดัชนีการเกิดฟอง
ต้องไม่น้อยกว่า 170

1. วิธีดำเนินการ

- 1.1. ชั่งผงสมุนไพร 1 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 500 มิลลิลิตร
- 1.2. เติมน้ำ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ต้มบนอ่างอังไอน้ำ เป็นเวลา 30 นาที กรองลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำ
- 1.3. ดูดสารละลายที่ได้ ลงในหลอดทดลองชนิดที่มีฝาปิดสนิท (ขนาด 16 มิลลิเมตร x 16 เซนติเมตร) และปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำ ดังตาราง

ลำดับที่ของหลอดทดลอง	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ปริมาตรของสารละลาย (มิลลิลิตร)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ปริมาตรของน้ำ (มิลลิลิตร)	9	8	7	6	5	4	3	2	1	-

- 1.4. ปิดฝาให้สนิท เขย่าขึ้น-ลง ด้วยความถี่ 2 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 15 วินาที
- 1.5. ตั้งทิ้งไว้ เป็นเวลา 15 นาที และวัดความสูงของฟองที่เกิดขึ้น

2. การคำนวณ

$$\text{Foaming index} = \frac{1000}{a}$$

โดยที่

Foaming index คือ ดัชนีการเกิดฟอง

a คือ ปริมาตรของสารละลายในหลอดทดลองแรกที่ทำให้ความสูงของฟองที่เกิดขึ้นสูงไม่น้อยกว่า 1 เซนติเมตร

- ปริมาณ tannins
ต้องไม่น้อยกว่าร้อยละ 14.0 โดยน้ำหนัก

1. สารละลายตัวอย่าง

- 1.1. ชั่งผงสมุนไพร 4 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร
- 1.2. เติมน้ำ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ต้มบนอ่างอังไอน้ำ เป็นเวลา 30 นาที
- 1.3. กรองสารละลายที่ได้ ใส่น้ำลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 250 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำ

2. ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ (T₁)

- 2.1. ดูดสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงในถ้วยระเหย
- 2.2. นำด้วยระเหยที่บรรจุสารสกัด มาระเหยแห้ง
- 2.3. อบด้วยระเหยที่บรรจุสารสกัด ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จนได้น้ำหนักคงที่
- 2.4. นำด้วยระเหยที่บรรจุสารสกัด วางในโถดูดความชื้น ตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิขวดซึ่งเท่ากับอุณหภูมิห้อง (ใช้เวลาประมาณ 30-60 นาที)
- 2.5. ชั่งด้วยระเหยที่บรรจุสารสกัด และบันทึกค่าน้ำหนักที่ได้ (T₁)

3. ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำที่ปราศจาก tannins (T₂)

- 3.1. ดูดสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ชนิดมีฝาปิด ขนาด 250 มิลลิลิตร
- 3.2. เติม hide powder 3 กรัม เขย่าต่อเนื่อง เป็นเวลา 60 นาที และกรองผ่าน Buchner funnel
- 3.3. ดูดสารละลายที่กรองได้ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงในถ้วยระเหย
- 3.4. ดำเนินการตามวิธีการหาปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ ข้อ 2.2 ถึง 2.4
- 3.5. ชั่งด้วยระเหยที่บรรจุสารสกัด และบันทึกค่าน้ำหนักที่ได้ (T₂)

4. สารละลายเปรียบเทียบกับ (T₀)

- 4.1. ดูนํ้า ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ชนิดมีฝาปิด ขนาด 250 มิลลิลิตร
- 4.2. เติม hide powder 3 กรัม เขย่าต่อเนื่อง เป็นเวลา 60 นาที และกรองผ่าน Buchner funnel
- 4.3. ดูดสารละลายที่กรองได้ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงในถ้วยระเหย
- 4.4. ดำเนินการตามวิธีการหาปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ ข้อ 2.2 ถึง 2.4
- 4.5. ชั่งด้วยระเหยที่บรรจุสารสกัด และบันทึกค่าน้ำหนักที่ได้ (T₀)

5. การคำนวณ

$$\text{Tannins} = \frac{T_1 - T_2 + T_0}{W_{\text{Sample}}} \times 500$$

โดยที่

Tannins คือ ปริมาณ tannins (ร้อยละโดยน้ำหนัก)

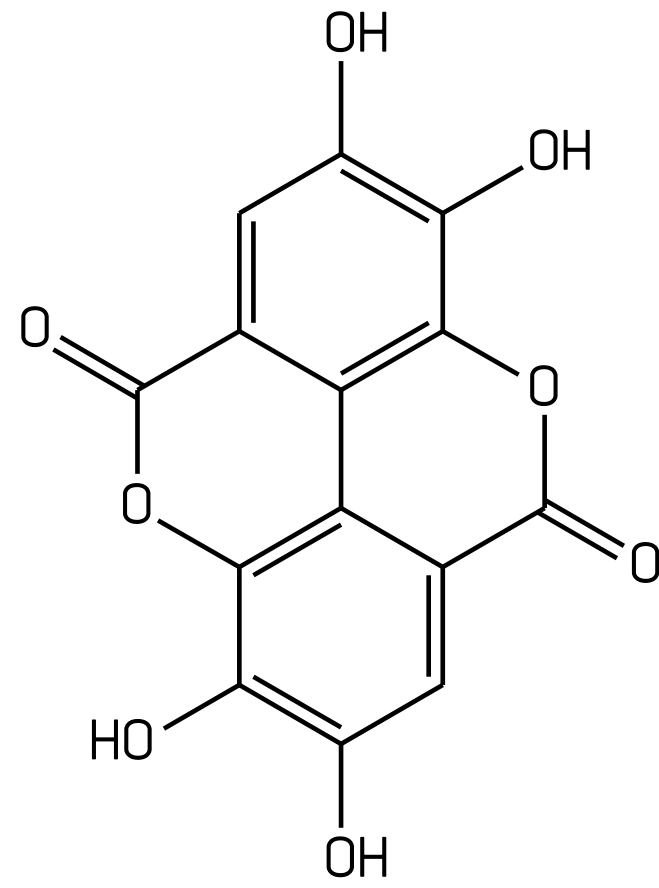
W_{Sample} คือ น้ำหนักของผงสมุนไพร (กรัม)

- ชื่อวิทยาศาสตร์ *Terminalia bellirica* (Gaertn.) Roxb.
- ชื่อพ้อง *T. belerica* Roxb., *Myrobalanus bellirica* Gaertn.
- วงศ์ Combretaceae

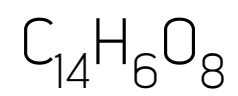
▪ สารสำคัญ

1. สารกลุ่ม tannins

Chebulagic acid, ellagic acid และ gallic acid

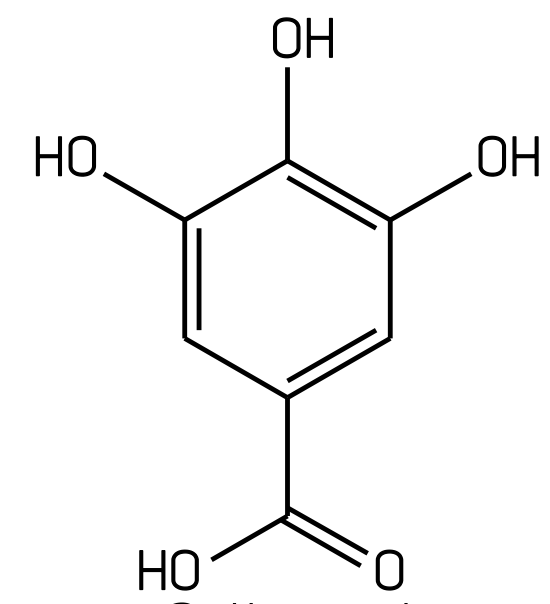


Ellagic acid

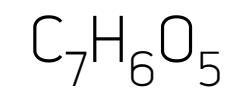


Mol. Wt.: 302.19

C, 55.64; H, 2.00; O, 42.36

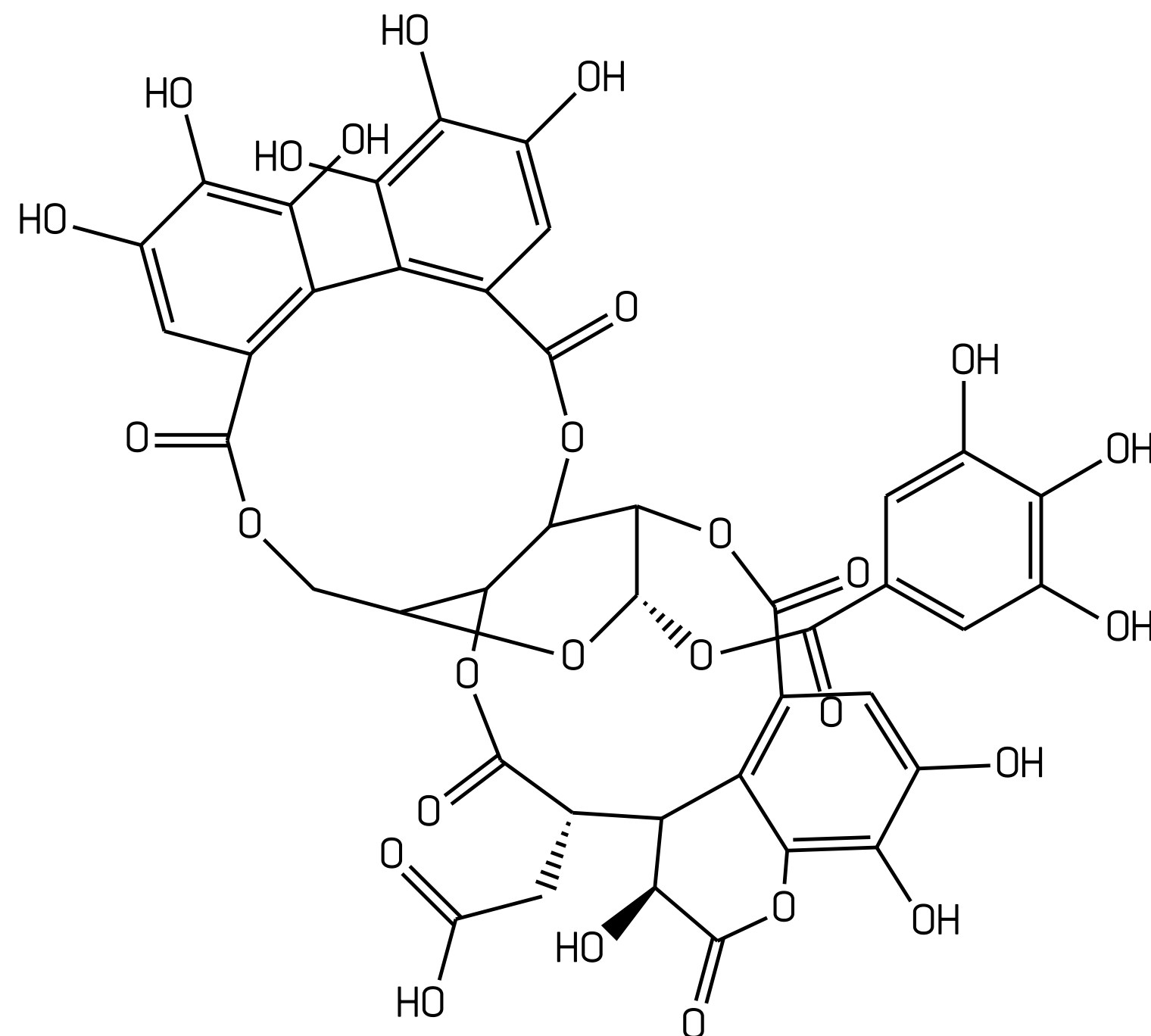


Gallic acid

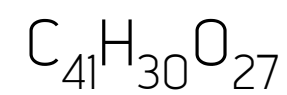


Mol. Wt.: 170.12

C, 49.42; H, 3.55; O, 47.02



Chebulagic acid



Mol. Wt.: 954.66

C, 51.58; H, 3.17; O, 45.25

▪ เอกลักษณ์ทางเคมี

1. การตรวจสอบเบื้องต้น

การเตรียมสารละลาย A	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ ชั่งผงสมุนไพร 0.2 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 50 มิลลิลิตร ▪ เติมน้ำ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ต้มในอ่างอังไอน้ำ เป็นเวลา 5 นาที และกรอง ▪ นำสารละลายที่กรองได้ (สารละลาย A) มาใช้ในการตรวจสอบ 1 และ 2 	
การตรวจสอบ 1	ข้อกำหนด
<ul style="list-style-type: none"> ▪ เติมสารละลาย A ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ▪ เติมสารละลาย iron(III) chloride TS 2-3 หยด 	สารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้ม
การตรวจสอบ 2	ข้อกำหนด
<ul style="list-style-type: none"> ▪ เติมสารละลาย A ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองชนิดที่มีฝาปิดสนิท และเขย่า เป็นเวลา 2-3 นาที 	ไม่มีฟองเกิดขึ้น
การตรวจสอบ 3	ข้อกำหนด
<ul style="list-style-type: none"> ▪ ชั่งผงสมุนไพร 0.5 กรัม ลงในขวดก้นกลม ขนาด 50 มิลลิลิตร ▪ เติม chloroform ปริมาตร 15 มิลลิลิตร สกัดโดยวิธี reflux เป็นเวลา 15 นาที และกรอง ▪ นำสารละลายที่กรองได้ มาระเหยแห้ง ▪ ละลายส่วนที่เหลือจากการระเหย ด้วย acetic anhydride ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ▪ เติม sulfuric acid ปริมาตร 1 มิลลิลิตร อย่างช้า ๆ 	สารละลายชั้นบนเปลี่ยนเป็นสีเขียว และเกิดวงแหวนสีน้ำตาลระหว่างรอยต่อของสารละลายทั้งสองชั้น
การตรวจสอบ 4	ข้อกำหนด
<ul style="list-style-type: none"> ▪ ชั่งผงสมุนไพร 0.5 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 50 มิลลิลิตร ▪ เติม ethanol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ต้มในอ่างอังไอน้ำ เป็นเวลา 20 นาที และกรอง ▪ ดูดสารละลายที่กรองได้ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ▪ เติมสารละลาย ninhydrin TS ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ต้มบนอ่างอังไอน้ำ เป็นเวลา 2-3 นาที 	สารละลายเปลี่ยนเป็นสีม่วง

2. การตรวจสอบเพื่อยืนยันผล

2.1. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

2.1.1. ละลายสารมาตรฐาน gallic acid 2 มิลลิกรัม ในสารละลาย 50% v/v ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

2.2. การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

2.2.1. ชั่งผงสมุนไพร 0.1 กรัม ลงในขวดก้นกลม ขนาด 50 มิลลิลิตร

2.2.2. เติมน้ำ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ต้มในอ่างอังไอน้ำ เป็นเวลา 15 นาที และกรอง

2.2.3. นำสารละลายที่กรองได้ มาระเหยแห้ง

2.2.4. ละลายส่วนที่เหลือจากการระเหย ด้วยน้ำ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

2.3. ระบบ TLC

หัวข้อ	รายละเอียด	วิธีดำเนินการ
เฟสคงที่	แผ่นกระดาษสารดูดซับ ประเภท silica gel GF ₂₅₄	
เฟสเคลื่อนที่	Toluene : ethyl acetate : formic acid (50 : 45 : 10)	1) ผสมและเทเฟสเคลื่อนที่ ลงในถัง TLC ให้มีความสูง ประมาณ 1 เซนติเมตร 2) ปิดฝาดัง TLC ให้สนิท ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 1 ชั่วโมง
ปริมาตรที่ใช้	2 ไมโครลิตร (สารละลาย มาตรฐาน) 4 ไมโครลิตร (สารละลาย ตัวอย่าง)	3) Spot สารละลายที่เตรียมได้ (2.1 และ 2.2) ลงบน เฟสคงที่ในแนวระดับเดียวกัน
ระยะทางของ เฟสเคลื่อนที่	12 เซนติเมตร	4) วางเฟสคงที่ในแนวระดับ ในถัง TLC ที่เตรียมไว้ 5) ปล่อยให้เฟสเคลื่อนที่ซึมขึ้นไปตามผิวของเฟสคงที่ สูง 12 เซนติเมตร
การตรวจวัด	(i) UV ₂₅₄ (ii) Anisaldehyde TS with UV ₃₆₆ (iii) Potassium hexacyanoferrate(III) TS; iron(III) chloride TS	6) นำเฟสคงที่ออกจากถัง TLC ตั้งทิ้งไว้จนแห้ง 7) ส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร 8) พ่นด้วยสารละลาย anisaldehyde TS และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร 9) พ่นด้วยสารละลาย potassium hexacyanoferrate(III) TS และพ่นทับด้วย สารละลาย iron(III) chloride TS

2.4. ผล TLC

Spot	ค่า R _f	ผลการตรวจวัด		
		(i)	(ii)	(iii)
1	2-4	-	ม่วง	-
2	4-5	ทึบแสง	-	-
3	5-7	-	-	น้ำเงิน
4	9-11	-	เหลือง	-
5	11-17	ทึบแสง	-	-
6	22-25	ทึบแสง	-	-
7	27-30	ทึบแสง	-	น้ำเงิน
8	41-46	ทึบแสง	ม่วง	น้ำเงิน
9 (gallic acid)	47-50	ทึบแสง	ม่วง	น้ำเงิน
10	52-56	ทึบแสง	-	-
11	58-62	ทึบแสง	-	น้ำเงิน
12	64-69	ทึบแสง	-	-

- ปริมาณความชื้น (ภาคผนวก 1A)
ต้องไม่เกินร้อยละ 11.0 โดยน้ำหนัก

- ปริมาณเด็กรวม (ภาคผนวก 2.1)
ต้องไม่เกินร้อยละ 5.0 โดยน้ำหนัก
- ปริมาณเด็กรวมที่ไม่ละลายในกรด (ภาคผนวก 2.2)
ต้องไม่เกินร้อยละ 0.6 โดยน้ำหนัก
- ปริมาณสารสกัดด้วย 70% v/v ethanol (ภาคผนวก 3A) ตัวทำละลาย คือ 70% v/v ethanol
ต้องไม่น้อยกว่าร้อยละ 29.0 โดยน้ำหนัก
- ปริมาณสารสกัดด้วย ethanol (ภาคผนวก 3A) ตัวทำละลาย คือ 95% v/v ethanol
ต้องไม่น้อยกว่าร้อยละ 17.0 โดยน้ำหนัก
- ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ (ภาคผนวก 3A) ตัวทำละลาย คือ น้ำที่อิมัลชันด้วย chloroform
ต้องไม่น้อยกว่าร้อยละ 24.0 โดยน้ำหนัก
- ปริมาณ tannins
ต้องไม่น้อยกว่าร้อยละ 16.0 โดยน้ำหนัก
 1. สารละลายตัวอย่าง
 - 1.1. ชั่งผงสมุนไพร 4 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร
 - 1.2. เติมน้ำ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ต้มบนอ่างอังไอน้ำ เป็นเวลา 30 นาที
 - 1.3. กรองสารละลายที่ได้ ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 250 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำ
 2. ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ (T₁)
 - 2.1. ดูดสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงในถ้วยระเหย
 - 2.2. นำถ้วยระเหยที่บรรจุสารสกัด มาระเหยแห้ง
 - 2.3. อบถ้วยระเหยที่บรรจุสารสกัด ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จนได้น้ำหนักคงที่
 - 2.4. นำถ้วยระเหยที่บรรจุสารสกัด วางในโถดูดความชื้น ตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิขวดซึ่งเท่ากับอุณหภูมิห้อง (ใช้เวลาประมาณ 30-60 นาที)
 - 2.5. ชั่งถ้วยระเหยที่บรรจุสารสกัด และบันทึกค่าน้ำหนักที่ได้ (T₁)
 3. ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำที่ปราศจาก tannins (T₂)
 - 3.1. ดูดสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ชนิดมีฝาปิด ขนาด 250 มิลลิลิตร
 - 3.2. เติม hide powder 3 กรัม เขย่าต่อเนื่อง เป็นเวลา 60 นาที และกรองผ่าน Buchner funnel
 - 3.3. ดูดสารละลายที่กรองได้ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงในถ้วยระเหย
 - 3.4. ดำเนินการตามวิธีการหาปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ ข้อ 2.2 ถึง 2.4
 - 3.5. ชั่งถ้วยระเหยที่บรรจุสารสกัด และบันทึกค่าน้ำหนักที่ได้ (T₂)
 4. สารละลายเปรียบเทียบกับ (T₀)
 - 4.1. ดูดน้ำ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ชนิดมีฝาปิด ขนาด 250 มิลลิลิตร
 - 4.2. เติม hide powder 3 กรัม เขย่าต่อเนื่อง เป็นเวลา 60 นาที และกรองผ่าน Buchner funnel
 - 4.3. ดูดสารละลายที่กรองได้ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงในถ้วยระเหย
 - 4.4. ดำเนินการตามวิธีการหาปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ ข้อ 2.2 ถึง 2.4
 - 4.5. ชั่งถ้วยระเหยที่บรรจุสารสกัด และบันทึกค่าน้ำหนักที่ได้ (T₀)
 5. การคำนวณ

$$\text{Tannins} = \frac{T_1 - T_2 + T_0}{W_{\text{Sample}}} \times 500$$

โดยที่

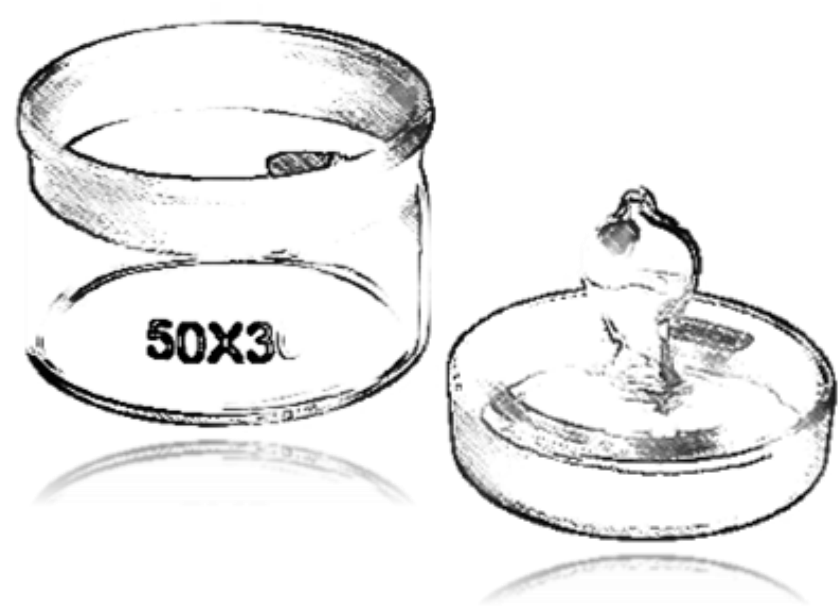
Tannins คือ ปริมาณ tannins (ร้อยละโดยน้ำหนัก)
 W_{Sample} คือ น้ำหนักของผงสมุนไพร (กรัม)



- ภาคผนวก 1A ปริมาณความชื้น โดยวิธีกราวิเมตริก
- เครื่องแก้วและอุปกรณ์

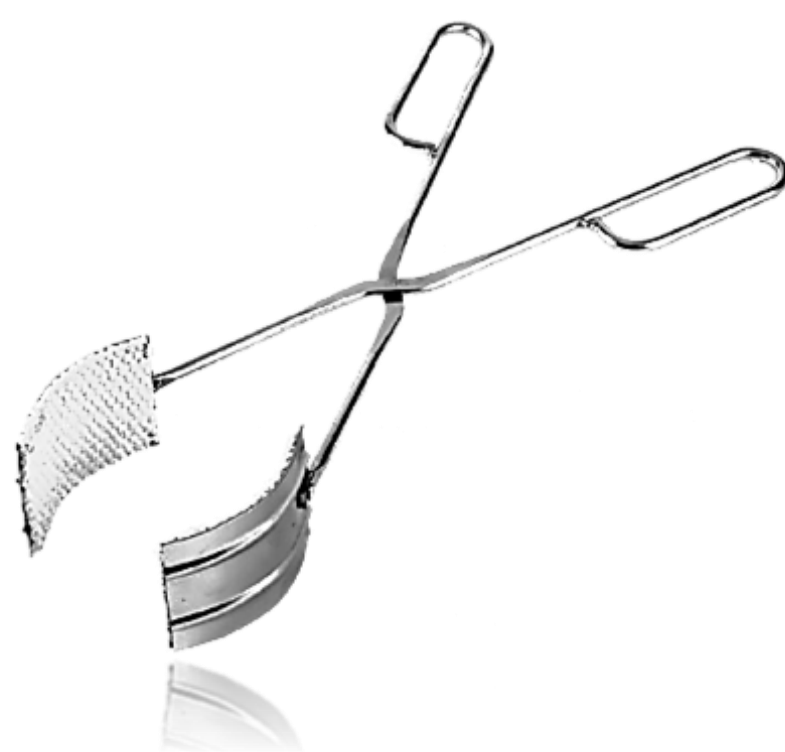
ขวดชั่ง

(Weighing bottle)



คีมคีบ

(Beaker tongs)



ช้อนตักสาร

(Spatula)

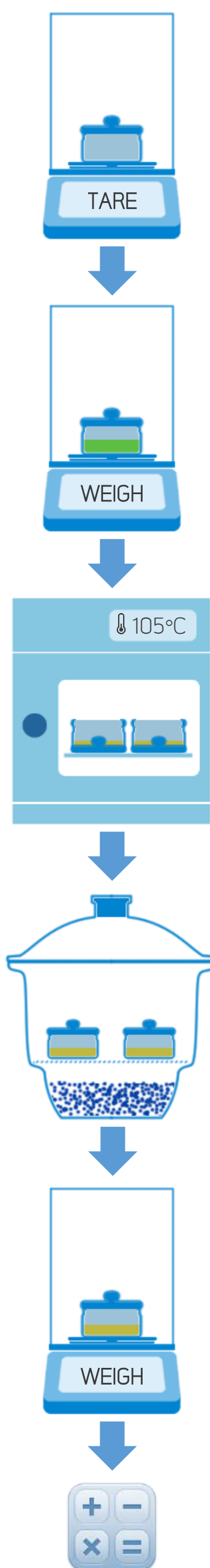


โถดูดความชื้น

(Desiccator)



▪ วิธีดำเนินการ



1. ชั่งขวดชั่งพร้อมฝา และบันทึกค่าน้ำหนักที่ได้ (W_0)
2. ชั่งผงสมุนไพร 5 กรัม (W_{Sample}) ลงในขวดชั่ง เคลี่ยผงสมุนไพรให้เรียบ
3. อบขวดชั่งที่บรรจุตัวอย่างพร้อมฝา (เปิดฝา) ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จนได้น้ำหนักคงที่*
4. นำขวดชั่งที่บรรจุตัวอย่างพร้อมฝา (ปิดฝา) วางในโถดูดความชื้น ตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิขวดชั่ง เท่ากับอุณหภูมิห้อง (ใช้เวลาประมาณ 30-60 นาที)
5. ชั่งขวดชั่งที่บรรจุตัวอย่างพร้อมฝา และบันทึกค่าน้ำหนักที่ได้ (W_1)
6. คำนวณค่าร้อยละของน้ำหนัที่หายไปจากผงสมุนไพรที่ใช้ (น้ำหนัที่หายไป คือ ปริมาณความชื้นในสมุนไพร)

*น้ำหนักคงที่ หมายถึง น้ำหนักที่ได้จากการชั่งน้ำหนักติดต่อกัน 2 ครั้ง มีค่าต่างกันไม่เกิน 2.5 มิลลิกรัม/กรัมของผงสมุนไพรที่ใช้ โดยการชั่งครั้งที่สองเพื่อหาความต่างของน้ำหนักจะกระทำภายหลังจากการอบที่ใช้เวลาเพิ่มขึ้นไม่เกิน 1 ชั่วโมง

▪ การคำนวณ

$$\text{Moisture} = \frac{W_{\text{Sample}} - (W_1 - W_0)}{W_{\text{Sample}}} \times 100$$

โดยที่

Moisture	คือ	ปริมาณความชื้น (ร้อยละโดยน้ำหนัก)
W_0	คือ	น้ำหนักของขวดชั่งพร้อมฝา (กรัม)
W_1	คือ	น้ำหนักคงที่ของขวดชั่งที่บรรจุตัวอย่างพร้อมฝา (กรัม)
W_{Sample}	คือ	น้ำหนักของผงสมุนไพร (กรัม)

- ภาคผนวก 1B ปริมาณความชื้น โดยวิธีการกลั่นด้วยโทลูอิน
- เครื่องแก้วและอุปกรณ์

กรวยพลาสติก

(Funnel)



ขวดก้นกลม

(Round-bottom flask)



ชุดกลั่น

(Dean-Stark apparatus)



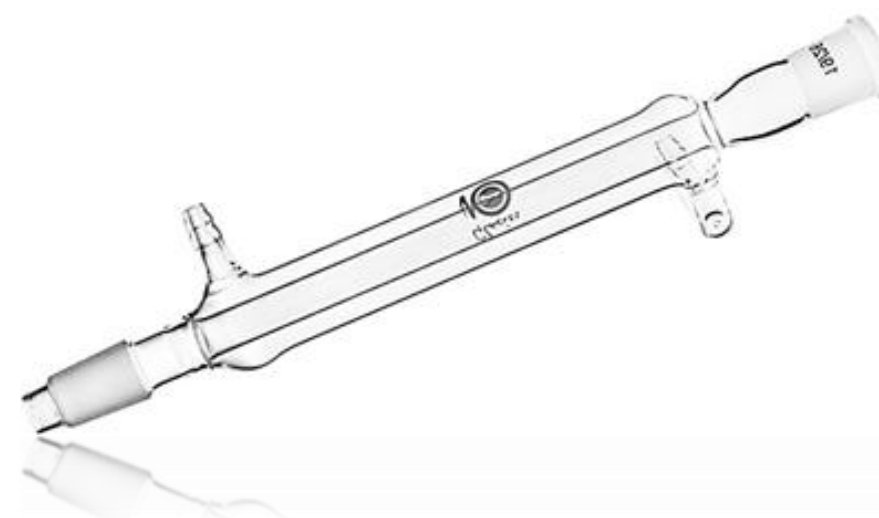
ช้อนตักสาร

(Spatula)



ชุดควบแน่น

(Condenser)



บีกเกอร์

(Beaker)

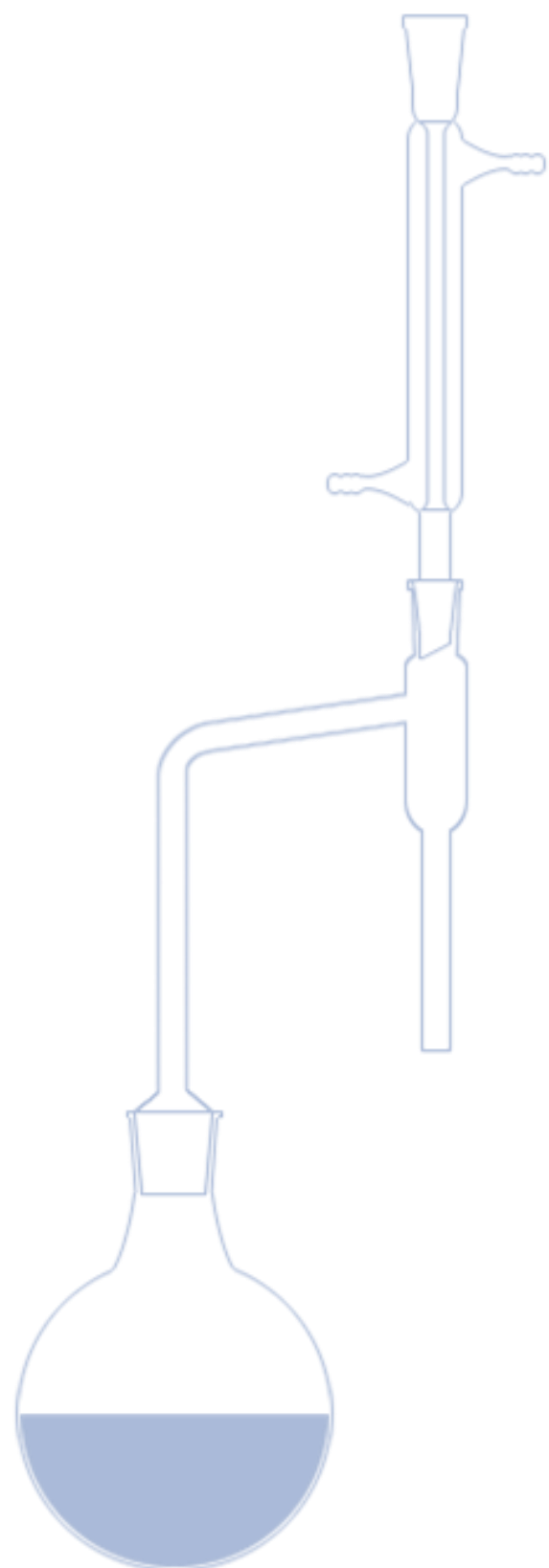


ปิเปต

(Volumetric pipette)



▪ วิธีดำเนินการ



1. เติม toluene ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ลงในขวดก้นกลม ขนาด 500 มิลลิลิตร
2. เติมน้ำ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร
3. เติม anti-bumping granule ลงไปเล็กน้อย (ประมาณ 4-5 เม็ด)
4. สก๊ตโดยวิธีการกลั่น ที่อุณหภูมิ 145-155 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
5. อ่านค่าปริมาตรของน้ำที่ได้ (V_0)
6. เติมผงสมุนไพร 10 กรัม (W_{Sample})
7. สก๊ตโดยวิธีการกลั่น ที่อุณหภูมิ 145-155 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
8. อ่านค่าปริมาตรของน้ำที่ได้ (V_1)
9. คำนวณหาร้อยละของปริมาณความชื้น

▪ การคำนวณ

$$\text{Moisture} = \frac{V_1 - V_0}{W_{\text{Sample}}} \times 100$$

โดยที่

Moisture	คือ ปริมาณความชื้น (ร้อยละโดยปริมาตรต่อน้ำหนัก)
V_0	คือ ปริมาตรของน้ำที่ได้จากการกลั่น ก่อนเติมสมุนไพร (มิลลิลิตร)
V_1	คือ ปริมาตรของน้ำที่ได้จากการกลั่น หลังเติมสมุนไพร (มิลลิลิตร)
W_{Sample}	คือ น้ำหนักของผงสมุนไพร (กรัม)



▪ เครื่องแก้วและอุปกรณ์

กรวยกรอง

(Funnel)



กระบอกตวง

(Graduated cylinder)



คีมคีบ

(Crucible tongs)



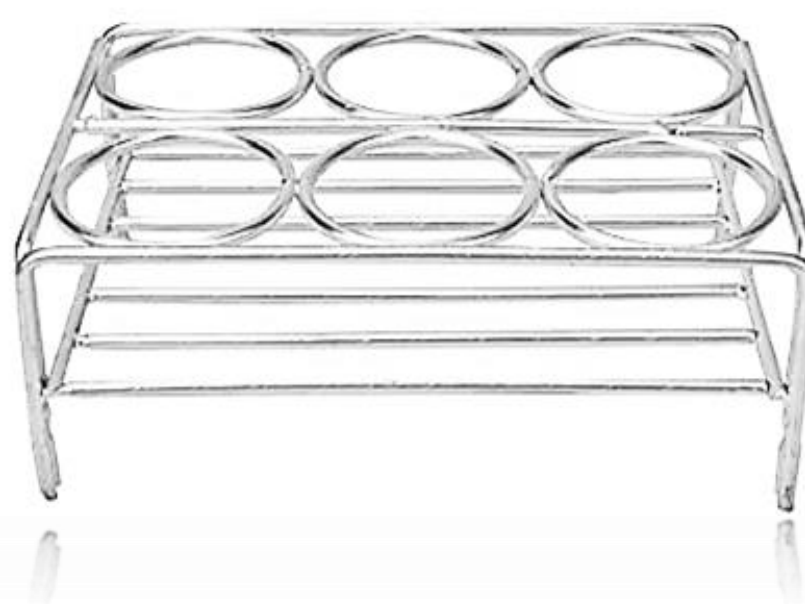
ช้อนตักสาร

(Spatula)



ตะแกรง

(Rack)



ถ้วยกระเบื้อง

(Crucible)



โถดูดความชื้น

(Desiccator)



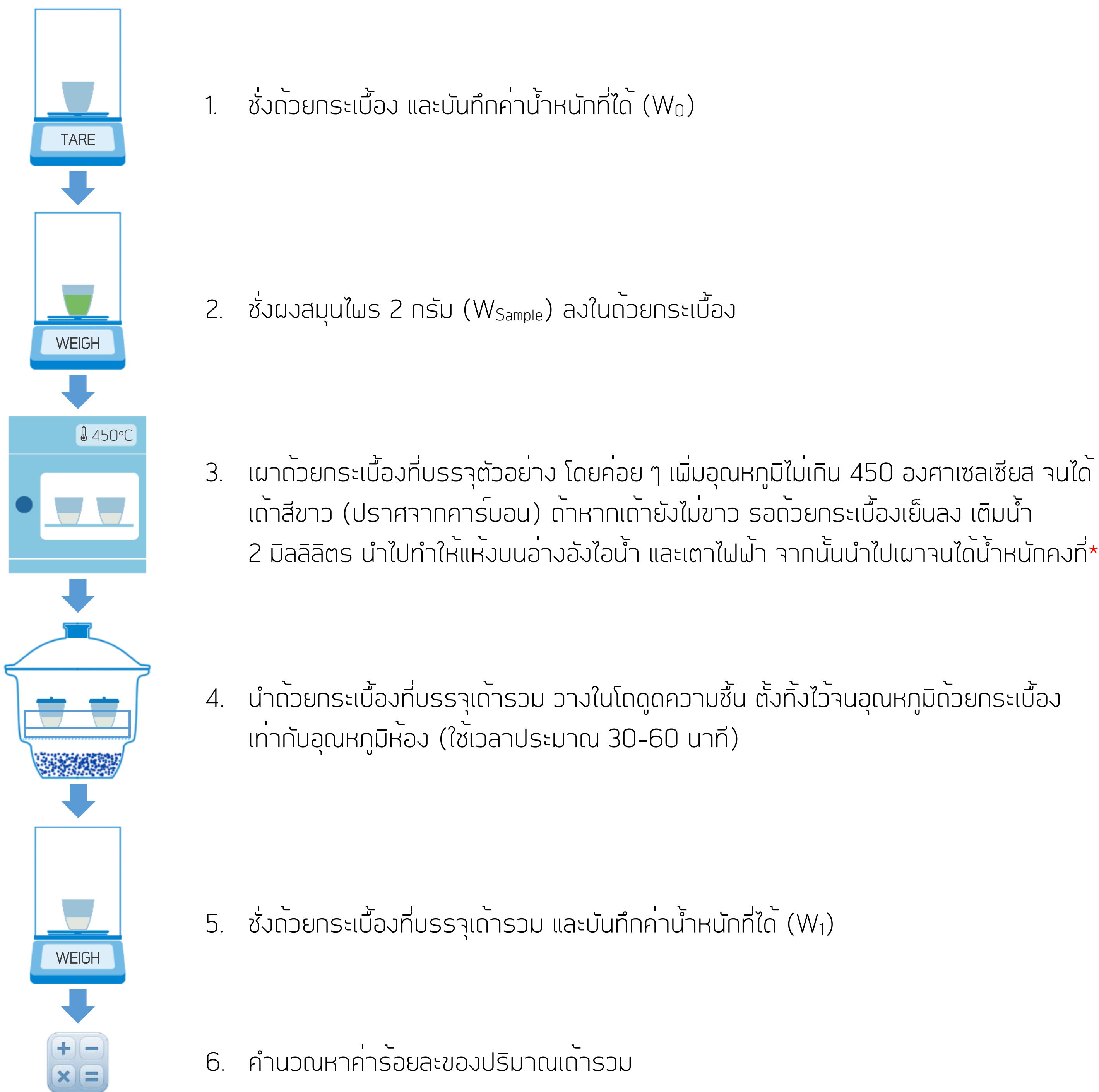
หลอดหยด

(Dropper)



▪ ภาคผนวก 2.1 ปริมาณเต้ารวม

▪ วิธีดำเนินการ



*น้ำหนักคงที่ หมายถึง น้ำหนักที่ได้จากการชั่งน้ำหนักติดต่อกัน 2 ครั้ง มีค่าต่างกันไม่เกิน 0.5 มิลลิกรัม/กรัมของผงสมุนไพรที่ใช้ โดยการชั่งครั้งที่สองเพื่อหาความต่างของน้ำหนักจะกระทำภายหลังจากการเผาที่ใช้เวลาเพิ่มขึ้นไม่เกิน 1 ชั่วโมง

▪ การคำนวณ

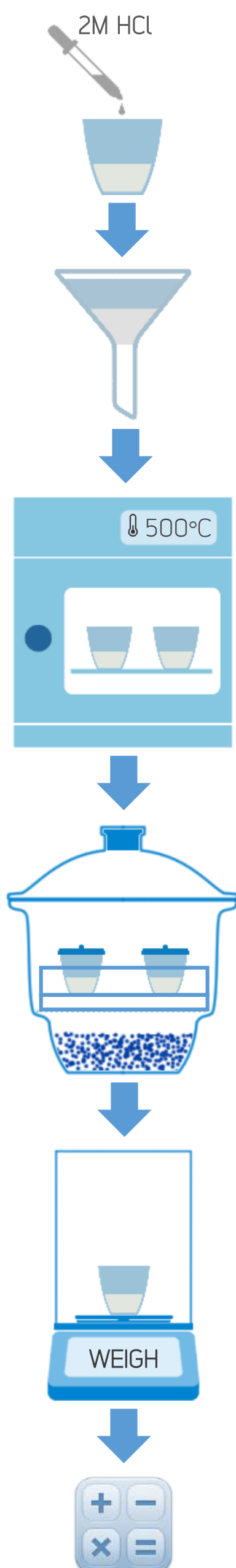
$$\text{Total ash} = \frac{W_1 - W_0}{W_{\text{Sample}}} \times 100$$

โดยที่

Total ash	คือ ปริมาณเต้ารวม (ร้อยละโดยน้ำหนัก)
W_0	คือ น้ำหนักของถ้วยกระเบื้อง (กรัม)
W_1	คือ น้ำหนักคงที่ของถ้วยกระเบื้องที่บรรจุเต้ารวม (กรัม)
W_{Sample}	คือ น้ำหนักของผงสมุนไพร (กรัม)

ภาคผนวก 2.2 ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด

วิธีดำเนินการ



1. เติมสารละลาย 2M hydrochloric acid ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงในถ้วยกระเบื้องที่มีเถ้ารวม ตมนาน 5 นาที
2. กรองผ่านกระดาษกรองชนิดปราศจากเถ้า ล้างตะกอนด้วยน้ำร้อนจนน้ำล้างตะกอนเป็นกลาง (ตรวจสอบด้วยกระดาษลิตมัส)
3. นำกระดาษกรองที่มีเถ้า ใส่ลงในถ้วยกระเบื้องใบเดิม ทำให้แห้งบนเตาไฟฟ้า และนำไปเผาที่ อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่*
4. นำถ้วยกระเบื้องที่บรรจุเถ้าที่ไม่ละลายในกรด วางในโถดูดความชื้น ตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิ ด้วยกระเบื้องเท่ากับอุณหภูมิห้อง (ใช้เวลาประมาณ 30 - 60 นาที)
5. ชั่งด้วยถ้วยกระเบื้องที่บรรจุเถ้าที่ไม่ละลายในกรด และบันทึกค่าน้ำหนักที่ได้ (W_2)
6. คำนวณหาค่าร้อยละของปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด

*น้ำหนักคงที่ หมายถึง น้ำหนักที่ได้จากการชั่งน้ำหนักติดต่อกัน 2 ครั้ง มีค่าต่างกันไม่เกิน 0.5 มิลลิกรัม/กรัมของผงสมุนไพรที่ใช้ โดยการชั่งครั้งที่สองเพื่อหาความต่างของน้ำหนักจะกระทำภายหลังจากการเผาที่ใช้เวลาเพิ่มขึ้นไม่เกิน 1 ชั่วโมง

การคำนวณ

$$\text{Acid-insoluble ash} = \frac{W_2 - W_0}{W_{\text{Sample}}} \times 100$$

โดยที่

Ash	คือ ปริมาณเถ้า (ร้อยละโดยน้ำหนัก)
W_0	คือ น้ำหนักของถ้วยกระเบื้อง (กรัม)
W_2	คือ น้ำหนักคงที่ของถ้วยกระเบื้องที่บรรจุเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (กรัม)
W_{Sample}	คือ น้ำหนักของผงสมุนไพร (กรัม)

- ภาคผนวก 3A ปริมาณสารสกัด โดยวิธีการหมัก
- เครื่องแก้วและอุปกรณ์

ขวดรูปชมพู่

(Erlenmeyer flask)



คีมคีบ

(Tongs)



ช้อนตักสาร

(Spatula)



ถ้วยระเหย

(Evaporating dish)



โถดูดความชื้น

(Desiccator)

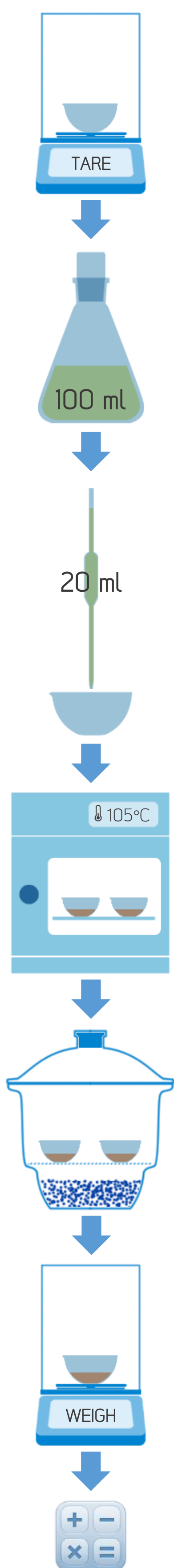


ปิเปต

(Volumetric pipette)



▪ วิธีดำเนินการ



1. ชั่งด้วยระเหย และบันทึกค่าน้ำหนักที่ได้ (W_0)
2. ชั่งผงสมุนไพร 5 กรัม (W_{Sample}) ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร
3. เติมตัวทำละลาย ปริมาตร 100 มิลลิลิตร สกัดโดยวิธีการหมัก เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และกรอง
4. เปิดสารสกัดที่กรองได้ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในถ้วยระเหย
5. นำด้วยระเหยที่บรรจุสารสกัด มาระเหยแห้ง
6. อบด้วยระเหยที่บรรจุสารสกัด ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จนได้น้ำหนักคงที่*
7. นำด้วยระเหยที่บรรจุสารสกัด วางในโถดูดความชื้น ตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิขวดซึ่งเท่ากับอุณหภูมิห้อง (ใช้เวลาประมาณ 30 - 60 นาที)
8. ชั่งด้วยระเหยที่บรรจุสารสกัด และบันทึกค่าน้ำหนักที่ได้ (W_1)
9. คำนวณหาร้อยละของปริมาณสารสกัด

*น้ำหนักคงที่ หมายถึง น้ำหนักที่ได้จากการชั่งน้ำหนักติดต่อกัน 2 ครั้ง มีค่าต่างกันไม่เกิน 2.5 มิลลิกรัม/กรัมของผงสมุนไพรที่ใช้ โดยการชั่งครั้งที่สองเพื่อหาความต่างของน้ำหนักจะกระทำภายหลังจากการอบที่ใช้เวลาเพิ่มขึ้นไม่เกิน 1 ชั่วโมง

▪ การคำนวณ

$$\text{Extractive} = \frac{W_1 - W_0}{W_{\text{Sample}}} \times 500$$

โดยที่

Extractive	คือ	ปริมาณสารสกัด (ร้อยละโดยน้ำหนัก)
W_0	คือ	น้ำหนักของถ้วยระเหย (กรัม)
W_1	คือ	น้ำหนักคงที่ของถ้วยระเหยที่บรรจุสารสกัด (กรัม)
W_{Sample}	คือ	น้ำหนักของผงสมุนไพร (กรัม)

▪ เครื่องแก้วและอุปกรณ์

กรวยพลาสติก

(Funnel)



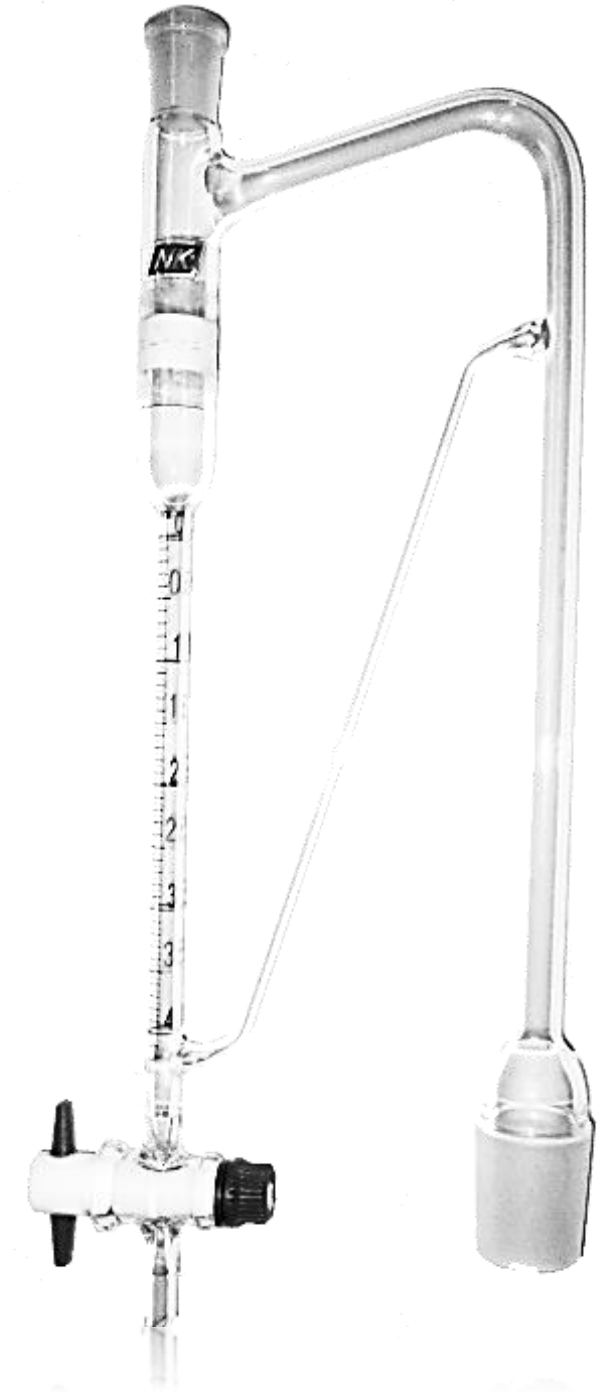
ขวดก้นกลม

(Round-bottom flask)



ชุดกลั่น

(Dean-Stark apparatus)



ช้อนตักสาร

(Spatula)



ชุดควบแน่น

(Condenser)



บีกเกอร์

(Beaker)

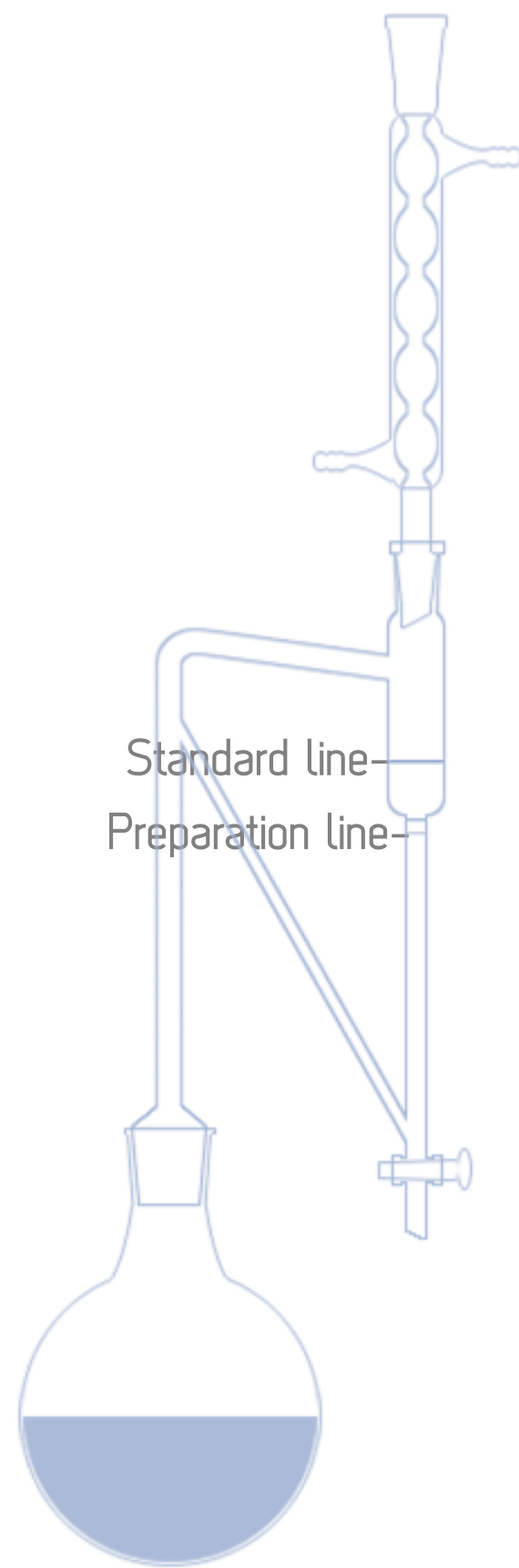


ปิเปต

(Volumetric pipette)



▪ วิธีดำเนินการ



1. ชั่งผงสมุนไพร ตามที่มอโนกราฟกำหนด (W_{Sample}) ลงในขวดก้นกลม ขนาด 500 มิลลิลิตร
2. เติมน้ำ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
3. เติมน้ำ anti-bumping granule ลงไปเล็กน้อย (ประมาณ 4-5 เม็ด)
4. เติมน้ำ silicone antifoam ปริมาตร 2 มิลลิลิตร
5. นำมาประกอบเข้ากับชุดกลั่น
6. เติมน้ำ ลงใน graduated tube ให้ระดับน้ำอยู่ที่ standard line
7. เติมน้ำ xylene ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (V_0) และนำมาต่อเข้ากับชุดควบแน่น
8. สกัดโดยวิธีการกลั่น ที่อุณหภูมิ 135-150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
9. ไขชั้นน้ำทิ้ง จนกระทั่งระดับของชั้น xylene และน้ำมันหอมระเหยอยู่ที่ preparation line ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
10. ไขชั้นน้ำทิ้ง จนกระทั่งระดับของชั้น xylene และน้ำมันหอมระเหยอยู่ที่ตำแหน่งศูนย์
11. อ่านค่าปริมาตรของ xylene และน้ำมันหอมระเหยที่ได้ (V_1)
12. คำนวณหาร้อยละของปริมาณน้ำมันหอมระเหย

▪ การคำนวณ

$$\text{Volatile oil} = \frac{V_1 - V_0}{W_{\text{Sample}}} \times 100$$

โดยที่

Volatile oil	คือ ปริมาณน้ำมันหอมระเหย (ร้อยละโดยปริมาตรต่อน้ำหนัก)
V_0	คือ ปริมาตรของ xylene (มิลลิลิตร)
V_1	คือ ปริมาตรของ xylene และน้ำมันหอมระเหยที่ได้ (มิลลิลิตร)
W_{Sample}	คือ น้ำหนักของผงสมุนไพร (กรัม)

- **Ammonia TS (9.5-10.5% w/w NH₃)**
ละลาย ammonia ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ในน้ำ จนครบปริมาตร 100 มิลลิลิตร
เก็บที่อุณหภูมิไม่เกิน 20 องศาเซลเซียส

- **Anisaldehyde TS**
ผสม anisaldehyde : acetic acid : methanol : sulfuric acid (0.5 : 10 : 85 : 5) ตามลำดับ

- **Iron(III) chloride TS**
ละลาย iron(III) chloride 9 กรัม ในน้ำ จนครบปริมาตร 100 มิลลิลิตร

- **Iron(II) sulfate TS**
ละลาย iron(II) sulfate 0.45 กรัม ในสารละลาย 0.1M hydrochloric acid ปริมาตร 50 มิลลิลิตร
และปรับจนครบปริมาตร 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำที่ปราศจาก CO₂

- **Marquis reagent**
หยด formaldehyde 2-3 หยด ลงใน sulfuric acid ปริมาตร 6 มิลลิลิตร

- **Modified Dragendorff TS2**
ผสมสารละลาย A : สารละลาย B : acetic acid (5 : 5 : 20) และปรับจนครบ 100 ด้วยน้ำ
สารละลาย A: ละลาย bismuth oxynitrate 0.85 กรัม ในสารละลายผสมของน้ำ และ 33% v/v acetic acid
(40 มิลลิลิตร : 10 มิลลิลิตร)
สารละลาย B: ละลาย potassium iodide 8 กรัม ในน้ำ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

- **Natural product (NP) TS**
ละลาย diphenylboric acid-2-aminoethyl ester 1 กรัม ในน้ำ จนครบปริมาตร 100 มิลลิลิตร

- **Ninhydrin TS**
ละลาย ninhydrin 200 มิลลิกรัม ในน้ำ จนครบปริมาตร 10 มิลลิลิตร

- **Ninhydrin-ethanol TS**
ละลาย ninhydrin 1 กรัม ใน ethanol ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และเติม acetic acid 10 มิลลิลิตร

- **Polyethylene glycol (PEG) TS**
ละลาย polyethylene glycol 4000 5 กรัม ใน ethanol จนครบปริมาตร 100 มิลลิลิตร

- **Potassium hexacyanoferrate(III) TS**
ล้างผลึก potassium hexacyanoferrate(III) ในน้ำปริมาณเล็กน้อย และละลายผลึกที่ได้ ในน้ำ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

- **Potassium hydroxide-ethanol TS**
ละลาย potassium hydroxide 3 กรัม ในน้ำ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และปรับจนครบปริมาตร 100 มิลลิลิตร ด้วย ethanol
(aldehyde-free) ตั้งทิ้งไว้ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำส่วนใสมาใช้

- **Potassium iodobismuthate-acetic acid TS**
ละลาย potassium iodide 8 กรัม ในน้ำ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และเติมสารละลายผสมของ bismuth oxynitrate, น้ำ
และ acetic acid (0.85 กรัม : 40 มิลลิลิตร : 10 มิลลิลิตร)

- **Sodium hydrogen carbonate TS**
ละลาย sodium hydrogen carbonate 5 กรัม ในน้ำ จนครบปริมาตร 100 มิลลิลิตร

- **Vanillin-sulfuric acid TS1**
ละลาย vanillin 1 กรัม ใน ethanol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และเติม sulfuric acid ปริมาตร 2 มิลลิลิตร โดยเติมทีละหยด
พร้อมเขย่า



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences



สถาบันวิจัยสมุนไพร
Medicinal Plant Research Institute

สถาบันวิจัยสมุนไพร
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
88/7 ถ.ติวานนท์ ต.ตลาดขวัญ อ.เมือง จ.นนทบุรี 11000
โทรศัพท์ 0-2951-0491 โทรสาร 0-2589-9866