

วิธีการวิจัย

1. สารเคมีและอุปกรณ์

1.1 สารเคมีและสารละลายที่ใช้ทดสอบ: ภาควิชาเภสัชกรรม

1.2 อุปกรณ์: ถาดกระเบื้องหลุม, กรวยกรอง, water bath, หลอดทดลอง, ขวดรูปชมพู่, กล้องจุลทรรศน์, สไลด์, กระจกปิดสไลด์, ถ้วยกระเบื้อง, TLC tank, แผ่น TLC ชนิดสำเร็จรูป, เตาเผาอุณหภูมิสูง, เครื่องชั่ง, ตู้ส่อง UV, กล้องถ่ายรูป

2. ตัวอย่างสมุนไพร

จัดหาตัวอย่างสมุนไพรในพื้นที่เขื่อนอุบลรัตน์จำนวน 5 ชนิดจาก 5 วงศ์ ในช่วงเดือนเมษายนถึงกรกฎาคม 2553 รายละเอียดดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 รายชื่อต้นไม้ และข้อมูลการเก็บตัวอย่างต้นไม้

ชื่อท้องถิ่น	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อวงศ์	Collected No.	ส่วนที่เก็บ
หนามแท่ง	<i>Catunaregam tomentosa</i> (Blume ex DC.) Tirveng.	Rubiaceae	TT. OC. SK. 970, 1015	ลำต้น
ดากดำ	<i>Diospyros castanea</i> Fletcher	Ebenaceae	TT. OC. SK. 1030	ลำต้น
จิวป่า (ดอกขาว)	<i>Bombax anceps</i> Pierre var. <i>anceps</i>	Bombacaceae	TT. OC. SK. 1074	ลำต้น
กอกกัน	<i>Lanea cormandelica</i> (Houtt). Merr	Anacardiaceae	TT. OC. SK. 993	ลำต้น
พันชาติ	<i>Erythrophleum succirubrum</i> Gagnep.	Leguminosae- Caesalpinioideae	TT. OC. SK. 1082	ลำต้น

หมายเหตุ TT= Thaweesak Thitimetharoch, OC= Orasa Chaichumporn , SK = Sureerut Khaewsart (Herbal Herbarium, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University)

3. การตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์

3.1 ข้อมูลทางด้านพฤกษศาสตร์

ตรวจสอบลักษณะที่มองเห็นเปรียบเทียบกับตัวอย่างอ้างอิง เช่น ลักษณะของใบ ผล ดอก สี กลิ่น และจัดทำตัวอย่างต้นสมุนไพรอ้างอิง โดยการอัดด้วยแผ่นไม้ อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 5 วัน นำออกมาเย็บติดกระดาษแข็ง ตัดป้ายกำกับ ส่งไปเก็บที่ พิพิธภัณฑ์พืช คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.2 การเตรียมสารสกัดหยาบ

นำตัวอย่างสมุนไพรมาล้างทำความสะอาด ผึ่งให้แห้ง แล้วชั่งน้ำหนักสด นำมาอบที่ 45°C จนน้ำหนักคงที่ บดให้ละเอียด นำผงสมุนไพรมาหมักใน 50% เอทานอลเป็นเวลา 7 วัน คนเป็นระยะๆ แล้วกรองด้วยผ้าขาวบาง 3-4 ชั้น แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง No.1 จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาระเหยให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator (EYELA, N-100, RIKAKIKAI CO., LTD) แล้วทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze dry (CHRIST GAMMA 1-1 LSC, Germany) จะได้สารสกัดหยาบ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3 โครมาโทกราฟีชนิดผิวนาง (Thin-Layer Chromatography, TLC)

ระบบที่ใช้

Stationary phase: แผ่น TLC ขนาด 10 X 10 เซนติเมตร ชนิดสำเร็จรูป

Mobile phase: Toluene: Acetic acid: Ethyl acetate: = 30:20:50

วิธีการ

ศึกษาเปรียบเทียบลักษณะรูปแบบ TLC ในตัวอย่างสารสกัด โดยในแต่ละตัวอย่างชั่ง 20 มิลลิกรัม ละลายด้วยเมทานอล แล้ว Sonicate นาน 20 นาที จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง No.1 แล้วนำสารละลายที่ได้ไปทำการทดสอบต่อไป สารมาตรฐานที่ใช้ได้แก่ Quercetin, Tannic acid, Epicatechin, Gallic acid และ Vanillic acid ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยใช้ เมทานอล เป็นตัวทำละลาย นำสารตัวอย่างที่เตรียมไว้ spot ลงบนแผ่น TLC สำเร็จรูปปริมาณสารตัวอย่างละ 10 µl

หลังจากให้ Mobile phase เคลื่อนที่ผ่าน stationary phase เพื่อแยกสารที่เป็นองค์ประกอบในพืชตัวอย่างแล้วนำแผ่น TLC มาตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร และตรวจสอบภายหลังทำปฏิกิริยาเคมีโดยน้ำยาสเปรย์ 2 ชนิด คือ 1) H₂SO₄ in Ethanol 2) Anisaldehyde- H₂SO₄ หลังการสเปรย์ให้ความร้อนที่ 105 °C นาน 5 นาที จากนั้นถ่ายรูป และคำนวณค่า R_f

3.4 การทดสอบกลุ่มสารสำคัญ

1. การทดสอบสารสำคัญกลุ่มแทนนิน

1.1 การเตรียมส่วนสกัดเพื่อทดสอบ

นำผงพืชแห้งที่บดแล้ว ประมาณ 10 กรัม มาต้มในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร จนเดือด เมื่อเย็นลงแล้วให้เติม 10% NaCl ลงไป 4-5 หยด จากนั้นนำไปกรองผ่านกระดาษกรอง No. 1 เก็บส่วนใสไว้ทดสอบต่อไป

1.2 การทดสอบคุณสมบัติทั่วไปของแทนนิน

นำส่วนใสจากข้อ 1.1 ลงไปในภาตกระเบื้องหลุมประมาณ 2 หยดต่อหลุม จากนั้นทดสอบกับน้ำยา 0.5% เจลาติน, 1% lead acetate, 1% quinine sulfate และสารละลาย ferric chloride โดยแยกหยดน้ำยาเหล่านี้ 1-2 หยดลงทดสอบ สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น เปรียบเทียบกับการทดสอบกับน้ำกลั่นและสารมาตรฐาน tannic acid

1.3 การทดสอบ hydrolysable tannins

หยดส่วนใสจากข้อ 1.1 จำนวน 2 หยด ลงในภาตกระเบื้องหลุม จากนั้นหยดสารละลาย ferric chloride 1-2 หยด ลงไป สังเกตสีที่เกิดขึ้น จากนั้นหยด 1 N NaOH ลงไป สังเกตสีที่เปลี่ยนแปลงไป และเปรียบเทียบกับน้ำกลั่น

1.4 การทดสอบ condensed tannins

นำส่วนใสจากข้อ 1.1 มาทดสอบต่อดังนี้

1) นำส่วนใส 10 มิลลิลิตร ใส่ใน evaporating dish และระเหยจนแห้งบน water bath เติมน้ำยา vanillin ลงไป 1 มิลลิลิตร จากนั้นหยด กรดเกลือเข้มข้น 1 หยด สังเกตผล

2) นำส่วนใส 2 มิลลิลิตร มาเติม 40% formalin 3 หยด และ 10% HCl 6 หยด ต้มบน water bath 1-2 นาที สังเกตผล

2 การทดสอบสารสำคัญในกลุ่มฟลาโวนอยด์

2.1 การเตรียมสารสกัดสมุนไพร

นำผงแห้งสมุนไพรที่บดแล้ว ประมาณ 5 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ จากนั้นเติม 95% ethanol พอท่วมผงยา เขย่าเป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสมาทดสอบต่อ

2.2 การทดสอบฟลาโวนอยด์

นำส่วนใสมาเทลงหลอดแก้ว จำนวน 5 หลอดๆ ละ 2 มิลลิลิตร โดยแยกทดสอบ ดังนี้

ก. หลอดที่ 1 ใส่น้ำกลั่นเป็นหลอดควบคุม

ข. หลอดที่ 2 เติม มิลลิกรัม ribbon 1 ชิ้น จากนั้นหยดกรดเกลือเข้มข้น 2 หยด จนเกิดฟองฟู สังเกตผล

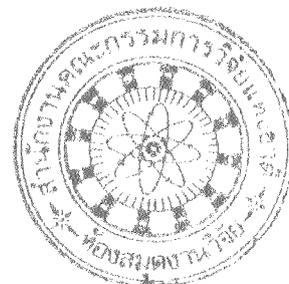
ค. หลอดที่ 3 เติมผง Zn ประมาณ 10 มิลลิลิตร เติมกรดเกลือแกงเข้มข้น 3 หยด เขย่าให้เข้ากับและสังเกตผล

ง. หลอดที่ 4 เติม 2 N HCl 10 หยด เขย่าให้เข้ากัน สังเกตผล

จ. หลอดที่ 5 เติม 1 N NaOH 10 หยด เขย่าให้เข้ากัน สังเกตผล

3 การทดสอบสารสำคัญกลุ่ม cardiac glycosides

3.1. การเตรียมสารสกัดสมุนไพร



สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
 ห้องสมุดงานวิจัย
 วันที่.....1.1.พ.ศ. 2555.....
 เลขทะเบียน.....243130.....
 เลขเรียกหนังสือ.....

นำผงสมุนไพรแห้ง ประมาณ 5 กรัม มาต้มกับ 80% ethanol จำนวน 50 มิลลิลิตร ประมาณ 5 นาที เมื่อเย็นแล้วให้กรองผ่านกระดาษกรอง No. 1 จากนั้นเติม 10% lead acetate ผสมให้เข้ากันและทำให้ร้อนบนเตาไฟฟ้า ประมาณ 15 นาที เมื่อเย็นแล้วกรองผ่านกระดาษกรอง No.1 อีกครั้ง นำส่วนใสมาสกัดด้วย chloroform รวมกัน จำนวน 20 มิลลิลิตร เป็นจำนวน 3 ครั้ง ใน separating funnel จากนั้นแยกชั้น chloroform และเติม anhydrous Na_2SO_4 เพื่อดูดน้ำออก และกรองผ่านกระดาษกรอง No.1 นำส่วนที่กรองได้ไประเหยแห้งบน water bath ให้มีปริมาณเหลือ 1 ใน 10 เพื่อนำไปทดสอบต่อไป

3.2 การทดสอบคุณสมบัติของ cardiac glycosides

แบ่งทดสอบเป็น 3 ส่วน ดังนี้

- ก) การทดสอบ unsaturated lactone ring นำส่วนที่ได้จากข้อ 3.1 จำนวน 2 มิลลิลิตร มาระเหยแห้ง จากนั้นเติม Kedde's reagent 0.5 มิลลิลิตร และ 1 N NaOH 2-3 มิลลิลิตร สังเกตผล
- ข) การทดสอบ deoxy sugar นำส่วนที่ได้จากข้อ 3.1 มาจำนวน 3 มิลลิลิตร เติม glacial acetic acid ที่มี FeCl_3 อยู่จำนวน 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเอียงหลอด และค่อยๆ หยด conc H_2SO_4 จำนวน 1-2 มิลลิลิตร ลงไปข้างหลอดอย่างช้าๆ สังเกตการเปลี่ยนแปลงระหว่างชั้นของสารละลาย
- ค) การทดสอบ steroid nucleus นำส่วนที่ได้จากข้อ 3.1 จำนวน 2 มิลลิลิตร มาระเหยจนเกือบแห้ง เมื่อเย็นแล้วเท acetic anhydride จำนวน 3 หยด ผสมให้เข้ากัน จากนั้นหยด cone H_2SO_4 1 หยด ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 30 นาที สังเกตผล

4 การทดสอบสารสำคัญกลุ่มอัลคาลอยด์

4.1 การเตรียมสารสกัดสมุนไพร

นำผงพืชที่บดแห้งประมาณ 10 กรัม มาเติม 1% HCl จนท่วม จากนั้นต้มบน water bath 10 นาที เมื่อเย็นลงให้กรองผ่านกระดาษกรอง No.1 ล้างกากที่ได้ด้วย 1% HCl จนได้ส่วนใสประมาณ 20 มิลลิลิตร

4.2 การทดสอบหาอัลคาลอยด์เบื้องต้น

นำส่วนที่สกัดได้จากข้อ 4.1 มาทดสอบกับน้ำยา 5 ชนิด คือ Dragendorff, Wagner, Hager, Kraut และ tannic acid โดยใช้ caffeine เป็นสารมาตรฐาน โดยทดสอบบนกระดาษกรองเบอร์ 1 ใช้ส่วนใสสมุนไพร 3 หยด ทดสอบกับน้ำยา 1-2 หยด และสังเกตสีที่เปลี่ยนแปลงไป

3.5 การวิเคราะห์หาสารองค์ประกอบโดยวิธี HPLC

เครื่องมือ

- Agilent-1200 HPLC
- C18, Agilent hypersil ODS column (5 μ m, 4.6X250 mm)
- pH Mettler Toledo 320 pH meter

การเตรียม Mobile phase

- Solution A: Acetonitrile:H₂O:phosphoric acid = 79.7:20:0.3 โดย เติม 85% phosphoric acid ปริมาณ 3.529 มิลลิลิตร ลงไปใน acetonitrile 797 มิลลิลิตร แล้วปรับด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร
- Solution B: 0.3% phosphoric acid (pH=1.70)
โดย ตวง 85% phosphoric acid ปริมาณ 3.529 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1000 มิลลิลิตร

การเตรียมสารตัวอย่าง

ชั่งสารสกัดตัวอย่างสมุนไพร 1 มิลลิกรัม แล้วละลายด้วยเมทานอลปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไป sonicate นาน 30 นาที จากนั้นกรองสารละลายผ่าน 0.45 μ m nylon filter membrane

การเตรียมสารมาตรฐาน

1. เตรียม Standard mixture 1 ประกอบไปด้วย 200 μ l gallic acid (1mg/ml) + 200 μ l quercetin (1mg/ml)+ 200 μ l chlorogenic acid (1mg/ml)+ 200 μ l vanillin (1mg/ml)+ 200 μ l epicatechin gallate (1mg/ml)
2. เตรียม Standard mixture 2 ประกอบไปด้วย 200 μ l caffeic acid (1mg/ml) + 200 μ l coumaric acid (1mg/ml)+ 200 μ l ferulic acid (1mg/ml)
3. เตรียม Standard mixture 3 ประกอบไปด้วย 200 μ l catechin (1mg/ml) + 200 μ l epigallocatechin (1mg/ml)+ 200 μ l epigallocatechin gallate (1mg/ml)

ระบบการวิเคราะห์ HPLC

ระบบการวิเคราะห์เป็น Gradient elution (ตารางที่ 2), ความยาวคลื่น 210 nm
ตารางที่ 2 ระบบการวิเคราะห์ HPLC เป็น Gradient elution

Time	Flow (ml/min)	Solution A (%)	Solution B (%)
0	1	5	95
5	1	10	90
10	1	20	80
25	1	30	70
35	1	40	60
45	1	50	50

4 การหาปริมาณ total phenolics

โดยวิธี Folin-Ciocalteu method ดังนี้

การเตรียม standard curve

ใช้ tannic acid ซึ่งเป็น gallotannins (0.1 mg/ml) เป็นสารละลายมาตรฐาน ทำการทดลองโดยใช้ tannic acid ปริมาณ 0.02-0.1 mg ในปริมาณ 0.5 ml และเติม Folin reagent 0.25 ml จากนั้นเติม 20% sodium carbonate solution 0.25 ml ผสมให้เข้ากัน และ incubate ที่อุณหภูมิห้อง 40 นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 725 nm จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงไป plot กับความเข้มข้นของ tannic acid และหาค่าความสัมพันธ์ของความเข้มข้น (r^2) จะต้องไม่ต่ำกว่า 0.99 และ % CV (coefficient of variation) สำหรับ intra assay มีค่าเท่ากับ 0.16 (n=8) และสำหรับ inter assay เท่ากับ 0.22 (n=17)

การหา total phenolics ในสารตัวอย่าง

ละลายสารตัวอย่างใน 50% ethanol ให้มีความเข้มข้น 5mg/ml จากนั้น sonicated 30 นาที หากมีตะกอนให้กรองออก นำสารละลายในปริมาณต่างๆที่ 7 ความเข้มข้น ซึ่งมีปริมาตร ตั้งแต่ 50-200 μ l มาเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 0.5 ml เติม Folin reagent 0.25 ml, 20% sodium carbonate 0.25 ml ผสมให้เข้ากัน และ incubate ที่อุณหภูมิห้อง 40 นาที จากนั้นนำไปวัดการดูดกลืนแสง ที่ช่วงคลื่น 725 nm คำนวณหาค่าเฉลี่ย OD/ml จากนั้นคำนวณหา total phenolics โดยเทียบกับ slope ของ standard curve และแสดงค่า total phenolics เป็น equivalent tannic acid เป็นหน่วย mg/g ของสารสกัด ทำซ้ำสองทุกความเข้มข้น หากจำเป็นอาจเจือจางสารละลายก่อนการทดสอบ

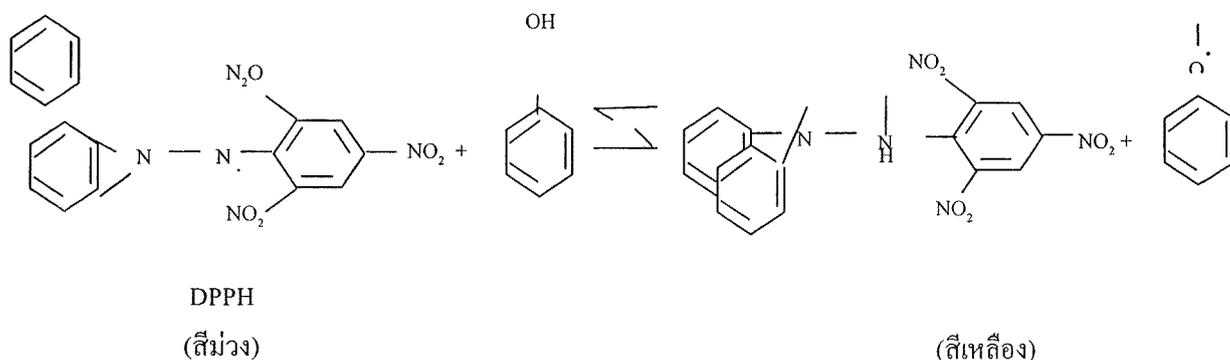
5 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

ใช้วิธี DPPH Radical Scavenging Assay ซึ่งเป็นวิธีทางเคมีที่นิยมใช้ เนื่องจากใช้เวลาสั้นๆ ก็สามารถคัดกรองฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้

การเตรียม Stable Free radical

เตรียมสารละลาย DPPH (2,2 - diphenyl - picryl hydrazine) ความเข้มข้น 1mM ใน methanol โดยชั่ง DPPH 3.943 mg และปรับปริมาตรให้ครบ 10 ml ใน volumetric flask สีชา นำไป sonicate จนสารละลายใส เก็บใน vial สีชา ป้องกันแสง

วิธีทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น



รูปที่ 1 ปฏิกริยาการต้านออกซิเดชั่น

เตรียมตัวอย่าง ให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ เติมสารละลาย DPPH ในปริมาตร 200 μ l คงที่ทุกหลอด และใส่สารทดสอบ 2,800 μ l เพื่อ screen หาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการฟอกจางสี (bleaching) สารละลาย DPPH ที่ใช้เพียงพอในการทำปฏิกริยากับสารทดสอบที่ความเข้มข้นที่ใช้ ภายหลังเติมสารละลาย DPPH ลงในสารทดสอบทุกหลอด ทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm เพื่อหาปริมาณ DPPH ที่เหลืออยู่เทียบกับหลอด control ที่มีเฉพาะ DPPH 200 μ l โดยไม่ได้ใส่สารทดสอบ และคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถจับอนุมูลอิสระได้ 50% (EC_{50}) เปรียบเทียบกับค่า EC_{50} ของสารมาตรฐานวิตามินอี และวิตามินซีด้วยวิธีทดสอบเดียวกัน

การคำนวณและแปลผล

ทำการหาห้วงค่าความเข้มข้น (mg/ml) กับค่า %inhibition

$$\%inhibition = [OD_{sample} / OD_{control}] \times 100$$

$$OD = ABS_{control} - ABS_{sample}$$

คำนวณค่า EC_{50} คือความเข้มข้นของสารทดสอบที่สามารถจับอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50%

การทำ standard curve

การทำ Standard curve ใช้วิตามินอี และวิตามินซีซึ่งจะเตรียมใหม่ทุกวัน ที่มีการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยวิธีการเตรียมตามขั้นตอนต่างๆ เหมือนกับการเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์โดย

เตรียม stock solution ของวิตามินทั้ง 2 ใน methanol ให้มีความเข้มข้น 100 μ l/ml ใน volumetric flask สีชา นำมาเตรียมสารละลายมาตรฐาน ความเข้มข้น 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13 และ 1.57 μ l/ml โดยใช้ methanol ในการเจือจางและปรับปริมาตรให้ได้ตามความเข้มข้นที่ต้องการ

6 คุณลักษณะทางเคมีฟิสิกส์

6.1 ปริมาณสิ่งแปลกปลอม (Foreign matter)

ทำการชั่งผงสมุนไพร 100 กรัม และคัดแยกสิ่งแปลกปลอมด้วยตาเปล่าหรือใช้แว่นขยายช่วย จากนั้นคำนวณร้อยละของสิ่งแปลกปลอม

6.2 ปริมาณน้ำหนัที่หายไปจากการทำแห้ง (Loss on drying)

ทำการชั่งผงสมุนไพรอย่างแม่นยำ 3-5 กรัม และอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ทิ้งให้เย็นลงในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักและทำซ้ำจนได้น้ำหนักคงที่ แล้วคำนวณหาร้อยละของความชื้นหรือน้ำหนัที่หายไป

6.3 ปริมาณเถ้า

เถ้าทั้งหมด (Total ash)

นำตัวอย่างสมุนไพรจำนวน 1-5 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้องแล้วเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 450 องศาเซลเซียส จนได้เถ้าสีขาวหรือสีเทา หากยังเป็นสีดำให้นำออกมาเติมน้ำกลั่น 3-5 มิลลิลิตร ต้มบน hot plate แล้วนำไปเผาต่อในเตาเผาจนได้น้ำหนักคงที่ แล้วคำนวณหาร้อยละของปริมาณเถ้าทั้งหมดของผงสมุนไพรที่ใช้

เถ้าที่ไม่ละลายในกรด (Acid-insoluble ash)

นำตัวอย่างสมุนไพรจำนวน 1-5 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้องแล้วเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 450 องศาเซลเซียส จนได้เถ้าสีขาวหรือสีเทา หากยังเป็นสีดำให้นำออกมาเติมน้ำกลั่น 3-5 มิลลิลิตร ต้มบน hot plate จากนั้น เติมน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร และกรดไฮโดรคลอริก 10 มิลลิลิตร ต้มเป็นเวลา 10 นาที กรองด้วยกระดาษกรองชนิดที่ปราศจากเถ้า และล้างเถ้าด้วยน้ำร้อนจนหมดความเป็นกรด นำกระดาษกรองพร้อมกากที่ได้มาระเหยแห้งบนจานให้ความร้อนแล้วนำไปเผาที่อุณหภูมิ 650 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่ แล้วคำนวณหาร้อยละของปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรดของผงสมุนไพรที่ใช้ ศึกษาเปรียบเทียบใน 13 ตัวอย่าง

6.4 ปริมาณสารสกัด

ปริมาณสารสกัดน้ำ (Water-soluble extractive)

นำผงสมุนไพร 5 กรัม ใส่ขวดรูปชมพู่ที่มีฝาปิด เติมน้ำที่อิ่มตัวด้วยคลอโรฟอร์ม 0.25%v/v ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าอย่างสม่ำเสมอเป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วทิ้งไว้ 18 ชั่วโมง กรองสารละลายที่ได้แล้วเปิดสารละลายที่กรองได้ 20 มิลลิลิตร ใส่ถ้วยแก้วที่รู้น้ำหนักที่แน่นอน นำไประเหยแห้งบนอ่างน้ำร้อนจนแห้งนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ คำนวณหา ค่าร้อยละของปริมาณสารสกัดที่ได้จากน้ำหนักของผงสมุนไพรที่ใช้

ปริมาณสารสกัดเอทานอล (Ethanol-soluble extractive)

วิธี ทำเช่นเดียวกับการหาปริมาณสารสกัดน้ำแต่เปลี่ยนเป็นใช้ เอทานอล 95% เป็นตัวทำละลายแทน

7. การตรวจสอบการปนเปื้อนโลหะหนัก

โลหะหนักเป็นอันตรายต่อสุขภาพ เพื่อให้เกิดความมั่นใจในคุณภาพและความปลอดภัยของสมุนไพรจึงได้ตรวจสอบโดยใช้เทคนิค Atomic Absorption Spectroscopy^(2, 11, 12; 13) ซึ่งโลหะหนักที่ทำการตรวจสอบได้แก่ สารหนู (As), แคดเมียม (Cd) และตะกั่ว (Pb)

1. การเตรียมตัวอย่าง

1.1 ชั่งตัวอย่าง 1 กรัม ใส่ crucible ที่ปิดด้วยกระจกนาฬิกา จากนั้นนำมาย่อยด้วยกรดไนตริกเข้มข้นจำนวน 20 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ประมาณ 5-6 ชั่วโมง จนได้สารละลายใสจากนั้นทิ้งให้เย็น

1.2 กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนให้เป็น 10 มิลลิลิตร จากนั้นเก็บตัวอย่างที่ย่อยได้ในภาชนะที่ปิดสนิทในตู้เย็นจนกว่าจะตรวจวิเคราะห์

2. การวัดโลหะหนัก (As, Cd, Pb) ใช้เทคนิค Atomic Absorption

Spectroscopy สำหรับ Pb วัดด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectroscopy ของ Variance (Model: SpectrAA-200) ส่วน As และ Cd วัดด้วย Automatic graphite furnace Atomic Absorption Spectroscopy ของ Variance (Model: SpectrAA-640Z)

ก. วิธีการวัดตะกั่ว

1. ปรับค่าต่างๆ ของเครื่อง ดังนี้ แหล่งพลังงาน Air/Acetylene ความยาวคลื่น 217.0 นาโนเมตร slit width 1.0 นาโนเมตร lamp current 10.0 mA

2. เตรียมกราฟมาตรฐาน โดยปรับความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน Pb เป็น 1, 2, 3, 4, 5 ppm วัดการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้น 2 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ยสร้างกราฟมาตรฐานระหว่าง ค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้น

3. เตรียมสารละลายตัวอย่าง และวัดค่าการดูดกลืนแสงทำซ้ำ 3 ตัวอย่าง คำนวณค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสง แล้วนำค่าไปเทียบกราฟมาตรฐาน เพื่อหาปริมาณ Pb ในตัวอย่างสารสกัด

ข. วิธีการวัดแคดเมียม

1. ปรับค่าต่างๆ ของเครื่อง โดยใช้ graphite furnace เป็นแหล่งพลังงาน ตัวทำละลาย คือ กรดไนตริก 1 โมลาร์ Modifier คือ แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($\text{NH}_4 \text{H}_2 \text{PO}_4$) ความยาวคลื่น 228.8 นาโนเมตร slit width 0.5 นาโนเมตร lamp current 4.0 mA

2. เตรียมกราฟมาตรฐาน โดยใช้ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน Cd เป็น 1, 2, 3, 4 ส่วนในล้านล้านส่วน (part per billion, ppb) อ่านค่าการดูดกลืนแสง 2 ซ้ำ แล้วนำค่าเฉลี่ยมาสร้างกราฟมาตรฐาน

3. เตรียมสารละลายตัวอย่าง และวัดค่าการดูดกลืนแสง ทำซ้ำ 3 ตัวอย่าง จากนั้นคำนวณปริมาณ Cd ที่พบในตัวอย่างที่วัดในแต่ละครั้งของการวิเคราะห์ นำข้อมูลมาทำการคำนวณหาค่าเฉลี่ยและปริมาณ Cd ในตัวอย่าง

ค. วิธีการวัดสารหนู ใช้เครื่องและวิธีการเดียวกับการวัด Cd โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย และใช้ palladium 500 ส่วนในล้านส่วน (ppm) เป็น modifier ใช้ความยาวคลื่น 193.7 นาโนเมตร slit width 0.5 นาโนเมตร lamp current 10.0 mA จัดทำกราฟมาตรฐานสารละลาย As และวัดปริมาณในตัวอย่างเช่นเดียวกับการวัดโลหะอื่นๆ

8. ขนาดผงยา

เตรียมชุดตะแกรงประกอบด้วยขนาด 18, 20, 40, 100, 120, 140 และ 200 เมช การจัดเรียงลำดับตามขนาดช่องบนตะแกรง โดยตะแกรงส่วนบนสุดมีขนาดช่องใหญ่สุด และตะแกรงล่างสุดมีช่องเล็กสุด และมีถาดรองสารตัวอย่างอยู่ถัดจากตะแกรงล่างสุด ชั่งน้ำหนักตะแกรง และชั่งสารตัวอย่าง 50 กรัม ใส่ในตะแกรงบนสุดปิดฝา และวางตะแกรงบนเครื่องร่อน เปิดเครื่องเป็นเวลา 15 นาที เอาตะแกรงออกจากเครื่อง และชั่งน้ำหนักสารในแต่ละตะแกรง และในถาดรองที่อยู่ด้านล่างสุดและบันทึกผล