

คุณลักษณะทางเคมีกายภาพของกานพลู

ดวงเพ็ญ ปัทมดิลก*, อภิรักษ์ ศักดิ์เพ็ชร, พีรธรรม เทียมเทียบรัตน์, สิริกาญจน์ ธนอริยโรจน์,
วิไลลักษณ์ ชื่นนางชี

สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จังหวัดนนทบุรี 11000

* ผู้รับผิดชอบบทความ: duangpen.p@dmsc.mail.go.th

บทคัดย่อ

การศึกษาคุณลักษณะทางเคมีกายภาพของกานพลู (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry) มีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้ข้อมูลไปจัดทำข้อกำหนดคุณภาพเนื่องจากยังไม่มีเกณฑ์มาตรฐานสำหรับกานพลูในประเทศไทย โดยรวบรวมกานพลู 15 ตัวอย่าง ในช่วงสิงหาคม 2559 ถึงมีนาคม 2560 นำมาศึกษาวิธีตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีและประเมินคุณลักษณะทางเคมีกายภาพ พบว่า สารสกัดเมทานอลจากกานพลูให้ผลบวกกับปฏิกิริยา Liebermann Burchard และสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ 1% การตรวจด้วยวิธีโครมาโทกราฟีผิวบาง ใช้ silica gel GF254 และส่วนผสมของเฮกเซน-อะซีโตน (10:1) พบจุดสารยูจีนอลที่ R_f เท่ากับ 0.43 คุณลักษณะทางเคมีกายภาพ พบว่า ปริมาณความชื้นและน้ำมันระเหยง่าย มีค่าเท่ากับ 6.06 ± 1.07 และ 25.38 ± 3.27 % โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก ตามลำดับ ปริมาณเถ้ารวม ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด ปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอล 95% และปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ มีค่าเท่ากับ 5.70 ± 0.20 , 0.05 ± 0.04 , 21.17 ± 1.56 และ 25.27 ± 0.98 % โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ข้อกำหนดคุณภาพของกานพลูสรุปได้ดังนี้ ปริมาณความชื้น ไม่เกิน 7% โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก ปริมาณเถ้าและเถ้าที่ไม่ละลายในกรด ไม่เกิน 7 และ 1% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอล 95% และปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ ไม่น้อยกว่า 19 และ 23% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ปริมาณน้ำมันระเหยง่าย ไม่น้อยกว่า 23% โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก การตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีโครมาโทกราฟีผิวบางต้องพบสารยูจีนอล ส่วนการตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีของน้ำมันกานพลูด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรเมตรีพบสารยูจีนอลเป็นองค์ประกอบหลัก ผลการศึกษานี้ไปสู่การจัดทำมอโนกราฟกานพลูในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทยเพื่อเป็นมาตรฐานอ้างอิงของประเทศต่อไป

คำสำคัญ: *Syzygium aromaticum*, กานพลู, คุณลักษณะทางเคมีกายภาพ, การควบคุมคุณภาพ

Physico-chemical Characteristics of Clove

Duangpen Pattamadilok^{*}, Apirak Sakpetch, Peradhamma Thiemthieprat, Sirikarn Thana-ariyaroj, Vilailuk Chuennangchee

Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

^{*}Corresponding author: duangpen.p@dmsc.mail.go.th

Abstract

This study on physico-chemical characteristics of clove (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry) aimed to obtain data for establishing the quality specification of clove since there had been no standard criteria for this medicinal herb in Thailand. Fifteen samples of clove were collected from August 2016 to March 2017. Chemical identification and physico-chemical properties were studied. The methanolic extract of clove exhibited positive results with Liebermann Burchard test and 1% ferric chloride solution. TLC analysis was performed using silica gel GF254 and a mixture of hexane-acetone (10:1). Spots of eugenol were observed at the Rf value of 0.43. Physico-chemical characteristics exhibited the water and volatile oil contents of 6.06 ± 1.07 and $25.38 \pm 3.27\%$ v/w, respectively. The contents of total ash, acid insoluble ash, 95% ethanol extractive and water extractive were 5.70 ± 0.20 , 0.05 ± 0.04 , 21.17 ± 1.56 and $25.27 \pm 0.98\%$ w/w, respectively. Thus, quality specification of clove could be established. The water content should not be more than 7% v/w. The contents of total ash and acid insoluble ash should be not more than 7% and 1% w/w, respectively. The contents of 95% ethanol extractive and water extractive should not be less than 19% and 23% w/w. The content of volatile oil should not be less than 23% v/w. Chemical identification using TLC, eugenol must be detected. Furthermore, chemical identification of clove oil by GCMS exhibited eugenol as the main component. The results of this study have led to the establishment of a monograph of Thai Herbal Pharmacopoeia to be used as a reference standard of Thailand.

Key words: *Syzygium aromaticum*, clove, physico-chemical characteristic, quality control

บทนำและวัตถุประสงค์

กานพลู (clove) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry วงศ์ Myrtaceae^[1] เป็นไม้ต้น สูง 9-20 เมตร ใบเดี่ยว เรียงตรงข้าม รูปใบหอก รูปรีแคบ หรือรูปไข่กลับแคบ กว้าง 2.5-5.5 เซนติเมตร ยาว 6-13.5 เซนติเมตร ปลายใบแหลมหรือเรียวแหลม โคนสอบ ขอบใบเรียบ แผ่นใบด้านบนเป็นมัน ก้านใบยาว 1-2.5 เซนติเมตร ช่อดอกแบบกระจุกแยกแขนง ออกที่ปลายกิ่ง ช่อย่อย

แบบช่อเชิงหลั่น แต่ละช่อมี 3 ดอก ใบประดับและใบประดับย่อยรูปสามเหลี่ยม ดอกสีขาวอมเขียว เหลืองอ่อน หรือเหลืองอมเขียว ก้านดอกยาว 3-7 มิลลิเมตร ฐานดอกรูปทรงกระบอกแคบ ยาว 1 เซนติเมตร กลีบเลี้ยงสีเขียวจะเปลี่ยนเป็นสีแดงเมื่อดอกบาน โคนเชื่อมกันเป็นหลอดยาว 5-7 เซนติเมตร ปลายแยกเป็น 4 แฉก กลีบดอก 4 กลีบ รูปขอบขนานหรือกลม ยาว 7-8 มิลลิเมตร ขอบเรียบ โคนเชื่อมกันเป็นหลอดยาว 4-5 มิลลิเมตร มีต่อมน้ำมันมาก ร่วงง่าย เกสรเพศผู้มีจำนวนมาก ร่วงง่าย ก้านชูอับเรณูยาว

7.1-7.4 มิลลิเมตร อับเรณูรูปไข่หรือรูปขอบขนานแกมรูปไข่ ยาวประมาณ 0.5 มิลลิเมตร รังไข่มี 2 ช่อง แต่ละช่องมีอวุลจำนวนมาก ผลรูปขอบขนานแกมรูปไข่กลับ มักมีกลีบเลี้ยงติดทนที่ปลายผล ผลแก่จัดสีแดง^[2] ส่วนที่นำมาใช้ทางยา คือ ดอกตูมที่โตเต็มที่แต่ยังไม่บาน โดยเก็บจากต้นเมื่อดอกตูมเริ่มมีสีชมพู แล้วนำมาตากแห้ง กานพลูมีน้ำมันหอมระเหยเป็นส่วนประกอบ 14-23% และกรดแกลโลแทนนิก (gallotannic acid) 10-13% น้ำมันกานพลูประกอบด้วย สารยูจีนอล (eugenol) 60-90% และยังมีแอลฟา-แคโรโอฟิลลีน (α -caryophyllene) บีตา-แคโรโอฟิลลีน (β -caryophyllene), อะเซทิลยูจีนอล (acetyl eugenol), แคโรโอฟิลลีนออกไซด์ (caryophyllene oxide), กรด 2-โพรเพนิก (2-propenoic acid), แอลฟา-ฮูมูลีน (α -humulene), แกมมา-คาดีนีน (γ -cadinene) และฮูมูลีนออกไซด์ (humulene oxide) เป็นต้น^[2-4] ตำราสรรพคุณยาไทยว่า กานพลูมีรสเผ็ด ร้อนปร่า สรรพคุณกระจายเสมหะ แก้เสมหะเหนียว แก้เลือดออกตามไรฟัน แก้หืด ทำให้อาหารงวด แก้ปวดฟัน แก้วระมะนาด แก้ปวดท้อง แก่ลม แก้เหน็บชา แก้พิษโลหิต พิษน้ำเหลือง ขับน้ำคาวปลา ทำอุจจาระให้ปรกติ แก้อาการทั้ง 4 พิการ แก้ท้องเสีย กดลมให้ลง สูบ้องต่ำ น้ำมันกานพลูใช้แก้ปวดฟัน^[2] ในบัญชียา

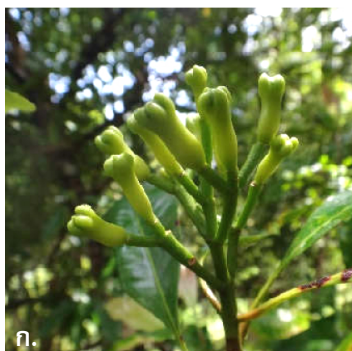
หลักแห่งชาติ พ.ศ. 2562 กานพลูเป็นส่วนประกอบในตำรายาแผนไทยหลายตำรับ ได้แก่ ยาประสะกานพลู ยาประสะเจตพังคี ยาหอมนวโกฐ ยาหอมอินทจักร์ ยาหอมเทพจิตร ยาหอมแก้ลมวิงเวียน ยาธาตุบรรจบ ยาธาตุอบเชย ยามันทธาตุ ยามหาจักรใหญ่ ยาวิสัยพยาใหญ่ ยาอภัยสาลี ยาธรณีสัณทะฆาต ยาเลื่อดงาม ยาประสะเปราะใหญ่ ยาแก้ไอผสมกานพลู ยาแก้ไอพื้นบ้านอีสาน ยาบำรุงโลหิต และยาแก้ไข้เส้น^[5] เนื่องจากยังไม่มีการกำหนดมาตรฐานเพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพของกานพลูในประเทศไทย การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีตรวจเอกลักษณ์ทางเคมี ประเมินคุณลักษณะทางเคมีกายภาพของกานพลู และศึกษาวิธีตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีของน้ำมันกานพลูที่มีจำหน่ายในท้องตลาด ผลของการศึกษาสามารถนำไปสู่การกำหนดมาตรฐานคุณภาพของสมุนไพรชนิดนี้ต่อไป

ระเบียบวิธีศึกษา

1. วัสดุ

1.1 ตัวอย่างสมุนไพร

กานพลู จำนวน 1 ตัวอย่าง จากสวนสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จังหวัดจันทบุรี เก็บตัวอย่างโดยนายประถม ทองศรีรักษ์ ซึ่งเก็บในขณะ



ภาพที่ 1 กานพลู ก. ช่อดอก ข. ดอก (สด) ค. ดอก (แห้ง)

ที่ดอกโตเต็มที่มีเริ่มมีสีชมพูแต่ยังไม่บาน นำมาผึ่งให้แห้ง และกานพลูแห้ง จำนวน 14 ตัวอย่าง รวบรวมจากร้านยาสมุนไพรซึ่งกระจายตามภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย ในช่วงเดือนสิงหาคม 2559 ถึงมีนาคม 2560 นำตัวอย่างกานพลูมาอบไล่ความชื้นในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำมาบดเป็นผงหยาบผ่านร่อนเบอร์ 250 แล้วเก็บในขวดแก้วสีชาปิดสนิท

ส่วนน้ำมันกานพลูที่นำมาศึกษาวิธีตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี เป็นตัวอย่างที่จำหน่ายในท้องตลาดจำนวน 1 ตัวอย่าง

1.2 สารมาตรฐาน

eugenol (Sigma Aldrich, India)

1.3 สารเคมีและตัวทำละลาย

acetone AR (RCI Labscan Limited, Thailand), chloroform AR (RCI Labscan Limited, Thailand), dichloromethane (RCI Labscan Limited, Thailand), hexane AR (Merck, Germany), methanol AR (Merck, Germany), toluene AR (Fisher Scientific, UK), ethyl acetate AR (Fisher Scientific, UK), ferric chloride (BDH, UK), hydrochloric acid (Merck, Germany), sulfuric acid (Labscan, Thailand), acetic anhydride (JT Baker, USA), xylene, anisaldehyde, ethanol, DI water

1.4 วัสดุวิทยาศาสตร์และเครื่องมือแก้ว

TLC plate Silica gel GF254, ความหนา 0.25 มิลลิเมตร (Merck, Germany), กระดาษกรอง เบอร์ 4 (Whatman, UK), กระดาษกรองปราศจากเถ้า เบอร์ 41 (Whatman, UK) และกระดาษลิตมัส (Merck, Germany), Azeotropic distillation apparatus,



ภาพที่ 2 การหาปริมาณความชื้นด้วยวิธี Azeotropic distillation

volatile oil apparatus, ขวดซังสาร, ถ้วยกระเบื้อง, ถ้วยระเหย, โถดูดความชื้น, ขวดแก้วปรับปริมาตร, pasture pipette

1.5 เครื่องมือ

เครื่องบดสมุนไพร, แร่ง (Laboratory Test Sieve, UK), ตู้อบร้อน (Mettler, Germany), เครื่องชั่งไฟฟ้า ความละเอียด 0.1 มิลลิกรัม (Mettler-Toledo, Switzerland), เตาไฟฟ้าสำหรับแผ่น TLC (CAMAG TLC plate heater, Switzerland), เครื่องถ่ายภาพ TLC (TLC scanner), เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรมิเตอร์ (Agilent Technologies, USA), เตาเผาอุณหภูมิสูง (Thermolyne, USA), อ่างน้ำร้อน, ชุดสกัดสาร ประกอบด้วย round bottom flask, heating mantle, condenser และเครื่องทำน้ำเย็นหมุนเวียน

2. วิธีการศึกษา

2.1 การตรวจเอกลักษณ์ทางเคมี (chemical Identification)^[6]

1) ปฏิกริยาการเกิดสี (color reaction)

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

สกัดผงกานพลู น้ำหนัก 1 กรัม ด้วยเมทานอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยวิธีรีฟลักซ์ (reflux) เป็นเวลา 10 นาที กรองผ่านกระดาษกรองได้สารละลายตัวอย่าง

การทดสอบ

ก. Liebermann Burchard test โดยนำสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 2 มิลลิลิตร มาระเหยแห้งบนอ่างน้ำร้อน จากนั้นละลายกลับด้วยเอซิติกแอนไฮไดรด์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ดูดสารละลายที่ได้ใส่ในหลอดทดสอบ แล้วเติมกรดกำมะถันอย่างช้า ๆ จนเห็นสารละลายแยกชั้น สังเกตผลที่เกิดขึ้น โดยผลบวกของปฏิกริยาจะปรากฏสารละลายชั้นบนเป็นสีเขียว

ข. หยดสารละลายเฟอริกคลอไรด์ 1% จำนวน 2-3 หยด ลงในสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 2 มิลลิลิตร สังเกตสีของสารละลายที่เปลี่ยนแปลง โดยผลบวกของปฏิกริยาจะปรากฏสารละลายสีน้ำเงิน

2) โครมาโทกราฟีผิบบาง (Thin Layer Chromatography; TLC)

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง (A)

สกัดผงกานพลู น้ำหนัก 1 กรัม ด้วยไดคลอโรมีเทน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยวิธีการแช่สกัดเป็นเวลา 30 นาที กรองได้สารละลายตัวอย่าง

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน (B)

ละลายยูจีนอล ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ในเมทานอล ปรับปริมาตรจนครบ 5 มิลลิลิตร

ระบบโครมาโทกราฟี

วัฏภาคคงที่ silica gel GF254, ความหนา 0.25 มิลลิเมตร

วัฏภาคเคลื่อนที่ เฮกเซน-อะซีโตน อัตราส่วน 10:1

ระยะทางการเคลื่อนที่ของวัฏภาคเคลื่อนที่ 15 เซนติเมตร

ปริมาณวิเคราะห์

A. 15 ไมโครลิตร สำหรับสารละลายตัวอย่าง

B. 3 ไมโครลิตร สำหรับสารละลายมาตรฐาน

การตรวจวัด

1) ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

2) น้ำยา anisaldehyde -H₂SO₄, 105 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

2.2 การศึกษาคุณลักษณะทางเคมีกายภาพ^[7]

1) ปริมาณความชื้น (วิธี Azeotropic distillation)^[7]

โดยใช้ Azeotropic distillation apparatus ดังภาพที่ 2

เติมน้ำมันและน้ำ ปริมาตร 200 และ 2 มิลลิลิตร ตามลำดับ ลงในขวดแก้วกันกลม ต้มกลั่นเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง อ่านค่าปริมาตรน้ำ (เทคนิค 2 ตำแหน่ง) จากนั้น นำผงกานพลู น้ำหนัก 10 กรัม (ซึ่งอย่างละเอียด เทคนิค 4 ตำแหน่ง) ใส่ในขวดกันกลม พร้อม boiling chip 2-3 ชิ้น กลั่นจนน้ำมันเริ่มเดือดแล้วค่อย ๆ ปรับอุณหภูมิให้ได้อัตราเร็วในการกลั่นเป็น 2 หยดต่อวินาที กลั่นจนน้ำถูกกลั่นเกือบหมดจึงเพิ่มความร้อนให้อัตราเร็วในการกลั่นเป็น 4 หยดต่อวินาที กลั่นต่อเป็นเวลา 5 นาที จึงหยุดให้ความร้อน แล้วปล่อยให้ receiving tube เย็น เมื่อน้ำและน้ำมันแยกชั้นกันดีแล้วจึงอ่าน

ค่าปริมาตรของน้ำ คำนวณค่าร้อยละของปริมาณน้ำในตัวอย่างกานพลู หน่วยเป็น % ปริมาตรต่อน้ำหนักดังนี้

$$\text{ปริมาณน้ำในกานพลู} = 100 \frac{(n'-n)}{p}$$

เมื่อ p = น้ำหนักตัวอย่างกานพลู

n' = ปริมาตรน้ำ จากการอ่านครั้งที่ 2

n = ปริมาตรน้ำ จากการอ่านครั้งแรก (ก่อนใส่กานพลู)

2) ปริมาณเถ้ารวม^[7]

ซึ่งผงกานพลู น้ำหนัก 3 กรัม (ซึ่งอย่างละเอียด ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ใส่ในถ้วยกระเบื้องที่ทราบน้ำหนักแน่นอน เฝานในเตาเผาอุณหภูมิสูง โดยค่อย ๆ เพิ่มอุณหภูมิจนถึง 450 องศาเซลเซียส จนเกิดการเผาไหม้อย่างสมบูรณ์ได้เถ้าสีขาว (ถ้าปราศจากคาร์บอน) ทิ้งไว้ให้เย็น ซึ่งหาน้ำหนัก หากยังไม่ได้เถ้าสีขาวให้ตั้งถ้วยกระเบื้องทิ้งไว้ให้เย็นแล้วค่อย ๆ เติมน้ำกลั่นประมาณ 2 มิลลิลิตร นำไปประเหยแห้งบนอ่างน้ำร้อน แล้วนำไปเผาซ้ำอีกครั้งจนได้น้ำหนักคงที่ คำนวณหาปริมาณเถ้าจากผงกานพลูที่ใช้ หน่วยเป็น % โดยน้ำหนัก

3) ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด^[7]

นำถ้วยกระเบื้องที่มีเถ้าสีขาว จากข้อ 2) มาเติมกรดเกลือความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปิดฝาถ้วยกระเบื้องด้วยกระดาษฟิวส์ แล้วนำไปต้มนาน 2 นาที กรองด้วยกระดาษกรองปราศจากเถ้า ล้างตะกอนด้วยน้ำร้อนจนน้ำล้างตะกอนมีความเป็นกลางเมื่อทดสอบด้วยกระดาษลิตมัส จากนั้นนำตะกอนที่ได้พร้อมกระดาษกรองใส่ในถ้วยกระเบื้องใบเดิมแล้วทำให้แห้งบนเตาไฟฟ้า แล้วนำไปเผาที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่ คำนวณหาปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรดจากผงกานพลูที่ใช้ หน่วยเป็น % โดยน้ำหนัก

4) ปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอล 95%^[7]

สกัดผงกานพลู น้ำหนัก 5 กรัม (ซึ่งอย่างละเอียด ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ด้วยเอทานอล 95% ในขวดแก้วที่มีฝาปิดสนิท เขย่าบ่อย ๆ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ 18 ชั่วโมง จากนั้น กรองผ่านกระดาษกรอง ปิดเตาสารละลายที่ได้ ปริมาตร 20.0 มิลลิลิตร ใส่ในถ้วยระเหยที่ทราบน้ำหนักแน่นอน นำไปประเหยแห้งบนอ่างน้ำร้อน จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่ คำนวณปริมาณสารสกัดที่ได้เทียบน้ำหนักผงกานพลูที่ใช้ หน่วยเป็น % โดยน้ำหนัก

5) ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ^[7]

ทำเช่นเดียวกับการหาปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอล 95% แต่เปลี่ยนชนิดของตัวทำละลายเป็นน้ำที่อมตัวด้วยคลอโรฟอร์มแทน ซึ่งเตรียมโดยการเติมคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงในน้ำ 900 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

6) ปริมาณน้ำมันระเหยง่าย^[8]

ใช้เครื่องมือกลั่นน้ำมันระเหยง่ายตามตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย นำผงกานพลู น้ำหนัก 10 กรัม (ซึ่งอย่างละเอียด ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ใส่ในขวดก้นกลมขนาด 500 มิลลิลิตร เติมน้ำ 100 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน เติมน้ำลงใน graduated tube จนถึง standard line แล้วเติมโซลีน ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร ให้ความร้อน 130-150 องศาเซลเซียส จนน้ำเริ่มเดือด ปรับความร้อนให้ได้อัตราเร็วในการกลั่น 2-3 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ปิด heating mantle ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น (ประมาณ 30 นาที) ไขน้ำออกช้า ๆ จนกระทั่งระดับของโซลีนและน้ำมันระเหยง่ายที่ปนกันอยู่ลงไปอยู่ที่ขีด 0 อ่านปริมาตรของสารละลายผสมโซลีนและน้ำมันระเหยง่าย นำปริมาตรของโซลีนมาหักลบออกจากปริมาตรของสารละลาย

ผสม คำนวณหาปริมาณน้ำมันระเหยง่าย หน่วยเป็น % โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก

2.3 การศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมีของน้ำมัน การพลูด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี (Gas chromatograph-mass spectrometry; GCMS)^[9]

เครื่องโครมาโทกราฟี Agilent GCMSD

วัฏภาคคงที่ HP-5MS 30 เมตร, 250 x 0.25
ไมโครเมตร, 325 องศาเซลเซียส

Split ratio 1:50

ปริมาตรตัวอย่าง 1 ไมโครลิตร (เตรียมโดย
น้ำมันการพลู 10 ไมโครลิตร ละลายในเฮกเซน 1
มิลลิลิตร)

โปรแกรมอุณหภูมิ ดังตารางที่ 1

ตรวจชนิดขององค์ประกอบทางเคมีในน้ำมัน
การพลู โดยการเทียบกับฐานข้อมูลสารเคมี (Wiley
mass spectral library)

ผลการศึกษา

2.1 การตรวจเอกลักษณ์ทางเคมี

1) ปฏิกริยาการเกิดสี

สารละลายตัวอย่างที่ได้จากการสกัดการพลู
ด้วยเมทานอลโดยวิธีรีฟลักซ์ จำนวน 15 ตัวอย่าง นำ
มาทดสอบ

ก. Liebermann Burchard test

เมื่อนำสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 2 มิลลิลิตร
มาระเหยแห้งบนอ่างน้ำร้อน จากนั้นละลายกลับด้วย
แอซิติกแอนไฮไดรด์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ดูด
สารละลายที่ได้ใส่ในหลอดทดสอบ แล้วเติมกรด
กำมะถันอย่างช้า ๆ จนเห็นสารละลายแยกชั้น สังเกต
สีของสารละลายชั้นบน

พบว่า สารละลายตัวอย่างจากการพลูทุก
ตัวอย่าง ให้สีของสารละลายชั้นบนเป็นสีเขียว ดัง
ภาพที่ 3ก

ข. การทดสอบกับสารละลายเฟอริกคลอไรด์ 1%

นำสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 2 มิลลิลิตร
ใส่ในหลอดทดสอบ หยดสารละลายเฟอริกคลอไรด์
1% จำนวน 2-3 หยด สังเกตสีของสารละลายที่
เปลี่ยนแปลง

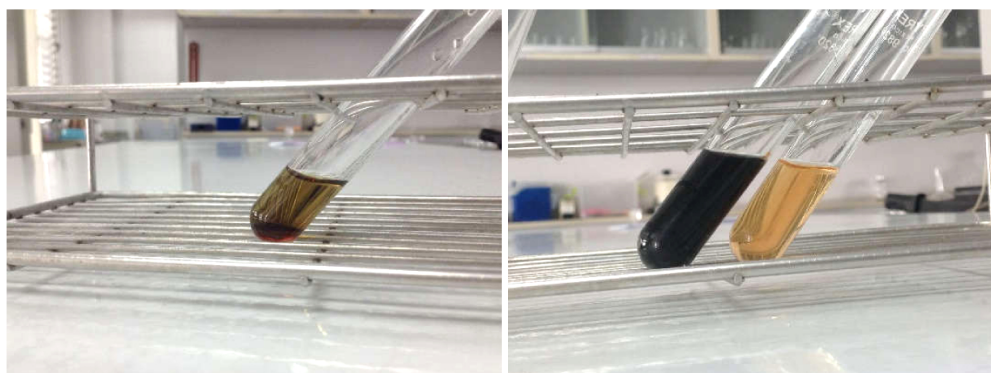
พบว่า สารละลายตัวอย่างจากการพลูทุก
ตัวอย่างเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน ดังภาพที่ 3ข

2) โครมาโทกราฟีผิวบาง

สารสกัดการพลูด้วยไดคลอโรมีเทนซึ่งสกัดโดย
วิธีการแช่สกัด นำมาศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธี
โครมาโทกราฟีผิวบางโดยเทียบสารมาตรฐานยูจีนอล
ระบบโครมาโทกราฟี ประกอบด้วย silica gel GF254,
ส่วนผสมของเฮกเซนและอะซีโตนในอัตราส่วน 10:1
เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ซึ่งเคลื่อนที่ด้วยระยะทาง 15

ตารางที่ 1 โปรแกรมอุณหภูมิของระบบโครมาโทกราฟี

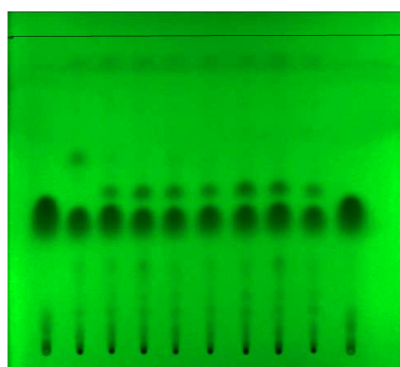
อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ (องศาเซลเซียสต่อนาที)	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ระยะเวลาคงอุณหภูมิ (นาที)
0	80	2
3	120	5
3	180	10



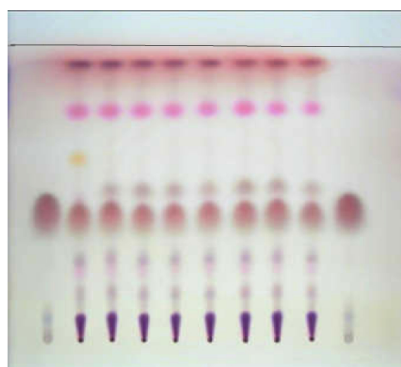
ภาพที่ 3 ปฏิบัติการเกิดสีของกานพลู

ก. Liebermann Burchard test

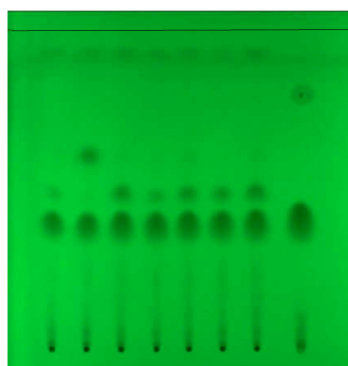
ข. การทดสอบกับสารละลายเฟอริกคลอไรด์ 1% (ซ้าย) ผลบวก และ (ขวา) หลอดควบคุม



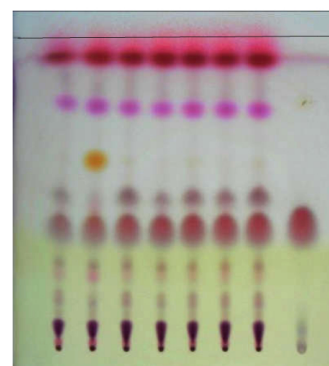
std. 1 2 3 4 5 6 7 8 std.



std. 1 2 3 4 5 6 7 8 std.



9 10 11 12 13 14 15 std.



9 10 11 12 13 14 15 std.

ภาพที่ 4 โครมาโทแกรมผิวบางของสารสกัดไดคลอโรมีเทนจากกานพลู

1-15 สารสกัดไดคลอโรมีเทนจากกานพลู ตัวอย่างที่ 1-15

std. สารละลายยูจีนอลในเมทานอล

ซ้าย ตรวจวัดด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

ขวา ตรวจวัดด้วย anisaldehyde -H₂SO₄

ตารางที่ 2 โครมาโทแกรมผิวบางของสารสกัดไดคลอโรมีเทนจากกานพลู

จุดสี	hR _f	การตรวจวัด	
		แสงอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร	anisaldehyde -H ₂ SO ₄
1	0-10	-	ม่วง
2	17-20	-	ม่วงชมพู
3	24-27	-	ชมพู
4	28-32	-	ม่วงชมพู
5*	38-48	ดำ (quenching)	ม่วงแดง
6	52-55	ดำ (quenching)	ม่วงแดง
7**	62-65	ดำ (quenching)	เหลือง
8	77-83	-	ชมพู
9	95-97	-	ม่วง

*ยูจีนอล

**พบเด่นชัดในกานพลู จำนวน 2 ตัวอย่าง ตัวอย่างอื่นๆ เห็นเป็นจุดสีเหลืองจาง

เซนติเมตร ตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และพ่นน้ำยา anisaldehyde -H₂SO₄ แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จะปรากฏโครมาโทแกรมผิวบาง ดังภาพที่ 4 และตารางที่ 2

2.2 การศึกษาคุณลักษณะทางเคมีกายภาพ

การศึกษาคุณลักษณะทางเคมีกายภาพของกานพลู จำนวน 15 ตัวอย่าง ในหัวข้อต่าง ๆ ได้แก่ ปริมาณความชื้น ปริมาณเถ้ารวม เถ้าที่ไม่ละลายในกรด ปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอล 95% ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ และปริมาณน้ำมันระเหยง่าย ผลการศึกษาดังตารางที่ 3 และภาพที่ 6

จากการประเมินคุณลักษณะทางเคมีกายภาพของกานพลู จำนวน 15 ตัวอย่าง พบว่า ปริมาณความชื้นและปริมาณน้ำมันระเหยง่าย มีค่าเท่ากับ 6.06 ± 1.07 และ $25.38 \pm 3.27\%$ โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก (ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ปริมาณเถ้ารวม ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด ปริมาณสารสกัดด้วย

เอทานอล 95% และปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ มีค่าเท่ากับ 5.70 ± 0.20 , 0.05 ± 0.04 , 21.17 ± 1.56 และ $25.27 \pm 0.98\%$ โดยน้ำหนัก (ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ตามลำดับ

การกำหนดข้อกำหนดมาตรฐาน โดยกำหนดเกณฑ์สูงสุดจากค่าเฉลี่ยบวก 10% สำหรับปริมาณที่ระบุ “ไม่เกิน” และเกณฑ์ต่ำสุดจากค่าเฉลี่ยลบด้วย 10% สำหรับปริมาณที่ระบุ “ไม่น้อยกว่า” ดังนั้น จะได้ข้อกำหนดคุณภาพของกานพลูที่ควรจะเป็นได้ ดังตารางที่ 4

2.3 การศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมีของน้ำมันกานพลูด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟแมสสเปกโทรเมตรี

เมื่อวิเคราะห์น้ำมันกานพลูด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟแมสสเปกโทรเมตรี พบองค์ประกอบทางเคมีชนิดหลักคือ ยูจีนอล ชินดรองลงมา ได้แก่ ปีตา-แคโรโอฟิลลีน และแอลฟา-แคโรโอฟิลลีน ที่เวลา (retention time) เท่ากับ 17.350, 19.985 และ 21.961 นาที ตามลำดับ ดังภาพที่ 6 และตารางที่ 5

ตารางที่ 3 ผลการประเมินคุณลักษณะทางเคมีกายภาพของกานพลู

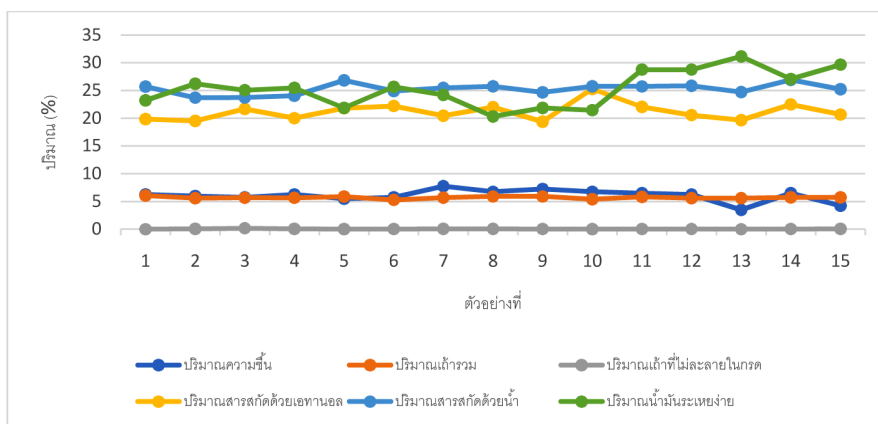
ตัว อย่าง ที่	ปริมาณความชื้น (%โดยปริมาตร ต่อน้ำหนัก)	ปริมาณเถ้า (%โดยน้ำหนัก)		ปริมาณสารสกัดด้วย เอทานอล 95% (%โดยน้ำหนัก)	ปริมาณสาร สกัดด้วยน้ำ (%โดยน้ำหนัก)	ปริมาณน้ำมัน ระเหยง่าย (%โดย ปริมาตรต่อน้ำหนัก)
		เถ้ารวม	เถ้าที่ ไม่ละลาย ในกรด			
1	6.24	6.05	0.00	19.84	25.71	23.21
2	5.99	5.60	0.06	19.51	23.71	26.23
3	5.75	5.67	0.18	21.66	23.73	25.07
4	6.24	5.66	0.05	20.01	24.07	25.46
5	5.50	5.89	0.01	21.80	26.82	21.87
6	5.75	5.29	0.04	22.21	24.89	25.65
7	7.75	5.68	0.07	20.45	25.49	24.19
8	6.75	5.90	0.05	22.01	25.75	20.31
9	7.25	5.90	0.04	19.37	24.68	21.86
10	6.75	5.42	0.01	25.26	25.76	21.46
11	6.50	5.82	0.04	22.05	25.73	28.77
12	6.24	5.58	0.04	20.57	25.83	28.77
13	3.50	5.59	0.00	19.65	24.71	31.14
14	6.50	5.72	0.04	22.49	26.93	27.05
15	4.25	5.74	0.07	20.67	25.23	29.66
ค่าเฉลี่ย	6.06	5.70	0.05	21.17	25.27	25.38
ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน	1.07	0.20	0.04	1.56	0.98	3.27
10%	0.61	0.57	0.01	2.12	2.53	2.54

อภิปรายผล

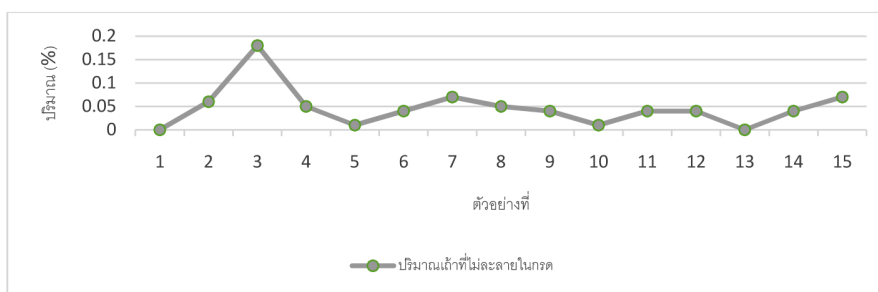
การศึกษานี้มีความสำคัญเนื่องจากจะนำไปสู่การกำหนดมาตรฐานของกานพลูของประเทศไทยเพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพสมุนไพรชนิดนี้ก่อนนำเข้าสู่กระบวนการผลิตยาหรือผลิตภัณฑ์สุขภาพ ซึ่งประกอบด้วย 1) การพัฒนาวิธีการตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีของกานพลูโดยปฏิกิริยาการเกิดสีและโครมาโทกราฟีผิวบางเพื่อตรวจสอบว่าเป็นสมุนไพรชนิด

และ 2) การประเมินคุณลักษณะทางเคมีกายภาพเพื่อกำหนดเป็นข้อกำหนดคุณภาพสำหรับกานพลู ผลจากการศึกษานี้จะเสนอเข้าสู่การพิจารณาบรรจุเป็นมโนกราฟีในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทยต่อไป

การตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีของกานพลูจะอาศัยปฏิกิริยาเคมีที่สัมพันธ์กับกลุ่มสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบในกานพลู ปฏิกิริยา Liebermann Burchard เป็นการทดสอบสารกลุ่มเทอร์พีนอยด์



ก.



ข.

ภาพที่ 5 ผลการประเมินคุณลักษณะทางเคมีกายภาพของกานพลู

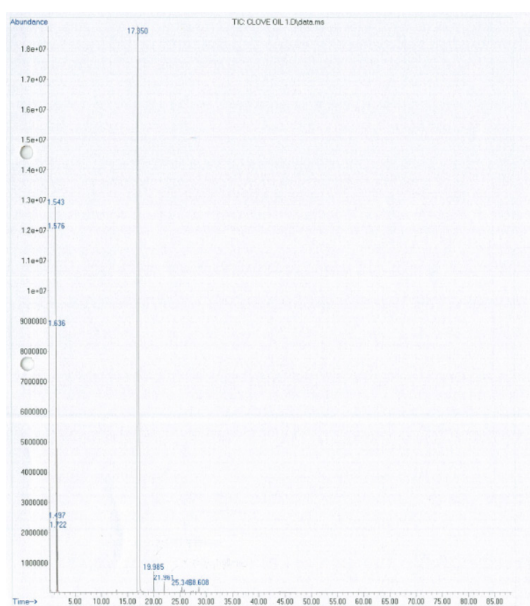
ก. คุณลักษณะทางเคมีกายภาพของกานพลูในภาพรวม

ข. ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรดของกานพลู

ตารางที่ 4 ข้อกำหนดคุณภาพของกานพลู

คุณลักษณะทางเคมีกายภาพ	เกณฑ์กำหนด		ข้อกำหนดคุณภาพ
	ค่าสูงสุด (mean+10%)	ค่าต่ำสุด (mean-10%)	
ปริมาณความชื้น	6.67	-	ไม่เกิน 7% โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก
ปริมาณเถ้ารวม	6.27	-	ไม่เกิน 7% โดยน้ำหนัก
ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด	0.06	-	ไม่เกิน 1% โดยน้ำหนัก
ปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอล 95%	-	19.05	ไม่น้อยกว่า 19% โดยน้ำหนัก
ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ	-	22.74	ไม่น้อยกว่า 23% โดยน้ำหนัก
ปริมาณน้ำมันระเหยง่าย	-	22.84	ไม่น้อยกว่า 23% โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก

(terpenoids) ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญในน้ำมันระเหยง่ายของกานพลู เช่น ยูจีนอล บีตา-แคโรโอฟิลลีน แอลฟา-แคโรโอฟิลลีน เป็นต้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยในอดีตและผลการวิเคราะห์น้ำมันกานพลูด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี ผลบวกของปฏิกิริยาคือสารละลายชั้นบนเปลี่ยนเป็นสีเขียว ปฏิกิริยา Liebermann Burchard ต้องใช้



ภาพที่ 6 แก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรเมตรีโครมาโทแกรมของน้ำมันกานพลู

แอซิติกแอนไฮไดรต์ในการทำปฏิกิริยา ซึ่งสารดังกล่าวจัดเป็นยาเสพติดให้โทษในประเภท 4 ตามพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ พ.ศ. 2522 จึงอาจหาสารดังกล่าวได้ยาก หากไม่มีแอซิติกแอนไฮไดรต์อาจต้องใช้วิธีอื่นในการทดสอบสารกลุ่มเทอร์พีนอยด์แทน เช่น Salkowski test ส่วนการทดสอบกับสารละลายเฟอร์ริก-คลอไรด์ 1% เป็นการทดสอบสารกลุ่มฟีนอลิกซึ่งสัมพันธ์กับรายงานองค์ประกอบทางเคมีชนิดกรดแกลโลแทนนิกซึ่งพบในกานพลูถึง 10-13% ผลบวกของปฏิกิริยาคือสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน การตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยโครมาโทกราฟีผิบบางเลือกให้ยูจีนอลเป็นสารเทียบ (chemical marker) เนื่องจากเป็นองค์ประกอบทางเคมีหลักที่พบในน้ำมันระเหยง่ายจากกานพลู และตรวจวัดผลด้วยการทำปฏิกิริยากับ anisaldehyde- H_2SO_4 ซึ่งเป็นน้ำยาสำหรับการตรวจวัดสารกลุ่มเทอร์พีนอยด์

การประเมินคุณลักษณะทางเคมีกายภาพของกานพลู ปริมาณความชื้น ปริมาณเถ้ารวมและเถ้าที่ไม่ละลายในกรด เป็นคุณลักษณะทางกายภาพที่ควรกำหนด เนื่องจากความชื้นที่ปริมาณสูงเกินไปจะเป็นปัจจัยเอื้อต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และอาจเร่งให้เกิดการเสื่อมสลายของสารสำคัญในสมุนไพรโดย

ตารางที่ 5 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันกานพลูจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี

พีค	ระยะเวลาที่ตรวจพบสาร (นาที)	พื้นที่ใต้พีค (%)	องค์ประกอบทางเคมี
1	17.350	85.66	ยูจีนอล ($C_{10}H_{12}O_2$) น้ำหนักโมเลกุล 164.2
2	19.985	0.94	บีตา-แคโรโอฟิลลีน ($C_{15}H_{24}$) น้ำหนักโมเลกุล 204.35
3	21.961	0.45	แอลฟา-แคโรโอฟิลลีน ($C_{15}H_{24}$) น้ำหนักโมเลกุล 204.35

ปฏิกิริยาละลายตัวด้วยน้ำ (hydrolysis) ส่วนปริมาณ ถ้าเป็นสิ่งที่ขึ้นถึงการปนปลอมปนเปื้อน โดยปริมาณ ถ้ารวมจะเป็นผลรวมของ physiological ash ซึ่งได้ มาจากสารอินทรีย์ที่มีในพืช เช่น แคลเซียมออกซาลเลต แคลเซียมคาร์บอเนต แกลิออนินทรีย์ต่าง ๆ และ non-physiological ash ซึ่งได้จากสิ่งอื่น ๆ (extraneous matter) เช่น ดิน หวาย ในขณะที่ปริมาณถ้าที่ไม่ ละลายในกรดบ่งบอกปริมาณ silica ที่ปนอยู่ เช่น หวาย silicious earth ค่า physiological ash จึงเป็น ค่าคงที่ของพืชชนิดนั้น ๆ ดังนั้นค่าถ้าที่สูงเกินจะเป็น ถ้าที่เกิดจากสิ่งที่ปนเปื้อนหรือปลอมปนเข้ามา การ กำหนดมาตรฐานปริมาณเหล่านี้จึงต้องระบุว่า “ไม่ เกิน” ส่วนปริมาณน้ำมันระเหยง่าย ปริมาณสารสกัด ด้วยเอทานอล 95% และสารสกัดด้วยน้ำ เป็นสิ่งบ่งชี้ ถึงคุณภาพทางเคมี เนื่องจากบ่งชี้ถึงสารที่ออกฤทธิ์ หรือกลุ่มของสารออกฤทธิ์หรือสารที่ได้จากการสกัด ด้วยตัวทำละลายแล้วนำไปใช้ประโยชน์ทางยาได้ การ กำหนดมาตรฐานปริมาณเหล่านี้จึงต้องระบุว่า “ไม่ น้อยกว่า”

มาตรฐานของกานพลูมีการกำหนดไว้ในตำรายา สากลหลายฉบับ^[6] เช่น ตำราอายุรเวทของอินเดียมีการ กำหนดปริมาณถ้ารวมและปริมาณถ้าที่ไม่ละลายใน กรด ไม่เกิน 7.0 และ 1.0% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอล 95% และปริมาณสาร สกัดด้วยน้ำ ไม่น้อยกว่า 3.0 และ 9.0% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ และปริมาณน้ำมันระเหยง่าย ไม่น้อยกว่า 15.0% โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก ตำรายาของจีนมีการ กำหนดปริมาณถ้าและปริมาณถ้ารวม ไม่เกิน 7.0 และ 1.0% โดยน้ำหนัก ตำรายาของยุโรปกำหนด ปริมาณน้ำมันระเหยง่าย ไม่น้อยกว่า 15.0% โดย น้ำหนัก เมื่อเปรียบเทียบกับคุณลักษณะทางเคมีกายภาพ ของกานพลูในการศึกษานี้ สามารถกล่าวได้ว่า กานพลู

ที่พบในประเทศไทยมีคุณภาพดีกว่าเมื่อเทียบกับ มาตรฐานของกานพลูในประเทศหรือภูมิภาคอื่นของ โลก

การตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีของน้ำมันกานพลู สามารถใช้วิธีแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี ในการวิเคราะห์ ซึ่งจะพบสารยูจินอลเป็นองค์ประกอบ ทางเคมีหลัก น้ำมันกานพลูที่จำหน่ายในท้องตลาดมัก จะสกัดด้วยวิธีการลั่นด้วยไอน้ำ แต่อย่างไรก็ตาม มี รายงานการศึกษาพบว่า การสกัดกานพลูด้วยวิธี ซูเปอร์คริติคัลฟลูอิด (supercritical fluid) ก็จะได้ สารสกัดที่มียูจินอลเป็นองค์ประกอบหลักเช่นกัน^[3]

ผลจากการศึกษานี้สามารถเสนอเข้าสู่การ พิจารณารับรองเป็นมโนกราฟ (monograph) ของ วัตถุดิบสมุนไพรกานพลูในตำรามาตรฐานยาสมุนไพร ไทย เพื่อเป็นตำราอ้างอิงของประเทศต่อไป

ข้อสรุป

จากการศึกษาคุณลักษณะทางเคมีกายภาพของ กานพลู จำนวน 15 ตัวอย่าง สามารถสรุปข้อกำหนด คุณภาพสำหรับกานพลูที่พบในประเทศไทยได้ ดังนี้ การตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยปฏิกิริยาการเกิดสี ต้องให้ผลบวกกับปฏิกิริยา Liebermann Burchard และสารละลายเฟอริกคลอไรด์ 1% เมื่อตรวจ เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีโครมาโทกราฟีผิวบางจะ ต้องพบสารยูจินอล ปริมาณความชื้นไม่เกิน 7% โดย ปริมาตรต่อน้ำหนัก ปริมาณถ้าและถ้าที่ไม่ละลายใน กรดไม่เกิน 7 และ 1% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ปริมาณ สารสกัดด้วยเอทานอล 95% และปริมาณสารสกัด ด้วยน้ำไม่น้อยกว่า 19 และ 23% โดยน้ำหนัก ตาม ลำดับ ปริมาณน้ำมันระเหยง่ายไม่น้อยกว่า 23% โดย ปริมาตรต่อน้ำหนัก

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ที่สนับสนุนงบประมาณการวิจัยนี้ และขอขอบคุณนายประถม ทองศรีรักษ์ สำหรับการเก็บรวบรวมตัวอย่างานพลาจากแหล่งธรรมชาติ

References

1. Office of Forest Herbarium, Forest and Plant Conservation Research Office, Department of National Parks, Wildlife and Plant Conservation. Tem Smitinand's Thai plant names. 2014 revised edition. Bangkok: National Office of Buddhism Printing House; 2014. (in Thai)
2. Department of Thai Traditional and Alternative Medicine. Monographs of selected Thai materia medica volume 1. Bangkok: Amarin printing and publishing Co. Ltd.; 2009. 324 p. (in Thai)
3. De Oliveira MS, Da Costa WA, Pereira DS, Botelho JRS, De Alencar Menezes TO, De Aquiar Andrade EH, Da Silva SHM, Da Silva Sousa Filho AP, De Carvalho Junior RN. Chemical composition and phytotoxic activity of clove (*Syzygium aromaticum*) essential oil obtained with supercritical CO₂. J Supercrit Fluids. 2016;18;185-93.
4. Plata-Rueda A, Campos JM, Da Silva Rolim G, Martínez LC, Dos Santos MH, Fernandes FL, Serrão JD, Zanuncio JC. Terpenoid constituents of cinnamon and clove essential oils cause toxic effects and behavior repellency response on granary weevil, *Sitophilus granaries*. Ecotoxicol Environ Saf. 2018;156:263-70.
5. National List of Essential Medicines B.E. 2562 (2019). Published in Government Gazette, Vol. 124, Part 95D. (2019 April 17). (in Thai)
6. Pattamadilok D, Sakpetch A, Thana-ariyaroj S, Thiemthieprat P, Chuennangchee V, Jiraputtharom A, Thongsri-rak S. Medicinal Plant Research Institute. Final report: Physico-chemical characteristics of clove. Department of Medical Sciences; 2017. (17 p). (in Thai)
7. World Health Organization. Quality Control Method for Herbal Materials. Geneva: WHO Press; 2011. 173 p.
8. Bureau of Drug and Narcotics, Department of Medical Sciences. Thai Herbal Pharmacopoeia 2017. Bangkok: The Agricultural Co-operative Federation of Thailand., Ltd.; 2017. 698 p.
9. British Pharmacopoeia Commission. British Pharmacopoeia 2010. Volume III. London: The Stationary Office; 2009. p. 3547.