

การตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมีและทางเคมีกายภาพของใบกระท่อม

ธนวัฒน์ ทองจีน^{*}, พีรธรรม เทียมเทียบริตัน^{*}, สายัณห์ เรืองเขตร^{*}, ศักดิ์วิชัย อ่อนทอง^{*},
อัสวชัย ช่วยพรหม^{*†}, ศิริวรรณ ชัยสมบูรณ์พันธ์^{*}

^{*} สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ ตำบลตลาดขวัญ อำเภอเมือง นนทบุรี 11000

[†] ผู้รับผิดชอบบทความ: aussavashai@gmail.com

บทคัดย่อ

บทนำและวัตถุประสงค์: กระท่อมมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Mitragyna speciosa* (Korth.) Havil. วงศ์ Rubiaceae ใบกระท่อมมีสรรพคุณ ใช้ระงับอาการปวดท้อง แก้บิด แก้ท้องเสีย แก้ปวดเมื่อยตามร่างกายและระงับประสาท สมุนไพรชนิดนี้ยังไม่มีการกำหนดมาตรฐานในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย เพื่อใช้เป็นมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพ ผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์ศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและทางเคมีกายภาพของใบกระท่อม

วิธีการศึกษา: รวบรวมตัวอย่างใบกระท่อม จำนวน 17 ตัวอย่าง ที่เก็บจากหลายจังหวัดทั่วประเทศไทย นำมาศึกษาโดยเปรียบเทียบกับตัวอย่างจริง 1 ตัวอย่างที่ได้รับมาจากห้องปฏิบัติการพิพิธภัณฑสถานแห่งชาติพืช นำตัวอย่างใบกระท่อมมาตรวจสอบเบื้องต้นทางเคมีด้วยปฏิกิริยาการเกิดสี พิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีโครมาโทกราฟีผิวบางและศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและทางเคมีกายภาพ

ผลการศึกษา: ผลการตรวจสอบเบื้องต้นทางเคมีด้วยปฏิกิริยาการเกิดสี พบว่าให้ผลบวกกับสารกลุ่มแอลคาลอยด์ (alkaloids) กลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) และกลุ่มฟีนอลิก (phenolics) เมื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (Thin Layer Chromatography) ตรวจพบสารไมทราจีนีน (mitragynine) ซึ่งเป็นสารกลุ่มแอลคาลอยด์ เมื่อศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและทางเคมีกายภาพของใบกระท่อมแห้ง ได้แก่ ปริมาณความชื้นด้วยวิธี Loss on drying ปริมาณเถ้ารวม ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด ปริมาณสิ่งสกปรกด้วยน้ำ และปริมาณสิ่งสกปรกในเอทานอล พบว่ามีค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับร้อยละ 5.60 ± 0.68 , 4.67 ± 0.37 , 0.14 ± 0.02 , 19.52 ± 1.68 และ 17.12 ± 2.81 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ

อภิปรายผล: การตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมีและทางเคมีกายภาพ และการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีของวัตถุดิบสมุนไพรใบกระท่อม มีประโยชน์ต่อการควบคุมคุณภาพทางเคมีให้เป็นไปตามเกณฑ์ในการควบคุมมาตรฐานยาสมุนไพรให้มีคุณภาพดีและมีความสม่ำเสมอ สามารถนำไปบริโภคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ: ผลการศึกษานี้นำไปสู่การจัดทำอินโกราฟี (monograph) ใบกระท่อม และสามารถใช้เป็นแนวทางในการกำหนดมาตรฐานของใบกระท่อมแห้งในตำรามาตรฐานยาสมุนไพร เพื่อเป็นมาตรฐานอ้างอิงของประเทศต่อไป

คำสำคัญ: ใบกระท่อม, คุณสมบัติทางเคมีและทางเคมีกายภาพ, ข้อกำหนดมาตรฐาน

The Evaluation of Chemical and Physico-Chemical Properties of *Mitragyna speciosa* (Korth.) Havil. Leaves

Thanawat Thongchin^{*}, Peradhama Thiemthieprat^{*}, Sayan Ruengkhet^{*}, Sakwichai Ontong^{*},
Aussavashai Shuayprom^{*,†}, Siriwan Chaisomboonpan^{*}

^{*} Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Tiwanon Road, Talad Kwan Sub-District, Muang District, Nonthaburi 11000, Thailand

[†] Corresponding author: aussavashai@gmail.com

Abstract

Introduction and Objective: *Mitragyna speciosa* (Korth.) Havil., commonly known as kratom, belongs to the family Rubiaceae. Kratom leaves have medicinal properties for relieving stomach pain and body aches, curing dysentery and diarrhea, and tranquilizing the body. However, the standard methods for quality control of this plant have not been established in the Thai Herbal Pharmacopoeia. Therefore, the aim of this study was to investigate the chemical and physico-chemical properties of *M. speciosa* leaves.

Methods: Seventeen samples of *M. speciosa* leaves were obtained from many provinces throughout Thailand and compared to the authentic sample received from the Herbarium Laboratory. The samples of *M. speciosa* leaves were preliminarily examined for chemical properties using color reaction. Chemical identification was performed using the thin layer chromatography (TLC) method and their chemical and physico-chemical properties were also determined.

Results: All 17 *M. speciosa* leaf samples, based on the color reactions of the preliminary examination, were positive for alkaloids, flavonoids and phenolics; and based on the TLC method, they were positive for alkaloids including mitragynine. As for their chemical and physico-chemical properties, shown as mean \pm SD, the moisture, total ash, acid-insoluble ash, water-soluble extractive and ethanol-soluble extractive contents were $5.60 \pm 0.68\%$, $4.67 \pm 0.37\%$, $0.14 \pm 0.02\%$, $19.52 \pm 1.68\%$ and $17.12 \pm 2.81\%$ w/w, respectively.

Discussion: The examination of chemical and physico-chemical properties and the verification of the chemical identity of *M. speciosa* leaf raw materials are beneficial for controlling chemical quality to meet the criteria for standardizing herbal medicines and to ensure their good quality and consistency for effective consumption.

Conclusion and Recommendation: The results of this study have led to the establishment of a monograph and the standardization of dried *M. speciosa* leaves in the Thai Herbal Pharmacopoeia to be used as a reference standard of Thailand.

Keywords: *Mitragyna speciosa* leaves; chemical and physico-chemical property; monograph

บทนำและวัตถุประสงค์

กระท่อม มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Mitragyna speciosa* (Korth.) Havil. จัดอยู่ในวงศ์ Rubiaceae มีชื่ออื่น ๆ เช่น ท่อม, อีถ่าง^[1] เป็นไม้ยืนต้น ใบเดี่ยว เรียงตรงข้าม รูปไข่แกมขอบขนาน ฐานใบรูปหัวใจอยู่ระหว่างก้านใบ ดอกช่อออกที่ปลายกิ่ง ซอยย่อยรูปทรงกลมคล้ายดอกกระถิน เมื่อแรกบานสีขาวนวลแล้วเปลี่ยนเป็นสีเหลืองแกมน้ำตาล ผลสดรูปทรงกลม (Figure 1)^[1]สรรพคุณของไมกระท่อมมีดังนี้ คือ แก้บิด ปวดมวน ปวดเม่ง แก้ปวด แก้ท้องเสีย ทำให้อนอนหลับ คุมธาตุและสมาน แก้ท้องร่วง แก้ปวดเมื่อยตามร่างกาย และระงับประสาท^[1] กระท่อมในประเทศไทยพบได้หลายสายพันธุ์ไม่น้อยกว่า 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ก้านแดง (ก้านใบและเส้นใบสีแดง) สายพันธุ์แดงกว่า (ก้านใบและเส้นใบสีเขียว) และสายพันธุ์ยักษ์

ใหญ่หรือหางกิ้ง (ขอบใบหยัก)^[2] ไมกระท่อมมีสารสำคัญหลัก คือ ไมทราไจนีน (mitragynine) ซึ่งเป็นสารกลุ่มแอลคาลอยด์ (alkaloids) กลไกการออกฤทธิ์ของไมทราไจนีนและอนุพันธ์ เช่น 7-ไฮดรอกซีไมทราไจนีน (7-hydroxymitragynine) เกิดจากการจับกับตัวรับโอปิออยด์ (opioid receptors) ส่งผลให้กระท่อมมีฤทธิ์คล้ายโอปิออยด์ เช่น ง่วงซึม รู้สึกเคลิ้มสุข แก้ปวด จึงทำให้มีการนำกระท่อมไปใช้ทดแทนสารหรือยาในกลุ่มโอปิออยด์^[3,4] สารไมทราไจนีนมีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาลอ่อน สูตรโครงสร้างของไมทราไจนีน (Figure 2) การศึกษาทางเภสัชวิทยาพบว่า สารไมทราไจนีนมีคุณสมบัติลดการปวด (analgesic) แก้ไอ (antitussive) บรรเทาอาการท้องร่วง (antidiarrheal) มีฤทธิ์ต้านมาลาเรีย (antimalarial)^[5] และมีฤทธิ์ต้านการซึมเศร้า (antidepressant effect)^[6]

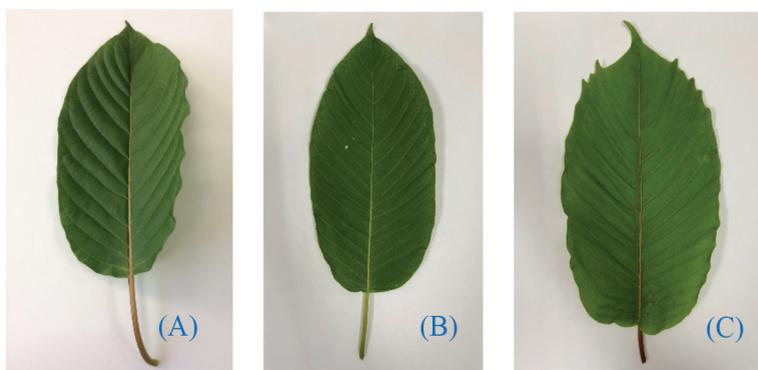


Figure 1 *Mitragyna speciosa* leaves; Kan Daeng (A), Kan Khiao (B) and Kan Daeng Hang Kang (C)

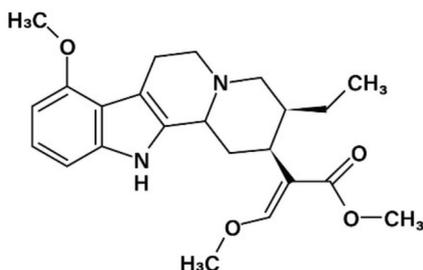


Figure 2 Chemical structure of mitragynine

ระเบียบวิธีศึกษา

1. วัสดุ

1.1 ตัวอย่างสมุนไพร

ตัวอย่างวัตถุดิบใบกระท่อมสดระยะใบเฟสลาด จำนวน 17 ตัวอย่าง ที่เก็บจากหลายจังหวัดทั่วประเทศไทย ได้แก่ ตรัง กระบี่ ชุมพร จันทบุรี กรุงเทพมหานคร นนทบุรี ปทุมธานี อุทัยธานี นครราชสีมา และนครปฐม ในช่วงระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2564 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ 2565 (Table 1) ผ่านการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเภสัชเวทเปรียบเทียบกับตัวอย่างจริง (authentic) จำนวน 1 ตัวอย่าง ที่ได้จากอำเภอมะขาม จังหวัดจันทบุรี (Figure 3) ว่าเป็นใบกระท่อม *Mitragyna speciosa* (Korth.) Havil.

วงศ์ Rubiaceae สายพันธุ์ก้านเขียว

โดยนักพฤกษศาสตร์ ห้องปฏิบัติการพิพิธภัณฑสถานบัวบานวิจัยสมุนไพร และเปรียบเทียบกับตัวอย่างพรรณไม้แห่งหมายเลขอ้างอิง DMSC 5290 ซึ่งเป็นใบกระท่อมสายพันธุ์ก้านเขียวเช่นกัน จากนั้นนำมาคัดเลือกเฉพาะใบ ล้างด้วยน้ำให้สะอาด ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง และอบให้แห้งด้วยเตาอบร้อนไฟฟ้าที่มีพัดลมระบายอากาศที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง และนำตัวอย่างที่แห้งแล้วไปบดเป็นผงละเอียด ผ่านแรงที่มีขนาดช่อง 180 ไมโครเมตร เก็บผงตัวอย่างในขวดแก้วสีชาที่มีฝาปิดสนิท ระบุชื่อสมุนไพร แหล่งที่เก็บ วันที่เก็บ และวันที่เตรียมตัวอย่าง เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

Table 1 Seventeen samples of *Mitragyna speciosa* leaves obtained from natural sources in various provinces of Thailand

Sample	Natural sources	Cultiva
1	Huai Yot District, Trang Province	Kan Khiao
2	Mueang District, Trang Province	Kan Daeng Hang Kang
3	Khlomg Thom District, Krabi Province	Kan Daeng
4	Bang Bua Thong District, Nonthaburi Province	Kan Khiao
5	Lat Bua Luang District, Ayutthaya Province	Kan Khiao
6	Makham District, Chanthaburi Province	Kan Daeng
7	Sam Khok District, Pathumthani Province	Kan Daeng Hang Kang
8	Lat Lum Kaeo District, Pathumthani Province	Kan Daeng Hang Kang
9	Sai Noi District, Nonthaburi Province	Kan Khiao
10	Rangae District, Narathiwat Province	Kan Khiao
11	Lang Suan District, Chumphon Province	Kan Khiao
12	Sawi District, Chumphon Province	Kan Khiao
13	Pak Kret District, Nonthaburi Province	Kan Khiao
14	Bang Len District, Nakhon Pathom Province	Kan Daeng
15	Bang Yai District, Nonthaburi Province	Kan Daeng
16	Tha Sae District, Chumphon Province	Kan Khiao
17	Bang Sue District, Bangkok Province	Kan Khiao



Figure 3 *Mitragyna speciosa* leaves; Kan Khiao (authentic sample)

1.2 สารมาตรฐาน

สารมาตรฐานไมทราจีนีน ความบริสุทธิ์ 95.4% (Chromadex, Lot: 00013890-00223)

1.3 สารเคมีและตัวทำละลาย

ethyl acetate AR (Fisher Scientific, UK), chloroform AR (RCI Labscan Limited, Thailand), hexane (Merck, Germany), methanol AR (Merck, Germany), ferric chloride (BDH, UK), hydrochloric acid (Merck, Germany), sulfuric acid (Labscan, Thailand), ethanol AR (RCI Labscan Limited, Thailand), absolute ethanol (RCI Labscan Limited, Thailand), distilled water, Bismuth subnitrate (Merck, Germany), acetic acid (Merck, Germany), potassium iodide (Merck, Germany)

1.4 วัสดุวิทยาศาสตร์และเครื่องแก้ว

HPTLC Silica gel 60F254 Glass plate ขนาด 20 × 10 เซนติเมตร No.1056420001 (Merck, Germany), กระดาษกรองเบอร์ 4 (Whatman, UK), กระดาษกรองปราศจากเถ้าเบอร์ 41 (Whatman, UK) และกระดาษลิทมัส (Merck, Germany), แผ่นแมกนีเซียม (magnesium ribbon), ขวดซังสาร, ถ้วยกระเบื้อง, ถ้วยระเหย, โถแก้วดูดความชื้น, ขวดแก้วปรับปริมาตร, ปิเปตแก้วชนิดไม่มีขีดบอกปริมาตร

(pasteur pipette)

1.5 เครื่องมือ

ตู้บรอนไฟฟ้ารุ่น UL-50 (Memmert), เครื่องบดป่น รุ่น RT 34 (ChyunTseh Industrial), เครื่องแรง รุ่น AS 200 Basic (Retsch), เครื่องที่มีขนาดช่อง 180 ไมโครเมตร (Endocott), เครื่องระเหยสุญญากาศ ประกอบด้วย rotavapor รุ่น N-1000 (Eyela) และอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิรุ่น SB-1000 (Eyela), เครื่องทำสุญญากาศรุ่น A-3S (Eyela) และเครื่องทำน้ำเย็นหมุนเวียน รุ่น CA-101 (Eyela), เตาเผาอุณหภูมิสูง (Muffle furnace, Thermolyne), ชุดเครื่อง TLC densitometer ประกอบด้วยเครื่องใส่สารตัวอย่าง (Automatic TLC Sampler 4), เครื่องถ่ายภาพโครมาโตกราฟ (TLC Digital camera รุ่น TLC Visualizer 2) และเครื่องตรวจอ่านแผ่น TLC (TLC Scanner 3) ยี่ห้อ CAMAG, เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น GX-6100 (AND) และเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น XT 220A (Precisa)

2. วิธีการศึกษา

การศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมีและคุณภาพทางเคมีของตัวอย่างใบกระท่อม จำนวน 17 ตัวอย่าง โดยวิธีการวิเคราะห์ตามตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทยในการทดสอบแต่ละตัวอย่างทำ 2 ซ้ำ และใช้ค่าทางสถิติในการคำนวณเพื่อหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยใช้วิธีดังต่อไปนี้

2.1 การศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมี (chemical identification)

1) ปฏิกริยาการเกิดสี (color reaction)^[7,8,9]

ก. Dragendorff's reagent test^[7,8,9]

ซึ่งตัวอย่าง 0.5 กรัม เติมน้ำเอธิลแอลกอฮอล์ (absolute ethanol) 20 มิลลิลิตร นำไปรีฟลักซ์

(reflux) นาน 20 นาที กรอง นำสารละลายที่กรองได้ 2 มิลลิลิตร ระเหยให้แห้งบนอ่างอังไอน้ำ แล้วละลาย กลับด้วยกรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) จำนวน 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายตราเจนดรอพฟ์ (Dragendorff) 2-3 หยด สังเกตผลที่เกิดขึ้น ถ้าเป็น ผลบวกสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองส้มและมี ตะกอนสีส้มแดง (Table 2)

ข. Shinoda's test^[7,8,9]

นำสารละลายที่กรองได้ 2 มิลลิลิตร ในข้อ ก. ไปเติมแผ่นแมกนีเซียม (magnesium ribbon) 2-3 ชิ้น และกรดไฮโดรคลอริก จำนวน 1 มิลลิลิตร นำไปอุ่นในอ่างอังไอน้ำ 5-10 นาที สังเกตผลที่เกิดขึ้น ถ้าเป็นผลบวกสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีแดง เข้ม (Table 2)

ค. Ferric chloride test^[7,8,9]

นำสารละลายที่กรองได้ 2 มิลลิลิตร ในข้อ ก. เติมสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ (ferric chloride) ความเข้มข้นร้อยละ 10.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรใน น้ำกลั่น (เตรียมโดยละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ จำนวน 10 กรัม ในน้ำกลั่น จำนวน 100 มิลลิลิตร^[8]) จำนวน 2-3 หยด สังเกตผลที่เกิดขึ้น ถ้าเป็นผลบวกสารละลาย จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินแกมดำ (Table 2)

2) โครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (Thin Layer Chromatography)

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่าง 1 กรัม เติมเอธิลอะซิเตท 40 มิลลิลิตร นำไปรีฟลักซ์ นาน 20 นาที กรอง ระเหย ให้แห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จากนั้นละลาย สารที่เหลือ (residue) ด้วยเอธิลอะซิเตท 10.0 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ละลายสารมาตรฐานไมโทราไจนีน ให้มี

ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในเมทานอล

การเตรียมสารละลายทดสอบ (test solution)

สารละลายตราเจนดรอพฟ์ (Dragendorff reagent) เตรียมโดยละลายบิสมัทซับไนเตรต (Bismuth subnitrate) 0.85 กรัม ในกรดแอซีติก (acetic acid) 10 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ (Potassium iodide) เข้มข้นร้อยละ 40 โดยมวลต่อปริมาตร 50 มิลลิลิตร สารละลายเพื่อใช้ (stock solution) เก็บ ไว้ในตู้เย็นก่อน ใช้วิธีการเตรียม คือ ปิเปต สารละลาย เพื่อใช้ 10 มิลลิลิตร ผสมกับกรดแอซีติก 20 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร^[8]

การเตรียมวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase)

เตรียมวัฏภาคเคลื่อนที่ที่พัฒนาเอง โดยผสม เฮกเซน (hexane) กับเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) ในอัตราส่วน 6: 4 ให้เข้ากันดี นำมาใส่ในโถแก้ว โครมาโทกราฟี ทิ้งไว้อย่างน้อย 1 ชั่วโมง ก่อนใช้ เพื่อให้บรรยากาศในโถแก้วอิ่มตัวด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่

ก. วิธีการ

ใช้เครื่อง Automatic TLC Sampler 4 หยดสารละลายตัวอย่าง ทั้ง 17 ตัวอย่าง ชนิดละ 1 ไมโครลิตร และสารละลายมาตรฐาน 1 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นเคลือบซิลิกาเจล ขนาด 20 × 10 เซนติเมตร ความหนา 0.25 มิลลิเมตร ในแนวระดับเดียวกัน (ความยาวของแถบประมาณ 6 มิลลิเมตร) โดยให้ห่าง จากขอบล่างของแผ่นประมาณ 15 มิลลิเมตร ห่างจาก ขอบด้านซ้ายและขวาประมาณ 10 มิลลิเมตร และให้ มีระยะห่างระหว่างแถบของสารละลายตัวอย่างแต่ละ ชนิดไม่น้อยกว่า 4 มิลลิเมตร ฝึ่งให้แห้ง แล้วนำไปวาง ในโถแก้วทำโครมาโทกราฟีที่อิ่มตัวด้วยวัฏภาค เคลื่อนที่ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อวัฏภาคเคลื่อนที่

ซึมขึ้นไปตามผิวที่ฉาบสูง 8 เซนติเมตร นำแผ่นเคลือบซิลิกาเจลออกมาผึ่งไว้ให้แห้งในตู้ดูดควัน แล้วนำไปตรวจสอบ

ข. การตรวจสอบ

นำแผ่นเคลือบซิลิกาเจลไปพ่นด้วยสารละลายตราเจนตรอฟฟี่ ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วนำไปตรวจสอบลักษณะของโครมาโทแกรมของสารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐาน ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร และแสงสีขาว (white light) ด้วยเครื่องถ่ายภาพโครมาโทกราฟี (Table 3, Figure 4 and Figure 5)

2.2 การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ (physico-chemical properties)^[8]

1) ปริมาณความชื้นด้วยวิธี Loss on drying^[8]

ซึ่งตัวอย่าง 5 กรัม ที่ทราบน้ำหนักที่ถูกต้องเป็นเทคนิค 4 ตำแหน่ง ในขวดซึ่งน้ำหนักที่ทราบน้ำหนักคงที่ นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง และอบต่ออีก 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นลงในโถแก้วดูดความชื้นที่ใส่ซิลิกาเจล เพื่อหาน้ำหนักคงที่ (หมายถึง น้ำหนักที่ได้จากการชั่ง 2 ครั้ง มีค่าต่างกันไปไม่เกิน 0.5 มิลลิกรัม โดยการชั่งครั้งที่สองเพื่อหาความแตกต่างของน้ำหนัก จะชั่งภายหลังจากการอบที่ใช้เวลาเพิ่มขึ้นอีกหนึ่งชั่วโมง) นำไปคำนวณหาค่าร้อยละของปริมาณความชื้นโดยคำนวณจากน้ำหนักที่สูญเสียไปเมื่ออบให้แห้ง (Table 4)

2) ปริมาณเถ้ารวม^[8]

ซึ่งตัวอย่าง 2 กรัม ที่ทราบน้ำหนักที่ถูกต้องเป็นเทคนิค 4 ตำแหน่ง ในถ้วยกระเบื้องที่ทราบน้ำหนักคงที่ ในเตาเผาอุณหภูมิสูง โดยค่อยๆ เพิ่มอุณหภูมิเป็น 450 องศาเซลเซียส จนได้เถ้าสีขาวที่ปราศจากคาร์บอน ทิ้งไว้ให้เย็นในโถแก้วดูดความชื้นที่ใส่ซิลิกาเจล นำไปชั่งน้ำหนัก และเผาต่ออีก 1 ชั่วโมง

นำไปชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักคงที่นำไปคำนวณหาค่าร้อยละของปริมาณเถ้ารวม (Table 4)

3) ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด^[8]

เติมกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 25.0 มิลลิลิตร ลงในถ้วยกระเบื้องที่มีเถ้ารวมที่ได้ จากข้อ 2 ปิดด้วยฝากระจกนาฬิกา ต้มนาน 5 นาที กรองด้วยกระดาษกรองชนิดปราศจากเถ้า ค่อยๆ ล้างตะกอนด้วยน้ำร้อนจนน้ำล้างตะกอนมีความเป็นกลาง เมื่อทดสอบด้วยกระดาษลิตมัส นำเถ้าที่กรองได้และกระดาษกรองใส่ลงในถ้วยกระเบื้องใบเดิม ทำให้แห้งด้วยเตาร้อน เมื่อแห้งแล้วนำไปเผาต่อในเตาเผาอุณหภูมิสูงที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่ นำไปคำนวณหาค่าร้อยละของปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (Table 4)

4) ปริมาณสิ่งสกปรกด้วยน้ำ^[8]

ซึ่งตัวอย่าง 5 กรัม ที่ทราบน้ำหนักที่ถูกต้องเป็นเทคนิค 4 ตำแหน่ง นำมาแช่สกัดด้วยน้ำที่ทำให้อิ่มตัวด้วยคลอโรฟอร์ม (chloroform) 100 มิลลิลิตร (เตรียมโดยผสมคลอโรฟอร์ม 2.5 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร) ในขวดแก้วที่มีฝาปิดสนิท นาน 24 ชั่วโมง โดย 6 ชั่วโมงแรก ให้เขย่าด้วยเครื่องเขย่า ตั้งทิ้งไว้ 18 ชั่วโมง กรอง นำสารละลายที่กรองได้ ปริมาตร 20.0 มิลลิลิตร ใส่ในถ้วยปากกว้างที่ทราบน้ำหนักคงที่ ระเหยให้แห้งบนอ่างอังไอน้ำ นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่ นำไปคำนวณหาค่าร้อยละของปริมาณสิ่งสกปรกด้วยน้ำ (Table 4)

5) ปริมาณสิ่งสกปรกในเอทานอล^[8]

ซึ่งตัวอย่าง 5 กรัม ที่ทราบน้ำหนักที่ถูกต้องเป็นเทคนิค 4 ตำแหน่ง นำมาแช่สกัดด้วยเอทานอล 95% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดแก้วที่มีฝาปิดสนิท

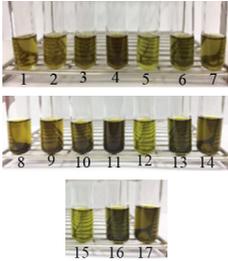
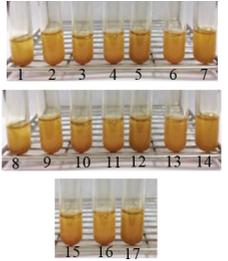
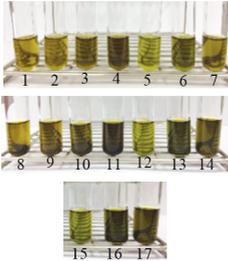
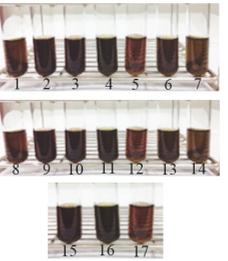
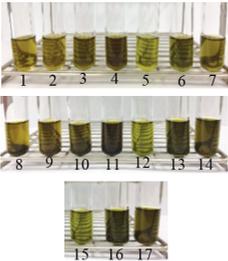
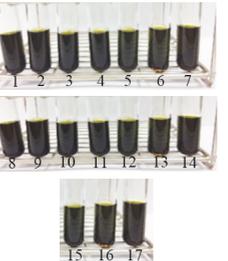
นาน 24 ชั่วโมง โดย 6 ชั่วโมงแรกให้เขย่าด้วยเครื่องเขย่า ตั้งทิ้งไว้ 18 ชั่วโมง กรอง นำสารละลายที่กรองได้ ปริมาตร 20.0 มิลลิลิตร ใส่ในถ้วยปากกว้างที่ทราบน้ำหนักคงที่ ระเหยให้แห้งบนอ่างอังไอน้ำ นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่นำไปคำนวณหาค่าร้อยละของปริมาณสิ่งสกัดในเอทานอล (Table 4)

ผลการศึกษา

จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยปฏิกิริยาการเกิดสีของสารสกัดจากใบกระท่อม พบว่าเมื่อ

ทดสอบด้วยสารละลายตราเจนดรอฟฟ์ ทุกตัวอย่างเปลี่ยนจากสีเขียวขี้ม้าอ่อนเป็นสีเหลืองส้ม และมีตะกอนสีส้มแดง แสดงว่าให้ผลบวกกับสารกลุ่มแอลคาลอยด์ เมื่อเติมแผ่นแมกนีเซียมและทดสอบด้วยการทำปฏิกิริยากับกรดไฮโดรคลอริก ทุกตัวอย่างเปลี่ยนจากสีเขียวขี้ม้าเป็นสีแดงเข้มปนเขียว แสดงว่าให้ผลบวกกับสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ และการทดสอบด้วยสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ ทุกตัวอย่างเปลี่ยนจากสีเขียวขี้ม้าเป็นสีเขียวขี้ม้าเข้มปนดำ แสดงว่าให้ผลบวกกับสารกลุ่มฟีนอลิก (Table 2)

Table 2 Preliminary phytochemical test of *Mitragyna speciosa* leaves extract

Test	<i>Mitragyna speciosa</i> leaves extract sample	Test results of <i>Mitragyna speciosa</i> leaves extract	Positive control
Dragendorff's reagent test			
Shinoda's test			
Ferric chloride test			

องค์ประกอบทางเคมีของใบกระท่อมมีสารกลุ่มแอลคาลอยด์ เมื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง โดยตรวจสอบแผ่นเคลือบซิลิกาเจลภายหลังทำปฏิกิริยาด้วยสารละลายดราเจนดรอพฟ์ สังเกตผลด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร จะให้แถบสารเรืองแสงสีแดง สีฟ้า และสีเขียวบนฟ้า รวมกันทั้งหมด 13 แถบ และสังเกตผลด้วยแสงสีขาว จะให้แถบสารสีเขียวบนดำและสีเหลืองบนน้ำตาล รวมกันทั้งหมด 7 แถบ พบ

การเรืองแสงสีเขียวบนฟ้าของสารละลายมาตรฐานไมทราจินิกินภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร และสีเหลืองบนน้ำตาลของสารละลายมาตรฐานไมทราจินิกิน ภายใต้แสงสีขาว ที่แถบสาร retention factor (Rf) เฉลี่ย 0.45 ซึ่งตรงกับ Rf เฉลี่ยของตัวอย่างสารสกัดเอทานอลจากใบกระท่อมทั้ง 17 ตัวอย่าง และมีค่า hR_f ช่วง 45-46 (Table 3, Figure 4 and Figure 5)

Table 3 hR_f Value of components in seventeen ethanolic extract samples of *Mitragyna speciosa* leaves

Band	hR_f Value	Detection after spraying with Dragendorff test solution	
		Ultraviolet light 366 nm	White light
1	3-4	red	green-black
2	5-6	red	green-black
3	7-8	red	green-black
4	16-17	blue	-
5	29-30	blue	-
6*	45-46	green-blue	yellow-brown
7	51-52	red	green-black
8	59-60	red	-
9	68-70	red	-
10	74-75	red	green-black
11	80-81	red	green-black
12	85-86	red	-
13	95-96	red	-

*Mitragynine

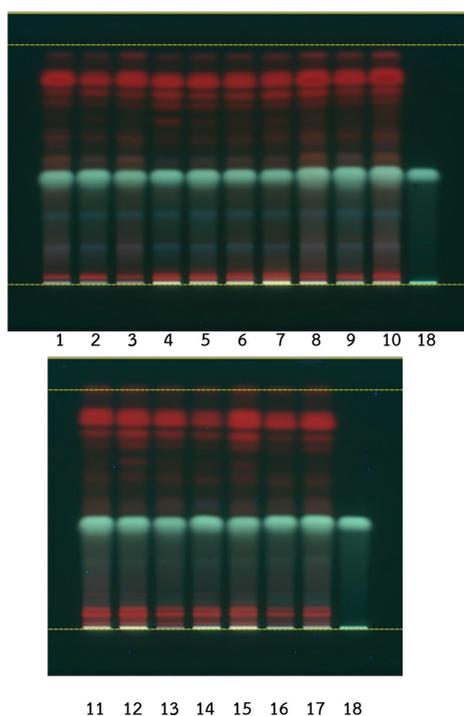


Figure 4 Thin layer chromatogram of ethanolic extract of *Mitragyna speciosa* leaves (1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 and 17) compare with authentic sample (6) and standard solution of mitragynine (18). Examine under ultraviolet light 366 nm.

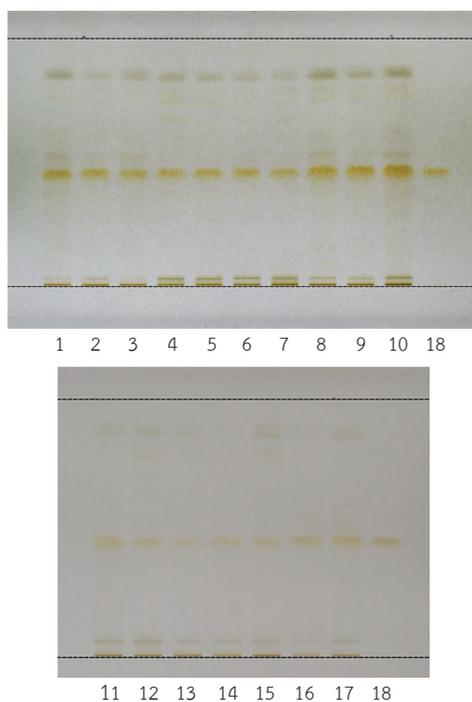


Figure 5 Thin layer chromatogram of ethanolic extract of *Mitragyna speciosa* leaves (1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 and 17) compare with authentic sample (6) and standard solution of mitragynine (18). Examine under white light.

การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีกายภาพของใบกระท่อม โดยการวิเคราะห์ปริมาณความชื้นด้วยวิธี Loss on drying ปริมาณเถ้ารวม ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด ปริมาณสิ่งสกัดด้วยน้ำ และปริมาณสิ่งสกัดในเอทานอล (Table 4) โดยค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยซึ่งได้จากการทำการทดสอบซ้ำ 2 ครั้ง จากผลการศึกษาดังกล่าว พบว่ามีค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เท่ากับ ร้อยละ 5.60 ± 0.68 , $4.67 \pm$

0.37 , 0.14 ± 0.02 , 19.52 ± 1.68 และ 17.12 ± 2.81 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ (Table 5)

การกำหนดข้อกำหนดมาตรฐาน โดยกำหนดเกณฑ์สูงสุดจาก ค่าเฉลี่ย +10% สำหรับปริมาณที่ระบุว่า “ไม่เกิน” และเกณฑ์ต่ำสุดจาก ค่าเฉลี่ย -10% สำหรับปริมาณที่ระบุว่า “ไม่น้อยกว่า” ดังนั้นจะได้ข้อกำหนดคุณภาพของใบกระท่อมที่ควรจะเป็นได้ (Table 5)

Table 4 Assessment of Physico-Chemical Property of *Mitragyna speciosa* leaves

Sample	Moisture content (%w/w)	Total ash content (%w/w)	Acid-insoluble ash content (%w/w)	Water-soluble extractive content (%w/w)	Ethanol-soluble extractive content (%w/w)
1	6.02	4.46	0.13	19.65	21.28
2	4.88	4.43	0.15	17.36	20.96
3	5.96	4.68	0.16	18.97	20.48
4	4.93	4.32	0.15	19.72	13.72
5	5.53	4.54	0.13	20.74	15.99
6	6.10	4.36	0.12	19.10	14.78
7	6.40	4.40	0.15	20.30	13.72
8	4.85	4.38	0.12	20.54	16.89
9	4.69	5.09	0.12	18.65	17.39
10	4.57	5.41	0.16	17.48	14.20
11	5.62	5.05	0.16	17.75	13.57
12	6.31	4.92	0.15	19.47	13.91
13	5.68	4.23	0.13	19.15	18.96
14	6.95	4.47	0.11	18.92	17.38
15	6.11	5.07	0.12	24.53	17.53
16	5.12	5.22	0.16	18.52	20.05
17	5.52	4.33	0.13	20.92	20.25
Mean	5.60	4.67	0.14	19.52	17.12
SD	0.68	0.37	0.02	1.68	2.81
10%	0.56	0.47	0.01	1.95	1.71

Note : 10% is 10% of mean

SD is Standard Deviation

Table 5 Quality control guidelines of *Mitragyna speciosa* leaves

Physico-Chemical Property	Mean \pm SD	Criteria		Quality control guidelines
		(Mean+10%)	(Mean - 10%)	
Moisture content	5.60 \pm 0.68	6.16	-	Not more than 7% w/w
Total ash content	4.67 \pm 0.37	5.14	-	Not more than 6% w/w
Acid-insoluble ash content	0.14 \pm 0.02	0.15	-	Not more than 1% w/w
Water-soluble extractive content	19.52 \pm 1.68	-	17.57	Not less than 17% w/w
Ethanol-soluble extractive content	17.12 \pm 2.81	-	15.41	Not less than 14% w/w

อภิปรายผล

การศึกษานี้มีความสำคัญเนื่องจากจะนำไปสู่การกำหนดมาตรฐานของใบกระท่อมในประเทศไทยเพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพสมุนไพรชนิดนี้ก่อนนำเข้าสู่กระบวนการผลิตเป็นยาหรือผลิตภัณฑ์สุขภาพ ซึ่งประกอบด้วย 1) การพัฒนาวิธีการตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีของใบกระท่อมโดยปฏิบัติการเกิดสีและวิธีโครมาโทกราฟีแบบชั้นบางเพื่อตรวจสอบว่าเป็นสมุนไพรถูกชนิด และ 2) การประเมินคุณลักษณะทางเคมีกายภาพเพื่อกำหนดเป็นข้อกำหนดคุณภาพสำหรับใบกระท่อม ผลจากการศึกษานี้จะเสนอเข้าสู่การพิจารณาบรรจุเป็นมอโนกราฟีในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทยต่อไป จากการทบทวนรายงานการศึกษาวิจัยฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา พบว่าสารไมทราจินีน มีคุณสมบัติลดการปวด แก้อาการท้องเสีย มีฤทธิ์ต้านมาลาเรีย^[5] และมีฤทธิ์ต้านการซึมเศร้า^[6] ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้เลือกใช้ไมทราจินีนเป็นสารเทียบ (marker) ในการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของใบกระท่อม สำหรับผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง โดยทำปฏิกิริยากับสารละลายดราเจนดรอพฟ์ ซึ่งเป็นสารเคมีที่ให้

ผลบวกในการทำปฏิกิริยากับสารกลุ่มแอลคาลอยด์จากผลการทดสอบ พบว่าสารสกัดเอทานอลจากใบกระท่อมมีองค์ประกอบทางเคมีอย่างน้อย 13 ชนิด ทุกตัวอย่างตรวจพบสารไมทราจินีน

การประเมินคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของใบกระท่อม ปริมาณความชื้นด้วยวิธี Loss on drying ปริมาณเถ้ารวมและเถ้าที่ไม่ละลายในกรด การกำหนดปริมาณความชื้นมีความสำคัญในการควบคุมคุณภาพทางเคมีเนื่องจากความชื้นมีผลต่อความคงสภาพของตัวอย่าง ถ้ามีความชื้นมากจะทำให้สมุนไพรเกิดการปนเปื้อนจุลินทรีย์ได้ง่าย รวมทั้งอาจเกิดปฏิกิริยาการสลายตัวด้วยน้ำ (hydrolysis) ทำให้องค์ประกอบทางเคมีเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ส่วนเถ้า นั้น หมายถึง สิ่งที่คงเหลืออยู่จากการเผาไหม้อย่างสมบูรณ์ เถ้าของพืชส่วนใหญ่ประกอบด้วยด่าง ในรูปคาร์บอเนต (carbonate) ฟอสเฟต (phosphate) คลอไรด์ (chloride) และซัลเฟต (sulphate) ปริมาณเถ้ารวม เป็นการบ่งบอกถึงคุณสมบัติทางกายภาพของสมุนไพรตามธรรมชาติ เถ้าของพืชมีการละลายได้ดีในกรดไฮโดรคลอริก มีสารคงเหลือจากการเผาไหม้น้อย การวิเคราะห์ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรดจึงเป็นวิธีตรวจสอบสิ่งแปลกปลอมที่เป็นสารอนินทรีย์

เช่น หิน กรวด หรือทราย ที่เกิดขึ้น ในกระบวนการเก็บเกี่ยวและทำความสะอาด หรืออาจมีสิ่งแปลกปลอมที่ได้จากปุ๋ยเคมี การกำหนดมาตรฐานปริมาณเหล่านี้จึงต้องระบุว่า “ไม่เกิน” โดยทั่วไปสมุนไพรไม่ควรมีความชื้นมากกว่าร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก ปริมาณแฉัรววมจะมีค่าอยู่ที่ร้อยละ 1-20 โดยน้ำหนัก และปริมาณแฉัที่ไม่ละลายในกรดจะมีค่าอยู่ที่ร้อยละ 1-10 โดยน้ำหนัก^[10,11,12,13,14] ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณสารสกัดด้วยตัวทำละลาย ในการศึกษานี้เลือกใช้น้ำและเอทานอล 95% เป็นตัวทำละลาย ปริมาณสิ่งสกัดด้วยน้ำและปริมาณสิ่งสกัดในเอทานอล เป็นสิ่งบ่งชี้ถึงคุณภาพทางเคมี เนื่องจากบ่งชี้ถึงสารที่ออกฤทธิ์หรือกลุ่มของสารออกฤทธิ์หรือสารที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายแล้วนำไปใช้ประโยชน์ทางยาได้ การกำหนดมาตรฐานปริมาณเหล่านี้จึงต้องระบุว่า “ไม่น้อยกว่า” จากผลการทดสอบเมื่อศึกษาคุณสมบัติทางเคมีกายภาพในใบกระท่อม จำนวน 17 ตัวอย่าง โดยวิเคราะห์ปริมาณความชื้นด้วยวิธี Loss on drying ปริมาณแฉัรววม ปริมาณแฉัที่ไม่ละลายในกรด ปริมาณสิ่งสกัดด้วยน้ำ และปริมาณสิ่งสกัดในเอทานอล 95% พบว่ามีค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับร้อยละ 5.60 ± 0.68 , 4.67 ± 0.37 , 0.14 ± 0.02 , 19.52 ± 1.68 และ 17.12 ± 2.81 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ทั้งนี้ การประเมินคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของใบกระท่อมในวิธีการต่าง ๆ ที่กล่าวมา (Table 5) ผลจากการศึกษานี้สามารถเสนอเข้าสู่การพิจารณาบรรจุเป็นมอโนกราฟของวัตถุดิบสมุนไพรใบกระท่อมในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย เพื่อเป็นตำราอ้างอิงของประเทศต่อไป

การตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีของวัตถุดิบสมุนไพรใบกระท่อม มีประโยชน์ต่อการควบคุมคุณภาพทางเคมีให้เป็นที่ไปตามเกณฑ์ในการควบคุม

มาตรฐานยาสมุนไพรให้มีคุณภาพดีและมีความสม่ำเสมอ สามารถนำไปบริโภคได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อให้ผู้บริโภคมีความมั่นใจในการใช้สมุนไพรชนิดนี้อีกทั้งสมุนไพรใบกระท่อมอีกชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพในการนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพ ดังนั้น การตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ และการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีให้เป็นที่ไปตามข้อกำหนด จึงเป็นขั้นพื้นฐานในการพัฒนายาจากวัตถุดิบสมุนไพรใบกระท่อม นอกจากนี้ควรต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงคุณภาพของสารสกัดระหว่างกระบวนการผลิตเพื่อให้การควบคุมคุณภาพเป็นไปอย่างครบวงจร และคุณภาพของผลิตภัณฑ์สุดท้ายด้วย

ข้อสรุป

จากผลการศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมีเบื้องต้น ด้วยปฏิบัติการเกิดสีพบว่าใบกระท่อมทุกตัวอย่างให้ผลบวกกับกลุ่มแอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ และฟีนอลิก จากผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง พบว่าตัวอย่างใบกระท่อม 17 ตัวอย่าง ให้ผลบวกกับกลุ่มแอลคาลอยด์และตรวจพบไมทราจินีน จากผลการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีกายภาพพบว่าเกณฑ์ข้อกำหนดทางเคมีกายภาพของใบกระท่อมควรเป็นดังนี้ ปริมาณความชื้น ปริมาณแฉัรววม และปริมาณแฉัที่ไม่ละลายในกรด ควรมีค่าไม่เกินร้อยละ 7, 6 และ 1 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ สำหรับปริมาณสิ่งสกัดด้วยน้ำ และปริมาณสิ่งสกัดในเอทานอล ควรมีค่าไม่น้อยกว่าร้อยละ 17 และ 14 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ (Table 5) ผลจากการศึกษาวิจัยนี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการจัดทำข้อกำหนดมาตรฐานทางเคมีของใบกระท่อมในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย เพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพของใบกระท่อมในประเทศไทยต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้ร่วมวิจัยทุกท่านในห้องปฏิบัติการ การวิจัยเพื่อแยกสารสำคัญจากสมุนไพร และห้องปฏิบัติการฟิสิกส์ที่พืช สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ให้การสนับสนุนในงานวิจัยนี้

References

1. Boonyaprapat N, Chokchaicharoenporn O. Medicinal Plants Indigenous to Thailand. Bangkok: Prachachon; 1996;1(1):54-5. (in Thai).
2. Department of Thai Traditional and Alternative Medicine. Guidelines for the utilization of Kratom. 1st ed. Bangkok: Beyond Publishing Co.,Ltd. 2022. (in Thai)
3. Wungsintaweekul J. Kratom [Internet]. Nonthaburi: Center for Continuing Pharmacy Education. The Pharmacy Council; [cited 2019 July 24]. Available from: https://ccpe.pharmacycouncil.org/index.php?option=article_detail&subpage=article_detail&id= 251. (in Thai).
4. Panyaphu D, Namkeard S, Inchai W, Yossathera K. Kratom: Herbal Medicine or Narcotic Drug. J Thai Trad Alt Med. 2016;14(3):242-56. (in Thai).
5. Shuayprom A, Chaisomboonpan S, Ontong Sakwichai, Thiemthieprat P, Ruengkhet S, Thongchin T. Development and Method Validation of Mitragynine Contents in *Mitragyna Speciosa* (Korth.) Havil. Leaves by Ultra High Performance Liquid Chromatography. J Thai Trad Alt Med. 2023;21(2):416. (in Thai).
6. Idayu NF, Hidayat T, Moklas MAM, Sharida F, Raudzah ARN, Shamina AR, Apriyani E. Antidepressant-like effect of mitragynine isolated from *Mitragyna speciosa* Korth in mice model of depressant. Phytomedicine. 2011;18(5):402-07.
7. Osman ME, Ahmed EM, Eltohami MS. Preliminary phytochemical evaluation and seed proximate analysis of Surib (*Sesbania leptocarpa* DC.). Sudan JMS. 2013;8(1):29-34.
8. Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. Thai Herbal Pharmacopoeia. Volume II. The Agricultural Cooperative Federation of Thailand Limited, 2020.
9. Ahuja J, Suresh J, Deep A, Madhuri, Pratyusha, Ravi. Phytochemical screening of aerial parts of *Artemisia parviflora* Roxb.: A medicinal plant. Pharm Lett. 2011;3:116-24.
10. Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. Thai Herbal Pharmacopoeia. Volume I. The Agricultural Cooperative Federation of Thailand Limited, 2016.
11. Plant Research and Development Division. Inspection methods to control quality and standardization. In: Herbal Guide to Basic Public Health. Department of Medical Sciences, Bangkok. Text and Journal Corporation Co., Ltd., 1988, 17-9. (in Thai).
12. Evans WC. Trease and Evans' Pharmacognosy. 13th ed. London: ELBS; 1989. pp.39-57, 127-9.
13. Dechatiwongse Na Ayudhya T, Jirawattanapong W. Standardization and quality control of herbs. Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Nonthaburi, 2001:1-25. (in Thai).
14. Drug Control Division, Food and Drug Administration. Guidelines for quality control of medicinal products from herbs. Bangkok: Agricultural Cooperative Assembly Printing Company of Thailand Limited, 2005.