

สมบัติทางเคมีและทางกายภาพเคมีของใบไต่ไม่รู้ล้ม

สายัณห์ เรืองเขตร*, ธนวัฒน์ ทองจีน, พีรธรรม เทียมเทียบรัตน์, แสงตะวัน ศรีโบราณ,
ศักดิ์วิชัย อ่อนทอง, สุภารัตน์ รูปคม, นวรัตน์ จัดเจน และสันตกิจ นิลอุตมศักดิ์

สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ อำเภอเมืองนนทบุรี จังหวัดนนทบุรี 11000

* ผู้รับผิดชอบบทความ: ruengkhetayan@gmail.com

บทคัดย่อ

บทนำและวัตถุประสงค์: ไต่ไม่รู้ล้มมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Elephantopus scaber* L. วงศ์ Asteraceae ในทางภูมิปัญญาพื้นบ้านและชุมชนบนพื้นที่สูงในประเทศไทย มีการนำส่วนรากและต้นมาตากแห้งเพื่อต้มน้ำดื่มหรือดองเหล้า โดยมีสรรพคุณโดดเด่นในการบำรุงกำลัง บำรุงกำลัง แก้ปวดเมื่อย ขับปัสสาวะ และรักษาโรคเบาหวาน นอกจากนี้ส่วนใบยังมีสรรพคุณในการรักษาบาดแผล แก้ไข้และแก้ไข้ สมุนไพรชนิดนี้ยังไม่มีข้อกำหนดมาตรฐานในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทยเพื่อใช้เป็นมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของใบไต่ไม่รู้ล้ม เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการจัดทำข้อกำหนดมาตรฐานของสมุนไพรชนิดนี้

วิธีการศึกษา: ทำการรวบรวมตัวอย่างไต่ไม่รู้ล้ม จำนวน 12 ตัวอย่าง จากแหล่งธรรมชาติของประเทศไทย นำมาศึกษาโดยเปรียบเทียบกับตัวอย่างจริง 1 ตัวอย่างที่ได้รับมาจากห้องปฏิบัติการพืชพิษภัณฑ์พืช นำตัวอย่างไต่ไม่รู้ล้มมาตรวจสอบเบื้องต้นทางเคมีด้วยปฏิกิริยาการเกิดสี พิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีโครมาโทกราฟีผิวบาง และศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพเคมี

ผลการศึกษา: ผลการตรวจสอบเบื้องต้นทางเคมีด้วยปฏิกิริยาการเกิดสีพบว่าให้ผลบวกกับสารในกลุ่มฟีนอลิกและฟีนอลิก เมื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีโครมาโทกราฟีผิวบาง พบว่าให้ผลบวกกับสารกลุ่มฟีนอลิก และตรวจพบกรดคลอโรจีนิก ทั้ง 12 ตัวอย่าง เมื่อศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของไต่ไม่รู้ล้ม ได้แก่ ปริมาณความชื้นด้วยวิธีการวัดถ่วง ปริมาณเถ้ารวม ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด ปริมาณสิ่งสกัดด้วยน้ำ และปริมาณสิ่งสกัดด้วยเอทานอล 95% พบว่ามีค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับร้อยละ 9.33 $\pm$ 0.75, 6.42 $\pm$ 1.20, 2.70 $\pm$ 0.92, 15.55 $\pm$ 3.60 และ 7.05 $\pm$ 1.59 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ

อภิปรายผล: ตัวอย่างไต่ไม่รู้ล้ม ทั้ง 12 ตัวอย่าง ตรวจพบสารที่มีค่า hR_f และสีตรงกันกับสารมาตรฐานกรดคลอโรจีนิกที่มีค่า hR_f เท่ากับ 30 – 31 แต่จากความเข้มของ band ที่ต่างกันแสดงว่ามีปริมาณกรดคลอโรจีนิกมากน้อยต่างกัน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะความแตกต่างของสายพันธุ์ อยู่ต้นสมุนไพร ระยะเวลาในการเก็บเกี่ยว สภาพดิน แร่ธาตุ สภาพภูมิประเทศหรือภูมิอากาศ จากการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพเคมีควรกำหนดเกณฑ์ข้อกำหนดทางกายภาพเคมีของใบไต่ไม่รู้ล้มแห่งนี้ ปริมาณความชื้น ปริมาณเถ้ารวม และปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด ควรมีค่า

ไม่เกินร้อยละ 10, 7 และ 3 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ และปริมาณสิ่งสกัดด้วยน้ำ และปริมาณสิ่งสกัดด้วยเอทานอล 95% ควรมีค่าไม่น้อยกว่าร้อยละ 14 และ 7 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ

ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ: ผลการศึกษานี้นำไปสู่การจัดทำมโนกราฟข้อกำหนดมาตรฐานของใบไผ่ไม่รู้ลืม และสามารถใช้เป็นแนวทางในการกำหนดมาตรฐานของใบไผ่ไม่รู้ลืมแห่งในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย เพื่อใช้อ้างอิงในการควบคุมคุณภาพต่อไป หากในอนาคตมีงานวิจัยที่แสดงว่าสารไผ่ไม่รู้ลืมมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่ควรจะนำไผ่ไม่รู้ลื้อมาพัฒนาเป็นยา ควรต้องมีการวิจัยเชิงปริมาณเพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารนั้นใน standardized extract เพื่อการพัฒนาจากสารสกัดไผ่ไม่รู้ลื้อมีที่ควบคุมคุณภาพ สำหรับการศึกษาทางพิษวิทยา การวิจัยทางคลินิก และการใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์ รวมทั้งพัฒนามโนกราฟใหม่ของสารสกัดไผ่ไม่รู้ลืมในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย

คำสำคัญ: ไผ่ไม่รู้ลืม, คุณสมบัติทางกายภาพเคมี, ข้อกำหนดมาตรฐาน, การควบคุมคุณภาพ

Chemical and Physicochemical Properties of *Elephantopus scaber* L. Leaves

Sayan Ruengkhet*, Thanawat Thongchin, Peradhama Thiemthieprat, Sangtawan Sriboran, Sakwichai Ontong, Sudarat Rupkhom, Nawarat Chadchen, and Santakit Ninudomsak

Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Tiwanon Road, Mueang Nonthaburi District, Nonthaburi Province 11000, Thailand

* **Corresponding author:** ruengkhetsayan@gmail.com

Abstract

Introduction and Objective: *Elephantopus scaber* L., a member of the Asteraceae family, is a medicinal herb traditionally utilized by local communities and high-altitude ethnic groups in Thailand. According to indigenous wisdom, the roots and whole plants are typically sun-dried and prepared as decoctions or medicinal tinctures (steeped in alcohol). Its primary therapeutic properties include enhancing physical vigor, acting as an aphrodisiac, relieving muscular pain, serving as a diuretic, and treating various male-specific ailments. Additionally, the leaves are also employed for wound healing and relieving fever and cough. Despite its extensive traditional use, *E. scaber* lacks established quality control specifications in the Thai Herbal Pharmacopoeia. Consequently, this study aims to investigate the physicochemical properties of *E. scaber* L. leaves to provide information for the development of standard specification monograph and quality control of this herbal material.

Methods: Twelve samples of *E. scaber* L. were obtained from natural sources in Thailand and compared with the authentic sample received from the Herbarium Laboratory. Samples of *E. scaber* L. were preliminarily examined for chemical properties using color reaction. Chemical identification was performed using the thin layer chromatography (TLC) method and their physicochemical properties were also determined.

Results: All 12 samples, based on the color reactions of the preliminary chemical examination, 12 were positive when tested for flavonoids and phenolic compounds; and based on the TLC method, they were positive for flavonoids and chlorogenic acid. As for their physicochemical property studies including gravimetric method, their mean amounts $\pm$ SD for the moisture content, total ash, acid-insoluble ash, water-soluble extractive and 95% ethanol-soluble extractive were 9.33 ± 0.75 %, 6.42 ± 1.20 %, 2.70 ± 0.92 %, 15.55 ± 3.60 % and 7.05 ± 1.59 % w/w, respectively.

Discussion: All 12 samples of *E. scaber* L. were found to contain substances with hR_f values and colors identical to the chlorogenic acid standard, with an hR_f value of approximately 30 – 31. However, variations in band intensity suggest differing concentrations of chlorogenic acid across the samples. These differences may be attributed to variations in cultivars, the age of the herbal plant, harvest time, soil conditions, mineral content, topography, or climatic conditions. Based on the results of the physicochemical analysis, the quality standards for dried *E. scaber* L. leaves should be defined as follows: moisture content, total ash, and acid-insoluble ash should be no more than 10%, 7%, and 3% w/w, respectively. Furthermore, the contents of water-soluble extractive and 95% ethanol-soluble extractive should be not less than 14% and 7% w/w, respectively.

Conclusion and Recommendation: The findings of this study will contribute to the establishment of a standard specification monograph for *E. scaber* L. leaf in the Thai Herbal Pharmacopoeia (THP), as reference for its quality control. If future research identifies specific compounds with significant pharmacological activity suitable for drug development, quantitative research should be conducted to analyze those markers within a standardized extract. This is essential for toxicological studies, clinical trials, and future commercial utilizations, including the development of a new monograph for *E. scaber* L. standardized extracts in THP.

Key words: *Elephantopus scaber* L., physicochemical properties, proposed specifications, quality control

บทนำและวัตถุประสงค์

โดไม่รู้ล้ม มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Elephantopus scaber* L. อยู่ในวงศ์ Asteraceae มีชื่ออื่น ๆ เช่น ขี้โพนกุ่ม กิ่งโพนกุ่ม เคยโบ้ หญ้าสามสิบสองหาบ โดไม่รู้ล้มเป็นไม้ล้มลุก ลำต้นสั้น ใบเดี่ยว เรียงซ้อนสลับเป็นวง รูปขอบขนาน หรือรูปใบหอกกลับ มักแผ่ราบไปกับผิวดิน ขอบใบหยักฟันเลื่อย ห่องใบมีขนมากกว่าหลังใบ ดอกช่อแทงออกจากกลางต้น ก้านช่อแตกแขนงได้ ดอกย่อยขนาดเล็ก กลีบดอกสีม่วง ออกเป็นกระจุกที่ปลายก้านดอก รองรับด้วยใบประดับแข็ง ผลเป็นผลแห้ง ไม่แตก^[1] (Figure 1) ในประเทศไทยพบพืชในสกุลนี้ 3 ชนิดหลัก ได้แก่ โดไม่รู้ล้ม (*Elephantopus scaber* L.), โดดอกขาว

(*Elephantopus mollis* Kunth.) และโคลาโต หรือต้นไต้ดิน (*Pseudelephantopus spicatus* (Juss. ex Aubl.) C.F. Baker)^[2]

โดไม่รู้ล้มเป็นพืชที่พบการแพร่กระจายทั่วไปในป่าโปร่งและป่าเต็งรังทุกภูมิภาคของประเทศไทย ตามภูมิปัญญาพื้นบ้านและชุมชนบนพื้นที่สูง นิยมนำรากและต้นมาตากแห้งเพื่อปรุงเป็นยาสมุนไพรในรูปแบบการต้มน้ำดื่มหรือดองสุรา โดยมีสรรพคุณเด่นในการบำรุงกำลัง บำรุงกำหนด แก้ปวดเมื่อย ขับปัสสาวะ และรักษาโรคเฉพาะบุรุษ นอกจากนี้ ส่วนใบยังมีสรรพคุณในการรักษาบาดแผล แก้ไข้ และบรรเทาอาการไอ^[3]

Figure 1 *Elephantopus scaber* L.

จากรายงานการศึกษาทางพฤกษเคมีเบื้องต้นพบว่า สารสกัดจากโตไม้รู้ล้มประกอบด้วยสารสำคัญหลายกลุ่ม ได้แก่ ฟเลโวนอยด์ (flavonoids), แทนนิน (tannins) และ ฟีนอลิก (phenolics)^[3] โดยเฉพาะสารกลุ่ม sesquiterpene lactone เช่น deoxyelephantopin ซึ่งมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านอักเสบ ต้านมะเร็ง และฤทธิ์ปกป้องตับ^[5]

มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและสมรรถภาพทางเพศ ผลการศึกษาวัยฉัยในสัตว์ทดลองบ่งชี้ถึงศักยภาพของโตไม้รู้ล้มในด้านต่าง ๆ ดังนี้ คือ สารสกัดมีแนวโน้มช่วยเสริมสมรรถภาพทางเพศและกระตุ้นการสร้างอสุจิ (spermatogenesis) ทำให้ความหนาแน่นของอสุจิเพิ่มสูงขึ้น โดยไม่ส่งผลกระทบต่อระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน^[6,7] และมีฤทธิ์ลดความดันโลหิตและอัตราการเต้นของหัวใจเพียงชั่วคราว ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบด้านความปลอดภัยเมื่อเทียบกับยาแผนปัจจุบันบางชนิด^[3,4] ข้อควรระวังเรื่องขนาดการใช้ คือ การใช้สารสกัดโตไม้รู้ล้มในความเข้มข้นต่ำมีประสิทธิภาพในการเสริมสมรรถภาพทางเพศได้ดีกว่าการใช้ในขนาดสูง ซึ่งอาจให้ผลในทาง

ตรงกันข้าม นอกจากนี้ เมื่อเปรียบเทียบกับตะโกนา (*Diospyros rhodocalyx* Kurz.) พบว่า แม้ตะโกนาจะช่วยเพิ่มจำนวนอสุจิ แต่ไม่มีฤทธิ์เสริมสมรรถภาพทางเพศ และอาจส่งผลเสียต่อตับ ไต ม้าม และระบบภูมิคุ้มกันได้^[6]

มีรายงานการศึกษาความปลอดภัยและการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดโตไม้รู้ล้ม พบว่าการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันและพิษเรื้อรัง (ระยะเวลา 180 วัน) ในหนูแรต ยืนยันว่าการได้รับสารสกัดในขนาดที่เหมาะสมไม่ก่อให้เกิดความผิดปกติต่อระบบไหลเวียนโลหิต อวัยวะภายใน หรือระบบภูมิคุ้มกัน อย่างไรก็ตาม การได้รับสารในความเข้มข้นที่สูงเกินไปอาจส่งผลกระทบต่ออวัยวะสำคัญ จึงจำเป็นต้องมีการควบคุมปริมาณและคุณภาพอย่างเคร่งครัด^[3,4]

ปัจจุบันมีการศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมีของใบโตไม้รู้ล้มด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน เช่น กรดคลอโรจีนิค (chlorogenic acid), อะพิจิจีนิน (apigenin) และลูทีโอลิน (luteolin) และการหาปริมาณกรดคลอโรจีนิค (chlorogenic acid) ด้วยวิธี

High Performance Liquid Chromatography (HPLC)^[8]

แม้จะมีข้อมูลงานวิจัยรองรับ แต่เนื่องจากในปัจจุบันได้ไม่รู้จักยังไม่มีการระบุข้อกำหนดมาตรฐาน (standard specifications) ในตำรายาสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia) ซึ่งเป็นข้อกำหนดสำคัญในการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ยาผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร หรือเครื่องสำอางในระดับอุตสาหกรรม เพื่อให้เกิดการยอมรับและสามารถนำสมุนไพรชนิดนี้ไปใช้ประโยชน์ได้อย่างมีประสิทธิภาพและปลอดภัย ผู้วิจัยจึงมุ่งเน้นศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพเคมีของใบโดไม้ไม่รู้ล้ม เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพิสูจน์เอกลักษณ์ ตรวจสอบมาตรฐานทางเภสัชเวท และรวบรวมข้อมูลด้านการควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบ อันจะนำไปสู่การพัฒนามาตรฐานสมุนไพรในระดับสากลต่อไป

ระเบียบวิธีศึกษา

1. วัสดุ

1.1 ตัวอย่างสมุนไพร

ตัวอย่างวัตถุดิบโดไม้ไม่รู้ล้มสด จำนวน 12

ตัวอย่าง ที่เก็บจากเกือบทุกภาคของประเทศไทย ได้แก่ จันทบุรี ตรัง ตาก เพชรบุรี ชุมพร สุราษฎร์ธานี ตรัง พัทลุง และสงขลา ในช่วงระหว่างเดือนตุลาคม 2566 ถึงเดือนมีนาคม 2567 (Table 1) ผ่านการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเภสัชเวทเปรียบเทียบกับตัวอย่างแท้ (authentic) จำนวน 1 ตัวอย่าง ที่ได้จากอำเภอมะขาม จังหวัดจันทบุรี (Figure 1) ว่าเป็นโดไม้ไม่รู้ล้ม *Elephantopus scaber* L. วงศ์ Asteraceae โดยนักพฤกษศาสตร์ หอปฏิบัติการพิพิธภัณฑสถานวิทยาสสมุนไพร หมายเลขอ้างอิง DMSC 5321 จากนั้นนำมาคัดเลือกเฉพาะใบ ลำต้น และราก ล้างด้วยน้ำให้สะอาด ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ และอบให้แห้งด้วยเตาอบร้อนไฟฟ้าที่มีพัดลมระบายอากาศที่อุณหภูมิ 45 - 50 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง และนำตัวอย่างที่แห้งแล้วไปบดเป็นผงละเอียด (โดยแยกเป็น ใบ ลำต้น และราก) ผ่านร่อนที่มีขนาดช่อง 180 ไมโครเมตร เก็บผงตัวอย่างในขวดแก้วสีชา มีฝาปิดสนิท ระบุชื่อสมุนไพร แหล่งที่เก็บ วันที่เก็บ และวันที่เตรียมตัวอย่าง เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

Table 1 Twelve samples of *Elephantopus scaber* L. obtained from natural sources in various provinces of Thailand

Sample number	Natural sources
1	Makham District, Chanthaburi Province
2	Mae Ramat District, Tak Province
3	Mueang District, Trat Province
4	Ban Na Derm District, Suratthani Province
5	Ban Na San District, Suratthani Province
6	Wiang Sa District, Suratthani Province
7	Tha Yang District, Phetchaburi Province
8	Huai Yot District, Trang Province
9	Kong Ra District, Phatthalung Province (violet flower)
10	Kong Ra District, Phatthalung Province (white flower)
11	San Kala Khiri District, Songkhla Province
12	Sawi District, Chumphon Province

1.2 สารมาตรฐาน

สารมาตรฐานกรดคลอโรจีนิก (Chromadex, Grade P, lot no. 00003450-TVM)

1.3 สารเคมีและตัวทำละลาย

ethyl acetate AR (Fisher Scientific, UK), chloroform AR (RCI Labscan Limited, Thailand), glacial acetic acid (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, diphenylboric acid-2-aminoethyl ester (Sigma-Aldrich), polyethylene glycol 4000 (Sigma-Aldrich)

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) และ กระดาษลิตมัส (Merck, Germany), magnesium ribbon, ขวดซังสาร, ถ้วยกระเบื้อง, ถ้วยระเหย, โถแก้วดูดความชื้น, โถแก้วทำโครมาโทกราฟี, ขวดแก้วปรับปริมาตร, pasture pipette

1.5 เครื่องมือ

ตู้อบร้อนไฟฟ้ารุ่น UL-50 (Memmert), เครื่องบดปั่น 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) และ เครื่องทำน้ำเย็นหมุนเวียน รุ่น CA-101 (Eyela), เตาเผาอุณหภูมิสูง (Muffle furnace, Thermolyne), ชุดเครื่อง TLC densitometer ประกอบด้วยเครื่องพ่นสารตัวอย่าง (Automatic TLC Sampler 4), เครื่องถ่ายภาพโครมาโตกราฟี (TLC Digital camera รุ่น TLC Visualizer 2) และเครื่องตรวจอ่านแผ่น TLC (TLC Scanner 3) ยี่ห้อ CAMAG, เครื่องซัง 2 ตำแหน่ง รุ่น GX-6100 (AND) และเครื่องซัง 4 ตำแหน่ง รุ่น XT 220A (Precisa)

2. วิธีการศึกษา

การศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมีและคุณภาพทางเคมีของตัวอย่างโศไม่รู้จักที่เตรียม จำนวน 12 ตัวอย่าง ทำโดยวิธีการวิเคราะห์ตามตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย ในการทดสอบแต่ละตัวอย่างทำ 2 ซ้ำ และใช้ค่าทางสถิติในการคำนวณเพื่อหาค่าเฉลี่ย และ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยใช้วิธีดังต่อไปนี้

2.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมี (chemical identification)

1) ปฏิกริยาการเกิดสี (color reaction)^[9-11]

ก. Shinoda's test^[9-11]

ซังตัวอย่าง 0.5 กรัม เติมน้ำเอธานอล (absolute ethanol) 20 มิลลิลิตร นำไปรีฟลักซ์ (reflux) นาน 20 นาที กรอง นำสารละลายที่กรองได้ 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เจือจางด้วยน้ำเอธานอล จำนวน 1 - 2 มิลลิลิตร เติมน้ำแมกนีเซียม (magnesium ribbon) 2 - 3 ชิ้น และกรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) จำนวน 1 มิลลิลิตร นำไปอุ่นในอ่างน้ำร้อน 5 - 10 นาที สังเกตผลที่เกิดขึ้น ถ้าเป็นผลบวกสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีแดงเข้ม

แสดงว่ามีสารกลุ่มเฟลโวนอยด์

ข. Ferric chloride test^[9-11]

ซึ่งตัวอย่าง 0.5 กรัม เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร นำไปรีฟลักซ์ นาน 20 นาที กรอง นำสารละลายที่กรองได้ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ (ferric chloride) ความเข้มข้นร้อยละ 10.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรในน้ำกลั่น^[12] จำนวน 2 - 3 หยด สังเกตผลที่เกิดขึ้น ถ้าเป็นผลบวกสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินแกมดำ แสดงว่ามีสารกลุ่มฟีนอลิก

2) โครมาโทกราฟีผิวบาง (Thin Layer Chromatography)

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ซึ่งตัวอย่าง 1 กรัม เติมแอ็บโซลูตเอทานอล 30 มิลลิลิตร นำไปรีฟลักซ์ นาน 30 นาที กรอง ระเหย ให้แห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จากนั้นละลายสารที่เหลือ (residue) ด้วยแอ็บโซลูตเอทานอล 3.0 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายสารมาตรฐาน

ละลายสารมาตรฐานกรดคลอโรจีนิก ให้มีความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในเมทานอล

การเตรียมสารละลายทดสอบ (test solution)

เนตเชอรัลโพรดักส์/พอลิเอทิลีนไกลคอล (natural products/polyethylene glycol, NP/PEG test solution)^[13]

สารละลายเอ็นพี (NP) เตรียมโดยละลายสาร diphenylboric acid-2-aminoethyl ester ในเมทานอล ให้มีความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ส่วนสารละลายพีอีจี (PEG) เตรียมโดยละลายสาร polyethylene glycol 4000 ในเอทานอล ให้มีความเข้มข้นร้อยละ 5.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

การเตรียมวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase)

เตรียมวัฏภาคเคลื่อนที่ที่พัฒนาเอง โดยผสมเอทิลแอซีเตต (ethyl acetate), กรดฟอร์มิก (formic acid), กรดกลีเซอิลแอซีติก (glacial acetic acid) และน้ำกลั่น (distilled water) ในอัตราส่วน 100:5:5:13 ให้เข้ากันดี นำมาใส่ในโถแก้วโครมาโทกราฟี ทิ้งไว้อย่างน้อย 2 ชั่วโมง ก่อนใช้ เพื่อให้บรรยากาศในโถแก้วอิ่มตัวด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่

ก. วิธีการ

ใช้เครื่อง Automatic TLC Sampler 4 หยดสารละลายตัวอย่าง ทั้ง 12 ตัวอย่าง ชนิดละ 6 ไมโครลิตร และสารละลายมาตรฐาน 2 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นเคลือบซิลิกาเจล ขนาด 20 × 10 เซนติเมตร ความหนา 0.25 มิลลิเมตร ในแนวระดับเดียวกัน (ความยาวของแถบประมาณ 6 มิลลิเมตร) โดยให้ห่างจากขอบล่างของแผ่นประมาณ 15 มิลลิเมตร ห่างจากขอบด้านซ้ายและขวาประมาณ 10 มิลลิเมตร และให้มีระยะห่างระหว่างแถบของสารละลายตัวอย่างแต่ละชนิดไม่น้อยกว่า 4 มิลลิเมตร ผึ่งให้แห้ง แล้วนำไปวางในโถแก้วทำโครมาโทกราฟีที่อิ่มตัวด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อวัฏภาคเคลื่อนที่ซึมขึ้นไปตามผิวที่ฉาบสูง 8 เซนติเมตร นำแผ่นเคลือบซิลิกาเจลออกมาผึ่งไว้ให้แห้งในตู้ดูดควัน แล้วนำไปตรวจสอบ

ข. การตรวจสอบ

นำแผ่นเคลือบซิลิกาเจลไปตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet, UV) ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร นำแผ่นเคลือบซิลิกาเจลไปพ่นด้วยสารละลายทดสอบเอ็นพี/พีอีจี โดยมีเทคนิคดังนี้ นำแผ่นเคลือบซิลิกาเจลไปทำให้ร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน

10 นาที จากนั้นพ่นด้วยสารละลายเอ็นพีขณะที่แผ่นเคลือบซิลิกาเจลยังร้อน แล้วพ่นทับด้วยสารละลายฟอสฟอรัสให้แห้งในอากาศและสังเกตผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร

2.2 การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพเคมี (physicochemical properties)^[14]

1) ปริมาณความชื้นด้วยวิธีกราวิเมตริก (gravimetric)^[14]

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

2) ปริมาณเถ้ารวม^[14]

ซึ่งตัวอย่าง 2 กรัม ที่ทราบน้ำหนักที่ถูกต้องเป็นเทคนิค 4 ตำแหน่ง ในถ้วยกระเบื้องที่ทราบน้ำหนักคงที่ ในเตาเผาอุณหภูมิสูง โดยค่อย ๆ เพิ่มอุณหภูมิเป็น 450 องศาเซลเซียส จนได้เถ้าสีขาวที่ปราศจากคาร์บอน ทิ้งไว้ให้เย็นในโถแก้วดูดความชื้นที่ใส่ซิลิกาเจล นำไปชั่งน้ำหนัก และเผาต่ออีก 1 ชั่วโมง นำไปชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักคงที่ นำไปคำนวณหาค่าร้อยละของปริมาณเถ้ารวม

3) ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด^[14]

เติมกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 25.0 มิลลิลิตร ลงในถ้วยกระเบื้องที่

มีเถ้ารวมที่ได้ จากข้อ 4 ปิดด้วยฝากระจกนาฬิกา ต้ม นาน 5 นาที กรองด้วยกระดาษกรองชนิดปราศจากเถ้า ค่อย ๆ ล้างตะกอนด้วยน้ำร้อนจนน้ำล้างตะกอนมีความเป็นกลางเมื่อทดสอบด้วยกระดาษลิตมัส นำเถ้าที่กรองได้และกระดาษกรองใส่ลงในถ้วยกระเบื้องใบเดิม ทำให้แห้งด้วยเตาร้อน เมื่อแห้งแล้วนำไปเผาต่อด้วยเตาเผาอุณหภูมิสูงที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่ นำไปคำนวณหาค่าร้อยละของปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด

4) ปริมาณสิ่งสกปรกด้วยน้ำ^[14]

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

5) ปริมาณสิ่งสกปรกด้วยเอทานอล 95%^[14]

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 จนได้น้ำหนักคงที่

นำไปคำนวณหาค่าร้อยละของปริมาณสิ่งสกัดด้วยเอทานอล 95%

ผลการศึกษา

2.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมี (chemical identification)

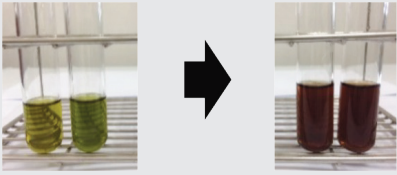
1) ปฏิริยาการเกิดสี (color reaction)

Shinoda's test และ Ferric chloride test

จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วย

ปฏิริยาการเกิดสีของสารสกัดด้วยตัวทำละลายจากโศไม่รู้อิมแห้ง พบว่าเมื่อเติมแผ่นแมกนีเซียมและทดสอบด้วยการทำปฏิริยากับกรดไฮโดรคลอริก ทุกตัวอย่างเปลี่ยนจากสีเขียวอ่อนเป็นสีแดงเข้ม แสดงว่าให้ผลบวกกับสารกลุ่มฟเลโวนอยด์ (flavonoids) และการทดสอบด้วยสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ ทุกตัวอย่างเปลี่ยนจากสีเขียวอ่อนเป็นสีเขียวแกมดำ แสดงว่าให้ผลบวกกับสารกลุ่มฟีนอลิก (phenolic compounds) (Table 2)

Table 2 Preliminary phytochemical test results of *Elephantopus scaber* L. extract

Test	Test results of <i>Elephantopus scaber</i> L. extract
Shinoda's test for flavonoids	
Ferric chloride test for phenolic compounds	

2) โครมาโทกราฟีผิวนาง (Thin Layer Chromatography)

องค์ประกอบทางเคมีของโศไม่รู้อิมมีสารกลุ่มฟเลโวนอยด์ เมื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีโครมาโทกราฟีผิวนาง โดยตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร พบว่าตัวอย่างที่ 1 - 6

ให้แถบมืด จำนวน 9 แถบ, ตัวอย่างที่ 7 และ 8 ให้แถบมืด จำนวน 3 แถบ, ตัวอย่างที่ 9 และ 10 ให้แถบมืด จำนวน 3 แถบ, ตัวอย่างที่ 11 และ 12 ให้แถบมืด จำนวน 6 แถบ (Figure 2A, Table 3, Table 4,

Table 5 และ Table 6) เมื่อตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร พบว่าตัวอย่างที่ 1 - 6

ให้แถบสีเขียวปนฟ้า สีฟ้า และสีแดงปนชมพู รวมทั้งหมด 8 แถบ, ตัวอย่างที่ 7 และ 8 ให้แถบสีเขียวปนฟ้า สีฟ้า

สีฟ้าปนเขียว และสีแดงปนชมพู รวมทั้งหมด 8 แถบ, ตัวอย่างที่ 9 และ 10 ให้แถบสีเขียวปนฟ้า สีฟ้า สีฟ้าปนเขียว และสีแดงปนชมพู รวมทั้งหมด 5 แถบ, ตัวอย่างที่ 11 และ 12 ให้แถบสีฟ้า สีฟ้าปนเขียว และสีแดงปนชมพู รวมทั้งหมด 6 แถบ (Figure 2B, Table 3,

Table 4, Table 5 และ Table 6) หลังจากพ่นด้วยสารละลายเอ็นพีขณะที่แผ่นเคลือบซิลิกาเจลยังร้อนแล้วพ่นทับด้วยสารละลายฟลูออรีน พบว่าตัวอย่างที่ 1-6 ให้แถบสีเหลืองปนเขียว สีฟ้า สีเหลือง และสีแดง รวมทั้งหมด 9 แถบ, ตัวอย่างที่ 7 และ 8 ให้แถบสีเหลืองปนเขียว สีเขียวปนฟ้า สีฟ้า สีเหลือง และสีแดง รวมทั้งหมด 6 แถบ, ตัวอย่างที่ 9 และ 10 ให้แถบสี

เหลืองปนเขียว สีเหลืองปนชมพู สีเขียวปนฟ้า สีฟ้า และสีแดง รวมทั้งหมด 8 แถบ, ตัวอย่างที่ 11 และ 12 ให้แถบสีเหลืองปนเขียว สีฟ้า สีเหลือง และสีแดง รวมทั้งหมด 6 แถบ และตัวอย่างทั้ง 12 ตัวอย่าง ตรวจพบกรดคลอโรจินิก (Figure 2C, Table 3, Table 4, Table 5 และ Table 6)

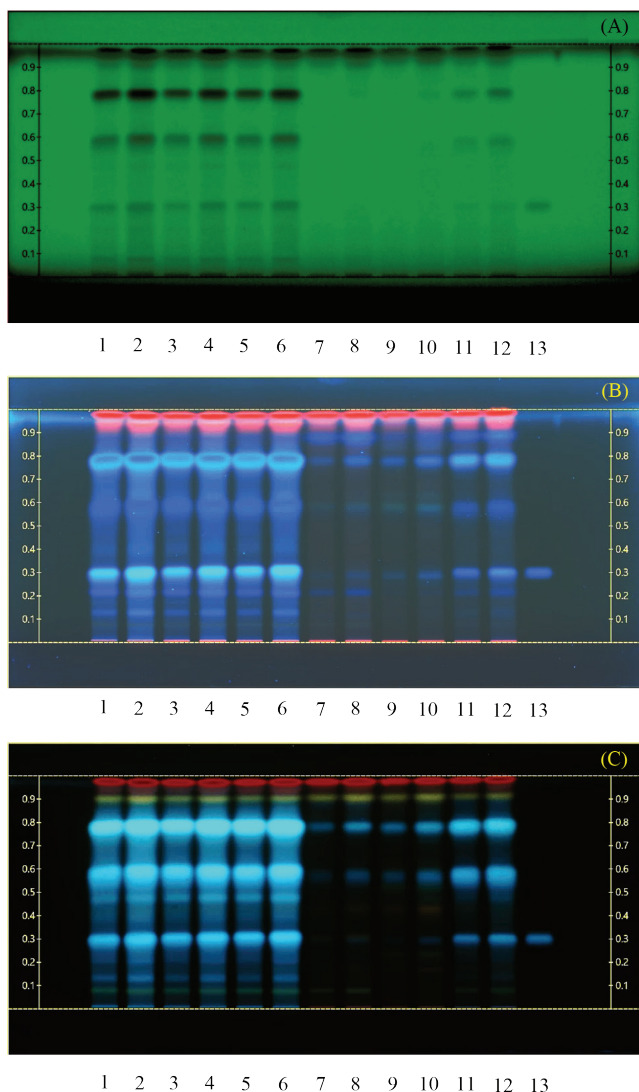


Figure 2 Thin Layer Chromatogram of Ethanolic Extracts of *Elephantopus scaber* L. (1–12) compared with standard solution of chlorogenic acid (13). Detection under UV light at 254 nm (A) and 366 nm (B) before spraying with NP/PEG test solution, detection under UV light at 366 nm (C) after spraying with NP/PEG test solution.

Table 3 hR_f Values of components in six ethanolic extract samples of *Elephantopus scaber* L. (1–6) compared with standard solution of chlorogenic acid (13)

Band	hR_f Value	Detection under UV light 254 nm	Detection under UV light 366 nm	
			Before spraying with NP/PEG Test Solution	After spraying with NP/PEG Test Solution
1	8–9	quenching	green–blue	yellow–green
2	11–12	quenching	blue	blue
3	21–22	quenching	blue	blue
4*	30–31	quenching	blue	light–blue
5	48–49	quenching	–	blue
6	58–59	quenching	blue	light–blue
7	79–80	quenching	blue	light–blue
8	90–91	quenching	red–pink	yellow
9	98–99	quenching	red–pink	red

* chlorogenic acid

Table 4 hR_f Values of components in two ethanolic extract samples of *Elephantopus scaber* L. (7 and 8) compared with standard solution of chlorogenic acid (13)

Band	hR_f Value	Detection under UV light 254 nm	Detection under UV light 366 nm	
			Before spraying with NP/PEG Test Solution	After spraying with NP/PEG Test Solution
1	8–9	quenching	green–blue	yellow–green
2	21–22	–	blue	–
3*	30–31	–	blue	light–blue
4	58–59	–	blue–green	light–blue
5	79–80	–	blue	light–blue
6	88–89	–	blue	–
7	90–91	quenching	red–pink	yellow
8	98–99	quenching	red–pink	red

* chlorogenic acid

Table 5 hR_f Values of components in two ethanolic extract samples of *Elephantopus scaber* L. (9 and 10) compared with standard solution of chlorogenic acid (13)

Band	hR_f Value	Detection under UV light 254 nm	Detection under UV light 366 nm	
			Before spraying with NP/PEG Test Solution	After spraying with NP/PEG Test Solution
1	21-22	–	–	yellow–pink
2	25-26	–	–	yellow–green
3*	30-31	–	blue	light–blue
4	45-46	–	–	yellow–pink
5	58-59	–	blue–green	light–blue
6	79-80	quenching	blue	light–blue
7	90-91	quenching	red–pink	yellow
8	98-99	quenching	red–pink	red

* chlorogenic acid

Table 6 hR_f Values of components in two ethanolic extract samples of *Elephantopus scaber* L. (11 and 12) compared with standard solution of chlorogenic acid (13)

Band	hR_f Value	Detection under UV light 254 nm	Detection under UV light 366 nm	
			Before spraying with NP/PEG Test Solution	After spraying with NP/PEG Test Solution
1	8-9	quenching	–	yellow–green
2	21-22	–	blue	–
3*	30-31	quenching	blue	light–blue
4	58-59	quenching	blue–green	light–blue
5	79-80	quenching	blue	light–blue
6	90-91	quenching	red–pink	yellow
7	98-99	quenching	red–pink	red

2.2 การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพเคมี (physicochemical properties)

การวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพเคมีของใบโศไม่รู้อัมแห้ง โดยการวิเคราะห์ปริมาณความชื้น ด้วยวิธีการวิกรมเมตริก ปริมาณเถ้ารวม ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด ปริมาณสิ่งสกัดด้วยน้ำ และปริมาณสิ่ง

สกัดด้วยเอทานอล 95% (Table 7) โดยค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยซึ่งได้จากการทำการทดสอบซ้ำ 2 ครั้ง จากผลการศึกษาดังกล่าว พบว่ามีค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เท่ากับ ร้อยละ 9.33 $\pm$ 0.75, 6.42 $\pm$ 1.20, 2.70 $\pm$ 0.92, 15.55 $\pm$ 3.60 และ 7.05 $\pm$ 1.59 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ (Table 7)

จากข้อมูลในตารางที่ 7 เมื่อนำมาทำเป็นข้อกำหนดมาตรฐาน โดยกำหนดเกณฑ์สูงสุดจาก ค่าเฉลี่ย + 10% สำหรับปริมาณที่ระบุ “ต้องไม่เกิน” (not more than, NMT) และเกณฑ์ต่ำสุดจาก

ค่าเฉลี่ย - 10% สำหรับปริมาณที่ระบุ “ต้องไม่น้อยกว่า” (not less than, NLT) จะได้ข้อกำหนดคุณภาพของโตไม้รู้ล้มที่ควรจะเป็นได้ดังแสดงใน Table 8

Table 7 Assessment of physicochemical properties of *Elephantopus scaber* L. leaf samples

Sample	Moisture content (% w/w)	Total ash content (% w/w)	Acid-insoluble ash content (% w/w)	Water-soluble extractive content (% w/w)	95% ethanol- soluble extractive content (% w/w)
1	9.97	6.22	3.28	18.24	8.69
2	8.93	5.97	2.64	18.65	8.74
3	9.52	9.96	0.34	18.11	8.36
4	10.14	6.32	3.42	17.84	8.27
5	8.58	5.87	2.12	17.64	7.99
6	9.14	6.55	3.27	19.35	8.86
7	8.35	5.27	2.10	9.14	4.88
8	8.12	5.35	2.13	10.54	5.11
9	10.59	6.66	3.58	13.66	5.73
10	9.64	6.19	3.15	10.74	5.15
11	9.71	6.20	3.18	17.01	5.97
12	9.28	6.44	3.24	15.66	6.87
Mean	9.33	6.42	2.70	15.55	7.05
SD	0.75	1.20	0.92	3.60	1.59
10%	0.93	0.64	0.27	1.55	0.71

Note: 10% is 10% of mean

SD is Standard Deviation

Table 8 Proposed specifications of *Elephantopus scaber* L. based on physicochemical findings

Physicochemical Properties	Mean $\pm$ SD	Criteria		Proposed specifications
		Not more than (Mean + 10%)	Not less than (Mean - 10%)	
Moisture content	9.33 $\pm$ 0.75	10.26	–	Not more than 10% w/w
Total ash content	6.42 $\pm$ 1.20	7.06	–	Not more than 7% w/w
Acid-insoluble ash content	2.70 $\pm$ 0.92	2.97	–	Not more than 3% w/w
Water-soluble extractive content	15.55 $\pm$ 3.60	–	13.99	Not less than 14% w/w
95% ethanol-soluble extractive content	7.05 $\pm$ 1.59	–	6.35	Not less than 7% w/w

อภิปรายผล

การศึกษานี้มีความสำคัญเนื่องจากจะนำไปสู่การกำหนดมาตรฐานของใบโดไม้รู้อุ้มในประเทศไทยเพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพสมุนไพรชนิดนี้ก่อนนำเข้าสู่กระบวนการผลิตยาจากสมุนไพรหรือผลิตภัณฑ์สมุนไพรเพื่อสุขภาพ ซึ่งประกอบด้วย 1) การพัฒนาวิธีการตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีของโดไม้รู้อุ้มโดยปฏิกิริยาการเกิดสีและวิธีโครมาโทกราฟีผิวนาง เพื่อตรวจสอบว่าเป็นสมุนไพรถูกชนิด และ 2) การประเมินคุณลักษณะทางกายภาพเคมี

เพื่อเป็นข้อมูลในการจัดทำข้อกำหนดคุณภาพสำหรับโดไม้รู้อุ้ม ผลจากการศึกษานี้จะเสนอเข้าสู่การพิจารณาบรรจุเป็นมอโนกราฟของใบโดไม้รู้อุ้มในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia, THP) ต่อไป

การตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีของโดไม้รู้อุ้มทำตามแนวทางการกำหนดมาตรฐานของวัตถุ

สมุนไพรของTHP ต้องเก็บตัวอย่างสมุนไพรจากแหล่งต่าง ๆ เพื่อเป็นตัวแทนของสมุนไพรจากทั่วประเทศจำนวน 12 ตัวอย่างอาศัยปฏิกิริยาเคมีที่สัมพันธ์กับกลุ่มสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบในใบโดไม้รู้อุ้ม ได้แก่ Shinoda's test เป็นการทดสอบสารกลุ่มเฟลโวนอยด์ ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญในโดไม้รู้อุ้ม เช่น กรดคลอโรจีนิก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยในอดีต^[8] ผลบวกของปฏิกิริยา คือ สารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวอ่อนเป็นสีน้ำตาลปนแดงเข้ม และ Ferric chloride test เป็นการทดสอบสารกลุ่มฟีนอลิก ผลบวกของปฏิกิริยา คือ สารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวอ่อนเป็นสีน้ำเงินแกมดำ จากผลการทดสอบนี้แสดงว่าโดไม้รู้อุ้มแห้งมีองค์ประกอบทางเคมีกลุ่มเฟลโวนอยด์ และฟีนอลิก ตามลำดับ จากการทบทวนรายงานการศึกษาวิจัย พบว่าโดไม้รู้อุ้มมีกรดคลอโรจีนิก ซึ่งเป็นสารกลุ่มเฟลโวนอยด์ และมีรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจหลาย

อย่าง เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง และฤทธิ์ปกป้องตับ^[5] มีรายงานการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีในสารสกัดใบโศได้นำรู้ลัมด้วยวิธีโครมาโทกราฟีผิวบาง โดยเทียบกับสารมาตรฐานกรดคลอโรจีนิก อะพิจินิน และลูทีโอลิน และการวิเคราะห์หาปริมาณกรดคลอโรจีนิกในสารสกัดใบโศได้นำรู้ลัมด้วยวิธี HPLC^[6] ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้เลือกใช้กรดคลอโรจีนิกเป็นสารเทียบ (marker) ในการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของโศได้นำรู้ลัม

สำหรับผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีโครมาโทกราฟีผิวบาง โดยทำปฏิกิริยากับสารละลายทดสอบ NP/PEG ซึ่งเป็นสารเคมีที่ให้ผลบวกในการทำปฏิกิริยากับสารกลุ่มฟลโวนอยด์ จากผลการทดสอบ พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลจากใบโศได้นำรู้ลัมแห้ง ตัวอย่างที่ 1 - 6 มีองค์ประกอบทางเคมี 9 ชนิด, ตัวอย่างที่ 7 และ 8 มีองค์ประกอบทางเคมี 6 ชนิด, ตัวอย่างที่ 9 และ 10 มีองค์ประกอบทางเคมี 8 ชนิด, ตัวอย่างที่ 11 และ 12 มีองค์ประกอบทางเคมี 6 ชนิด, ทั้ง 12 ตัวอย่าง ตรวจพบสารที่มีค่า hR_f และสีตรงกันกับสารมาตรฐานกรดคลอโรจีนิกที่ค่า hR_f เท่ากับ 30-31 (Figure 2C, Table 3, Table 4, Table 5, Table 6) ซึ่งสนับสนุนการใช้กรดคลอโรจีนิกเป็น marker ของโศได้นำรู้ลัม แต่จากความเข้มของ band ที่ต่างกันแสดงว่ามีปริมาณกรดคลอโรจีนิกมากน้อยต่างกัน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะความแตกต่างของสายพันธุ์อายุต้นสมุนไพร ระยะเวลาในการเก็บเกี่ยว สภาพดิน และแร่ธาตุ หรืออาจจะเป็นเพราะสภาพภูมิประเทศหรือภูมิอากาศ ซึ่งต้องมีการศึกษาต่อไป

การประเมินคุณสมบัติทางกายภาพเคมีของใบโศได้นำรู้ลัม ปริมาณความชื้นด้วยวิธีกราวิเมตริก ปริมาณเถ้ารวมและเถ้าที่ไม่ละลายในกรด การกำหนด

ปริมาณความชื้นมีความสำคัญในการควบคุมคุณภาพทางเคมีเนื่องจากความชื้นมีผลต่อความคงสภาพของตัวอย่าง ถ้ามีความชื้นมากจะทำให้สมุนไพรเกิดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์และเชื้อราได้ง่าย รวมทั้งอาจเกิดปฏิกิริยาการสลายตัวด้วยน้ำ (hydrolysis) ทำให้องค์ประกอบทางเคมีเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ส่วนนี้หมายถึง สิ่งที่คงเหลืออยู่จากการเผาไหม้อย่างสมบูรณ์ เถ้าของพืชส่วนใหญ่ประกอบด้วยต่างในรูปคาร์บอเนต (carbonate) ฟอสเฟต (phosphate) คลอไรด์ (chloride) และซัลเฟต (sulphate) ปริมาณเถ้ารวม เป็นการบ่งบอกถึงคุณสมบัติทางกายภาพของสมุนไพรตามธรรมชาติ เถ้าของพืชมีการละลายได้ดีในกรดไฮโดรคลอริก มีสารคงเหลือจากการเผาไหม้น้อย การวิเคราะห์ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรดจึงเป็นวิธีตรวจสอบสิ่งแปลกปลอมที่เป็นสารอนินทรีย์ เช่น หิน กรวด หรือทราย ที่เกิดขึ้น ในกระบวนการเก็บเกี่ยว และทำความสะอาด หรืออาจมีสิ่งแปลกปลอมที่ได้จากปุ๋ยเคมี จากผลการทดสอบเมื่อศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพเคมีในใบโศได้นำรู้ลัมแห้ง จำนวน 12 ตัวอย่าง โดยวิเคราะห์ปริมาณความชื้นด้วยวิธีกราวิเมตริก ปริมาณเถ้ารวม และปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรดพบว่า มีค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับร้อยละ 9.33 ± 0.75 , 6.42 ± 1.20 และ 2.70 ± 0.92 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ การกำหนดมาตรฐานปริมาณเหล่านี้จึงต้องระบุ “ต้องไม่เกิน” โดยทั่วไปสมุนไพรไม่ควรมีความชื้นมากกว่าร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก ปริมาณเถ้ารวมจะมีค่าอยู่ที่ร้อยละ 1-20 โดยน้ำหนัก และปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรดจะมีค่าอยู่ที่ร้อยละ 1 - 10 โดยน้ำหนัก^[15-20]

ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณสารสกัดด้วยตัวทำละลาย ในการศึกษานี้เลือกใช้น้ำและเอทานอล 95%

เป็นตัวทำลาย ปริมาณสิ่งสกัดด้วยน้ำ และปริมาณสิ่งสกัดด้วยเอทานอล 95% เป็นสิ่งบ่งชี้ถึงคุณภาพทางเคมี เนื่องจากบ่งชี้ถึงสารที่ออกฤทธิ์หรือกลุ่มของสารออกฤทธิ์หรือสารที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำลาย แล้วนำไปใช้ประโยชน์ทางยาได้ จากผลการทดสอบเมื่อศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพเคมีในใบโดไม่รู้ล้มแห้ง จำนวน 12 ตัวอย่าง โดยวิเคราะห์ปริมาณสิ่งสกัดด้วยน้ำ และปริมาณสิ่งสกัดด้วยเอทานอล 95% พบว่ามีค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับ ร้อยละ 15.55 ± 3.60 และ 7.05 ± 1.59 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ (Table 7)

การกำหนดมาตรฐานปริมาณเหล่านี้จึงต้องระบุว่า “ต้องไม่น้อยกว่า” จากผลการทดสอบพบว่า ปริมาณสิ่งสกัดด้วยน้ำมีค่ามากกว่าปริมาณสิ่งสกัดด้วยเอทานอล 95% ประมาณ 2 เท่า อาจเป็นเพราะสารที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีของใบโดไม่รู้ล้มส่วนมากมีความเป็นขี้สูง เมื่อสกัดด้วยน้ำซึ่งมีความเป็นขี้สูงกว่าเอทานอล 95% จึงทำให้สารเหล่านั้นละลายหรือถูกสกัดออกมาในสิ่งสกัดด้วยน้ำได้มากกว่าด้วยเอทานอล 95%

ผลจากการศึกษานี้สามารถเสนอเข้าสู่การพิจารณาบรรจุเป็นมอโนกราฟของวัตถุดิบสมุนไพรโดไม่รู้ล้มในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย เพื่อเป็นข้อกำหนดมาตรฐานสำหรับการอ้างอิงในการตรวจวิเคราะห์เพื่อควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบใบโดไม่รู้ล้มต่อไป

หากในอนาคตมีงานวิจัยที่แสดงว่าสารใดมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่ควรจะได้ไม่รู้ล้มมาพัฒนาเป็นยา ควรต้องมีการวิจัยเชิงปริมาณเพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารนั้นในวัตถุดิบและสารสกัด เพื่อใช้ในการพัฒนายาจากสารสกัดโดไม่รู้ล้มที่ควบคุมคุณภาพ (standardized

extract) สำหรับการวิจัยทางพิษวิทยา การวิจัยทางคลินิก และการใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์ รวมทั้งพัฒนามอโนกราฟใหม่ของสารสกัดโดไม่รู้ล้มในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทยต่อไป

ข้อสรุป

จากผลการศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมีเบื้องต้นด้วยปฏิกิริยาการเกิดสีพบว่าใบโดไม่รู้ล้มแห้งทุกตัวอย่างให้ผลบวกกับกลุ่มเฟลโวนอยด์ และฟีนอลิก จากผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีโครมาโทกราฟีผิวบาง พบว่าตัวอย่าง ทั้ง 12 ตัวอย่าง ให้ผลบวกกับกลุ่มเฟลโวนอยด์ และตรวจพบกรดคลอโรจีนิก จากผลการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพเคมี พบว่าเกณฑ์ข้อกำหนดทางกายภาพเคมีของใบโดไม่รู้ล้มแห้งควรเป็นดังนี้ ปริมาณความชื้น ปริมาณเถ้ารวม และปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด ควรมีค่าไม่เกิน ร้อยละ 10, 7 และ 3 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ สำหรับปริมาณสิ่งสกัดด้วยน้ำ และปริมาณสิ่งสกัดด้วยเอทานอล 95% ควรมีค่าไม่น้อยกว่าร้อยละ 14 และ 7 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ (Table 8) ผลจากการศึกษาวิจัยนี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการจัดทำข้อกำหนดมาตรฐานทางเคมีของใบโดไม่รู้ล้มแห้งในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย เพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพของโดไม่รู้ล้มในประเทศไทยต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้ร่วมวิจัยทุกท่านในห้องปฏิบัติการวิจัยเพื่อแยกสารสำคัญจากสมุนไพร และห้องปฏิบัติการฟิสิกส์และพิษ สถาบันวิจัยสมุนไพร และกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ให้การสนับสนุนในงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Boonyaprapat N, Chokchaicharoenporn O. Medicinal plants indigenous to Thailand. Vol. 1. Bangkok: Prachachon; 1998. p. 32-4. (in Thai)
2. Thai Health Promotion Foundation. Understanding “Do Mai Ru Lom” (Elephant’s Foot) [Internet]. Bangkok: Thai Health Promotion Foundation; 2022 Dec 26 [cited 2026 Mar 19]. Available from: <https://www.thaihealth.or.th/>
3. Highland Research and Development Institute (Public Organization). *Elephantopus scaber*: Herbs and the Elderly [Internet]. Chiang Mai: The Institute; [cited 2026 Mar 19]. Available from: <https://www.hrdi.or.th/Articles/Detail/131>
4. Highland Research and Development Institute (Public Organization). Final report of the research and development project on medicinal plants and folk medicine in highland areas. Chiang Mai: Highland Research and Development Institute (Public Organization); 2016.
5. Das M, Bandyopadhyay A. Promising phytomedicines from *Elephantopus scaber* L: a review. Res J of Pharm Biol Chem Sci. 2015;6(3):1508-18.
6. Deetae W. Effects of crude extracts of *Elephantopus scaber* L. and *Diospyros rhodocalyx* Kurz. on sexual performance in male rats [master’s thesis]. Chiang Mai: Chiang Mai University; 2023.
7. Pinmongkholgul S, Smitasiri Y, Wongreun S. The effects of *Elephantopus scaber* Linn. on blood pressure, intra-cavernous pressure and sperm density in male albino rat (*Rattus norvegicus*). KKU Sci J. 2005;33(2):104-12. (in Thai)
8. Rerk-am U, Kongsombat B, Tangsatirapakdee S, Banchonglikitkul C. Determination of some phenolic compounds in ethanolic extract of *Elephantopus scaber* Linn. leaves. Thai J Pharm Sci. 2012;36:14-6. (in Thai)
9. Osman ME, Ahmed EM, Eltohami MS. Preliminary phytochemical evaluation and seed proximate analysis of Surib (*Sesbania leptocarpa* DC.). Sudan J Med Sci. 2013;8(1):29-34.
10. Department of Medical Sciences. Thai Herbal Pharmacopoeia. Volume 2. Bangkok: Prachachon; 2007.
11. 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(6):116-24.
12. Deachathai S, Mahabusarakam W, Phongpaichit S, Taylor WC. Phenolic compounds from the fruit of *Garcinia dulcis*. Phytochemistry. 2005;66(19):2368-75. (in Thai)
13. Dechatiwongse T, Techadamrongsin Y, Jirawattanapong W. Chemical specification of Thai herbal drugs, Volume 1. Nonthaburi: Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health; 1993. p. 171-6. (in Thai)
14. Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. Thai herbal pharmacopoeia 2018. Bangkok: Keawjawjom Printing & Publishing, Suan Sunandha Rajabhat University; 2018. 782 p. (in Thai)
15. Plant Research and Development Division. Inspection methods to control quality and standardization. In: Department of Medical Sciences. Herbal guide to basic public health. Bangkok: Text and Journal Corporation; 1988. p. 17-9. (in Thai)
16. Evans WC. Trease and Evans’ pharmacognosy. 13th ed. London: ELBS; 1989. p. 39-57, 127-9.
17. Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. Thai herbal pharmacopoeia. Volume 1. Bangkok: Prachachon; 1995.
18. Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. Thai herbal pharmacopoeia. Volume 2. Bangkok: Prachachon; 2000.
19. Dechatiwongse Na Ayudhya T, Jirawattanapong W. Standardization and quality control of herbs. Nonthaburi: Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences; 2001. p. 1-25. (in Thai)
20. Drug Control Division, Food and Drug Administration. Guidelines for quality control of medicinal products from herbs. Bangkok: Agricultural Cooperative Assembly Printing Company of Thailand; 2005.