



นิพนธ์ต้นฉบับ

องค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ COX-1 ของสารสกัดเถาวัลย์เปรียง

ประไพ วงศ์สินคงมั่น¹

จารีย์ บันลือ¹

สมชาย แสหนหลวงอินทร์¹

ธนวัฒน์ ทองจีน²

อุทัย ไสธนะพันธุ์³

¹สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

²ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 2 พิษณุโลก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พิษณุโลก 65000

³คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม 73000

*ผู้รับผิดชอบบทความ: prapai.w@dmasc.mail.go.th

บทคัดย่อ

สมุนไพรเถาวัลย์เปรียง [*Derris scandens* (Roxb.) Benth. วงศ์ Leguminosae] มีสรรพคุณตามภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย ใช้เถาเป็นยาแก้ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ ขับปัสสาวะ ขับระดู จากรายงานการศึกษาวิจัยทางเภสัชวิทยา พบว่าสารสกัดเถาวัลย์เปรียงมีฤทธิ์ลดความดันโลหิต ต้านเชื้อรา กระตุ้นภูมิคุ้มกัน ต้านอักเสบ ลดน้ำตาลในเลือดและต้านอนุมูลอิสระ จากผลการศึกษาเบื้องต้นของฤทธิ์ต้านอักเสบในหลอดทดลอง พบว่าสารสกัดด้วย 50% เอทานอลของเถาวัลย์เปรียง มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ COX-1 จึงเห็นควรศึกษาเพื่อแยกสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในสารสกัดเถาวัลย์เปรียงด้วย 50% เอทานอล ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี รวมทั้งพิสูจน์สูตรโครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีและเปรียบเทียบกับรายงานการวิจัย จากผลการศึกษา พบว่าสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ 2 ชนิด เป็นสารกลุ่มกรดฟีนอลิกและกลุ่มไอโซฟลาวโนไกลโคไซด์ คือ piscidic acid (1) และ genistein 7-O- α -rhamnosyl (1 $\rightarrow$ 6)- β -glucopyranoside (2) ตามลำดับ ซึ่งสาร 2 เป็นองค์ประกอบหลักทางเคมีในสารสกัดดังกล่าว จึงมีประโยชน์ในการนำมาใช้เป็นสารบ่งชี้เพื่อควบคุมคุณภาพทางเคมีของสารสกัดเถาวัลย์เปรียง

คำสำคัญ : เถาวัลย์เปรียง, สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

ภูมิหลังและเหตุผล

สมุนไพรเถาวัลย์เปรียงมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Derris scandens* (Roxb) Benth. วงศ์ Leguminosae^{1,2} โดยทางการแพทย์แผนไทยระบุว่ามีสรรพคุณใช้เป็นยาแก้กระษัย แก้เส้นเอ็นชืด แก้

ปวดเมื่อย ขับปัสสาวะ เถาหักตากแห้งคั่วไฟ ชงน้ำดื่มแทนน้ำชา แก้ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ เถาต้องเหล้าใช้เป็นยาขับระดู ส่วนรากใช้เบื่อปลา (แต่ไม่มีคุณสมบัติฆ่าแมลง)^{3,4} มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา พบว่า สารสกัดด้วยน้ำและเอทานอล

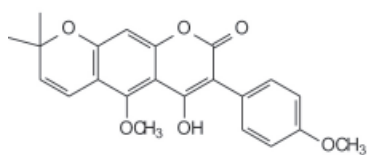
จากลำต้นเถาวัลย์เปรียงมีฤทธิ์ต้านอักเสบ^{5,6} ลดความดันโลหิต⁷ ต้านเชื้อจุลินทรีย์^{7,8} และกระตุ้นภูมิคุ้มกัน⁹ จากรายงานการวิจัยเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้จากสมุนไพเราะวัลย์เปรียงพบว่าสารที่มีฤทธิ์ต้านอักเสบ เป็นสารในกลุ่มไอโซฟเลโวนและไอโซฟเลโวนกลัยโคไซด์ เช่น genistein, genistein 7-O- α -rhamnosyl (1 $\rightarrow$ 6)- β -glucopyranoside^{5-6,9-12} ส่วนอนุพันธ์ของ iso-prenyl isoflavones เช่น 3'- γ,γ -dimethyl-allylwightone และ scandenin มีฤทธิ์ลดความดันโลหิต ต้านอนุมูลอิสระ และต้านเชื้อจุลินทรีย์⁷ สารกลุ่ม prenylated isoflavone เช่น 5,7,4'-trihydroxy-6,3'-diprenylisoflavone มีฤทธิ์ต้านเชื้อราชนิด *Trichophyton mentagrophytes*¹³ scandenone และ scandenin A มีฤทธิ์ยับยั้ง α -glucosidase¹⁴ นอกจากนี้ ยังพบสารประเภทอื่น ๆ ในลำต้นเถาวัลย์เปรียง เช่น คูมาริน สเตียรอยด์และเทอร์ปีนอยด์¹⁵⁻²⁰ (รูปที่ 1) เนื่องจากสมุนไพเราะวัลย์

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลากหลาย และจากผลการศึกษาเบื้องต้น พบว่าสารสกัดสมุนไพเราะวัลย์เปรียงด้วย 50% เอทานอล มีฤทธิ์ต้านอักเสบโดยยับยั้งเอนไซม์ cyclooxygenase-1 (COX-1 inhibitor) ดังนั้น จึงมีประโยชน์ที่จะศึกษาเพื่อแยกสารออกฤทธิ์ที่พบในสารสกัดดังกล่าวด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ตลอดจนพิสูจน์สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้แก่ NMR, MS

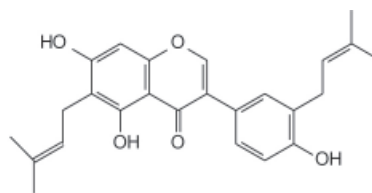
ระเบียบวิธีศึกษา

วัสดุ

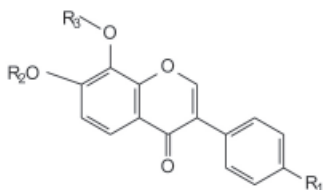
1. ตู้อบร้อนไฟฟ้ารุ่น VLE-400 (Memmert)
2. เครื่องบดปั่น รุ่น RT 34 ของ (Chyun Tseh Industrial)
3. เครื่องแรง รุ่น AS 200 Basic (Retsch)
4. เครื่องระเหยสุญญากาศ ประกอบด้วยอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น B-480 (Buchi)



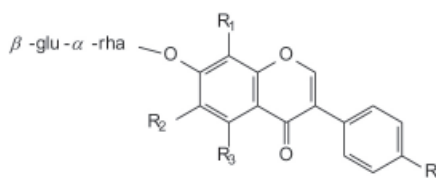
Robustic acid



5, 7, 4'-trihydroxy-6, 3'-diprenylisoflavone



derriscandenoside A:
R₁ = OCH₃, R₂ = H, R₃ = α -rha
derriscandenoside C:
R₁ = R₂ = OCH₃, R₃ = α -rha- β -glu



derriscandenoside B:
R₁ = OH, R₂ = R₃ = H, R₄ = OCH₃
genistein-7-O-[α -rha-(1 $\rightarrow$ 6)]- β -glu
R₁ = R₂ = H, R₃ = R₄ = OH

รูปที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีบางชนิดที่พบในเถาวัลย์เปรียง

Laboritechnik) เครื่อง Rotavapor รุ่น R-114 (Buchi) เครื่อง Aspirator รุ่น A-3S ยี่ห้อ Eyela® และเครื่องทำน้ำเย็นหมุนเวียน รุ่น CA-101 ยี่ห้อ Eyela (Tokyo Rikakikai)

5. เครื่องระเหิดให้แห้งด้วยความเย็น (Freeze-dried Apparatus) (Labconco)

6. เครื่องชั่งไฟฟ้า พิกัด 0.1-0.01 มิลลิกรัม (Sartorius)

7. อ่างเสียงความถี่สูง (Ultrasonic bath) (Elma)

8. เครื่องแยกโครมาโทกราฟสมรรถนะสูง (Analytical HPLC) (Waters) ประกอบด้วยเครื่องควบคุมปั๊ม รุ่น 600 เครื่องฉีดสารตัวอย่างรุ่น 717 คอลัมน์ยี่ห้อ X-Terra RP18 ขนาด 4.6 ± 150 เซนติเมตร, 60 Å, 5 ไมโครเมตร และเครื่องตรวจวัดชนิดโฟโตไดโอดแอเรย์รุ่น 2996

9. เครื่องแยกโครมาโทกราฟสมรรถนะสูงชนิด preparative (Preparative HPLC) (Waters) ประกอบด้วยเครื่องควบคุมปั๊ม รุ่น 600 คอลัมน์ Prep Novapak^R HRC18 (25×100 มม, 6 ไมโครเมตร) ต่อกับ RCM guard insert HRC18 (25×10 มิลลิเมตร, 6 ไมโครเมตร) และเครื่องตรวจวัดชนิด photodiode array detector (PDA) รุ่น 2996

10. สารเคมีทุกชนิดที่ใช้ในการทดลองต่างๆ เป็นชนิดที่ใช้กับงานวิเคราะห์ (analytical grade) และน้ำบริสุทธิ์ที่ใช้ในงานทดลองเป็นน้ำที่ได้จากการกรองเอาอนุภาคที่มีประจุออก (deionized water)

11. สารเคมีทุกชนิดที่ใช้กับเครื่องโครมาโทกราฟสมรรถนะสูง (HPLC) เป็น HPLC, gradient grade (Merck) และน้ำบริสุทธิ์ต้องกรองเอาอนุภาคที่มีประจุออก โดยใช้เครื่องกรองน้ำบริสุทธิ์ (Ultra Pure Water System) ยี่ห้อ Nanopure

(Barnstead)

วิธีการศึกษา

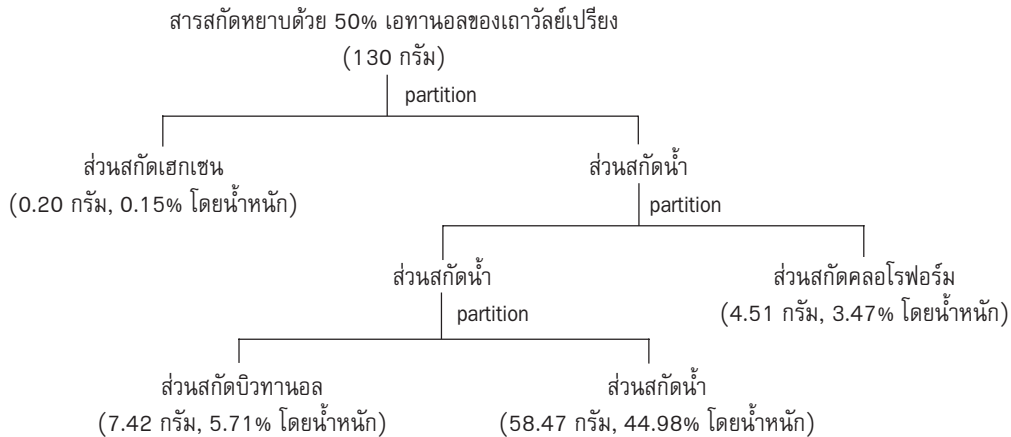
1. การเตรียมสารสกัดหยาบด้วย 50% เอทานอลของลำต้นเถาว์วัลย์เปรียง

ลำต้น (เถา) เถาว์วัลย์เปรียง (0.8 กิโลกรัม) เก็บจากอำเภอบางกระพุ่ม จังหวัดพิษณุโลก ในปี พ.ศ. 2548 เมื่อตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ตามหลักพฤกษศาสตร์โดยนักพฤกษศาสตร์ตามหลักพฤกษศาสตร์อนุกรมวิธาน โดยใช้เอกสารประกอบด้านพฤกษชาติของต่างประเทศ^{1,2} พบว่าเป็น *Derris scandens* Benth. วงศ์ Leguminosae นำตัวอย่างสดมาล้างน้ำให้สะอาด ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องพอหมาดๆ หั่นเป็นชิ้นและอบให้แห้งด้วยตู้อบร้อนไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง แล้วนำตัวอย่างที่แห้งแล้วไปบดเป็นผงหยาบ สกัดด้วย 50% เอทานอลด้วยวิธี Soxhlet นาน 2 ชั่วโมง ทำซ้ำ 2 ครั้ง รวมสารสกัดที่ได้แล้วระเหยให้เข้มข้นด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ และทำให้แห้งด้วยวิธีการแช่แข็งแล้วระเหิดให้แห้ง (freeze-dried method) ได้สารสกัดหยาบ 142.81 ก (%yield = 17.85 โดยน้ำหนัก)

2. การแยกองค์ประกอบทางเคมีจากสารสกัดหยาบด้วย 50% เอทานอลของเถาว์วัลย์เปรียง

สารสกัดหยาบด้วย 50% เอทานอลของเถาว์วัลย์เปรียงที่แห้งแล้ว จำนวน 130 กรัม ถูก partition ด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ได้แก่ เฮกเซน, คลอโรฟอร์ม, เอทิลอะซิเตท, บิวทานอล และน้ำ โดยค่าร้อยละของปริมาณสารสกัดและปริมาณผลผลิต แสดงในรูปที่ 2 และฤทธิ์ของส่วนสกัดต่างๆ แสดงในตารางที่ 1

จากผลการทดสอบฤทธิ์ในหลอดทดลองต่อการยับยั้ง COX-1 และ COX-2 พบว่า สารสกัด



รูปที่ 2 การเตรียมส่วนสกัดด้วยวิธี partition จากสารสกัดหยาบด้วย 50% เอทานอลของเถาวัลย์เปรียง

ตารางที่ 1 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ COX-1 และ COX-2 ในหลอดทดลองของสารสกัดหยาบด้วย 50% เอทานอลของเถาวัลย์เปรียง ส่วนสกัดที่ได้จากการ partition และสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

ตัวอย่าง	ฤทธิ์ยับยั้ง COX-1* (IC ₅₀ , ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ฤทธิ์ยับยั้ง COX-2** (IC ₅₀ , ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
สารสกัดหยาบด้วย 50% เอทานอล	4.11	inactive
ส่วนสกัดเฮกเซน	inactive	inactive
ส่วนสกัดคลอโรฟอร์ม	inactive	inactive
ส่วนสกัดบิวทานอล	inactive	inactive
ส่วนสกัดน้ำ	4.15	inactive
1	inactive	inactive
2	4.0	inactive
Aspirin***	4-5	9-10

*cyclooxygenase-1 enzyme

**cyclooxygenase-2 enzyme

***positive control

หยาบด้วย 50% เอทานอลและส่วนสกัดน้ำมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ COX-1 ในขณะที่ส่วนสกัดอื่นๆ ไม่มีฤทธิ์ดังกล่าว ดังนั้น จึงได้นำส่วนสกัดน้ำ (20 กรัม) มาแยกต่อเพื่อหาสารออกฤทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ Sephadex LH20 เป็นวัสดุภาคคงที่ และชะด้วยตัวทำละลายเมทานอล (ตั้งแต่ 100% - 40%) และชะด้วยน้ำและ เมทานอล 100% เก็บ

สารละลายที่ได้ครั้งละ 25 มิลลิลิตร นำมาระเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศให้แห้ง นำส่วนสกัดที่ได้ไปละลายในเมทานอล แล้วนำไปตรวจสอบด้วยวิธีโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง และนำส่วนสกัดที่มีฟีดที่ต้องการไปแยกต่อด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูงชนิด preparative โดยใช้คอลัมน์ Prep Novapak^R HRC18 (25×100 มม, 6 ไมโครเมตร)

ต่อกับ RCM guard insert HRC18 (25×10 มิลลิเมตร, 6 ไมโครเมตร) เป็น วัสดุภาคคงที่ และใช้ สารละลายผสมของอะซีโตนไตรลีน:น้ำ ในอัตราส่วน 15:85 เป็นวัสดุภาคเคลื่อนที่ อัตราการไหลที่ 1 มล/นาที และตรวจวัดด้วย PDA ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร พบว่าสารบริสุทธิ์ 1 และ 2 จะมี retention time เท่ากับ 1.5 และ 20.5 นาที ตามลำดับ โดยสาร 1 และ 2 มีลักษณะเป็นผงสีขาว โดยปริมาณของสาร 1 และ 2 ที่แยกได้ เท่ากับ 79 และ 41 มิลลิกรัม หรือคิดเป็นร้อยละของผลผลิต (%yield) เท่ากับ 0.40 และ 0.21 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ นำสารที่แยกได้ และสารสกัดหยาบไปวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูงโดยฉีดสารที่แยกได้ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาณ 2.0 ไมโครลิตร และสารสกัดหยาบที่มีความเข้มข้น 0.1 กรัม/มิลลิลิตร ปริมาณ 2.0 ไมโครลิตร ใช้คอลัมน์ยี่ห้อ X-Terra RP18 ขนาด 4.6 ± 150 เซนติเมตร, 60 Å, 5 ไมโครเมตร และใช้สารละลายผสมของ 1% กรดอะซีติก: น้ำ: อะซีโตนไตรลีน ในอัตราส่วน 92:0:8 (t=0), 65:0:35 (t=10), 0:85:15 (t=15) เป็นวัสดุภาคเคลื่อนที่ อัตราการไหลที่ 1.5 มิลลิลิตร/นาที และตรวจวัดด้วย PDA ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร

3. การพิสูจน์สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารที่แยกได้

นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาพิสูจน์สูตรโครงสร้างทางเคมีโดยใช้เทคนิคสเปกโทรสโกปี ได้แก่ NMR และ MS โดยส่งตรวจสอบที่ศูนย์เครื่องมือกลางจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยใช้เครื่อง 500 MHz Nuclear magnetic resonance (NMR) (JEOL JNM-A500) และ Electron Impact Mass spectrometer (EIMS Fisons VG Trio 2000)

4. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

สารสกัดหยาบและสารสกัดแยกส่วนส่งทดสอบฤทธิ์ต้านอักเสบในหลอดทดลอง (COX-1, COX-2) ที่หน่วยปฏิบัติการวิจัยกลางไบโอเทค ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) โดยใช้วิธี radioimmunoassay

ผลการศึกษา

จากการแยกสารสกัดหยาบด้วย 50% เอทานอลของลำต้นเถาวัลย์เปรียงด้วยการ partition ด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ได้แก่ เฮกเซน, คลอโรฟอร์ม, เอทิลอะซิเตท, บิวทานอล และน้ำ พบว่า สารสกัดหยาบและส่วนสกัดน้ำที่ได้จากการ partition มีฤทธิ์ต้านอักเสบในหลอดทดลอง โดยมีความแรงในการยับยั้งเอนไซม์ cyclooxygenase-1 (COX-1) เท่ากัน คือ $IC_{50} = 4.11$ และ 4.15 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ซึ่งใกล้เคียงกับ aspirin ซึ่งใช้เป็นสารควบคุมบวก (positive control) ในขณะที่ยาอื่น ๆ ไม่มีฤทธิ์ดังกล่าว ดังนั้นจึงแยกสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพออกจากส่วนสกัดน้ำด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ Sephadex LH20 เป็นวัสดุภาคคงที่ ชะด้วยเมทานอล (ตั้งแต่ 100% - 40%) และน้ำ 100% เก็บสารละลายที่ได้ครั้งละ 25 มิลลิลิตร นำมาระเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศให้แห้ง นำส่วนสกัดที่ได้ไปละลายในเมทานอล แล้วนำไปตรวจสอบด้วยวิธีโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูงแล้วนำส่วนสกัดที่มีฟีดที่ต้องการไปแยกต่อด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูงชนิด preparative โดยใช้คอลัมน์ Prep Novapak^R HRC18 (25×100 มม, 6 ไมโครเมตร) ต่อกับ RCM guard insert HRC18 (25×10 มิลลิเมตร, 6 ไมโครเมตร) เป็น วัสดุภาคคงที่และใช้สารละลาย

ผสมของอะซีโตนไทรล์: น้ำ ในอัตราส่วน 15:85 เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ อัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตร/นาที่ และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร พบว่าแยกสารบริสุทธิ์ 1 และ 2 ได้ที่ retention time เท่ากับ 1.5 และ 20.5 นาที ตามลำดับ โดยสาร 1 และ 2 มีลักษณะเป็นผง amorphous สีขาว จำนวน 79 และ 41 มิลลิกรัม ตามลำดับ หรือคิดเป็นร้อยละ

ของผลผลิต (%yield) เท่ากับ 0.40 และ 0.21 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ เมื่อพิสูจน์สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปี พบว่าข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ สอดคล้องกับผลการศึกษาในรายงานการวิจัยที่ตีพิมพ์แล้ว^{5,21} (ตารางที่ 2-5) และจาก UV-VIS และ MS spectra ของสาร 1 และ 2 มีดังนี้ piscidic acid (1): $\lambda_{\text{max}} =$

ตารางที่ 2 ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz) ของ 1 เปรียบเทียบกับ Piscidic Acid²¹

ตำแหน่งโปรตอน	δ_{H} (ppm) ใน $d_6\text{-DMSO}$ ของ 1	δ_{H} (ppm) ใน CD_3OD ของ piscidic acid ²¹
1	9.12 (2H, br s)	-
2	4.24 (1H, s)	4.55 (1H, s)
4	2.80 (1H, d, 13.74), 2.94 (1H, d, 13.73)	2.97 (2H, m)
5	9.12 (2H, br s)	-
2'	6.97 (2H, d, 8.54)	7.04 (2H, d, 7.9)
3'	6.60 (2H, d, 8.54)	6.72 (2H, d, 7.9)
4'	3.45 (1H, br s)	-
5'	6.60 (2H, d, 8.54)	6.72 (2H, d, 7.9)
6'	6.97 (2H, d, 8.54)	7.04 (2H, d, 7.9)

ตารางที่ 3 ข้อมูล $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz) ของ 1 เปรียบเทียบกับ Piscidic Acid²¹

ตำแหน่งคาร์บอน	δ_{C} (ppm) ใน $d_6\text{-DMSO}$ ของ 1	δ_{C} (ppm) ใน CD_3OD ของ piscidic acid ²¹
1	172.89	174.88
2	75.25	76.57
3	79.59	81.44
4	40.62	41.98
5	174.05	176.18
1'	121.52	128.10
2'	131.15	132.16
3'	114.52	116.24
4'	155.81	156.53
5'	114.52	116.24
6'	131.15	132.16

227 nm, EI-MS: m/z (relative intensity, %); $[C_{11}H_{12}O_7]$ 279.47 $[M+Na]$ (65). genistein 7-O- α -rhamnosyl(1 $\rightarrow$ 6)- β -glucopyranoside (2): λ_{max} = 261 nm, EI-MS : m/z (relative intensity, %) $[C_{27}H_{31}O_{14}]$, 601.55 $[M+Na]$ (60), 579.59(40), 433.63 (30), 271.58 (100) โดยสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารทั้งสองชนิดแสดงในรูปที่ 3 จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสาร

สกัดหยาบเอทิลอะซิเตตด้วย 50% เอทานอล ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูงพบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีรวมประมาณ 13 ชนิด โดยพบ genistein 7-O- α -rhamnosyl (1 $\rightarrow$ 6)- β -glucopyranoside (2) เป็นองค์ประกอบหลักที่ retention time เท่ากับ 8.75 นาที และ piscidic acid (1) เป็นองค์ประกอบรองที่ retention time เท่ากับ 1.45 นาที (รูปที่ 4) ผลการศึกษาศักยภาพยับยั้งเอนไซม์ COX พบว่า 1 ไม่มี

ตารางที่ 4 ข้อมูล 500 MHz 1H -NMR ของ 2 เปรียบเทียบกับ genistein 7-O- α -rhamnosyl (1 $\rightarrow$ 6)- β -glucopyranoside⁵

ตำแหน่งโปรตอน	δ_H (ppm) ใน d_6 -DMSO ของ 2	δ_H (ppm) ใน d_6 -DMSO ของ genistein 7-O- α -rhamnosyl (1 $\rightarrow$ 6)- β -glucopyranoside ⁵
2	8.27 (1H, s)	8.40 (1H, s)
5	12.83 (1H, br s)	12.88 (1H, br s)
6	6.44 (1H, d, J = 2.1)	6.44 (1H, d, J = 2.1)
8	6.73 (1H, d, J = 1.8)	6.73 (1H, d, J = 2.1)
2'	7.40 (2H, d, J = 8.55)	7.40 (2H, d, J = 8.5)
3'	6.83 (2H, d, J = 8.8)	6.83 (2H, d, J = 8.5)
4'	9.65 (1H, br s)	9.65 (1H, br s)
5'	6.83 (2H, d, J = 8.8)	6.83 (2H, d, J = 8.5)
6'	7.40 (2H, d, J = 8.55)	7.40 (2H, d, J = 8.5)
1''	4.55 (1H, d, J = 7.3)	5.18 (1H, d, J = 6.9)
2''	—*	—*
3''	—*	—*
4''	—*	—*
5''	—*	—*
6''	3.90 (1H, dd, J = 10.99, 1.53), 3.47 (1H, m)	3.91 (1H, dd, J = 14.2, 3.2), 3.47 (1H, dd, 14.2, 3.2)
1'''	4.54 (1H, s)	4.62 (1H, s)
2'''	—*	—*
3'''	—*	—*
4'''	—*	—*
5'''	—*	—*
6'''	—*	—*

*signals due to most sugar protons were not given

ตารางที่ 5 ข้อมูล 125 MHz ^{13}C -NMR spectral data (in d_6 -DMSO) ของ 2 เปรียบเทียบกับ genistein 7-O- α -rhamnosyl (1 $\rightarrow$ 6)- β -glucopyranoside⁵

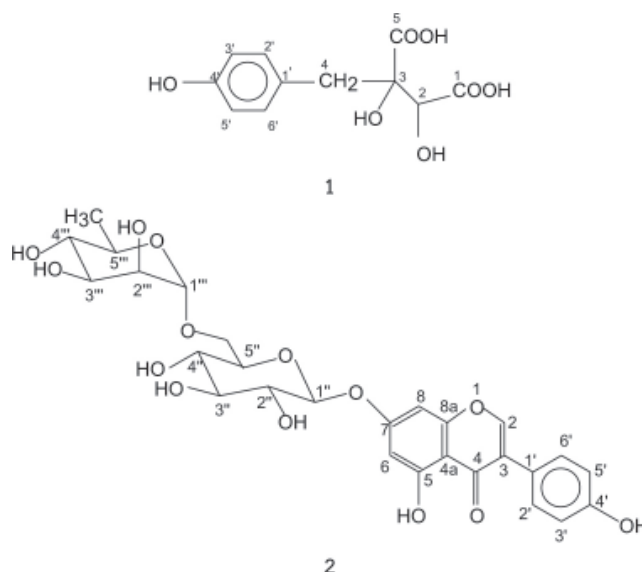
ตำแหน่งคาร์บอน	δ_c (ppm) ใน d_6 -DMSO ของ 2	δ_c (ppm) ใน d_6 -DMSO ของ genistein 7-O- α -rhamnosyl (1 $\rightarrow$ 6)- β -glucopyranoside ⁵
2	154.69	155.11
3	122.48	122.8
4	180.52	180.9
4a	106.21	106.5
5	161.57	161.9
6	99.99	100.3
7	162.82	163.2
8	94.56	95.0
8a	157.52	157.9
1'	121.06	121.4
2'	130.11	130.5
3'	115.11	115.5
4'	157.26	157.6
5'	115.11	115.5
6'	130.11	130.5
1''	100.66	101.0
2''	76.53	76.9
3''	79.15	79.6
4''	70.29	70.6
5''	75.66	76.0
6''	66.43, 68.39	68.7, 66.8
1'''	100.66	100.1
2'''	72.17	72.5
3'''	79.21	71.1
4'''	99.73	73.4
5'''	70.73	70.3
6'''	17.87	18.23

ฤทธิ์ดังกล่าว และ 2 มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ COX-1 โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 4.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ตารางที่ 1)

วิจารณ์

ยาแผนปัจจุบันที่มีฤทธิ์ต้านอักเสบ ได้แก่ ยา

ในกลุ่ม NSAIDs (non-steroidal anti-inflammatory drugs) มักถูกเลือกใช้ในการรักษาอาการอักเสบ ลดปวดและลดไข้ ที่มีกลไกแตกต่างกันไป ที่สนใจกันมากที่สุดคือฤทธิ์ที่มีผลต่อการสร้าง prostaglandin โดย NSAIDs จะยับยั้งเอนไซม์ cyclooxygenase ที่ทำหน้าที่เปลี่ยน arachidonic acid เป็น

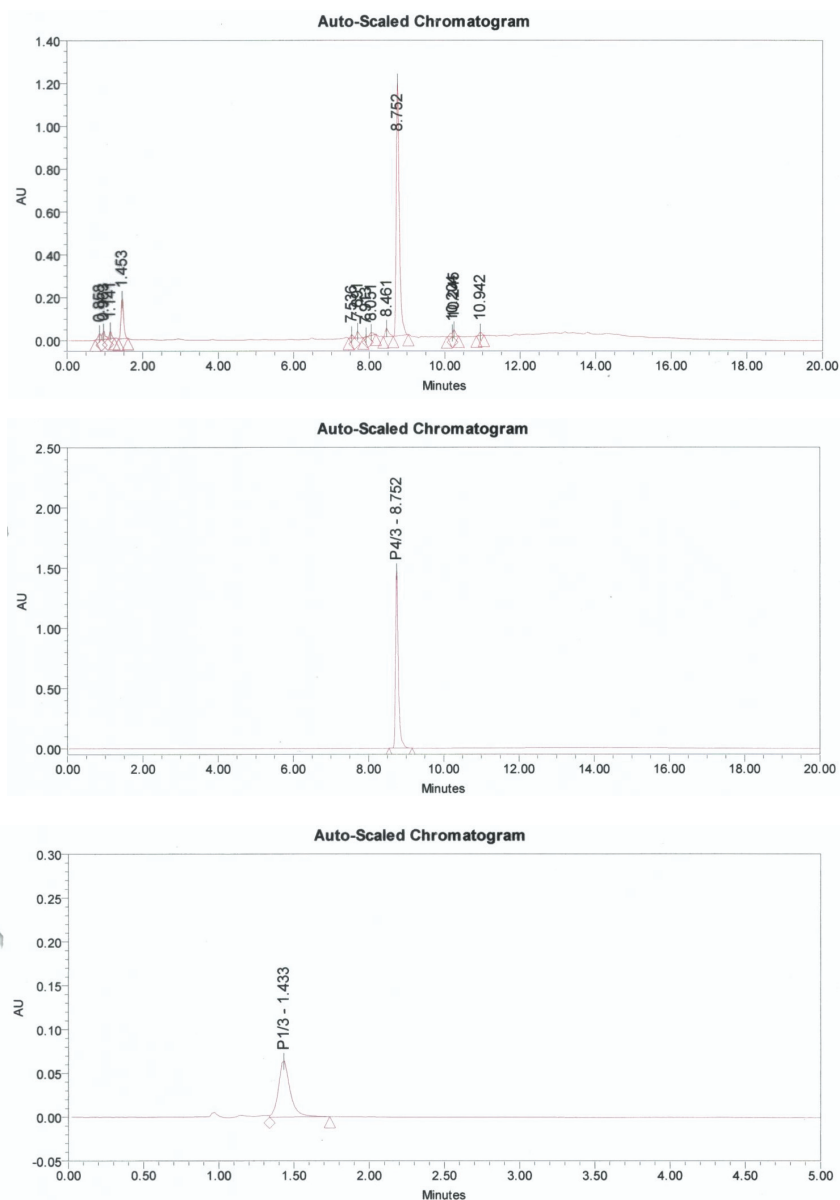


รูปที่ 3 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ picroside (1) และ genistein 7-O- α -rhamnosyl(1 $\rightarrow$ 6)- β -glucopyranoside (2)

endoperoxidase และเอนไซม์ตัวนี้จะเปลี่ยนตัวเองเป็น thromboxane A₂ และ prostacyclin ทั้งนี้ NSAIDs แต่ละตัวแสดงความสามารถต่างกันไปใน การยับยั้ง COX เช่น ยับยั้งการทำงานของ neutrophil และแสดงฤทธิ์แก้ปวดจากประสาทส่วนกลาง ส่วน aspirin ออกฤทธิ์เป็น irreversible inhibitor ของ COX แต่ NSAIDs บางตัว เช่น ibuprofen, piroxicam เป็น competitive reversible inhibitor ของ COX โดย COX แบ่งออกเป็น 2 isoforms คือ COX-1 และ COX-2 โดย COX-1 มีอยู่ในร่างกายเป็นปกติ ส่วน COX-2 จะถูกกระตุ้นขึ้นในช่วงที่มีอาการอักเสบ ข้อดีของยาที่มีฤทธิ์ยับยั้ง COX-2 คือ จะไม่มีผลในการเพิ่มการหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร ในขณะที่ยาที่มีฤทธิ์ยับยั้ง COX-1 จะมีผลในการเพิ่มการหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร²² ดังนั้น ในการศึกษาวิจัยนี้ จึงต้องการแยกสารที่มีฤทธิ์ต้านอักเสบจากสารสกัดเถาวัลย์เปรียงด้วยการคัดกรองสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าวด้วยการยับยั้ง

เอนไซม์ COX

จากผลการแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบด้วย 50% เอทานอลของเถาวัลย์เปรียง ด้วยเทคนิค partition ด้วย เฮกเซน, คลอโรฟอร์ม, เอทิลอะซิเตท, บิวทานอล และน้ำ (รูปที่ 2) พบว่าได้ ส่วนสกัดต่าง ๆ ในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยส่วนสกัดน้ำมีปริมาณมากที่สุด (%yield = 44.98 โดยน้ำหนัก) และส่วนสกัดเฮกเซนมีปริมาณน้อยที่สุด (%yield = 0.15 โดยน้ำหนัก) เมื่อนำส่วนสกัดทั้งหมดไปทดสอบฤทธิ์ต้านอักเสบโดยศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ COX-1 และ COX-2 พบว่า เฉพาะสารสกัดหยาบและส่วนสกัดน้ำเท่านั้นที่มีฤทธิ์ยับยั้ง เฉพาะ COX-1 โดยมี IC₅₀ เท่ากับ 4.11 และ 4.15 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสกัดน้ำจึงถูกแยกต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ Sephadex LH20 เป็นวัสดุภาคคงที่ ชะด้วย เมทานอลและน้ำ รวบรวมสารละลายที่มีลักษณะเหมือนกันเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟี



รูปที่ 4 โครมาโทแกรมสมรรถนะสูงของสารสกัดหยาบด้วย 50% เอทานอลของเถาวัลย์เปรียงและสารบริสุทธิ์ P1/3 = piscidic acid; P4/3 = genistein 7-O- α -rhamnosyl (1 $\rightarrow$ 6)- β -glucopyranoside

สมรรถนะสูงไประเหยให้แห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ แล้วนำไปแยกต่อยังวิธีโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูงชนิด preparative เนื่องจากเป็นสารที่มีความเป็นขี้ผึ้ง โดยใช้ C18 เป็นวัฏภาคคงที่ และใช้สารละลายผสมของอะซีโตไนไตรล์: น้ำ ใน

อัตราส่วน 15:85 เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ เลือกเก็บ peak ที่มี retention time เท่ากับ 1.5 และ 20.5 นาทีตามลำดับ เมื่อระเหยให้แห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแล้ว พบว่าได้สารบริสุทธิ์ 2 ชนิด คือ สาร 1 และ 2 มีลักษณะเป็นผง amorphous สีขาว จำนวน

79 และ 41 มิลลิกรัม ตามลำดับ หรือคิดเป็นร้อยละของผลผลิต (%yield) เท่ากับ 0.40 และ 0.21 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ เมื่อพิสูจน์สูตรโครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปี ได้แก่ NMR, MS พบว่า สารบริสุทธิ์ที่แยกได้สองชนิดคือ สารกลุ่มกรดฟีนอลิก คือสาร piscidic acid (1) ซึ่งจากรายงานการวิจัยพบว่า มีฤทธิ์ทำให้หลับ กล่อมประสาทและระงับอาการไอ²¹ แต่ยังไม่เคยมีรายงานว่าพบในสารสกัดเถาวัลย์เปรียงมาก่อน ส่วนสารอีกชนิดเป็นสารกลุ่มไอโซฟลาวอนกลัยโคไซด์คือสาร genistein 7-O- α -rhamnosyl (1 $\rightarrow$ 6)- β -glucopyranoside (2) ซึ่งมีรายงานการวิจัยว่ามีฤทธิ์ต้านอักเสบและสามารถแยกได้จากสารสกัดเถาวัลย์เปรียงด้วยน้ำ⁵ (รูปที่ 3) ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ COX พบว่า เฉพาะ 2 มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ COX-1 โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 4.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ตารางที่ 1) นอกจากนี้ จากผลการศึกษาร่องประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบเถาวัลย์เปรียงด้วย 50% เอทานอล ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง (Analytical HPLC) พบว่าสาร 2 เป็นองค์ประกอบหลัก (major compound) ของสารสกัดหยาบด้วย 50% เอทานอลของเถาวัลย์เปรียง โดยมีค่า retention time ที่ 8.75 นาที และ 1 เป็นองค์ประกอบรอง โดยมีค่า retention time ที่ 1.45 นาที (รูปที่ 4) จากผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ COX-1 ของสารสกัดหยาบและสาร 2 มีค่า IC₅₀ ใกล้เคียงกัน อาจเป็นเพราะมีสาร 2 เป็นองค์ประกอบหลักของสารสกัดหยาบดังกล่าว

ข้อสรุป

จากผลการศึกษาวิจัยเพื่อแยกองค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดหยาบด้วย 50%

เอทานอลของเถาวัลย์เปรียง ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีและโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูงชนิด preparative และพิสูจน์สูตรโครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีของสารที่แยกได้ พบว่า สารบริสุทธิ์ 2 ชนิด คือ piscidic acid (1) และ genistein 7-O- α -rhamnosyl (1 $\rightarrow$ 6)- β -glucopyranoside (2) โดยสาร 1 มีรายงานว่า มีฤทธิ์ทำให้หลับ กล่อมประสาท ระงับอาการไอ²¹ ซึ่งรายงานนี้เป็นครั้งแรกที่พบสาร piscidic acid ในสารสกัดเถาวัลย์เปรียง ส่วนสาร 2 เคยมีรายงานว่าแยกได้จากสารสกัดน้ำของเถาวัลย์เปรียง⁵ สำหรับผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ COX พบว่า เฉพาะสาร 2 มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ COX-1 โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 4.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งจากโครมาโทแกรมสมรรถนะสูง พบว่าสาร 2 เป็นองค์ประกอบหลักของสารสกัดหยาบด้วย 50% เอทานอลของเถาวัลย์เปรียง ดังนั้น สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าวจึงมีประโยชน์ในการใช้เป็นสารบ่งชี้เพื่อควบคุมคุณภาพทางเคมีของสารสกัดเถาวัลย์เปรียง นอกจากนี้ การวิจัยนี้เป็นการสนับสนุนภูมิปัญญาของแพทย์แผนไทยในด้านสรรพคุณแก้ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อของสมุนไพรเถาวัลย์เปรียงด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สำหรับทุนวิจัยจากงบประมาณของสถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

เอกสารอ้างอิง

1. เต็ม สมิตินันท์. ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย, พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: บริษัท ประชาชน จำกัด, 2544. หน้า 184.
2. The Plant List 2010. *Derris scandens* (Roxb.) Benth. [Internet] [cited 2013 Aug 10]. Available from: <http://www.theplantlist.org/>

3. สมาคมสมุนไพรแห่งประเทศไทย. งานนิทรรศการสมุนไพรครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: ศรีเมืองการพิมพ์; 2519. หน้า 81-3.
4. สมาคมโรงเรียนแพทย์แผนโบราณ. สำนักวัดพระเชตุพนฯ (วัดโพธิ์) ทำเทียน พระนคร. ประมวลสรรพคุณยาไทย ภาค 2, 2510. หน้า 137-8.
5. Laupattarakasem P, Houghton PJ, Robin J, and Hoult, S. Anti-inflammatory isoflavonoids from the stems of *Derris scandens*. *Planta Med* 2004;70(6):496-501.
6. Laupattarakasem P, Houghton PJ, Hoult JR, Itharat A. An evaluation of the activity related to inflammation of four plants used in Thailand to treat arthritis. *J Ethnopharmacol* 2003;85(2-3):207-15.
7. Mahabusarakam W, Deachathai S, Phongpaichit S, Jansakul C, Taylor WC. A benzil and isoflavone derivatives from *Derris scandens*. *Phytochem* 2004;65:1185-91.
8. Rukachaisirikul V, Sukpondma Y, Jansakul C, Taylor WC. Isoflavone glycosides from *Derris scandens*. *Phytochem* 2002;60(8):827-34.
9. Mokkhasmit M, Ngarmvathana W, Sawasdimongkol K, Permiphaphat U. Pharmacological evaluation of Thai medicinal plants. *J Med Ass Thailand* 1971;54:490-504.
10. Sekine T, Inagaki M, Ikegami F, Fuji Y, Ruangrunsi N. Six deprenylisoflavones, derrisisoflavones A-F, from *Derris scandens*. *Phytochem* 1999;52(1):87-94.
11. Dianpeng L, Mingan O, Jansakul C, Chongren Y. Two isoflavonoids from the stems of *Derris scandens*. *Yaoxue Xuebao* 1999;34:43-5.
12. มยุรี ชวนกำเนิดการ และสว่างจิตต์ วิทยาลัย. การหาส่วนประกอบทางเคมีของต้นเถาวัลย์เปรียง. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยรามคำแหง. วารสารวิจัย 2547;7(2):78-92.
13. Sekine T, Inagaki M, Koseki T, Murakoshi I, Fuji Y, Yamamoto K, Ruangrunsi N, Ikegami F. antifungal constituents of Thai medicinal plants, *Derris scandens* and *Rauwolfia verticillata*. Current advances in natural product research. The Third NRCT-JSPS joint seminar. Bangkok, Thailand, 1996. p. 229-35.
14. Rao SA et al. Isolation, characterization and chembiological quantification of β -glucosidase enzyme inhibitory and free radical scavenging constituents from *Derris scandens* Benth. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007;855(2): 166-72.
15. Rao MN, Krupadanam GLD, Srimannarayana G. Four isoflavones and two 3-aryl coumarins from stems of *Derris scandens*. *Phytochem* 1994;37(1):267-9.
16. Wang BH, Ternai B, Polya G. Specific inhibition of cyclic AMP-dependent protein kinase by warangalone and robustic acid. *Phytochem* 1997;44(5):787-96.
17. Falshaw CP, Harmer RA, Ollis WD, Wheeler RE, Lalitha VR, Rao NVS. Natural occurrence of 3-aryl-4-hydroxycoumarin. II. Phytochemical examination of *Derris scandens*. *J Chem Soc C* 1969;3:374-82.
18. Rao NV and Seshadri TR. Chemical examination of *Derris scandens*. *Ibid* 1947;365-74.
19. Johnson AP, Pelter A, Stainton P. Extractive from *Derris scandens* II. The structures of scandenin and lonchocarpic acid. *J Chem Soc C* 1966;2:192-203.
20. Senegupta P, Das PB, Saha SK. Triterpenes from *Derris scandens* (Roxb.) Benth. *J Indian Chem Soc* 1971;48(1):95-6.
21. Takahira M, Kusano A, Shibano M, Kusano G, and Miyase T. Piscidic acid and fukiic acid esters from *Cimicifuga simplex*. *Phytochem* 1998;49(7):2115-9.
22. Katzung BG, Trevor AJ. Examination and Board Review Pharmacology. 4th ed. New Jersey: Prentice Hall; 1995, p. 146-7, 253-4.

Abstract

Bioactive compounds of *Derris scandens* (Roxb.) Benth. extract
Prapai Wongsinkongman^{1,*}, Jaree Bansiddhi¹, Somchai Sanluangin¹,
Tanavat Thongjin², Utai Sothanapun³

¹Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000.

²Regional Medical Sciences Center 2 Phitsanulok, Department of Medical Sciences, Phitsanulok 65000.

³Faculty of Pharmaceutical Sciences, Silpakorn University, Nakornpathom 73000.

*Corresponding author: prapai.w@dmsc.mail.go.th

Derris scandens (Roxb.) Benth. or *thao-wan-priang* has been used in Thai traditional medicine as muscle pain relief, diuretic and emmenagogue. From pharmacological studies, *thao-wan-priang* showed hypotensive, anti-fungal, immunostimulant, anti-inflammatory, hypoglycemia, and free radical scavenging activities. From the preliminary study, it was found that the stem extract of *Derris scandens* (Roxb.) Benth. with 50% ethanol exhibited anti-inflammatory activity against COX-1; therefore, this study was carried out using bioassay-guided fractionation of the 50% ethanolic extracts. As a result, two compounds were purified using column chromatography and their chemical structures were elucidated using spectroscopic techniques, as well as comparison with reported data. The phenolic acid and isoflavone glycoside compounds were identified as piscidic acid (1) and genistein 7-O- α -rhamnosyl (1 $\rightarrow$ 6)- β -glucopyranoside (2), respectively. Since compound 2 was a major chemical constituent, it was beneficial to use as a marker for the quality control of the extract of *Derris scandens* (Roxb.) Benth. stems.

Key words: *Derris scandens* (Roxb.) Benth.; *thao-wan-priang*, bioactive compounds