คุณภาพทางเคมีของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงใน 50 % เอธานอล

Chemical Quality of *Derris scandens* (Roxb.) Benth. Extract in 50% Ethanol

ประไพ วงศ์สินคงมั่น[1]
Prapai Wongsinkongman
ธิดารัตน์ บุญรอด[1]
Tidarat Boonruad
เย็นจิตร เตชะดำรงสิน[2]
Yenchit Techadamrongsin
จารีย์ บันสิทธิ์[1]
Jaree Bansiddhi
ปราณี ชวลิตธำรง[1]
Pranee Chavalittumrong

บทคัดย่อ

สารสกัดจากลำต้นเถาวัลย์เปรียง *Derris scandens* (Roxb.) Benth. ใน 50% เอธานอล เป็นสารสกัดสมุนไพรไทยชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพในการเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพจากสมุนไพร เนื่องจากมีรายงานถึงประโยชน์ทางเภสัชวิทยาอย่างหลากหลาย เช่น ฤทธิ์ลดความดันโลหิตสูง ฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน ฤทธิ์ต้านเชื้อรา ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาด้านคุณภาพของสารสกัดชนิดนี้มาก่อน จึงได้ทำการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงใน 50 % เอธานอลที่เก็บวัตถุดิบจากแหล่งธรรมชาติต่างๆ ในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง จำนวน 9 ตัวอย่าง โดยการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ ปริมาณสารสกัดด้วย 50 % เอธานอล ปริมาณความชื้น และดัชนีการเกิดฟอง รวมทั้งได้พิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีรงคเลขผิวบาง และวิธีโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง ผลการศึกษานี้ ทำให้ทราบถึงเกณฑ์เบื้องต้นในการควบคุมคุณภาพทางเคมีของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงใน 50 % เอธานอล ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์สุขภาพจากสารสกัดเถาวัลย์เปรียง

ABSTRACT

Derris scandens (Roxb.) Benth. or Thao-wan-priang stems extract in 50 % etha-

1 สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
2 สถาบันการแพทย์ไทย-จีน เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข

nol is a potential Thai herbal extract to use for herbal health products. It has been reported for several pharmacological uses such as hypotensive, immunostimulant, anti-fungal, anti-inflammatory, and free radical scavenging activities. Since the quality of this extract has not been reported yet. Therefore, a study was carried out using 9 samples of the 50 % ethanolic extracts of crude drugs obtained from the Northern, Northeastern and Central parts of Thailand. The values of water extractive, 50 % ethanol extractive, moisture content and foaming index were given. Chemical identification of this extract both by Thin-layer chromatography and High-performance liquid chromatography was also included. The results of this study is beneficial for setting the preliminary criteria of chemical quality control of Thao-wan-priang extract in 50 % ethanol which will be useful for quality control of its health products.

KEY WORDS : Thao-wan-priang extract in 50 % ethanol, *Derris scandens* (Roxb.) Benth. extract in 50 % ethanol, chemical quality, quality control, health products.

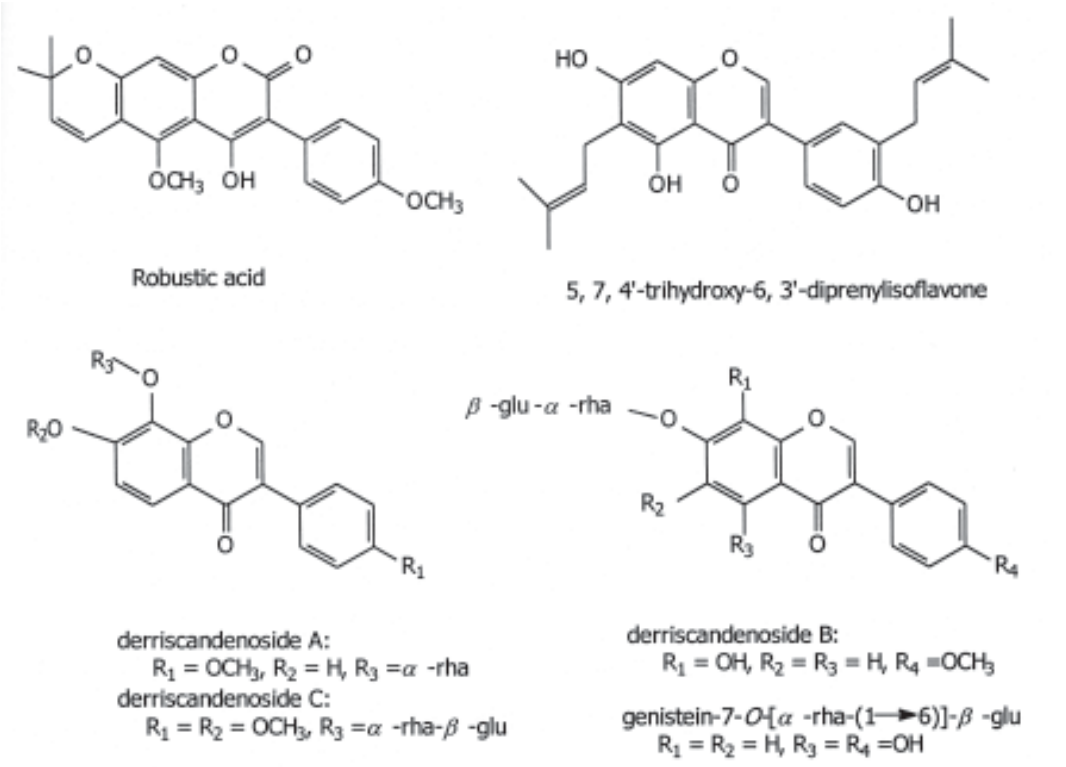
บทนำ

เถาวัลย์เปรียง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Derris scandens* (Roxb.) Benth. วงศ์ Leguminosae-Papilionoideae[1] ชื่ออังกฤษ Jewel Vine และมีชื่อท้องถิ่นอื่นๆ เช่น เครือเขาหนัง เถาตาปลา เครือตาปลา พานไสน ย่านเหมาะ[1-2] พืชชนิดนี้เป็นไม้เถาขนาดใหญ่ ใบเป็นใบประกอบแบบขนนก ใบย่อยรูปรี ช่อดอกยาว สีชมพูอ่อนหรือสีขาว มีกลิ่นหอมอ่อนๆ ผลเป็นฝักแบนเล็ก มีเมล็ดเล็ก[3] ในสรรพคุณยาไทยระบุว่าใช้เถาเป็นยาแก้กระษัย แก้เส้นเอ็นขอด แก้ปวดเมื่อย ขับปัสสาวะ บางแหล่งนิยมนำลำต้น(เถา)หั่นตากแห้งคั่วไฟ ชงน้ำดื่มแทนน้ำชา ใช้แก้ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ ถ้าใช้ดองเหล้าจะเป็นยาขับระดู ส่วนรากใช้เบื่อปลา (แต่ไม่มีคุณสมบัติฆ่าแมลง)[3-4] นอกจากนี้ ในการศึกษาทางเภสัชวิทยา มีรายงานว่า สารสกัดด้วย 50 % เอธานอลจากลำต้นเถาวัลย์เปรียงมีฤทธิ์ลดความดันโลหิต[5] ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์[6] และฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน[7] พบว่าสารเคมีที่มีสูตรโครงสร้างเป็นอนุพันธ์ของ isoflavone ได้แก่ genistein 7-*O*-[α-rhamnosyl (1$\rightarrow$6)]-β- glucosyl glycoside มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ [8] ส่วนอนุพันธ์ของ isoprenyl ได้แก่ 3′γ,γ-dimethylallylwighteone และ scandenin มีฤทธิ์ลดความดันโลหิต และฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์[9] ในขณะที่อนุพันธ์ของ isoflavone และ benzil มีฤทธิ์ลดความดันโลหิต ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์[9] นอกจากนี้พบว่าสารเคมีกลุ่ม dipenylisoflavone เช่น 5,7,4′-trihydroxy-6,3′-diprenylisoflavone มีฤทธิ์เป็นยาต้านเชื้อรา *Trichophyton mentagrophytes* ด้วย [10] ในขณะที่สารสกัดจากรากเถาวัลย์เปรียง พบว่าสารเคมีกลุ่ม diprenylisoflavone เช่น warangalone, robustic

acid, 8-γ,γ -dimethylallylwighteone, 3′-γ,γ -dimethylallylwighteone มีฤทธิ์ยับยั้ง cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit ของตับหนู โดยค่าความเข้มข้นในการยับยั้งที่ 50% หรือ IC_{50} ที่ 3.5, 10, 20, 24 และ 33 ไมโครโมล่าร์ ตามลำดับ และเสนอว่า สารเคมีที่มีสูตรโครงสร้างเป็น prenyl (หรือ dimethylallyl) ดังกล่าวจำเป็นต่อการแสดงฤทธิ์ ซึ่งอาจเป็นเหตุผลที่รากเถาวัลย์เปรียงมีฤทธิ์ในการเบื่อปลาหรือฆ่าแมลงก็ได้ [11]

จากการศึกษาทางเคมี พบว่า ส่วนลำต้น (เถา) ของเถาวัลย์เปรียง ประกอบด้วยสารเคมีประเภท isoflavone และ isoflavone glycoside จำนวนมาก เช่น 5,7,4′-trihydroxy-6,3′-diprenylisoflavone[10], 5,7,4-trihydroxy-6,8-diprenylisoflavone[10], lupinisoflavone G[10], 7,8-dihydroxy-4′-methoxyisoflavone[10], erysenegalensein E[10], lupinisol A[10], eturunagarone[12], lupalbigenin[12], 3′-γ,γ -dimethylallylwighteone[8, 12], 8-γ,γ -dimethylallylwighteone[12], 3,3′-γ,γ -dimethylallylwighteone[12], derriscandenosides A-E[13], 7,8-dihydroxy-4′-methoxyisoflavone[13], 8-hydroxy-4′,7-dimethoxyisoflavone-8-*O*-β- glucopyranoside[13], 7-hydroxy-4′,8-dimethoxyisoflavone-7- *O*-β-glucopyranoside[13], formononetin-7-*O*-β-glucopyranoside[13], diadzein-7- *O*- [α-rhamnopyranosyl-(1→6)]-β-glucopyranoside[13], formononetin-7-*O*- [α-rhamnopyranosyl-(1→6)]-β-glucopyranoside[13], genistein-7- *O*- [α-rhamnopyranosyl-(1→6)]-β-glucopyranoside[8, 13], derrisisoflavone A-F[10,14], derriscanosides A-B[15] และสารกลุ่ม coumarins เช่น 4,4′-di-*O*-methyl scandenin[12], 4,4′-di-*O*-methyllonchocarpic acid[12] และ robustic acid [12] ส่วนเหนือดินของเถาวัลย์เปรียงมีรายงานการพบสารประเภท steroids เช่น lupeol, taraxerol และ β-sitosterol[16] เป็นต้น ส่วนรากของเถาวัลย์เปรียง พบสารกลุ่ม isoflavone ได้แก่ warangalone (หรือ scandenone) [17, 18], scandinone[17], chandalone[18], osajin[17], nallanin[19] และ chandanin[19] และพบสารกลุ่ม coumarin ได้แก่ lonchocarpenin[18], lonchocarpic acid[18, 20], scandenin[18-22]

การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลัน โดยการฉีดสารสกัด 50 % เอธานอลจากส่วนเหนือดินเถาวัลย์เปรียงเข้าช่องท้องหนูถีบจักร พบว่า ขนาดที่เป็นพิษทำให้หนูตาย 50 % คือ 1 ก./กก. [23] แต่เมื่อให้โดยการป้อนทางปาก หรือฉีดใต้ผิวหนังในขนาด 10 ก./กก. กลับไม่พบความเป็นพิษใดๆ ต่อสัตว์ทดลอง[24] สำหรับการศึกษาพิษเรื้อรัง (6 เดือน) นั้น ไม่พบความผิดปกติใดๆที่เกิดจากความเป็นพิษของสารสกัดด้วย 50 % เอธานอลในหนูขาว แม้จะให้สารสกัดโดยการป้อน ทางปากในขนาด 6, 60, 600 มก./กก./วัน หรือเทียบเท่าผงเถาวัลย์เปรียงแห้ง 0.03, 0.3, 3 ก./กก./วัน หรือ 1, 10,100 เท่าของ ขนาดที่ใช้ในคนต่อวัน[25]



รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของสารสำคัญบางชนิดที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของเถาวัลย์เปรียง

จากข้อมูลต่างๆ ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว จะเห็นได้ว่า สารสกัดด้วย 50 % เอธานอลของลำต้นสมุนไพรชนิดนี้มีประสิทธิภาพในการใช้เป็นยาหรือผลิตภัณฑ์สุขภาพ และมีความปลอดภัยสูง ดังนั้นในการวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาคุณภาพทางเคมีของสารสกัดดังกล่าวจากลำต้นเถาวัลย์เปรียง เพื่อควบคุมและกำหนดคุณภาพทางเคมีของสารสกัด ซึ่งจะนำไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์สมุนไพรให้มีประสิทธิภาพ

วิธีดำเนินการวิจัย

ตัวอย่างสารสกัดเถาวัลย์เปรียง

ตัวอย่างวัตถุดิบเถาวัลย์เปรียงถูกสำรวจและเก็บตัวอย่างจากภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดพิษณุโลก เชียงใหม่ ระยอง ปราจีนบุรี หนองคาย สกลนคร อุดรธานี มหาสารคาม บุรีรัมย์ ระหว่างเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2545 – เดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2547 รวม 9 ตัวอย่าง ตรวจสอบชนิดพืชอย่างถูกต้องตามหลักพฤกษอนุกรมวิธาน โดยห้องปฏิบัติการพฤกษศาสตร์ สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พบว่า คือ *Derris scandens* (Roxb.)

Benth. ในการเตรียมสมุนไพรเถาวัลย์เปรียงเพื่อการศึกษาในครั้งนี้ ได้นำตัวอย่างลำต้นแห้งไปล้างด้วยน้ำให้สะอาด ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ นำไปอบให้แห้งในเตาอบร้อนไฟฟ้าที่มีพัดลมระบายอากาศ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำตัวอย่างที่แห้งแล้วไปบดเป็นผงละเอียด ผ่านแร่งเบอร์ 80 จากนั้นนำไปสกัดด้วยการรีฟลักซ์ด้วย 50 % เอธานอล เพื่อเตรียมเป็นสารสกัดที่มีความเข้มข้นประมาณ 10-15 เท่าของวัตถุดิบ นำไปทำให้แห้งด้วยการระเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ และเครื่องทำให้แห้งด้วยความเย็น เก็บสารสกัดในขวดแก้วสีชามีฝาปิดสนิท ปิดฉลากระบุชื่อสมุนไพร แหล่งที่มา วันที่เก็บ และวันที่เตรียมตัวอย่าง เก็บขวดบรรจุสารสกัดสมุนไพรไว้ในตู้เย็น ที่อุณหภูมิไม่เกิน 0 องศาเซลเซียส

เครื่องมือ

1. เตาอบร้อนไฟฟ้ารุ่น VLE-400 ของบริษัท Mammert ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
2. เครื่องบดปั่น รุ่น RT 34 ของบริษัท Chyun Tseh Industrial ประเทศไต้หวัน
3. เครื่องแร่ง รุ่น AS 200 Basic ของบริษัท Retsch ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี และแร่งเบอร์ 80 ของบริษัท Endocott ประเทศอังกฤษ
4. เครื่องเขย่ารุ่น KS 501 ของบริษัท IKA Labortechnik ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
5. เครื่องระเหยสุญญากาศ ประกอบด้วย Rotavapor รุ่น R-114 และอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น B-140ของ บริษัท Buchi Laboritechnik ประเทศญี่ปุ่น เครื่องทำสุญญากาศรุ่น WJ-20 ยี่ห้อ Sibata® ประเทศญี่ปุ่น และเครื่องทำน้ำเย็นหมุนเวียน รุ่น CA-101 ยี่ห้อ Eyela® ของบริษัท Tokyo Rikakikai ประเทศญี่ปุ่น
6. เครื่องแยกโครมาโทกราฟสมรรถนะสูง (HPLC) ของบริษัท Waters ประเทศสหรัฐอเมริกา ประกอบด้วยเครื่องควบคุมปั๊ม รุ่น 600, เครื่องฉีดสารตัวอย่างรุ่น 717, คอลัมน์ ยี่ห้อ Novapak® C18 ขนาด 3.9 x 150 ซม. 60 Å 4μm และเครื่องตรวจวัดชนิดโฟโตไดโอดแอเรย์รุ่น 2770
7. Sep-Pak C18 Cartridge และ Nylon filter ของบริษัท Waters ประเทศสหรัฐอเมริกา
8. แผ่นเคลือบซิลิกาเจลชนิดอาร์พี18เอฟ254 ขนาด 20 x 20 ซม. ความหนา 0.25 มม. ของบริษัท E. Merck ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
9. ตู้ตรวจวัดแสงที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร ของบริษัท Camag ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
10. เครื่องกรองน้ำบริสุทธิ์ (Ultra Pure Water System) ยี่ห้อ Nanopure® ของบริษัท Barnstead ประเทศสหรัฐอเมริกา

11. อ่างเสียงความถี่สูง (Sonicator bath) บริษัท Elma ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
12. เครื่องทำให้แห้งด้วยความเย็น (Freeze dryer) บริษัท Labconco ประเทศสหรัฐอเมริกา

สารเคมี

1. สารเคมีทุกชนิดที่ใช้ในการทดลองต่าง ๆ ยกเว้นสารเคมีที่ใช้กับเครื่องแยกโครมาโทกราฟสมรรถนะสูง เป็นชนิดที่ใช้กับงานวิเคราะห์ (analytical grade) และน้ำบริสุทธิ์ที่ใช้ในงานทดลองเป็นน้ำที่ได้จากการกรองเอาอนุภาคที่มีประจุออก (deionized water)
2. สารเคมีทุกชนิดที่ใช้กับเครื่องแยกโครมาโทกราฟสมรรถนะสูง เป็นชนิดที่ใช้เฉพาะกับเครื่องแยกโครมาโทกราฟสมรรถนะสูง (LC gradient grade) ของบริษัท Merck ประเทศสหรัฐอเมริกา สำหรับน้ำบริสุทธิ์ที่ใช้กับเครื่องแยก โครมาโทกราฟสมรรถนะสูงเป็นน้ำที่กรองผ่านเครื่องกรอง Ultra Pure Water System
3. สารละลายเอ็นพี-พีอีจี (NP-PEG reagent ย่อมาจาก Natural Products-Polyethylene Glycol reagent) มีวิธีเตรียมดังต่อไปนี้
   3.1 สารละลายเอ็นพี เตรียมโดยละลาย diphenylboric acid-2-aminoethyl ester จำนวน 1 กรัม ในเมธานอลจำนวน 100 มิลลิลิตร
   3.2 สารละลายพีอีจี เตรียมโดยละลาย polyethylene glycol 4000 จำนวน 5 กรัมในเอธานอล 100 มิลลิลิตร
4. สารละลาย Fehling มีวิธีเตรียมดังต่อไปนี้
   4.1 สารละลายทองแดง (Copper solution) เตรียมโดยละลาย cupric sulfate 3.5 กรัม ในน้ำ 50 มิลลิลิตร เก็บในขวดทึบแสงที่มีฝาปิดสนิท
   4.2 สารละลาย Alkaline tartrate เตรียมโดยละลาย potassium sodium tartrate 17.3 กรัม และ sodium hydroxide 5 กรัม ด้วยน้ำ และปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร เก็บในขวดทนด่างที่มีฝาปิดสนิท
   4.3 นำสารละลาย 4.1 และ 4.2 มาผสมกันในอัตราส่วน 1 : 1 โดยเตรียมทันที่ก่อนใช้

วิธีการ

1. **การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยปฏิกริยาการเกิดสี**
   (1) Froth Test: ชั่งตัวอย่าง 0.5 กรัม บรรจุในหลอดทดลองที่มีฝาเกลียวปิด เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เขย่าแรง ๆ นานประมาณ 30 วินาที สังเกตฟองที่เกิดขึ้น[26] (ตารางที่ 1)
   (2) Liebermann-Burchard Test: ชั่งตัวอย่าง 0.5 กรัม บรรจุในขวดแก้วก้นกลม เติมเมธานอล 10 มิลลิลิตร นำไปต้มบนอ่างอังไอน้ำเป็นเวลา 5 นาที กรอง นำ

สารละลายที่กรองได้ไประเหยให้แห้ง ด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ สารที่ได้จากการระเหย นำไปละลายด้วยอะซีติคแอนไฮไดรด์ จำนวน 2 มิลลิลิตร แล้วค่อยๆ เติมกรดกำมะถันเข้มข้น 1 มิลลิลิตร สังเกตผลที่เกิดขึ้น[26] (ตารางที่ 1)

(3)Fehling Test: ชั่งตัวอย่าง 0.5 กรัม บรรจุในขวดแก้วก้นแบน เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร นำไปต้มบนอ่างอังไอน้ำนาน 10 นาที กรอง สารละลายที่กรองได้นำไปเติมผงถ่านจำนวน 0.3 กรัม กรอง แล้วเติมสารละลาย Fehling จำนวน 1 มิลลิลิตร นำไปอุ่นในอ่างอังไอน้ำนาน 2-3 นาที สังเกตผลที่เกิดขึ้น [26] (ตารางที่ 1)

(4)Cyanidin Test: ชั่งตัวอย่าง 0.5 กรัม บรรจุในขวดแก้วก้นแบน เติมเมธานอล 10 มิลลิลิตร นำไปต้มบนอ่างอังไอน้ำนาน 10 นาที กรอง สารละลายที่กรองได้นำไปเติมแผ่นแมกนีเซียม 1-2 ชิ้น และกรดเกลือจำนวน 3-4 หยด นำไปอุ่นในอ่างอังไอน้ำ สังเกตผลที่เกิดขึ้น[27] (ตารางที่ 1)

2. การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีรงคเลขผิวบาง

(1)การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่าง 0.1 กรัม ละลายด้วย 50 % เอธานอลจำนวน 10.0 มิลลิลิตร โดยใช้อ่างเสียงความถี่สูงนาน 30 นาที กรองขณะร้อน นำสารละลายที่กรองได้ไประเหยจนเหลือ 1 มิลลิลิตรด้วยเครื่องระเหย สุญญากาศที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วปรับปริมาตรด้วย 50 % เอธานอลจนได้ 2.0 มิลลิลิตร

(2)การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ละลายสารมาตรฐาน genistein-7-*O*- [α-rhamnopyranosyl-(1$\rightarrow$6)]-β-glucopyranoside จำนวน 1 มิลลิกรัมใน 50% เอธานอล 1 มิลลิลิตร

(3)น้ำยาแยก

เตรียมน้ำยาแยกโดยผสมเมธานอล และน้ำ ในอัตราส่วน 40:60 ให้เข้ากันดี นำมาใส่ในถังทำโครมาโทกราฟีทิ้งไว้อย่างน้อย 1 ชั่วโมงก่อนใช้ เพื่อให้บรรยากาศในถังอิ่มตัวด้วยน้ำยาแยก

(4)วิธีการ

ใช้หลอดรูเล็ก (capillary tube) นำสารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานชนิดละ 2 ไมโครลิตร มาแต้มบนแผ่นเคลือบซิลิกาเจลในแนวระดับเดียวกัน โดยให้ห่างจากขอบล่างของกระจกประมาณ 2 เซนติเมตรและให้มีระยะห่างระหว่างหยดของสารละลายแต่ละชนิดไม่น้อยกว่า 1 เซนติเมตร ผึ่งให้แห้ง นำไปตั้งในถังทำโครมาโทกราฟีที่เตรียมไว้ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้น้ำยาแยกซึมขึ้นไปตามผิวที่ฉาบสูง 15เซนติเมตร นำแผ่นเคลือบซิลิกาเจลออกจากถัง ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำไปตรวจสอบ

(5)การตรวจสอบ

นำแผ่นเคลือบซิลิกาเจลไปวางบนเตาไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้น ทิ้งให้เย็นลงประมาณ 50 องศาเซลเซียส นำไปพ่นด้วยสารละลายเอ็นพี แล้วพ่นทับด้วยสารละลายพีอีจี ทิ้งไว้ให้แห้ง และสังเกตผลภายใน 15 นาที โดยนำไปส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร [28] สังเกตผลจากจุดที่เรืองแสง (ตารางที่ 2, รูปที่ 2)

3. การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีโครมาโทกราฟสมรรถนะสูง

(1)การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ชั่งสารตัวอย่างมา 0.5 กรัม ในขวดรูปชมพู่ นำไปละลายใน 50 % เอธานอล 10.0 มิลลิลิตร โดยใช้อ่างเสียงความถี่สูงนาน 30 นาที กรองขณะร้อน หากมีตะกอน ให้กรองด้วยกระดาษกรอง นำสารละลายที่กรองได้มาปรับปริมาตรให้ได้ 10.0 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายจำนวน 1.0 มิลลิลิตรมากรองผ่าน SepPak C18 และกรองด้วยตัวกรองไนลอนขนาด 0.45 ไมครอน

(2)การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ละลายสารมาตรฐาน genistein-7-*O*- [α-rhamnopyranosyl-(1$\rightarrow$6)]-β-glucopyranoside จำนวน 4 มิลลิกรัมใน 50 % เอธานอล 1 มิลลิลิตร

(3)น้ำยาแยก

ใช้สารละลาย1% กรดอะซีติก ผสมกับน้ำ และอะซีโตไนไตรล์ โดยผสมกันแบบ gradient ในอัตราส่วน 92 : 0 : 8 (t=0), 65 : 0 : 35 (t=10), 0 : 85 : 15 (t= 15)

(4)อัตราเร็วของน้ำยาแยก

1.5 มิลลิลิตร / นาที

(5)ปริมาณสารที่ใช้ในการฉีด

ใช้สารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐาน ชนิดละ 2 ไมโครลิตร

(6)การตรวจสอบ

ใช้ตัวตรวจวัดชนิดโฟโตไดโอดแอเรย์ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร สังเกต peak ที่เกิดขึ้นในโครมาโทแกรม(รูปที่ 3)

4. ปริมาณความชื้น

ทำตามวิธีที่กำหนดไว้ในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย[29]โดยใช้ตัวอย่างจำนวน 1 กรัม (ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน) ในการทดสอบหาค่าน้ำหนักที่สูญเสียไปเมื่ออบให้แห้ง (ตารางที่ 3)

5. ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำและสารสกัดด้วย 50 % เอธานอล

ทำตามวิธีที่กำหนดไว้ในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย[29] โดยใช้ตัวอย่างจำนวน 1 กรัม (ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน) ในการทดสอบ (ตารางที่ 3)

6. ดัชนีการเกิดฟอง

ทำตามวิธีที่กำหนดไว้ในวิธีการควบคุมคุณภาพของสมุนไพรตามองค์การอนามัยโลก[30] (ตารางที่ 3) โดยชั่งสมุนไพร 1.00 กรัม ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมน้ำเดือด 100 มิลลิลิตร แล้ววางบนอ่างอังไอน้ำ นาน 30 นาที เริ่มจับเวลาเมื่อน้ำเริ่มเดือด ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วกรองด้วยกรวย Buchner แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100.0 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร ระวังอย่าให้มีฟองขณะปรับปริมาตร ปิเปตสารละลายใส่ลงในหลอดทดลอง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 16 มิลลิเมตร ชนิดมีฝาเกลียวปิดสนิท จำนวน 10 หลอด โดยเริ่มตั้งแต่ 1, 2, 3,...,10 มิลลิลิตร โดยให้ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 10 มิลลิลิตร ทุกหลอด เขย่าขึ้นลงให้ได้อัตรา 30 ครั้งต่อ 15 วินาที แล้วตั้งทิ้งไว้ 15 นาที เมื่อครบเวลาให้วัดส่วนสูงของฟอง และคำนวณดัชนีการเกิดฟองโดยใช้สูตรดังนี้ “ดัชนีการเกิดฟอง = 1000/ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบที่ทำให้เกิดฟองสูงกว่า 1 เซนติเมตร”

ผลการวิจัย

จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยปฏิกิริยาการเกิดสีของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงใน 50 % เอธานอล จำนวน 9 ตัวอย่าง พบว่า ทุกตัวอย่างให้ผลบวกกับ Froth Test, Liebermann-Burchard Test, Fehling Test และ Cyanidin Test (ดังแสดงในตารางที่ 1) เมื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีรงคเลขผิวบางโดยใช้สารละลายเอ็นพี-พีอีจี แล้วนำไปส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร พบว่า มีสารประกอบฟลาโวนอยด์ประมาณ 5-6 ชนิด โดยพบสารสำคัญ genistein-7-*O*- [α-rhamnopyranosyl-(1$\rightarrow$6)]-β-glucopyranoside ในทุกตัวอย่าง (ดังแสดงในตารางที่ 2 และรูปที่ 2) นอกจากนี้ การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง พบว่า สารสกัดเถาวัลย์เปรียงใน 50 % เอธานอลมีองค์ประกอบทางเคมีประมาณ 15-16 ชนิด และในทุกตัวอย่างตรวจพบสารสำคัญดังกล่าวด้วย (ดังแสดงในรูปที่ 3)

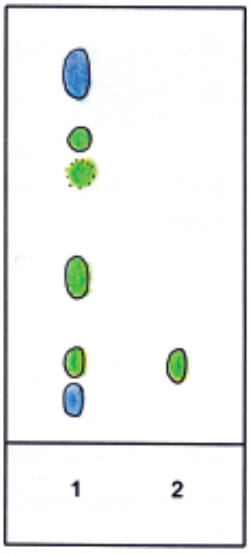
ตารางที่ 1 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงใน 50% เอธานอลด้วยปฏิกิริยาการเกิดสี

วิธีทดสอบ	ผลการทดสอบ
Forth Test (ตรวจสอบสารประเภทซาโปนิน)	เกิดฟองชนิดที่คงทนได้นานกว่า 15 นาที
Liebermann-Burchard Test (ตรวจสอบสารประเภทเทอร์ปีนส์และสเตอรอล)	ได้วงแหวนสีน้ำตาลแดงระหว่างรอยต่อของชั้นสารละลาย
Fehling Test (ตรวจสอบสารประเภทน้ำตาลที่สูญเสียอิเล็กตรอนได้ง่าย)	ได้ตะกอนสีแดงอิฐ
Cyanidin Test (ตรวจสอบสารประเภทฟลาโวนอยด์)	ได้สารละลายสีน้ำตาลแดง

ตารางที่ 2 ค่า hR_f และผลการตรวจสอบสารประเภทฟลาโวนอยด์ของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงใน 50% เอธานอล

จุดสี	ค่า hr_f	การตรวจสอบ
		เรืองแสงภายใต้ UV366 กับสารละลาย เอ็นพี-พีอีจี
1	7-8	ฟ้าอ่อน
2*	16-18	เขียวอ่อน
3	37-41	เขียวอ่อน
4	65-67	เขียวอ่อน
5	70-71	เขียวอ่อน
6	80-82	ฟ้าอ่อน

หมายเหตุ *genistein-7-*O*- [α-rhamnopyranosyl-(1$\rightarrow$6)]-β-glucopyranoside



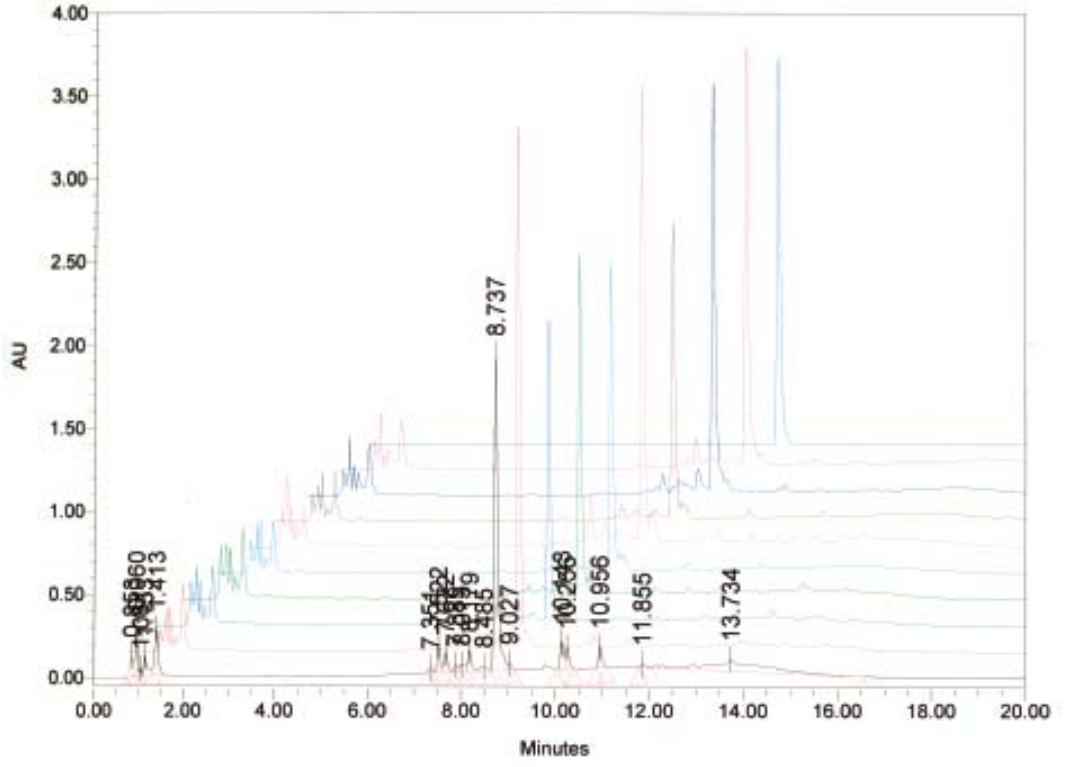
รูปที่ 2 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีรงคเลขผิวบางของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงใน 50 % เอธานอลเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน เมื่อใช้สารละลายผสมของเมธานอล : น้ำในอัตราส่วน 40 : 60 เป็นน้ำยาแยก

ตรวจสอบโดยใช้ สารละลาย เอ็นพี-พีอีจี

1 = สารสกัดด้วย 50% เอธานอลจากเถาวัลย์เปรียง

2 = genistein-7-*O*- [α-rhamnopyranosyl-(1$\rightarrow$6)]-β-glucopyranoside

$\therefore$ = จุดสีที่พบในบางตัวอย่าง



รูปที่ 3 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูงของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงใน 50% เอธานอลเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน โดยใช้สารละลาย 1% กรดอะซีติก: น้ำ : อะซีโตไนไตรล์ ในอัตราส่วน 92 : 0 : 8 (t=0), 65 :0 : 35 (t=10), 0 : 85 : 15 (t=15) เป็นน้ำยาแยกที่อัตราเร็ว 1.5 มิลลิลิตร/นาที และใช้คอลัมน์ Novapak® C18 (ขนาด 3.9 x 150 ซม. 60 Å 4 μm)

การทดสอบคุณสมบัติทั่วไปทางกายภาพและทางเคมีของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงใน 50%เอธานอล ทำโดยการวิเคราะห์หาปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ ปริมาณสารสกัดด้วย 50 % เอธานอล ปริมาณความชื้น ดัชนีการเกิดฟอง และค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลาย 1.0 % ในน้ำ พบว่า มีค่าเฉลี่ยดังนี้ 74.55±13.40, 88.37±3.09, 4.68±0.61, 500±0 และ 5.06±0.09 ตามลำดับ ซึ่งค่าเฉลี่ยดังกล่าวและเกณฑ์ที่ใช้ในการกำหนดได้แสดง ไว้ในตารางที่ 3

วิจารณ์

จากการตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีของตัวอย่างสารสกัดลำต้นแห้งของเถาวัลย์เปรียงใน 50% เอธานอล ซึ่งเก็บวัตถุดิบจากแหล่งธรรมชาติต่างๆ ในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และ

ตารางที่ 3 ผลการประเมินคุณภาพทางเคมีและกายภาพของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงใน 50% เอธานอล

รายการ	ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนเฉลี่ย ($\bar{X} \pm$ S.D., n = 9)	เกณฑ์กำหนดค่าบน ($\bar{X}$ + 10 %)	เกณฑ์กำหนดค่าล่าง ($\bar{X}$ - 10 %)
ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ	74.55 ± 13.40	-	67
ปริมาณสารสกัดด้วย 50 % เอธานอล	88.37 ± 3.09	-	79
ปริมาณความชื้น	4.68 ± 0.61	6	-
ดัชนีการเกิดฟอง	500 ± 0	-	450
ค่าความเป็นกรด-ด่างของสารสกัด (1.0 % ในน้ำ)	5.06 ± 0.09	5.5	4.5

ภาคกลางของประเทศไทย จำนวน 9 ตัวอย่าง พบว่า ทุกตัวอย่างให้ผลเหมือนกันในการทดสอบด้วยปฏิกริยาการเกิดสี ดังนี้ ตรวจพบสารประเภทซาโปนินโดยใช้ Froth Test ตรวจพบสารประเภทเทอร์ปีนส์โดยใช้ Liebermann-Burchard Test ตรวจพบสารประเภทน้ำตาล ที่สูญเสียอิเล็กตรอนได้ง่ายโดยใช้ Fehling Test และตรวจพบสารประเภทฟลาโวนอยด์โดยใช้ Cyanidin Test การทดสอบยืนยันผลเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีรงคเลขผิวบาง โดยพ่นด้วยสารละลายเอ็นพี (Natural Products)-พีอีจี (Polyethylene Glycol) แล้วนำไปส่องดูการเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร สามารถตรวจพบสารประเภทฟลาโวนอยด์จำนวน 6-7 ชนิด ซึ่งการทดสอบตรวจพบ genistein-7-*O*- [α -rhamnopyranosyl-(1$\rightarrow$6)]-β-glucopyranoside ในสารสกัดด้วยเอธานอลของเถาวัลย์เปรียงทุกตัวอย่าง สำหรับการทดสอบสารสกัดเถาวัลย์เปรียง โดยวิธีโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง (HPLC) พบว่า มีองค์ประกอบทางเคมี 12- 16 ชนิดและพบ genistein-7-*O*-[α -rhamnopyranosyl-(1$\rightarrow$6)]-β-glucopyranoside เป็นองค์ประกอบในทุกตัวอย่าง โดยมีค่า Retention time (T_R) ที่ 8.7 นาที ดังแสดงในรูปที่ 3

การประเมินคุณภาพของสมุนไพรตามมาตรฐานสากลนั้น นอกจากการตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีแล้ว ยังต้องตรวจคุณภาพทางกายภาพและทางเคมีด้วย โดยการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ ปริมาณสารสกัดด้วย 50 % เอธานอล ปริมาณความชื้น และดัชนีการเกิดฟอง[29-30] ในการกำหนดปริมาณความชื้น มีความสำคัญต่ออายุของสารสกัดสมุนไพร หากสารสกัดสมุนไพรมีความชื้นสูง จะทำให้เกิดการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ได้ง่าย และอาจทำให้เสื่อมคุณภาพได้เร็ว รวมทั้งเมื่อนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ก็จะทำให้มีคุณภาพต่ำไปด้วย นอกจากนี้ ค่าสารสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ที่เหมาะสม เป็นอีกดัชนีหนึ่งที่จะบ่งชี้คุณภาพของสารสำคัญในสารสกัดสมุนไพร หาก

สารสกัดสมุนไพรนั้นยังไม่ทราบสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ หรือยังไม่มีวิธีวิเคราะห์สารสำคัญที่เหมาะสม[30] ดังนั้น การศึกษาวิจัยนี้ จึงวิเคราะห์หาปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ และปริมาณสารสกัดด้วย 50% เอธานอล ส่วนค่าดัชนีการเกิดฟองแสดงถึงปริมาณสารประเภทซาโปนินในสมุนไพร เนื่องจากสารประกอบซาโปนินมีคุณสมบัติเฉพาะตัว คือเกิดฟองที่คงทนเมื่อเขย่ากับน้ำ ถึงแม้ว่า ค่าดัชนีการเกิดฟองควรไม่น้อยกว่า 450 จากการกำหนดเกณฑ์ค่าล่าง แต่เนื่องจากวิธีการหาค่าดังกล่าว(จากสมการ 1000/V) จะเห็นว่า ค่าที่ได้จากการทดสอบที่น้อยกว่า 500 ควรมีค่าเท่ากับ 333 สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่างของสารสกัดมีความสำคัญในการเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์ เนื่องจากหากมีความเป็นกรด-ด่างที่สูงเกินไปจะมีผลต่อคุณภาพและอายุความคงตัวของผลิตภัณฑ์ ดังนั้น พบว่า ค่าที่เหมาะสมสำหรับสารสกัดเถาวัลย์เปรียงใน 50 % เอธานอลที่ความเข้มข้น 1.0% ในน้ำ ควรมี pH ระหว่าง 4.5 ถึง 5.5

ผลการศึกษาวิจัยนี้ ทำให้สามารถทราบถึงคุณภาพทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดสมุนไพรชนิดนี้ ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพที่มีคุณภาพที่ดี ส่วนการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ในสารสกัดนั้น คณะผู้วิจัยจะดำเนินการต่อไปในอนาคต

สรุปผลการทดลอง

ผลการศึกษา แสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากลำต้นแห้งของเถาวัลย์เปรียงใน 50% เอธานอลประกอบด้วยสารประเภทซาโปนิน น้ำตาลกลุ่มที่สูญเสียอิเล็กตรอนได้ง่าย เทอร์ปีนส์ และฟลาโวนอยด์ จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีรงคเลขผิวบาง และวิธีโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง พบว่า สารสกัดทุกตัวอย่างมี genistein-7-*O*- [α-rhamnopyranosyl-(1$\rightarrow$6)]-β-glucopyranoside ซึ่งเป็นสารประเภทไอโซฟลาโวนกลัยโคไซด์ที่ตรวจพบในวัตถุดิบด้วย[31] ดังนั้น เพื่อประโยชน์ในการควบคุมคุณภาพทางเคมีและกายภาพของสารสกัดสมุนไพรชนิดนี้ใน 50% เอธานอล จึงได้กำหนดเกณฑ์สูงสุด โดยกำหนดค่าบนจากค่าเฉลี่ยบวกด้วย 10 % สำหรับปริมาณที่ระบุว่า “ไม่เกิน” และเกณฑ์ต่ำสุดโดยกำหนด ค่าล่างจากค่าเฉลี่ยลบด้วย 10 % สำหรับปริมาณที่ระบุว่า “ไม่น้อยกว่า” (ยกเว้นค่าดัชนีการเกิดฟอง) ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 สรุปผลข้อกำหนดคุณภาพของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงใน 50 % เอธานอล

รายการ	ไม่เกิน	ไม่น้อยกว่า
ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ (% โดยน้ำหนัก)	-	67
ปริมาณสารสกัดด้วย50 % เอธานอล (% โดยน้ำหนัก)	-	79
ปริมาณความชื้น (% โดยน้ำหนัก)	6	-
ดัชนีการเกิดฟอง	-	333
ค่าความเป็นกรด-ด่าง (1.0% ในน้ำ)	5.5	4.5

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ดร. บุษราวรรณ ศรีวรรธนะ ห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันแบบอาศัยเซลล์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ทดสอบฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อุทัย โสธนะพันธุ์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่ให้ความอนุเคราะห์ พิสูจน์โครงสร้างของสารมาตรฐาน รวมทั้งผู้ร่วมงานทุกท่านในห้องปฏิบัติการพฤกษเคมี สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

เอกสารอ้างอิง

1. (เต็ม สมิตินันท์; ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ. 2544) ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย, พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร : บริษัท ประชาชน จำกัด, หน้า 184.
2. Becker CA and Bakhuzen van den Brionk RC. Flora of Java 1963; 1: 616-619
3. พเยาว์ เหมือนวงศ์ญาติ. สมุนไพรก้าวใหม่ (แก้ไขปรับปรุงใหม่จากตำราวิทยาศาสตร์สมุนไพร), พิมพ์ครั้งที่ 2กรุงเทพมหานคร : บริษัท ที.พี. พริ้นท์ จำกัด, 2537 : 86-87.
4. สมาคมโรงเรียนแพทย์แผนโบราณ. สำนักวัดพระเชตุพนฯ (วัดโพธิ์) ท่าเตียน พระนคร. ประมวลสรรพคุณยาไทย ภาค 2. 2510 : 137-138.
5. Mokkhasmit M, Ngarmvathana W, Sawasdimongkol K, and Permphiphat U. Pharmacological evaluation of Thai medicinal plants. J Med Ass Thailand. 1971; 54 : 490-504.
6. Dhawan BN, Patnaik GK, Rastogi RP, Singh KK, and Tandon JS. Screening of Indian plants for biological activity. Indian J Exp Biol. 1977; 15 : 208-219.
7. Sriwanthana B and Chavalittumrong P. In vitro effect of *Derris scandens* on normal lymphocyte proliferation and its activities on natural killer cells in normals and HIV-1 infected patients. J Ethnopharmacol. 2001 ; 76 (1) : 125-129.
8. Laupattarakasem P, Houghton PJ, Hoult JR. Anti-inflammatory isoflavonoid glycosides from *Derris scandens*. Planta Med. 2004; 70 (6) , 496-501.
9. Mahabusarakam W, Dechathai S, Phongpaichit S, Jansakul C, and Talor WC. A benzil and isoflavone derivatives from *Derris scandens* Benth. Phytochem. 2004; 65(8) : 1185-1191.
10. Sekine T, Inagaki M, Koseki T, Murakoshi I, Fuji Y, Yamamoto K, Ruangrungsi N, and 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 : 229-235.

11. Wang BH, Ternai B, Polya G. Specific inhibition of cyclic AMP-dependent protein kinase by warangalone and robustic acid. Phytochem. 1997; 44 (5): 787-796.

12. Rao MN, Krupadanam GLD, Srimannarayana G. Four isoflavones and two 3-aryl coumarins from stems of *Derris scandens*. Phytochem 1994 ; 37 (1) : 267-269.

13. Rukachaisirikul V, Sukpondma Y, Jansakul C, Taylor WC. Isoflavone glycosides from *Derris scandens*. Phytochem. 2002 ; 60(8) : 827-834.

14. Sekine T, Inagaki M, Ikegami F, Fuji Y, Ruangrungsi N. Six deprenylisoflavones, derrisisoflavones A-F, from *Derris scandens*. Phytochem. 1999 ; 52 (1) : 87-94.

15. Dianpeng L, Mingan O, Jansakul C, Chongren Y. Two isoflavonoids from the stems of *Derris scandens*. Yaoxue Xuebao. 1999; 34 : 43-45.

16. Senegupta P, Das PB, and Saha SK. Triterpenes from *Derris scandens* (Roxb.) Benth. J Indian Chem Soc. 1971 ; 48 (1) : 95-96.

17. Pelter A and Stainton P. Extractives from *Derris scandens* II. Isolation of osajin and two new isoflavones, Scandenone and scandinone. J. Chem. Soc., C. Org. 1966 ; 7 : 701-704.

18. Falshaw CP, Harmer RA, Ollis WD, Wheeler RE, Lalitha VR, Rao NVS. Natural occurance of 3-aryl-4- hydroxycoumarin. II. Phytochemical examination of *Derris scandens*. J Chem Soc C. 1969 ; 3 : 374-382.

19. Rao NV and Seshadri TR. Chemical examination of *Derris scandens*. Ibid. 1947; 365-374.

20. 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.

21. Clark EP. Scandenin-a constituent of the roots of *Derris scandens*. J Org Chem. 1943; 8(5): 489-492.

22. Rao SNV and Khan WA. Structural studies on scandenin. I. A study of its physical and chemical properties. Indian J Chem. 1963; 1(2): 74-77.

23. Dhawan BN, Patnaik GK, Rastogi RP Singh KK, and Tanden JS. Screening of Indian plants for biological activity. Indian J Exp Biol. 1977; 15 :208-219.

24. Mokkhasmit M, Swatdimongkol K, and Satrawaha P. Study on toxicity of Thai

medicinal plants. Bull Dept Med Sci. 1971; 12(2): 36-65.

25. Chavalittumrong P, Chivapat S, Chuthaputti A, Rattanajarasroj S, and Punyamong S. Chronic toxicity study of crude extract of *Derris scandens* Benth. Songklanakarin J Sci Technol. 1999 ; 21 (4) : 425-433.

26. Faculty of Pharmacy, Mahidol University. Specification of Thai Medicinal Plants. 1992 : 64-67.

27. กฤษณพันธ์ ว. พฤกษเคมีเบื้องต้น. ใน จิรัจฉริยากูล ว, บรรณาธิการ. ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ, พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 2534 : 4.3.

28. Wagner H, Bladt S, and Zgainski EM. Plant Drug Analysis. 1990: 303-304.

29. Thai Herbal Pharmacopoeia. Vol.II. Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. 2000 : 136-137,141-142.

30. World Health Organization. Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials. 1998. (http://www.who.int/medicines/library/trm/medicinalplants/qualcontrolmethods.html)

31. ประไพ วงศ์สินคงมั่น, ธิดารัตน์ บุญรอด, เย็นจิตร เตชะดำรงสิน, จารีย์ บันสิทธิ์, ปราณี ชวลิตธำรง. ข้อกำหนดทางเคมีและกายภาพของเถาวัลย์เปรียง. วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก. 2547; 2(3):18-34.