ข้อกำหนดทางเคมีและกายภาพของเถาวัลย์เปรียง

Chemical and Physical Specifications of Derris scandens (Roxb.) Benth.

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

บทคัดย่อ

เถาวัลย์เปรียง Derris scandens (Roxb.) Benth. เป็นสมุนไพรชนิดหนึ่งที่มีการใช้กันมานานในตำรายาไทย โดยใช้เถาเป็นยาขับปัสสาวะ แก้ปวด แก้ไข้ และบรรเทาอาการปวดเมื่อยของกล้ามเนื้อ สมุนไพรชนิดนี้ยังไม่มีข้อกำหนดด้านมาตรฐานคุณภาพมาก่อน จึงได้ทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และกายภาพของเถาวัลย์เปรียงที่เก็บจากแหล่งธรรมชาติต่างๆ ในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง จำนวน 16 ตัวอย่าง โดยการตรวจวิเคราะห์ปริมาณเถ้ารวม ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ ปริมาณสารสกัดด้วย 50 % เอธานอล ปริมาณสารสกัดด้วย 95 % เอธานอล ปริมาณความชื้น และดัชนีการเกิดฟอง รวมทั้งได้พิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีรงคเลขผิวบาง และวิธีโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง ผลการศึกษานี้ ทำให้สามารถจัดทำข้อกำหนดทางเคมีและกายภาพของสมุนไพรชนิดนี้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์สุขภาพจากสมุนไพรเถาวัลย์เปรียง

1 สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
2 สถาบันการแพทย์ไทย-จีน เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข

ABSTRACT

Thao-wan-priang, Derris scandens (Roxb.) Benth., has long been used in Thai traditional medicine as diuretic, analgesic, antipyretic and muscle relaxant. The quality standard of this crude drug has not been reported. Therefore a study was conducted on 16 samples of crude drug obtained from the Northern, Northeastern and Central parts of Thailand. The values of total ash content, acid-insoluble ash content, water extractive, 50 % ethanol extractive, 95 % ethanol extractive, moisture content and foaming index were given. Chemical identification of this crude drug both by Thin-layer chromatography and High-performance liquid chromatography was also reported. The results of this study can be used to set up the appropriate chemical and physical specifications of Thao-wan-priang which will be useful for quality control of this crude drug and its health products.

KEY WORDS : Thao-wan-priang, Derris scandens (Roxb.) Benth., chemical and physical specifications, quality control, health products.

บทนำ

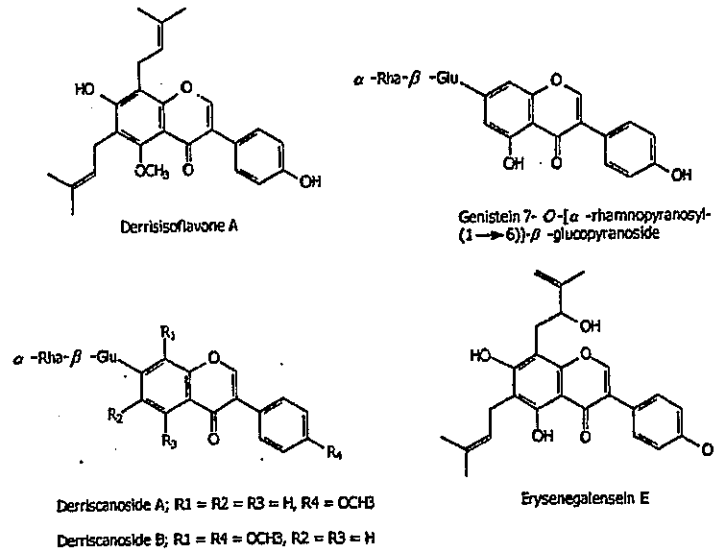
เถาวัลย์เปรียง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า Derris scandens (Roxb.) Benth. ชื่ออังกฤษ Jewel Vine และมีชื่อท้องถิ่นต่างๆ ได้แก่ เถาตาปลา เครือตาปลา เครือเขาหนัง (นครราชสีมา) พานไสน (ชุมพร)[1] ย่านเหมาะ (นครศรีธรรมราช)[2-3] อยู่ในวงศ์ Leguminosae-Papilionoideae[1] พืชชนิดนี้เป็นไม้เถาขนาดใหญ่ ใบเป็นใบประกอบแบบขนนก ใบย่อยรูปวงรี ดอกช่อห้อยลง ขนาดของดอกย่อยเล็กกว่าดอกโสน ดอกสีชมพูอ่อนหรือสีขาว มีกลิ่นหอมอ่อนๆ ผลเป็นฝักแบนเล็ก มีเมล็ด 2-4 เมล็ด[2] ยาไทยใช้เถาเป็นยาแก้กระษัย แก้เส้นเอ็นขอด ทำให้เส้นอ่อนและหย่อนดี ขับปัสสาวะ แก้ปัสสาวะพิการ เป็นยาถ่ายเฉพาะเสมหะเท่านั้น ไม่ทำให้อุจจาระเดิน จึงเหมาะที่จะใช้ในโรคบิด โรคไอ โรคหวัด บางแหล่งนิยมนำเถาหั่นตากแห้งคั่วไฟ ชงน้ำดื่มแทนน้ำชา ใช้แก้ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ ถ้าใช้เถาดองเหล้าจะเป็นยาขับระดู ส่วนรากใช้เบื่อปลา (แต่ไม่มีคุณสมบัติฆ่าแมลง)[2-4]

จากการศึกษาทางเคมี พบว่า ส่วนเถา (ลำต้น) ของเถาวัลย์เปรียง ประกอบด้วยสารเคมีประเภท isoflavone และ isoflavone glycoside จำนวนมาก เช่น eturunagarone[5], 4,4′-di-O-methyl scandenin[5], lupinisol A[6], 5,7,4′-trihydroxy-6,8-diprenylisoflavone[6], 5,7,4′-trihydroxy-6,3′- diprenylisoflavone[6], erysenegalensein E[6], derrisisoflavones A-F[6-7], scandinone[6], lupiniisoflavone G[7], lupalbigenin[7], derrisscandenosides A-E[8], 7,8-dihydroxy-4′-methoxyisoflavone[8], formononetin-7-*O*-β-glucopyranoside[8], 8-hydroxy-4′,7-dimethoxyisoflavone-8-*O*-β-glucopyranoside[8], 7-hydroxy-4′,8-dimethoxyisoflavone

-7-O-β-glucopyranoside[8], diadzein-7-O-[α-rhamnopyranosyl-(1→6)]-β-glucopyranoside[8], formononetin-7-O-α-rhamnopyranosyl-(1→6)]-β-glucopyranoside[8], derrisscanosides A-B[9], genistein-7-O-[α-rhamnopyranosyl-(1→6)]-β-glucopyranoside[8,10] นอกจากนี้ ยังพบ 3-aryl-4-hydroxycoumarins[11], 4-hydroxy-3-methoxy benzoic acid[8], 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoic acid[8] เป็นต้น และพบสารประเภท steroids จากส่วนเหนือดินของเถาวัลย์เปรียง เช่น lupeol, taraxerol และ β-sitosterol[12] เป็นต้น

สำหรับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงนั้น มีรายงานว่า สารสกัดด้วยน้ำจากลำต้นของเถาวัลย์เปรียงมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง leukotriene B ลดการหลั่งของ myeloperoxide และลดการสร้าง eicosanoid[13] สำหรับฤทธิ์ลดการอักเสบที่อุ้งเท้าหนูพบว่าได้ผลดีอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อใช้เป็นยาฉีดใต้ผิวหนัง แต่ฤทธิ์ลดการอักเสบไม่มีนัยสำคัญเมื่อป้อนทางปาก[13] นอกจากนี้ พบว่าสารสกัดน้ำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย[13] ในขณะที่สารสกัดด้วยบิวธานอลและสารประกอบประเภท rhamnosyl-(1→6)-glucosylisoflavones จากลำต้นเถาวัลย์เปรียงมีฤทธิ์ลดความดันโลหิตได้[14] และสารสกัดด้วย 50 % เอธานอลจากลำต้นเถาวัลย์เปรียงมีฤทธิ์กระตุ้น ภูมิคุ้มกัน[15] นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่า 5,7,4′-trihydroxy-6,3′-diprenylisoflavone ที่แยกได้จากสารสกัดเอธานอลมีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Trichophyton mentagrophytes* ด้วย โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อได้น้อยกว่า 15.6 มคก./มล.[6] เป็นต้น

การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลัน โดยการฉีดสารสกัด 50 % เอธานอลจากส่วนเหนือดินเถาวัลย์เปรียงเข้าทางช่องท้องหนูถีบจักร พบว่า ขนาดที่เป็นพิษทำให้หนูตายร้อยละ 50 คือ 1 ก./กก. แต่เมื่อให้โดยการป้อนทางปาก หรือฉีดใต้ผิวหนังในขนาด 10 ก./กก. กลับไม่พบความเป็นพิษใดๆ ต่อสัตว์ทดลอง[16] สำหรับการทดสอบพิษเรื้อรังนั้น ไม่พบความเป็นพิษใดๆ ในหนูทดลอง แม้จะให้โดยการป้อนทางปากในขนาดสูงถึง 600 มก./กก. ซึ่งเป็นขนาดที่สูงกว่าขนาดยาปกติ 100 เท่า[17] จากข้อมูลต่างๆ ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว จะเห็นได้ว่า สมุนไพรชนิดนี้มีศักยภาพที่จะนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพต่างๆ และเนื่องจากยังไม่มีรายงานด้านข้อกำหนดทางเคมีและกายภาพของสมุนไพรชนิดนี้อย่างเป็นระบบมาก่อน คณะผู้วิจัยจึงได้ศึกษาคุณภาพของเถาวัลย์เปรียงที่เก็บจากแหล่งธรรมชาติต่างๆ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการกำหนดมาตรฐานของวัตถุดิบ ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งในการยกระดับคุณภาพของสมุนไพรไทยสู่มาตรฐานระดับสากล



รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของสารสำคัญบางชนิดที่พบในเถาวัลย์เปรียง

วิธีดำเนินการวิจัย

ตัวอย่างเถาวัลย์เปรียง

สำรวจและเก็บตัวอย่างวัตถุดิบเถาวัลย์เปรียงจากแหล่งธรรมชาติต่างๆ ในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดพิษณุโลก ปราจีนบุรี เชียงใหม่ หนองคาย สกลนคร อุดรธานี มหาสารคาม บุรีรัมย์ และนครนายก ระหว่างเดือนมีนาคม พ.ศ. 2544 - เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2546 รวม 16 ตัวอย่าง ตรวจสอบชนิดพืชอย่างถูกต้องตามหลักพฤกษอนุกรมวิธาน โดยห้องปฏิบัติการพฤกษศาสตร์ สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พบว่า คือ Derris scandens (Roxb.) Benth. ในการเตรียมสมุนไพรเถาวัลย์เปรียงเพื่อการศึกษาในครั้งนี้ ได้นำตัวอย่างลำต้นสดไปล้างด้วยน้ำให้สะอาด ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ นำไปอบให้แห้งในเตาอบร้อนไฟฟ้าที่มีพัดลมระบายอากาศ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำตัวอย่างที่แห้งแล้วไปบดเป็นผงละเอียด ผ่านแร่งเบอร์ 80 และเก็บในขวดแก้วสีชามีฝาปิดสนิท ปิดฉลากระบุชื่อสมุนไพร แหล่งที่มา วันที่เก็บ และวันที่เตรียมตัวอย่าง เก็บขวดบรรจุสมุนไพรไว้ในที่สะอาด เย็น ไม่ชื้น และอากาศถ่ายเทได้ดี

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. เตาเผาอุณหภูมิสูงรุ่น 6000 ยี่ห้อ Thermolyne® ของบริษัท Barnstead International ประเทศสหรัฐอเมริกา
6. เครื่องระเหยสุญญากาศ ประกอบด้วย Rotavapor รุ่น R-114 และอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น B-140 ของบริษัท Buchi Laboritechnik ประเทศญี่ปุ่น เครื่องทำสุญญากาศรุ่น WJ-20 ยี่ห้อ Sibata® ประเทศญี่ปุ่น และเครื่องทำน้ำเย็นหมุนเวียน รุ่น CA-101 ยี่ห้อ Eyela® ของบริษัท Tokyo Rikakikai ประเทศญี่ปุ่น
7. เครื่องแยกโครมาโทกราฟสมรรถนะสูง (HPLC) ของบริษัท Waters ประเทศสหรัฐอเมริกา ประกอบด้วยเครื่องควบคุมปั๊ม รุ่น 600, เครื่องฉีดสารตัวอย่างรุ่น 717, คอลัมน์ ยี่ห้อ Novapak® C18 ขนาด 3.9 x 150 ซม. 60 A^0 4 μm และเครื่องตรวจวัดชนิดโฟโตไดโอดแอเรย์รุ่น 2770
8. Sep-Pak C18 Cartridge และ Nylon filter ของบริษัท Waters ประเทศสหรัฐอเมริกา
9. แผ่นเคลือบซิลิกาเจลชนิด จีเอฟ 254 ขนาด 20 x 20 ซม. ความหนา 0.25 มม. ของบริษัท E. Merck ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
10. ตู้ตรวจวัดแสงที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร ของบริษัท Camag ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
11. เครื่องกรองน้ำบริสุทธิ์ (Ultra Pure Water System) ยี่ห้อ Nanopure® ของบริษัท Barnstead ประเทศสหรัฐอเมริกา
12. อ่างเสียงความถี่สูง (Sonicator bath) บริษัท Elma ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี

สารเคมี

1. สารเคมีทุกชนิดที่ใช้ในการทดลองต่างๆ 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[14] (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 กรัมใน

เอธานอล 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 โดยเตรียมทันทีก่อนใช้

วิธีการ

1. การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยปฏิกริยาการเกิดสี

(1) Frath Test: ชั่งตัวอย่าง 0.5 กรัม บรรจุในหลอดทดลองที่มีฝาเกลียวปิด เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เขย่าแรงๆ นานประมาณ 30 วินาที สังเกตฟองที่เกิดขึ้น (ตารางที่ 1)[18]

(2) Liebermann-Burchard Test: ชั่งตัวอย่าง 0.5 กรัม บรรจุในขวดแก้วก้นกลม เติมเมธานอล 10 มิลลิลิตร นำไปต้มบนอ่างอังไอน้ำเป็นเวลา 5 นาที กรอง นำสารละลายที่กรองได้ไประเหยให้แห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ สารที่ได้จากการระเหย นำไปละลายด้วยอะซีติคแอนไฮไดรด์ จำนวน 2 มิลลิลิตร แล้วค่อยๆ เติมกรดกำมะถันเข้มข้น 1 มิลลิลิตร สังเกตผลที่เกิดขึ้น (ตารางที่ 1)[18]

(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 (ตารางที่ 1)[18]

(4) Cyanidin Test: ชั่งตัวอย่าง 1.0 กรัม บรรจุในขวดแก้วก้นแบน เติมเมธานอล 10 มิลลิลิตร นำไปต้มบนอ่างอังไอน้ำนาน 5 นาที กรอง สารละลายที่กรองได้ไประเหยจนเหลือ 1 มล. นำไปเติมแผ่นแมกนีเซียม 1-2 ชิ้น และกรดเกลือจำนวน 3-4 หยด นำไปอุ่นในอ่างอังไอน้ำ สังเกตผลที่เกิดขึ้น (ตารางที่ 1)[19]

2. **การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีรงคเลขผิวบาง**

(1) การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

สกัดตัวอย่าง 1.0 กรัม ด้วยเอธานอลจำนวน 20.0 มิลลิลิตร โดยวิธีรีฟลักซ์บนอ่างอังไอน้ำนาน 20 นาที กรองขณะร้อน นำสารละลายที่กรองได้ไประเหยจนแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ละลายสารที่ได้จากการระเหยด้วยเอธานอลจำนวน 3.0 มิลลิลิตร

(2) การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ละลายสารมาตรฐาน genistein-7-*O*- [α-rhamnopyranosyl-(1→6)]-β-glucopyranoside จำนวน 5 มิลลิกรัมในเอธานอล 1 มิลลิลิตร

(3) น้ำยาแยก

เตรียมน้ำยาแยกโดยผสมคลอโรฟอร์ม เมธานอล และน้ำ ในอัตราส่วน 70 : 40 : 10 ให้เข้ากันดีในกรวยแยก ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น นำสารละลายชั้นล่างมาใส่ในถังทำโครมาโทกราฟี ทิ้งไว้อย่างน้อย 1 ชั่วโมงก่อนใช้ เพื่อให้บรรยากาศในถังอิ่มตัวด้วยน้ำยาแยก

(4) วิธีการ

ใช้หลอดรูเล็ก (capillary tube) นำสารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานชนิดละ 5 ไมโครลิตร มาแต้มบนแผ่นเคลือบซิลิกาเจลในแนวระดับเดียวกัน โดยให้ห่างจากขอบล่างของกระจกประมาณ 2 เซนติเมตรและให้มีระยะห่างระหว่างหยดของสารละลายแต่ละชนิดไม่น้อยกว่า 1 เซนติเมตร ผึ่งให้แห้ง นำไปตั้งในถังทำโครมาโทกราฟีที่เตรียมไว้ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้น้ำยาแยกซึมขึ้นไปตามผิวที่ฉาบสูง 15 เซนติเมตร นำแผ่นกระจกออกจากถัง ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำไปตรวจสอบ

(5) การตรวจสอบ

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

5.2 นำแผ่นเคลือบซิลิกาเจลไปพ่นด้วยสารละลาย 20 % กรดกำมะถันในเอธานอล ทิ้งไว้ให้แห้ง นำแผ่นเคลือบซิลิกาเจลไปทำให้ร้อนบนเตาไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที สังเกตสีที่เกิดขึ้นภายใต้แสงธรรมชาติ (ตารางที่ 3, รูปที่ 2)

3. **การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง**

(1) การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ชั่งสารตัวอย่างมา 1 กรัม ในขวดก้นกลม นำไปสกัดด้วยเมทานอล 10.0 มล. โดยใช้อ่างเสียงความถี่สูงนาน 30 นาที กรองขณะร้อน ทิ้งไว้ให้เย็น หากมีตะกอนให้กรองซ้ำ นำสารละลายที่กรองได้ 1.0 มิลลิลิตร กรองผ่าน SepPak C_{18} และตัวกรองไนลอนขนาด 0.45 ไมครอน

(2) การเตรียมสารละลายมาตรฐาน
ละลายสารมาตรฐาน genistein-7-*O*-α-rhamnopyranosyl-(1→6)]-β-βglucopyranoside จำนวน 1 มิลลิกรัมในเมธานอล 1 มิลลิลิตร

(3) น้ำยาแยก
ใช้น้ำและเมธานอลผสมกันด้วยวิธี gradient ในอัตราส่วน 35 : 65 (t = 0), 15 : 85 (t = 5) และ 0 : 100 (t = 10)

(4) อัตราเร็วของน้ำยาแยก
0.5 มิลลิลิตร / นาที

(5) ปริมาณสารที่ใช้ในการฉีด
ใช้สารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐาน ชนิดละ 2 ไมโครลิตร

(6) การตรวจสอบ
ใช้ตัวตรวจวัดชนิดโฟโตไดโอดแอเรย์ที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร สังเกต peak ที่เกิดขึ้นในโครมาโทแกรม (รูปที่ 3)

4. **ปริมาณความชื้น**
ทำตามวิธีที่กำหนดไว้ในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย[21]โดยใช้ตัวอย่างจำนวน 5 กรัม (ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน) ในการทดสอบหาค่าน้ำหนักที่สูญเสียไปเมื่ออบให้แห้ง (ตารางที่ 4)

5. **ปริมาณเถ้ารวมและปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด**
ทำตามวิธีที่กำหนดไว้ในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย[21] โดยใช้ตัวอย่างจำนวน 2 กรัม (ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน) ในการทดสอบ (ตารางที่ 4)

6. **ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ สารสกัดด้วย 50 % เอธานอล และปริมาณสารสกัดด้วย 95 % เอธานอล**
ทำตามวิธีที่กำหนดไว้ในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย[21] โดยใช้ตัวอย่างจำนวน 2 กรัม (ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน) ในการทดสอบ (ตารางที่ 4)

7. **ดัชนีการเกิดฟอง**
ทำตามวิธีที่กำหนดไว้ในหนังสือวิธีการควบคุมคุณภาพของสมุนไพรจัดทำโดยองค์การอนามัยโลก[22-23]
(ตารางที่ 4) 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 มิลลิเมตรชนิดมีฝาเกลียวปิดสนิท จำนวน 10 หลอด โดยเริ่มตั้งแต่ 1, 2, 3...10 มิลลิลิตร โดยให้ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 10 มิลลิลิตรทุกหลอด เขย่าขึ้นลงให้ได้อัตรา 30 ครั้งต่อ 15 วินาที แล้วตั้งทิ้งไว้ 15 นาที เมื่อครบเวลาให้

วัดส่วนสูงของฟอง และคำนวณดัชนีการเกิดฟองโดยใช้สูตรดังนี้
"ดัชนีการเกิดฟอง = 1000/ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบที่ทำให้เกิดฟองสูงกว่า 1 เซนติเมตร"

ผลการวิจัย

จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยปฏิกริยาการเกิดสีของเถาวัลย์เปรียง จำนวน 16 ตัวอย่าง พบว่าทุกตัวอย่างให้ผลบวกกับ Froth Test, Liebermann-Burchard Test, Fehling Test และ Cyanidin Test (ดังแสดงในตารางที่ 1) เมื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีรงคเลขผิวบางโดยใช้สารละลายเอ็นพี-พีอีจี แล้วนำไปส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร พบว่าทุกตัวอย่างให้ผลบวกกับการทดสอบสารประกอบฟลาโวนอยด์ โดยพบสารสำคัญ genistein-7-*O*- [α-rhamnopyranosyl-(1$\rightarrow$6)]-β-glucopyranoside ในทุกตัวอย่าง (ดังแสดงในตารางที่ 2 และรูปที่ 2) นอกจากนี้ การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง พบว่า สารสกัดเถาวัลย์เปรียงด้วยเมธานอลมีองค์ประกอบทางเคมีไม่น้อยกว่า 19 ชนิด และในทุกตัวอย่างตรวจพบสารสำคัญ genistein-7-*O*-[α-rhamnopyranosyl-(1$\rightarrow$6)]-β-glucopyranoside (ดังแสดงในรูปที่ 3)

ตารางที่ 1 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยปฏิกริยาการเกิดสี

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

ตารางที่ 2 ค่า hR_f และผลการตรวจสอบสารประเภทฟลาโวนอยด์ในสารสกัดด้วยเอธานอลจากเถาวัลย์เปรียง

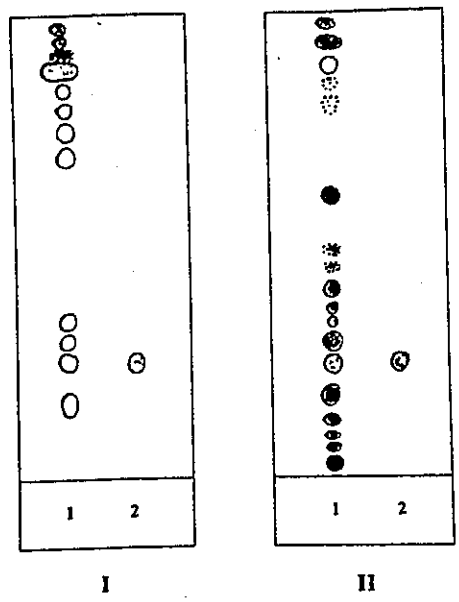
จุดสี	ค่า hR_f	การตรวจสอบด้วยการเรืองแสงภายใต้UV366 กับสารละลายเอ็นพี-พีอีจี
1	18-19	เหลือง
2 *	24	เหลือง
3	28-29	เหลือง
4	31-32	เหลือง
5	70-71	เหลือง
6	75	เหลือง
7	79-80	เหลือง
8	83-84	เหลือง
9	87-88	เหลืองเข้ม
10	89	ส้ม
11	91-92	เหลืองอมส้ม
12	96	เหลืองอมส้ม

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

ตารางที่ 3 ค่า hR_f และผลการตรวจสอบสารประกอบทางเคมีทั่วไปในสารสกัดด้วยเอธานอลจากเถาวัลย์เปรียง

จุดสี	ค่า hR_f	การตรวจสอบด้วยการเกิดสีกับสารละลาย 20 %กรดกำมะถันเมื่อได้รับความร้อน
1	2	น้ำตาลเข้ม
2	5	น้ำตาล
3	7-8	น้ำตาล
4	10-11	น้ำตาล
5	16-18	น้ำตาล
6 *	22-24	เหลือง
7	27-28	น้ำตาล
8	35-36	น้ำตาล
9	37-38	น้ำตาล
10	40-41	น้ำตาล
11	42	น้ำตาล
12	44-45	น้ำตาล
13	58-59	น้ำตาล
14	80	น้ำตาลอ่อน
15	81-83	น้ำตาลอ่อน
16	87-88	เหลือง
17	92-93	น้ำตาล
18	96-97	น้ำตาล

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

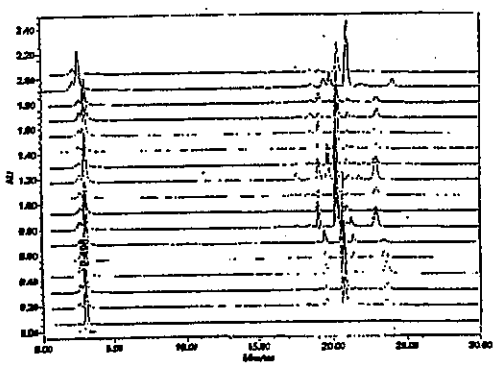


รูปที่ 2 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีรงคเลขผิวบางของสารสกัดด้วยเอธานอลจากเถาวัลย์เปรียง เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน เมื่อใช้สารละลายผสมคลอโรฟอร์ม : เมธานอล : น้ำ ในอัตราส่วน 70 : 40 : 10 เป็นน้ำยาแยก ตรวจสอบด้วยสารละลาย เอ็นพี-พีอีจี (รูป I) หรือตรวจสอบด้วยสารละลายกรดกำมะถัน 20 % เมื่อได้รับความร้อน (รูป II)

1 = สารสกัดด้วยเอธานอลจากเถาวัลย์เปรียง

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

( ) = จุดสีที่พบในบางตัวอย่าง



รูปที่ 3 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูงของสารสกัดด้วยเมธานอลจากเถาวัลย์เปรียงเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน โดยใช้ น้ำ : เมธานอล ในอัตราส่วน 35 : 65 ถึง 0: 100 เป็นน้ำยาแยก และใช้คอลัมน์ Novapak® C18 (ขนาด 3.9 x 150 ซม. 60 A° 4 μm)

การทดสอบคุณสมบัติทั่วไปทางกายภาพและทางเคมีของเถาวัลย์เปรียง ทำโดยการวิเคราะห์หาปริมาณเถ้ารวม ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ ปริมาณสารสกัดด้วย 50 % เอธานอล ปริมาณสารสกัดด้วย 95 % เอธานอล ปริมาณความชื้น และดัชนีการเกิดฟอง พบว่า มีค่าเฉลี่ยดังนี้ 6.48 ± 0.80, 0.12 ± 0.06, 16.16 ± 1.48, 15.96 ± 1.87, 7.21 ± 0.90, 6.35 ± 0.94 และ 238 ± 22 ตามลำดับ ซึ่งค่าเฉลี่ยดังกล่าว และเกณฑ์ที่ใช้ในการกำหนดได้แสดงไว้ในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการประเมินคุณภาพทางเคมีและกายภาพของเถาวัลย์เปรียง

รายการ	ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนเฉลี่ย ($\bar{x}$ ± S.D., n = 16)	เกณฑ์กำหนดค่าบน ($\bar{x}$ + 10 %)	เกณฑ์กำหนดค่าล่าง ($\bar{x}$ - 10 %)
ปริมาณเถ้ารวม	6.48 ± 0.80	8	-
ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด	0.12 ± 0.06	1	-
ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ	16.16 ± 1.48	-	14
ปริมาณสารสกัดด้วย 50 % เอธานอล	15.96 ± 1.87	-	14
ปริมาณสารสกัดด้วย 95 % เอธานอล	7.21 ± 0.99	-	6
ปริมาณความชื้น	6.35 ± 0.94	7	-
ดัชนีการเกิดฟอง	238 ± 22	-	200

วิจารณ์

จากการตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีของตัวอย่างลำต้นแห้งของเถาวัลย์เปรียง ซึ่งเก็บจากแหล่งธรรมชาติต่าง ๆ ในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลางของประเทศไทย จำนวน 16 ตัวอย่าง พบว่า ทุกตัวอย่างให้ผลเหมือนกันในการทดสอบด้วยปฏิกริยาการเกิดสี ดังนี้ ตรวจพบสารประเภทซาโปนินโดยใช้ Froth Test ตรวจพบสารประเภทเทอร์ปีนส์โดยใช้ Liebermann-Burchard Test ตรวจพบสารประเภทน้ำตาลที่สูญเสียอิเล็กตรอนได้ง่ายโดยใช้ Fehling Test และตรวจพบสารประเภทฟลาโวนอยด์โดยใช้ Cyanidin Test การทดสอบยืนยันผลเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีรงคเลขผิวบาง โดยพ่นด้วยสารละลายเอ็นพี (Natural Products)-พีอีจี (Polyethylene Glycol) แล้วนำไปส่องดูการเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร สามารถตรวจพบสารประเภทฟลาโวนอยด์จำนวน 11-12 ชนิด หากทดสอบโดยการพ่นด้วยสารละลายกรดกำมะถัน 20 % แล้วนำไปอบให้ร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วดูภายใต้แสงธรรมชาติ ตรวจพบองค์ประกอบทางเคมีจำนวน 16 - 18 ชนิด ซึ่งการทดสอบยืนยันผลทั้งสองวิธี ตรวจพบ genistein-

7-*O*- [α-rhamnopyranosyl-(1→6)]-β-glucopyranoside ในสารสกัดด้วยเอธานอลของเถาวัลย์เปรียงทุกตัวอย่าง สำหรับการทดสอบสารสกัดเถาวัลย์เปรียงด้วยเมธานอลโดยวิธีโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง (HPLC) พบว่า มี genistein-7-*O*-[α-rhamnopyranosyl-(1→6)]-β-glucopyranoside เป็นองค์ประกอบโดยมีค่า Retention time (T_R) ที่ 2.5 นาที ดังแสดงในรูปที่ 3

การประเมินคุณภาพของสมุนไพรตามมาตรฐานสากลนั้น นอกจากการตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีแล้ว ยังต้องตรวจคุณภาพทางกายภาพและทางเคมีด้วย โดยการตรวจวิเคราะห์ปริมาณเถ้ารวม ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ ปริมาณสารสกัดด้วย 50 % เอธานอล ปริมาณสารสกัดด้วย 95 % เอธานอล ปริมาณความชื้น และดัชนีการเกิดฟอง[21-23] ปริมาณความชื้นของสมุนไพรแห้งไม่อนุญาตให้มีค่าเกินกว่าเกณฑ์ที่กำหนด หากสมุนไพรมีความชื้นสูง จะเป็นผลให้สมุนไพรมีคุณภาพต่ำ และเสื่อมคุณภาพเร็ว ซึ่งเป็นผลจากการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีของสารประกอบเคมีในตัวสมุนไพรเอง เช่น การสลายตัวด้วยน้ำ (hydrolysis) หรือความเสี่ยงจากการปนเปื้อนด้วยเชื้อจุลินทรีย์ เชื้อรา หรือแมลงในสมุนไพรจะเกิดขึ้นได้ง่าย[23] เป็นต้น สำหรับปริมาณเถ้ารวมนั้น เป็นดัชนีหนึ่งในการกำหนดคุณภาพทางกายภาพของสมุนไพร ในขณะที่ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรดเป็นดัชนีแสดงถึงการปนเปื้อนจากสารที่เหลือจากการเผาไหม้ในกรด เช่น หิน หรือ ทราย ซึ่งมีซิลิกาเป็นองค์ประกอบ เป็นต้น[23] ค่าต่างๆ เหล่านี้จะเป็นประโยชน์ในการตรวจสอบคุณภาพของสมุนไพรดังกล่าว นอกจากนี้ ค่าสารสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ที่เหมาะสม เป็นอีกดัชนีหนึ่งที่จะบ่งชี้คุณภาพของสารสำคัญในสมุนไพร หากสมุนไพรนั้นยังไม่ทราบสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ หรือยังไม่มีวิธีวิเคราะห์สารสำคัญที่เหมาะสม[23] เนื่องจากสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และวิธีการใช้สมุนไพรชนิดนี้ในตำรายาไทย มักใช้ตัวทำละลายที่มีความเป็นขั้วสูง ดังนั้น การศึกษาวิจัยนี้ จึงวิเคราะห์หาปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ ปริมาณสารสกัดด้วย 50% เอธานอล และปริมาณสารสกัดด้วย 95% เอธานอลส่วนค่าดัชนีการเกิดฟองแสดงถึงปริมาณสารประเภทซาโปนินในสมุนไพร เนื่องจากสารประกอบซาโปนินมีคุณสมบัติเฉพาะตัวคือเกิดฟองที่คงทนเมื่อเขย่ากับน้ำ

ผลการศึกษาวิจัยนี้ ทำให้สามารถจัดทำข้อกำหนดคุณภาพเบื้องต้นของสมุนไพรชนิดนี้ ส่วนการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ในสมุนไพรนั้น คณะผู้วิจัยจะดำเนินการต่อไป เนื่องจากสมุนไพรชนิดนี้มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายประการ จึงจำเป็นต้องเลือกใช้สารมาตรฐานที่เหมาะสม และสามารถใช้เป็นดัชนีในการบ่งชี้ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น ฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ลดความดันโลหิต เป็นต้น สำหรับการศึกษาวิจัยเถาวัลย์เปรียงต่อไปในอนาคต คณะผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาสารสำคัญที่แสดงฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน ซึ่งพบว่า สารสกัดเถาวัลย์เปรียงด้วยเอธานอล เมื่อถูกนำมาแยกได้สารประกอบกลุ่มต่างๆ ในเบื้องต้นพบว่า สารประกอบไอโซฟลาโวนกลัยโคไซด์ ได้แก่ genistein-7-*O*-[α-rhamnopyranosyl-(1→6)]-β-glucopyranoside ที่แยกได้จากสารสกัดเถาวัลย์เปรียงนั้น มีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันได้บ้างแต่น้อยกว่าสารสกัดเถาวัลย์เปรียงด้วย 50 % เอธานอลซึ่งเป็นสารตั้งต้น แสดงว่าสารที่ออกฤทธิ์ดังกล่าว น่าจะเป็นสารชนิดอื่น ดังนั้น จึงเห็นควรดำเนินการศึกษาวิจัยในการแยกหาสารบริสุทธิ์ที่เป็นสารออกฤทธิ์ต่อไป

สรุปผลการทดลอง

ผลการศึกษา แสดงให้เห็นว่า ลำต้นแห้งของเถาวัลย์เปรียงประกอบด้วยสารประเภทซาโปนิน น้ำตาลกลุ่มที่สูญเสียอิเล็กตรอนได้ง่าย เทอร์ปีนส์ และฟลาโวนอยด์ จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีรงคเลขผิวบาง และวิธีโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง พบว่า เถาวัลย์เปรียงทุกตัวอย่างมี genistein-7-*O*- [α-rhamnopyranosyl-(1$\rightarrow$6)]-β-glucopyranoside ซึ่งเป็นสารประเภทไอโซฟลาโวนกลัยโคไซด์ที่ตรวจพบในสารสกัดเถาวัลย์เปรียงด้วยเอธานอล ดังนั้น เพื่อประโยชน์ในการควบคุมคุณภาพทางเคมีและกายภาพของสมุนไพรชนิดนี้ จึงได้กำหนดเกณฑ์สูงสุด โดยกำหนดค่าบน จากค่าเฉลี่ยบวกด้วย 10 % สำหรับปริมาณที่ระบุว่า "ไม่เกิน" และเกณฑ์ต่ำสุดโดยกำหนดค่าล่างจากค่าเฉลี่ยลบด้วย 10 % สำหรับปริมาณที่ระบุว่า "ไม่น้อยกว่า" ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 สรุปผลข้อกำหนดคุณภาพของเถาวัลย์เปรียง

รายการ	ไม่เกิน	ไม่น้อยกว่า
ปริมาณเถ้ารวม (% โดยน้ำหนัก)	8	-
ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (% โดยน้ำหนัก)	1	-
ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ (% โดยน้ำหนัก)	-	14
ปริมาณสารสกัดด้วย 50 % เอธานอล (% โดยน้ำหนัก)	-	14
ปริมาณสารสกัดด้วย 95 % เอธานอล (% โดยน้ำหนัก)	-	6
ปริมาณความชื้น (% โดยน้ำหนัก)	7	-
ดัชนีการเกิดฟอง	-	200

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ดร. บุษราวรรณ ศรีวรรธนะ ห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันแบบอาศัยเซลล์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ทดสอบฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อุทัย โสธนะพันธุ์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่ให้ความอนุเคราะห์พิสูจน์โครงสร้างของสารมาตรฐาน รวมทั้งผู้ร่วมงานทุกท่านในห้องปฏิบัติการพฤกษเคมี สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

เอกสารอ้างอิง

1. เต็ม สมิตินันท์. ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย, พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร : บริษัท ประชาชน จำกัด, 2544 : 184.
2. พเยาว์ เหมือนวงศ์ญาติ. สมุนไพรก้าวใหม่ (แก้ไขปรับปรุงใหม่จากตำราวิทยาศาสตร์สมุนไพร), พิมพ์ครั้งที่ 2 กรุงเทพมหานคร : บริษัท ที.พี. พริ้นท์ จำกัด, 2537 : 86-87.
3. สมาคมสมุนไพรแห่งประเทศไทย. งานนิทรรศการสมุนไพร ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร : ศรีเมืองการพิมพ์, 2519 : 81-83.
4. สมาคมโรงเรียนแพทย์แผนโบราณ. สำนักวัดพระเชตุพนฯ (วัดโพธิ์) ท่าเตียน พระนคร. ประมวลสรรพคุณยาไทย ภาค 2. 2510 : 137-138.
5. Rao MN, Krupadanam GLD, Srimannarayana G. Four isoflavones and two 3-aryl coumarins from stems of Derris scandens. Phytochem 1994 ; 37 (1) : 267-269.
6. 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.
7. Sekine T, Inagaki M, Ikegami F, Fuji Y, Ruangrungsi N. Six deprenylisoflavones, derrisisoflavones A-F, from Derris scandens. Phytochem. 1999 ; 52 (1) : 87-94.
8. Rukachaisirikul V, Sukpondma Y, Jansakul C, Taylor WC. Isoflavone glycosides from Derris scandens. Phytochem. 2002 ; 60(8) : 827-834.
9. Dianpeng L, Mingan O, Jansakul C, Chongren Y. Two isoflavonoid glycosides from Derris scandens. Yaoxue Xuebao. 1999; 34 : 43-45.
10. Laupattarakasem P, Houghton PJ, Hoult JR. Anti-inflammatory isoflavonoids from the stems of Derris scandens. Planta Med. 2004 ; 70 (6) : 496-501.
11. 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.
12. Senegupta P, Das PB, and Saha SK. Triterpenes from Derris scandens (Roxb.) Benth. J Indian Chem Soc.1971 ; 48 (1) : 95-96.
13. 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 Ethanopharmacol. 2003 ; 85 (2-3) : 207-215.

14. Jansakul C, Srichanbarn A, and Saelee A. Some pharmacological studies of a hypotensive fraction from Derris scandens. J. Sci. Soc. Thailand. 1997 ; 23 : 323-334.

15. 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.

16. นันทวัน บุณยะประภัศร และ อรนุช โชคชัยเจริญพร. สมุนไพรไม้พื้นบ้าน (2). กรุงเทพมหานคร : บริษัท ประชาชน จำกัด,2541 : 290-291.

17. 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.

18. Faculty of Pharmacy, Mahidol University. Specification of Thai Medicinal Plants. 1992 ; 1 : 64-67.

19. กฤษณพันธ์ ว. พฤกษเคมีเบื้องต้น. ใน จิรัจ ฉริยากูล. ว, บรรณาธิการ ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ, พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล : 2534 : 4.3.

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

21. Thai Herbal Pharmacopoeia. Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. 2000 ; 2 : 137-138,141-142.

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

23. WHO/Pharm. Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials. 92.559. 1992.