คุณภาพทางเคมี ของสมุนไพร (เล่ม 1)

สถาบันวิจัยสมุนไพร
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
กระทรวงสาธารณสุข

คุณภาพทางเคมี ของสมุนไพร (เล่ม 1)

สถาบันวิจัยสมุนไพร
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
กระทรวงสาธารณสุข

ที่ปรึกษา	นายแพทย์ไพจิตร์ วราชิต	อธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
	นายแพทย์พงศ์พันธ์ วงศ์มณี	รองอธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะบรรณาธิการ	ปราณี ชวลิตธำรง	
	ธิดารัตน์ บุญรอด	
คณะผู้นิพนธ์	ปราณี ชวลิตธำรง	
	ธิดารัตน์ บุญรอด	
	ประไพ วงศ์สินคงมั่น	
	จารีย์ บันสิทธิ์	
	ทวีผล เดชาติวงศ์ ณ อยุธยา	
	เย็นจิตร เตชะดำรงสิน	
	วารุณี จิรวัฒนาพงศ์	
	ดวงเพ็ญ ปัทมดิลก	
	ปัทมาวดี เสตะกัณณะ	
ประสานการจัดพิมพ์	สุธิดา ไชยราช	
	ฐตินภา นุ่มใส	
ถ่ายภาพ	ฐตินภา นุ่มใส	
ISBN	978974-8455-93-8	
เจ้าของลิขสิทธิ์	สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	
	กระทรวงสาธารณสุข นนทบุรี	
	โทร. 02-589-9866, 02-951-0491	
พิมพ์ครั้งที่ 1	จำนวน 1,000 เล่ม มีนาคม 2550	
ออกแบบ	บริษัท 1241 มิราคูลัส จำกัด	
พิมพ์ที่	โรงพิมพ์สำนักงานพระพุทธศาสนาแห่งชาติ	

คำนำ

ปัจจุบันได้มีการนำสมุนไพรมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพกันอย่างกว้างขวาง ทั้งในรูปแบบเป็นยา อาหาร เครื่องดื่มบำรุงสุขภาพ และเครื่องสำอาง กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ในฐานะที่เป็นหน่วยงานหลักด้านการวิจัยและวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์สุขภาพด้านสมุนไพรของกระทรวงสาธารณสุขทำหน้าที่สนับสนุนการผลิตผลิตภัณฑ์ที่ปลอดภัยและมีคุณภาพได้มาตรฐาน ได้เล็งเห็นความสำคัญในการพัฒนาคุณภาพของสมุนไพรและผลิตภัณฑ์โดยสถาบันวิจัยสมุนไพร ได้ดำเนินการศึกษาวิจัยจัดทำข้อกำหนดมาตรฐานของสมุนไพรไทย เพื่อใช้เป็นแนวทางในการควบคุมเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพดี มีความสม่ำเสมอและมีความปลอดภัยสำหรับผู้บริโภค เนื่องจากสมุนไพรจะมีประสิทธิผล ต้องมีปริมาณสารสำคัญหรือตัวยาสำคัญในความเข้มข้นที่เหมาะสม

หนังสือ “คุณภาพทางเคมีของสมุนไพร เล่ม 1” ที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์จัดทำขึ้นโดยรวบรวมรายงานผลการวิจัยด้านคุณภาพทางเคมีของสมุนไพรและสารสกัด ได้แก่ กระชายดำ เถาวัลย์เปรียง ขมิ้นเครือ หญ้าหนวดแมว ปัญจขันธ์ หว้า และ แมงลักคา จำนวน 10 เรื่อง ซึ่งได้ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการต่างๆ นำมารวบรวมให้เป็นรูปเล่ม เพื่อให้บุคลากรสาธารณสุข ผู้ประกอบการด้านสมุนไพร และผู้สนใจทั่วไปได้ศึกษา ค้นคว้า และนำไปประกอบการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสมุนไพร

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์หวังเป็นอย่างยิ่งว่า หนังสือ “คุณภาพทางเคมีของสมุนไพร เล่ม 1” จะเป็นประโยชน์ ต่อนักวิชาการ ผู้ประกอบการด้านสมุนไพร ผู้สนใจทั่วไป ในการพัฒนาเพื่อยกระดับคุณภาพผลิตภัณฑ์สมุนไพรไทยให้ได้มาตรฐานสากล เพื่อให้สมุนไพรไทยเป็นที่ยอมรับในต่างประเทศ อันจะนำไปสู่การสร้างรายได้ที่ยั่งยืนแก่ชุมชน

(นายแพทย์ไพจิตร์ วราชิต)
อธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
มีนาคม 2550

สารบัญ

บทนำ	(ก)
การควบคุมคุณภาพและกำหนดมาตรฐานสมุนไพร	1
การเตรียมสารสกัดจากสมุนไพร	9
การประเมินคุณภาพของวัตถุดิบและน้ำมันหอมระเหยของเหง้ากระชายดำ	11
การศึกษาการควบคุมคุณภาพของลำต้นขมิ้นเครือ	31
ข้อกำหนดทางเคมีและกายภาพของเถาวัลย์เปรียง	49
คุณภาพทางเคมีของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงใน 50% เอทานอล	65
ข้อกำหนดทางเคมีของสมุนไพรปัญจขันธ์	81
ข้อกำหนดทางเคมีของส่วนเหนือดินแมงลักคา	95
ข้อกำหนดทางเคมีของหญ้าหนวดแมว	113
การศึกษาคุณภาพของสมุนไพรใบหว้า	129

berberine

berberine

berberine

บทนำ

การประเมินคุณภาพทางเคมีของสมุนไพรไทยในการศึกษาวิจัยนี้ ประกอบด้วยส่วนที่เป็นวัตถุดิบและสารสกัดจากสมุนไพร โดยเป็นวัตถุดิบของสมุนไพร 6 ชนิด ได้แก่ หว้า กระชายดำ เถาวัลย์เปรียง หญ้าหนวดแมว ปัญจขันธ์ และแมงลักคา ส่วนสารสกัดมี 2 ชนิด ได้แก่ สารสกัดเถาวัลย์เปรียงใน 50%เอทานอล และน้ำมันหอมระเหยจากเหง้ากระชายดำ ซึ่งวัตถุประสงค์หลักของการศึกษาวิจัยเพื่อใช้เป็นส่วนหนึ่งของการกำหนดคุณภาพมาตรฐาน ในการควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์ ทั้งนี้ การจัดทำข้อกำหนดคุณภาพมาตรฐานของสมุนไพรหากสมุนไพรชนิดใด มีข้อกำหนดในเภสัชตำรับของประเทศต่าง ๆ หรือในตำรามาตรฐานยาสมุนไพร (Thai Herbal Pharmacopoeia) ก็สามารถดำเนินการกำหนดได้ แต่หากสมุนไพรชนิดใดยังไม่มีการจัดทำข้อกำหนดคุณภาพมาตรฐานไว้ จำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องศึกษาวิจัยเพื่อจัดทำข้อกำหนดคุณภาพมาตรฐานของสมุนไพรชนิดนั้น ๆ ไว้

โดยทั่วไปข้อกำหนดคุณภาพจะครอบคลุมเนื้อหาเกี่ยวกับบทนิยามการตรวจสอบคุณลักษณะ การตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมี การตรวจสอบความบริสุทธิ์ (สิ่งแปลกปลอม ปริมาณสารสกัดด้วยตัวทำละลาย ปริมาณความชื้น ปริมาณเถ้า การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ การปนเปื้อนด้วยสารหนูและโลหะหนัก การปนเปื้อนด้วยสารพิษตกค้าง) และการเก็บรักษา

ดังนั้นเนื้อหาการศึกษาวิจัย “คุณภาพทางเคมีของสมุนไพรไทย เล่ม 1” จึงจัดว่าเป็นส่วนหนึ่งของข้อมูลที่จะนำไปใช้ประโยชน์ในการจัดทำข้อกำหนดคุณภาพมาตรฐานของสมุนไพรไทยต่อไป โดยมีรายละเอียดแนวทางในการดำเนินการดังนี้

ในการควบคุมคุณภาพทางเคมีของวัตถุดิบสมุนไพรจำเป็นต้องหาปริมาณน้ำหรือความชื้น ปริมาณสารสกัดในตัวทำละลายที่เหมาะสม รวมทั้งปริมาณเถ้ารวมและเถ้าที่ไม่ละลายในกรด ข้อกำหนดที่บ่งบอกถึงคุณสมบัติที่เฉพาะตัวของกลุ่มสารเคมี เช่น กลุ่มสารซาโปนินจะหาค่าดัชนีการเกิดฟอง ตลอดจนปริมาณสารสำคัญ นอกจากนี้ ต้องมีการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีเพื่อตรวจสอบสารสำคัญ โดยทั่วไป พืชสดมีน้ำอยู่ประมาณร้อยละ 70-80 เมื่อทำให้แห้ง จะช่วยลดปริมาณน้ำที่มีอยู่ในสมุนไพร ดังนั้น จะทำให้กระบวนการสลายด้วยน้ำหรือไฮโดรไลซิสลดลง ซึ่งช่วยป้องกันการเสื่อมคุณภาพและเป็นการถนอมอายุของสมุนไพร สมุนไพรที่แห้งแล้วควรบรรจุในภาชนะทึบแสง และเก็บรักษาในที่สะอาด เย็น ไม่ชื้น และอากาศถ่ายเทได้ดี รวมทั้งมีการนำออกตากแดด หรืออบทุก 2-3 เดือน โดยทั่วไปควรใช้สมุนไพรภายใน 1 ปี นอกจากนี้ ยังขึ้นกับชนิดของสมุนไพรด้วย เช่น สมุนไพรที่มีสารสำคัญประเภทน้ำมันหอมระเหย จะเสื่อมเร็วกว่าเป็นต้น ในเภสัชตำรับกำหนดมาตรฐานความชื้นของวัตถุดิบไว้ เพื่อควบคุมคุณภาพให้เหมาะสม ป้องกันการเสื่อมคุณภาพเร็วทั้งที่เกิดจากกระบวนการทางเคมีของเอ็นไซม์ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารสำคัญ รวมทั้งการสลายด้วยน้ำ (hydrolysis) และการเติบโตของเชื้อราหรือจุลินทรีย์ที่มีการปนเปื้อนในวัตถุดิบ การทดสอบหาปริมาณความชื้นทำได้ 2 วิธี คือการกลั่นด้วยโทลูอีน (azeotropic method) ซึ่งมักนิยมใช้ในกรณีที่วัตถุดิบมีน้ำมันหอมระเหยหรือสารที่ระเหยได้อยู่ หรือการอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสจนน้ำหนักคงที่ (gravimetric method/

loss on drying) ในกรณีที่สมุนไพรไม่มีน้ำมันหอมระเหยหรือสารที่ระเหยได้ สำหรับการหาปริมาณสารสกัดในตัวทำละลายที่เหมาะสม เป็นการตรวจสอบคุณภาพของวัตถุดิบ ในกรณีที่ยังไม่มีวิธีที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ โดยตัวทำละลายที่เหมาะสม คือ ตัวทำละลายที่ความจำเพาะในการสกัดเอาสารสำคัญออกจากสมุนไพรได้ เนื่องจากสารประกอบทางเคมีในพืชมีอยู่หลายชนิด การเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สามารถสกัดเอาสารเคมีทุกกลุ่มออกมาได้จึงเป็นไปได้ยาก การเลือกใช้ตัวทำละลายมาสกัดสมุนไพร จึงพิจารณาค้นคว้าจากภูมิปัญญาพื้นบ้าน เช่น การต้มเอาน้ำดื่ม หรือการดองสุรา หรือพิจารณาจากกลุ่มสารออกฤทธิ์ว่ามีความเป็นขั้วมากหรือน้อย โดยทั่วไป หากใช้ตามภูมิปัญญาพื้นบ้านมักเป็นกลุ่มสารออกฤทธิ์ที่มีความเป็นขั้วสูง จึงใช้น้ำหรือเอทานอล หรือตัวทำละลายผสมระหว่างน้ำกับเอทานอลเป็นตัวทำละลายเพื่อสกัดแยกสารเคมีที่เป็นสารออกฤทธิ์หรือสารสำคัญตามต้องการออกจากสมุนไพรให้ได้มากที่สุด ส่วนการหาปริมาณเถ้ารวมและเถ้าที่ไม่ละลายในกรด เพื่อตรวจสอบว่ามีสิ่งปนปลอมของสิ่งที่ไม่ต้องการอยู่มากน้อยเพียงใด การหาเถ้ารวมเป็นการทดสอบเพื่อหาปริมาณของสารที่เหลืออยู่จากการเผาผงยาที่อุณหภูมิไม่เกิน 450 องศาเซลเซียส เถ้ารวมจะเกิดได้จากทั้งส่วนของเนื้อเยื่อพืชเองและจากสิ่งปนเปื้อนที่ติดมากับพืช เช่น ดิน ส่วนเถ้าที่ไม่ละลายในกรดเป็นการหาเถ้าที่ไม่ละลายในกรดเกลือเจือจาง ค่าที่ได้จะบอกถึงการมีสารประเภทซิลิกาอยู่ เช่น ทราย ในขณะที่การตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีและการหาปริมาณสารสำคัญถือเป็นหัวใจสำคัญในการควบคุมคุณภาพ เนื่องจากเป็นการทดสอบว่าวัตถุดิบสมุนไพรที่นำมาใช้นั้น มีองค์ประกอบทางเคมีที่เหมือนกันหรือต่างกันอย่างไร รวมทั้งมีสารสำคัญที่ต้องการอยู่หรือไม่ ในปริมาณเท่าใด ในการตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีจะทดสอบโดยใช้ปฏิกิริยาการเกิดสีซึ่งเป็นการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาประเภทของสารเคมีที่มีอยู่ในสมุนไพร ส่วนการตรวจสอบชนิดขององค์ประกอบทางเคมีนิยมใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟฟี เช่น โครมาโตกราฟฟีผิวบาง (TLC) โครมาโตกราฟฟีสมรรถนะสูง (HPLC) แก๊สโครมาโตกราฟฟี (GC) เป็นต้น เพื่อเปรียบเทียบโครมาโตแกรมของตัวอย่างที่ทดสอบกับตัวอย่างจริง (authentic) และสารมาตรฐาน (reference standard) นอกจากนี้ สมุนไพรที่มีวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในการศึกษาวิจัยที่รวบรวมไว้ในเล่มนี้ ได้แก่ สมุนไพรปัญจขันธ์ ซึ่งใช้วิธีที่เหมาะสมเพื่อสกัดปริมาณสารซาโปนินรวมซึ่งเป็นสารสำคัญและหาโดยใช้วิธีกราวิเมตริก สำหรับจำนวนตัวอย่างที่เลือกเป็นตัวแทนในการศึกษาวิจัยเพื่อควบคุมคุณภาพวัตถุดิบ โดยทั่วไปนิยมใช้ตัวอย่าง อย่างน้อย 5 ตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ ในระยะเวลาต่างกัน ซึ่งในการศึกษาเพื่อจัดทำข้อกำหนดทางเคมีของสมุนไพรโดยสถาบันวิจัยสมุนไพร มักใช้อย่างน้อย 15 ตัวอย่างเป็นตัวแทน เพื่อให้วัตถุดิบสมุนไพรมีความหลากหลายมากขึ้น และนำผลการศึกษาที่ได้ไปใช้ควบคุมคุณภาพทางเคมี และจัดทำข้อกำหนดทางเคมีเพื่อเป็นมาตรฐานได้อย่างเหมาะสม

สำหรับการศึกษาคุณภาพทางเคมีของสารสกัดจากสมุนไพร ในส่วนที่เป็นสารสกัดที่อยู่ในรูปผงแห้ง ได้แก่ สารสกัดเถาวัลย์เปรียงใน 50%เอทานอล ควบคุมคุณภาพโดยการหาปริมาณสารสกัดในตัวทำละลายที่เหมาะสม (แต่จะไม่หาปริมาณเถ้า เนื่องจากมีการสกัดเอาสารสำคัญที่ต้องการออกมาอยู่ในรูปของสารละลายที่เป็นของเหลวแล้ว) และทดสอบเอกลักษณ์ทางเคมี เพื่อดูความแตกต่างขององค์ประกอบทางเคมี รวมทั้งร้อยละของผลผลิต เพื่อศึกษาว่า

กระบวนการสกัดแต่ละครั้งมีความสม่ำเสมอหรือไม่ เนื่องจากมีระยะเวลาที่จำกัดในการศึกษา เพื่อควบคุมคุณภาพทางเคมีของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงใน 50% เอทานอล จึงใช้ตัวอย่างสารสกัดเป็นตัวแทนมาศึกษาจำนวน 9 ตัวอย่าง เพื่อเป็นเกณฑ์เบื้องต้นในการประเมินคุณภาพทางเคมีของสารสกัดดังกล่าว ส่วนสารสกัดเหง้ากระชายดำที่นำมาศึกษาในรูปของน้ำมันหอมระเหยได้ประเมินคุณภาพทั้งทางเคมีและกายภาพ โดยใช้ 18 ตัวอย่าง สำหรับการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ ตรวจสอบโดยใช้อวัยวะความรู้สึก (organoleptic method) เพื่อศึกษาลักษณะของตัวอย่าง ค่าการละลาย (solubility) ค่าดัชนีหักเห (refractive index) และความหนาแน่นสัมพัทธ์ (relative density) ส่วนการประเมินคุณภาพทางเคมี จะใช้การตรวจเอกลักษณ์ทางเคมี ได้แก่ ปฏิกิริยาการเกิดสี และเทคนิคทางโครมาโตกราฟฟีที่เหมาะสม เช่น โครมาโตกราฟฟีผิวบาง (TLC) หรือแก๊สโครมาโตกราฟฟี (GC) เป็นต้น

ตามที่ได้กล่าวไว้แล้ว ผลการศึกษาวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งในความพยายามของสถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในการพัฒนาอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์สมุนไพรให้มีคุณภาพเป็นที่เชื่อถือแก่ผู้บริโภค เพื่อนำข้อมูลดังกล่าวไป ใช้ประโยชน์เร่งรัดการจัดทำตำรามาตรฐานสมุนไพรไทย เพื่อใช้เป็นมาตรฐานอ้างอิงของประเทศต่อไปและหวังเป็นอย่างยิ่งที่จะได้รับการสนับสนุนและความร่วมมือจากผู้วิจัยทั้งภาครัฐ ภาคเอกชน ขยายผลให้ครอบคลุมสมุนไพรไทยได้มากยิ่งขึ้น อันจะส่งผลประโยชน์โดยส่วนรวมให้แก่ประเทศชาติ

บรรณานุกรม

1. Thai Herbal Pharmacopoeia. Vol. 1. Bangkok: Department of Medical Sciences, Public Health Ministry. 1995.
2. Thai Herbal Pharmacopoeia. Vol. 2. Bangkok: Department of Medical Sciences, Public Health Ministry. 2000.
3. World Health Organization. Quality control methods for medicinal plant materials. 1998. *(http://www.who.int/medicines/library/trm/medicinalplants/qualcontrolmethods.html)*
4. ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ. ใน: ว. จิรัจฉริยากูล. ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 2534, หน้า 10-19.

ตารางสรุปข้อกำหนดทางเคมีของสมุนไพรไทยในการศึกษาวิจัย

ลำดับที่	ข้อกำหนดทางเคมี	ขมิ้นเครือ	กระชายดำ	เถาวัลย์เปรียง	น้ำมันกระชายดำ	สารสกัดเถาวัลย์เปรียงใน 50% เอทานอล
1	เอกลักษณ์ทางเคมี	พบ berberine และ palmatine	พบ borneol	พบ genistein-7-O-[α-rhamnopyranosyl-(1→6)]-β-glucopyranoside	พบ borneol	พบ genistein-7-O-[α-rhamnopyranosyl-(1→6)]-β-glucopyranoside
2	ปริมาณความชื้น	ไม่มากกว่า 10% โดยน้ำหนัก	ไม่มากกว่า 10% โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก	ไม่มากกว่า 7% โดยน้ำหนัก	–	ไม่มากกว่า 6% โดยน้ำหนัก
3	ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ	ไม่น้อยกว่า 7% โดยน้ำหนัก	ไม่น้อยกว่า 17% โดยน้ำหนัก	ไม่น้อยกว่า 14% โดยน้ำหนัก	–	ไม่น้อยกว่า 67% โดยน้ำหนัก
4	ปริมาณสารสกัดด้วย 50% เอทานอล	–	–	ไม่น้อยกว่า 14% โดยน้ำหนัก	–	ไม่น้อยกว่า 79% โดยน้ำหนัก
5	ปริมาณสารสกัดด้วย 95% เอทานอล	ไม่น้อยกว่า 4% โดยน้ำหนัก	ไม่น้อยกว่า 8% โดยน้ำหนัก	ไม่น้อยกว่า 6% โดยน้ำหนัก	–	–
7	ดัชนีการเกิดฟอง	–	–	ไม่น้อยกว่า 200	–	ไม่น้อยกว่า 333
8	ปริมาณเถ้ารวม	ไม่มากกว่า 3% โดยน้ำหนัก	ไม่มากกว่า 6% โดยน้ำหนัก	ไม่มากกว่า 8% โดยน้ำหนัก	–	–
9	ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด	ไม่มากกว่า 1% โดยน้ำหนัก	ไม่มากกว่า 2% โดยน้ำหนัก	ไม่มากกว่า 1% โดยน้ำหนัก	–	–
10	ความเป็นกรด-ด่าง	–	–	–	–	4.5-5.5
11	ค่าดัชนีหักเห	–	–	–	1.471-1.476	–
12	ความหนาแน่นสัมพัทธ์	–	–	–	0.980-0.983	–
13	ปริมาณสารสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม	ไม่น้อยกว่า 1% โดยน้ำหนัก	–	–	–	–
14	ปริมาณเบอเบอรีน	ไม่น้อยกว่า 2.5% โดยน้ำหนัก	–	–	–	–

ตารางสรุปข้อกำหนดทางเคมีของสมุนไพรไทยในการศึกษาวิจัย

ลำดับที่	ข้อกำหนดทางเคมี	ปัญจขันธ์	แมงลักคา	หญ้าหนวดแมว ส่วนเหนือดิน	ใบหญ้าหนวดแมว	ใบหว้า
1	เอกลักษณ์ทางเคมี	พบ saponins	พบ ursolic acid	พบ caffeic acid, rosmarinic acid, ursolic acid	พบ caffeic acid, rosmarinic acid, ursolic acid	พบ betulinic acid, ursolic acid, myricetin
2	ปริมาณความชื้น	ไม่มากกว่า 8% โดยน้ำหนัก	ไม่มากกว่า 9% โดยน้ำหนัก	ไม่มากกว่า 9% โดยน้ำหนัก	ไม่มากกว่า 10% โดยน้ำหนัก	ไม่มากกว่า 8% โดยปริมาตรน้ำหนัก
3	ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ	ไม่น้อยกว่า 21% โดยน้ำหนัก	ไม่น้อยกว่า 7% โดยน้ำหนัก	ไม่น้อยกว่า 12% โดยน้ำหนัก	ไม่น้อยกว่า 26% โดยน้ำหนัก	ไม่น้อยกว่า 13% โดยน้ำหนัก
4	ปริมาณสารสกัดด้วย 50% เอทานอล	—	—	ไม่น้อยกว่า 13% โดยน้ำหนัก	ไม่น้อยกว่า 23% โดยน้ำหนัก	—
5	ปริมาณสารสกัดด้วย 95% เอทานอล	ไม่น้อยกว่า 9% โดยน้ำหนัก	ไม่น้อยกว่า 4% โดยน้ำหนัก	ไม่น้อยกว่า 5% โดยน้ำหนัก	ไม่น้อยกว่า 11% โดยน้ำหนัก	ไม่น้อยกว่า 12% โดยน้ำหนัก
6	ปริมาณสารสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม	—	—	—	—	ไม่น้อยกว่า 5% โดยน้ำหนัก
7	ดัชนีการเกิดฟอง	ไม่น้อยกว่า 242	—	—	—	—
8	ปริมาณเถ้ารวม	ไม่มากกว่า 14% โดยน้ำหนัก	ไม่มากกว่า 10% โดยน้ำหนัก	ไม่มากกว่า 6% โดยน้ำหนัก	ไม่มากกว่า 13% โดยน้ำหนัก	ไม่มากกว่า 7% โดยน้ำหนัก
9	ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด	ไม่มากกว่า 2% โดยน้ำหนัก	ไม่มากกว่า 2% โดยน้ำหนัก	ไม่มากกว่า 1% โดยน้ำหนัก	ไม่มากกว่า 1% โดยน้ำหนัก	ไม่มากกว่า 1% โดยน้ำหนัก
10	ความเป็นกรด-ด่าง	—	—	ไม่น้อยกว่า 5	ไม่น้อยกว่า 5	—
11	ปริมาณกีปิโนไซด์รวม	ไม่น้อยกว่า 4% โดยน้ำหนัก	—	—	—	—
12	ปริมาณ fixed oil	ไม่น้อยกว่า 1	—	—	—	—
13	ปริมาณโปแตสเซียม	—	—	0.7%	2%	—
14	ปริมาณแทนนิน	—	—	—	—	ไม่น้อยกว่า 6% โดยน้ำหนัก
15	ปริมาณน้ำมันหอมระเหย	—	—	—	—	ไม่น้อยกว่า 0.5% โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก

การควบคุมคุณภาพ และกำหนดมาตรฐานสมุนไพร

วารุณี จิรวัฒนาพงศ์

ปัจจุบันมีการนำสมุนไพรอันเป็นทรัพยากรที่มีค่าของประเทศ มาใช้ประโยชน์ทางสาธารณสุขกันอย่างแพร่หลาย ทั้งที่ใช้เป็นอาหาร ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร เครื่องสำอางและใช้เป็นยา เนื่องจากพบอาการอันไม่พึงประสงค์ที่ร้ายแรงจากการใช้ยาแผนปัจจุบัน ประกอบกับความเชื่อที่ว่าสารจากสมุนไพรเป็นสารธรรมชาติจึงมีความปลอดภัยสูงกว่าสารจากการสังเคราะห์ ทำให้แนวโน้มของการใช้สมุนไพรเพิ่มมากขึ้น สมุนไพรที่นำมาใช้อาจอยู่ในรูปสมุนไพรสด (Fresh plant) สมุนไพรแห้ง (Crude drug) สารสกัดจากพืช (Plant extract) หรือผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป (Finished product)

อย่างไรก็ตามการนำสมุนไพรมาใช้รักษาโรคนั้นมักประสบปัญหาความไม่แน่นอนของประสิทธิภาพในการรักษา การที่สมุนไพรมีคุณภาพแตกต่างกันมีสาเหตุจากปัจจัยต่างๆ ดังนี้

1. การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี (Biochemical variation)

   เป็นความแตกต่างของสารประกอบเคมีในพืช ซึ่งอาจเกิดจากสายพันธุ์ แหล่งปลูก อายุพืช ระยะเวลาในการเก็บเกี่ยว เป็นต้น

2. การปนเปื้อน (Contamination)

   การที่มีส่วนของพืชชนิดอื่นปะปนมา หรือการปนเปื้อนของดินทรายจากการทำความสะอาดไม่ดี เป็นต้น

3. การเสื่อมสภาพ (Deterioration)

   การที่สมุนไพรเสื่อมสภาพจากการเก็บเป็นเวลานาน การเก็บรักษาสมุนไพรไม่ถูกวิธี หรือการเน่าเสีย ล้วนส่งผลให้สมุนไพรมีคุณภาพต่ำลง

4. การทดแทน (Substitution) และการปนปลอม (Adulteration)

   เป็นการนำสมุนไพรอื่นที่มีลักษณะคล้ายคลึงกันแต่ราคาถูกกว่า มาใช้ปนปลอม หรือใช้ทดแทนทั้งหมด

5. ความรู้และประสบการณ์ (Experience)

   ผู้นำสมุนไพรมาใช้ควรมีความรู้และประสบการณ์มากพอ เพราะสมุนไพรแต่ละชนิดมักมีชื่อเรียกแตกต่างกันในแต่ละท้องถิ่น หรือบางชนิดมีชื่อเรียกพ้องกัน ก่อให้เกิดความสับสนในการเลือกใช้สมุนไพร และอาจนำสมุนไพรมาใช้ผิดชนิดไปจากที่ต้องการ นอกจากนี้ผู้เก็บสมุนไพรมาใช้ต้องทราบช่วงเวลาและวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บสมุนไพร

การนำสมุนไพรไปใช้ในการรักษาและป้องกันโรคนั้น ต้องมั่นใจว่าเป็นสมุนไพรที่ถูกต้อง มีสารสำคัญสามารถควบคุมปริมาณได้ และมีสรรพคุณ ซึ่งจะนำไปสู่การผลิตผลิตภัณฑ์สมุนไพร เพื่อใช้ประโยชน์ทางการแพทย์และเภสัชกรรมอย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด ดังนั้นการควบคุมคุณภาพของสมุนไพรและผลิตภัณฑ์สมุนไพร จึงมีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่ง เพราะจะทำให้คุณภาพของผลิตภัณฑ์สมุนไพรในแต่ละครั้งที่ผลิตมีความสม่ำเสมอ ส่งผลถึงประสิทธิภาพและประสิทธิผลในการรักษาที่แน่นอนเชื่อถือได้ การจัดทำข้อกำหนดมาตรฐานเพื่อใช้เป็นหลักในการควบคุมคุณภาพสมุนไพรและผลิตภัณฑ์สมุนไพร จึงเป็นงานสำคัญอย่างหนึ่งที่จะยกระดับคุณภาพสมุนไพรและผลิตภัณฑ์สมุนไพรให้มีมาตรฐานในระดับสากล

การควบคุมคุณภาพสมุนไพรเพื่อจัดตั้งเกณฑ์มาตรฐานต้องคำนึงถึง

1. ชื่อวิทยาศาสตร์ (Scientific name)
2. แหล่งตัวอย่าง (Source of material)
3. ฤดูกาลเก็บเกี่ยวและอายุพืช (Harvesting time and plant-age)
4. ส่วนของพืชที่ใช้เป็นยา (Part used)
5. ตัวอย่างพืชที่ถูกต้อง (Authentic sample)
6. สรรพคุณ (Indication)
7. สารสำคัญหรือสารออกฤทธิ์ (Active constituent)

สารสำคัญที่พบในสมุนไพร

1. **สเตียรอยด์** (Steroids)

   เป็นสารที่มีสูตรโครงสร้างเดียวกับฮอร์โมนและยาต้านอักเสบ สามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ฮอร์โมนและยาต้านอักเสบเช่น β-sitosterol ซึ่งพบบ่อยในพืช มีฤทธิ์เป็น anticholesteremic

2. **เทอร์ปีนอยด์** (Terpenoids)

   เป็นสารที่พบในพืชแทบทุกชนิด แบ่งออกเป็น hemiterpenoids, monoterpenoids, sesquiterpenoids, diterpenoids, triterpenoids, tetraterpenoids และ carotenoids ตัวอย่างสารในกลุ่มนี้ได้แก่ menthol, artemisinin, taxol เป็นต้น

3. **กลัยโคไซด์** (Glycosides)

   เป็นสารประกอบที่มี 2 ส่วน คือส่วนที่เป็นน้ำตาล (Glycone) และส่วนที่ไม่เป็นน้ำตาล (Aglycone) กลัยโคไซด์หลายชนิดมีประโยชน์ทางยา โดยเฉพาะ Cardiac glycosides มีฤทธิ์ต่อกล้ามเนื้อหัวใจ โดยเพิ่มแรงบีบตัว ใช้ในการรักษาโรคหัวใจวาย (Congestive heart failure) เช่น digitoxin, digoxin

4. **แอลคาลอยด์** (Alkaloids)

   เป็นสารที่มีรสขม มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบในโมเลกุล (Heterocyclic nitrogen) มีคุณสมบัติเป็นด่าง มีฤทธิ์เป็นทางเภสัชวิทยาอย่างเด่นชัด ได้แก่ quinine, strychnine, morphine เป็นต้น

5. **ฟลาโวนอยด์** (Flavonoids)

เป็นสารประกอบพวกโพลีฟีนอล จัดเป็นกลุ่มสารที่มีสี มักมีสีเหลือง แดง ม่วงหรือน้ำเงิน มักพบในรูป glycosides เช่น rutin ใช้เป็นยารักษาโรคเส้นเลือดฝอยเปราะ ส่วนสารประกอบ isoflavonoids บางชนิดพบว่ามีฤทธิ์คล้าย estrogen

6. **แอนทราควิโนนส์** (Anthraquinones)

เป็นสารประกอบกลุ่มควิโนน (quinones) ที่พบมากที่สุดและสำคัญที่สุด พบทั้งในรูปอิสระ (aglycone) และรูป glycosides ส่วน aglycone ละลายได้ดีในด่างให้สีชมพู นำมาใช้เป็นยาระบาย และยาถ่ายเช่น rhein, aloe-emodin, sennoside A และ B เป็นต้น นอกจากนี้ยังใช้เป็นยารักษาเชื้อราที่ผิวหนังด้วย

7. **แทนนิน** (Tannins)

เป็นสารประกอบโพลีฟีนอล มีรสฝาด ใช้เป็นยาฝาดสมานและรักษาอาการท้องร่วง นอกจากนี้ยังใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง

8. **ซาโปนิน** (Saponins)

เป็นสารประกอบพวกกลัยโคไซด์ โดยมีส่วน aglycone เป็น steroids หรือ triterpenoids มีคุณสมบัติพิเศษคือ เมื่อเขย่ากับน้ำจะเกิดฟองที่คงอยู่เป็นเวลานาน เป็นสารลดแรงตึงผิวที่ดี สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงแตก และเป็นพิษต่อปลา เช่น rotenone

9. **น้ำมันระเหยง่าย** (Volatile oils)

เป็นของเหลวที่มีกลิ่นเฉพาะ มีกลิ่นหอม ระเหยที่อุณหภูมิห้อง ประกอบด้วยสารเคมีที่สำคัญประเภท monoterpenes, sesquiterpenes และ oxyginated derivatives เช่น น้ำมันสะระแหน่ (peppermint oil) ใช้เป็นยาขับลม บำบัดอาการท้องอืด ท้องเฟ้อ น้ำมันกานพลู (clove oil) ใช้เป็นยาฆ่าเชื้อ (antiseptic) และเป็นยาชาเฉพาะที่บรรเทาอาการปวดฟัน เป็นต้น

10. **น้ำมันไม่ระเหย** (Fixed oil)

เป็นสารประกอบพวกไขมัน แตกต่างกันที่น้ำมันไม่ระเหยมีจุดหลอมเหลวต่ำ และมีสภาพเป็นของเหลวที่อุณหภูมิปกติ ส่วนไขมันจะมีสภาพกึ่งของแข็งกึ่งของเหลว น้ำมันไม่ระเหยส่วนใหญ่ได้มาจากส่วนเมล็ด ถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางยาหลายอย่างเช่น น้ำมันละหุ่ง (Castor oil) ใช้เป็นยาถ่ายอย่างแรง

11. **กรดอินทรีย์** (Organic acids)

เป็นกรดอินทรีย์ที่พบในพืช ใช้เป็นยาระบายและใช้ในเครื่องสำอาง เช่น tartaric acid, malic acid ในใบและฝักมะขาม เป็นต้น

12. **คูมารินส์** (Coumarins)

เป็นสารประกอบพวกแลคโตน (Lactone) เช่น coumarin ใช้แต่งกลิ่น, warfarin ใช้เป็นยาต้านการแข็งตัวของเลือด (anticoagulant)

13. **สารอื่นๆ**

เช่น amino acids, carbohydrates, resins, oleoresins, balsams, gum, mucilages เป็นต้น

การกำหนดมาตรฐานสมุนไพร

ในการจัดทำข้อกำหนดมาตรฐานสมุนไพร จะต้องมีการตรวจวิเคราะห์ในหัวข้อต่างๆและจัดทำมาตรฐานไว้ดังนี้

1. **การตรวจเอกลักษณ์ทางเภสัชเวท** (Pharmacognostic identification)

   1.1 **การตรวจลักษณะเซลล์และเนื้อเยื่อ**

   - การตรวจลักษณะด้านฮิสโตโลยี (Histology study)

     เป็นการตรวจลักษณะการเรียงตัวของเซลล์และส่วนประกอบภายในเซลล์ โดยการตัดส่วนของพืชให้บางมากๆและย้อมสีด้วยน้ำยาที่เหมาะสมเพื่อดูลักษณะทางกล้องจุลทรรศน์

   - การศึกษาผงยา (Powdered drugs study)

     เป็นการตรวจลักษณะของผงยาว่าเป็นส่วนใดของพืช รวมถึงการใช้น้ำยา (reagents) ต่างๆ ในการย้อมสี และตรวจลักษณะผลึกของสารที่มีในผงยานั้น

   1.2 **การตรวจวัดขนาดของเนื้อเยื่อ และตรวจหาค่าคงที่บางชนิด**

   พืชบางชนิดจะมีลักษณะเนื้อเยื่อและขนาดเฉพาะเจาะจงเช่น

   - cystolith hair ในใบกัญชา *Cannabis sativa* Linn. (Cannabidaceae)
   - idioblast ในใบชา *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze (Theaceae)

   หรือการใช้ค่าคงที่ทางเภสัชเวทมาแยกความแตกต่างของพืชเช่น Stomatal number, Palisade ratio, Vein-islet number และ Vein-terminal number เป็นต้น

2. **การตรวจเอกลักษณ์ทางเคมี** (Chemical identification)

   2.1 **การตรวจสอบเบื้องต้น** (Preliminary test)

   เป็นการตรวจหาสารสำคัญโดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสี การตกตะกอน หรือปฏิกิริยาอื่นๆ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการตรวจหาองค์ประกอบทางเคมีโดยละเอียดต่อไป

   2.2 **การตรวจสอบเพื่อยืนยันผล** (Confirmatory test)

   เป็นการตรวจหาองค์ประกอบทางเคมีของกลุ่มสารสำคัญที่ตรวจพบในเบื้องต้น สามารถนำเทคนิคโครมาโตกราฟีมาใช้ แต่ที่นิยมคือใช้วิธีโครมาโตกราฟีชนิดผิวบาง (Thin layer chromatography) เนื่องจากสามารถบอกองค์ประกอบทางเคมีได้รวดเร็ว ชัดเจน และประหยัดกว่าวิธีอื่นๆ

3. **การประเมินคุณภาพของสมุนไพร** (Crude drug evaluation)

   3.1 **สิ่งแปลกปลอม** (Foreign matter)

   เป็นการตรวจหาส่วนของพืชที่เภสัชตำรับไม่ได้ระบุไว้ รวมถึงชิ้นส่วนของแมลง ดิน ทรายหรือสิ่งสกปรกอื่นๆ

   3.2 **ปริมาณเถ้า** (Ash content)

   เป็นการหาสิ่งที่คงเหลืออยู่หลังจากการเผาไหม้อย่างสมบูรณ์ ส่วนใหญ่เถ้า

ประกอบด้วยด่าง (Alkali earth) ในรูปเกลือคาร์โบเนต ฟอสเฟต ซัลเฟต และคลอไรด์ ซึ่งละลายได้ดีในกรดเกลือ การตรวจหาเถ้านิยมใช้วิธี

- **ปริมาณเถ้าทั้งหมด** (Total ash content)

  เป็นปริมาณเถ้าทั้งหมดที่เกิดจากเนื้อเยื่อสมุนไพร และอาจเกิดจากสิ่งเจือปนอื่นๆ เช่น ดินทราย เป็นต้น

- **ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด** (Acid-insoluble ash content)

  เป็นปริมาณเถ้าที่เกิดจากสิ่งเจือปนต่างๆ เช่น หิน ดิน ทราย เป็นต้น

3.3 **ปริมาณความชื้น** (Moisture content)

วิธีการตรวจหาปริมาณความชื้นในสมุนไพร ต้องเลือกให้เหมาะสมกับชนิดของสมุนไพร มี 2 วิธี คือ

- Gravimetric method เป็นวิธีหาปริมาณความชื้นในสมุนไพรโดยการอบสมุนไพร ให้แห้งสนิท แล้วหาน้ำหนักที่หายไป (loss on drying) วิธีนี้ทำได้ง่ายเหมาะกับสมุนไพรที่ไม่มีองค์ประกอบอื่นที่ระเหยได้นอกจากน้ำ
- Azeotropic distillation method เป็นวิธีหาปริมาณความชื้นในสมุนไพรโดยการวัดปริมาณน้ำที่ได้จากการกลั่น วิธีนี้ยุ่งยากกว่าและใช้ค่าใช้จ่ายมากกว่าวิธีแรก เหมาะกับสมุนไพรที่มีองค์ประกอบอื่นที่ระเหยได้ เช่น มีน้ำมันระเหยง่าย

3.4 **ปริมาณสิ่งสกัดด้วยตัวทำละลาย** (Solvent extractive content)

เป็นการหาสิ่งสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม เพื่อตรวจหาปริมาณสารสำคัญ ใช้ในการควบคุมคุณภาพสมุนไพรขั้นต้น ในกรณีที่หาวิธีเฉพาะไม่ได้

3.5 **การหาปริมาณสารสำคัญหรือสารออกฤทธิ์** (Determination of active constituent)

วิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญหรือสารออกฤทธิ์ในสมุนไพรแต่ละชนิด จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดและคุณสมบัติของสารสำคัญหรือสารออกฤทธิ์นั้นๆ การประเมินคุณภาพของสมุนไพรด้วยวิธีนี้ มีประสิทธิภาพมากกว่าการตรวจหาปริมาณสิ่งสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ การวิเคราะห์แบ่งเป็น

- การวิเคราะห์กลุ่มสาร เช่น น้ำมันระเหยง่าย แอนทราควิโนนส์รวม แอลคาลอยด์รวม แทนนินรวม เป็นต้น
- การวิเคราะห์สารเดี่ยว เช่น quinine, curcumin

3.6 **การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์** (Microbial limit)

ในขั้นตอนต่างๆ ของการเตรียมสมุนไพรแห้ง การเก็บรักษา และการเตรียมเป็นยาเม็ด แคปซูล หรือยาหมักเย็น มักมีการปนเปื้อนด้วยเชื้อราและจุลินทรีย์ ที่มีอยู่ตามธรรมชาติ ในเภสัชตำรับได้ระบุว่าสมุนไพรที่ใช้ทำยาต้องปลอดเชื้อ จึงจำเป็นต้องตรวจสอบการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อนเสมอ

3.7 ปริมาณสารตกค้าง (Pesticide residues limit)

เนื่องจากมีการใช้สารฆ่าแมลงในการปลูกสมุนไพรมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการปลูกสมุนไพรเพื่อการค้า จึงควรมีการตรวจสอบสารตกค้างที่จะก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค

รูปแบบของผลิตภัณฑ์สมุนไพร

1. ผลิตภัณฑ์สมุนไพรเพื่อใช้เป็นยาสามารถแบ่งเป็น 4 กลุ่มดังนี้
   - ยาแผนโบราณ (Traditional drugs) หมายถึง ยาจากสมุนไพรที่มีข้อบ่งใช้ /สรรพคุณ ขนาดและวิธีใช้เป็นไปตามองค์ความรู้ที่สืบทอดต่อกันมา
   - ยาจากสมุนไพรแผนโบราณ (Modified traditional drugs) หมายถึง ยาจากสมุนไพรที่มีข้อบ่งใช้ / สรรพคุณ ขนาดและวิธีใช้เป็นไปตามองค์ความรู้ที่สืบทอดต่อกันมา แต่ได้มีการพัฒนารูปแบบ (dosage form) ไปจากเดิม
   - ยาจากสมุนไพรแผนปัจจุบัน (Herbal drugs หรือ Phytopharmaceuticals) หมายถึง ยาจากสมุนไพรที่ได้จากการวิจัยและพัฒนาด้วยกระบวนการทางวิทยาศาสตร์ มีตัวยาสำคัญอยู่ในลักษณะ semipurified compounds
   - ยาแผนปัจจุบันที่เป็นยาใหม่ (New drugs) หมายถึง ยาจากสมุนไพรที่วิจัยและพัฒนาด้วยกระบวนการทางวิทยาศาสตร์จนได้ตัวยาสำคัญอยู่ในลักษณะสารบริสุทธิ์ (Purified substance) ซึ่งทราบสูตรโครงสร้างที่แน่ชัด
2. ผลิตภัณฑ์สมุนไพรเพื่อเสริมอาหาร
3. ผลิตภัณฑ์สมุนไพรเพื่อใช้เป็นเครื่องสำอาง

การควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์สมุนไพร สามารถทำได้หลายระดับตั้งแต่ระดับง่ายถึงระดับที่ยุ่งยากซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพแตกต่างกันไปเช่น

- การใช้ chromatographic fingerprint ในการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ว่ามีสารออกฤทธิ์กลุ่มที่ต้องการหรือไม่ โดยไม่มีการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ (เป็น Qualitative analysis) ได้เป็นผลิตภัณฑ์ที่เรียกว่า Fingerprinted products
- การผลิตหรือควบคุมคุณภาพโดยควบคุมปริมาณสารสำคัญให้มีปริมาณไม่ต่ำกว่าที่กำหนด
- การผลิตเป็น Standardized products ที่มีการควบคุมปริมาณสารสำคัญในผลิตภัณฑ์ให้มีปริมาณที่แน่นอนทุกครั้งที่ผลิต นั่นคือ มี product uniformity ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีราคาสูง แต่กรรมวิธีในการผลิตและควบคุมคุณภาพยุ่งยากกว่า

นอกจากนี้การควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์สมุนไพร ยังต้องทำตามข้อกำหนดที่ระบุได้ในเภสัชตำรับขึ้นกับรูปแบบของผลิตภัณฑ์นั้น ๆ เช่น การหา weight variation, disintegration time, dissolution เป็นต้น

บรรณานุกรม

1. คณะอนุกรรมการพัฒนาบัญชียาหลักแห่งชาติ ในคณะกรรมการแห่งชาติด้านยา. 2543. บัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ.2542(บัญชียาจากสมุนไพร). โรงพิมพ์ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยจำกัด. หน้า 1-48.
2. ทวีผล เดชาติวงศ์ ณ อยุธยา. 2536. การควบคุมคุณภาพของสมุนไพร ในเอกสารการประชุมเชิงปฏิบัติการเรื่อง การควบคุมคุณภาพสมุนไพร. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข หน้า 45-53.
3. ภักดี โพธิศิริ. 2544. ความจำเป็น นโยบายของชาติ และบทบาทของนักวิชาการในการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสมุนไพร ในการประชุมเชิงปฏิบัติการเรื่อง การประเมินประสิทธิภาพและความปลอดภัยของยาสมุนไพร. สมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ. หน้า 1-10.
4. วีณา จิรัจฉริยากูล. 2534. ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. หน้า 11-19, 25-72.
5. Evans W.C. 1989. Trease and Evans' Pharmacognosy. 13th ed. ELBS, London. pp. 39-44, 127-129.
6. Robbers J.E., Speedie M.K. and Tyler V.E. 1996. Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology. Williams & Wilkins, USA. pp.80-90.
7. World Health Organization. 1998. Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials. WHO, Geneva. pp. 8,14-16, 28, 30-33, 47, 64.

การเตรียมสารสกัดจากสมุนไพร

ธิดารัตน์ บุญรอด

วัตถุดิบสมุนไพร จะมีคุณภาพดีมากหรือน้อยเพียงใด ขึ้นอยู่กับกระบวนการในการผลิตสมุนไพร ซึ่งเกี่ยวข้องกับบุคลากรหลายสาขาอาชีพ ได้แก่ นักวิชาการเกษตร เกษตรกร ผู้เก็บสมุนไพรจากแหล่งธรรมชาติ รวมทั้งผู้ค้าวัตถุดิบ การเตรียมวัตถุดิบสมุนไพรประกอบด้วย 4 ขั้นตอนหลัก คือ การเพาะปลูก การเก็บเกี่ยว กรรมวิธีหลังการเก็บเกี่ยว และการบรรจุและการเก็บรักษา ทุกขั้นตอนล้วนมีความสำคัญต่อคุณภาพสมุนไพร[1]

การเตรียมสารสกัดสมุนไพร

องค์ประกอบเคมีในสมุนไพร การทราบสารเคมีที่สำคัญจะช่วยทำให้สามารถนำสมุนไพรมาพัฒนาเป็นยาได้อย่างเหมาะสม เนื่องจากในพืชมีสารเคมีหลายชนิดที่แตกต่างกันไปตามส่วนต่างๆ ของพืช กลุ่มสารเคมีที่สำคัญๆ อาจแบ่งได้ดังนี้ กลัยโคไซด์ โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต น้ำมันหอมระเหย แทนนิน ฟลาโวนอยด์ สเตอรอยด์ เทอร์ปีนอยด์ วิตามิน เรซิน และบาลซั่ม เป็นต้น[1]

การสกัด เป็นการดึงหรือชะส่วนที่ละลายออกจากส่วนที่ไม่ละลาย (ส่วนที่เหลือ) ซึ่งอาจเป็นของแข็งหรือของเหลวก็ได้ ด้วยการใช้ตัวทำละลายที่เป็นของเหลวที่เหมาะสม ความสามารถของการสกัดจะขึ้นกับอัตราการซึมผ่าน (rate of diffusion) ของส่วนที่ละลายผ่านชั้นสัมผัสของของเหลวที่ทำหน้าที่เป็นตัวสกัด (Solvent) กับสารตั้งต้นที่จะสกัด เนื่องจากสารประกอบในพืชมีมากมายหลายชนิดและมีคุณสมบัติต่างกันมาก การเลือกตัวทำละลายที่สมบูรณ์สามารถสกัดสารทุกกลุ่มที่ต้องการออกมาจึงทำได้ยาก โดยทั่วไป การสกัดสมุนไพรจะอิงการใช้ของแพทย์แผนโบราณ เช่น ต้มหรือดองเหล้า ดังนั้น ตัวทำละลายที่นิยมใช้คือน้ำ เอธานอล หรือส่วนผสมของน้ำกับเอธานอล[2]

การเลือกใช้ตัวทำละลาย ตัวทำละลายที่ดีควรมีคุณสมบัติ ดังนี้[2]

- เป็นตัวทำละลายที่ดีพอสำหรับสารที่ต้องการสกัด โดยอาศัยหลักเกณฑ์
    - สารละลายในตัวทำละลายที่มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกัน (like dissolve like)
    - สามารถละลายสารที่ต้องการออกมามากที่สุด ในขณะที่ละลายสารที่ไม่ต้องการออกน้อยที่สุด (selective)

- ต้องเป็นตัวทำละลายที่หาง่าย ราคาถูก ไม่เป็นพิษต่อร่างกาย
- ไม่ระเหยง่ายหรือยากเกินไป
- ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการสกัด
- เป็นตัวทำละลายที่มีความคงตัวดี

วัตถุประสงค์ของการสกัดสารสำคัญจากสมุนไพร[2]

- เพื่อสกัดแยกสารสำคัญหรือสารออกฤทธิ์จากสมุนไพร
- เพื่อให้ได้สารสกัดที่มีความเข้มข้นของสารสำคัญ หรือสารออกฤทธิ์สูง
- เพื่อลดขนาดในการใช้ต่อครั้ง (dose) ให้อยู่ในปริมาณที่เหมาะสม

การตรวจสอบสารเคมีในสมุนไพร

การตรวจสอบคุณภาพทางเคมีของสมุนไพร คือการตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีว่าใช่สมุนไพรที่เราต้องการหรือไม่ มีสารออกฤทธิ์ทางยาเข้ามาตรฐานที่กำหนดไว้ในเภสัชตำรับหรือไม่ มีสิ่งปนปลอมหรือไม่ เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีในสมุนไพรมีมากมายหลายชนิด การทราบสารสำคัญนอกจากจะทำให้สามารถนำสมุนไพรมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ได้อย่างเหมาะสมและใช้บำบัดโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพแล้ว ยังเป็นประโยชน์ในการควบคุมปริมาณตัวยาสำคัญในวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์สมุนไพรให้มีคุณภาพสม่ำเสมอกันทุกรุ่นโดยตลอด การตรวจสอบสารเคมีกลุ่มต่างๆ ในสมุนไพรในเบื้องต้นทำได้ 2 วิธี คือตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาการเกิดสี การตกตะกอนหรือปฏิกิริยาอื่น และตรวจสอบยืนยันผลด้วยวิธีโครมาโตกราฟีชนิดผิวบาง (Thin layer chromatography,TLC) เพื่อให้การควบคุมคุณภาพสมุนไพรให้มีคุณภาพดี สามารถนำไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพและปลอดภัย จำเป็นต้องตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีและนอกจากนี้จำเป็นต้องดำเนินการตรวจสอบหาค่าต่างๆ ของสมุนไพรเพื่อการประเมินคุณภาพทางเคมีของสมุนไพร ให้เป็นไปตามข้อกำหนดในการควบคุมมาตรฐานยาสมุนไพรที่ระบุไว้ในตำรายา (Pharmacopoeia)[3]

เอกสารอ้างอิง

1. สถาบันวิจัยสมุนไพร. มาตรฐานสมุนไพร เล่มที่ 1 ฟ้าทะลายโจร. พ.ศ.2542. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก กรุงเทพฯ.
2. เย็นจิตร เตชะดำรงสิน จารีย์ บันสิทธิ์ อัมพร คุณอเนก ธิดารัตน์ บุญรอด วารุณี จิรวัฒนาพงศ์ ดวงเพ็ญ ปัทมดิลก พ.ศ.2546. การเตรียมสารสกัดสมุนไพร รายงานการศึกษาวิจัยโครงการสมุนไพรต้านเอดส์ (1) ฤทธิ์ของสมุนไพรไทยในการยับยั้งเชื้อเอชไอวีและเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อฉวยโอกาสและฤทธิ์เสริมภูมิคุ้มกัน กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข หน้า 7-13.
3. สถาบันวิจัยสมุนไพร. สมุนไพรน่ารู้ 1 ผักคาวตอง. พ.ศ.2546. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก กรุงเทพฯ.

การประเมินคุณภาพของวัตถุดิบ และน้ำมันหอมระเหยของเหง้ากระชายดำ

Quality Evaluation of Crude Drugs and Volatile Oil of Krachai-dam Rhizomes

ประไพ วงศ์สินคงมั่น, นฤมล มงคลชัยภักดิ์
ณุฉัตรา จันทร์สุวานิชย์, เย็นจิตร เตชะดำรงสิน
ธิดารัตน์ บุญรอด
สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

บทคัดย่อ

เหง้าสดของสมุนไพรที่มีชื่อไทยว่า 'กระชายดำ' ซึ่งซื้อจากแหล่งต่างๆ ในภาคกลาง ภาคตะวันออก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยระหว่างเดือนธันวาคม 2544 ถึงเดือนพฤษภาคม 2545 จำนวน 25 ตัวอย่าง เมื่อนำมาศึกษาทางเคมีเปรียบเทียบกับตัวอย่างของกระชายดำที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker (วงศ์ Zingiberaceae) พบว่า วัตถุดิบแห้งของทุกตัวอย่างมีองค์ประกอบทางเคมีเหมือนกันกับตัวอย่าง *Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker เมื่อพิสูจน์เอกลักษณ์โดยเทคนิครงคเลขผิวบาง และจากการประเมินคุณภาพของตัวอย่างที่เป็นวัตถุดิบแห้ง พบว่าวัตถุดิบควรมีคุณภาพดังนี้ ปริมาณเถ้ารวมไม่เกินร้อยละ 6 โดยน้ำหนัก ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรดไม่เกินร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก ปริมาณความชื้นไม่เกินร้อยละ 10 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำไม่น้อยกว่าร้อยละ 17 โดยน้ำหนัก และปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอลไม่น้อยกว่าร้อยละ 8 โดยน้ำหนัก สำหรับการประเมินคุณภาพทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยที่กลั่นโดยใช้น้ำจากวัตถุดิบสด จำนวน 18 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างทั้งหมดมีองค์ประกอบทางเคมีเหมือนกันกับตัวอย่าง *Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker เมื่อพิสูจน์เอกลักษณ์โดยเทคนิครงคเลขผิวบาง นอกจากนี้พบว่า น้ำมันหอมระเหยควรมีคุณสมบัติด้านกายภาพเคมีดังนี้ ค่าดัชนีการหักเหของแสงอยู่ในช่วงตั้งแต่ 1.471 ถึง 1.476 ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และค่าความหนาแน่นสัมพัทธ์อยู่ในช่วงตั้งแต่ 0.980 ถึง 0.983 ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

ABSTRACT

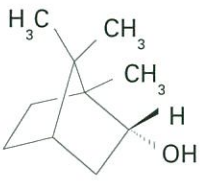
Twenty-five samples of so called 'Krachai-dam' (Thai name) fresh rhizomes were purchased from different sources in central part, eastern part and northeastern part of Thailand during December 2001 to May 2002. These samples were studied compared to the authentic sample (*Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker, Family Zingiberaceae). From the identification with thin-layer chromatography (TLC), it was found that the chromatograms of the twenty-five dried crude drugs were similar to those of the authentic sample. From the results of the quality evaluation, it was found that the crude drugs should have the following properties: the total ash was not more than 6% w/w, the acid-insoluble ash was not more than 2% w/w, the moisture content was not more than 10% v/w, the water-soluble extractive was not less than 17% w/w, and the ethanol-soluble extractive was not less than 8 % w/w. To obtain the 'Krachai-dam' volatile oil, eighteen fresh rhizomes and the authentic sample were distilled with water. From the results of the physicochemical evaluation, the volatile oil should have the following properties: the refractive index was varied from 1.471 to 1.476 at 20°C and the relative density was varied from 0.980 to 0.983 at 20°C.

Key Words Krachai-dam rhizomes, crude drugs, volatile oil, quality evaluation, *Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker.

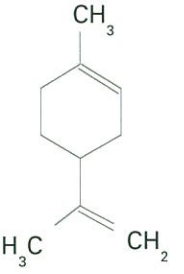
INTRODUCTION

Kaempferia parviflora Wall. ex Baker (Thai name: Krachai-dam) is a perennial herb of the family Zingiberaceae[1]. The picture of this plant is shown in Figure 1. The rhizomes of this plant have been used in Thai traditional medicine as poultice, appetite stimulant, pain reliever, and aphrodisiac[2,3]. It was reported that the volatile oils of *Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker rhizomes contained terpenoids compounds such as limonene, sylvestrene, and borneol which showed antibacterial activities against *Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtilis*, and *Staphylococcus aureus*[4]. The structures of some constituents of the volatile oil are shown in Figure 2. Since the identity and the quality of the crude drugs and volatile oils of the 'Krachai-dam' obtained from various sources have never been investigated before, this prompted us to evaluate the qualities of this plant compared to the authentic sample.

Figure 1 *Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker



d-Borneol



Limonene

Figure 2 The structures of some compounds in volatile oil of *Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker rhizomes

MATERIALS AND METHODS

Materials

1. **Sieve:** Aperture 180 microns, mesh no. 80 from Endocotts Ltd., London, England.
2. **Plant materials:** Twenty-five samples of fresh 'Krachai-dam' rhizomes (about 2.5 kg/sample) were purchased from different provinces in central part, eastern part and north-eastern part of Thailand during December 2001 to May 2002. To obtain dried crude drugs samples, a 1-kg portion of each fresh rhizome was washed, sliced into small pieces, then dried in an oven at 50°C for 48 hours. The dried materials were ground and passed through a sieve with mesh no.180. The samples were kept at room temperature in well-closed containers and protected from light.

3. **Authentic sample:** The fresh rhizomes of the 'Krachai-dam' authentic sample were collected from Loei Province, Thailand for using in this study. Some of them were grown in the nursery until reaching the flowering period. The flowering specimens were identified by basing on the literatures[5, 6]. As a result, this plant is *Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker in the family Zingiberaceae. The voucher specimen, Department of Medical Sciences (DMSc) Herbarium No. 1575, was kept at the Department of Medical Sciences Herbarium.

   To obtain the authentic crude drug, a 0.5-kg portion of the fresh rhizome was washed, sliced into small pieces, then dried in an oven at 50°C for 48 hours. The dried materials were ground and passed through a sieve with mesh no. 180. The dried sample was kept at room temperature in a well-closed container and protected from light.

3. **Standard substances:** Borneol ($C_{10}H_{18}O$, MW=154.24) and caffeic acid ($C_9H_8O_4$, MW=180.15) were purchased from Sigma, U.S.A.
4. **Silica gel G:** TLC precoated plate 20 x 20 cm, layer thickness 0.25 mm, Art. 5721 from E. Merck, Germany.
5. **Silica gel GF254:** TLC precoated plate 20 x 20 cm, layer thickness 0.25 mm, Art. 5715 from E. Merck, Germany.
6. **Refractometer:** The refractive index values were determined by the refractometer (Carl Zeiss, Germany).
7. **Solvents and chemicals used:** All of them are analytical grade.

Methods

1. Chemical identification

1.1 Preliminary test

Test Solution: Sample 1 g was refluxed with 20 ml of ethanol for 5 minutes and filtered through cotton.

Ethanolic sulfuric acid: Conc. sulfuric acid (5 ml) was diluted with 95% ethanol to 100 ml.

Vanillin-sulfuric acid Test Solution (TS): Vanillin (1 g) was dissolved in 100 ml of ethanolic sulfuric acid. The solution was freshly prepared before using.

Ethanolic ninhydrin Test Solution (TS): Ninhydrin (1 g) was dissolved in 50 ml of 95% ethanol and mixed with 10 ml of glacial acetic acid.

1.1.1 For crude drugs

Procedure:

A. Examination of terpenoids: Test solution (5 ml) was decolorized with 1 g of activated charcoal, mixed well and filtered. Vanillin-sulfuric acid TS (2 drops) was added to the filtrate, mixed well and heated in a boiling water-bath for

2 minutes. The color of the solution was noted.

B. Examination of anthocyanins: Test solution (2 ml) was mixed with 1 drop of a 5% w/v solution of potassium hydroxide and the color of the solution was noted. Then, a 20% v/v solution of conc. sulfuric acid (1 drop) was added to the solution and the color of the solution was noted.

C. Examination of primary amine or amino acids: Test solution (2 drops) was dropped on a filter paper and air-dried at room temperature. Ethanolic ninhydrin TS (1 drop) was added to the same spot on the paper and dried in a current of hot air. The color of the paper was noted.

D. Examination of flavonoids: Magnesium ribbon (1 piece) was added to 2 ml of test solution, shaken well, and mixed with 2 drops of conc. hydrochloric acid. The color of the solution was noted.

1.1.2 For volatile oils

Sample preparation

1.1.2.1 To obtain the volatile oil samples, a 1-kg portion of each fresh rhizome was washed and sliced into small pieces, then distilled with water (note: seven samples were omitted because the amount of rhizomes were not adequate to perform the test). The volatile oils were kept at 4°C in well-closed containers and protected from light.

1.1.2.2 To obtain the authentic volatile oil, a 1-kg portion of the fresh rhizomes was washed and sliced into small pieces, then distilled with water. The authentic volatile oil was kept at 4°C in well-closed containers and protected from light.

Procedure :

To examine terpenoids, the volatile oil sample (1 drop) was added to 0.5 ml of 95 % ethanol and mixed well. Vanillin-sulfuric acid TS (2 drops) was added to the mixture, mixed well, and the color of the solution was noted[7].

1.2 Confirmatory test (Thin-layer chromatography)

1.2.1 For crude drug extracts

Sample solution:	Sample (0.5 g) was refluxed with 10 ml of methanol for 5 minutes, shaken frequently, allowed to cool, and filtered. The filtrate was adjusted to 10 ml with methanol.
Standard solution:	Caffeic acid (1 mg) was dissolved in 10 ml of methanol.
Adsorbant:	TLC plate silica gel GF254.

Developing solvent: Hexane: Ethyl acetate: Formic acid (60: 30: 5).

Developing distance: 10 cm.

Spotting amount: 5 µl each.

Spraying reagent: Natural products-polyethyleneglycol reagent (NP/PEG reagent) was prepared as followed[8].

NP reagent: Diphenylboric acid-2-aminoethyl ester (1 g) was dissolved in 100 ml of methanol.

PEG reagent: Polyethylene glycol 4000 (5 g) was dissolved in 100 ml of 95% ethanol.

Detection:

1. The plate was observed under UV 254.
2. The plate was observed under UV 366.
3. The plate was heated at 80°C for 10 minutes, then sprayed while the plate was still warm with NP reagent. Subsequently, the plate was sprayed with PEG reagent. The plate was allowed to dry in air and observed under UV366.

1.2.2 For volatile substances

Samples were tested using Thermomicro Analysis and Separation (TAS) Oven Method[9].

Sample amount: Sample of dried rhizomes (0.8 g) was used.

Standard solution: Borneol (4 mg) was dissolved in 1 ml of ethyl acetate.

Temperature (time): 30°C (3 min), 50°C (5 min), 70°C (5 min), 90°C (5 min), 110°C (5 min), 135°C (3 min), 150°C (5 min), 160°C (3 min), and 190°C (3 min).

Adsorbant: TLC plate silica gel G.

Developing solvent: Hexane: Ethyl acetate: Acetic acid (90: 10: 1).

Developing distance: 15 cm.

Spotting amount: 1 µl each.

Spraying reagent: Vanillin - phosphoric acid Test Solution (TS)[9]. Vanillin (1 g) was dissolved in 25 ml of

95% ethanol, mixed with 25 ml of distilled water and 35 ml of *ortho*-phosphoric acid, respectively. The solution was freshly prepared before using.

Detection: After spraying with vanillin - phosphoric acid TS and heating at 120°C for 10 minutes, the spots were observed as follows:

1. in daylight.
2. under UV 366.

1.2.3 For volatile oil

Sample solutions: The volatile oil sample (10 µl) was diluted with 95% ethanol to 200 µl.

Standard solution: Borneol (4 mg) was dissolved in 1 ml of ethyl acetate.

Adsorbant: TLC plate silica gel G.

Developing solvent: Hexane: Ethyl acetate: Acetic acid (90: 10: 1).

Developing distance: 15 cm.

Spotting amount: 1 µl each.

Spraying reagent: Vanillin-phosphoric acid TS.

Detection: Similar to the detection for volatile substances (1.2.2).

2. Quality Evaluation of Crude Drugs

2.1 Determination of ash

Total ash and acid-insoluble ash contents were carried out using the methods in Thai Herbal Pharmacopoeia[10].

2.2 Determination of extractives

Water-soluble and ethanol-soluble extractives were carried out using the methods in Thai Herbal Pharmacopoeia[10].

2.3 Determination of water (azeotropic distillation method)

Water was determined using the method in Thai Herbal Pharmacopoeia[10].

3. Physicochemical Evaluation of Volatile Oil

3.1 Description

Samples were described for organoleptic characteristics.

3.2 Solubility

The solubility of samples was carried out at room temperature, using the

definition described in Thai Pharmacopoeia[11].

3.3 Refractive index

The refractive index of samples was carried out at 20°C, using the method in Thai Pharmacopoeia[11].

3.4 Relative density

The relative density of samples was carried out at 20°C, using the method in Thai Pharmacopoeia[11].

RESULTS

1. Chemical identification

1.1 Preliminary test

1.1.1 For crude drugs

The color reactions of the crude drug samples and the authentic sample were performed in order to test terpenoids, anthocyanins, primary amine/amino acids, and flavonoids. The results of all tests were described as follows.

A. Examination of terpenoids: The preliminary test of twenty-five samples of the crude drugs and the authentic sample were performed in addition of vanillin-sulfuric acid TS and the blue color was developed. The results were positive to terpenoids.

B. Examination of anthocyanins: The preliminary test of twenty-five samples and the authentic sample were performed in the addition of potassium hydroxide and the green to blue color of test solution was produced. The color of the solution was changed to red in the addition of conc. sulfuric acid. The results were positive to anthocyanins.

C. Examination of primary amine or amino acids: The preliminary test of twenty-five samples and the authentic sample were performed in the addition of ethanolic ninhydrin TS to the same spot of test solution on the filter paper and the violet color was produced. The results were positive to primary amine or amino acids.

D. Examination of flavonoids: The cyanidin reaction of twenty-five samples and the authentic sample was performed in the addition of magnesium ribbon and conc. hydrochloric acid, and the red color of the solution was produced. The results were positive to flavonoids.

1.1.2 For volatile oil

The results of the percentage yields of the volatile oil obtained from eighteen samples of crude drugs and the authentic sample are shown in Table 1.

Table 1 The percentage yields (% v/w) of volatile oil distilled by water from the authentic sample and "Krachai-dam" fresh rhizomes

Sample	% Volatile Oil* (%v/w)
Authentic sample	0.04
1	0.07
2	0.05
3	0.06
4	0.09
5	0.08
6	0.05
7	0.05
8	0.12
9	0.08
10	0.08
11	0.11
12	0.14
13	0.16
14	0.16
15	0.10
16	0.10
17	0.10
18	0.10
$\bar{X} \pm SD$ (n= 18)	0.094 ± 0.034

* Single test was performed.

To test terpenoids, the color reactions of the volatile oil samples and the authentic volatile oil were performed in the addition of vanillin-sulfuric acid TS and the purple color was produced. The results were positive to terpenoids.

1.2 Confirmatory test (Thin-layer chromatography)

1.2.1 For crude drug extracts

The confirmatory tests of twenty-five samples of the crude drugs and the authentic sample were performed by thin-layer chromatography. The results are shown in Table 2 and Figure 3.

Table 2 hR_f Values of components in the methanolic solution of the crude drugs of "Krachaidam" rhizomes

Spots	hR_f Value	Detection with		
		UV254 (before spraying with NP/PEG reagent)	UV366* (before spraying with NP/PEG reagent)	UV366* (after spraying with NP/PEG reagent)
1	18-19	violet	green	blue
2	27-29	blue	blue	blue
3	31-32	—	blue-green	blue
4	36-37	quenching	green	green
5	41-43	quenching	green	blue
6	53-58	quenching	violet	yellow-green
7	56-62	quenching	violet	yellow-green
8	63-73	quenching	violet	yellow-green
9	71-80	quenching	violet	yellow-green
10	76-83	quenching	yellow	orange
11	84-92	quenching	green	orange

*Fluorescent spots

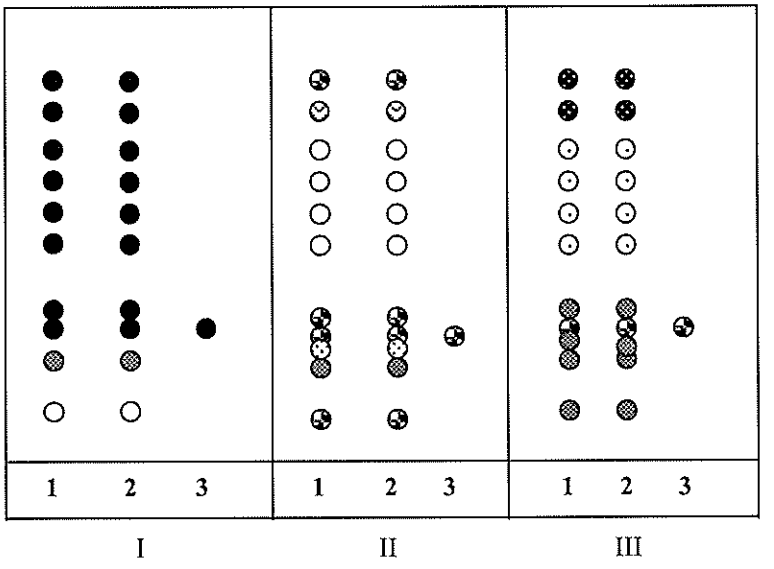


Figure 3 Thin-layer chromatograms of the crude drug extracts of "Krachai-dam" rhizomes and the authentic sample, using a mixture of hexane-ethyl acteate-formic acid (60: 30: 5) as the developing solvent.

1 = authentic sample
2 = crude drug extracts
3 = standard caffeic acid
I = detection with UV254
II = fluorescence under UV366
III = fluorescence under UV366 after spraying with NP/PEG reagent
○ = violet
◍ = blue
● = quenching
◔ = green
⊙ = blue-green
⊙ = yellow-green
◒ = yellow
◉ = orange

1.2.2 For volatile substances

The volatile substances of twenty-five samples of crude drugs and the authentic sample were performed by TAS oven method. The results are shown in Table 3 and Figure 4.

Table 3 hR_f Values of the volatile substances of the crude drugs of "Krachai-dam" rhizomes

Spots	hR_f Values	Detection with	
		Day light	UV366*
1	2	–	blue
2	9 - 12	violet	–
3	21 - 23	–	blue
4	26 - 28	blue violet	orange
5	31 - 34	brown violet	yellow
6	41 - 43	wine red	orange
7	69 - 72	violet	–
8	71 - 77	yellow	–
9	80 - 83	–	blue
10	92 - 96	red violet	–

* Fluorescent spots

Figure 1 *Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker

d-Borneol Limonene

Figure 2 The structures of some compounds in volatile oil of *Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker rhizomes

MATERIALS AND METHODS

Materials

1. **Sieve:** Aperture 180 microns, mesh no. 80 from Endocotts Ltd., London, England.
2. **Plant materials:** Twenty-five samples of fresh 'Krachai-dam' rhizomes (about 2.5 kg/sample) were purchased from different provinces in central part, eastern part and north-eastern part of Thailand during December 2001 to May 2002. To obtain dried crude drugs samples, a 1-kg portion of each fresh rhizome was washed, sliced into small pieces, then dried in an oven at 50°C for 48 hours. The dried materials were ground and passed through a sieve with mesh no.180. The samples were kept at room temperature in well-closed containers and protected from light.

3. **Authentic sample:** The fresh rhizomes of the 'Krachai-dam' authentic sample were collected from Loei Province, Thailand for using in this study. Some of them were grown in the nursery until reaching the flowering period. The flowering specimens were identified by basing on the literatures[5, 6]. As a result, this plant is *Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker in the family Zingiberaceae. The voucher specimen, Department of Medical Sciences (DMSc) Herbarium No. 1575, was kept at the Department of Medical Sciences Herbarium.

   To obtain the authentic crude drug, a 0.5-kg portion of the fresh rhizome was washed, sliced into small pieces, then dried in an oven at 50°C for 48 hours. The dried materials were ground and passed through a sieve with mesh no. 180. The dried sample was kept at room temperature in a well-closed container and protected from light.

3. **Standard substances:** Borneol ($C_{10}H_{18}O$, MW=154.24) and caffeic acid ($C_9H_8O_4$, MW=180.15) were purchased from Sigma, U.S.A.
4. **Silica gel G:** TLC precoated plate 20 x 20 cm, layer thickness 0.25 mm, Art. 5721 from E. Merck, Germany.
5. **Silica gel GF254:** TLC precoated plate 20 x 20 cm, layer thickness 0.25 mm, Art. 5715 from E. Merck, Germany.
6. **Refractometer:** The refractive index values were determined by the refractometer (Carl Zeiss, Germany).
7. **Solvents and chemicals used:** All of them are analytical grade.

Methods

1. Chemical identification

1.1 Preliminary test

Test Solution: Sample 1 g was refluxed with 20 ml of ethanol for 5 minutes and filtered through cotton.

Ethanolic sulfuric acid: Conc. sulfuric acid (5 ml) was diluted with 95% ethanol to 100 ml.

Vanillin-sulfuric acid Test Solution (TS): Vanillin (1 g) was dissolved in 100 ml of ethanolic sulfuric acid. The solution was freshly prepared before using.

Ethanolic ninhydrin Test Solution (TS): Ninhydrin (1 g) was dissolved in 50 ml of 95% ethanol and mixed with 10 ml of glacial acetic acid.

1.1.1 For crude drugs

Procedure:

A. Examination of terpenoids: Test solution (5 ml) was decolorized with 1 g of activated charcoal, mixed well and filtered. Vanillin-sulfuric acid TS (2 drops) was added to the filtrate, mixed well and heated in a boiling water-bath for

2 minutes. The color of the solution was noted.

B. Examination of anthocyanins: Test solution (2 ml) was mixed with 1 drop of a 5% w/v solution of potassium hydroxide and the color of the solution was noted. Then, a 20% v/v solution of conc. sulfuric acid (1 drop) was added to the solution and the color of the solution was noted.

C. Examination of primary amine or amino acids: Test solution (2 drops) was dropped on a filter paper and air-dried at room temperature. Ethanolic ninhydrin TS (1 drop) was added to the same spot on the paper and dried in a current of hot air. The color of the paper was noted.

D. Examination of flavonoids: Magnesium ribbon (1 piece) was added to 2 ml of test solution, shaken well, and mixed with 2 drops of conc. hydrochloric acid. The color of the solution was noted.

1.1.2 For volatile oils

Sample preparation

1.1.2.1 To obtain the volatile oil samples, a 1-kg portion of each fresh rhizome was washed and sliced into small pieces, then distilled with water (note: seven samples were omitted because the amount of rhizomes were not adequate to perform the test). The volatile oils were kept at 4°C in well-closed containers and protected from light.

1.1.2.2 To obtain the authentic volatile oil, a 1-kg portion of the fresh rhizomes was washed and sliced into small pieces, then distilled with water. The authentic volatile oil was kept at 4°C in well-closed containers and protected from light.

Procedure :

To examine terpenoids, the volatile oil sample (1 drop) was added to 0.5 ml of 95 % ethanol and mixed well. Vanillin-sulfuric acid TS (2 drops) was added to the mixture, mixed well, and the color of the solution was noted[7].

1.2 Confirmatory test (Thin-layer chromatography)

1.2.1 For crude drug extracts

Sample solution:	Sample (0.5 g) was refluxed with 10 ml of methanol for 5 minutes, shaken frequently, allowed to cool, and filtered. The filtrate was adjusted to 10 ml with methanol.
Standard solution:	Caffeic acid (1 mg) was dissolved in 10 ml of methanol.
Adsorbant:	TLC plate silica gel GF254.

Developing solvent: Hexane: Ethyl acetate: Formic acid (60: 30: 5).

Developing distance: 10 cm.

Spotting amount: 5 µl each.

Spraying reagent: Natural products-polyethyleneglycol reagent (NP/PEG reagent) was prepared as followed[8].

NP reagent: Diphenylboric acid-2-aminoethyl ester (1 g) was dissolved in 100 ml of methanol.

PEG reagent: Polyethylene glycol 4000 (5 g) was dissolved in 100 ml of 95% ethanol.

Detection:

1. The plate was observed under UV 254.
2. The plate was observed under UV 366.
3. The plate was heated at 80°C for 10 minutes, then sprayed while the plate was still warm with NP reagent. Subsequently, the plate was sprayed with PEG reagent. The plate was allowed to dry in air and observed under UV366.

1.2.2 For volatile substances

Samples were tested using Thermomicro Analysis and Separation (TAS) Oven Method[9].

Sample amount: Sample of dried rhizomes (0.8 g) was used.

Standard solution: Borneol (4 mg) was dissolved in 1 ml of ethyl acetate.

Temperature (time): 30°C (3 min), 50°C (5 min), 70°C (5 min), 90°C (5 min), 110°C (5 min), 135°C (3 min), 150°C (5 min), 160°C (3 min), and 190°C (3 min).

Adsorbant: TLC plate silica gel G.

Developing solvent: Hexane: Ethyl acetate: Acetic acid (90: 10: 1).

Developing distance: 15 cm.

Spotting amount: 1 µl each.

Spraying reagent: Vanillin - phosphoric acid Test Solution (TS)[9]. Vanillin (1 g) was dissolved in 25 ml of

95% ethanol, mixed with 25 ml of distilled water and 35 ml of *ortho*-phosphoric acid, respectively. The solution was freshly prepared before using.

Detection: After spraying with vanillin - phosphoric acid TS and heating at 120°C for 10 minutes, the spots were observed as follows:

1. in daylight.
2. under UV 366.

1.2.3 For volatile oil

Sample solutions: The volatile oil sample (10 µl) was diluted with 95% ethanol to 200 µl.

Standard solution: Borneol (4 mg) was dissolved in 1 ml of ethyl acetate.

Adsorbant: TLC plate silica gel G.

Developing solvent: Hexane: Ethyl acetate: Acetic acid (90: 10: 1).

Developing distance: 15 cm.

Spotting amount: 1 µl each.

Spraying reagent: Vanillin-phosphoric acid TS.

Detection: Similar to the detection for volatile substances (1.2.2).

2. Quality Evaluation of Crude Drugs

2.1 Determination of ash

Total ash and acid-insoluble ash contents were carried out using the methods in Thai Herbal Pharmacopoeia[10].

2.2 Determination of extractives

Water-soluble and ethanol-soluble extractives were carried out using the methods in Thai Herbal Pharmacopoeia[10].

2.3 Determination of water (azeotropic distillation method)

Water was determined using the method in Thai Herbal Pharmacopoeia[10].

3. Physicochemical Evaluation of Volatile Oil

3.1 Description

Samples were described for organoleptic characteristics.

3.2 Solubility

The solubility of samples was carried out at room temperature, using the

definition described in Thai Pharmacopoeia[11].

3.3 Refractive index

The refractive index of samples was carried out at 20°C, using the method in Thai Pharmacopoeia[11].

3.4 Relative density

The relative density of samples was carried out at 20°C, using the method in Thai Pharmacopoeia[11].

RESULTS

1. Chemical identification

1.1 Preliminary test

1.1.1 For crude drugs

The color reactions of the crude drug samples and the authentic sample were performed in order to test terpenoids, anthocyanins, primary amine/amino acids, and flavonoids. The results of all tests were described as follows.

A. Examination of terpenoids: The preliminary test of twenty-five samples of the crude drugs and the authentic sample were performed in addition of vanillin-sulfuric acid TS and the blue color was developed. The results were positive to terpenoids.

B. Examination of anthocyanins: The preliminary test of twenty-five samples and the authentic sample were performed in the addition of potassium hydroxide and the green to blue color of test solution was produced. The color of the solution was changed to red in the addition of conc. sulfuric acid. The results were positive to anthocyanins.

C. Examination of primary amine or amino acids: The preliminary test of twenty-five samples and the authentic sample were performed in the addition of ethanolic ninhydrin TS to the same spot of test solution on the filter paper and the violet color was produced. The results were positive to primary amine or amino acids.

D. Examination of flavonoids: The cyanidin reaction of twenty-five samples and the authentic sample was performed in the addition of magnesium ribbon and conc. hydrochloric acid, and the red color of the solution was produced. The results were positive to flavonoids.

1.1.2 For volatile oil

The results of the percentage yields of the volatile oil obtained from eighteen samples of crude drugs and the authentic sample are shown in Table 1.

Table 1 The percentage yields (% v/w) of volatile oil distilled by water from the authentic sample and "Krachai-dam" fresh rhizomes

Sample	% Volatile Oil* (%v/w)
Authentic sample	0.04
1	0.07
2	0.05
3	0.06
4	0.09
5	0.08
6	0.05
7	0.05
8	0.12
9	0.08
10	0.08
11	0.11
12	0.14
13	0.16
14	0.16
15	0.10
16	0.10
17	0.10
18	0.10
$\bar{X} \pm$ SD (n= 18)	0.094 ± 0.034

* Single test was performed.

To test terpenoids, the color reactions of the volatile oil samples and the authentic volatile oil were performed in the addition of vanillin-sulfuric acid TS and the purple color was produced. The results were positive to terpenoids.

1.2 Confirmatory test (Thin-layer chromatography)

1.2.1 For crude drug extracts

The confirmatory tests of twenty-five samples of the crude drugs and the authentic sample were performed by thin-layer chromatography. The results are shown in Table 2 and Figure 3.

Table 2 hR_f Values of components in the methanolic solution of the crude drugs of "Krachai-dam" rhizomes

Spots	hR_f Value	Detection with		
		UV254 (before spraying with NP/PEG reagent)	UV366* (before spraying with NP/PEG reagent)	UV366* (after spraying with NP/PEG reagent)
1	18-19	violet	green	blue
2	27-29	blue	blue	blue
3	31-32	—	blue-green	blue
4	36-37	quenching	green	green
5	41-43	quenching	green	blue
6	53-58	quenching	violet	yellow-green
7	56-62	quenching	violet	yellow-green
8	63-73	quenching	violet	yellow-green
9	71-80	quenching	violet	yellow-green
10	76-83	quenching	yellow	orange
11	84-92	quenching	green	orange

*Fluorescent spots

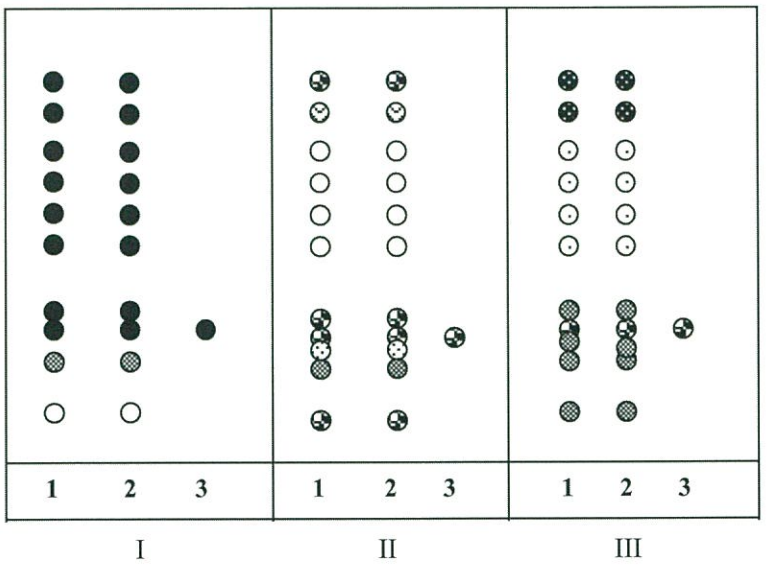


Figure 3 Thin-layer chromatograms of the crude drug extracts of "Krachai-dam" rhizomes and the authentic sample, using a mixture of hexane-ethyl acteate-formic acid (60: 30: 5) as the developing solvent.

1 = authentic sample
2 = crude drug extracts
3 = standard caffeic acid
I = detection with UV254
II = fluorescence under UV366
III = fluorescence under UV366 after spraying with NP/PEG reagent
○ = violet
◍ = blue
● = quenching
◕ = green
◌ = blue-green
⊙ = yellow-green
◔ = yellow
◉ = orange

1.2.2 For volatile substances

The volatile substances of twenty-five samples of crude drugs and the authentic sample were performed by TAS oven method. The results are shown in Table 3 and Figure 4.

Table 3 hR_f Values of the volatile substances of the crude drugs of "Krachai-dam" rhizomes

Spots	hR_f Values	Detection with	
		Day light	UV366*
1	2	–	blue
2	9 - 12	violet	–
3	21 - 23	–	blue
4	26 - 28	blue violet	orange
5	31 - 34	brown violet	yellow
6	41 - 43	wine red	orange
7	69 - 72	violet	–
8	71 - 77	yellow	–
9	80 - 83	–	blue
10	92 - 96	red violet	–

* Fluorescent spots

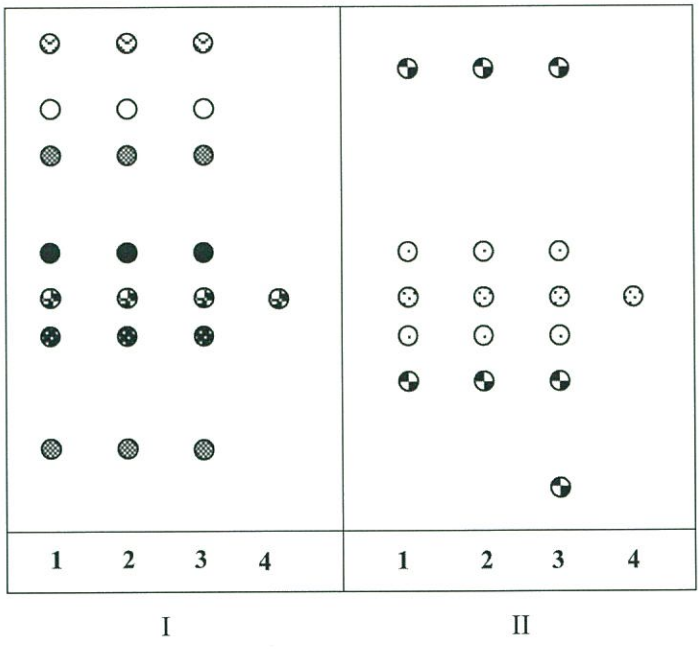


Figure 4 Thin-layer chromatograms of the volatile oil, the volatile substances of "Krachai-dam" rhizomes and the authentic volatile oil, using a mixture of hexane-ethyl acetate-acetic acid (90:10:1) as the developing solvent.

1 = authentic sample
2 = volatile oil
3 = volatile substances
4 = standard borneol
I = visible in day light after spraying with vanillin-phosphoric acid TS
II = fluorescence under UV366 after spraying with vanillin-phosphoric acid TS
= violet
= blue violet
= brown violet
= wine red
= yellow
= red violet
= blue
= orange
= yellow

1.2.3 For volatile oil

The confirmatory tests of eighteen samples of the volatile oil and the authentic volatile oil were performed by thin-layer chromatography. The results are shown in Table 4 and Figure 4.

Table 4 hR_f values of components in the methanolic solution of the volatile oil of "Krachai-dam" rhizomes.

Spots	hR_f Values	Detection with	
		Day light	UV366*
1	9 - 12	violet	—
2	21 - 23	—	blue
3	26 - 28	blue violet	orange
4	31 - 34	brown violet	yellow
5	41 - 43	wine red	orange
6	69 - 72	violet	—
7	71 - 77	yellow	—
8	80 - 83	—	blue
9	92 - 96	red violet	—

*Fluorescent spots

2. Quality evaluation of crude drugs

To evaluate the general qualities of crude drugs, five tests were performed. The results of determinations of total ash, acid-insoluble ash, water-soluble extractive, ethanol-soluble extractive, and water content are shown in Table 5.

Table 5 Quality evaluation of the crude drugs of "Krachai-dam" rhizomes

Test	*Authentic sample*	$\bar{X} \pm$ S.D. (n = 25)	$\bar{X}$ + 10%	$\bar{X}$ - 10%
Total ash*	4.64	5.05 ± 1.08	5.56	—
Acid-insoluble ash*	1.21	1.41 ± 0.69	1.55	—
Water-soluble extractive*	20.25	19.26 ± 2.52	—	17.33
Ethanol-soluble extractive*	8.74	8.87 ± 1.41	—	7.98
Water* (Azeotropic distillation method)	8.33	8.82 ± 0.72	9.70	—

* Duplicate tests were performed.

3. Quality evaluation of volatile oils

3.1 Description

The volatile oils were clear and yellow liquid. They had characteristic aromatic odor and bitter taste followed by a sensation of cold.

3.2 Solubility

The volatile oils were very soluble in 95% ethanol, ethyl acetate, chloroform, and hexane. They were very slightly soluble in distilled water.

3.3 Refractive index

The results of the refractive index of eighteen samples and the authentic volatile oil are shown in Table 6.

Table 6 The refractive index at 20°C of the volatile oil of "Krachai-dam" rhizomes

Sample	Refractive index* at 20°C
Authentic sample	*1.4712*
1	1.4730
2	1.4759
3	1.4720
4	1.4755
5	1.4710
6	1.4750
7	1.4760
8	1.4719
9	1.4760
10	1.4710
11	1.4730
12	1.4711
13	1.4720
14	1.4723
15	1.4723
16	1.4740
17	1.4735
18	1.4730
$\bar{X} \pm$ S.D. (n=18)	1.4731 ± 0.0018

* Single test was performed.

3.4 Relative density

The results of the relative density of five samples and the authentic volatile oil are shown in Table 7.

Table 7 The relative density of the volatile oil at 20°C of "Krachai-dam" rhizomes

Sample	Relative density* at 20°C
Authentic sample	0.9811
1	0.9809
2	0.9831
3	0.9798
4	0.9815
5	0.9795
$\bar{X} \pm$ S.D. (n = 5)	0.9810 ± 0.0014

* Single test was performed.

DISCUSSION

Since crude drugs are of natural origin, their qualities were dependent on cultivation, collection, preparation, and storage[12]. To evaluate the qualities of so called 'Krachai-dam' rhizomes, the chemical identification of twenty-five samples from various sources in central, eastern and northeastern parts of Thailand during December 2001 to May 2002 were performed compared to the authentic sample by both preliminary tests and thin-layer chromatography (TLC). From the preliminary tests, the results of the color tests of crude drugs samples were positive to terpenoids, anthocyanins, primary amine/amino acids, and flavonoids. Using vanillin-sulfuric acid TS, terpenoids of volatile oils were detected by forming the different colors (*i.e.*, violet-red, blue, yellow, or violet-brown)[13]. The primary amine or amino acids were detected by the appearance of violet color with ethanolic ninhydrin TS[13]. Like indicator, the anthocyanins, color pigments in plants, produced the red color in the addition of acid and the green to blue color in the addition of alkali[12]. The cyanidin reaction provided a positive result of flavonoids by producing the red color in the addition of magnesium ribbon and conc. hydrochloric acid[12]. The TLC patterns of the crude drugs samples and the authentic sample were carried out on silica gel GF254 using a mixture of hexane-ethyl acetate-formic acid (60:30:5) as a mobile phase and detected with NP/PEG reagent, which was a specific reagent for flavonoids detection[8]. This system provided a clear result of the separation of different compounds (Figure 3). It was found that caffeic acid, as a marker, showed similar hR_f values (36-37) and color to spot 4 in the samples. Other orange or yellow-green spots indicated other flavonoids.

Other quality evaluation studies, *i.e.*, determination of ashes, extractives and water content, were performed for the crude drug samples and the authentic sample. The total ash consists of physiological ash and non-physiological ash[14]. The "physiological ash" is obtained from the plant tissue and the "non-physiological" ash is obtained after ignition of contaminants (e.g. sand and soil). The determination of acid-insoluble ash provides the presence of silica, especially sand and siliceous earth. The variation of ash contents indicates the quality change of samples. More contaminants will rise the ash contents. The extractions provide the amount of active constituents in a given amount of samples extracted with different solvents when there is no suitable assay method[14]. The use of a suitable solvent is helpful to provide preliminary information of a particular drug sample. The excessive moisture content in plant materials leads to the deterioration due to the microbial growth, the presence of fungi or insects, and deterioration following hydrolysis reaction[14]. Therefore, it is important to set limits for the water content, especially for some plant materials, which absorbs moisture easily or deteriorates quickly in the presence of water[14]. The azeotropic distillation method is appropriate for samples containing volatile substances[14]. In this study, determinations of total ash, acid-insoluble ash, water-soluble extractive, ethanol-soluble extractive, and water content of the authentic sample were similar to those of crude drug samples (Table 5). Thus, the appropriate specification of quality control of the crude drugs was established as shown in the conclusion.

There are many methods for extraction of volatile oils. The popular methods are steam distillation and water distillation. In general, steam distillation is suitable for the fresh sample while water distillation works for the dried one. However, for the volatile oils of 'Krachai-dam' rhizome, we found that water distillation provided better yields of volatile oils from the fresh samples than steam distillation. The water distillation of the eighteen samples yielded the average as 0.09 $\pm$ 0.03 % v/w ($\bar{X} \pm$ S.D.), while the water distillation of the authentic sample yielded 0.04 % v/w. The chemical constituents of various volatile oils samples of 'Krachai-dam' rhizomes were identified compared to the authentic sample by preliminary test and thin-layer chromatography. From the preliminary test, terpenoids were tested with vanillin-sulfuric acid TS, producing the purple color. Thin-layer chromatography was carried out on silica gel G using a mixture of hexane-ethyl acetate-acetic acid (90:10:1) as a mobile phase. The chromatograms were sprayed with vanillin-phosphoric acid TS and detected with visible light and UV366. It was found that all samples had similar TLC patterns, compared to the authentic sample (Figure 4). Spot 4 of the volatile oil corresponded to borneol, a marker, which was a brown-violet-colored spot (observed in visible light) and a yellow-colored spot (observed under UV366) with hR_f values 31-34 (Table 4, Figure 4). The TAS oven method is very useful for studying the volatile substances because it is simple, rapid, and sensitive. Therefore, the volatile substances of the 'Krachai-dam' rhizomes were investigated using TAS oven method compared to the constituents

of those volatile oils. The results of TLC chromatograms indicated that 10 spots of the volatile substances of the 'Krachai-dam' rhizomes were identified, which nine spots (spots 2-10 of Table 3 and spots 1-9 of Table 4) were corresponded to those of the volatile oils (Figure 4). Therefore, TAS oven method is suitable for detection of volatile substances in 'Krachai-dam' crude drugs.

The physicochemical properties of the volatile oils from the 'Krachai-dam' rhizomes were also studied for identity purpose in terms of the refractive index and the relative density. The refractive index of the volatile oils was measured at 20°C[11] as shown in Table 6. The average and its variation of the refractive index ($\bar{X} \pm$ S.D.) was 1.4731 ± 0.0018. Many pharmacopoeias (i.e., Thai Pharmacopoeia) express the refractive index to three decimal digits[12], thus the refractive index was established in terms of three decimal places as shown in the conclusion. The relative density of the volatile oils was measured at 20°C, compared to water[12] (Table 7). The average and its variation of the relative density ($\bar{X} \pm$ S.D.) was 0.9810 ± 0.0014. As the same reason of the refractive index, the relative density was also set up in terms of three decimal values as shown in the conclusion.

CONCLUSION

The results of the preliminary showed that the 'Krachai-dam' rhizomes contained terpenoids, anthocyanins, primary amine/amino acids, and flavonoids compounds. The results of the confirmatory tests confirmed that the 'Krachai-dam' rhizomes contained terpenoids and flavonoids. From the results of the quality control study, the qualities of the crude drugs of 'Krachai-dam' rhizomes were proposed from the results of the maximum limits ($\bar{X}$ + 10%) for the limited amount of determination of the term "not more than" such as the ashes and the water content, and the results of the minimum limits ($\bar{X}$ -10%) for the limited amount of determination of the term "not less than" such as the extractive contents. Therefore, the specification of the crude drugs is proposed as follows:

Total ash: not more than 6% w/w

Acid-insoluble ash: not more than 2% w/w

Water-soluble extractive: not less than 17% w/w

Ethanol-soluble extractive: not less than 8% w/w

Water: not more than 10% v/w

The results of the preliminary and confirmatory tests showed that the volatile oil of 'Krachai-dam' rhizomes contained terpenoids compounds. From the results of the physico-chemical evaluation, the specification of the volatile oil of "Krachai-dam" rhizomes is established as follows:

Refractive index, at 20°C: 1.471 - 1.476

Relative density, at 20°C: 0.980 - 0.983

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are indebted to Prof. Dr. Puangpen Sirirugsa, Department of Biology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, for her helpful advice for the botanical identification of authentic sample.

REFERENCES

1. สมิตินันท์ ต. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย, พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : บริษัทประชาชน จำกัด. 2544: 303.
2. มะลิสุวรรณ พ. สมุนไพรเพื่อสุขภาพ. กระชายดำ. กรุงเทพฯ: บริษัท สำนักพิมพ์ยูทิไลซ์ จำกัด. 2545: 67-7.
3. Hudson, W. D. Summary of April 2000 Meeting of the New England Botanical Club. 2000: 1-3. (*http://www.huh.harvard.edu/nebc/Summaries/2000/Apr00sum.html*).
4. ธนะศิริวัฒนา ณ., ณ ตะกั่วทุ่ง ส., ฐานะจาโร ธ., และคณะ. องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ต้านจุลชีพของน้ำมันระเหยจากเปราะหอม กระชายดำ และเฒ่าหนังแห้ง. ฝ่ายวิชาการ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2541.
5. Backer, C. A. and Bakhuizen Van Den Brink, R. C. Flora of Java. Vol. III. Wolters, Noordhoff N. V., Groningen, The Netherlands. 1968: 41-2, 67-8.
6. Sirisugsa, P. Taxonomy of the genus *Kaempferia* (Zingiberaceae) in Thailand. Thai For. Bull. (Bot.). 1992: 19: 1-15.
7. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. Beijing: the People's of Republic of China. 1988: 6.
8. Wagner, H., Bladt, S., Zgainski, E. M. Plant Drug Analysis. 1990: 303-4.
9. Brain KR, Turner TD. The Practical Evaluation of Phytopharmaceuticals. Wright-Scientechnica, Bristol. 1975: 81-4.
10. Thai Herbal Pharmacopoeia. Vol. II. Bangkok: Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. 2000: 136-7, 141-2.
11. Thai Pharmacopoeia. Vol. I Part 1. Bangkok: Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, 1987: 7, 388-1.
12. กฤษณพันธ์ ว. พฤกษเคมีเบื้องต้น. ใน: จิรัจฉริยากูล ว, บรรณาธิการ. ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ, พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 2534: 4.3.
13. Moffat, A.C. Clarke's Isolation and Identification of Drugs. The Pharmaceutical Press. London. 1986: 142.
14. Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials. WHO/Pharm. 92.559. 1992:25-1.

การศึกษาการควบคุม คุณภาพของลำต้นขมิ้นเครือ (Quality Control Study of *Arcangelisia flava* Stem)

เย็นจิตร จิวเวชดำรงค์กุล, วารุณี จิรวัฒนาพงศ์
ทวีผล เดชาติวงศ์ ณ อยุธยา
กองวิจัยและพัฒนาสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการควบคุมคุณภาพของลำต้นขมิ้นเครือ จำนวน 20 ตัวอย่าง ซึ่งสุ่มตัวอย่างจากร้านขายยาแผนโบราณในกรุงเทพฯ และนนทบุรีระหว่างเดือน มกราคม 2532-2534 โดยศึกษาเปรียบเทียบกับตัวอย่างจากสวนสมุนไพรกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จันทบุรี เบอร์เบอรีน (berberine) เป็นแอลคาลอยด์หลักที่พบในสมุนไพรชนิดนี้มีสรรพคุณแก้ท้องร่วงและเป็นยาเจริญอาหารจึงได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณเบอร์เบอรีนในตัวอย่างสมุนไพรชนิดนี้โดยใช้เทคนิคการแยกและทำให้สารบริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี (column chromatography) โดยใช้คอลัมน์ขนาดเล็ก (mini column) ที่บรรจุอลูมิเนียมออกไซด์ (alumina) เพียง 2.5 กรัม จากนั้นนำสารละลายของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปวัดค่าความเข้มข้นโดยวิธีสเปคโตรโฟโตเมตรี (spectrophotometry) ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็วและมีความถูกต้องแม่นยำ นอกจากนี้ได้จัดทำข้อกำหนดมาตรฐานทางเคมีของสมุนไพรนี้ไว้ด้วย

ABSTRACT

Quality control study of 20 samples of Khamin-krua, *Arcangelisia flava* (L.) Merr. stems, purchased from different traditional drugstores in Bangkok and Nonthaburi during January 1989-1991 was performed compared to the authentic samples from Chanthaburi botanical garden. The principal alkaloid of Khamin-krua, berberine,has been used as antidiarrheal and stomachic. The assay was carried out by column chromatography using only 2.5 g of alumina in small column for the purification of berberine and determined its concentration by spectrophotometry. The method was simple, rapid and sentitive for routine analysis. The appropriate chemical specification was also established.

Key words : Khamin-Krua, *Arcangelisia flava*, Quality control, Berberine, Spectrophotometry.

Introduction

Khamin-krua is a local name for several Thai medicinal plants belonging to different botanical origins i.e. *Anamirta cocculus* Wight & Arn. (Menispermaceae)[1], *Arcangelisia flava* (L.) Merr. (Menispermaceae)[1-3], *Combretum acuminatum* Roxb. (Combretaceae)[1,4] and *Fibraurea tinctoria* Lour. (Menispermaceae)[5,6]. Traditionally, the stem of khamin-krua has been used as stomachic, blood tonic, emmenagogue and astringent; flowers are used as antidysentery; roots are used to treat orchitis, red eyes, blepharitis and to improve lymph quality[7-9]. Panvisavas et al.[10] reported that khamin-krua from old-styled drugstores in Bangkok, Chanthaburi botanical garden and Songkhla province were derived from different plants. Khamin-krua from old-styled drugstores in Bangkok was different from the one from Chanthaburi botanical garden, but the rhizomes of both plants contained berberine and palmatine alkaloids while the one from Songkhla province contained palmatine and jatrorrhizine alkaloids with no berberine. Amatayakul and Pecharaply[2] reported that Khamin-krua from Chanthaburi botanical garden was botanically identified as *Arcangelisia flava* (L.) Merr. (Menispermaceae). Boonyaprakarn et al.[6] solated palmatine and jatrorrhizine alkaloids from the stems of khamin-krua derived from *Fibraurea tinctoria* Lour. (Menispermaceae).

Khamin-krua used in this study was derived from *Arcangelisia flava* (L.) Merr. It is a climber with bright yellow wood (Figure 1)[2], wildly distributed in south eastern and southern parts of Thailand.[11] The stems contain berberine[12-15], columbamine[13], palmatine[13-15], jatrorrhizine, pycenarrhine, dehydrocorydalmine, thalifendine, 8-hydroxyberberine, limacine, homoaromoline[15], 6-hydroxyarcangelisin, 2-dehydroarcangelisinol, tinophylol, 6-hydroxyfibleucin, 6-hydroxyfibraurin and fibleucin[16] (Figure 2).

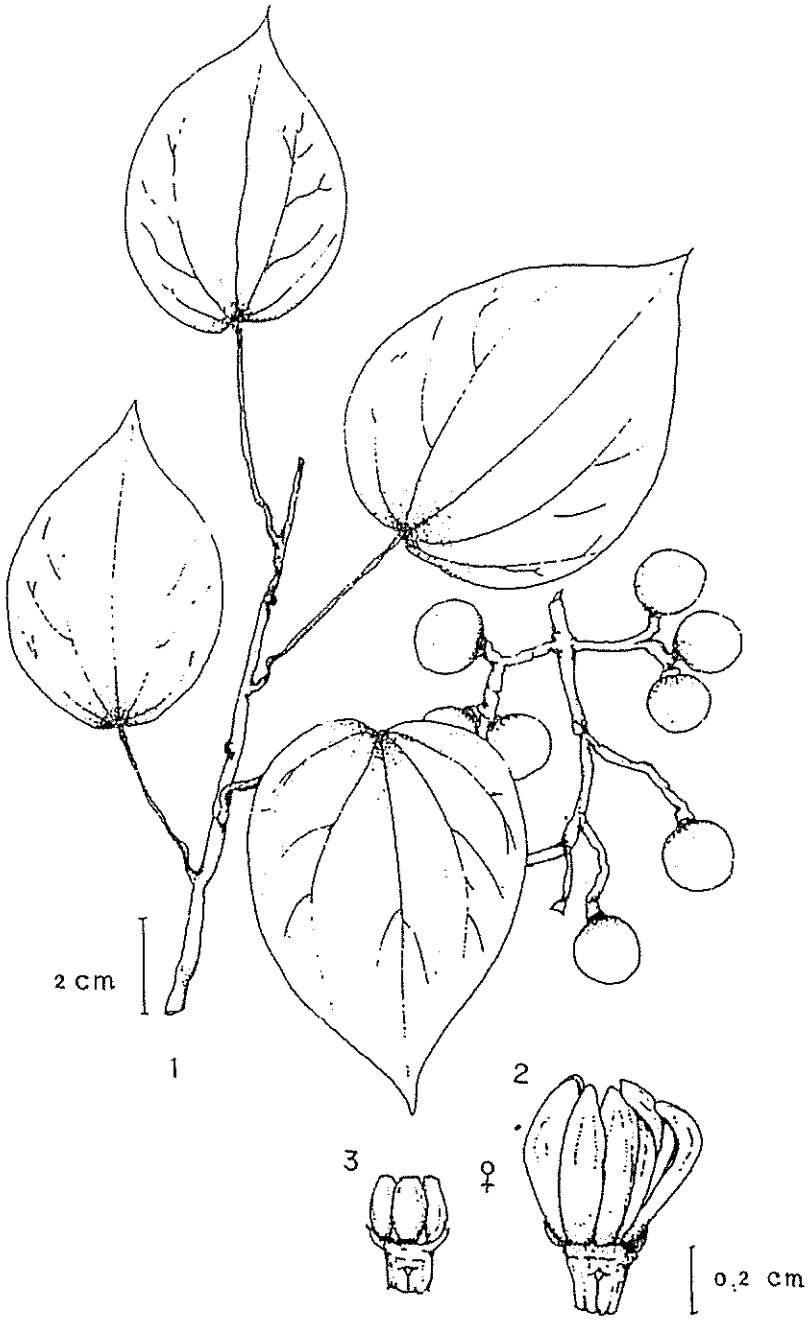
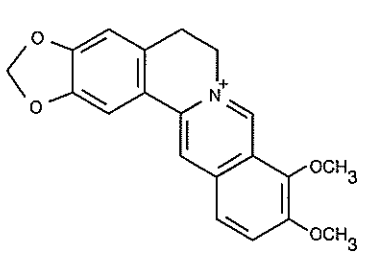
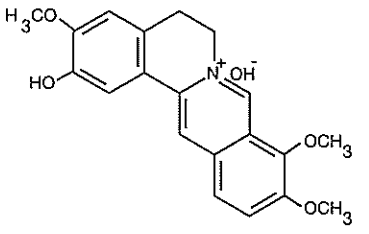


Figure 1 : The sketches of *Arcangelisia flava* (L.) Merr.

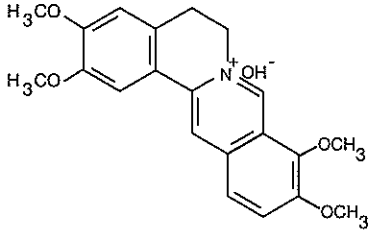
1. The stems, leaves and fruits.
2. The female flower.
3. The ovaries.



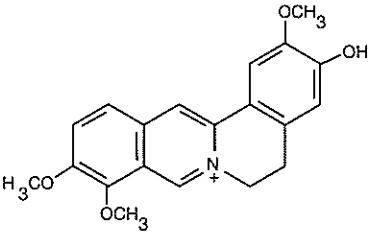
berberine



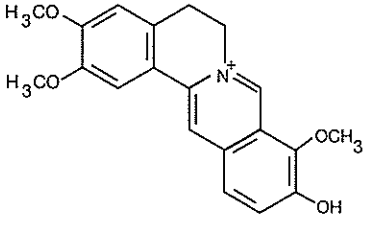
columbamine



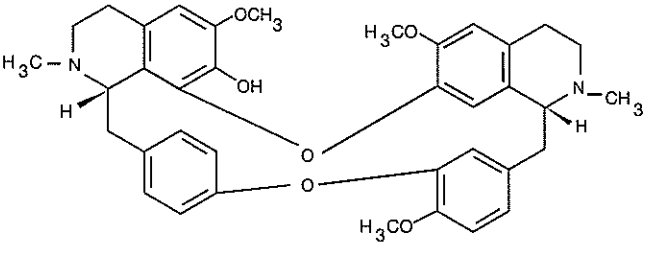
palmatine



jatrorrhizine



dehydrocorydalmine



homoaromoline

Figure 2 Structural formula of some alkaloids in *Arcangelisia flava* (L.) Merr. stems.

Berberine has been shown to be the principal alkaloid in this plant[13]. Generally, plants containing berberine have been used as antidiarrheal agent and stomachic in Chinese, Japanese and Korean medicinal preparations[11].

Since Khamin-krua (*Arcangelisia flava* (L.) Merr.) contains berberine, an effective anti-diarrheal agent. Thus for the purpose of the promotion and mobilization of this medicinal plant applications, the authors have considered making a systematic study of its quality, then setting up it standard specifications. Moreover, a satisfactory assay procedure for berberine content in the crude drug was also investigated.

Materials and Methods

Materials

1. Sieve: Aperture 180 microns, mesh no. 80 from Endecotts Ltd., London, England.
2. Microsoxhlet extracting apparatus consisting of a 35-ml flat-bottom flask with ground joint cone NS 12/19 and a 10-ml microsoxhlet extractor with condenser socket NS 24/25 and flask socket NS 12/18.
3. Column: Glass column, about 9 mm in internal diameter and about 15 cm long.
4. Extraction thimbles: Cellulose, single thickness, internal diameter X external length 10 mm X 50 mm, external diameter X external length 12 mm X 50 mm from Whatman Ltd., England.
5. Double beam spectrophotometer : JASCO, Model UVIDEC-650, 1-cm cells.
6. Authentic samples of crude drugs : Two fresh samples of Khamin-krua stems were collected from Chanthaburi botanical garden in April 1989 and October 1991. Its botanical origin was identified as *Arcangelisia flava* (L.) Merr. by Botanical Section, Division of Medicinal Plant Research and Development, Department of Medical Sciences, DMS Herbarium no. 875. The stems were washed thoroughly, then cut into small pieces and dried in an oven at 45°-50°C for 15 hrs. The dried samples were ground to powder, then passed through sieve no. 180 and kept in well-closed containers.
7. Crude drug samples : Twenty samples of Khamin-krua stems were purchased from different traditional drugstores in Bangkok and Nonthaburi during January 1989-1991. Other foreign substances were removed from the samples and cut into small pieces. Its pharmacognostical characteristics were studied by comparison with the authentic samples and were identified by Pharmacognostical Section, Division of Medicinal Plant Research and Development, Department of Medical Sciences. Each crude drug sample was ground to powder, passed through sieve no. 180 and kept in well-closed containers.
8. Standard substances : Berberine chloride was purchased from Fluka AG, CH-9470

Buchs, Switzerland. Palmatine iodide was isolated and identified by Phytochemical Section, Division of Medicinal Plant Research and Development, Department of Medical Sciences.

9. Neutral aluminum oxide and silica gel 60 TLC plates, precoated 20 X 20 cm, layer thickness 0.25 mm, Art. 5721 from E. Merck, Germany.
10. Solvents and chemicals were all analytical grade.

Methods

1. Chemical identification

A. Preliminary test

Test solution: Sample 1 g was refluxed with 25 ml of methanol for 10 min and filtered.

Reagent :

1. Conc. nitric acid.
2. Ether.
3. Hydrogen peroxide TS.....A 3 per cent w/v of hydrogen peroxide in water.
4. Conc. hydrochloric acid.
5. Dragendorff TS..... Bismuth subnitrate 0.85 g was dissolved in a mixture of 40 ml of water and 10 ml of glacial acetic acid. A 40 percent w/v solution of potassium iodide (50 ml) was added and mixed. This stock solution was refrigerated for prolonged storage. For use, this stock solution (10 ml) was mixed with 20 ml of glacial acetic acid and diluted with water to 100 ml.
6. 3 N Sulfuric acid..... Sulfuric acid (84 ml) was carefully added to water, and diluted to 1,000 ml with water.
7. 0.1 N Potassium permanganate..... About 3.3 g of potassium permanganate were dissolved in 1,000 ml of water in a flask, and the solution was boiled for about 15 min. The stopper was inserted in the flask, and it was allowed to stand for at least 2 days, and filtered.

Procedure :

1. Test solution 2 ml were observed under UV_{366} and the color was noted.
2. Conc. nitric acid 0.5 ml was added to 2 ml of test solution, mixed well and the color of the solution was noted.
3. Test solution 2 ml were evaporated until dryness, the residue was dissolved with 2 ml of ether, then 0.5 ml of hydrogen peroxide TS was added, mixed well and conc. hydrochloric acid 1 ml was carefully added. The color of the ring at the zone of contact was noted.

4. Test solution 1 ml was evaporated until dryness, then a few drops of Dragendorff TS were added and the color of the precipitate was noted.
5. Test solution 5 ml were evaporated until dryness, the residue was dissolved with 2 ml of 3 N sulfuric acid, then a few drops of 0.1 N potassium permanganate were added and the color of potassium permanganate on warming was noted.

B. Confirmatory test (Thin-layer chromatographic analysis)

Standard condition : Normal saturation, room temperature.

Test solution : Sample 0.5 g was refluxed with 20 ml of methanol for 5 min and filtered. The filtrate was evaporated under reduced pressure to 5 ml.

Standard solution : Separately dissolved 1 mg each of berberine chloride and palmatine iodide in 1 ml of water.

Layer : TLC plate silica gel 60.

Developing solvent : Butanol-acetic acid-water 7:1:2

Developing distance : 12 cm.

Spotting amount : 2 µl each.

Spray reagent : Dragendorff TS.

Detection :
1. Visible in daylight.
2. Fluorescence under UV_{366}.
3. Visible with Dragendorff TS.

II. Determination of ash

Total ash and acid-insoluble ash contents were carried out using the methods in Thai Pharmacopoeia[17].

III. Determination of extractives

Water-soluble and ethanol-soluble extractives were carried out using the methods in British Pharmacopoeia[18]. Chloroform-soluble extractive was determined as described in the United States Pharmacopoeia, using chloroform instead of hexane[19].

IV. Determination of loss on drying

Loss on drying was determined as described in Thai Pharmacopoeia[17].

V. Determination of berberine in crude drug

1. Preparation of standard solutions

About 4, 8, 12, 16 and 20 mg of berberine chloride, previously dried at 110°C for 4 hr, were accurately weighed and placed in separate 50-ml volumetric flasks, dissolved with 25 ml of methanol, then diluted to volume with hydrochloric acid-methanol 1:100 and mixed well. The concentrations of standard solutions obtained were 0.08, 0.16, 0.24, 0.32 and 0.40 mg/ml, respectively.

2. Selection of a proper wavelength

Two and a half ml of standard solution at a concentration of 0.24 mg/ml were transferred to a 25-ml volumetric flask, then diluted to volume with ethanol and mixed well. Ten ml of this solution were transferred to a 25-ml volumetric flasks, diluted to volume with 0.5 M sulfuric acid and mixed well.

The ultraviolet absorption spectrum of the solution in 1-cm cells scanned through a wavelength range from 200-500 nm was recorded.

3. Preparation of aluminum oxide column

Aluminum oxide column was prepared by filling the mini column with 2.5 g of neutral aluminum oxide using wet method, then washed with about 15 ml of ethanol.

4. Preparation of the calibration curve for berberine chloride

Two and a half ml of each standard solution was accurately applied to separate pretreated aluminum oxide columns, eluted with 15 ml of ethanol in portions, the eluate was combined into 25-ml volumetric flasks, then diluted to volume with ethanol and mixed well. Ten ml of each solution was accurately transferred to separate 25 ml volumetric flasks, diluted to volume with 0.5 M sulfuric acid and mixed well. The absorbances of standard solutions in I -cm cells were measured at 345 nm, using 0.5 M sulfuric acid as a blank.

The calibration curve between absorbances and concentrations of the standard solutions was plotted.

5. Assay of berberine in crude drug

The sample 0.5 g was accurately weighed, placed in a microsoxhlet extracting apparatus, added with 25 ml of hydrochloric acid-methanol 1:100, then refluxed to colorless and allowed to cool. The extract was transferred to a 50-ml volumetric flask and the extractor was washed with hydrochloric acid-methanol 1:100 in portions. The washings and the extract were combined and made up to volume. This solution 2.5 ml were accurately applied to a pretreated aluminum oxide column, eluted with 15 ml of ethanol in portions, the eluate was combined into a 25-ml volumetric flask, then diluted to volume with ethanol and mixed well. This solution 10.0 ml were transferred to a 25-ml volumetric flask, diluted to volume with 0.5 M sulfuric acid and mixed well. The absorbance of the sample solution in 1-cm cells was measured at 345 nm, using 0.5 M

sulfuric acid as a blank. The concentration of berberine chloride from the calibration curve was read. The percentage of berberine on the water-free basis sample was calculated as berberine chloride from the following formula

$$\text{Berberine chloride content} = \frac{C \times 125}{w \times 1000} \%$$

Where

C = Concentration of berberine chloride in the sample solution read from the calibration curve (ug/ml).

w = Weight of sample on the water-free basis (g).

6. Recovery of the assay procedure

Known amount of 3, 7 and 10 mg of berberine chloride, previously dried at 110°C for 4 hr, were separately added to three equal portions of the authentic sample of crude drug and the berberine contents were determined as described in the above assay procedure.

7. Sample analysis

The berberine content, calculated as berberine chloride, in 20 crude drug samples were determined as described in the assay procedure.

Results

I. Chemical identification

The chemical identification of 20 samples of Khamin-krua purchased from different traditional drugstores in Bangkok and Nonthaburi was performed compared to the authentic sample of the stems of *Arcangelisia flava* (L.) Merr. collected from Chanthaburi botanical garden by preliminary test and thin-layer chromatographic analysis and the results are shown in Table 1 and Figure 3.

Table 1 : Chemical identification of *Arcangelisia flava* (L.) Merr. stems.

Sample	Identification tests					
	Preliminary test					Confirmatory test
	UV_{366}	conc. HNO_3	H_2O_2/conc HCl	Dragendorff	H_2SO_4/$KMnO_4$	(TLC)
Authentic	Both samples gave yellow fluorescence	Both samples gave orange color	Both samples gave red ring at the zone of contact	Both samples gave orange precipitate	The color of potassium permanganate in both samples were decolorized	Both samples showed two isoquinoline alkaloids, berberine and palmatine
Crude drug	All the samples gave yellow fluorescence	All the samples gave orange color	All the samples gave red ring at the zone of contact	All the samples gave orange precipitate	The color of potassium permanganate in all the samples were decolorized	All the samples showed two isoquinoline alkaloids, berberine and palmatine

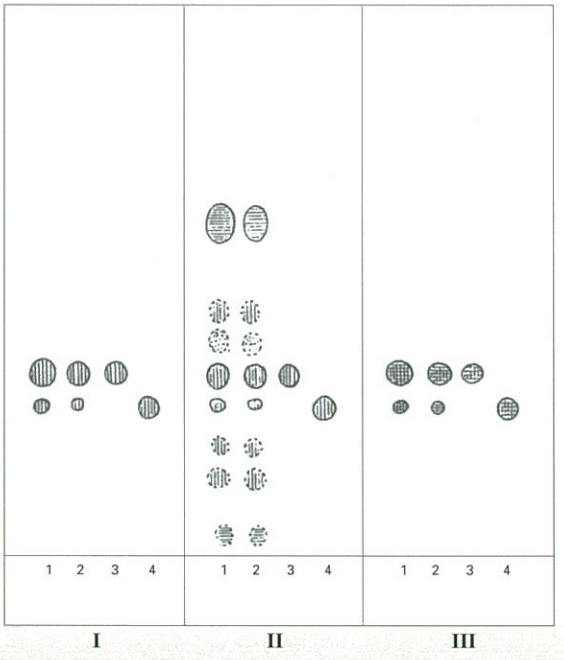


Figure 3 : TLC chromatograms of the methanolic extract of *Arcangelisia flava* (L.). Merr. stems.

Remarks : 1 = authentic samples 2 = crude drug samples
3 = standard berberine chloride ; R_f ca. 0.36
4 = standard palmatine iodide : R_f ca. 0.28
I = visible in daylight II = fluorescence under UV_{366}
III = visible with Dragendorff TS
◯ = substance appeared in all batches of the samples
◯ = substance appeared in some batches of the samples
◯ = yellow color ◯ = purple color ◯ = blue color ◯ = orange color

II. Assay of berberine in crude drug

Because berberine is rather unstable, it dissolves slowly in water with alkaline reaction and behaves as a quarternary base, forming salts by replacement of the hydroxy group[20]. Therefore berberine chloride was chosen as a standard substance for the assay. The result of the ultraviolet absorption spectrum of berberine chloride solution at a concentration (C) of 9.6 μg/ml in 1-cm cells (b) scanned through a wavelength range from 200-500 nm are shown in Figure 4.

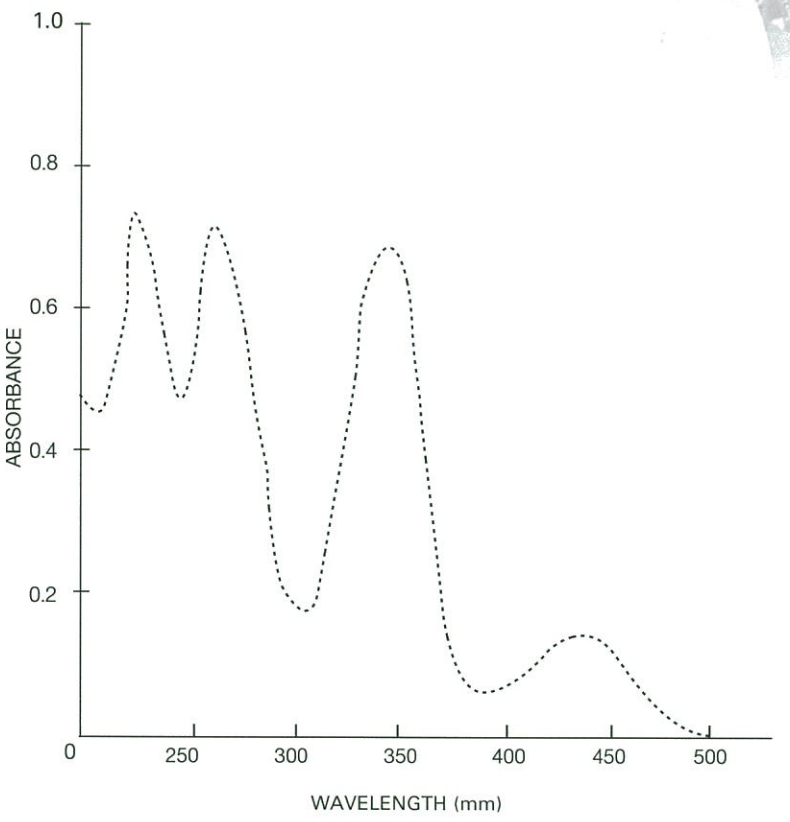


Figure 4: Ultraviolet absorption spectrum of berberine chloride in a mixture of ethanol and 0.5 M sulfuric acid; b = 1 cm, C = 9.6 μg/ml

Berberine chloride exhibited absorption maxima at the wavelength 227 nm, 263 nm, 345 nm and 424 nm. A wavelength at which the absorptivity was relatively large and the sensitivity of the assay to small changes in wavelength was 345 nm. Thus a wavelength in the vicinity of 345 nm would probably be the best for the assay of berberine, calculated as berberine chloride, in crude drug.

When the absorbances of five standard solutions of berberine chloride as a function of its concentrations were plotted, the resulting calibration curve obeyed Beer's law at a concentration range from O to 20 ug/ml (as shown in Figure 5).

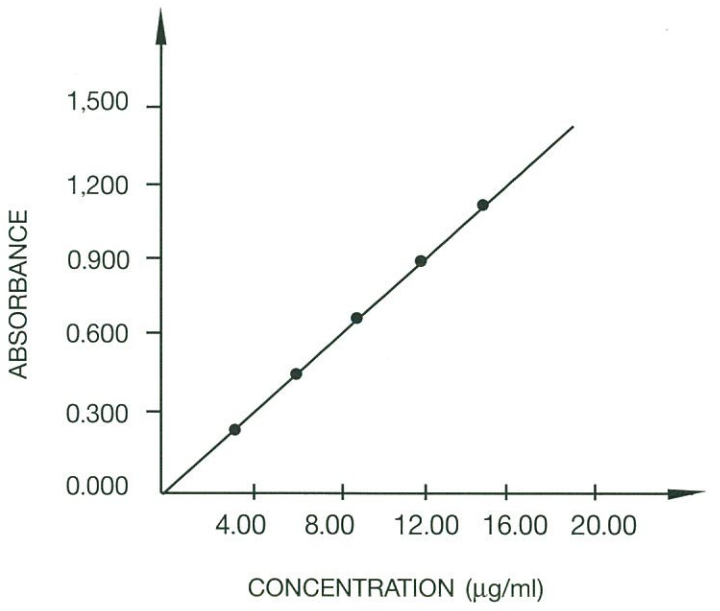


Figure 5 : Calibration curve for berberine chloride prepared by plotting the absorbances of five standard solutions as a function of its concentrations.

The determination of berberine, calculated as berberine chloride, in authentic sample of crude drug by the recommended method gave the average recovery of 98.91 % of berberine chloride for three determinations with a standard deviation of 0.69 (as shown in Table 2).

Table 2 : Recovery of the assay procedure

Sample	Dry weight of sample taken (g)	Amount of standard added (g)	Berberine chloride content (%)	Amount of standard recovered (g)	Recovery (%)
1	0.4798	-	1.25	-	-
2	0.4854	0.00357	1.98	0.00354	99.16
3	0.4703	0.00696	2.70	0.00682	97.97
4	0.4746	0.01015	3.38	0.01011	99.59
				$\bar{X}$	98.91
				SD	0.69

III. Quality evaluation of crude drug

Crude drugs were derived from heterogenous sources, it could well be that faulty collection or possible deterioration due to incorrect or extended storage might have altered the content of constituents in crude drugs. To assess the value of crude drugs, their quality evaluations were performed in four main categories; i.e. determination of ash, extractives, loss on drying, and berberine content. The results are shown in Table 3.

Table 3 : Quality evaluation of *Arcangelisia flava* (L.) Merr.

Sample no.	Ash content (%)		Extractive content (%)			Loss on drying (%)	Berberine chloride content (%)
	total	acid-insol.	water	ethanol	chloroform		
1	2.39	0.16	6.67	3.76	1.87	6.09	3.43
2	2.23	0.19	7.98	5.54	1.48	9.47	2.59
3	2.01	0.00	9.62	5.62	1.52	9.54	2.73
4	2.38	0.21	10.61	5.75	1.39	7.29	2.83
5	2.68	0.37	10.27	5.30	1.53	8.53	3.83
6	2.50	0.19	6.34	3.88	1.27	8.06	2.60
7	2.85	0.49	8.62	4.90	1.02	7.04	3.02
8	2.74	0.40	8.33	4.61	1.07	8.29	2.84
9	2.95	0.41	7.27	4.70	1.31	9.41	2.21
10	3.12	0.51	8.18	4.83	1.11	7.79	2.97
11	2.62	0.36	7.34	4.72	1.04	9.70	2.77
12	2.86	0.41	8.62	5.40	0.92	8.17	3.12
13	3.04	0.26	8.43	6.16	1.14	7.71	3.65
14	2.64	0.19	8.11	4.86	0.92	7.78	2.54
15	2.71	0.28	7.38	5.33	0.95	7.69	2.69
16	2.69	0.41	6.05	4.39	0.95	8.34	3.08
17	2.67	0.46	6.82	4.54	1.04	8.61	3.45
18	2.18	0.14	6.92	6.78	1.36	6.88	3.09
19	3.12	0.58	6.28	4.77	1.14	9.24	3.70
20	3.08	0.51	6.06	4.65	1.15	8.87	3.24
$\bar{X}$	2.67	0.33	7.80	5.02	1.21	8.23	3.02
SD	0.31	0.15	1.30	0.71	0.25	0.95	0.42

Discussion

The function of quality control and drug evaluation is to assess the value of raw materials and to ensure that the final product is of the required standard[21]. In this study, the chemical identification of various samples of Khamin-krua from traditional drugstores was performed compared to the authentic samples by preliminary test and thin-layer chromatographic analysis. Since berberine, the major alkaloid, was present with other minor isoquinoline alkaloids in this crude drug, the preliminary test was emphasized on the detection of isoquinoline alkaloids by precipitation with Dragendorff TS and by color reaction with conc. nitric acid. Other reactions were also investigated as the characteristics of this crude drug. Thin-layer chromatographic

separation was carried out on silica gel G using a mixture of butanol-acetic acid-water (7:1:2) as a mobile phase. This system gave a good spread of Rf values and had high reproducibility. The results of chemical identification showed that Khamin-krua contained berberine and palmatine alkaloids.

Alkaloids are basic nitrogenous substances, physiologically active and usually obtained from natural resources. There are many methods for the extraction of alkaloids from crude drugs. The choice of the method will depend on the nature of the desirable alkaloids as well as other constituents present in crude drug. Ethanol is a good extracting solvent for both alkaloidal salts and free alkaloids[21]. For industrial purpose, a commonly used solvent is acid ethanol which will yield the alkaloidal salts, and this method is low cost[22]. For these reasons, the authors extracted Khamin-krua with different acid alcohol mixtures and found that the best extraction method was to extract the sample with a mixture of hydrochloric acid-methanol (1:100) in a microsoxhlet extracting apparatus. An alumina column afforded an elution of pure berberine chloride, confirmed by thin-layer chromatographic analysis and ultraviolet spectrophotometry with authentic sample of berberine chloride, other alkaloids are undetectable.

The results of the study showed that berberine chloride in a mixture of ethanol and 0.5 M sulfuric acid exhibited absorption maxima at the wavelength 227 nm, 263 nm, 345 nm and 424 nm. A wavelength in the vicinity of 345 nm would probably be the best, for the assay of this crude drug. The assay of berberine, calculated as berberine.chloride, in the crude drug by column chromatography followed by spectrophotometry gave a linearity at a concentration range from 0 to 20 μg/ml. This method gave percentage recovery of 97.97-99.59%. for three determinations with a standard deviation of 0.69. The method was simple, rapid and sensitive for routine analysis.

Ash residue consists of an inorganic mixture of metallic salts and silica. In certain crude drugs the percentage variation of the weight of ash from sample to sample is very small and any marked difference indicates a change in quality. Unwanted parts of drugs sometimes possess a character which will raise the ash value. More direct contaminant such as sand or earth is immediately detected by ash value. The extraction of any drug with a solvent yields a solution of different compounds. The composition of this solution will depend upon the drug and upon the solvent used. The use of a single solvent can be the means of providing preliminary information on the quality of a particular drug sample[21]. Because the presence of excessive water in the crude drugs will promote the growth of microbes, fungi or insects and the hydrolysis of constituents leading to deterioration of drug, it is necessary to determine the water content of this crude drug, the pharmacopoeial limits of water for vegetable drugs are usually 8-14% with few exception[23]. Hence the appropriate specification to control the quality of this crude drug was established as shown in the following conclusion. This specification derived from the

experimental results, i.e. ash content, acid-insoluble ash content, water-soluble extractive, ethanol-soluble extractive, chloroform-soluble extractive, loss on drying and berberine chloride content were 2.01-3.12%, 0-0.58%, 6.05-10.27%, 3.76-6.78%, 0.92-1.87%, 6.09-9.70%, and 2.21-3.83%, respectively, with the standard deviations of 0.31, 0.15, 1.30, 0.71, 0.25, 0.95, and 0.42, respectively.

Conclusion

From the results of the study, the apporopriate chemical specifications of *Arcangelisia flava* (L.) Merr. stems are proposed from the results of sample analysis. When $\bar{X}$ is the arithmatic mean of the results, the maximum limits ($\bar{X}$ +10%) are stated for the limited amount of total ash, acid-insoluble ash, and loss on drying and the term "not more than" are expressed for their specifications. Besides these, the limits of active or major constituents and extractives are stated the minimum limit ($\bar{X}$ – 10%) and the term "not less than" is used for their specifications.

Total ash content not more than 3%.

Acid-insoluble ash content not more than 1%

Loss on drying not more than 10%

Water-soluble extractive not less than 7%

Ethanol-soluble extractive not less than 4%

Chloroform-soluble extractive not less than 1%

Berberine chloride content not less than 2.5%

Acknowledgements

We would like to express our thanks to our colleagues at the Division of Medicinal Plant Research and Development Mr. Daroon Pecharaply, for the botanical origin identification of the autentic samples and for providing the sketches of *Arcangelisia flava* (L.) Merr., Mrs. Pranorm Dechwisissakul, for the identification of crude drug samples purchased from traditional drugstores, and Mr. Amporn Kun-anake, for providing standard alkaloid, palmatine iodide.

References

1. Smitinand, T. 1980 Thai Plant Names. Funny Publishing Press, Bangkok. pp.21, 29, 91.
2. Amatayakul, T. and Pecharaply, D. 1974. Study on Botanical and Pharmacognosy of *Arcangelisia flava*. Bull. Dept. Med. Sci. 16 (1) : 19-28.
3. Reports of Research Activity Project, Coordinating Committee on Research Projects, Chulalongkorn University. 1989. Chulawichai 8 (11) : 5.
4. Chayamarut, K. 1985. Samunprai-thai. Part 4. Chutima Press, Bangkok pp. 342-343.
5. Jirawongse, V. Chairman of the Subcommittee on Crude Drugs of the Thai Pharmacopoeia

Committee. Personal communication.

6. Boonyaprakorn, P., Dampawan, P. and Wiriyachitra. P. 1983. Chemical Constituents of *Fibraurea tinctoria* Lour. Songklanakarin J. Sci. Technol. 5 : 343-345.
7. Phongbunrot, S. 1985. Maithet-muangthai. Kasembannakit Press, Bagnkok. pp.91-92.
8. Old-styled Doctor Association. 1968. Pramaun-sappakun-yathai. Part 1. Samnakwatprachetuphon Press, Bangkok. p. 157.
9. Medicinal Plant Information Center, Faculty of Pharmacy, Mahidol University. 1992. Sup-phaet-thai. Prachachon Press, Bangkok. pp. 25-26, 88, 110-111.
10. Panvisavas, R., Kun-anake, A. and Taguchi, H. 1972. Kramin-krua Bull. Dept. Med. Sci. 14 (3-4) : 59-73.
11. Chumsri, P. and Rungruchkanont, K. 1987. Preparation of Antidiarrheal Drug from Isoquinoline Alkaloids of *Arcangelisia flava* Merr. Princess Congress I. Chulabhorn Foundation and Mahidol University. Bangkok. p.74.
12. Wells, A.H. 1919. Physiologically Active Constituents of Certain Philippine Medicinal Plants. III. Philip. J. Sci. 14 : 1-6.
13. Santos, A.C. 1931. Alkaloids of *Arcangelisia flava* (L) Merr. Univ. Philippines Natural and Applied Sci. Bull. 1 : 153-161.
14. Manske, R.H.F. and Holmes. H.L. 1954. The Alkaloids. Vol. IV. Academic Press, N.Y. p.93.
15. Verpoorte, R., Siwon, J., Van Essen, G.F.A., Tiekin, M. and Baerheim Svendsen, A. 1982. Studies on Indonesian Medicinal Plants. VII. Alkaloids of *Arcangelisia flava*. J. Nat. Prod. 45 (5) : 582-584.
16. Kunii. T., Kagei, K., Kawakami, Y., Nagai, Y., Nezu, Y. and Sato, T. 1985. Indonesian Medicinal Plants. I. New Furanoditerpenes from *Arcangelisia flava* Merr. Chem. Bull. 33 (2) : 479-487.
17. Thai Pharmacopoeia. 1987. Vol. 1. Part 1. Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. Bangkok. pp.399, 441.
18. British Pharmacopoeia 1988. Vol. II. Her Majesty's Stationery Office, London. p. A 136.
19. The United States Pharmacopoeia XXI. 1985. United States Pharmacopeial Convention, Inc., MD. p.1214.
20. Budavari, S., O'Neil, M.J., Smith, A. and Heckelman, P.E. 1989. The Merck Index. 11th ed. Merck & Co., Inc., N.J. p. 180.
21. Brain, K.R. and Turner, T,D. 1975. The Practical Evaluation of Phytopharmaceuticals. Wright-Scientechnica, Bristol. pp. 81-84.
22. Practical Pharmacognosy for Pharmacy Students. Pharmacognosy Department, Faculty of Pharmacy, Mahidol University. p.61.
23. Lou, Z.C. 1980. General Control Methods for Vegetable Drugs. WHO/Pharm. 80.502. pp. 33-34.

ข้อกำหนดทางเคมีและกายภาพของเถาวัลย์เปรียง

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

ประไพ วงศ์สินคงมั่น, ธิดารัตน์ บุญรอด**
*เย็นจิตร เตชะดำรงสิน**, จารีย์ บันสิทธิ์**
*ปราณี ชวลิตธำรง**

*สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
**สถาบันการแพทย์ไทย-จีน เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข

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% เอทานอล ปริมาณสารสกัดด้วย 95% เอทานอล ปริมาณความชื้น และดัชนีการเกิดฟอง รวมทั้งได้พิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีรงคเลขผิวบาง และวิธีโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง ผลการศึกษานี้ ทำให้สามารถจัดทำข้อกำหนดทางเคมีและกายภาพของสมุนไพรชนิดนี้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรเถาวัลย์เปรียง

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 this crude drug obtained from the Northern, Northeastern and Central parts of Thailand. The values of total ash content, acid-insoluble ash content, water-soluble extractive, 50% ethanol-soluble 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 contral 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

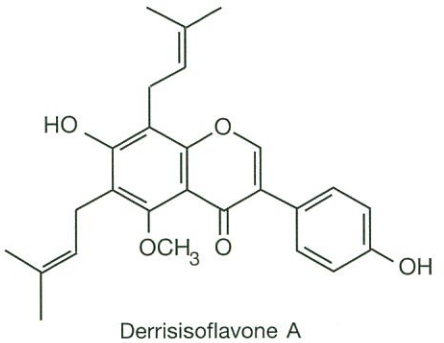
เถาวัลย์เปรียง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Derris scandens* (Roxb.) Benth. ชื่ออังกฤษ Jewel Vine และมีชื่อท้องถิ่นต่างๆ ได้แก่ เถาตาปลา เครือตาปลา เครือเขาหนัง (นครราชสีมา พานไสน (ชุมพร)[1] ย่านเหมาะ (นครศรีธรรมราช)[2-3] อยู่ในวงศ์ Leguminosae-Papilionoideae[1] พืชชนิดนี้เป็นไม้เถาขนาดใหญ่ ใบเป็นใบประกอบแบบขนนก ใบย่อยรูปวงรี ดอกช่อห้อยลง ขนาดของดอกย่อยเล็กกว่าดอกโสน ดอกสีชมพูอ่อนหรือสีขาว มีกลิ่นหอมอ่อนๆ ผลเป็นฝักแบนเล็ก มีเมล็ด 2-4 เมล็ด[2] ยาไทยใช้เถาเป็นยาแก้กระษัย แก้เส้นเอ็นขอด ทำให้เส้นอ่อนและหย่อนดี ขับปัสสาวะ แก้ปัสสาวะพิการ เป็นยาถ่ายเฉพาะเสมหะเท่านั้น ไม่ทำให้อุจจาระเดิน จึงเหมาะที่จะใช้ในโรคบิด โรคหวัด บางแหล่งนิยมเถาหั่นตากแห้งคั่วไฟ 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′-methyxyisoflavone[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], diadzien-7-O-[α-rhamnopyranosyl-(1$\rightarrow$6)]-β-glucopyranoside[8], formononetin-7-O-[α-rhamnopyranosyl-(1$\rightarrow$6)]-β-glucopyranoside[8], derrisscanosides A-B[9], genistein-7-O-[α-rhamnopyranosyl-(1$\rightarrow$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

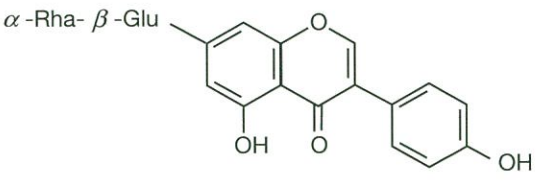
เช่น lupeol, taraxerol และ β-sitosterol[12] เป็นต้น

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

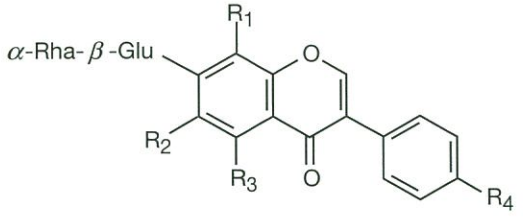
การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลัน โดยการฉีดสารสกัด 50% เอทานอลจากส่วนเหนือดินเถาวัลย์เปรียงเข้าทางช่องท้องหนูถีบจักร พบว่า ขนาดที่เป็นพิษทำให้หนูตายร้อยละ 50 คือ 1 ก./กก. แต่เมื่อให้โดยการป้อนทางปาก หรือฉีดใต้ผิวหนังในขนาด 10 ก./กก. กลับไม่พบความเป็นพิษใดๆ ต่อสัตว์ทดลอง[16] สำหรับการทดสอบพิษเรื้อรังนั้น ไม่พบความเป็นพิษใดๆ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



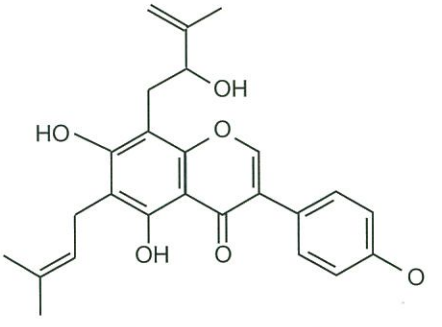
Derrisisoflavone A



Genistein 7-*O*-[α-rhamnopyranosyl-(1⟶6)]-β-glucopyranoside



Derriscanoside A; $R_1 = R_2 = R_3 = H$, $R_4 = OCH_3$
Derriscanoside B; $R_1 = R_4 = OCH_3$, $R_2 = R_3 = H$



Erysenegalensein E

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 พบว่าคือ *Derris scandens* (Roxb.) Benth. ในการเตรียมสมุนไพรเถาวัลย์เปรียงเพื่อการศึกษาในครั้งนี้ ได้นำตัวอย่างลำต้นสดไปล้างด้วยน้ำให้สะอาด ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ นำไปอบให้แห้งในเตาอบร้อนไฟฟ้าที่มีพัดลมระบายอากาศ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำตัวอย่างที่แห้งแล้วไปบดเป็นผงละเอียด ผ่านแร่งเบอร์ 80 และเก็บในขวดแก้วสีชามีฝาปิดสนิท ปิดฉลากระบุชื่อสมุนไพรแหล่งที่มา วันที่เก็บ และวันที่เตรียมตัวอย่าง เก็บขวดบรรจุสมุนไพรไว้ในที่สะอาด เย็น ไม่ชื้น และอากาศถ่ายเทได้ดี

เครื่องมือ

1. เตาอบร้อนไฟฟ้ารุ่น ULE-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 และอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิรุ่น 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, คอลัมน์ยี่ห้อ Novapak® C18 ขนาด 3.9 x 150 ซม. 60 A° 4 μm และเครื่องตรวจวัดชนิดโฟโตไดโอดแอเรย์รุ่น 2770
8. Sep-Pak C18 Cartride 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 (Ultrasonicator bath) บริษัท Elma ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี

สารเคมี

1. สารเคมีทุกชนิดที่ใช้ในการทดลองต่างๆ ยกเว้นสารเคมีที่ใช้กับเครื่องแยกโครมาโทกราฟสมรรถนะสูง เป็นชนิดที่ใช้กับงานวิเคราะห์ (analytical grade) และน้ำบริสุทธิ์ที่ใช้ในงานทดลองเป็นน้ำที่ได้จากการกรองเอาอนุภาคที่มีประจุออก (deionized water)
2. สารเคมีทุกชนิดที่ใช้กับเครื่องแยกโครมาโทกราฟสมรรถนะสูง เป็นชนิดที่ใช้เฉพาะกับเครื่องแยกโครมาโทกราฟสมรรถนะสูง (HLC gradient grade) ของบริษัท Merck ประเทศสหรัฐอเมริกา สำหรับน้ำบริสุทธิ์ที่ใช้กับเครื่องแยกโครมาโทกราฟสมรรถนะสูงเป็นน้ำที่กรองผ่านเครื่องกรอง 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 ในเมทานอลจำนวน 100 มิลลิเมตร
   3.2 สารละลายพีอีจี เตรียมโดยละลาย polyethylene glycol 4000 จำนวน 5 กรัมในเอทานอล 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) Froth 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 เติมเมทานอล 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 เติมเมทานอล 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 ด้วยเอทานอลจำนวน 20.0 มิลลิลิตร โดยวิธีฟลักซ์บนอ่างอังไอน้ำนาน 20 นาที กรองขณะร้อน นำสารละลายที่กรองได้ไประเหยจนแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ละลายสารที่ได้จากการระเหยด้วยเอทานอลจำนวน 3.0 มิลลิลิตร

(2) การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ละลายสารมาตรฐาน genistein-7-O-[α-rhamnopyranosyl-(1$\rightarrow$6)]-β-glucopyranoside จำนวน 5 มิลลิกรัมในเอทานอล 1 มิลลิลิตร

(3) น้ำยาแยก

เตรียมน้ำยาแยกโดยผสมคลอโรฟอร์ม เมทานอล และน้ำ ในอัตราส่วน 70:40:10 ให้เข้ากันดีในกรวยแยก ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น นำสารละลายชั้นล่างมาใส่ในถังนำโครมาโทกราฟี ทิ้งไว้อย่างน้อย 1 ชั่วโมงก่อนใช้ เพื่อให้บรรยากาศในถังอิ่มตัวด้วยน้ำยาแยก

(4) วิธีการ

ใช้หลอดรูเล็ก (capillary tube) นำสารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานชนิดละ 5 ไมโครลิตร มาแต้มบนแผ่นเคลือบซิลิกาเจลในแนวระดับเดียวกัน โดยให้ห่างจากขอบล่างของกระจกประมาณ 2 เซนติเมตรและให้มีระยะระหว่างหยดของสารละลายแต่ละชนิดไม่น้อยกว่า 1 เซนติเมตร ผึ่งให้แห้ง นำไปตั้งในถังทำโครมาโทกราฟีที่เตรียมไว้ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้น้ำยาแยกซึมขึ้นไปตามผิวที่ฉาบสูง 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% กรดกำมะถันในเอทานอล ทิ้งไว้ให้แห้ง นำแผ่นเคลือบซิลิกาเจลไปทำให้ร้อนบนเตาไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที สังเกตสีที่เกิดขึ้นภายใต้แสงธรรมชาติ (ตารางที่ 3, รูปที่ 2)

3. การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีโครมาโทกราฟสมรรถนะสูง

(1) การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ชั่งสารตัวอย่างมา 1 กรัม ในขวดก้นกลม นำไปสกัดด้วยเมทานอล 10.0 มล. โดยใช้อ่างเสียงความถี่สูงนาน 30 นาที กรองขณะร้อน ทิ้งไว้ให้เย็น หากมีตะกอนให้กรองซ้ำ นำสารละลายที่กรองได้ 1.0 มิลลิลิตร กรองผ่าน SepPak C18 และตัวกรองไนลอนขนาด 0.45 ไมครอน

(2) การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ละลายสารมาตรฐาน genistein-7-O-[α-rhamnopyranosyl-(1$\rightarrow$6)]-β-glucopyranoside จำนวน 1 มิลลิกรัมในเมทานอล 1 มิลลิลิตร

(3) น้ำยาแยก

ใช้น้ำและเมทานอลผสมกันด้วยวิธี 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

ใช้ตัวตรวจวัดชนิดโฟโตโอดแอเรย์ที่ความยาวคลื่น 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% เอทานอล และปริมาณสารสกัดด้วย 95% เอทานอล**

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 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 16 มิลลิเมตร ชนิดมีฝาเกลียวปิดสนิท จำนวน 10 หลอด โดยเริ่มตั้งแต่ 1, 2, 3... 10 มิลลิลิตร โดยให้ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 10 มิลลิลิตรทุกหลอด เขย่าขึ้นลงให้ได้อัตรา 30 ครั้งต่อ 15 วินาที เมื่อครบเวลาให้วัดส่วนสูงของฟอง และคำนวณดัชนีการเกิดฟองโดยใช้สูตรดังนี้ "ดัชนีการเกิดฟอง = 1000/ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบที่ทำให้เกิดฟองสูงกว่า 1 เซนติเมตร"

ผลการวิจัย

จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยปฏิกิริยาการเกิดสีของเถาวัลย์เปรียง จำนวน 16 ตัวอย่างพบว่าทุกตัวอย่างให้ผลบวกกับ Froth Test, Lieberman-Burchard Test, Fehling Test และ Cyanidin Test (ดังแสดงในตารางที่ 1) เมื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีรงคเลขผิวบางโดยใช้สารละลายเอ็นพี-พีอีจี แล้วนำไปส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร พบว่าทุกตัวอย่างให้ผลบวกกับการทดสอบสารประกอบฟลาโวนอยด์ โดยพบสารสำคัญ genistein-7-O-[α-rhamnopyranosyl-(1$\rightarrow$6)]-β-glucopyranoside ในทุกตัวอย่าง (ดังแสดงในตารางที่ 2 และรูปที่ 2) นอกจากนี้ การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีโครมาโทกราฟีสมรรถะสูง พบว่า สารสกัดเถาวัลย์เปรียงด้วยเมธานอลมีองค์ประกอบทาเคมีไม่น้อยกว่า 19 ชนิด และในทุกตัวอย่างตรวจพบสารสำคัญ genistein-7-O-[α-rhamnopyranosyl-(1$\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

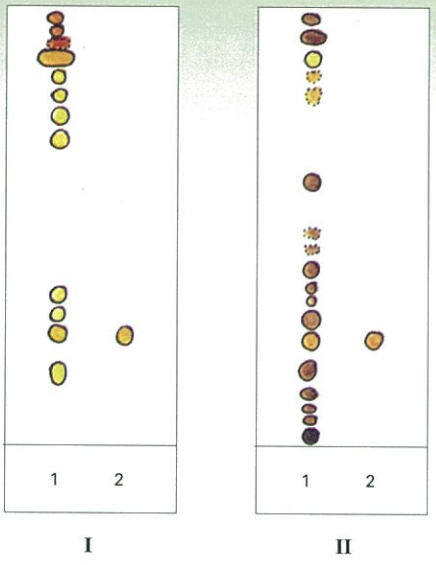
จุดสี	ค่า hR_f	การตรวจสอบด้วยการเรืองแสงภายใต้ UV366 กับสารละลายเอ็นพี-พีอีจี
1	18-19	เหลือง
2*	24	เหลือง
3	28-29	เหลือง
4	31-32	เหลือง
5	70-71	เหลือง
6	75	เหลือง
7	79-80	เหลือง
8	83-84	เหลือง
9	87-88	เหลืองเข้ม
10	89	ส้ม
11	91-92	เหลืองอมส้ม
12	96	เหลืองอมส้ม

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

ตารางที่ 3 ค่า hR_f และผลการตรวจสอบสารประกอบทางเคมีทั่วไปในสารสกัดด้วยเอทานอลจากเถาวัลย์เปรียง

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

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

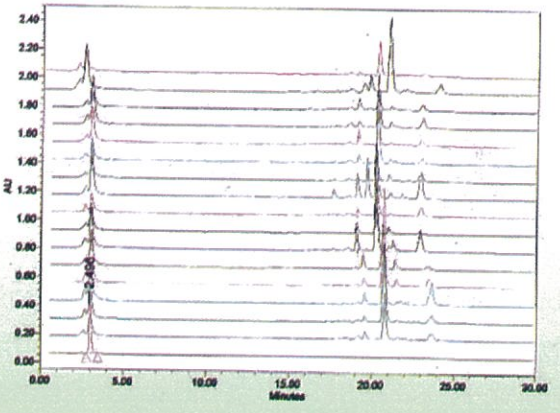


รูปที่ 2 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีรงคเลขผิวบางของสารสกัดด้วยเอทานอลจากเถาวัลย์เปรียง เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน เมื่อใช้สารละลายผสมคลอโรฟอร์ม: เมทานอล:น้ำ ในอัตราส่วน 70:40:10 เป็นน้ำยาแยก ตรวจสอบด้วยสารละลายเอ็นพี - พีอีจี (รูป I) หรือตรวจสอบด้วยสารละลายกรดกำมะถัน 20% เมื่อได้รับความร้อน (รูป II)

1 = สารสกัดด้วยเอทานอลจากเถาวัลย์เปรียง

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

( ) = จุดสีที่พบในบางตัวอย่าง



รูปที่ 3 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูงของสารสกัดด้วยเมทานอลจากเถาวัลย์เปรียงเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน โดยใช้ น้ำ:เมทานอล 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% เอทานอล ปริมาณสารสกัดด้วย 95% เอทานอล ปริมาณความชื้น และดัชนีการเกิดฟอง พบว่า มีค่าเฉลี่ย ดังนี้ 6.48 ± 0.80, 0.12 ± 0.06, 16.16 ± 1.48, 15.96 ± 1.87, 7.21 ± 0.99, 6.35 ± 0.94 และ 238 ± 22 ตามลำดับ ซึ่งค่าเฉลี่ยดังกล่าว และเกณฑ์ที่ใช้ในการกำหนดได้แสดงไว้ในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการประเมินคุณภาพทางเคมีและกายภาพของเถาวัลย์เปรียง

รายการ	ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนเฉลี่ย ($\bar{X}$ ± SD, 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% เอทานอล	15.96 ± 1.87	-	14
ปริมาณสารสกัดด้วย 95% เอทานอล	7.21 ± 0.99	-	6
ปริมาณความชื้น	6.35 ± 0.94	7	-
ดัชนีการเกิดฟอง	238 ± 22	-	200

วิจารณ์

จากการตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีของตัวอย่างลำต้นแห้งของเถาวัลย์เปรียง ซึ่งเก็บจากแหล่งธรรมชาติต่างๆ ในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลางของประเทศไทย จำนวน 16 ตัวอย่าง พบว่า ทุกตัวอย่างให้ผลเหมือนกันในการทดสอบด้วยปฏิกิริยาการเกิดสี ดังนี้ ตรวจพบสารประเภทซาโปนินโดยใช้ Froth Test ตรวจพบสารประเภทเทอร์ปีนส์โดยใช้ Liebermann-Burchard Test ตรวจพบสารประเภทน้ำตาลที่สูญเสียอิเล็กตรอนได้ง่ายโดยใช้ Fehling Test และตรวจพบสารประเภทฟลาโวนอยด์โดยใช้ Cyanidin Test การทดสอบยืนยันผลเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีรงคเลขผิวบาง โดยพ่นด้วยสารละลายเอ็นพี (Natural Products) -พีจีอี (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$\rightarrow$6)]-β-glucopyranoside ในสารสกัดด้วยเอทานอลของเถาวัลย์เปรียงทุกตัวอย่าง สำหรับการทดสอบสารสกัดเถาวัลย์เปรียงด้วยเมทานอลโดยวิธีโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง (HPLC) พบว่ามี genistein-7-O-[α-rhamnopyranosyl-(1$\rightarrow$6)]-β-glucopyranoside เป็นองค์ประกอบโดยมีค่า Retention time (T_R) ที่ 2.5 นาที ดังแสดงในรูปที่ 3

การประเมินคุณภาพของสมุนไพรตามมาตรฐานสากลนั้น นอกจากการตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีแล้ว ยังต้องตรวจคุณภาพทางกายภาพและทางเคมีด้วย โดยการตรวจวิเคราะห์ปริมาณเถ้ารวมปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ ปริมาณสารสกัดด้วย 50% เอทานอล ปริมาณสารสกัดด้วย 95% เอทานอล ปริมาณความชื้น และดัชนีการเกิดฟอง[21-23] ปริมาณความชื้นของสมุนไพรแห้งไม่อนุญาตให้มีค่าเกินกว่าเกณฑ์ที่กำหนด หากสมุนไพรมีความชื้นสูงจะเป็นผลให้สมุนไพรมีคุณภาพต่ำ และเสื่อมคุณภาพเร็ว ซึ่งเป็นผลจากการเกิดปฏิกริยาทางเคมีของสารประกอบเคมีในตัวสมุนไพรเอง เช่น การสลายตัวด้วยน้ำ (hydrolysis) หรือความเสี่ยงจากการปนเปื้อนด้วยเชื้อจุลินทรีย์ เชื้อรา หรือแมลงในสมุนไพรจะเกิดขึ้นได้ง่าย[23] เป็นต้น สำหรับปริมาณเถ้ารวมนั้น เป็นดัชนีแสดงถึงการปนเปื้อนจากสารที่เหลือจากการเผาไหม้ในกรด เช่น หิน หรือ ทราย ซึ่งมีซิลิกาเป็นองค์ประกอบ เป็นต้น[23] ค่าต่างๆ เหล่านี้จะเป็นประโยชน์ในการตรวจสอบคุณภาพของสมุนไพรดังกล่าว นอกจากนี้ ค่าสารสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ที่เหมาะสม เป็นอีกดัชนีหนึ่งที่จะบ่งชี้คุณภาพของสารสำคัญในสมุนไพร หากสมุนไพรนั้นยังไม่ทราบสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ หรือยังไม่มีวิธีวิเคราะห์สารสำคัญที่เหมาะสม[23] เนื่องจากสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และวิธีการใช้สมุนไพรชนิดนี้ในตำราไทย มักใช้ตัวทำละลายที่มีความเป็นขั้วสูง ดังนั้นการศึกษาวิจัยนี้ จึงวิเคราะห์หาปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ ปริมาณสารสกัดด้วย 50% เอทานอล และปริมาณสารสกัดด้วย 95% เอทานอลส่วนค่าดัชนีการเกิดฟองแสดงถึงปริมาณสารประเภทซาโปนินในสมุนไพร เนื่องจากสารประกอบซาโปนินมีคุณสมบัติเฉพาะตัวคือเกิดฟองที่คงทนเมื่อเขย่ากับน้ำ

ผลการศึกษาวิจัยนี้ ทำให้สามารถจัดทำข้อกำหนดคุณภาพเบื้องต้นของสมุนไพรชนิดนี้ ส่วนการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ในสมุนไพรนั้น คณะผู้วิจัยจะดำเนินการต่อไป เนื่องจากสมุนไพรชนิดนี้มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายประการ จึงจำเป็นต้องเลือกใช้สารมาตรฐานที่เหมาะสม และสามารถใช้เป็นดัชนีในการบ่งชี้ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น ฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ลดความดันโลหิต เป็นต้น สำหรับการศึกษาวิจัยเถาวัลย์เปรียงต่อไปในอนาคต คณะผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาสารสำคัญที่แสดงฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน ซึ่งพบว่า สารสกัดเถาวัลย์เปรียงด้วยเอทานอล เมื่อถูกนำมาแยกได้สารประกอบกลุ่มต่าง ๆ ในเบื้องต้นพบว่า สารประกอบไอโซฟลาโวนกลัยโคไซด์ ได้แก่ genistein-7-O-[α-rhamnopyranosyl-(1$\rightarrow$6)]-β-glucopyranoside ที่แยกได้จากสารสกัดเถาวัลย์เปรียงนั้น มีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันได้บ้างแต่น้อยกว่าสารสกัดเถาวัลย์เปรียงด้วย 50% เอทานอลซึ่งเป็นสารตั้งต้น แสดงว่าสารที่ออกฤทธิ์ดังกล่าว น่าจะเป็นสารชนิดอื่น ดังนั้น จึงเห็นควรดำเนินการศึกษาวิจัยในการแยกหาสารบริสุทธิ์ที่เป็นสารออกฤทธิ์ต่อไป

สรุปผลการทดลอง

ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าลำต้นแห้งของเถาวัลย์เปรียงประกอบด้วยสารประเภทซาโปนิน น้ำตาลกลุ่มที่สูญเสียอิเล็กตรอนได้ง่าย เทอร์ปีนส์ และฟลาโวนอยด์ จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีรงคเลขผิวบาง และวิธีโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง พบว่า เถาวัลย์เปรียงทุกตัวอย่างมี genistein-7-O-[α-rhamnopyranosyl-(1$\rightarrow$6)]-β-glucopyranoside ซึ่งเป็นสารประเภทไอโซฟลาโวนกลัยโคไซด์ที่ตรวจพบในสารสกัดเถาวัลย์เปรียงด้วยเอทานอล ดังนั้น เพื่อประโยชน์ในการควบคุมคุณภาพทางเคมีและกายภาพของสมุนไพรชนิดนี้ จึงได้กำหนดเกณฑ์สูงสุด โดยกำหนดค่าบน จากค่าเฉลี่ยบวกด้วย 10% สำหรับปริมาณที่ระบุว่า "ไม่เกิน" และเกณฑ์ต่ำสุด โดยกำหนดค่าล่างจากค่าเฉลี่ยลบด้วย 10% สำหรับปริมาณที่ระบุว่า "ไม่น้อยกว่า" ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 สรุปผลข้อกำหนดคุณภาพของเถาวัลย์เปรียง

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

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ดร.บุษราวรรณ ศรีวรรธนะ ห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันแบบอาศัยเซลล์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ทดสอบฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุทัย โสธนะพันธุ์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่ให้ความอนุเคราะห์พิสูจน์สูตรโครงสร้างของสารสำคัญ 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. 1990; 34: 43-45.
10. Laupattarakasem P, Houghton PJ, Hoult JR. Anti-inflammatory isoflavonoids from the stems of *Derris scandens*. Planta Med. 2004; 70(60): 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. 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 Medicinal Plants. 1992; 1: 64-67.
19 กฤษณพันธ์ ว. พฤกษเคมีเบื้องต้น. ใน จิรัจฉริยากูล. 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 Science, 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.

คุณภาพทางเคมีของ สารสกัดเถาวัลย์เปรียงใน 50 % เอทานอล

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

ประไพ วงศ์สินคงมั่น, ธิดารัตน์ บุญรอด**
*เย็นจิตร เตชะดำรงสิน**, จารีย์ บันสิทธิ์**
*ปราณี ชวลิตธำรง**
*สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
**สถาบันการแพทย์ไทย-จีน เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข

บทคัดย่อ

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

ABSTRACT

Derris scandens (Roxb.) Benth. or Thao-wan-priang stems extract in 50 % ethanol 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-soluble extractive, 50 % ethanol-soluble 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.

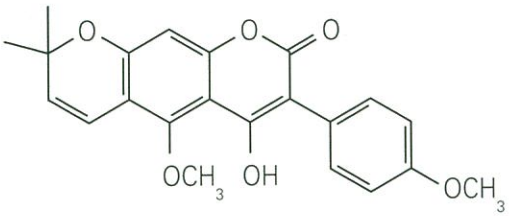
บทนำ

เถาวัลย์เปรียง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Derris scandens* (Roxb.) Benth. ชื่ออังกฤษ Jewel Vine และมีชื่อท้องถิ่นต่างๆ ได้แก่ เครือตาปลา เถาตาปลา เครือตาหนัง (นครราชสีมา) พานไสน (ชุมพร)[1] ย่านเหมาะ (นครศรีธรรมราช)[2-3] อยู่ในวงศ์ Leguminosae-Papilionoideae[1] พืชชนิดนี้เป็นไม้เถาขนาดใหญ่ ใบเป็นใบประกอบ แบบขนนก ใบย่อย รูปวงรี ดอกช่อห้อยลง ขนาดของดอกย่อยเล็กกว่าดอกโสน ดอกสีชมพูอ่อนหรือสีขาว มีกลิ่นหอมอ่อนๆ ผลเป็นฝักแบนเล็ก มีเมล็ด 2-4 เมล็ด[2] ในสรรพคุณยาไทยระบุว่าใช้เถาเป็นยาแก้กระษัย แก้เส้นเอ็นขอด แก้ปวดเมื่อยขับปัสสาวะ บางแหล่งนิยมนำเถาหั่นตากแห้งคั่วไฟ ชงน้ำดื่มแทนน้ำชา ใช้แก้ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ ถ้าใช้เถาดองเหล้าจะเป็นยาขับระดู ส่วนรากใช้เบื่อปลา (แต่ไม่มีคุณสมบัติฆ่าแมลง[2-4] นอกจากนี้ ในการศึกษาทางเภสัชวิทยา มีรายงานว่า สารสกัดด้วย 50% เอทานอลจากลำต้นเถาวัลย์เปรียงมีฤทธิ์ลดความดันโลหิต[5] ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์[6] และฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน[7] พบว่า สารเคมีที่มีสูตรโครงสร้างเป็นอนุพันธ์ของ isoflavone ได้แก่ genistein 7-O-[α-rhamnosyl 1 → 6]-β-glucopuranoside มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ[8] ส่วนอนุพันธ์ของ isoprenyl ได้แก่ 3′-γ,γ-dimethylallylwighteone และ scandenin มีฤทธิ์ลดความดันโลหิต และฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์[9] ในขณะที่อนุพันธ์ของ isoflavone และ benzyl 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

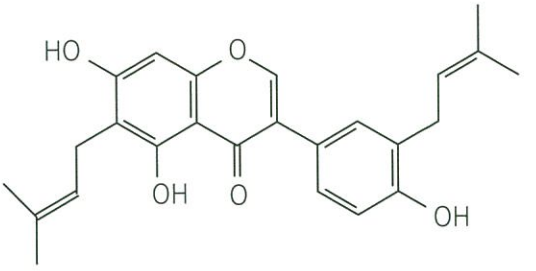
IC_{50} ที่ 3.5, 10, 20, 24 และ 33 ไมโครโมล่าร์ ตามลำดับ และเสนอว่า สารเคมีที่มีสูตรโครงสร้างเป็น prenyl (หรือ dimethylallyl) ดังกล่าวจำเป็นต่อการแสดงฤทธิ์ ซึ่งอาจเป็นเหตุผลที่รากเถาวัลย์เปรียงมีฤทธิ์ในการเบื่อปลาหรือฆ่าแมลงก็ได้[11]

จากการศึกษาทางเคมี พบว่า ส่วนเถา (ลำต้น) ของเถาวัลย์เปรียง ประกอบด้วยสารประกอบประเภท 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]

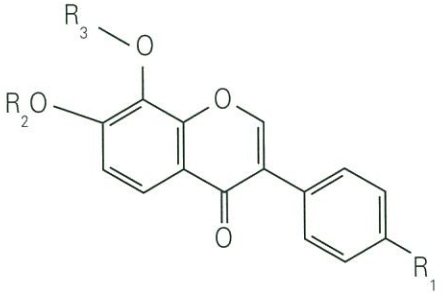
การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลัน โดยการฉีดสารสกัด 50% เอทานอลจากส่วนเหนือดินเถาวัลย์เปรียงเข้าช่องท้องหนูถีบจักร พบว่า ขนาดที่เป็นพิษทำให้หนูตาย 50% คือ 1 ก./กก.[23] แต่เมื่อให้โดยการป้อนทางปาก หรือฉีดใต้ผิวหนังในขนาด 10 ก./กก. กลับไม่พบความเป็นพิษใดๆ ต่อสัตว์ทดลอง[24] สำหรับการศึกษาพิษเรื้อรัง (6 เดือน)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



robustic acid



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

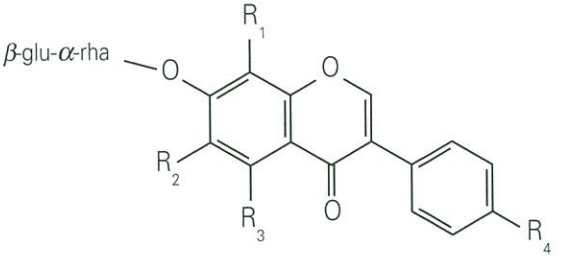


derriscandenoside A:

$R_1 = OCH_3$, $R_2 = H_1$, $R_3 = \alpha$-rha

derriscandenoside C:

$R_1 = R_2 = OCH_3$, $R_3 = \alpha$-rha-β-glu



derriscandenoside B:

$R_1 = OH_1$, $R_2 = R_3 = H_1$, $R_4 = OCH_3$

genistien-7-O-[α-rha-(1 $\rightarrow$6)]-β-glu:

$R_1 = R_2 = H$, $R_3 = R_4 = OH$

รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของสารสำคัญบางชนิดที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของเถาวัลย์เปรียง

จากข้อมูลต่างๆ ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว จะเห็นได้ว่า สารสกัดด้วย 50% เอทานอลของลำต้นสมุนไพรชนิดนี้มีประสิทธิภาพในการใช้เป็นยาหรือผลิตภัณฑ์สุขภาพ และมีความปลอดภัยสูง ดังนั้น ในการวิจัยนี้ 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% เอทานอล เพื่อเตรียมเป็นสารสกัดที่มีความเข้มข้นประมาณ 10-15 เท่าของวัตถุดิบ นำไปทำให้แห้งด้วยการระเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ และเครื่องทำให้แห้งด้วยความเย็น เก็บสารสกัดในขวดแก้วสีชามีฝาปิดสนิท ปิดฉลากระบุชื่อสมุนไพร แหล่งที่มา วันที่เก็บ และวันที่เตรียมตัวอย่าง เก็บขวดบรรจุสารสกัดสมุนไพรไว้ในตู้เย็น ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

เครื่องมือ

1. เตาอบร้อนไฟฟ้ารุ่น ULE-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-140 ของบริษัท Buchi Laboritechnik ประเทศญี่ปุ่น เครื่องทำสุญญากาศ รุ่น 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 A˚4 μm และเครื่องตรวจวัดชนิดโฟโตไดโอดแอเรย์รุ่น 2770
7. Sep-Pak C18 Cartridge และ Nylon filter ของบริษัท Waters ประเทศสหรัฐอเมริกา
8. แผ่นเคลือบซิลิกาเจลชนิดอาร์พี 18 เอฟ 254 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 (Ultrasonicator bath) บริษัท Elma ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
12. เครื่องทำให้แห้งด้วยความเย็น (Freeze dryer) บริษัท Labconco ประเทศสหรัฐอเมริกา

สารเคมี

1. สารเคมีทุกชนิดที่ใช้ในการทดลองต่างๆ ยกเว้นสารเคมีที่ใช้กับเครื่องแยกโครมาโทกราฟสมรรถนะสูง เป็นชนิดที่ใช้กับงานวิเคราะห์ (analytical grade) และน้ำบริสุทธิ์ที่ใช้ในงานทดลองเป็นน้ำที่ได้จากการกรองเอาอนุภาคที่มีประจุออก (deionized water)
2. สารเคมีทุกชนิดที่ใช้กับเครื่องแยกโครมาโทกราฟสมรรถนะสูง เป็นชนิดที่ใช้เฉพาะกับเครื่องแยกโครมาโทกราฟสมรรถนะสูง (LC gradient grade) ของบริษัท Merck ประเทศสหรัฐอเมริกา สำหรับน้ำบริสุทธิ์ที่ใช้กับเครื่องแยกโครมาโทกราฟสมรรถนะสูงเป็นน้ำที่กรองผ่านเครื่องกรอง 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 ในเมทานอลจำนวน 100 มิลลิลิตร
    3.2 สารละลายพีอีจี เตรียมโดยละลาย polyethylene glycol 4000 จำนวน 5 กรัม ในเอทานอล 100 มิลลิลิตร
4. สารละลาย Fehling มีวิธีเตรียมดังต่อไปนี้
    4.1 สารละลายทองแดง (Copper solution) เตรียมโดยละลาย cupric sulfate 3.5 กรัมในน้ำ 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) Froth Test: ชั่งตัวอย่าง 0.5 กรัม บรรจุในหลอดทดลองที่มีฝาเกลียวปิด เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เขย่าแรงๆ นานประมาณ 30 วินาที สังเกตฟองที่เกิดขึ้น[26] (ตารางที่ 1)

(2) Liebermann-Burchard Test: ชั่งตัวอย่าง 0.5 กรัม บรรจุในขวดแก้วก้นกลม เติมเมทานอล 10 มิลลิลิตร นำไปต้มบนอ่างอังไอน้ำเป็นเวลา 5 นาที กรอง นำสารละลายที่กรองได้ไประเหยให้แห้ง 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 เติมเมทานอล 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 % เอทานอล จำนวน 10.0 มิลลิลิตร โดยใช้อ่างเสียงความถี่สูง นาน 30 นาที กรองขณะร้อน นำสารละลายที่กรองได้ไประเหยจนเหลือ 1 มิลลิลิตรด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วปรับปริมาตรด้วย 50 % เอทานอล จนได้ 2.0 มิลลิลิตร

(2) การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

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

(3) น้ำยาแยก

เตรียมน้ำยาแยกโดยผสมเมทานอล และน้ำ ในอัตราส่วน 40:60 ให้เข้ากันดี นำมาใส่ในถังทำโครมาโทกราฟีทิ้งไว้อย่างน้อย 1 ชั่วโมงก่อนใช้ เพื่อให้บรรยากาศในถังอิ่มตัวด้วยน้ำยาแยก

(4) วิธีการ

ใช้หลอดรูเล็ก (capillary tube) นำสารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานชนิดละ 2 ไมโครลิตร มาแต้มบนแผ่นเคลือบซิลิกาเจลในแนวระดับเดียวกัน โดยให้ห่างจากขอบล่างของกระจกประมาณ 2 เซนติเมตรและให้มีระยะห่างระหว่างหยดของสารละลายแต่ละชนิดไม่น้อยกว่า 1 เซนติเมตร ผึ่งให้แห้ง นำไปตั้งในถังทำโครมาโทกราฟีที่เตรียมไว้ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้น้ำยาแยกซึมขึ้นไปตามผิวที่ฉาบสูง 15 เซนติเมตร 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 % เอทานอล 10.0 มิลลิลิตร โดยใช้อ่างเสียงความถี่สูง นาน 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 % เอทานอล 1 มิลลิลิตร

(3) น้ำยาแยก

ใช้สารละลาย 1% กรดอะซีติก ผสมกับน้ำและอะซีโตไนไตรล์ 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% เอทานอล

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 มิลลิลิตรด้วยขวดปรับปริมาตร ระวังอย่าให้มีฟองขณะปรับปริมาตร

ปิเปตสารละลายใส่ลงในหลอดทดลอง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 16 มิลลิเมตร ชนิดมีฝาเกลียวปิดสนิท จำนวน 10 หลอด โดยเริ่มตั้งแต่ 1, 2, 3,.....,10 มิลลิลิตร โดยให้ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 10 มิลลิลิตรทุกหลอด เขย่าขึ้นลงให้ได้อัตรา 30 ครั้งต่อ 15 วินาที แล้วตั้งทิ้งไว้ 15 นาที เมื่อครบเวลาให้วัดส่วนสูงของฟอง และคำนวณดัชนีการเกิดฟองโดยใช้สูตรดังนี้

ดัชนีการเกิดฟอง = 1000/ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบที่ทำให้เกิดฟองสูงกว่า 1 เซนติเมตร

ผลการวิจัย

จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยปฏิกริยาการเกิดสีของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงใน 50% เอทานอล 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% เอทานอลมีองค์ประกอบทางเคมีประมาณ 15-16 ชนิด และในทุกตัวอย่างตรวจพบสารสำคัญดังกล่าวด้วย (ดังแสดงในรูปที่ 3)

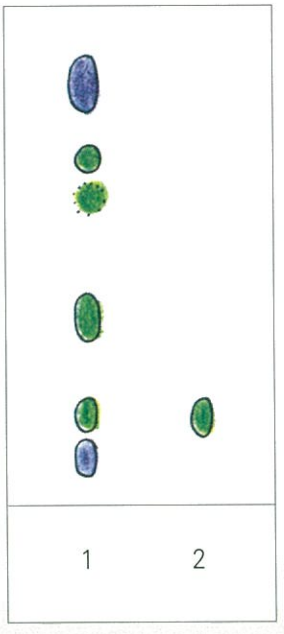
ตารางที่ 1 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงใน 50% เอทานอลด้วยปฏิกริยาการเกิดสี

วิธีทดสอบ	ผลการทดสอบ
Froth Test (ตรวจสอบสารประเภทซาโปนิน)	เกิดฟองชนิดที่คงทนได้นานกว่า 15 นาที
Liebermann-Burchard Test (ตรวจสอบสารประเภทเทอร์ปีนส์และสเตอรอล)	ได้วงแหวนสีน้ำตาลแดง ระหว่างรอยต่อของชั้นสารละลาย
Fehling Test (ตรวจสอบสารประเภทน้ำตาล ที่สูญเสียอิเล็กตรอนได้ง่าย)	ได้ตะกอนสีแดงอิฐ
Cyanidin Test (ตรวจสอบสารประเภทฟลาโวนอยด์)	ได้สารละลายสีน้ำตาลแดง

ตารางที่ 2 ค่า hR_f และผลการตรวจสอบสารประเภทฟลาโวนอยด์ของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงใน 50% เอทานอล

จุดสี	ค่า hR_f	การตรวจสอบเรืองแสงภายใต้ UV 366 กับสารละลายเอ็นพี-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

*genistein-7-O-[α-rhamnopyranosyl-(1→6)]-β-glucopyranoside

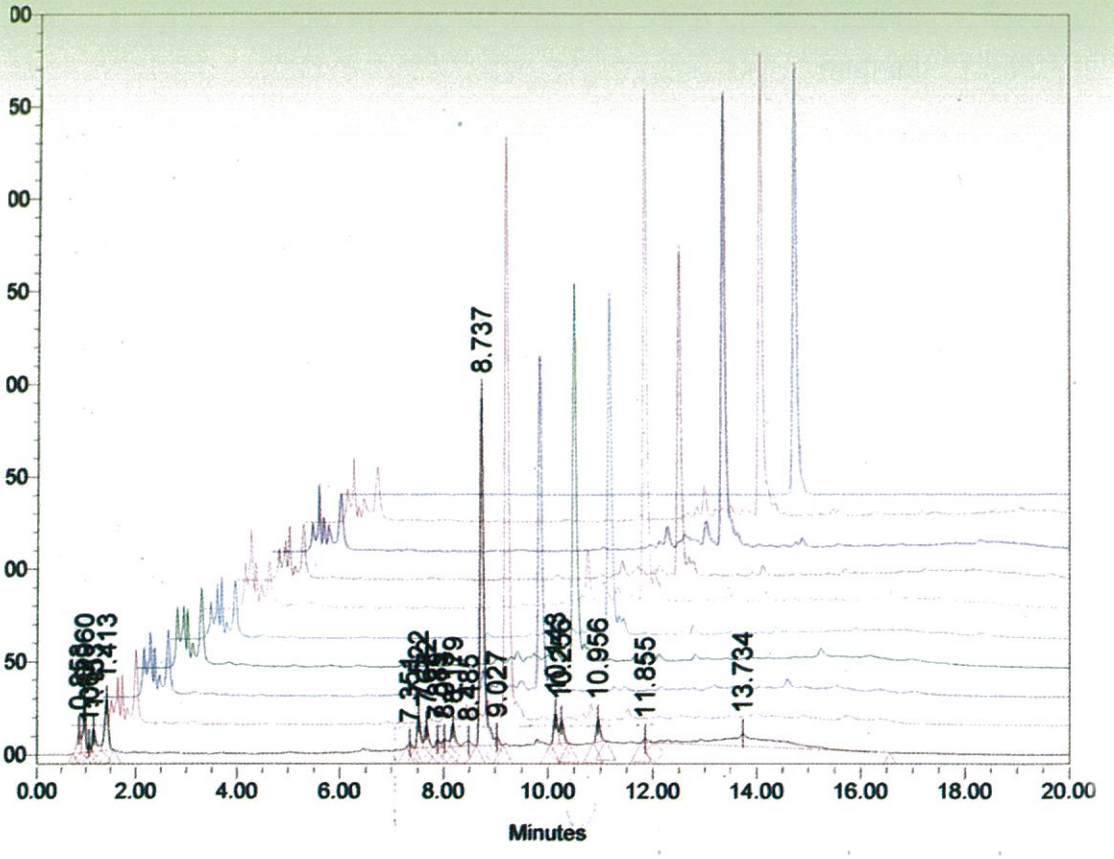


รูปที่ 2 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีรงคเลขผิวบางของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงใน 50% เอทานอล เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน เมื่อใช้สารละลายผสมของเมทานอล: น้ำในอัตราส่วน 40:60 เป็นน้ำยาแยกตรวจสอบโดยใช้ สารละลายเอ็นพี-พีอีจี

1 = สารสกัดด้วย 50% เอทานอลจากเถาวัลย์เปรียง

2 = genistein-7-O-[α-rhamnopyranosyl-(1→6)]-β-glucopyranoside

( ) = จุดสีที่พบในบางตัวอย่าง



รูปที่ 3 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูงของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงใน 50% เอทานอล เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน 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% เอทานอล ทำโดยการวิเคราะห์หาปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ ปริมาณสารสกัดด้วย 50% เอทานอล ปริมาณความชื้น ดัชนีการเกิดฟอง และค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลาย 1.0% ในน้ำ พบว่ามีค่าเฉลี่ย ดังนี้ 74.55 ± 13.40, 88.37 ± 3.09, 4.68 ± 0.61, 500 ± 0 และ 5.06 ± 0.09 ตามลำดับ ซึ่งค่าเฉลี่ยดังกล่าวและเกณฑ์ที่ใช้ในการกำหนดได้แสดง ไว้ในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการประเมินคุณภาพทางเคมีและกายภาพของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงใน 50% เอทานอล

รายการ	ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนเฉลี่ย ($\bar{X}$ ± SD, n = 9)	เกณฑ์กำหนดค่าบน ($\bar{X}$ + 10%)	เกณฑ์กำหนดค่าล่าง ($\bar{X}$ - 10 %)
ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ	74.55 ± 13.40	-	67
ปริมาณสารสกัดด้วย 50% เอทานอล	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

วิจารณ์

จากการตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีของตัวอย่างสารสกัดลำต้นแห้งของเถาวัลย์เปรียงใน 50 % เอทานอล ซึ่งเก็บวัตถุดิบจากแหล่งธรรมชาติต่างๆ ในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลางของประเทศไทย จำนวน 9 ตัวอย่าง พบว่า ทุกตัวอย่างให้ผลเหมือนกันในการทดสอบด้วยปฏิกิริยาการเกิดสี 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 6-7 ชนิด ซึ่งการทดสอบตรวจพบ genistein-7-O- [α-rhamnopyranosyl-(1→6)]-β-glucopyranoside ในสารสกัดด้วยเอธานอลของเถาวัลย์เปรียงทุกตัวอย่าง สำหรับการทดสอบสารสกัดเถาวัลย์เปรียงโดยวิธีโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง (HPLC) พบว่า มีองค์ประกอบทางเคมี 12-16 ชนิดและพบ genistein-7-O-[α-rhamnopyranosyl-(1→6)]-β-glucopyranoside เป็นองค์ประกอบในทุกตัวอย่างโดยมีค่า Retention time (T_R) ที่ 8.7 นาที ดังแสดงในรูปที่ 3

การประเมินคุณภาพของสมุนไพรตามมาตรฐานสากลนั้น นอกจากการตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีแล้ว ยังต้องตรวจคุณภาพทางกายภาพและทางเคมีด้วย โดยการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ ปริมาณสารสกัดด้วย 50% เอทานอล ปริมาณความชื้น และดัชนีการเกิดฟอง[29-30] ในการกำหนดปริมาณความชื้น มีความสำคัญต่ออายุของสารสกัดสมุนไพร หากสารสกัดสมุนไพรมีความชื้นสูง จะทำให้เกิดการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ได้ง่าย และอาจทำให้เสื่อมคุณภาพได้เร็ว รวมทั้งเมื่อนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ก็จะทำให้มีคุณภาพต่ำไปด้วย นอกจากนี้ ค่าสารสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ที่เหมาะสม เป็นอีกดัชนีหนึ่งที่จะบ่งชี้

คุณภาพของสารสำคัญในสารสกัดสมุนไพร หากสารสกัดสมุนไพรนั้นยังไม่ทราบสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ หรือยังไม่มีวิธีวิเคราะห์สารสำคัญที่เหมาะสม[30] ดังนั้น การศึกษาวิจัยนี้ จึงวิเคราะห์หาปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ และปริมาณสารสกัดด้วย 50% เอทานอล ส่วนค่าดัชนีการเกิดฟองแสดงถึงปริมาณสารประเภทซาโปนินในสมุนไพร เนื่องจากสารประกอบซาโปนินมีคุณสมบัติเฉพาะตัว คือเกิดฟองที่คงทนเมื่อเขย่ากับน้ำ ถึงแม้ว่า ค่าดัชนีการเกิดฟองควรไม่น้อยกว่า 450 จากการกำหนดเกณฑ์ค่าล่าง แต่เนื่องจากวิธีการหาค่าดังกล่าว(จากสมการ 1000/ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบที่ทำให้เกิดฟองสูงกว่า 1 เซนติเมตร) จะเห็นว่า ค่าที่ได้จากการทดสอบที่น้อยกว่า 500 ควรมีค่าเท่ากับ 333 สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่างของสารสกัดมีความสำคัญในการเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์ เนื่องจากหากมีความเป็นกรด-ด่างที่สูงเกินไปจะมีผลต่อคุณภาพและอายุความคงตัวของผลิตภัณฑ์ ดังนั้น พบว่า ค่าที่เหมาะสมสำหรับสารสกัดเถาวัลย์เปรียงใน 50% เอทานอลที่ความเข้มข้น 1.0% ในน้ำ ควรมี pH ระหว่าง 4.5 ถึง 5.5

ผลการศึกษาวิจัยนี้ ทำให้สามารถทราบถึงคุณภาพทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดสมุนไพรชนิดนี้ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพที่มีคุณภาพที่ดี ส่วนการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ในสารสกัดนั้น คณะผู้วิจัยจะดำเนินการต่อไปในอนาคต

สรุปผลการทดลอง

ผลการศึกษา แสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากลำต้นแห้งของเถาวัลย์เปรียงใน 50% เอทานอล ประกอบด้วยสารประเภทซาโปนิน น้ำตาลกลุ่มที่สูญเสียอิเล็กตรอนได้ง่าย เทอร์ปีนส์ และฟลาโวนอยด์ จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีรงคเลขผิวบาง และวิธีโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง พบว่า สารสกัดทุกตัวอย่างมี genistein-7-O-[α-rhamnopyranosyl-(1→ 6)]-β-glucopyranoside ซึ่งเป็นสารประเภทไอโซฟลาโวนกลัยโคไซด์ที่ตรวจพบในวัตถุดิบด้วย[31] ดังนั้น เพื่อประโยชน์ในการควบคุมคุณภาพทางเคมีและกายภาพของสารสกัดสมุนไพรชนิดนี้ใน 50% เอทานอล จึงได้กำหนดเกณฑ์สูงสุด โดยกำหนดค่าบนจากค่าเฉลี่ยบวกด้วย 10% สำหรับปริมาณที่ระบุว่า 'ไม่เกิน' และเกณฑ์ต่ำสุดโดยกำหนด ค่าล่างจากค่าเฉลี่ยลบด้วย 10% สำหรับปริมาณที่ระบุว่า 'ไม่น้อยกว่า' (ยกเว้นค่าดัชนีการเกิดฟอง) ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 สรุปผลข้อกำหนดคุณภาพของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงใน 50 % เอทานอล

รายการ	ไม่เกิน	ไม่น้อยกว่า
ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ (% โดยน้ำหนัก)	-	67
ปริมาณสารสกัดด้วย 50% เอทานอล (% 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 พิสูจน์สูตรโครงสร้างของสารสำคัญ 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. 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): 1- 15.

ข้อกำหนดทางเคมีของสมุนไพรปัญจขันธ์

วารุณี จิรวัฒนาพงศ์, จารีย์ บันสิทธิ์
เย็นจิตร เตชะดำรงสิน, ดวงเพ็ญ ปัทมดิลก
สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ

สมุนไพรปัญจขันธ์มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino. วงศ์ Cucurbitaceae สมุนไพรชนิดนี้มีศักยภาพที่จะนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพร สารออกฤทธิ์เป็นสารประเภท dammarance-type saponins ชื่อ gypenosides ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้องอก ลดไขมันในเลือด และฤทธิ์ต้านอักเสบ ฯลฯ จึงได้ศึกษาคุณภาพของสมุนไพรปัญจขันธ์ซึ่งเก็บจากแหล่งธรรมชาติและแหล่งปลูกต่าง ๆ จำนวน 13 ตัวอย่าง โดยจัดทำข้อกำหนดเอกลักษณ์ทางเคมี เพื่อตรวจหาสารประเภทซาโปนินซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ ด้วยปฏิกิริยาการเกิดสี การเกิดฟอง และรงคเลขผิวบาง (Thin-layer chromatography) นอกจากนี้ ยังได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ และจัดทำข้อกำหนดทางเคมีของส่วนเหนือดินของสมุนไพรชนิดนี้ด้วย

Chemical Specification of *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino

Warunee Jirawattanapong, Jaree Bansiddhi
Yenchit Techadamrongsin, Duangpen Pattamadilok
Medical Plant Research Institute, Department of Medical Sciences

ABSTRACT

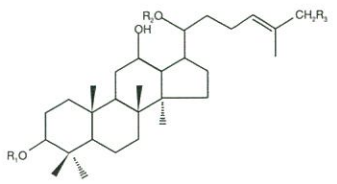
Gynostemma pentaphyllum (Thunb.) Makino (Cucurbitaceae) is of interest as a potential crude drug. Its chemical constituents were identified as gypenosides, dammarane-type saponins, which possessed various activities : antitumor, antilipemic, and anti-inflammatory activities etc. In this investigation, the quality of *G. pentaphyllum* collected from 13 various areas, both wild and cultivated, was examined. The chemical identifications were provided by colour reaction, froth test and TLC fingerprint. The efficient methods to determine the total saponins which are pharmaceutically valuable have been developed. Subsequently, the chemical specifications for the aerial parts of this herb were provided.

Key words : *Gynostemma pentaphyllum*, Chemical specification, Total saponins

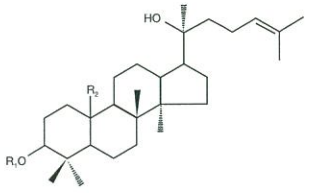
Introduction

Gynostemma pentaphyllum (Thunb.) Makino belongs to the family Cucurbitaceae. It is widely distributed in the South Shaanxi and the southern area of the Yangtze River of China, Japan, India, Indo-China, and Indonesia. In Thailand, this plant is found growing wild on highlands in the northern region such as Doi Chiang Dao, Chiang Mai province where it is also cultivated for commercial purposes. *G. pentaphyllum* is a herbacious climber with slender stem and 2-branched tendril. The leaves are compound, consisting of 3 - 5 leaflets, rarely 7 leaflets, ovate-orbicular in outline. The male and female flowers grow on separate plants. Flowers are very small, greenish yellow and arranged in a panicle. Fruits are small, globose, and black when ripe[1-4].

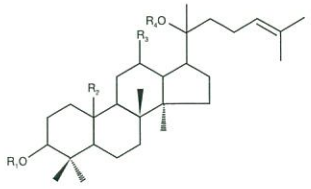
The aerial parts are of interested as potential crude drug. In Japan, it is known as Amachazuru which is used as antilipemic[5,6], antitumor[7,8], and health food supplements[9]. The utilities of this plant in China is anti-inflammatory, antitussive, treatment of cough, and chronic bronchitis[10] *G. pentaphyllum* is known as Panchakhan in Thailand. Although it is said to be one of the most commonly medicinal plants in many countries in Asia, there has been no report for its traditional use in Thailand except a well-known herbal tea in the recent year.



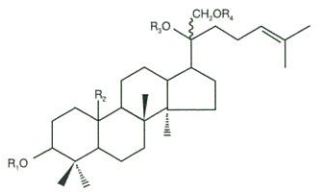
Gypenosides	R_1	R_2	R_3
I	-glc-(glc)-rham	-glc-glc	H
II	-glc-(glc)-rham	-glc-rham	H
III	-glc-glc	-glc-glc	H
IV	-glc-glc	-glc-xyl	H
V	-glc-glc	-glc-rham	H
VI	-glc-(glc)-rham	glc	H
VII	-glc-rham	-glc-rham	H
VIII	-glc-glc	glc	H
IX	glc	-glc-xyl	H
X	glc	-glc-rham	H
XI	-glc-rham	glc	H
XII	glc	glc	H
XIII	H	-glc-xyl	H
XIV	H	-glc-rham	H
XV	-glc-xyl	-glc-xyl	H
XVI	-glc-xyl	-glc-rham	H
XVII	glc	-glc-glc	H
XVIII	-glc-(glc)-rham	-glc-rham	OH
XIX	-glc-glc	-glc-rham	OH
XX	-glc-(glc)-rham	-glc-glc	OH
XXI	H	-glc-xyl	OH



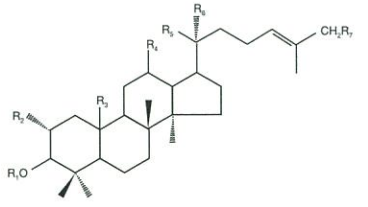
Gypenosides	R_1	R_2
XXVII	-glc-glc	CH_2OH
XXVIII	-glc-glc	CHO
XXIX	-ara-glc	CHO



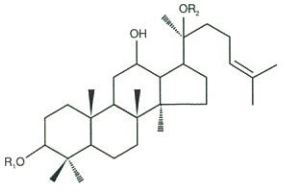
Gypenosides	R_1	R_2	R_3	R_4
XXXVI	-ara-glc	CHO	H	-glc-rham
XXXVII	-ara-glc	CHO	H	-glc-xyl
XXXVIII	-glc-glc	CH_2OH	H	H
XXXIX	-glc-glc	CH_2OH	OH	H(20R)
XL	-glc-glc	CHO	OH	H(20R)
XLI	-glc-glc	CH_2OH	H	H(20R)



Gypenosides	R_1	R_2	R_3	R_4
XXII	-glc-glc	CH_2OH	-glc-xyl	H
XXIII	-glc-glc	CH_2OH	H	glc
XXIV	-glc-glc	CHO	H	glc
XXV	-ara-glc	CHO	H	glc
XXVI	-ara-glc	CHO	glc	H
XXX	glc	CH_2OH	glc	H
XXXI	-glc-glc	CH_2OH	H	H
XXXII	glc	CH_2OH	H	glc
XXXIII	-glc-glc	CHO	H	H
XXXIV	-glc-glc	CHO	-glc-rham	H
XXXV	-glc-glc	CHO	-glc-xyl	H



Gypenosides	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6	R_7
XLII	-glc-glc	OH	CH_3	OH	-oglc-glc	CH_3	H
XLIII	-glc-glc	OH	CH_3	OH	-oglc-rham	CH_3	H
XLIV	glc	OH	CH_3	OH	-oglc-glc	CH_3	H
XLV	glc	OH	CH_3	OH	-oglc-rham	CH_3	H
XLVI	-glc-glc	OH	CH_3	OH	-oglc	CH_3	H
XLVII	-glc-glc	OH	CH_3	OH	-oglc-rham	CH_3	OH
XLVIII	-ara-(glc)-rham	H	CHO	H	OH	CH_2oglc	H
XLIX	-ara-(xyl)-rham	H	CHO	H	OH	CH_2oglc	H



Gypenosides	R_1	R_2
A	-glc-(rham)-glc	-glc-glc
B	-glc-(rham)-glc	-glc-rham
E	-glc-glc	-glc-rham
F	-glc-(rham)-glc	glc
G	-glc-rham	-glc-rham
I	glc	-glc-xyl
J	glc	-glc-rham
K	-glc-rham	glc
M	H	glc
N	H	-glc-rham

Figure 1 Structure of active constituents in aerial parts of *G. pentaphyllum* (Thunb.) Makino.[5-9,11-12,14]

Earlier phytochemical studies of *G. pentaphyllum* were reported the dammarane-type saponins, gypenosides (Figure 1) of which the structures were related to ginsenosides from the Ginseng root, as the major constituents[11]. Eighty two saponins have been isolated and identified[12]. The structures of gypenosides III, IV, VIII and XII were identical to ginsenosides Rb_1, Rb_3, Rd and F_2, respectively[11,13]. Antilipemic gynosaponins were reported as gynosaponins A, B, E, F, G, I, K, M, N, O[5,6]. Gypenosides I-III, V, VII-VIII, X-XIII, XIX-XX, XXII-XXIX had antitumor activity[7,8], while gypenosides XXX-XLI had anti-peptic ulcer activity[14]. Total saponins isolated from this plant had anti- inflammatory[15], anti platelet aggregation[16], anti- atherosclerosis and anti-aging activities[17]. Furthermore, *G. pentaphyllum* contained many minerals such as calcium, magnesium, manganese, copper, potassium, sodium, iron[18] and amino acids[19].

Since *G. pentaphyllum* becomes a popular health food supplement in Thailand and there is still no information presently available that specifically deal with chemical specifications of this crude drug. In this investigation, two wild samples and eleven cultivated samples were analyzed and its appropriate chemical specifications are established to convince the ultilization and quality control of this crude drug.

Materials and Methods

Materials

1. Crude drug sample : Eleven samples and 2 samples of *Gynostemma pentaphyllum* (Thumb.) Makino were taxonomic collected from various cultivated areas and 2 different wild areas, respectively, in Chiang Mai province during December 1999 to March 2000. The voucher specimen (Bansiddhi 43-21) was deposited at the Botanical Laboratory, Medicinal Plant Research Institute of Department of Medical Sciences. The botanical identifications were determined using description of Aymonin[1], Backer[2] and WU[3], and compared with the authentic specimen (Kerr-6555) at the Bangkok Herbarium (BK), Department of Agriculture, Ministry of Agriculture and Cooperative. The foreign matters were removed. The aerial parts were washed thoroughly, then cut into small pieces, dried in the hot-air oven at 50°C, ground to powder, passed through sieve with mesh no. 80 and kept in the well-closed containers.
2. Sieve : Aperture 180 microns, mesh no. 80 from Endecotts Ltd., London, England.
3. Sep-Pak C-18 Cartridges from Waters Corp., USA.
4. TLC Plate Silica gel 60, precoated, 0.25 mm thickness, Art. 5721 from E. Merck, Germany.
5. Antimony trichloride from E. Merck, Germany.
6. Conc. Sulfuric acid from Farmitalia Carlo Erba, Italy.
7. Solvents and chemicals used in this investigation were all analytical grade, and water was distilled water.

Methods

I. Chemical Identification

A. Preliminary Test

1. The powdered drug (0.5 g) was heated with 10 ml of water on a water-bath for 15 min, then filtered. The filtrate was transferred to a separatory funnel and extracted with the equal volume of butanol. Activated charcoal (0.1 g) was added to the butanol layer, stirred and filtered. The final filtrate was proceeded as following:
   1.1 Two-ml of the butanol extract was evaporated to dryness in porcelain dish, added dropwise saturated solution of antimony trichloride in chloroform, evaporated to dryness again and the colour was noted[20].
   1.2 Two-ml of butanol extract was evaporated to dryness in porcelain dish, added a few drop of conc. sulfuric acid and the colour was noted.
2. The powdered drug (0.5 g) was heated with 10 ml of water on a water-bath for 15 min, then filtered. One-ml of the filtrate was transferred to a test-tube and shaked for a while, a long lasting foam was observed[21].

B. Thin Layer Chromatography (Confirmatory Test)

Sample preparation : The powdered drug (1 g) was refluxed with 50 ml of water for 2 hr, filtered and washed with hot water, then transferred to 100-ml volumetric flask and adjusted to volume. Ten-ml portion of the solution was transferred to a separatory funnel, 15 ml of water was added and the mixture was extracted with three 10-ml portions of butanol. The butanol extract was evaporated to dryness, then dissolved in 10 ml of water. Five-ml portion of the resulting solution was applied to Sep-Pak C-18 and washed with 10 ml of water, 5 ml of 50% methanol, 2 ml of 60% methanol and eluted with 2 ml of absolute methanol. The methanol eluate was concentrated to 1 ml.

Adsorbent : Silica gel 60, precoated 0.25 mm thickness, E. Merck

Developing solvent : Chloroform:methanol:water (65:35:10 lower phase)

Developing distance: 10 cm

Spotting amount : 10 μl

Detection : Spray with excess amount of 20% sulfuric acid and activating at 105°C for 5 min.

II. Quality Evaluation

A. Determination of Ash

Total ash and acid-insoluble ash content were determined as described in Thai Pharmacopoeia[22].

B. Determination of Extractive Values

Ethanol soluble and water soluble extractive were carried out using the methods described in British Pharmacopoeia[23].

C. Determination of Water Content

Water content was carried out by the azeotropic method described in The United States Pharmacopoeia XXII[24].

D. Determination of Foaming Index

Foaming index was determined as described in Thai Herbal Pharmacopoeia Vol. II[25].

E. Determination of Fixed Oil Content

Fixed oil content was carried out using method described in The Quantitative Analysis of Drugs[26].

The powdered drug (5 g) was accurately weighed, placed in an extraction thimble and extracted with light petroleum (b.p. 40°C to 60°C) in a soxhlet apparatus for 3 to 4 hours. The thimble was removed and dried. The contents were ground finely in a mortar, returned into the thimble and continued the extraction for another hour. After evaporation of solvent, the oil was dried to constant weight at 100°C. The percentage of the fixed oil was calculated on the water free basis.

F. Determination of Total Saponins* Content by Modified Method

The analytical conditions of the determination procedure for total saponins content in crude drug was modified by the following principle of Takemoto's method[27].

The fine powdered (180 μm) 0.5 g of *G. pentaphyllum* was accurately weighed and placed in a 250-ml round bottom flask, then refluxed with 50 ml of water for 2 hours and filtered. The marc was washed with a proper volume of hot water. The washing and the filtrate were combined, transferred to 100-ml volumetric flask and adjusted to volume. Twenty-ml portion of this solution was transferred to a separatory funnel and extracted with three 10-ml portions of butanol. The butanol extracts were combined and washed with two 10-ml portions of water. After evaporating to dryness, the residue was dissolved in water and made up to volume of 10.0 ml. Five-ml portion of the resulting solution was applied to Sep-Pak C-18, then washed with 10 ml of water, 5 ml of 50% methanol, 2 ml of 60% methanol, and eluted with 2 ml of absolute methanol, respectively. The eluate was evaporated to dryness and dried to constant weight at 105°C. The total saponins content was calculated on the water free basis.

* "Total saponins" in this article means "total gypenosides"

Results

1. Chemical Identification

The chemical identification of 11 samples of *G. pentaphyllum* collected from heterogenous cultivated areas was performed compared to both samples obtained from different wild areas by preliminary test and Thin-layer chromatographic analysis. The results are shown in Table 1, Figure 2 and Table 2, respectively.

Table 1 Chemical identification of aerial parts of *G. pentaphyllum* (Thunb.) Makino.

Sources	Preliminary test			Confirmatory test
	Saturated antimony trichloride/chloroform	conc. Sulfuric acid	Froth test	
Cultivated areas	All samples gave violet colour	All samples gave red colour	All samples produced persisting foam for over 30 min	The samples showed 4-14 unidentified saponins
Wild areas (Both samples)	violet colour	red colour	produced persisting foam for over 30 min	showed 9 unidentified saponins

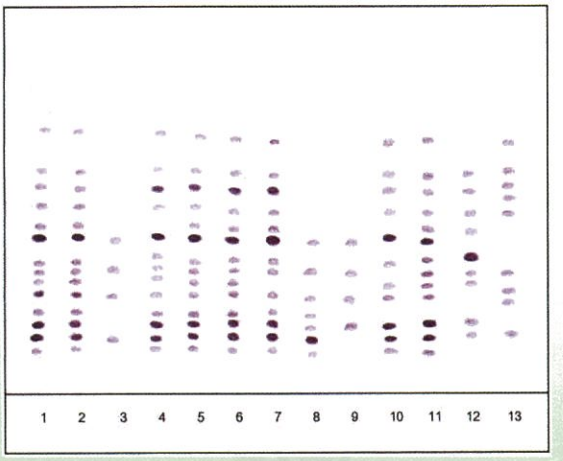


Figure 2 TLC chromatograms of the water extracts of aerial part of *G.pentaphyllum* (Thunb.) Makino.

Developing solvent : Chloroform:methanol:water (65:35:10 lower phase)

Remarks : 1-11 = samples of *G.pentaphyllum* collected from cultivated areas

12-13 = samples of *G.pentaphyllum* collected from wild areas

o = detected after spraying with 20% sulfuric acid and activating at 105°C for 5 min gave violet colour.

Table 2 hR_f Values of components in water extract of aerial parts of *G. pentaphyllum* (Thunb.) Makino.

Spot	hR_f Value	Detection with 20% sulfuric acid
1	11-12	Violet
2	14-15	Violet
3	17-18	Deep violet
4	20-21	Deep violet
5	25-26	Violet
6	28-29	Violet
7	31-32	Violet
8	34-35	Violet
9	39-41	Deep violet
10	43-44	Violet
11	47-48	Violet
12	53-54	Violet
13	58-59	Violet
14	67-69	Violet

II. Quality Evaluation

To estimate the value of *G. pentaphyllum* crude drugs, quality evaluation were performed as follows : determination of ash, extractives, moisture content, fixed oil content, foaming index, and total saponins content. The results are shown in Table 3, Figure 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, and 10. The quality evaluation of *G. pentaphyllum* collected from cultivated areas compared to the samples from wild areas is demonstrated in Table 4.

Table 3 Quality evaluation of aerial parts of G. *pentaphyllum* (Thunb.) Makino.

Quality evaluation	Range (%) (n=13)	X ± SD (n=13)
Total ash content	7.50 - 17.96	11.21 ± 2.27
Acid-insoluble ash content	0.06 - 1.86	0.85 ± 0.59
Ethanol-soluble extractive	6.96 - 12.11	10.10 ± 1.00
Water-soluble extractive	21.24 - 30.26	24.13 ± 2.57
Moisture content	4.90 - 8.83	7.10 ± 1.38
Fixed oil content	1.40 - 3.78	1.94 ± 0.28
Foaming index	166 - 2000	735 ± 763
Total saponins content	1.30 - 6.59	4.66 ± 1.31

Table 4 Comparison of quality evaluation of aerial parts of *G. pentaphyllum*. (Thunb.) Makino. collected from cultivated areas and wild areas.

Quality evaluation	Sources	
	Cultivated areas range in % (n =11)	Wild areas range in % (n=2)
Total ash content	10.15 - 17.96	7.50 - 8.51
Acid-insoluble ash content	0.33 - 1.86	0.06 - 0.08
Ethanol-soluble extractive	6.96 - 12.11	8.32 - 9.81
Water-soluble extractive	21.24 - 30.26	23.78 - 25.78
Moisture content	4.90 - 8.83	4.90 - 8.82
Fixed oil content	1.79 - 3.78	1.40 - 1.96
Foaming index	166 - 2000	2000
Total saponins content	1.30 - 6.59	3.16 - 6.08

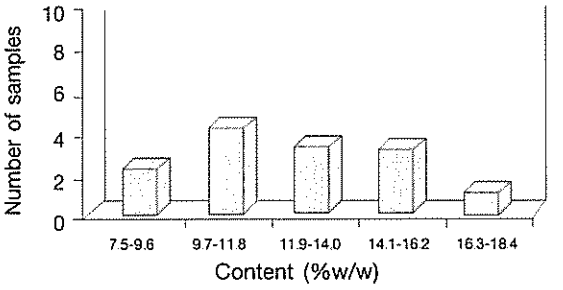


Figure 3 Total ash content in aerial parts of *G.pentaphyllum*

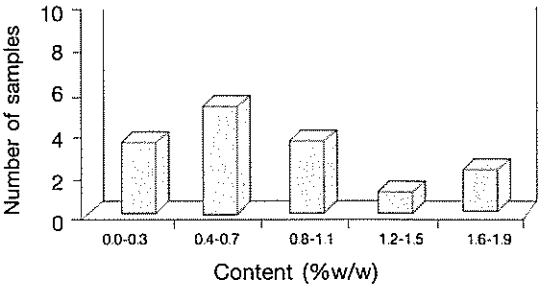


Figure 4 Acid insoluble ash content in aerial parts of *G.pentaphyllum*

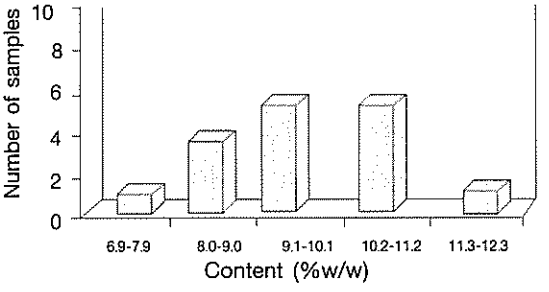


Figure 5 Ethanol soluble extractive content in aerial parts of *G.pentaphyllum*

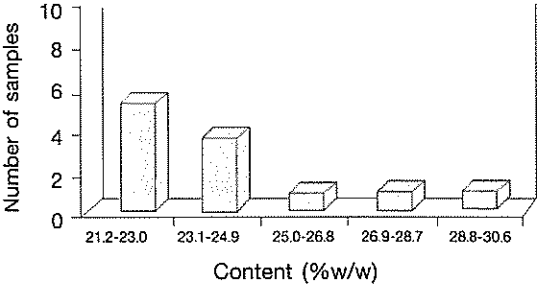


Figure 6 Water soluble extractive content in aerial parts of *G.pentaphyllum*

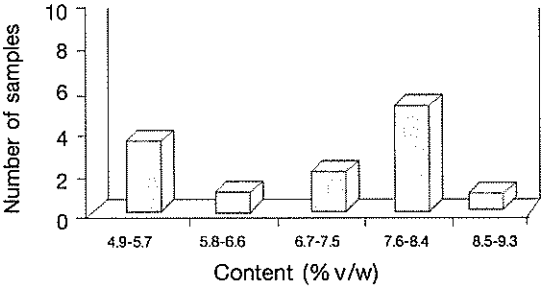


Figure 7 Moisture content in aerial parts of *G.pentaphyllum*

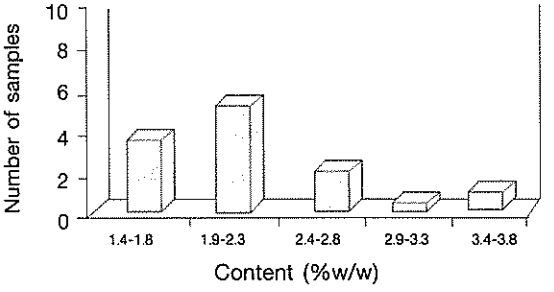


Figure 8 Fixed oil content in aerial parts of *G.pentaphyllum*

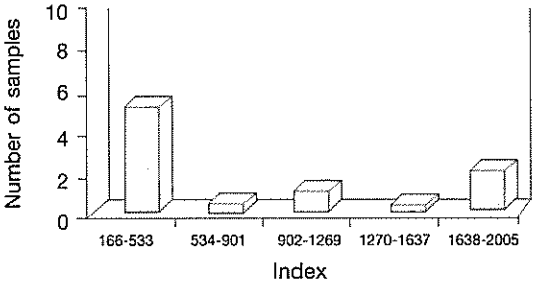


Figure 9 Foaming index of the aerial parts of *G.pentaphyllum*

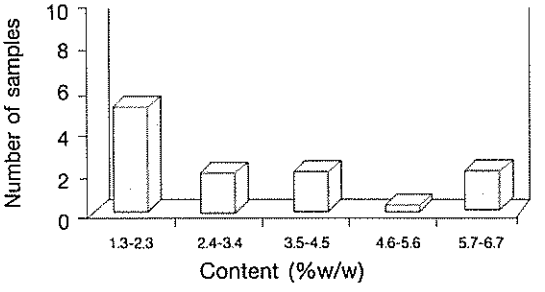


Figure 10 Total saponins content in aerial parts of *G.pentaphyllum*

Discussion

The purpose of drug quality control and evaluation is to assess the value of raw materials and to assure the phytopharmaceutical products to the standard requirement. Since there is no report of *G. pentaphyllum* distribution in Thailand and it is found both wild and cultivated areas in Chiang Mai province, all samples of *G. pentaphyllum* in this investigation is collected from Chiang Mai province. In the current study, the chemical identification of various samples of *G. pentaphyllum* collected from cultivated areas was performed comparing to the samples from wild areas by preliminary test and TLC fingerprint. Since the active compounds were dammarane-type saponins, the preliminary test was emphasized on detection of the total saponins by colour reaction with saturated solution of antimony trichloride and conc. sulfuric acid, and by froth test. TLC fingerprint was also particularly valuable for the qualitative determination. At double concentration, the TLC chromatograms of sample number 3, 8 and 9 showed the same pattern as the others from cultivated areas. The TLC chromatogram illustrated that the pattern of the contents in *G. pentaphyllum* obtained from cultivated areas and wild areas were quite similar.

According to the Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials[21], the determination of ash content, total ash and acid insoluble ash, are intended to measure the amount of residual substance remaining after ignition of the crude drugs. The values of total ash and acid insoluble ash content are varied from 7.50 - 17.96 and 0.06 - 1.86%, respectively. The rise of these values is dued to the presence of the high minerals content in *G. pentaphyllum*[18].

To attain the efficient phytotherapy, the determination of active constituents plays the most important part of quality control. Previous study in China reported that the total saponins content in the leaves and stems of *G. pentaphyllum* were 6.65% and 4.05%, respectively[28] while the results obtained from this investigation indicated that the total saponins content varied from 1.30% to 6.59%. There were 4 samples, in comparison with the other samples and the previous report of China, having very low content; 1.30, 1.90, 2.29, and 2.77%. Therefore, these samples may not be counted for the specification. Besides, most of the variations of active content and ash content occurred in the cultivated samples. These are probably the result from many factors such as varieties, climate, physical features of the growing area, irrigation, fertilizer and harvesting time, etc. So further study should be carried on to evaluate the factor affected the saponins content.

Conclusion

From the results of the study, the appropriate chemical specification of aerial parts of *Gynostemma pentaphyllum* (Thumb.) Makino. are proposed as follows

Total ash content not more than 14.0% w/w

Acid-insoluble ash content not more than 2.0% w/w

Moisture content not more than 8.0% v/w

Ethanol-soluble extractive not less than 9.0% w/w

Water-soluble extractive not less than 21.0% w/w

Fixed oil content not less than 1.0% w/w

Foaming index not less than 242

Total saponins content not less than 4.0% w/w

Reference

1. Aymonin MK. Cucurbitaceae. Flora du Cambodge du Laos et du Viet-Nam 1975; 15 : 24-8.
2. Backer CA, Bakhuizen van den Brink RC. Flora of Java. 1963. Vol. I p.305-6.
3. Wu CY, Chen SK. A Study on the Genus *Gynostemma* Bl. (Cucurbitaceae) from China. Acta Phytotaxon Sin 1983; 21 : 355-69.
4. Craib WG. Florae Siamensis Enumeratio. 1931. Vol.I p.766.
5. Takemoto T. Gynosaponins Extraction from *Gynostemma pentaphyllum*. Nippon Shoji Co., Ltd. assignee. Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 59 80,696 [84 80,696] (Cl C07J17/00), 10 May 1984, Appl 83/170,422 14 Sep 1983 (in Japanese).
6. Takemoto T. Gynosaponins Extraction from *Gynostemma pentaphyllum*. Nippon Shoji Co., Ltd. assignee. Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 59 80,700 [84 80,700] (Cl C07J17/00), 10 May 1984, Appl 83/170,426 14 Sep 1983 (in Japanese).
7. Takemoto T. Saponins from *Gynostemma pentaphyllum*. Nippon Shoji Co., Ltd. assignee. Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 58 57,398 [83 57,398] (Cl C07J9/00), 05 Apr 1983, Appl 81/156,997 01 Oct 1981 (in Japanese).
8. Takemoto T, Odashima T. Antitumor Saponins from *Gynostemma pentaphyllum*. Rohto Co., Ltd. assignee. Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 58 59,921 [83 59,921] (ClA61K31/575), 09 Apr 1983, Appl 81/157,925 02 Oct 1981 (in Japanese).
9. Kenkyusho KK. Saponins from *Gynostemma pentaphyllum* as Health Food Supplements. Osaka Yakuhin assignee. Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 60 43,358 [85 43,358] (Cl A23L1/29) 07 Mar. 1985, Appl 83/151,994 19 Aug 1983 (in Japanese).
10. Jiang-Xu New Medical College. Jiao-Gu-Lan. Zhong-Yao-Da-Zhi-Dian. Shanghai, China: Sci. & Tech; 1979 : p.16-7.
11. Takemoto T, Arihara S, Nakajima T, Okuhira M. Study on the Constituents of *Gynostemma pentaphyllum* Makino. I. Structures of Gypenosides I-XIV. Yakugaku Zasshi 1983; 103: 173-85.
12. Zhou HP. The Saponin Constituents and Pharmacology of *Gynostemma pentaphyllum* Mak. YaoXue Tongbao. 1988; 23 : 720-4.
13. Li L, Jiao LP, Lau BHS. Protective Effect of Gypenosides Against Oxidative Stress in Phagocytes, Vascular Endothelial Cells and Liver Microsomes. Cancer Biotherapy 1993; 3 : 263-72.

14. Sempuku, K. Gypenosides. Nippon Shoji Co., Ltd. assignee. Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 58 208,300 [83 208,300] (Cl C07J9/00), 03 Dec 1983, Appl 82/91,793 28 May 1982 (in Japanese).
15. Lin JM, Lin CC, Chiu HF, Yang JJ, Lee SG. Evaluation of the Anti-inflammatory and Liver-protective Effects of *Anoectochilus formaosanus, Ganoderma lucidum, Gynostemma pentaphyllum*. Am J Chin Med 1993; 21 59-69.
16. Wu J, Qiu P, Liu J, Mu Q, Xin D. Effect of Gypenosides on Platelet Aggregation and cAMP Levels in Rabbits. Zhongguo Yaolixue Yu Dullixue Zashi 1990; 4 : 54-7.
17. Li L, Lau BHS. Protection of Vascular Endothelial Cells from Hydrogen Peroxide-Induced Oxidant Injury by Gypenosides, Saponins of *Gynostemma pentaphyllum*. Phytother Res 1993; 7: 299-304.
18. Park YH, Hong YH, Park, WK. A Study on the Mineral Contents of Dolwoe Tea (*Gynostemrna pentaphyllum* Makino). Han'guk Yong yang Siklyong Hakhoechi 1987; 16 : 105-9.
19. Kim SH, Park, WK. Studies on the Amino Acid Constituents of *Gynostemrna pentaphyllum* Makino. Han'guk Yongyang Siklyong Hakhioechi 1988; 17 : 7-11.
20. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (English ed.) The Pharmacopoeia Commission of PRC, Beijing, China: The People's Medical Publishing House; 1988. p. 116-7.
21. World Health Organization. Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials. Geneva: WHO. 1992. p.25, 36. (WHO/PHARM/ 92.559).
22. Acid- insoluble Ash, Total Ash. in Thai Pharmacopoeia. Bangkok : Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. 1987. p.441. (Vol. I. Part 1).
23. Ethanol-soluble extractive, Water-soluble Extractive. in British Pharmacopoeia. London: Her Majesty's Stationery Office. 1988. p. A 136. (Vol. 2).
24. Azeotropic (Toluene Distillation) Method. in The United States Pharmacopoeia XXII. United States Pharmacopeial Convention, Inc. 1990; p.1621.
25. Foaming index. in Thai Herbal Pharmacopoeia. Bangkok : Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. 2000. p.89. (Vol.2).
26. Garratt DC. The Qualitative Analysis of Drugs. 3rd ed. Norvell, (MA): Chapman & Hall. 1964. p.750.
27. Takemoto T, Arihara S, Taniguchi S, Miyashita Y, Haji K, Shobu H. Quantitative Determination of Medicinal Saponins in *Gynostemma pentaphyllum* or Its Extracts and Pharmaceutical Preparations. Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 60 219,556 [85 219,556] (Cl G01N31/22), 02 Nov 1985, Appl 84/77,331 16 Apr 1984 (in Japanese).
28. He XL. Determination of Total Saponins in Fiveleaf Gynostemma (*Gynostemma pentaphyllum*). Zhongcaoyao 1987; 18 : 447-8.

ข้อกำหนดทางเคมี ของส่วนเหนือดินแมงลักคา
Chemical Specification of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. Aerial Parts

ประไพ วงศ์สินคงมั่น, ดวงเพ็ญ ปัทมดิลก**
จารีย์ บันสิทธิ์, ธิดารัตน์ บุญรอด**
*เย็นจิตร เตชะดำรงสิน**, ปราณี ชวลิตธำรง**
*สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
**สถาบันการแพทย์ไทย-จีน เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข

บทคัดย่อ

แมงลักคามีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. วงศ์ Labiatae (หรือ Lamiaceae) เป็นสมุนไพรชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ยาจากสมุนไพรโดยมีรายงานประโยชน์ทางเภสัชวิทยาอย่างหลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านเชื้อรา ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ แต่ยังไม่มีการศึกษาด้านคุณภาพทางเคมีของสมุนไพรชนิดนี้ จึงได้ทำการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของส่วนเหนือดินแมงลักคาที่เก็บจากแหล่งธรรมชาติในพื้นที่ภาคกลางจำนวน 15 ตัวอย่าง โดยการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ ปริมาณสารสกัดด้วย 95%เอทานอล ปริมาณความชื้น เถ้ารวม และเถ้าที่ไม่ละลายในกรด รวมทั้งการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีปฏิกิริยาการเกิดสีและวิธีโครมาโตกราฟีผิวบาง ผลการศึกษานี้จะเป็นประโยชน์ต่อการควบคุมคุณภาพทางเคมีของส่วนเหนือดินแห้งแมงลักคาเพื่อใช้เตรียมผลิตภัณฑ์ต่อไป

ABSTRACT

Maeng-Lak-Kha or wild spikenard has a scientific name as *Hyptis suaveolens* (L.) Poit., belonging to Family Labiatae (Lamiaceae). This herb is potential to be developed for herbal medicine products according to several reports for its pharmacological uses such as anti-fungal, anti-bacterial, anti-inflammatory and antioxidant activities. Since the chemical quality of this herb in Thailand has not been reported before, it is interesting to investigate its properties. In this study, it was carried out using 15 samples of the aerial parts of the medicinal plant collected from natural areas in central parts of Thailand. The water-soluble extractive, 95% ethanol-soluble extractive, water content, total ash, and acid-insoluble ash were provided as well as the chemical identification using color reactions and thin-layer chromatography. The result of this study is useful for control the chemical quality of dried aerial parts of Maeng-Lak-Kha to further prepare as herbal products.

KEY WORDS : *Hyptis suaveolens* (L.) Poit., wild spikenard, Maeng-Lak-Kha, chemical specification

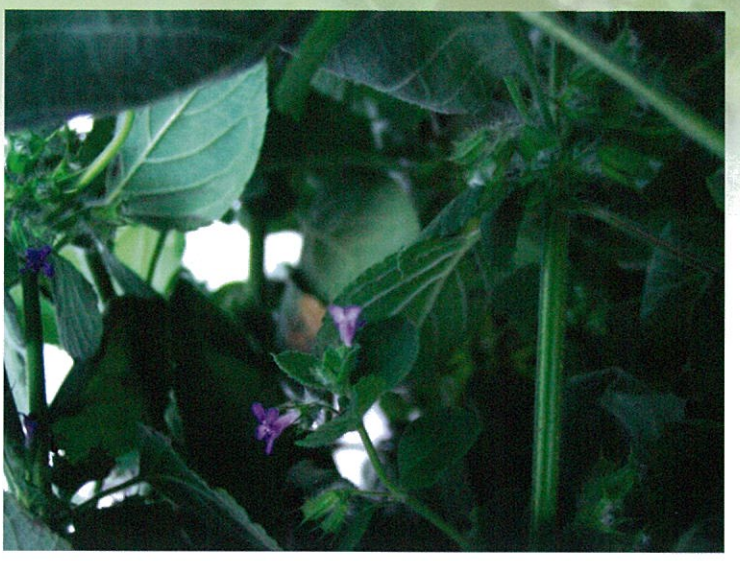
บทนำ

แมงลักคา มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Hyptis suaveolens* (L.) Poit.[1] อยู่ในวงศ์ Labiatae[1] (หรือ Lamiaceae) ชื่ออื่นๆในไทย ได้แก่ การา[1] กะเพราผี แมงลักป่า[2] ชื่ออังกฤษ ได้แก่ west Indian spikenard[3-4], wild spikenard[3-5], bushtea[4], chan[4], horehound[4], stinking roger[4], pignut[4] ชื่อจีน คือ เสอไป่จื่อ (蛇百字, shé bai zi)[3] เป็นพืชล้มลุก สูงได้ถึง 1.5 เมตร มีกลิ่นเฉพาะและมีขนทั่วไป ใบเดี่ยว ออกตรงข้าม รูปไข่ถึงไข่กลับ ปลายแหลมหรือมน โคนมนหรือเว้ารูปหัวใจ ขอบหยัก ดอกสีม่วง ออกรวมกันเป็นช่อสั้นตามง่ามใบใกล้ปลายกิ่งหรือที่ยอด ผลแบบแห้งไม่แตก เมล็ดมีเยื่อหุ้ม ถูกน้ำจะพองเป็นเมือกลื่น[6-7] ในประเทศไทย พบขึ้นทั่วไปตามที่รกร้าง กลางแจ้งหรือริมทาง[8] เป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดในอเมริกาแถบร้อน และแพร่กระจายพันธุ์อย่างกว้างขวางในเขตร้อนและร้อนชื้นทั่วโลก[6-8] สมุนไพรแมงลักคามีการใช้ประโยชน์พื้นบ้านที่หลากหลาย เช่น ชาวไทยมาเลย์ใช้ยอดอ่อนปรุงอาหารช่วยแต่งกลิ่นและรส[9] มาเลเซียใช้เป็นยาพอก[9] ไทยใช้ใบหรือปลายยอดใช้สำหรับแก้โรคผิวหนังและแต่งกลิ่นอาหาร แก้อาการชักกระตุก แก้โรคปวดข้อ รากใช้ขับระดูหรือเคี้ยวเพื่อดับกลิ่นปาก ทั้งต้น ใช้เป็นยาพอกแก้ปวดท้อง รวมทั้งใช้ไล่แมลง[10] นอกจากนี้ใช้กิ่งและใบสำหรับทุบวางในเล้าสัตว์เพื่อไล่ไรไก่[11] อินโดนีเซียใช้ต้นแมงลักคาแห้งในการเลี้ยงสัตว์และใช้ขับน้ำนม[3,12] สาธารณรัฐประชาชนจีนใช้ใบแก้ปวดศีรษะหรือใช้เพิ่มการขับเหงื่อ[3,12] เม็กซิโกใช้เมล็ด มายาเพื่อแก้โรคเกี่ยวกับลำไส้หรือใช้เป็นยาฆ่าเชื้อ นอกจากนี้ ยังใช้ทั้งต้นมาต้มน้ำเพื่อดื่มแก้ปวดกระเพาะอาหารและแก้ปวดบิด[3] ตรินิแดดใช้เพื่อขับลม ขับเสมหะ แก้หวัด แก้ไข้ แก้ไข้หวัดใหญ่ แก้มาเลเรีย แก้ไข้เหลือง แก้ท้องผูก แก้ปวดท้องประจำเดือน[3] เวเนซูเอลาใช้สำหรับผสมน้ำอาบเพื่อรักษาอาการอัมพฤกษ์หรืออัมพาต โรคแผลพุพองรวมทั้งโรคผิวหนัง[3] ชาวพื้นเมืองแถบ curacao ใช้ต้มน้ำดื่มแก้ท้องอืด อาเจียนและปวดกระเพาะอาหาร[3] นอกจากนี้ใน Antilles และเวเนซูเอลาใช้รักษามะเร็งและเนื้องอก[3] อินเดียใช้รากช่วยย่อยอาหารและกระตุ้นความอยากอาหาร[13] ไต้หวันใช้ใบและลำต้นพอกภายนอกแก้ปวดศีรษะและแก้โรคผิวหนัง[12] ฟิลิปปินส์ใช้ไล่แมลง และใช้ใบหรือยอดแก้ปวดท้อง แก้ปวดข้อหรือตะคริวโดยผสมกับน้ำอาบ รากใช้ต้มเป็นยาขับระดู และกระตุ้นความอยากอาหาร[3,12]

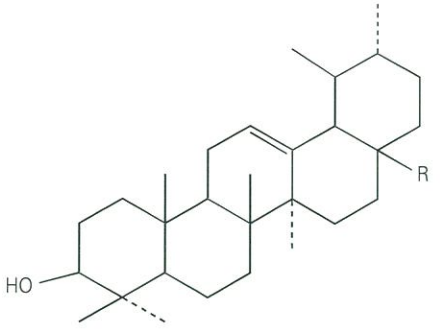
สำหรับการรายงานฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของแมงลักคา พบว่า สารสกัดด้วยเมทานอลมีฤทธิ์อย่างอ่อนในการต้านเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวก แกรมลบและเชื้อรา *Candida albicans* โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อได้ (MIC) ≤ 100 μg/ml[14] ประเทศในแถบแอฟริกาใต้พัฒนาสมุนไพรนี้เป็นผลิตภัณฑ์จากน้ำมันหอมระเหยเพื่อใช้ไล่ยุง[15] สารสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช โดยเฉพาะ 5-hydroxymethyl furfuraldehyde ยับยั้งการเติบโตของรากพืชอื่นได้[16] สารสกัดด้วยเอทานอลจากส่วนเหนือดินแมงลักคามีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของโปรโตซัวที่ทำให้เกิดโรคมาเลเรีย (*Plasmodium falciparum* 3D7 strain) โดยมีค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการเติบโตได้ 50% (IC_{50}) < 25μg/ml โดยสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ดังกล่าว คือ dehydroabietinol ยับยั้งการเติบโตของ *Plasmodium falciparum* ทั้งสายพันธุ์ที่ไวต่อยาคลอโรควินและดื้อต่อยาคลอโรควิน โดยมีค่าความเข้มข้นในการยับยั้งเชื้อที่ 50% (IC_{50}) เท่ากับ 26 และ 27 ไมโครโมลาร์[17] เมื่อเร็วๆนี้มีรายงานว่า สารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบแมงลักคา คือ 9α,13α-*epi*-dioxiabiet-8(14)-en-18-ol มีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของ *Plasmodium falciparum* ดีมากโดยมีค่า IC_{50} ที่ 0.1 μg/ml[18] สำหรับสาร

สกัดด้วยเอทานอลจากใบแมงลักคามีฤทธิ์รักษาแผลในหนูขาว อาจเนื่องจากมีฤทธิ์เพิ่มเอนไซม์ที่ใช้ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ catalase, superoxide dismutase[19] สำหรับน้ำมันหอมระเหยจากแมงลักคามีรายงานถึงความเป็นพิษต่อเชื้อรา[20-21] ยับยั้งเชื้อรา[22] ฤทธิ์ต้านการชัก[23] ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย[24-26] นอกจากนี้น้ำมันหอมระเหยจากดอก ใบและต้นของแมงลักคายับยั้งเชื้อราได้หลายชนิด ได้แก่ *Trichophyton mentagrophytes* และ *Microsporum gypseum* ในขณะที่น้ำมันหอมระเหยจากดอกเท่านั้นที่ยับยั้งเชื้อราชนิด *Candida albicans* ได้[27] ทั้งน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากแมงลักคามีรายงานถึงฤทธิ์กำจัดเพลี้ยอ่อนในพริกและหนอนห่อใบมะม่วงได้ดี[28] นอกจากนี้ มีรายงานถึงความเป็นพิษต่อเซลล์ในหลอดทดลอง[29] ยับยั้งเนื้องอก ลดน้ำตาลในเลือด[30] ลดหรือเพิ่มอัตราการเต้นของหัวใจ ลดความดันโลหิต ทำให้หลอดเลือดคลายตัว ทำให้แรงบีบตัวของกล้ามเนื้ออ่อนลง ทำให้กล้ามเนื้อเรียบหดตัวหรือคลายตัว[31-32] ฤทธิ์เหมือนเอสโตรเจน[33-34] ยับยั้งการฝังตัวของตัวอ่อนหรือเป็นพิษต่อตัวอ่อน[35] ฆ่าตัวอ่อนของแมลง[36] ฆ่าหอย[37] ป้องกันแมลง[38] ยับยั้งเอนไซม์ xanthine oxidase[39], protein kinase[40] และ protease[41]

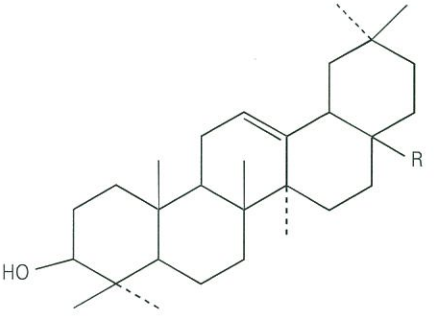
จากการศึกษาทางเคมี มีรายงานถึงองค์ประกอบทางเคมีชนิดต่างๆดังนี้ น้ำมันหอมระเหยมีองค์ประกอบทางเคมีประเภท monoterpenes, sesquiterpene, oxygenated monoterpenes และ oxygenated sesquiterpene โดยมีรายงานว่า น้ำมันหอมระเหยจากส่วนเหนือดินของพืชชนิดนี้มีองค์ประกอบหลัก คือ eucalyptol(1,8-cineol) (30.38%) รองลงมาคือ γ-amylene (13.58%), β-caryophylline (10.37%), δ-elemene (5.24%)[42] ในขณะที่น้ำมันหอมระเหยจากราก พบองค์ประกอบหลัก คือ 1,8-cineol และ α-phellandrene (18.56%), limonene (8.51%), caryophylline oxide (2.71%)[43] สำหรับองค์ประกอบทางเคมีอื่นๆ ของพืชชนิดนี้ในส่วนเหนือดิน มีรายงานว่าพบสารประเภท terpenoids เช่น oleanolic acid[16], β-amyrin[16], α-amyrin[16], lupeol[16], betulinic acid[16], ursolic acid[16], dehydroabietinol[17], 9α,13α-epi-dioxiabiet-8(14)-en-18-ol[18], hyptadienic acid[44], urs-12-en-3β-ol-29-oic acid[45] สารประเภท flavonoids เช่น 4',5-dihydroxy-7-methoxy flavone[16] สารประเภท aldehydes เช่น 5-hydroxy methyl furfuraldehyde[16] ส่วนองค์ประกอบทางเคมีอื่นๆ ที่พบในรากของพืชชนิดนี้ ได้แก่ สารประเภท terpenoids เช่น 3β-hydroxylup-20(29)-en-27-oic acid[44], heptacosanone[44], ursolic acid[44], betulinic acid[44], 3β-hydroxylup-12-en-28-oic acid[45], α-amyrin[45], β-amyrin[45], oleanolic acid[46], urs-12-en-3β-ol-27-oic acid (α-peltoboykinolic acid)[47-48] และสารประเภทสเตียรอยด์ เช่น sitosterol-β-D-glucoside[44], β-sitosterol[47] นอกจากนี้ ในเมือกหุ้มเมล็ดของแมงลักคา พบสารประเภท polysaccharides ได้แก่ L-fucose, D-xylose, D-mannose, D-galactose, D-glucose, 4-O-methyl-D-glucuronic acid[49]



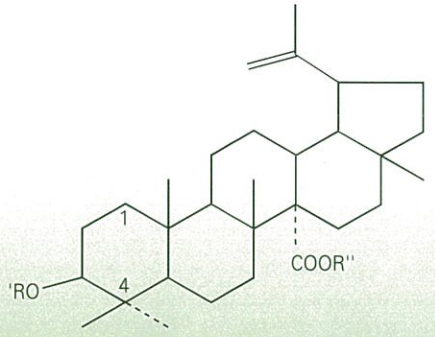
รูปที่ 1 ลักษณะต้น ใบและดอกสมุนไพรแมงลักคา



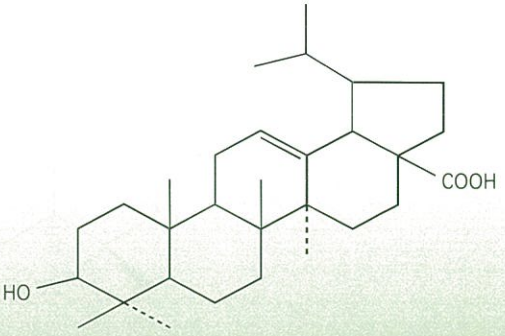
ursolic acid: R = COOH
α-amyrin: R = CH_3



oleanolic acid: R = COOH
β-amyrin: R = CH_3

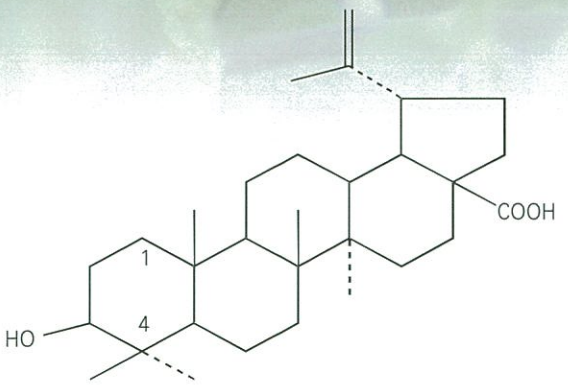


3β-hydroxylup-20(29)-en-27-oic acid: R′ = R″ = H
3β-acetoxylup-20(29)-en-287-oic acid: R′ = Ac; R″ = H
methyl-3β-hydroxylup-20(29)-en-27-oate: R′ = H; R″ = CH_3

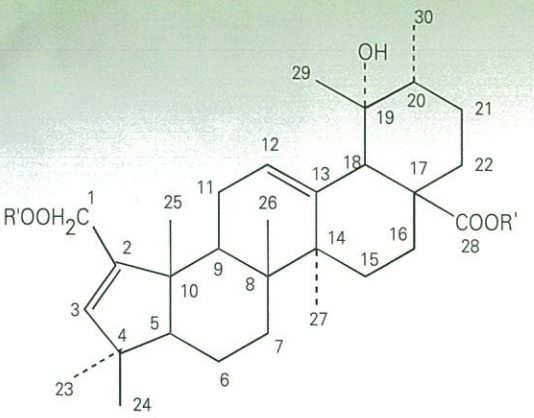


3β-hydroxylup-12-en-28-oic acid

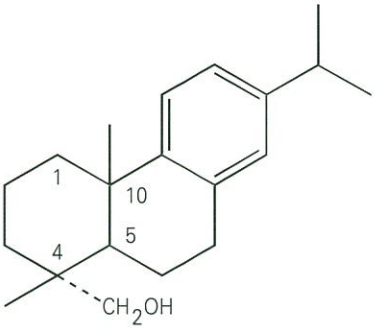
รูปที่ 2 สูตรโครงสร้างของสารเคมีบางชนิดที่พบในแมงลักคา



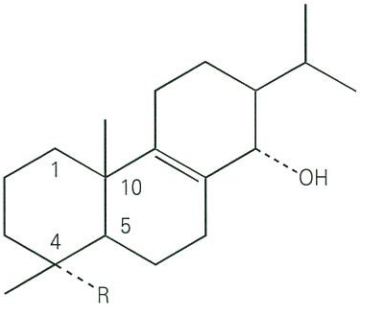
betulinic acid



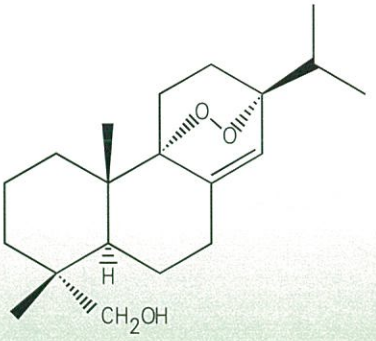
hyptadienic acid: R' =H; R'' = H
hyptadienic acid acetate: R' = Ac; R'' = H
methyl hyptadienate: R' = H; R'' = CH_3
acetyl methyl hyptadienate: R' = Ac; R'' = CH_3



dehydroabietinol



suaveolic acid: R = COOH
suaveolol: R = CH_2OH



9α,13α-epi-dioxiabiet-8(14)-en-18-ol

รูปที่ 2 (ต่อ) สูตรโครงสร้างของสารเคมีบางชนิดที่พบในแมงลักคา

การทดสอบความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดด้วยน้ำของแมงลักคาในหนูขาว โดยให้สารสกัดด้วยการกรอกทางปากในขนาด 5, 50, 250, 500 มก/กก/วัน เป็นเวลา 6 เดือน พบว่า ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของหนู และไม่ทำให้เกิดอาการเปลี่ยนแปลงของค่าทางโลหิตวิทยา ค่าทางชีวเคมีของซีรั่ม หรือพยาธิสภาพของอวัยวะภายในที่มีความสัมพันธ์กับขนาดของสารสกัด จึงสรุปว่า สารสกัดดังกล่าวในหนูขาวมีความปลอดภัย[50] จากข้อมูลต่างๆ ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว จะเห็นได้ว่า สมุนไพรชนิดนี้มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยาหรือผลิตภัณฑ์สุขภาพ และมีความปลอดภัยสูงหากเลือกใช้วิธีการสกัดที่เหมาะสม ดังนั้น ในการวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพเคมีของส่วนเหนือดินแห้งแมงลักคาเพื่อจัดทำข้อกำหนดทางเคมี ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการศึกษาวิจัยสมุนไพรชนิดนี้ต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

ตัวอย่างวัตถุดิบ

ส่วนเหนือดินสดแมงลักคาถูกรวบรวมจากแหล่งต่างๆ 15 แหล่งในพื้นที่จังหวัดกาญจนบุรี เพชรบุรี และราชบุรี ระหว่าง พ.ศ. 2543-2545 และตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ตามหลักพฤกษอนุกรมวิธาน โดยใช้เอกสารประกอบด้านพฤกษชาติของต่างประเทศ[6-7] พบว่า คือ *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. วงศ์ Labiatae (หรือ Lamiaceae) แล้วล้างด้วยน้ำให้สะอาด ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องพอหมาดๆ หั่นเป็นชิ้น และอบให้แห้งด้วยเตาอบร้อนไฟฟ้าที่มีพัดลมระบายอากาศที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส นาน 48 ชม (ค่าเฉลี่ยของผลผลิตแห้งเมื่อเทียบกับตัวอย่างสดประมาณ 26% โดยน้ำหนัก) แล้วนำตัวอย่างที่แห้งแล้วไปบดเป็นผงละเอียด ผ่านแร่งเบอร์ 80 เก็บผงสมุนไพรในขวดแก้วสีชามีฝาปิดสนิท ปิดฉลากระบุชื่อสมุนไพร แหล่งที่มา วันที่เก็บ และวันที่เตรียมตัวอย่าง

เครื่องมือ

1. เตาอบร้อนไฟฟ้ารุ่น ULE-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 อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น B-480 ของบริษัท Buchi Laboritechnik ประเทศญี่ปุ่น, เครื่อง Rotavapor รุ่น R-114 ของบริษัท Buchi, เครื่อง Aspirator รุ่น A-3S ยี่ห้อ Eyela® และเครื่องทำน้ำเย็นหมุนเวียน รุ่น CA-101 ยี่ห้อ Eyela® ของบริษัท Tokyo Rikakikai ประเทศญี่ปุ่น
6. แผ่นเคลือบซิลิกาเจลจี ขนาด 20 x 20 ซม. ความหนา 0.25 มม. ของบริษัท E. Merck ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี (Merck Number 1.05721)
7. ชุดเครื่องกลั่นหาปริมาณน้ำโดยการกลั่นด้วยโทลูอีน (Azeotropic Distillation Apparatus) ประกอบด้วยอ่างน้ำมันแบบควบคุมอุณหภูมิ ของบริษัท Mammert และเครื่องทำน้ำเย็น

หมุนเวียน รุ่น CA-111 ยี่ห้อ Eyela® ของบริษัท Tokyo Rikakikai ประเทศญี่ปุ่น

สารเคมี

1. สารเคมีทุกชนิดที่ใช้ในการทดลองต่างๆ เป็นชนิดที่ใช้กับงานวิเคราะห์ (analytical grade) และน้ำบริสุทธิ์ที่ใช้ในงานทดลองเป็นน้ำที่ได้จากการกรองเอาอนุภาคที่มีประจุออก (deionized water)
2. สารละลาย Iron (III) Chloride[51-53] เตรียมโดยละลาย Ferric Chloride จำนวน 9 ก ในน้ำกลั่น 100 มล
3. สารละลาย Fehling[51-53] มีวิธีเตรียมดังนี้
   3.1 สารละลายทองแดง เตรียมโดยละลาย cupric sulfate 3.5 ก ในน้ำกลั่น 50 มล เก็บในขวดสีชาที่ปิดสนิท
   3.2 สารละลาย alkaline tartrate เตรียมโดยละลาย potassium sodium tartrate 17.3 ก และ sodium hydroxide 5 ก ด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 50.0 มล เก็บในขวดทนด่างที่ปิดสนิท
   3.3 นำสารละลาย 3.1 และ 3.2 มาผสมกันในอัตราส่วน 1:1 โดยเตรียมทันทีก่อนใช้

วิธีการ

1. การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยปฏิกิริยาการเกิดสี[51-53]

(1) Liebermann-Burchard Test: ชั่งตัวอย่าง 0.5 ก บรรจุในขวดแก้วก้นกลม เติมเมทานอล 10 มล นำไปต้มบนอ่างอังไอน้ำด้วยวิธีรีฟลักซ์ เป็นเวลา 15 นาที กรอง นำสารละลายที่กรองได้ไปเติมผงถ่าน 0.3 ก กรอง แล้วนำสารละลายที่กรองได้ระเหยจนแห้งบนอ่างอังไอน้ำ สารที่เหลือจากการระเหยถูกละลายด้วย acetic anhydride แล้วค่อยๆ เติมกรดกำมะถันเข้มข้น 1.0 มล สังเกตผลที่เกิดขึ้น (ตารางที่ 1)

(2) Fehling Test: ชั่งตัวอย่าง 0.5 ก บรรจุในขวดแก้วรูปชมพู่ เติมน้ำกลั่น 10 มล นำไปต้มบนอ่างอังไอน้ำเป็นเวลา 15 นาที กรอง นำสารละลายที่ได้ไปเติมผงถ่าน 0.3 ก เขย่าให้เข้ากัน กรอง แล้วนำสารละลายที่กรองได้ 2 มล ใส่ในหลอดทดลอง และเติมสารละลาย Fehling จำนวน 1 มล นำไปอุ่นในอ่างอังไอน้ำ นาน 5 นาที สังเกตผลที่เกิดขึ้น (ตารางที่ 1)

(3) Iron (III) Chloride Test Solution: ชั่งตัวอย่าง 2.0 ก บรรจุในขวดแก้วรูปชมพู่ เติมน้ำกลั่น 20 มล นำไปต้มบนอ่างอังไอน้ำเป็นเวลา 30 นาที กรอง นำสารละลายที่กรองได้ 2 มล ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลาย ferric chloride 3-4 หยด สังเกตผลที่เกิดขึ้น (ตารางที่ 1)

2. การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีโครมาโตกราฟีผิวบาง

(1) การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่าง 1 ก เติมเมทานอลจำนวน 20.0 มล นำไปสกัดด้วยวิธีรีฟลักซ์บนอ่างอังไอน้ำ นาน 30 นาที กรองขณะร้อน นำสารละลายที่กรองได้ไประเหยจนแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอลจนได้ 10.0 มล

(2) การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ละลายสารมาตรฐาน ursolic acid (Chromadex®) จำนวน 2 มก ในเมทานอล 1 มล.

(3) น้ำยาแยก

เตรียมน้ำยาแยกโดยผสม dicloromethane, ethyl acetate และน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 70:30:1 ให้เข้ากันดี นำมาใส่ในถังทำโครมาโตกราฟีทิ้งไว้อย่างน้อย 1 ชั่วโมงก่อนใช้ เพื่อให้บรรยากาศในถังอิ่มตัวด้วยน้ำยาแยก

(4) วิธีการ

ใช้หลอดรูเล็ก (capillary tube) บรรจุสารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานแต่ละชนิดๆ ละ 2 มคล มาแต้มบนแผ่นเคลือบซิลิกาเจลในแนวระดับเดียวกัน โดยให้ห่างจากขอบล่างประมาณ 2 ซม และให้มีระยะห่างระหว่างสารละลายแต่ละชนิดไม่น้อยกว่า 1 ซม ผึ่งให้แห้ง นำไปตั้งในถังทำโครมาโตกราฟีที่เตรียมไว้ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้น้ำยาแยกซึมขึ้นไปตามผิวที่ฉาบสูง 12 ซม นำแผ่นเคลือบซิลิกาเจลออกจากถัง ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำไปตรวจสอบ

(5) การตรวจสอบ

นำแผ่นเคลือบซิลิกาเจลไปพ่นด้วยสารละลายเจือจางกรดกำมะถันที่มีความเข้มข้น 20% โดยปริมาตรในเอทานอล นำแผ่นเคลือบซิลิกาเจลไปทำให้ร้อนบนเตาไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส แล้วสังเกตผลด้วยแสงธรรมชาติ[51] (ตารางที่ 2 และรูปที่ 3)

3. ปริมาณความชื้น

ทำตามวิธีที่กำหนดไว้ในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย[53-54] โดยใช้ตัวอย่างจำนวน 10 กรัม (ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน) มากลั่นด้วยโทลูอีน เพื่อทดสอบหาปริมาณความชื้น (ตารางที่ 3 และรูปที่ 4)

4. ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำและสารสกัดด้วย 95% เอทานอล

ทำตามวิธีที่กำหนดไว้ในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย[53-54] โดยใช้ตัวอย่างจำนวน 5 กรัม (ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน) ในการทดสอบ (ตารางที่ 3 และรูปที่ 4)

5. เถ้ารวมและเถ้าที่ไม่ละลายในกรด

ทำตามวิธีที่กำหนดไว้ในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย[53-54] โดยใช้ตัวอย่างจำนวน 2 กรัม (ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน)ในการทดสอบ (ตารางที่ 3 และรูปที่ 4)

ผลการวิจัย

จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยปฏิกิริยาการเกิดสีของผงสมุนไพรแมงลักคาจำนวน 15 ตัวอย่าง พบว่า ทุกตัวอย่างให้ผลบวกกับ Liebermann-Burchard Test, Fehling Test และ Iron (III) Chloride Test Solution (ตารางที่ 1) เมื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีโครมาโตกราฟีผิวบางแล้วตรวจสอบด้วยสารละลายเจือจางกรดกำมะถัน (20% โดยปริมาตร) และนำไปทำให้ร้อนด้วยเตาไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที สังเกตด้วยแสงธรรมชาติ พบว่า มีสารประกอบเทอร์ปีนอยด์ประมาณ 11 - 14 ชนิด โดยพบ ursolic acid ในทุกตัวอย่าง (ตารางที่ 2 และรูปที่ 3)

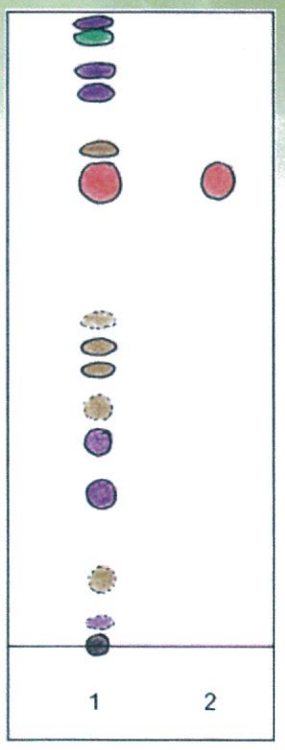
ตารางที่ 1 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยปฏิกิริยาการเกิดสี

วิธีทดสอบ	ผลการทดสอบ
Liebermann-Burchard Test (ตรวจสอบสารประเภทเทอร์ปีนอยด์)	ได้วงแหวนสีชมพูปนแดงระหว่างรอยต่อของชั้นสารละลาย
Fehling Test (ตรวจสอบสารประเภทน้ำตาลที่สูญเสียอิเล็กตรอนได้ง่าย)	ได้ตะกอนสีแดงอิฐ
Iron (III) Chloride Test Solution (ตรวจสอบสารประเภทฟีนอล)	ได้สารละลายสีน้ำเงินอมเขียว

ตารางที่ 2 ค่า hR_f และผลการตรวจสอบสารประเภท terpenoids ในสารสกัดด้วยเมทานอลจากผงแมงลักคา

จุดสี	ค่า hR_f	การตรวจสอบด้วยกรดกำมะถัน (20% โดยปริมาตร) แล้วทำให้ร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส และสังเกตผลด้วยแสงธรรมชาติ (สี)
1	3-4	ม่วง
2	13-14	น้ำตาล
3	26-27	ม่วง
4	33-36	ม่วง
5	38-40	น้ำตาล
6	46-48	น้ำตาล
7	49-50	น้ำตาล
8	51-52	น้ำตาล
9*	73-74	แดง
10	76-77	น้ำตาล
11	88	ม่วง
12	89-90	ม่วง
13	97-98	เขียว
14	99	ม่วง

*ursolic acid



รูปที่ 3 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีโครมาโตกราฟีผิวบางของสารสกัดด้วยเมทานอลจากผงส่วนเหนือดินแห้งแมงลักคาเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน เมื่อใช้สารละลายผสมของ dichloromethane: ethyl acetate: น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 70:30:1 เป็นน้ำยาแยก ตรวจสอบด้วยสารละลายกรดกำมะถัน (20% โดยปริมาตร) และสังเกตด้วยแสงธรรมชาติ

1 = สารสกัดด้วยเมทานอลจากผงส่วนเหนือดินแห้งแมงลักคา

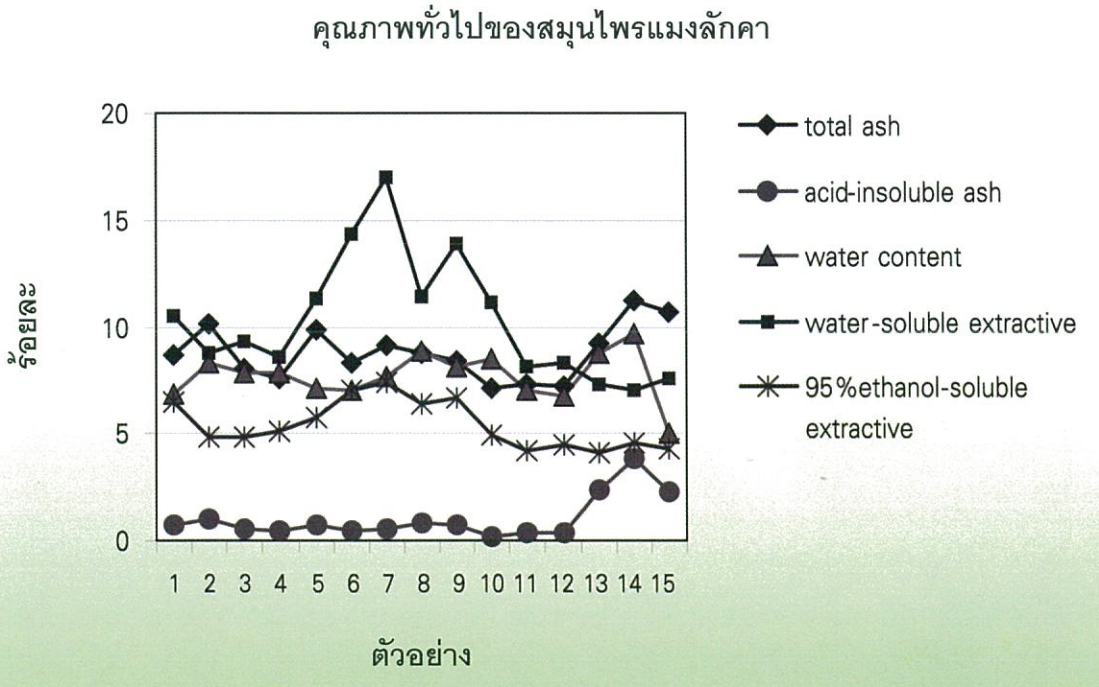
2 = ursolic acid

◌ = จุดสีที่พบในบางตัวอย่าง

การตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติทั่วไปทางกายภาพและเคมีของผงส่วนเหนือดินแห้งแมงลักคา โดยการหาปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ ปริมาณสารสกัดด้วย 95%เอทานอล เถ้ารวม เถ้าที่ไม่ละลายในกรด และปริมาณน้ำแสดงในรูปที่ 4 ผลค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและเกณฑ์ที่ใช้ในการกำหนดแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการประเมินคุณภาพทางเคมีและกายภาพของผงแมงลักคา

รายการ	ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\bar{X} \pm SD$, n = 15)	เกณฑ์กำหนดค่าบน ($\bar{X} + SD$)	เกณฑ์กำหนดค่าล่าง ($\bar{X} - SD$)
ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ (% w/w)	10.32 ± 2.91	-	7.41
ปริมาณสารสกัดด้วย 95%เอทานอล (% w/w)	5.40 ± 1.11	-	4.29
เถ้ารวม (% w/w)	8.77 ± 1.27	10.04	-
เถ้าที่ไม่ละลายในกรด (% w/w)	1.04 ± 1.01	2.05	-
ปริมาณน้ำ (% v/w)	7.7 ± 1.13	8.83	-



รูปที่ 4 ผลการวิเคราะห์คุณภาพทั่วไปของสมุนไพรแมงลักคา

วิจารณ์

จากการตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีของตัวอย่างส่วนเหนือดินแห้งของแมงลักคา ซึ่งเก็บจากแหล่งธรรมชาติต่างๆในพื้นที่ภาคกลางของประเทศไทย รวม 15 ตัวอย่าง พบว่า ทุกตัวอย่างให้ผลการตรวจสอบเป็นบวกเมื่อทดสอบด้วยปฏิกิริยาการเกิดสี คือ ตรวจพบสารประเภทเทอร์ปีนส์โดยใช้ Liebermann-Burchard Test ตรวจพบสารประเภทน้ำตาลที่สูญเสียอิเล็กตรอนได้ง่ายโดยใช้ Fehling Test และตรวจพบสารประเภทฟีนอลโดยใช้ Iron (III) Chloride Test Solution (ตารางที่ 1) การทดสอบยืนยันผลเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีโครมาโตกราฟีผิวบางโดยพ่นด้วยสารละลายเจือจางกรดกำมะถัน (20% v/v) แล้วนำไปทำให้ร้อนบนเตาไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 5 นาทีแล้วส่องดูภายใต้แสงธรรมชาติ สามารถตรวจพบสารประเภทเทอร์ปินอยด์จำนวน 11-14 ชนิด ซึ่งทุกตัวอย่างตรวจพบ ursolic acid ซึ่งเป็นสารเคมีประเภท triterpene (ตารางที่ 2 และรูปที่ 3)

ในการควบคุมคุณภาพของสมุนไพรตามเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลกหรือตำรายานั้น[52-54] ทำได้โดยการพิสูจน์เอกลักษณ์ (Identification) การตรวจสอบปริมาณสารสำคัญ (Assay) และการตรวจสอบคุณภาพทั่วไป (General Quality Control) ได้แก่ ปริมาณสารสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม ปริมาณความชื้น เถ้ารวม เถ้าที่ไม่ละลายในกรด หรือค่าอื่นๆตามแต่คุณสมบัติของสมุนไพรชนิดนั้นๆ ในการศึกษานี้ ได้ตรวจสอบคุณภาพทั่วไปโดยตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารสกัดในตัวทำละลาย เถ้ารวม เถ้าที่ไม่ละลายในกรด และปริมาณความชื้น (ตารางที่ 3 และรูปที่ 4) การตรวจสอบปริมาณความชื้นในสมุนไพรมีความสำคัญต่ออายุและคุณภาพของสมุนไพร เนื่องจากหากสมุนไพรมีความชื้นสูง จะทำให้เกิดการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์หรือเชื้อราได้ง่าย เป็นเหตุให้เสื่อมคุณภาพได้เร็วและเก็บได้ไม่นาน สำหรับวิธีการหาปริมาณความชื้นในผงสมุนไพรในตำรายาของประเทศไทย[53-54] กำหนดไว้ 2 วิธี คือ การหาปริมาณความชื้นโดยการอบด้วยตู้อบร้อนไฟฟ้าเพื่อหาค่าน้ำหนักที่สูญเสียไปที่อุณหภูมิที่กำหนด ซึ่งเหมาะสมกับสมุนไพรที่ไม่มีสารที่ระเหยได้ (volatile substances) หรือการหาปริมาณน้ำโดยการกลั่นด้วยโทลูอีน (Azeotropic Distillation Method) ซึ่งจะเหมาะสมกับสมุนไพรที่มีสารที่ระเหยได้ สำหรับผงสมุนไพรแมงลักคามีสารประเภทระเหยได้ เช่น น้ำมันหอมระเหย จึงเลือกใช้การทดสอบหาปริมาณน้ำด้วยวิธีการกลั่นด้วยโทลูอีน สำหรับเถ้ารวมและเถ้าที่ไม่ละลายในกรดเป็นค่าที่บอกถึงการปนเปื้อนทางกายภาพของสมุนไพร หากมีค่าดังกล่าวสูง จะบอกถึงการปนเปื้อนจากส่วนพืชที่ไม่ต้องการ หรือหินหรือทรายที่เกิดจากการล้างไม่สะอาด ซึ่งจะมีผลให้คุณภาพทางเคมีของผงสมุนไพรต่ำลง ซึ่งเมื่อนำไปเตรียมเป็นสารสกัดหรือผลิตภัณฑ์จะทำให้ได้ปริมาณสารสำคัญต่ำลงได้ นอกจากนี้ค่าสารสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ เป็นดัชนีหนึ่งที่จะบ่งชี้คุณภาพของสารสำคัญในผงสมุนไพรโดยเฉพาะเมื่อผงสมุนไพรนั้นยังไม่มีวิธีวิเคราะห์หาสารสำคัญที่ออกฤทธิ์อย่างเหมาะสม[54] ในการศึกษานี้ เลือกใช้น้ำและ 95%เอทานอลเป็นตัวทำละลายในการหาปริมาณสารสกัด

ผลการศึกษาวิจัยนี้ ทำให้สามารถทราบข้อกำหนดทางเคมีเพื่อควบคุมคุณภาพของผงสมุนไพรส่วนเหนือดินแห้งแมงลักคา กระบวนการผลิตสมุนไพรและผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่ดีนั้น ต้องมีการควบคุมคุณภาพอย่างรอบคอบตั้งแต่กระบวนการคัดเลือกใช้วัตถุดิบที่มีคุณภาพไปพัฒนาต่อเป็นสารสกัดหรือผลิตภัณฑ์ จะทำให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพสม่ำเสมอ อันจะเป็นประโยชน์ต่อ

การวิจัยและพัฒนาสมุนไพรอย่างยั่งยืนและได้รับการยอมรับจากผู้บริโภค

สรุปผลการทดลอง

ผลการศึกษาด้วยปฏิกิริยาการเกิดสี พบว่า ผงส่วนเหนือดินแห้งของสมุนไพรแมงลักคา ประกอบด้วยสารเคมีประเภทเทอร์ปีนอยส์ น้ำตาลที่สูญเสียอิเล็กตรอนได้ง่าย และฟีนอล จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีโครมาโตกราฟีผิวบาง พบว่า ทุกตัวอย่างมี ursolic acid ซึ่งเป็นสารเคมีประเภทไตรเทอร์ปีนอยส์ สำหรับการควบคุมคุณภาพทางเคมีและกายภาพของผงสมุนไพรชนิดนี้ ได้กำหนดเกณฑ์สูงสุดที่ยอมให้มีได้ โดยกำหนดจากค่าเฉลี่ยบวกด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) สำหรับปริมาณที่ระบุว่า "ไม่เกิน" และเกณฑ์ต่ำสุดที่ยอมให้มีได้ โดยกำหนดจากค่าเฉลี่ยลบด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) สำหรับปริมาณที่ระบุว่า "ไม่น้อยกว่า" ดังนั้น ข้อกำหนดทางเคมีของส่วนเหนือดินแห้งของสมุนไพรแมงลักคา จึงสรุปได้ดังนี้ ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำไม่น้อยกว่า 7% โดยน้ำหนัก ปริมาณสารสกัดด้วย 95% เอทานอลไม่น้อยกว่า 4% โดยน้ำหนัก ปริมาณน้ำไม่เกิน 9% โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก ปริมาณเถ้ารวมไม่เกิน 10% โดยน้ำหนัก และปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรดไม่เกิน 2% โดยน้ำหนัก

เอกสารอ้างอิง

1. ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้. กรมป่าไม้. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย. (เต็ม สมิตินันท์ ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ. 2544). กรุงเทพฯ: บริษัทประชาชน จำกัด. 2544. หน้า 289.
2. ธวัชชัย รัตน์ชเลศ, เจมส์ เอฟ แมกซ์เวล. รายชื่อวัชพืชที่มีรายงานพบในประเทศไทย. กรุงเทพฯ: เวิร์คเพลส. 2540. หน้า 85.
3. Duke JA, Ayensu ES. Medicinal plants of China. Vol. 2, Michigan, USA: Reference Publications, Inc. 1985. p. 369-70.
4. *http://www.hear.org/pier/species/hyptis_suaveolens.html*
5. นันทวัน บุณยะประภัศร, อรนุช โชคชัยเจริญพร. สมุนไพรไม้พื้นบ้าน. เล่ม 3. กรุงเทพฯ: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 2542. หน้า 778-80.
6. Backer CA, Bakhuizen van den Brick RC. Lamiaceae. Flora of Java. 1965; 2: 633-5.
7. Keng H. Labiatae. Flora Malesiana. 1978; 8(3): 301-72.
8. ดวงพร สุวรรณกุล, รังสิต สุวรรณเขตนิคม. วัชพืชในประเทศไทย. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2544. หน้า 86.
9. Burkill IH. A dictionary of the economic products of the Malay Peninsula. Vol. 1. Kuala Lumpur: Art printing works. 1966. p. 1239-40.
10. ดรุณ เพ็ชรพลายและคณะ. พืชสมุนไพรในประเทศไทย ตอนที่ 1. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก. 2538. หน้า 102-3.
11. วงศ์สถิต ฉั่วกุล และคณะ. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. สยามไภษัชยพฤกษ์: ภูมิปัญญาของชาติ. กรุงเทพฯ: บริษัทอมรินทร์พริ้นติ้ง แอนด์ พับลิชชิง จำกัด (มหาชน). 2538. หน้า 141.

12. Perry LM, Metzger J. Medicinal plants of East and Southeast Asia. Cambridge: MIT Press. London: 1980. p.186-7.
13. Kirtikar KR, Basu BD. Indian Medicinal Plants. Vol. III. Allahabad, India: Lalitmohan Bsu. 1935. p.2033.
14. Rojas A, Hernandez L, Pereda-Mirinda R, Mata R. Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. J Ethnopharmacol. 1992; 35(3): 275-83.
15. Palsson K, Jaenson TG. Plant products used as mosquito repellents in Guinea Bissau, West Africa. Acta Trop. 1999; 72(1); 39-52.
16. Mungmee C. Weed growth inhibitor from *Hyptis suaveolens* Poit. Master Thesis. Major Biotechnology, Faculty of Sciences, Chulalongkorn University. 2002.
17. Ziegler HL, Jensen TH, Christensen J, Staerk D, Hä gerstrand H, Sittie AA, Olsen CE, Staalsø, Ekpe P, Jaroszewski JW. Possible artefacts in the in vivo determination of antimalarial activity of natural products that incorporate into lipid bilayer: Apparent antiplasmodial activity of dehydroabietinol, a constituent of *Hyptis suaveolens*. Planta Med. 2002; 68: 547-9.
18. Chukwujekwu JC, Smith P, Coombes PH, Mulholland DA, Staden JV. Antiplasmodial diterpenoid from the leaves of *Hyptis suaveolens*. J Ethnopharmacol. 2005 (in press).
19. Shirwaikar A, Shenoy R, Udupa AL, Udupa SL, Shetty S. Wound healing property of ethanolic extract of leaves of *Hyptis suaveolens* with supportive role of antioxidant enzymes. Indian J Exp Biol. 2003; 41(3): 238-41.
20. Pandey DK, Tripathi NN, Tripathi RD, Dixit SN. Fungitoxic and phytotoxic properties of the essential oil of *Hyptis suaveolens*. J Plant Dis Prot. 1982; 89: 344-9.
21. Singh G, Upadhyay RK. Fungitoxic activity of the volatile oil of *Hyptis suaveolens*. Fitoterapia. 1992; 63(5): 462-5.
22. Singh HB and Handique AK. Antifungal activity of the essential oil of *Hyptis suaveolens* and its efficacy in biocontrol measures in combination with *Trichoderma harzianum*. J Essent Oil Res. 1997; (9): 683-7.
23. Akah PA and Nwambie AI. Nigerian plants with anticonvulsant property. Fitoterapia. 1993; 64(1): 42-4.
24. Asekun OT, Ekundayo O, Adenivi BA. Antimicrobial activity of the eseential oil of *Hyptis suaveolens* leaves. Fitoterapia. 1999; 70: 440-2.
25. Iwu MM, Ezeugwu CO, Okunji CO, Sanson DR, Tempesta MS. Antimicrobial activity and terpenoids of the essential oil of *Hyptis suaveolens*. Int J Crude Drug Res. 1990; 28: 73-6.
26. Mallavarupu GR, Ramesh S, Kaul PN, Bhattacharya AK, Rao BRR. The essential oil of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. J Essent Oil Res. 1993; 5(3): 321-3.

27. Okonogi S, Manopaiboon T. Antidermatophytosis from certain weed. เอกสารการสัมมนาวิชาการเทคโนโลยีชีวภาพเภสัชกรรม ครั้งที่ 2 เรื่อง การวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเพื่อการแพทย์แผนไทย. สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 2543. หน้า 285.
28. ทวีศักดิ์ สุนทรธนศาสตร์, ศิรินันท์ ทับทิมเกศ และกนก อุไรสกุล. การศึกษาองค์ประกอบและทดสอบผลการกำจัดเพลี้ยอ่อนในพริกและหนอนห่อใบมะม่วงของสารสกัดจากต้นแมงลักคา รายงานวิจัยประจำปี 2539 นักคณะวิจัยแห่งชาติ.
29. Gonzalez AG, Moujir L., Bazzocchi IL, Correa MD, Gupta MP. Screening of antimicrobial and cytotoxic activities of Panamian plants. Phytomedicine. 1994; 1(2): 149-53.
30. Aswal BS, Bhakuni DS, Goel AK, Kar K, Mehrotra BN, Mukherjee KC. Screening of Indian plants for biological activity: Part X. Indian J Exp Biol. 1984; 22(6): 312-32.
31. Saluja AK, Santani DD. Pharmacological investigation of the unsaponifiable matter of *Hyptis suaveolens*. Fitoterapia. 1993; 64(1): 3-6.
32. Feng PC, Haynes LJ, Magnus KE, Plimmer JR, Sherrat HAS. Pharmacological screening of some West Indian medicinal plants. J Pharm Pharmacol. 1962; 14: 556-61.
33. Saluja AK, Santani DD. Hormonal profile of *Hyptis suaveolens* Poit. Indian J Pharm Sci. 1983; 45(2): 97-9.
34. Kamboj VP. A review of Indian medicinal plants with intraceptive activity. Indian J Med Res. 1988; 4: 336-55.
35. Garg SK. Antifertility screening of plants-effect of four indigenous plants on early pregnancy in female albino rats. Indian J Med Res. 1976; 64: 1133-5.
36. Sharma RN, Gupta AS, Patwardhan SA, Hebbalkar DS, Tare V, Bhonde SB. Bioactivity of Lamiaceae plants against insects. Indian J Exp Biol. 1992; 30(3): 244-6.
37. Okunji CO, Iwu MM. Control of schistosomiasis using Nigerian medicinal plants as molluscicides. Int J Crude Drug Res. 1988;26(4): 246-52.
38. Queiroz-Voltan RB, Stubblebine WH, Shepherd G. Terpene variations in *Hyptis suaveolens* in the defense against herbivorous insect larvae. Bragantia. 1995; 54(2): 217-35.
39. Gonzalez AG, Bazzocchi IL, Moujir L, Ravelo AG, Correa MD, Gupta MP. Xanthine oxidase inhibitory of some Panamanian plants from Celastraceae and Lamiaceae. J Ethnopharmacol. 1995; 46(1): 25-9.
40. Larkin M, Brazier J, Ternai B, Polya GM. Protein kinase inhibitors in plants of the Myrtaceae, Proteaceae, and Leguminosae. Planta Med. 1993; 59: 525-8.
41. Aguirre C, Valdes-Rodriguez S, Mendoza-Hernandez G, Rojo-Dominguez A, Blanco-Labra A. A novel 8.7 kDa protease inhibitor from chan seeds (*Hyptis suaveolens* L.) inhibits protease from the larger grain borer Prostephanus truncates (Coleoptera: Bostrichidae). Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 2004; 138(1): 81-9.

42. Luz AIR, Zoghbi MGB, Ramos LS, Maia JGS, Da Silva ML. Essential oils of some Amazonian Labiatae, Genus Hyptis. J Nat Prod. 1984; 47(4): 745- 7.
43. Mallavarapu GR, Ramesh S, Kaul PN, Bhattacharya AK, Rao BRR. The essential oil of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. J Essent Oil Res. 1993; 5(3): 321-3.
44. Raja Rao KV, Rao LJM, Prakasa Rao NS. An A-ring contracted triterpenoid from *Hyptis suaveolens*. Phytochem. 1990; 29(4): 1326-9.
45. Mukherjee KS, Mukherjee RK, Ghosh PK. Chemistry of *Hyptis suaveolens*: A pentacyclic triterpene. J Nat Prod. 1984; 47(2): 377-8.
46. Misra TN, Singh RS, Upadhyay J. A natural triterpene acid from *Hyptis suaveolens*. Phytochem. 1983; 22(11): 2557-8.
47. Misra TN, Singh RS, Ojha TN, Upadhyay. Chemical constituents of *Hyptis suaveolens*. Part I. Spectral and biological studies on a triterpene acid. J Nat Prod. 1981; 44(6): 735-8.
48. Misra TN, Singh RS, Upadhyay. Triterpenoids from *Hyptis suaveolens* roots. Phytochem. 1983; 22(2): 603-5.
49. Gowda DC. Polysaccharide components of the seed-coat mucilage from *Hyptis suaveolens*. Phytochem. 1984; 23(2): 337-8.
50. Attawish A, Chivapat S, Chavalittumrong P, Phadungpat S, Bansiddhi J, Chaorai B. Chronic toxicity study of *Hyptis suaveolens* in rats. Songklanakarin J Sci Technol. 2005; 27(5): 1-10.
51. Wagner H, Bladt S, Zgainski EM. Plant Drug Analysis. 1990. pp. 125-7, 301.
52. Thai Herbal Pharmacopoeia. Vol. 1. Bangkok: Department of Medical Sciences, Public Health Ministry. 1995. pp.104-6, 122-4, 126-7.
53. Thai Herbal Pharmacopoeia. Vol. 2. Bangkok: Department of Medical Sciences, Public Health Ministry. 2000. pp.133-8, 141-2.
54. World Health Organization. Quality control methods for medicinal plant materials. 1998. *(http://www.who.int/medicines/library/trm/medicinalplants/qualcontrolmethods.html)*

ข้อกำหนดทางเคมีของหญ้าหนวดแมว

ดวงเพ็ญ ปัทมดิลก, เย็นจิตร เตชะดำรงสิน, ธิดารัตน์ บุญรอด, จารีย์ บันสิทธิ์
สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ

หญ้าหนวดแมว (*Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq. วงศ์ Lamiaceae) เป็นสมุนไพรที่มีการใช้อย่างแพร่หลาย แต่ยังไม่มีการบรรจุข้อมูลของสมุนไพรชนิดนี้เข้าในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจัดทำข้อกำหนดทางเคมี ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการจัดทำมาตรฐานสำหรับการควบคุมภาพสมุนไพรนี้ต่อไป ข้อมูลจากการศึกษาส่วนเหนือดินของสมุนไพรหญ้าหนวดแมว 23 ตัวอย่าง และเฉพาะส่วนใบอีก 6 ตัวอย่าง นำมาจัดทำข้อกำหนดทางเคมีตามลำดับ ดังนี้ ปริมาณความชื้น ไม่เกินร้อยละ 9, 10 โดยน้ำหนัก, ปริมาณเถ้าไม่เกินร้อยละ 6, 13 โดยน้ำหนัก, ทั้งส่วนเหนือดินและใบมีปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด ไม่เกินร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก, ปริมาณสิ่งสกัดด้วยน้ำ ไม่น้อยกว่าร้อยละ 12, 26 โดยน้ำหนัก, ปริมาณสิ่งสกัดด้วยแอลกอฮอล์ไม่น้อยกว่าร้อยละ 5, 11 โดยน้ำหนัก, ปริมาณสิ่งสกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50% ไม่น้อยกว่าร้อยละ 13, 23 โดยน้ำหนัก, ปริมาณโพแทสเซียม ไม่น้อยกว่าร้อยละ 0.7, 2 โดยน้ำหนัก, ทั้งส่วนเหนือดินและใบมีความเป็นกรด-เบส ไม่น้อยกว่า 5.0 นอกจากนี้ยังได้ศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมีทั้งการทดสอบการเกิดสีและการวิเคราะห์คุณภาพด้วยรงคเลขผิวบางด้วย

Chemical Specification of *Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq.

Daungpen Pattamadilok, Yenchit Techadamrongsin, Thidarat Boonruad, and Jaree Bansiddhi

Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences,

Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand.

ABSTRACT

Although *Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq. (Lamiaceae) is widely used in Thailand, it has not been included in Thai Herbal Pharmacopoeia. The main objective of this study is to provide scientific information on quality control to facilitate its appropriate chemical specification. Chemical evaluation of 23 samples of aerial part and 6 samples of leaves of *Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq. revealed that the appropriate chemical specifications of dried aerial part and leaves could be established respectively i.e. water content not more than 9, 10%w/w, ash content not more than 6, 13%w/w, acid insoluble ash content not more than 1 %w/w of each, water soluble extractive not less than 12, 16%w/w, ethanol soluble extractive not less than 5, 11%w/w, 50% ethanol soluble extractive not less than 13, 23%w/w, potassium content not less than 0.7, 2% w/w, pH value not less than 5.0 on both. Furthermore, chemical identification by means of color test and thin layer chromatographic analysis were determined.

Key word : *Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq., Lamiaceae, chemical specification

INTRODUCTION

The use of natural medicine is a persistent aspect of present-day health care. Although modern medicine may be available throughout the world, many people have begun to turn to alternative or complementary therapies, including medicinal herbs. *Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq. is widely distributed in Thailand. It has been scientifically evaluated for possible medical preparation. Safety and efficacy data are available. *Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq. is commonly used in primary health care program. Therefore, quality assurance of this herbal medicine has now become a key issue.

Orthosiphon aristatus (Blume) Miq. belongs to the family Lamiaceae. It is occasionally planted throughout Thailand for medicinal and ornamental purpose. It has local names in Thai, Yaa-nuat-maeo is more well known than Phayap-mek, Bangrak-pa[1]. It is a perennial herb, 25 -100 cm tall, with quadrangular stem. Leaves opposite, ovate to rhomboid, 3 - 7 cm long and 2 - 5 cm wide. Inflorescence terminal, many white or pale-lilac flowers which long-protruding stamens[2, 3]. The sketch of *Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq. has shown in Figure 1.

Figure 1 *Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq.

From previous phytochemical studies, three main groups of chemical constituents of *Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq. are flavonoids, organic acids and terpenoids. For instance, flavonoid compounds are eupatorin, sinensetin, salvigenin, ladanein, vomifoliol, 5 - hydroxy -6, 7, 3', 4' - tetramethoxyflavone, 6 - hydroxy-5, 7, 4'- trimethoxyflavone, 7, 3', 4'tri-O-methylluteolin, tetramethy scutellarein and scutellarein tetramethylether[4,5,6,7]. Caffeic acid and its derivatives including rosmarinic acid[6,7] and 2, 3-decaffeoyltartaric acid[8] predominate over the flavones in aqueous extract. In the class of terpenoids, diterpene constituents could be isolated, for example, orthosiphols A, B, D-N[6,7,9,10], orthosiphonones A-B[11,12], staminols A-B[7,10], norstaminol A[7,13], staminolactones A-B[7,13], norstaminone A[9], nororthosiphols A-B[11] and neoorthosiphols A-B[14,15] etc. Together with diterpenoids, triterpenoids and steroids such as ursolic acid, hederagenin and β-sitosterol were elucidated[7]. Furthermore, high potassium content in this plant has also been reported. In the search for pharmacological activity, methylripariochromene A from leaves has antihypertensive effect, some lipophillic flavonoids possess radical scavenging activity, alcoholic extract has diuretic activity, etc[4,5,11,16,17,18,19]. Pharmacologically active compounds in *Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq. that are responsible for the diuretic properties and for antibacterial properties, the predominating caffeic acid derivatives should be taken into consideration[8]. Chemical structures of some constituents are shown in Figure 2.

Orthosiphon aristatus (Blume) Miq. featured in pharmacopoeias of some countries. Although it is widely used in Thailand, it has not been included in Thai Herbal Pharmacopoeia. The objective of this investigation is to provide scientific information on quality control/quality assurance of *Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq. to facilitate its appropriate chemical specification in Thailand.

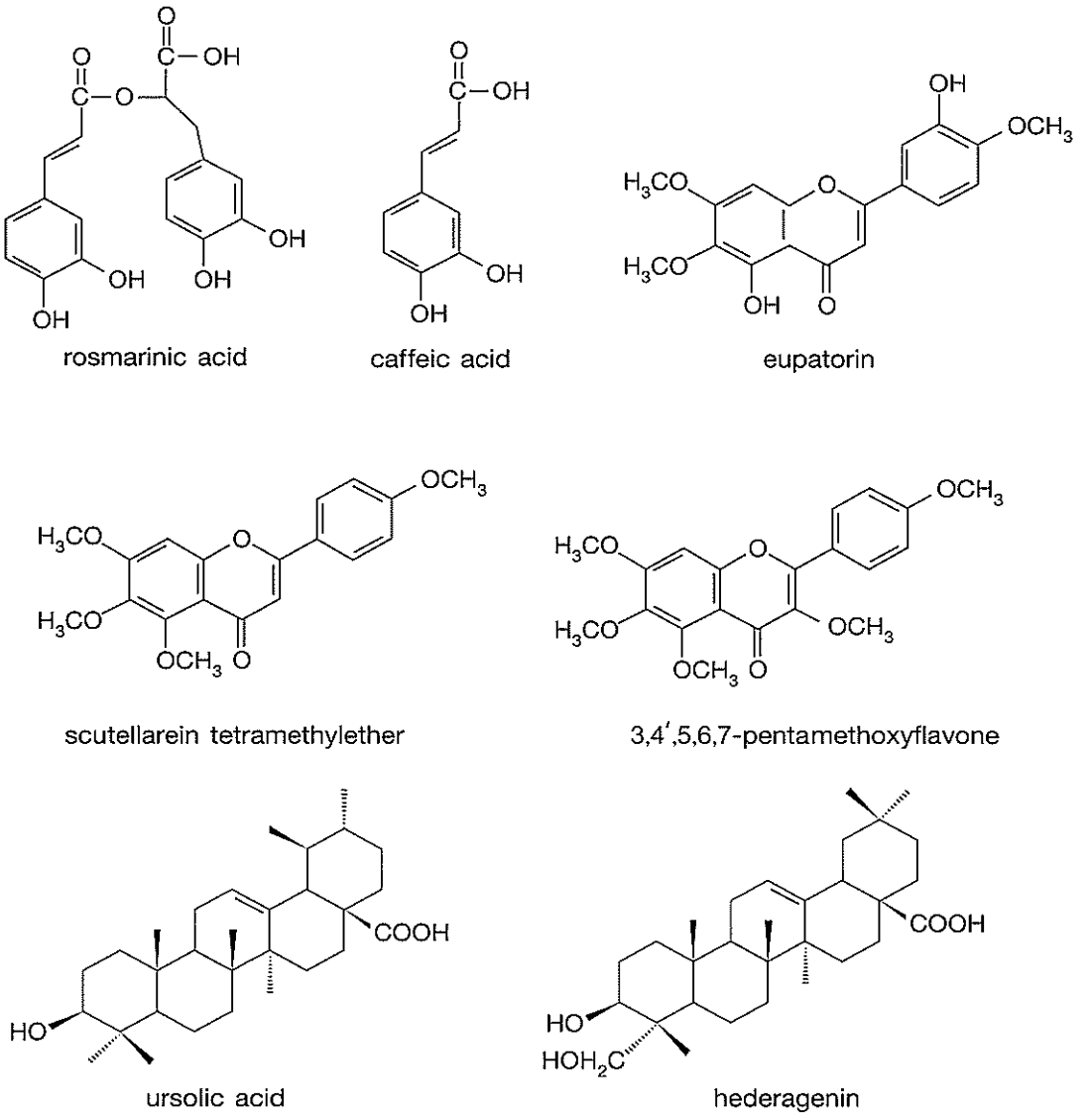


Figure 2 Chemical constituents of *Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq.

MATERIALS AND METHODS

Materials

1. Plant materials

Fresh aerial part and leaves of *Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq. (Family Lamiaceae) were collected from many parts of Thailand. They were identified[2,3] by Botanical laboratory, Medicinal Plant Research Institute at Department of Medical Sciences, where the voucher specimens (Bansiddhi 97-01 to 97-05) are deposited. 23 samples of aerial part and 6 samples of leaves were washed throughly, dried in an oven at 45°C for 48 hours. The dried samples were ground to powder, then passed through a sieve with mesh no.180 and kept in well-closed containers.

2. Adsorbent

Silica gel GF_{254} precoated plate 20 x 20 cm. Layer thickness 0.25 mm. (E. Merck)

3. Solvents and chemicals

Analytical grade

4. Reference standards

4.1 rosmarinic acid (Chromadex)

4.2 caffeic acid (Sigma)

4.3 ursolic acid (Sigma)

5. Retsch AS200 Basic sieves
6. Memmert hot air oven
7. Satorius analytical balances
8. UV carbinet
9. CAMAG TLC Plate Heater
10. Thermolyne Type 6000 furnace
11. Perkin Elmer 3030 Atomic adsorption spectrophotometer
12. Microwave digestion CEM Corporation MDS2100
13. Eyela NE-1 rotary evaporator
14. Hanna pH meter

Methods

A. Chemical identifications

1. Preliminary test

Test solution :

2 g of powdered drug was refluxed with 50 ml of water for 30 minutes, filtered and then evaporated the filtrate to 25 ml.

Reagent :

(1) Potassium Permanganate ($KMnO_4$) TS

3.3 g of potassium permanganate was dissolved in 1000 ml of water, the solution was

boiled for 15 min. Stoppered the flask, allowed it to stand for at least 2 days and filtered.

(2) Ferric Chloride ($FeCl_3$) TS

1 g of ferric chloride hexahydrate was dissolved in sufficient water to produce 100 ml of solution.

(3) 6 M Hydrochloric acid

Procedure :

1. To 2 ml of test solution, added a few drops of Potassium permanganate TS, shaked well. The color of Potassium permanganate TS was noted.

2. To 1 ml of test solution, added a few drops of Ferric chloride TS, observed the color of the solution.

3. 0.5 ml of test solution was evaporated until dryness, moistened the residue with one drop of 6 M hydrochloric acid, observed the color of the flame (from bunsen lamp) through the cobalt-glass.

2. Confirmatory test (Thin layer chromatographic analysis)

Test solution :

Refluxed 2 g of powdered drug with 50 ml of water for 30 minutes, filtered, and then evaporated the filtrate to dry to get water extract. Refluxed the extract with 25 ml of methanol for 10 minutes, filtered and evaporated the filtrate until dryness. Methanol extract of water extract could be obtained.

The test solution was prepared by redissolving methanol extract with methanol. The final volume of the test solution was adjusted to concentration of 10 mg/ml based on the weight of methanol extract of water extract.

Test solution : methanol extract of water extract of

1. aerial part of *Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq.
2. leaves of *Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq.

Standard solutions :

Dissolved reference standard with methanol and then adjusted the volume to concentration of as follow:

1. rosmarinic acid	0.5 mg/ml
2. caffeic acid	0.2 mg/ml
3. ursolic acid	0.5 mg/ml

Adsorbent :

Silica gel GF_{254} precoated plate

Developing solvent :

Toluene-ethyl acetate-formic acid 9:9:1

Developing distance : 10 cm.

Spotting amount :

5 µl each of test solution and 3 µl each of standard solution

Detection :

The chromatographic analysis was developed in the same manner on two TLC plates. After removal of the plates, allowed them to dry in room temperature, then examined the plates with the following detections.

I. UV 254 nm

II. Natural products-polyethyleneglycol reagent (NP/PEG reagent)[20]

NP reagent = 1% Diphenylboric acid 2-aminoethyl ester in methanol

PEG reagent = 5% Polyethyleneglycol 4000 in ethanol

One chromatographic plate was heated at 80°C at least 10 min, sprayed with excess amount of NP reagent and followed by PEG reagent. Then, the chromatogram was observed in long wavelength UV light (UV_{366}).

III. Vanillin-phosphoric acid reagent[20]

Preparation of reagent, dissolved 1 g of vanillin in 25 ml of ethanol, then added 25 ml of water and 35 ml of 85% ortho-phosphoric acid.

Another chromatographic plate was sprayed with this reagent, then heated at 120°C until spots distinctly appeared. Observed chromatogram under UV_{366} light.

B. Quality Evaluation

1. Loss on drying

Loss on drying was obtained from a Memmert hot air oven by following the method in Thai Herbal Pharmacopoeia[21].

2. Ash content

Total ash content and acid-insoluble ash content were carried out on Thermolyn Type 6000 Furnace using the methods in Thai Herbal Pharmacopoeia[21].

3. Extractives content

Water soluble extractive, ethanol soluble extractive, 50% ethanol soluble extractive contents were determined as described in Thai Herbal Pharmacopoeia[21].

4. Determination of potassium content

Potassium content was performed with a Perkin Elmer 3030 Atomic Absorption (AA) Spectrophotometer.

Analytical procedure was followed the method of United State Pharmacopoeia[22].

Potassium content was determined by means of AA analysis, 0.3 g of powdered drug, accurately weighed, added 2.0 ml of nitric acid, digested by using Microwave digestion CEM Corporation MDS2100: Sample solution was transferred to a 25 ml volumetric flask and adjusted to volume with water. One ml of solution was further diluted to 50.0 ml, and then potassium

content analysis was performed.

5. Determination of pH

Analytical procedure was followed the method of British Pharmacopoeia[23].

RESULTS

A. Chemical identifications

The results of preliminary test and confirmatory test of *Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq. aerial part and leaves have been presented in Table 1, 2 and Figure 3.

TLC patterns of aerial part and leaves of *Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq. are in a similar way. The hR_f values of components of both parts are concluded in Table 2.

B. Quality evaluation

All the samples were collected from various sources, unsuitable collection or possible deterioration due to incorrect or extended storage might effected the content of constituents in all the samples. To assess the value of *Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq., their quality evaluations were determined in 5 main categories; i.e. loss on drying, ash, extractive, potassium and pH. The results of quality evaluation of aerial parts and leaves have been showed in Table 3 and 4, respectively.

Table 1 Chemical identification of *Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq.

Sample	Identification test			
	Preliminary test			Confirmatory test (TLC analysis)
	$KMnO_4$ TS	$FeCl_3$ TS	Flame test	
Aerial part	Color of $KMnO_4$ TS was disappeared in all the samples	All the samples gave greyish-green color	Reddish-violet flame was observed in all the samples	All the samples showed rosmarinic acid, caffeic acid, ursolic acid and other unidentified compounds.
Leaves	Color of $KMnO_4$ TS was disappeared in all the samples	All the samples gave greyish-green color	Reddish-violet flame was observed in all the samples	All the samples showed rosmarinic acid, caffeic acid, ursolic acid and other unidentified compounds

Table 2 hR_f values of components of *Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq.

Spot	hR_f	Detection with		
		NP/PEG, UV_{366} (color)	UV_{254}	Vanillin - Phosphoric acid TS (color)
1	2-8	moss green	-	-
2	15-20	moss green	-	light orange
3	30-33	moss green	quenching	-
4	36-44	moss green	quenching	orange
5	48-53	pale blue	-	pale yellow
6	53-57	pale blue	-	pale yellow
7	58-61	blue	-	moss green
8	61-64	greenish blue	quenching	blue
9	64-67	pale blue	-	pale blue
10	81-86	-	-	orange red

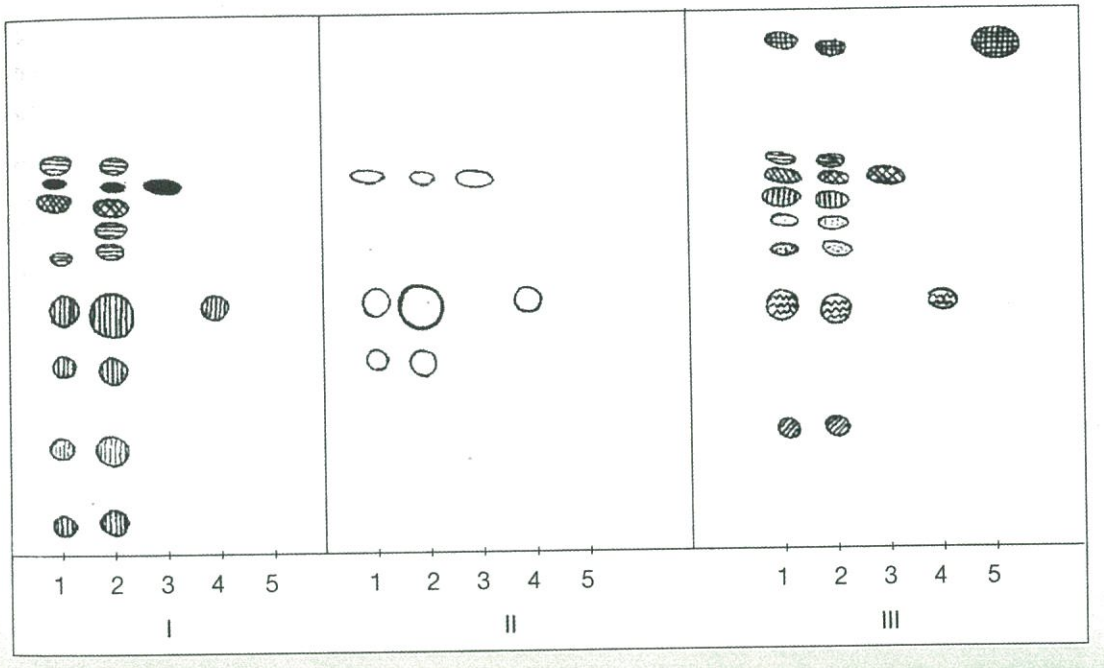


Figure 3 TLC chromatograms of *Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq.

Remark

I = detection with NP/PEG reagent, UV_{366} II = detection with UV_{254}

III = detection with Vanillin-phosphoric acid reagent, UV_{366}

1 = test solution of aerial part 2 = test solution of leaves

3 = caffeic acid 4 = rosmarinic acid 5 = ursolic acid

= moss green = pale blue = blue

= greenish blue = light orange = orange

= pale yellow = orange red = quenching

Table 3 Quality evaluation of *Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq. aerial part

Determination	Range ($\bar{X}$ ± 10%)	$\bar{X}$ ± SD
Loss on drying	7.24 - 8.84	8.04 ± 1.16
Total ash	4.73 - 5.79	5.26 ± 1.61
Acid insoluble ash	0.14 - 0.18	0.16 ± 0.10
Water extractive	11.92 - 14.56	13.24 ± 3.86
Ethanol extractive	4.98 - 6.08	5.53 ±1.24
50% Ethanol extractive	12.80 - 15.64	14.22 ± 4.48
Potassium content	0.75 - 0.91	0.83 ± 0.63
pH	5.00 - 6.12	5.56 ± 0.24

Table 4 Quality evaluation of *Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq. leaves

Determination	Range ($\bar{X}$ ± 10%)	$\bar{X}$ ± SD
Loss on drying	7.79 - 9.53	8.66 ± 1.68
Total ash	10.18 - 12.44	11.31 ± 1,21
Acid insoluble ash	0.36 - 0.44	0.40 ± 0.12
Water extractive	26.99 - 32.99	29.99 ± 6.53
Ethanol extractive	11.02 - 13.48	12.25 ± 2.88
50% Ethanol extractive	23.84 - 29.14	26.49 ± 3.41
Potassium content	2.46 - 3.00	2.73 ± 0.47
pH	5.81 - 7.11	6.46 ± 0.18

DISCUSSIONS

The chemical identification of 23 samples of aerial part and 6 samples of leaves of *Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq. were performed. Since the constituents of this medicinal plant consist of phenolic compounds, the preliminary tests were focus on detection of phenolic constituents by color reaction with $FeCl_3$ TS and $KMnO_4$ TS. Moreover, the presence of potassium salt in this plant could be investigated by flame test. All of these reactions could be as the characteristic of *Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq. Thin layer chromatographic analysis of phenolic acid, flavonoids and terpenoids was obtained on silica gel using a mixture of Toluene-Ethyl acetate-Formic acid (9:9:1) as a developing solvent and spraying with NP/PEG reagent. Rosmarinic acid, a major component, gave moss green color with the Rf value of about 0.40. A greenish blue color of caffeic acid could be also observed with Rf value of about 0.62. Instead of NP/PEG reagent, spraying with vanillin-phosphoric acid TS and observed under UV_{254} the orange-red spot of ursolic acid occurred. This system gave a good spread of components and displayed high reproducibility of Rf value.

From the result of quality evaluation, the appropriate chemical specifications of *Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq. could be set up. When $\bar{X}$ is the arithmatic mean of the results, the maximum limits $\bar{X}$ + 10% (if the results are not integers, they will be rounded to the next higher integers) are stated for the limited amount of loss on drying, total ash and acid-insoluble ash contents and the term "not more than" are expressed for their specifications. Besides these, the required limits of extractives, potassium content, pH value are stated for the maximum limits $\bar{X}$ -10% and the term "not less than" is used for their specifications. The data on quality evaluation of *Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq. are considerated from the experimental results of *Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq. aerial part (Table 3), water content by loss on drying, ash content, acid-insoluble ash content should be not more than 9%, 6% and 1%, respectively. Water soluble extractive, ethanol soluble extractive, 50% ethanol soluble extractive should not less than 12%, 5% and 13%, respectively. Potassium content should not less than 0.7%. pH value should not less than 5. From quality evaluation results of *Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq. leaves in Table 4 water content by loss on drying, ash content, acid insoluble ash content should not more than 10%, 13% and 1%, respectively. The value of extractive content: water soluble extractive, ethanol soluble extractive, 50% ethanol soluble extractive should not less than 26%, 11% and 23%, respectively. Potassium content should not less than 2%. pH value should not less than 5.

CONCLUSIONS

The appropriate chemical quality specification for the dried aerial part and leaves of *Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq. could be respectively as follow:

Loss on drying	: not more than 9, 10% w/w
Ash content	: not more than 6, 13% w/w
Acid insoluble ash	: not more than 1, 1% w/w
Water soluble extractive	: not less than 12, 26% w/w
Ethanol soluble extractive	: not less than 5, 11% w/w
50% ethanol soluble extractive	: not less than 13, 23% w/w
Potassium content	: not less than 0.7, 2% w/w
pH	: not less than 5.0, 5.0

The chemical identification of *Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq. by means of color test and chromatographic analysis can be provided.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to express their grateful thanks to Miss Chitra Chaiyawat, Miss Sujinda Rojanasaksothorn and Miss Supaporn Sintuwanich, Division of Drugs, Department of Medical Sciences for their valuable suggestion and helpful assistance in AA spectrophotometric analysis. Thanks are also due to Mr.Sareechai Vannabhirom for the illustration of medicinal plants. The authors are indebted to all of staff member of the Phytochemistry laboratory, Standardization and Quality Control section, Medicinal Plant Research Institute for their contribution during this study.

REFERENCES

1. Smitinand, T. Thai Plant Names. Rev.ed. Thai Plant Names (Tem Smitinand, Revised edition). The Forest Herbarium, Royal Forest Department. Bangkok: Prachachon Co., Ltd.; 2001: 386.
2. Keng, H. 1978. Labiatae. Flora Malesiana 8(3) 379-81.
3. Cramer, LH. Lamiaceae (Labiatae). A Revised Handbook to the Flora of Ceylon 1981; 3 : 123 - 126.
4. Lyckender IM, Malterud KE. Lipophillic Flavonoids from *Orthosiphon spicatus* Prevent Oxidative Inactivation of 15-Lipoxygenase. Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acid 1996; 54(4) : 239 - 46.
5. Malterud KE, Rydland KM. Inhibition of 15-Lipoxygenase from Orange Peel. J. Agri. Food Chem 48(11): 2000; 5576 - 80.
6. Takeda Y, Matsumoto T, Terao H, *et al.* Orthosiphol D and E, Minor Diterpenes from *Orthosiphon stamineus*. Phytochemistry 1993; 33(2) : 411 - 5.

7. Tezuka Y, Stampoulis P, Banskota AH, *et al.* Constituents of the Vietnamese Medicinal Plant *Orthosiphon stamineus.* Chem Pharm Bull 2000; 48(11) :1711 - 9.
8. Sumaryono W, Proksch P, Wray V, *et al.* Qualitative and Quantitative Analysis of the Phenolic Constituents from *Orthosiphon aristatus* Plant Med 1991; 57 : 176 - 80.
9. Awale S, Tezuka Y, Banskota AH, *et al.* Five Novel Highly Oxygenated Diterpenes of *Orthosiphon stamineus* from Myanmar. J. Nat Prod 2001; 64(5) :592 - 6.
10. Stampoulis P, Tezuka Y, Banskota AH, *et al.* Staminol A, a Novel Diterpene from *Orthosiphon stamineus*. Tetrahedron Letters 1999; 40(22) 4239 -42.
11. Ohashi K, Bahgaki T, Shibuya H. Antihypertensive Substance in the Leaves of Kumis Kucing (*Orthosiphon aristatus*) in Java Island. Yakugaku Zasshi J. Pharm. Soc. Japan 2000; 120(5) : 474- 82.
12. Shibuya H, Bohgaki T, Matsubara Y, *et al.* Indonesian Medicinal Plant XXII. Chemical Structures of Two New Isopimarane-type Diterpenes, Orthosiphonones A and B, and a New Benzochromene, Orthochromene A from the Leaves of *Orthosiphon aristatus* (Lamiaceae). Chem. Pharm. Bull 1999; 47(5) : 695 - 8.
13. Stampoulis P, Tezuka Y, Banskota AH, *et al.* Staminolactones A and B and Norstaminol A : Three Highly Oxygenated Staminane-type Diterpenes from *Orthosiphon stamineus*. Org. Letter 1999; 1(9) :1367 - 70.
14. Ohashi K, Bahgaki T, Matsubara T, *et al.* Indonesian Medicinal Plants. XXIII. Chemical Structures of Two New Migrated Pimarane-type Diterpenes, Neoorthosiphols A and B, and Suppressive Effect on Rat Thoracic Aorta of Chemical Constituents Isolated from the Leaves of *Orthosiphon aristatus* (Lamiaceae). Chem. Pharm. Bull 2000; 48(3) : 433- 5.
15. Shibuya H, Bohgaki T, Ohashi K, Two Novel Migrated Pimarane-type Diterpenes, Neoorthosiphols A and B, from the Leaves of *Orthosiphon aristatus* (Lamiaceae). Chem. Pharm. Bull 1999; 47(6) : 911 -2.
16. Beaux D, Fleurentin J, Mortier F. Effect of Extracts of *Orthosiphon stamineus* Benth, *Hieracium pilosella* L, *Sambucus nigra* L. and *Arctostaphylos uvaursi* (L) Spreng. in Rats. Phytotherapy Res 1998; 12(7) : 498 - 501.
17. Beaux D, Fleurentin J, Mortier F. Effect of Extracts of *Orthosiphon stamineus* Benth, *Hieracium pilosella* L, *Sambucus nigra* L. and *Arctostaphylos uvaursi* (L) Spreng. in Rats. Phytotherapy Res 1999; 13(3) : 222 - 5.
18. Shibuya H, Ohashi K, Kitagawa I. Search for Pharmacochemical Leads from Tropical Rainforest Plants. Pure and Applied Chemistry 1999: 71(6) : 1109 - 13.
19. Matsubara T, Bohgaki T, Watarai M, *et al* Antihypertensive Actions of Methylripariochromene A from *Orthosiphon aristatus*, an Indonesian Traditional Medicinal Plant Biol. Pharm. Bull 1999; 22(10) : 1083 - 8.

20. Wagner H, Baldt S, Zgainski E.M. Plant Drug Analysis. New York: Springer-Verlag. 1990. p. 303 - 4.
21. Thai Herbal Pharmacopoeia. Vol.1. Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, 1995. p.123, 126
22. The United State Pharmacopeia XXII. United States Pharmacopeial Rockville : Convention, Inc. 1990. p.1228 - 9.
23. British Pharmacopeia. Vol.2. London : The United Kingdom for Her Majesty's Stationery Office. 1988: A103.

การศึกษาคุณภาพของสมุนไพรใบหว้า
Study on the Quality of *Syzygium cumini* (L.) Skeels Leaves

ธิดารัตน์ บุญรอด, เย็นจิตร เตชะดำรงสิน, ปัทมาวดี เสตะกัณณะ
สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและคุณภาพทางเคมีของใบหว้าซึ่งมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Syzygium cumini* (L.) Skeels วงศ์ Myrtaceae ที่เก็บจากแหล่งธรรมชาติต่างๆ ในจังหวัดนครปฐมและนนทบุรี จำนวน 16 ตัวอย่าง พบว่า ใบหว้าแห้งที่จะนำมาใช้ประโยชน์ทางยาควรมีคุณภาพดังนี้คือ มีปริมาณแทนนินซึ่งเป็นสารสำคัญที่มีฤทธิ์ฝาดสมาน ไม่น้อยกว่าร้อยละ 6.0 โดยน้ำหนัก ปริมาณน้ำมันหอมระเหยซึ่งเป็นสารสำคัญที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคท้องร่วงและบิดที่เกิดจากเชื้อ *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus subtilis*. *Shigella dysenteriae* และ *Vibrio cholerae* O1 El Tor ไม่น้อยกว่าร้อยละ 0.5 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก และปริมาณความชื้นไม่เกินร้อยละ 8.0 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก นอกจากนี้ ยังได้ตรวจวิเคราะห์หาคุณภาพสมบัติเฉพาะตัวอื่นๆ และจัดทำข้อกำหนดเอกลักษณ์ทางเคมีด้วย

ABSTRACT

Sixteen samples of *Syzygium cumini* (L.) Skeels leaves, family Myrtaceae collected from various natural sources in Nakorn pathom and Nonthaburi Provinces were studied on antibacterial activity and chemical quality. It was found that the crude drug of good quality for medicinal purpose should contain tannins, which possessed astringent activity, not less than 6.0 % w/w. Volatile oil content, obtained from this crude drug and showed antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus subtilis, Shigella dysenteriae* and *Vibrio cholerae* 01 El Tor should not be less than 0.5 % v/w as well as the moisture content should not be more than 8.0 % v/w. Moreover, other specifications and its chemical identification were also given.

Key Words : *Syzygium cumini* (L.) Skeels, quality, tannins, volatile oil, antibacterial activity.

INTRODUCTION

Syzygium cumini (L.) Skeels (Synonyms *Eugenia jambolana* (Lam.), *Eugenia cumini*, "Waa" in Thai are trees in the family Myrtaceae (Figure 1) and they are widespread in cultivation and the wild in many types of forest at 0-1,000 meters above sea level and fruits are edible (Chantaranothai,1994). In traditional medicine, stem-bark is used as antidiarrheal, leaf as antidysenteric, fruit as antidiarrheal. seed as antidiarrheal, antidysenteric and non-specific antidote for strychnine poisoning (สมุนไพรสวนสิรีรุกขชาติ, 1992).

Chemical studies indicated that the leaves contain n-alkenes, aliphatic alcohol, triterpenoids, phytosterols (Gupta et al. 1974), flavonol glycoside, quercetin and myricetin-3-O-β-D-xylopyranosyl (1→2) α-L-rhamno-pyranosides (Slowing *et al.* 1994). In 1998. Pluemjai *et al* found that chloroform extract of the leaves showed antibacterial activity in diarrhoea and dysentery caused by *Staphyllococcus aureus* (ATCC 25293), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Shigella dysenteriae, Shigella flexneri* var X., *Salmonella typhimurium* and *Vibrio cholerae* O1 El Tor and it contained β-sitosterols (Figure 2) and other unidentified compounds. In 2000, Boonruad *et al* further isolated two compounds ursolic acid and betulinic acid from the chloroform extract. (Figure 2. Boonruad *et al.* 2000)

Three compounds previously isolated will be tested for antibacterial activities by the disc agar method (Buer et al. 1966) and will be compared to those of volatile oil extracted from the same sample. However, the chemical and physical characteristics of this crude drug have not been reported. Therefore, the purpose of this study was to analyse the chemical and physical characteristics to be used as quality evaluation of Waa leaves order to setting up standard specification. Furthermore, its chemical identification was also investigated.

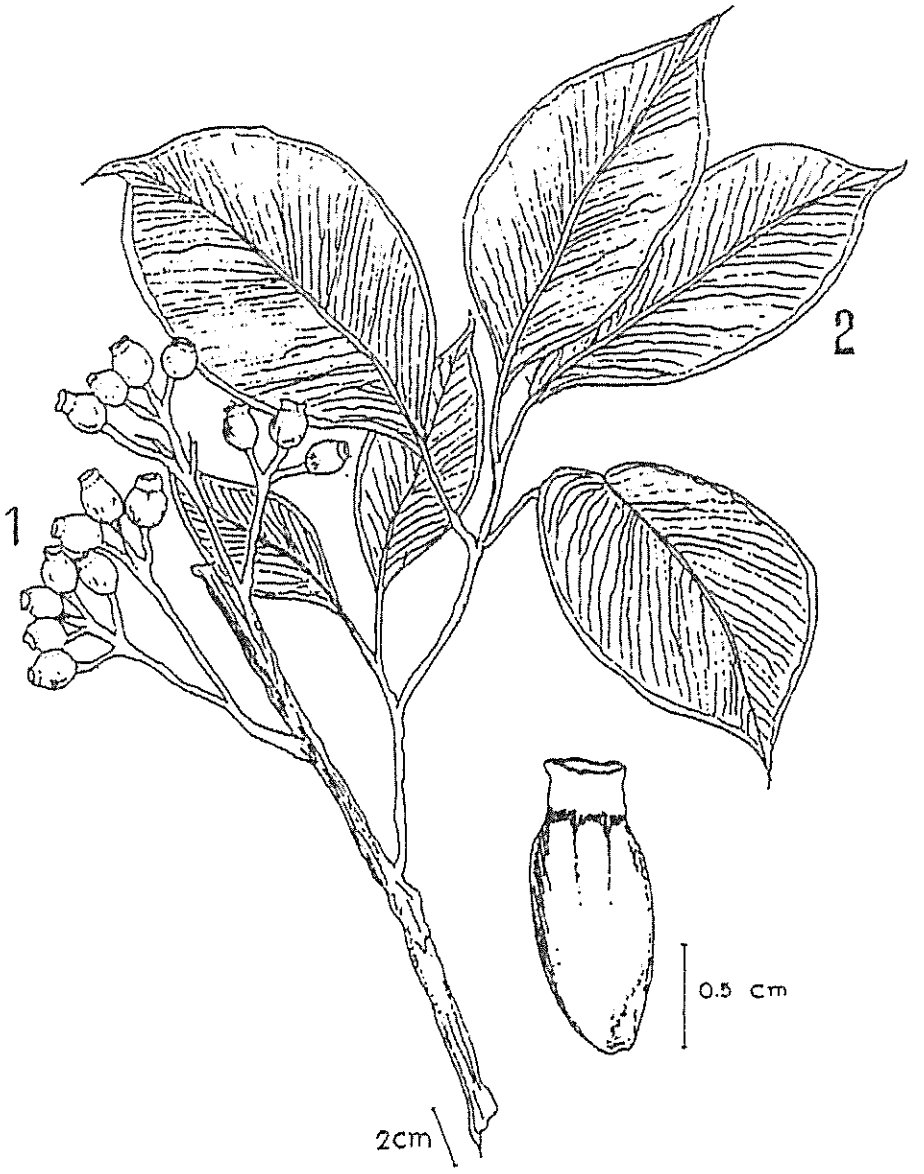
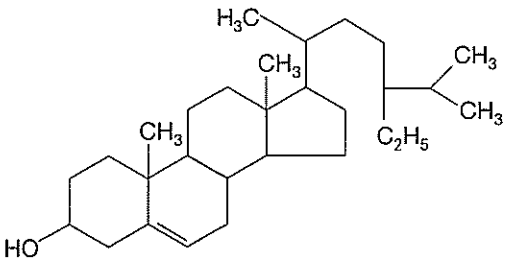
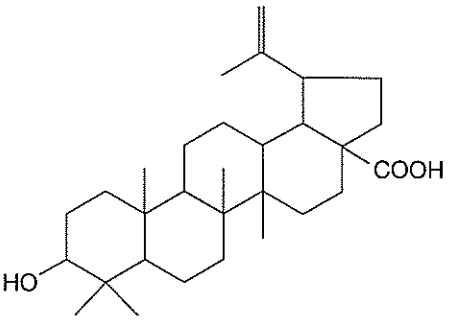


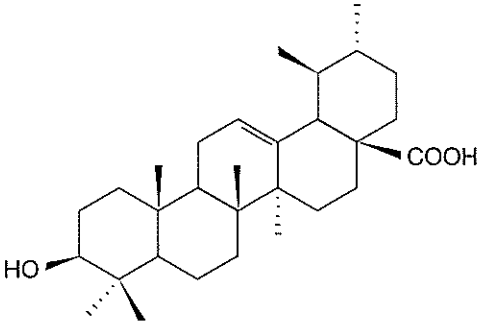
Figure 1 The sketch of *Syzygium cumini* (L.) Skeels
1. fruits 2. leaves



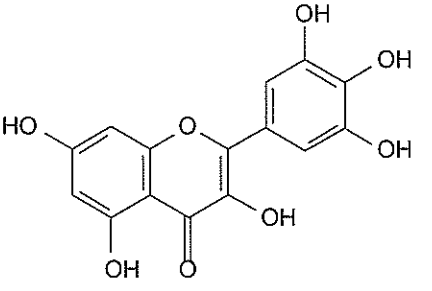
β-sitosterol



Betulinic acid



Ursolic acid



Myricetin

Figure 2 Some chemical structure constituents in *S.cumini* (L.) Skeels leaves

MATERIALS AND METHODS

Materials

1. Plant materials

Sixteen samples of *Syzygium cumini* (L.) Skeels fresh leaves were collected from Nakorn pathom and Nonthaburi Provinces. They were identified by Mr. Daroon Petcharaplai, The Chief of Research and Development of Production for Medicinal Plants Products Group, Medicinal Plant Research Institutes, Department of Medical Sciences. The leaves of each sample were washed clean and dried in an oven at 50°C for 32 hrs. The dried samples were ground to powder, then passed through a sieve with mesh no. 180 and kept in well-closed containers.

2. Standard substances:

- Tannic acid was purchased from E. Merck, Germany.
- Myricetin was purchased from Roth, Germany.

3. Isolated substances :

- Betulinic acid, ursolic acid and β–sitosterol, were isolated from *S. cumini* (L.) Skeels (Pluemjai *et al*, 1998, Boonruad *et al*, 2000)

4. Silica gel 60 GF_{254} :

- TLC plate precoated 20 x 20 cm, layer thickness 0.25 mm, Art 7730 from E. Merck, Germany.

5. All solvents and chemicals used :

- Analytical grade.

Methods

1. Preparation of crude extracts, isolated compounds and volatile oil

1.1 Crude extracts

The powder of dried leaves of *S. cumini* (L.) Skeel was extracted in a soxhlet apparatus with petroleum ether, chloroform and ethanol respectively. The crude extracts were separately concentrated under reduced pressure to dryness and tested for antibacterial activity. The crude extract prepared in 1997 and freshly prepared in 2000 were performed in the same manner.

1.2 Isolated compounds

Three compounds: β–sitosterol, ursolic acid and betulinic acid, from chloroform active extract were isolated by using chromatographic technique (Pluemjai *et al.* 1998 : Boonruad *et al.* 2000)

1.3 Volatile oil

The powder of dried leaves of the plant was subjected to steam distillation as described in the Pharmacopoeia of Japan. (Pharmacopoeia of Japan, 1986)

1.4 Volatile substances

The powder of dried leaves of the plant was set up for Thermomicro Analysis and Separation Ovens (TAS Method) (Brain, 1975)

2. Antibacterial activity of crude extract, isolated compounds and volatile oil

Chloroform extracts volatile oil and isolated compounds were tested for their antibacterial activities by the disc agar diffusion method (Buer *et al*, 1966). Test organisms were *Staphyllococcus aureus* (ATCC 25293), *Bacillus subtilis, Shigella dysenteriae, Shigella flexneri* var X, *Salmonella typhimurium* and *Vibrio cholerae* O1 El Tor. All strains of microorganism were obtained from the National Institute of Health, Department of Medical Sciences. Mueller-Hinton agar was used as

a culture medium. The samples were fulfilled on Mueller Hinton agar plates which had been spreaded with one of the bacteria mentioned above. All tests were carried out in duplicate.

3. Chemical identification

3.1 Preliminary test

Test solution (1) A 1 g of sample was refluxed with 25 ml of chloroform for 15 minutes and filtered.

(2) A 1 g of sample was refluxed with 20 ml of water for 15 minutes and filtered.

Reagent (1) conc. Sulfuric acid

(2) Acetic anhydride

(3) Ferrric chloride TS : A 1 g of ferric chloride ($FeCl_3.6H_2O$) was dissolved in water to make 100 ml. (Stahl, 1969)

(4) Phosphomolybdic acid TS : A 20 g of phosphomolybdic acid was dissolved in ethanol to make 100 ml. (Stahl, 1969)

Procedure : (1) 2 ml of test solution (1) was evaporated until dryness. The residue was dissolved in 2 ml of acetic anhydride and conc. sulfuric acid (1 ml) was carefully added and the color of the solution was noted.

(2) To 2 ml of test solution (1) add one drop of 20% phosphomolybdic acid heat on a waterbath for a few minutes and the color of the solution was noted.

(3) To 2 ml of test solution (2) add a few drops of Ferric chloride TS and the color of the solution was noted.

3.2 Confirmatory test (Thin-layer chromatographic analysis)

System 1

Sample solution : A 1 g of sample was refluxed with 20 ml of water for 15 minutes, filter and concentrate the filtrate to 2 ml.

Standard solution : A 1 mg of tannic acid was dissolved in 1 ml of water.

Standard condition : Normal saturation, room temperature

Layer : TLC plate silica gel GF_{254}

Developing solvent : Toluene : ethyl acetate : formic acid anhydrous =10:9:2

Developing distance : 12 cm

Spotting amount : Test solution = 10 µl Standard solution = 10 µl

Spraying reagent : Ferric chloride TS

Detection : (1) Quenching under UV_{254}

(2) Visible with Ferric chloride TS

System 2

Sample solution : (1) A 1 g of sample was refluxed with 25 ml of chloroform for 15 minutes, filter, and concentrate the filtrate to 5 ml.

(2) A 50 g of sample was set up for volatile oil determination (JP), 0.5 ml of volatile oil was obtained. To 0.1 ml of volatile oil was dissolved in 2 ml of chloroform.

(3) A 25 mg of sample was set up for TAS Method (Brain. 1975) at 265°C, for 25 minutes.

Standard solution : (1) A 1 mg of betulinic acid was dissolved in 1 ml of a mixture of chloroform and methanol (1:4).

(2) A 1 mg of ursolic acid was dissolved in 1 ml of a mixture of chloroform and methanol (1:4)

(3) A 1 mg of β–sitosterol was dissolved in 1 ml of chloroform.

(4) A 2 mg of myricetin was dissolved in 1 ml of a mixture of chloroform and methanol (1:3)

Standard condition : Normal saturation, room temperature

Layer : TLC plate silica gel GF_{254}

Developing solvent : Toluene : ethyl acetate = 93 : 7

Developing distance : 10 cm

Spotting amount : Test solution (1,2) = 1 μl each

Standard solution = 15 μl

Spraying reagent : (1) Anisaldehyde sulfuric acid TS

(2) Phosphomolybdic acid TS

Detection : (1) Quenching under UV_{254}

(2) Visible with anisaldehyde-sulfuric acid TS after heated the plate at 120°C for 5 minutes.

(3) Visible with phosphomolybdic acid TS after heated the plate at 120°C for 5 minutes.

4. Quality Evaluation

4.1 Ash content

Total ash content and acid-insoluble ash contents were carried out using the methods in Thai Herbal Pharmacopoeia. (Thai Herbal Pharmacopoeia, 1995)

4.2 Extractives content

Water soluble extractive, ethanol-soluble extractive and chloroform-soluble extractive were carried out using the methods in Thai Herbal Pharmacopoeia. (Thai Herbal Pharmacopoeia, 1995)

4.3 Moisture content (water by azeotropic method)

Moisture content was carried out using the methods in Thai Herbal Pharmacopoeia. (Thai Herbal Pharmacopoeia, 1995)

4.4 Tannins content

Tannins content was determined as described in Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials. (WHO/Pharm., 1992)

4.5 Volatile oil content

Volatile oil content was carried out using the methods in the Pharmacopoeia of Japan (Pharmacopoeia of Japan. 1986)

RESULTS

1. Antibacterial activity of crude extracts, isolated compounds and volatile oil

The antibacterial activities of chloroform extracts, volatile oil and isolated compounds from the same batch of S. *cumini* (L.) Skeels leaves were performed. The degree of antibacterial activities was correspond to the diameter of the clear inhibition zone each sample. It was found that the chloroform extract prepared since 1997 did not show antibacterial activity, while the freshly prepared one showed antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* (ATCC 25293), *Shigella dysenteriae* and *Vibrio cholerae* 01 El Tor. The volatile oil from this crude drug showed inhibitory activity against *Staphylococcus aureus* (ATCC 25293), *Bacillus subtilis*. *Shigella dysenteriae* and *Vibrio cholerae* 01 El Tor and its activity was stronger than that of the freshly prepared chloroform extract. (Table 1)

Table 1 Antibacterial activities of crude extracts, isolated compounds and volatile oil from S. *cumini* (L.) Skeels leaves

Samples	Diameter of Inhibition zone (mm)					
	S.aureus (ATCC 25293)	*Bacillus subtills*	*Shigella dysenteriae*	*Shigella flexneri* var X	*Samonella typhimurium*	*Vibrio cholerae* O1 El Tor
C-1 (2 mg/disc)	0	0	0	0	0	0
C-2 (2 mg/disc)	5	0	6	0	0	10
C-3 (2 mg/disc)	10	13	9	0	0	11
C-4 (0.12 mg/disc)	0	0	0	0	0	0
C-5 (0.12 mg/disc)	0	0	0	0	0	0
C-6 (0.12 mg/disc)	0	0	0	0	0	0

Remark C-1 = chloroform extract prepared in 1997
C-2 = chloroform extract freshly prepared in 2000
C-3 = volatile oil
C-4 = betulinic acid
C-5 = ursolic acid
C-6 = β–sitosterol

2. Chemical identification

2.1 Preliminary Test

The preliminary test of 16 samples of S. *cumini* (L.) Skeels leaves was performed by color test. The results are shown in Table 2.

2.2 Confirmatory Test

The confirmatory test of 16 samples of *S. cumini* (L.) Skeels leaves was performed by thin-layer chromatographic analysis. The results are shown in Tables 3, 4, 5, 6 and Figures 3, 4.

Table 2 Chemical identification of *S.cumini* (L.) Skeels leaves

Samples	Chemical identification				
	Preliminary Test			Confirmatory Test	
	Liebermann-Burchard	Phosphomolybdic acid	Ferric chloride	TLC	TAS
Chloroform extract	All samples gave brownish red ring at the zone of contact	All samples gave prussian blue color	-	All samples showed β–sitosterol, betulinic acid, ursolic acid, myricetin and other unidentified compounds	- -
Water extract	-	-	All samples gave blue-back color	All samples showed tannic acid and other unidentified compounds.	- -
Volatile oil	-	-	-	All samples showed myricetin and other unidentified compounds	- -
Crude drug	-	-	-	-	All samples showed myricetin and other unidentified compounds.

Table 3 hR_f value of components in water extract of *S. cumini* (L.) Skeels leaves.

Spot	hR_f value	Detection with	
		UV 254	Ferric chloride
1	4-5	quenching	blue-black color
2	8-9	quenching	-
3	14-15	quenching	-
4	16-17	quenching	-
5	20-21	quenching	blue-black color
6	23-24	quenching	-
7	34-35	quenching	-
8	45-46	quenching	
9	54-55	quenching	

Table 4 hR_f values of components in volatile substances of *S.cumini* (L.) Skeels leaves

Spot	hR_f value	Detection with		
		UV 254	Anisaldehyde-Sufuric acid TS	Phosphomolybdic acid
1	3-4	-	green-blue color	apple green color
2	7-8	-	violet color	-
3	11-12	quenching	apple green color	blue-green color
β-sitosterol	18-19	-	violet color	blue-green color
5	21-22	quenching	-	-
6	23-24	quenching	apple green color	blue-green color
7	30-31	quenching	light pink color	blue-green color
8	34-35	quenching	-	-
9	37-38	quenching	apple green color	blue-green color
10	45-46	quenching	dark pink color	blue-green color
11	54-55	quenching	olive green color	-
12	58-59	quenching	-	blue-green color
13	67-68	quenching	whitish pink color	-
myricetin	79-80	quenching	violet color	blue-green color

Table 5 hR_f values of components in chloroform extract of *S.cumini* (L.) Skeels leaves

Spot	hR_f value	Detection with		
		UV 254	Anisaldehyde-Sulfuric acid TS	Phosphomolybdic acid
ursolic acid	4-5	-	violet color	blue-green color
betulinic acid	8-9	-	violet color	blue-green color
3	11-12	quenching	apple green color	blue-green color
4	15-16	quenching	-	-
β–sitosterol	18-19	-	violet color	blue-green color
6	23-24	quenching	apple green color	-
7	30-31	quenching	-	blue-green color
8	37-38	-	-	-
9	45-46	-	dark pink color	blue-green color
10	55-56	-	olive green color	-
11	67-68	-	whitish pink color	-
myricetin	79-80	quenching	violet color	blue-green color

Table 6 hR_f values of components in volatile oil of *S.cumini* (L.) Skeels leaves

Spot	hR_f value	Detection with		
		UV 254	Anisaldehyde-Sulfuric acid TS	Phosphomolybdic acid
β–sitosterol	18-19	-	violet color	blue-green color
2	23-24	quenching	apple green color	blue-green color
3	30-31	quenching	light pink color	blue-green color
4	37-38	-	apple green color	blue-green color
5	45-46	-	dark pink color	blue-green color
6	55-56	-	olive green color	-
7	57-58	quenching	-	blue-green color
8	67-68	-	whitish pink color	-
myricetin	79-80	quenching	violet color	blue-green color

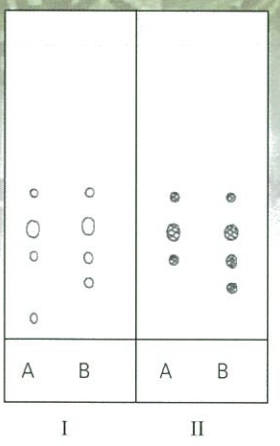


Figure 3 Thin-layer chromatogram of water extract of *S.cumini* (L.) Skeels leaves

Remark A = water extract
B = standard tannic acid
I = quenching under UV254
II = visible with Ferric chloride TS
O = quenching
● = blue-black color

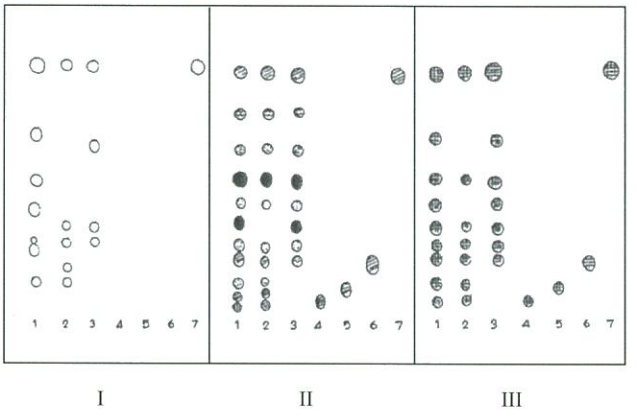


Figure 4 Thin-layer chromatogram of volatile substance, chloroform extract and volatile oil from *S.cumini* (L.) Skeels leaves

Remark 1 = volatile substance
2 = chloroform extract
3 = volatile oil
4 = standard ursolic acid
5 = standard betulinic acid
6 = standard β-sitosterol
7 = standard myricetin
I = quenching under UV 254
II = visible with anisaldehyde-sulfuric acid
III = visible with phosphomolybdic acid TS
○ = quenching
◎ = violet color
◍ = green color
◔ = blue color
◉ = blue-green color
● = pink color
◔ = whitish pink color

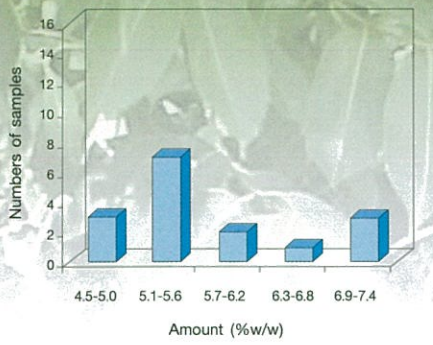


Figure 5 Amount of ash in *S.cumini* (L.) Skeels leaves

Figure 6 Amount of acid-insoluble ash in *S.cumini* (L.) Skeels leaves

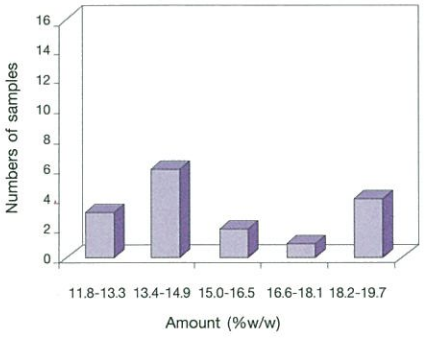


Figure 7 Amount of water-soluble extractive in *S.cumini* (L.) Skeels leaves

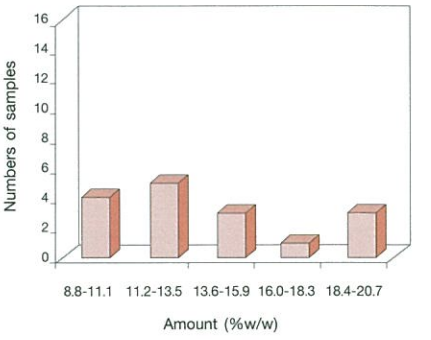


Figure 8 Amount of ethanol-soluble extractive in *S.cumini* (L.) Skeels leaves

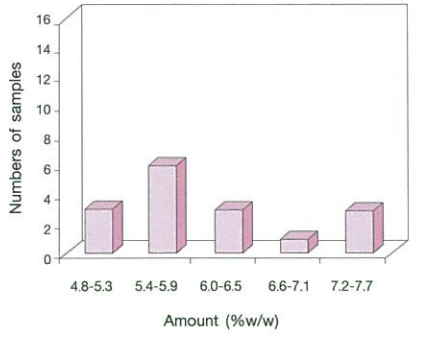


Figure 9 Amount of chloroform-soluble extractive in *S.cumini* (L.) Skeels leaves

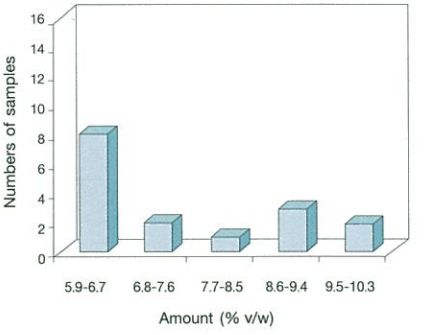


Figure 10 Amount of moisture content in *S.cumini* (L.) Skeels leaves

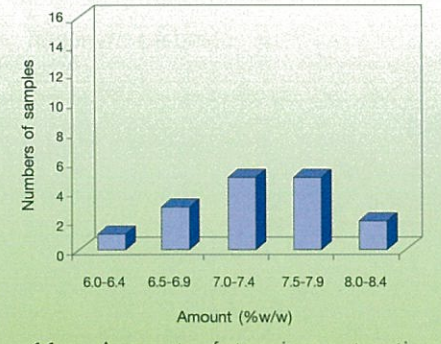


Figure 11 Amount of tannins extractive in *S.cumini* (L.) Skeels leaves

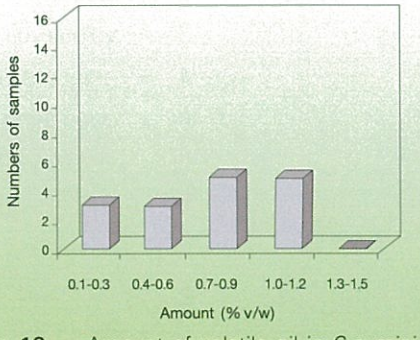


Figure 12 Amount of volatile oil in *S.cumini* (L.) Skeels leaves

3. Quality evaluation of crude drug

To assess the value of crude drugs, their quality evaluations were performed in five main categories : i.e. determination of ash content, extractives content, moisture content, tannins content and volatile oil content. The results of quality evaluation showed that total ash, acid- insoluble ash, water-soluble extractive, ethanol-soluble extractive. chloroform-soluble extractive, moisture, tannins and volatile oil content were 4.50-7.06, 0.01-0.25, 11.79-19.23. 8.83-20.19, 4.82-7.50, 5.91-9.78, 6.03-8.15 and 0.18-1.14% respectively, with standard deviations of 0.83, 0.07, 2.49, 3.46, 0.84, 1.47, 0.54 and 0.32 respectively. (Figures 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 and Table 7)

Table 7 Quality evaluation of *S.cumini* (L.) Skeels leaves.

Determination	Range (%) N = 16	$\overline{X} \pm SD$
Total ash	4.50 - 7.06	5.62 ± 0.83
Acid-insoluble ash	0.01 - 0.05	0.10 ± 0.07
Water-soluble extractive	11.79 - 19.23	15.41 ± 2.49
Ethanol-soluble extractive	8.83 - 20.19	13.53 ± 3.46
Chloroform-soluble extractive	4.82 - 7.50	5.98 ± 0.84
Moisture content	5.91 - 9.78	7.18 ± 1.47
Tannins	6.03 - 8.15	7.26 ± 0.54
Volatile oil	0.18 - 1.14	0.69 ± 0.32

DISCUSSION

From the study on antibacterial activities indicated that chloroform extract prepared since 1997 did not show antibacterial activities, while the freshly prepared one showed antibacterial activities against *Staphylococcus aureus* (ATCC 25293), *Bacillus subtilis, Shigella dysenteriae* and *Vibrio cholerae* 01 El Tor. This showed that the active components were unstable and the activity of crude extract was lost when kept for three years. From a screening test, it was found that the chloroform extract contained β-sitosterol, ursolic acid, betulinic acid, myricetin and other unidentified compounds. β-sitosterol, ursolic acid, betulinic acid did not show any antibacterial activity. Therefore, the active components should be myricetin or other unidentified compounds in the chloroform extract. Volatile oil from this crude drug contained β-sitosterol, myricetin and unidentified compounds showed inhibitory activity against *Staphylococcus aureus* (ATCC 25293), *Bacillus subtilis, Shigella dysenteriae* and *Vibrio cholerae* 01 El Tor and its activity was tronger than that of the freshly prepared chloroform extract. This result indicated that the active compound should be unidentified compounds.

The chemical identifications of various samples of Waa leaves were performed by color test and thin-layer chromatographic analysis. The preliminary test was emphasized on the detection of tannins and volatile oil by color reactions with ferric chloride TS and Liebermann-Burchardt reagent respectively. Thin-layer chromatographic separation of the tannins was carried out on silica gel GF_{254} using a mixture of toluene-ethyl acetate-formic acid anhydrous (10:9:2) as a mobile phase and detected with ferric chloride TS. It was found that all the samples gave the same TLC-fingerprint (Figure 3). Thin-layer chromatographic separation of the chloroform extract volatile oil and volatile substance (TAS method) was carried out on silica gel GF_{254} using a mixture of toluene-ethyl acetate (93 : 7) as a mobile phase, then detected with anisaldehydesulfuric acid TS and phosphomolybdic acid TS after the plate was heated at 120°C for 5 minutes. All the samples gave the same TLC fingerprint. It was found that ursolic acid betulinic acid were found only in the chloroform extract but were absent in the volatile oil. Even though these two compounds were inactive it could be used for the identification of this crude drug (Figure 4). TAS method is very useful for the chemical identification because it is simple, rapid, sensitive and the sample size is very small. Therefore, this method is available for small amount of sample.

CONCLUSION

From the results of the study, the appropriate chemical specifications of *S.cumini* (L.) Skeels. Leaves could be set up when $\overline{X}$ is the arithmetic mean of the results, the maximum limits $\overline{X}$ + 10% (if the results are not integers, they will be rounded to the next higher integers) are stated for the limited amount of ash, acid-insoluble ash, moisture content and the term "not more than" are expressed for their specifications. Besides these, the required limits of

extractives, tannins content and volatile oil are stated for the maximum limits $\overline{X}$-10%, (with decimal parts omitted except volatile oil content, the decimal parts could not be omitted because $\overline{X}$ is less than 1. Therefore, if the decimal part is more than 0.5 the limit is stated for 0.5) and the term "not less than" is used for their specifications.

Total ash	: not more than 7.0% w/w
Acid-insoluble ash	: not more than 1.0% w/w
Moisture content	: not more than 8.0% v/w
Water-soluble extractive	: not less than 13.0% w/w
Ethanol-soluble extractive	: not less than 12.0% w/w
Chloroform-soluble extractive	: not less than 5.0% w/w
Tannins content	: not less than 6.0% w/w
Volatile oil content	: not less than 0.5% v/w

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to express grateful thanks to our colleagues in the Medicinal Plant Research Institute : Miss Warunee Jirawattanapong, for determination of volatile oil, Miss Sadudee Rattanajarasros, for providing graphic patterns and Mr. Thanawath Thongcheen for the illustration of medicinal plants and assistance during this study.

REFERENCES

สมุนไพรสวนสิรีรุกขชาติ 2535. บริษัท อมรินทร์พริ้นติ้งกรุ๊ฟ จำกัด พิมพ์ครั้งที่ 1 หน้า 107.

Boonruad T, Chansuwanich N. 2000. Part I Chemical Constituents of Antibacterial Active Fraction from *Syrygium cumini* (L.) Skeels Leaves Extract. Bull. Dept. Med. Sci. 42 (2) : 1-13.

Brain KR, Turner TD. 1957. The Practical Evaluation of Phytopharmaceuticals. Wright-Sciantechica Bristol. UK. : 110-111.

Buer AW, Kirby WMM, Sheris JC, Turck M. 1966. Antibiotic suseptibility testing by a standardized simple disk method. Am J Clin Patho 45: 493-496.

Chantaranothai P, Panell J. 1994. A reversion of Acnema, Cleistocalyx, Eugenia s.s and *Syrygium cumini* (L.) (Myrtaceae) in Thailand. Thai For Bull 21 : 1-123.

Gupta SG, Sharma DP. 1974. Triterpenoid and other constituents of *Eugenia jambolana* Leaves. Phytochemistry.18 : 2013-2014.

Pluemjai T, Setakanna P, Chansuwanich N. 1998. Phytochemical and Antibacterial Studies on the Leaves of *Syrygium cumini* (L.) Skeels Bull Dept Med Sci 40 (2) : 119- 126.

Slowing K, Shuber M, Carretero E, Villar A. 1994. Flavonoid Glycosides from Eugenia Jambo. Phytochemistry. 37 : 255-258.

Stahl E. 1969. Thin-Layer Chromatography. Berlin. Heidelburg. New York : A Laboratory Handbook Springer-Verlag. pp. 857, 887.

Thai Herbal Pharmacopoeia. 1995. Vol 1. Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Bangkok. pp. 123, 126, 127.

The Pharmacopoeia of Japan. 1986. The Ministry of Health and Welfare, Tokyo. 11th ed. Part I. pp 51-52.

WHO/Pharm. 90 1992. Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials. 152/Rev.2 TRM/90.3 pp. 70-73.

กระชายดำ

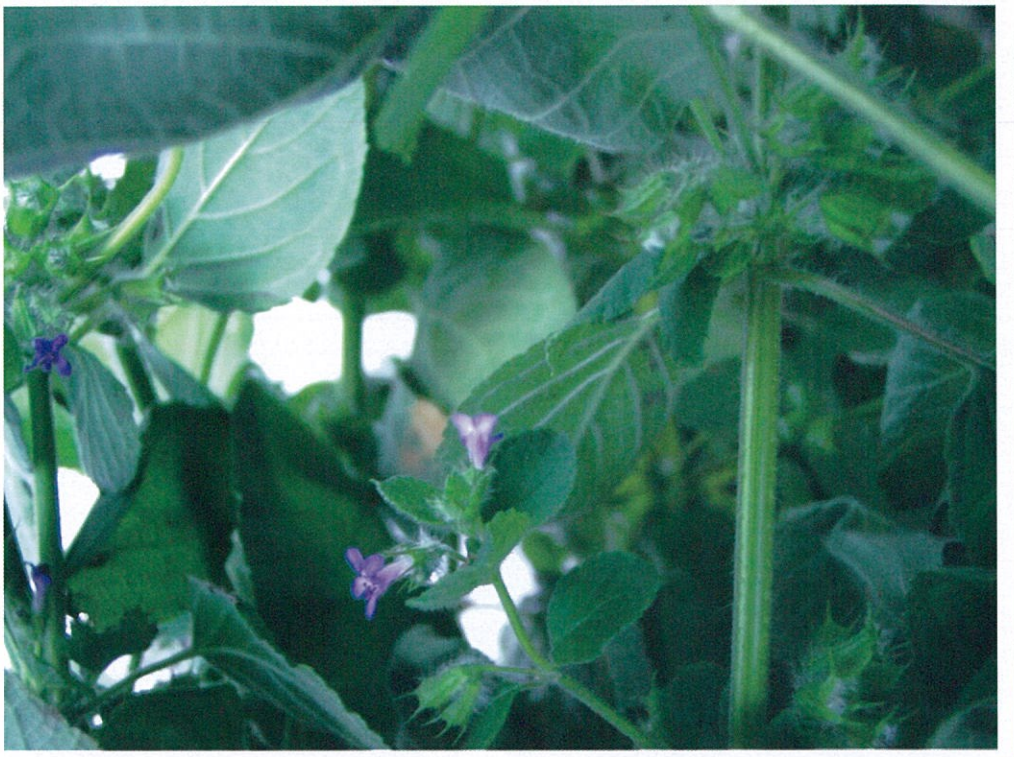
Kaempferia parviflora Wall. ex Baker

ขมิ้นเครือ

Arcangelisia flava (L.) Merr.

เถาวัลย์เปรียง
Derris scandens (Roxb.) Benth.

ปัญจขันธ์
Gynostemma pentaphyllum (Thunb.) Makino.

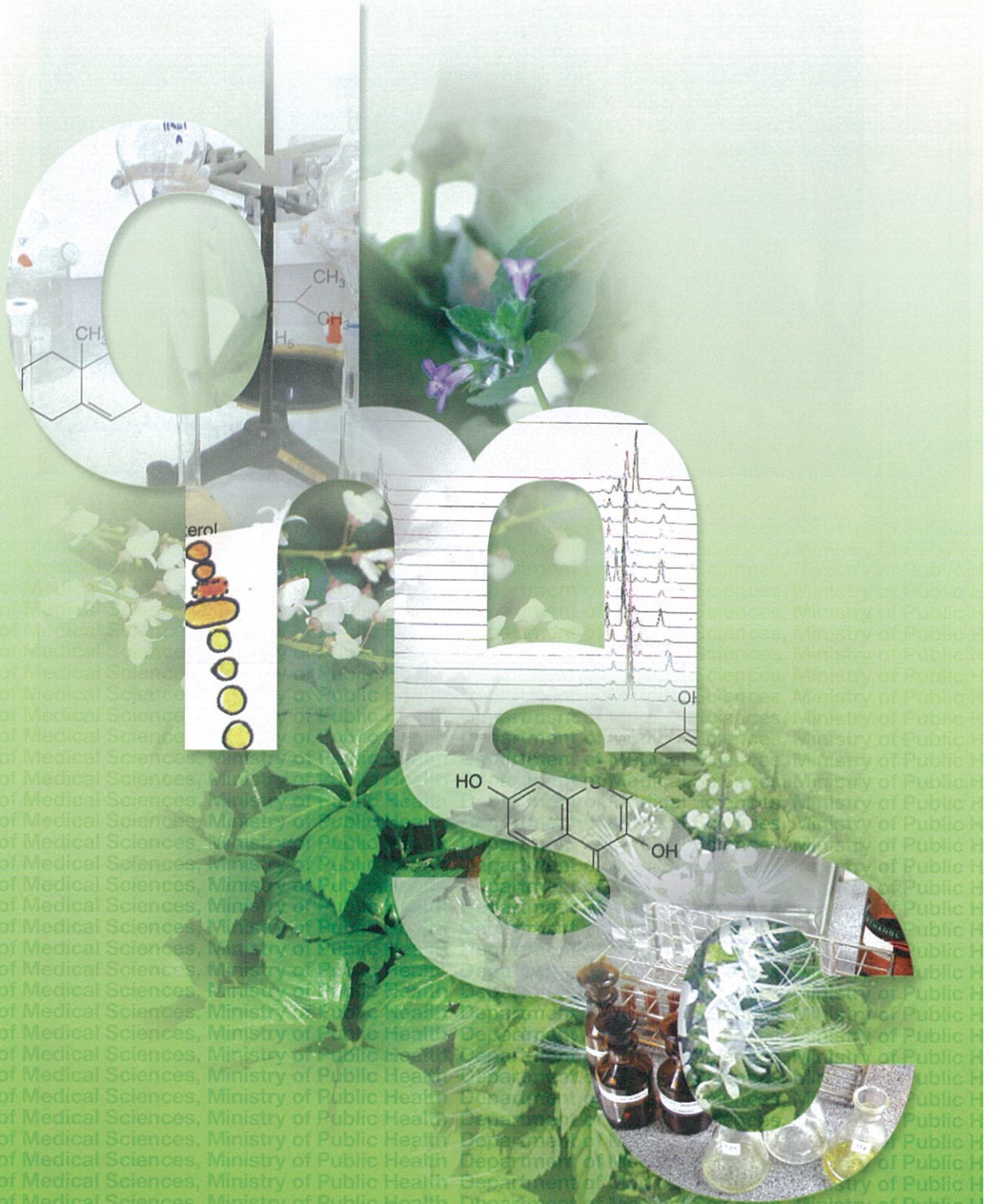


แมงลักคา

Hyptis suaveolens (L.) Poit.

หญ้าหนวดแมว

Orthosiphon aristatus (Blume) Miq.


CH3
HO
OH