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

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

บทคัดย่อ

แมงลักคามีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. วงศ์ Labiatae (หรือ Lamiaceae) เป็นสมุนไพรชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ยาจากสมุนไพร โดยมีรายงานประโยชน์ทางเภสัชวิทยาอย่างหลากหลาย 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

[1] สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
[2] สถาบันการแพทย์ไทย-จีน เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข

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 bǎizǐ)[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] เม็กซิโกใช้เมล็ดมาย่างเพื่อแก้โรคเกี่ยวกับลำไส้หรือใช้เป็นยาฆ่าเชื้อ นอกจากนี้ ยังใช้ทั้งต้นมาต้มน้ำเพื่อดื่มแก้ปวดกระเพาะอาหารและแก้ปวดบิด[3] ตรินิแดดใช้เพื่อขับลม ขับเสมหะ แก้หวัด แก้ไข้ แก้ไข้หวัดใหญ่ แก้มาเลเรีย แก้ไข้เหลือง แก้ท้องผูก แก้ปวดท้องประจำเดือน[3] เวเนซูเอลาใช้สำหรับผสมน้ำอาบเพื่อรักษาอาการอัมพฤกษ์หรืออัมพาต โรคแผลพุพองรวมทั้งโรคผิวหนัง[3] ชาวพื้นเมืองแถบ curacao ใช้ต้มน้ำดื่มแก้ท้องอืดอาเจียนและปวดกระเพาะอาหาร[3] นอกจากนี้ใน Antilles และเวเนซูเอลาใช้รักษามะเร็งและเนื้องอก[3]

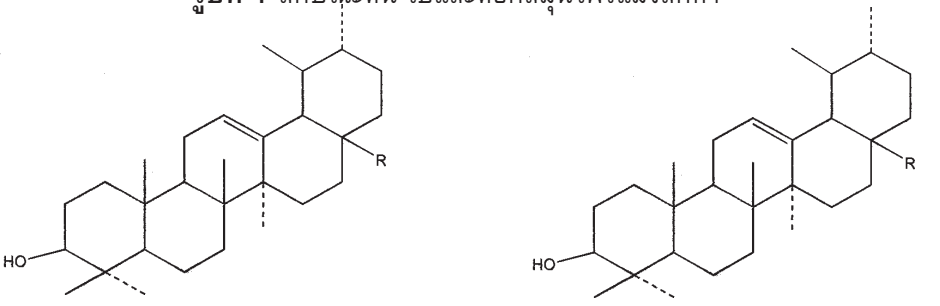
อินเดียใช้รากช่วยย่อยอาหารและกระตุ้นความอยากอาหาร[13] ใต้หวันใช้ใบและลำต้นพอกภายนอกแก้ปวดศีรษะและแก้โรคผิวหนัง[12] ฟิลิปปินส์ใช้ไล่แมลง และใช้ใบหรือยอดแก้ปวดท้อง แก้ปวดข้อหรือตะคริวโดยผสมกับน้ำอาบ รากใช้ต้มเป็นยาขับระดู และกระตุ้นความอยากอาหาร[3,12]

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* ทั้งสายพันธุ์ที่ไวต่อยาคลอโรควินและดื้อต่อยาคลอโรควินโดยมีค่าความเข้มข้นในการยับยั้งเชื้อที่ 50% (IC_{50}) เท่ากับ 26 และ 27 ไมโครโมลาร์[17] เมื่อเร็วๆนี้ มีรายงานว่าสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบแมงลักคา คือ 9α,13α-*epi*-dioxiabiet-8(14)-en-18-ol มีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของ *Plasmodium falciparum* ดีมากโดยมีค่า IC_{50} ที่ 0.1 μg/ml[18] สำหรับสารสกัดด้วยเอทานอลจาก ใบแมงลักคามีฤทธิ์รักษาแผลในหนูขาว อาจเนื่องจากมีฤทธิ์เพิ่มเอนไซม์ที่ใช้ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ catalase, superoxide dismutase[19] สำหรับน้ำมันหอมระเหยจากแมงลักคา มีรายงานถึงความเป็นพิษต่อเชื้อรา[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] สำหรับองค์ประกอบทางเคมีอื่นๆของพืชชนิดนี้ในส่วนเหนือดิน มีรายงานว่า พบสารประเภท 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-12en-3β-ol-29-oic acid[45] สารประเภท flavonoids เช่น 4',5-dihydroxy-7-methoxy flavone[16] สารประเภท aldehydes เช่น 5-hydroxy methyl furfuraldehyde[16] ส่วนองค์ประกอบทางเคมีอื่นๆที่พบในรากของพืชชนิดนี้ 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-12en-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]

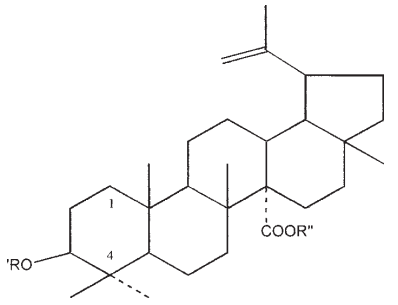
รูปที่ 1 ลักษณะต้น ใบและดอกสมุนไพรแมงลักคา



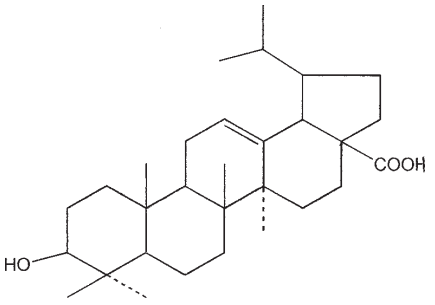
ursolic acid: R = COOH
α-amyrin: R = CH_3

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

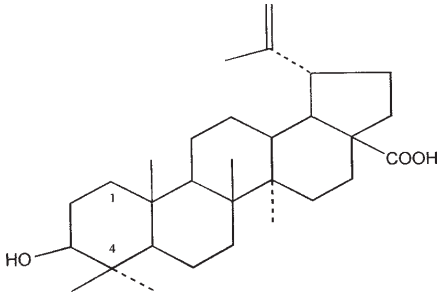
รูปที่ 2 สูตรโครงสร้างของสารเคมีบางชนิดที่พบในแมงลักคา



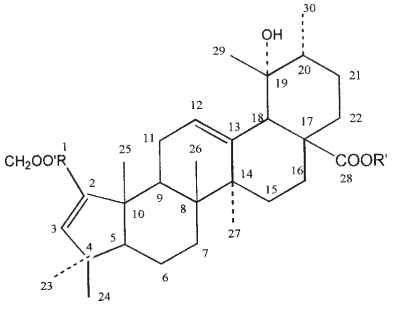
3β-hydroxylup-20(29)-en-27-oic acid: R' = R"= H
3β-acetoxylup-20(29)-en-287-oic acid: R'=Ac; R"=H
methyl-3β-hydroxylup-20(29)-en-27-oate: R'=H;R"= CH_3



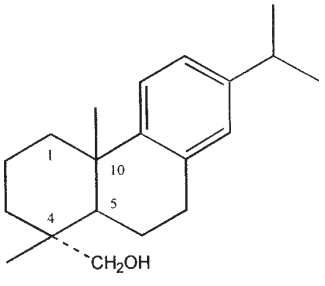
3β-hydroxylup-12-en-28-oic acid



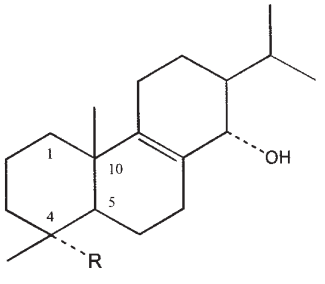
betulinic acid



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

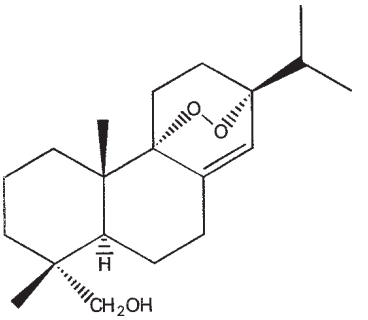


dehydroabietinol



suaveolic acid: R=COOH
suaveolol: R=CH_2OH

รูปที่ 2 (ต่อ)สูตรโครงสร้างของสารเคมีบางชนิดที่พบในแมงลักคา



9α-13α -*epi*-doxiabiet-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 จึงสรุปว่าสารสกัดดังกล่าวในหนูขาวมีความปลอดภัย [50] จากข้อมูลต่างๆ ดังที่ได้กล่าวมาแล้วจะเห็นได้ว่าสมุนไพรชนิดนี้มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยาหรือผลิตภัณฑ์สุขภาพ 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 และอบให้แห้งด้วยเตาอบร้อนไฟฟ้าที่มีพัดลมระบายอากาศ ที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส นาน 48 ชม (ค่าเฉลี่ยของผลผลิตแห้งเมื่อเทียบกับตัวอย่างสด ประมาณ 26% โดยน้ำหนัก) แล้วนำตัวอย่างที่แห้งแล้วไปบดเป็นผงละเอียด ผ่านแร่งเบอร์ 80 เก็บผงสมุนไพรในขวดแก้วสีชามีฝาปิดสนิท ปิดฉลากระบุชื่อสมุนไพร แหล่งที่มา วันที่เก็บ และวันที่เตรียมตัวอย่าง

เครื่องมือ

1. เตาอบร้อนไฟฟ้ารุ่น VLE-400 ของบริษัท Mammert ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี

2. เครื่องบดปั่น รุ่น RT 34 ของบริษัท Chyun Tseh Industrial ประเทศไต้หวัน

3. เครื่องแร่ง รุ่น AS 200 Basic ของบริษัท Retsch ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี และแร่งเบอร์ 80 ของบริษัท Endocott ประเทศอังกฤษ

4. เครื่องเขย่ารุ่น KS 501 ของบริษัท IKA Labortechnik ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี

5. เครื่องระเหยสุญญากาศ ประกอบด้วย 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 และเครื่องทำน้ำเย็นหมุนเวียน 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 แล้วค่อยๆเติมกรดกำมะถันเข้มข้น 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) <u>การเตรียมสารละลายตัวอย่าง</u> ชั่งตัวอย่าง 1 ก เติมเมทานอลจำนวน 20.0 มล นำไปสกัดด้วยวิธีรีฟลักซ์บนอ่างอังไอน้ำ นาน 30 นาที กรองขณะร้อน นำสารละลายที่กรองได้ไประเหยจนแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอลจนได้ 10.0 มล

(2) <u>การเตรียมสารละลายมาตรฐาน</u> ละลายสารมาตรฐาน ursolic acid (Chromadex®) จำนวน 2 มก ในเมทานอล 1 มล

(3) <u>น้ำยาแยก</u> เตรียมน้ำยาแยกโดยผสม dicloromethane, ethyl acetate และน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 70 : 30 : 1 ให้เข้ากันดี นำมาใส่ในถังทำโครมาโตกราฟีทิ้งไว้อย่างน้อย 1 ชั่วโมงก่อนใช้ เพื่อให้บรรยากาศในถังอิ่มตัวด้วยน้ำยาแยก

(4) <u>วิธีการ</u> ใช้หลอดรูเล็ก (capillary tube) บรรจุสารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานแต่ละชนิดๆ ละ 2 มคล มาแต้มบนแผ่นเคลือบซิลิกาเจลในแนวระดับเดียวกัน โดยให้ห่างจากขอบล่างประมาณ 2 ซม และให้มีระยะห่างระหว่างสารละลายแต่ละชนิดไม่น้อยกว่า 1 ซม ผึ่งให้แห้ง นำไปตั้งในถังทำโครมาโตกราฟีที่เตรียมไว้ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้น้ำยาแยกซึมขึ้นไปตามผิวที่ฉาบสูง 12 ซม นำแผ่นเคลือบซิลิกาเจลออกจากถัง ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำไปตรวจสอบ

(5) <u>การตรวจสอบ</u> 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) เมื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีโครมาโตกราฟีผิวบาง แล้วตรวจสอบด้วยสารละลายเจือจางกรดกำมะถัน (20 % โดยปริมาตร) และนำไปทำให้ร้อนด้วยเตาไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที สังเกตด้วยแสงธรรมชาติ พบว่ามีสารประกอบเทอร์ปินอยด์ประมาณ 11 - 14 ชนิด โดยพบ ursolic acid ในทุกตัวอย่าง (ตารางที่ 2 และรูปที่ 3)

ตารางที่ 1 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยปฏิกิริยาการเกิดสี

วิธีทดสอบ	ผลการทดสอบ
Liebermann-Burchard Test (ตรวจสอบสารประเภทเทอร์ปินอยด์)	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 องศาเซลเซียสและสังเกตผลด้วยแสงธรรมชาติ (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

หมายเหตุ * ursolic acid

รูปที่ 3 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีโครมาโตกราฟีผิวบางของสารสกัดด้วยเมทานอลจากผงส่วนเหนือดินแห้ง แมงลักคาเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน เมื่อใช้สารละลายผสมของ

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

1 = สารสกัดด้วยเมทานอลจากผงส่วนเหนือดินแห้งแมงลักคา

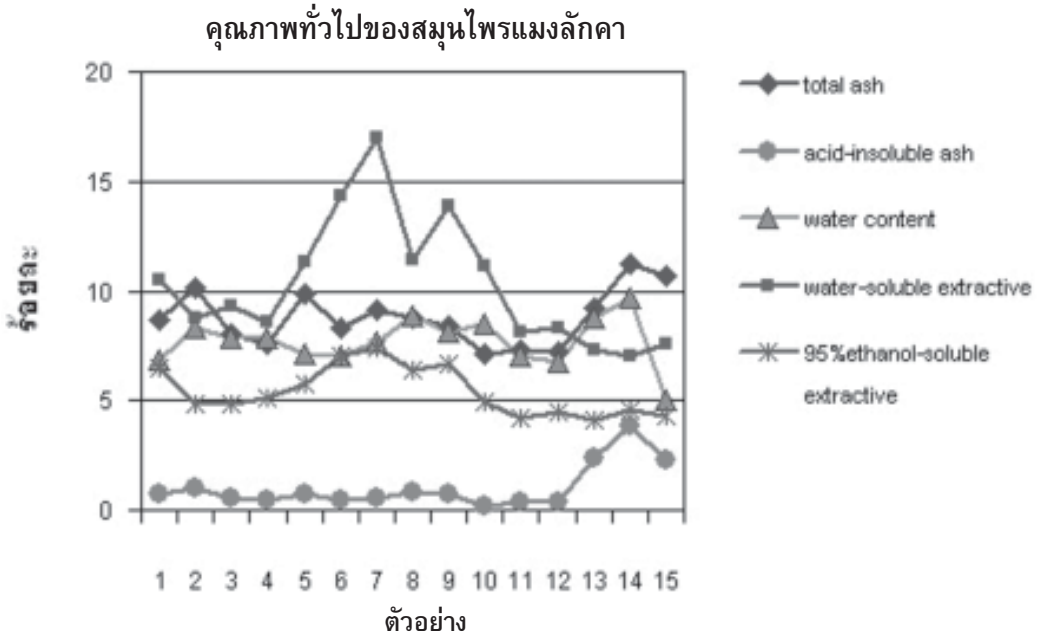
2 = ursolic acid

◌ = จุดสีที่พบในบางตัวอย่าง

การตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติทั่วไปทางกายภาพและเคมีของผงส่วนเหนือดินแห้งแมงลักคา โดยการหาปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ ปริมาณสารสกัดด้วย 95%เอทานอล เถ้ารวม เถ้าที่ไม่ละลายในกรด และปริมาณความชื้น แสดงในรูปที่ 4 ผลค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและเกณฑ์ที่ใช้ในการกำหนด ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการประเมินคุณภาพทางเคมีและกายภาพของผงแมงลักคา

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



รูปที่ 4 ผลการวิเคราะห์คุณภาพทั่วไปของสมุนไพรแมงลักคา

วิจารณ์

จากการตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีของตัวอย่างส่วนเหนือดินแห้งของแมงลักคาซึ่งเก็บจากแหล่งธรรมชาติต่างๆ ในพื้นที่ภาคกลางของประเทศไทย รวม 15 ตัวอย่าง พบว่า ทุกตัวอย่างให้ผลการตรวจสอบเป็นบวกเมื่อทดสอบด้วยปฏิกิริยาการเกิดสี คือ ตรวจพบสารประเภทเทอร์ปีนส์โดยใช้ Liebermann-Burchard Test ตรวจพบสารประเภทน้ำตาลที่สูญเสียอิเล็กตรอนได้ง่ายโดยใช้ Fehling Test และตรวจพบสารประเภทฟีนอลโดยใช้ Iron (III) Chloride Test Solution (ตารางที่ 1) การทดสอบยืนยันผลเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีโครมาโตกราฟีผิวบาง โดยพ่นด้วยสารละลายเจือจางกรดกำมะถัน (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 การหาปริมาณความชื้นโดยการอบด้วยตู้อบร้อนไฟฟ้าเพื่อหาค่าน้ำหนักที่สูญเสียไปที่อุณหภูมิที่กำหนดซึ่งเหมาะสมกับสมุนไพรที่ไม่มีสารที่ระเหยได้(volatile substances) หรือการหาปริมาณน้ำโดยการกลั่นด้วยโทลูอีน (Azeotropic Distillation Method) ซึ่งจะเหมาะสมกับสมุนไพรที่มีสารที่ระเหยได้ สำหรับผงสมุนไพรแมงลักคามีสารประเภทระเหยได้ เช่น น้ำมันหอมระเหย จึงเลือกใช้การทดสอบหาปริมาณความชื้นด้วยวิธีการกลั่นด้วยโทลูอีน สำหรับเถ้ารวมและเถ้าที่ไม่ละลายในกรดเป็นค่าที่บอกถึงการปนเปื้อนทางกายภาพของสมุนไพร หากมีค่าดังกล่าวสูง จะบอกถึงการปนเปื้อนจากส่วนพืชที่ไม่ต้องการ หรือหินหรือทรายที่เกิดจากการล้างไม่สะอาด ซึ่งจะมีผลให้คุณภาพทางเคมีของผงสมุนไพรต่ำลง ซึ่งเมื่อนำไปเตรียมเป็นสารสกัดหรือผลิตภัณฑ์ จะทำให้ได้ปริมาณสาระสำคัญต่ำลงได้ นอกจากนี้ค่าสารสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ เป็นดัชนีหนึ่งที่จะบ่งชี้คุณภาพของสารสำคัญในผงสมุนไพร โดยเฉพาะเมื่อผงสมุนไพรนั้นยังไม่มีวิธีวิเคราะห์หาสาระสำคัญที่ออกฤทธิ์อย่างเหมาะสม [54] ในการศึกษานี้ เลือกใช้น้ำและ 95% เอทานอลเป็นตัวทำละลายในการหาปริมาณสารสกัด

ผลการศึกษาวิจัยนี้ ทำให้สามารถทราบข้อกำหนดทางเคมีเพื่อควบคุมคุณภาพของผงสมุนไพรส่วนเหนือดินแห้งแมงลักคา กระบวนการผลิตสมุนไพรและผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่ดีนั้นต้องมีการควบคุมคุณภาพอย่างรอบคอบตั้งแต่กระบวนการคัดเลือกใช้วัตถุดิบที่มีคุณภาพไปพัฒนาต่อเป็นสารสกัดหรือผลิตภัณฑ์ จะทำให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพสม่ำเสมอ อันจะเป็นประโยชน์ต่อการวิจัยและพัฒนาสมุนไพรอย่างยั่งยืนและได้รับการยอมรับจากผู้บริโภค

สรุปผลการทดลอง

ผลการศึกษาด้วยปฏิกิริยาการเกิดสี พบว่า ผงส่วนเหนือดินแห้งของสมุนไพรแมงลักคาประกอบด้วยสารเคมีประเภทเทอร์ปินอยส์ น้ำตาลที่สูญเสียอิเล็กตรอนได้ง่าย และฟีนอล จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีโครมาโตกราฟีผิวบาง พบว่า ทุกตัวอย่างมี ursolic acid ซึ่งเป็นสารเคมีประเภทไตรเทอร์ปินอยส์ สำหรับการควบคุมคุณภาพทางเคมีและกายภาพของผงสมุนไพรชนิดนี้ได้กำหนดเกณฑ์สูงสุดที่ยอมให้มีได้ โดยกำหนดจากค่าเฉลี่ยบวกด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) สำหรับปริมาณที่ระบุว่า “ไม่เกิน” และเกณฑ์ต่ำสุดที่ยอมให้มีได้ โดยกำหนดจากค่าเฉลี่ยลบด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) สำหรับปริมาณที่ระบุว่า “ไม่น้อยกว่า” ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 สรุปข้อกำหนดทางเคมีของผงสมุนไพรแมงลักคา (ส่วนเหนือดินแห้ง)

รายการ	ไม่เกิน	ไม่น้อยกว่า
ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ (% โดยน้ำหนัก)	-	7
ปริมาณสารสกัดด้วย 95% เอทานอล (% โดยน้ำหนัก)	-	4
ปริมาณน้ำ (% โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก)	9	-
เถ้ารวม	10	
เถ้าที่ไม่ละลายในกรด	2	

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, Stark D, Hägerstrand H, Sittie AA, Olsen CE, Staals∅, 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)