คุณภาพทางเคมีของสารสกัดเถาวัลย์เปรียง

Chemical Quality of *Derris scandens* (Roxb.) Benth. Extract

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

บทคัดย่อ

สารสกัดจากลำต้นเถาวัลย์เปรียง *Derris scandens* (Roxb.) Benth. เป็นสารสกัดสมุนไพรไทยชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพในการเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพจากสมุนไพร เนื่องจากมีรายงานถึงประโยชน์ทางเภสัชวิทยาอย่างหลากหลาย เช่น ฤทธิ์ลดความดันโลหิตสูง ฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน ฤทธิ์ต้านเชื้อรา ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาด้านคุณภาพของสารสกัดนี้มาก่อน จึงได้ทำการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของสารสกัดเอธานอลจาก เถาวัลย์เปรียงที่เก็บจากแหล่งธรรมชาติต่างๆ ในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง จำนวน 9 ตัวอย่าง โดยการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ ปริมาณสารสกัดด้วย 50 % เอธานอล ปริมาณความชื้น และดัชนีการเกิดฟอง รวมทั้งได้พิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีรงคเลขผิวบาง และวิธีโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง ผลการศึกษานี้ ทำให้ทราบถึงเกณฑ์เบื้องต้นในการควบคุมคุณภาพทางเคมีของสารสกัดสมุนไพรชนิดนี้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์สุขภาพจากสมุนไพรเถาวัลย์เปรียง

ABSTRACT

Thao-wan-priang stems extract, *Derris scandens* (Roxb.) Benth., is a potential Thai herbal extract to use for herbal health products. It has been reported for several pharmacological uses such as hypotensive, immunomodulating, antifungal, anti-inflammmatory, and antioxidant activities. Since the chemical quality of this extract has not been reported yet. Therefore, a study was carried out using 10 samples of ethanolic extract of crude drug obtained from the Northern and Northeastern parts of Thailand. The values of water extractive, 50 % ethanol extractive, moisture content and foaming index were given. Chemical identification of this extract both by Thin-layer chromatography and High-performance liquid chromatography was also included. The results of this study is beneficial for setting the preliminary criteria of chemical quality control of Thao-wan-priang extract which

[1] สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

[2] สถาบันการแพทย์ไทย-จีน เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข

will be useful for quality control of its health products.

KEY WORDS : Thao-wan-priang ethanolic extract, *Derris scandens* (Roxb.) Benth., 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 ใบย่อยรูปวงรี ดอกช่อห้อยลง ขนาดของดอกย่อยเล็กกว่าดอกโสน ดอกสีชมพูอ่อนหรือสีขาว มีกลิ่นหอมอ่อนๆ ผลเป็นฝักแบนเล็ก มีเมล็ด 2-4 เมล็ด[2] ในสรรพคุณยาไทยระบุว่าใช้เถาเป็นยาแก้กระษัย แก้เส้นเอ็นขอด ขับปัสสาวะ บางแหล่งนิยมนำเถาหั่นตากแห้งคั่วไฟ ชงน้ำดื่มแทนน้ำชา ใช้แก้ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ ถ้าใช้เถาดองเหล้าจะเป็นยาขับระดู ส่วนรากใช้เบื่อปลา (แต่ไม่มีคุณสมบัติฆ่าแมลง)[2-4] นอกจากนี้ ในการศึกษาทางเภสัชวิทยา มีรายงานว่า สารสกัดน้ำและสารเคมีที่มีสูตรโครงสร้างเป็นอนุพันธ์ของ rhamnosyl 1 $\rightarrow$ 6 glucosylisoflavone จากลำต้นเถาวัลย์ เปรียงมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ[5] ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ [5] และฤทธิ์ลดความดันโลหิต[6] นอกจากนี้พบว่าสารสกัดด้วย 50% เอทานอลมีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน [7] และสารประกอบเคมีกลุ่ม dipenylisoflavone ที่แยกได้จากสารสกัดเอธานอล มีฤทธิ์เป็นยาต้านเชื้อรา Trichophyton *mentagrophytes* ด้วย [8] เช่น 5, 7,4′-trihydroxy-6,3′-diprenylisoflavone ในขณะที่สารสกัดจากรากเถาวัลย์เปรียง พบว่าสารเคมีกลุ่ม diprenylated isoflavone 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) ดังกล่าวจะเป็นสารออกฤทธิ์ ดังนั้น จึงอาจเป็นเหตุผลที่รากเถาวัลย์เปรียงมีฤทธิ์ในการเบื่อปลาหรือฆ่าแมลงก็ได้ [9]

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], eturunagarone[11], erysenegalensein E[10], lupinisol A[10], derriscandenosides A-F[10], derrisisoflavone A-F[10-11], derriscanosides A-B[12], lupalbigenin[10], lupiniisoflavone G[10], 7,8-dihydroxy-4'-methoxyisoflavone[10], 8- γ, γ-dimethylallylwighteone[13], 3,3'-γ, γ-dimethylallylwighteone[13], formononetin-7-O-β-glucopyranoside[10], 8-hydroxy-4',7-dimethoxyisoflavone-8- O-β-glucopyranoside[14], 7-hydroxy-4',8-dimethoxyisoflavone-7- O-β-glucopyranoside[14], diadzein-7- O- [α-rhamnopyranosyl-(1$\rightarrow$6)]-β-glucopyranoside[14], formononetin-7-O- [α-rhamnopyranosyl-(1$\rightarrow$6)]-β-glucopyranoside[14], genistein-7- O- [α-

rhamnopyranosyl-(1→6)]-β-glucopyranoside[14], 4,4'-di-O-methyl scandenin[15] นอกจากนี้ ยังพบ 3-aryl-4-hydroxycoumarins[15] เช่น 4,4'-di-O-methylscandenin รวมทั้งสารที่เกิดจากการ สลายตัวของ coumarin เช่น 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid, 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoic acid[15] เป็นต้น มีรายงานว่า ส่วนเหนือดินของเถาวัลย์เปรียง พบสารประเภท steroids เช่น lupeol, taraxerol และ β-sitosterol[17] เป็นต้น ส่วนรากของเถาวัลย์เปรียง พบสารกลุ่ม isoflavone ได้แก่ warangalone (หรือ scandenone)[18], scandinone[19], chandalone[18], osajin[19], nallanin[18] และ chandanin[18] และพบสารกลุ่ม coumarin[20] ได้แก่ lonchocarpenin, lonchocarpic acid, scandenin, robustic acid

การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลัน โดยการฉีดสารสกัด 50 % เอธานอลจากส่วนเหนือดิน เถาวัลย์เปรียง เข้าทางช่องท้องหนูถีบจักร พบว่า ขนาดที่เป็นพิษทำให้หนูตาย 50 % คือ 1 ก./กก. แต่เมื่อให้โดยการป้อนทางปาก หรือฉีดใต้ผิวหนังในขนาด 10 ก./กก. กลับไม่พบความเป็นพิษใดๆ ต่อสัตว์ทดลอง[5] สำหรับการศึกษาพิษเรื้อรัง (6 เดือน) นั้น ไม่พบความผิดปกติใดๆที่เกิดจากความเป็นพิษของสารสกัดด้วย 50 % เอธานอลในหนูขาว แม้จะให้สารสกัดโดยการป้อน ทางปากในขนาด 6, 60, 600 มก./กก./วัน หรือเทียบเท่าผงเถาวัลย์เปรียงแห้ง 0.03, 0.3, 3 ก./กก./วัน หรือ 1, 10,100 เท่าของ ขนาดที่ใช้ในคนต่อวัน[21] จากข้อมูลต่างๆ ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว จะเห็นได้ว่า สารสกัดด้วย 50 % เอธานอลของลำต้นสมุนไพร ชนิดนี้มีประสิทธิภาพในการใช้เป็นยาหรือผลิตภัณฑ์สุขภาพ และมีความปลอดภัยสูง ดังนั้น ในการวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์ที่จะ ศึกษาคุณภาพทางเคมีของสารสกัดดังกล่าวจากลำต้นเถาวัลย์เปรียง เพื่อควบคุมและกำหนด คุณภาพทางเคมีของสารสกัด ซึ่งจะนำไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์สมุนไพรให้มีประสิทธิภาพ

รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของสารสำคัญบางชนิดที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่พบในเถาวัลย์เปรียง

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 โดยห้องปฏิบัติการ พฤกษศาสตร์ สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พบว่า คือ *Derris scandens* (Roxb.) Benth. ในการเตรียมสมุนไพรเถาวัลย์เปรียงเพื่อการศึกษาในครั้งนี้ ได้นำตัวอย่างลำต้นแห้งไปล้างด้วยน้ำให้สะอาด ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ นำไปอบให้แห้งในเตาอบร้อนไฟฟ้าที่มีพัดลมระบายอากาศ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำตัวอย่างที่แห้งแล้วไปบดเป็นผงละเอียด ผ่านแร่งเบอร์ 80 จากนั้นนำไปสกัดด้วยการรีฟลักซ์ด้วย 50 % เอธานอล เพื่อเตรียมเป็นสารสกัดที่มีความเข้มข้นประมาณ 10 เท่าของปริมาณวัตถุดิบ นำไปทำให้แห้งด้วยการระเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ และเครื่องทำให้แห้งด้วยความเย็น เก็บสารสกัดในขวดแก้วสีชามีฝาปิดสนิท ปิดฉลากระบุชื่อสมุนไพร แหล่งที่มา วันที่เก็บ และวันที่เตรียมตัวอย่าง เก็บขวดบรรจุสมุนไพรไว้ในตู้เย็น ที่อุณหภูมิไม่เกิน 4 องศาเซลเซียส

เครื่องมือ

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

สารเคมี

1. 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[14] (NP-PEG reagent ย่อมาจาก Natural Products-Polyethylene Glycol reagent) มีวิธีเตรียมดังต่อไปนี้
   3.1 สารละลายเอ็นพี เตรียมโดยละลาย diphenylboric acid-2-aminoethyl ester จำนวน 1 กรัม ในเมธานอลจำนวน 100 มิลลิลิตร
   3.2 สารละลายพีอีจี เตรียมโดยละลาย polyethylene glycol 4000 จำนวน 5 กรัมในเอธานอล 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 โดยเตรียมทันที่ก่อนใช้

วิธีการ

1. **การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยปฏิกริยาการเกิดสี[19-20]**
   (1) ชั่งตัวอย่าง 0.5 กรัม บรรจุในหลอดทดลองที่มีฝาเกลียวปิด เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เขย่าแรงๆ นานประมาณ 30 วินาที สังเกตฟองที่เกิดขึ้น (ตารางที่ 1)
   (2) ชั่งตัวอย่าง 0.5 กรัม บรรจุในขวดแก้วก้นกลม เติมเมธานอล 10 มิลลิลิตร นำไปต้มบนอ่างอังไอน้ำเป็นเวลา 5 นาที กรอง นำสารละลายที่กรองได้ไประเหยให้แห้ง ด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ สารที่ได้จากการระเหย นำไปละลายด้วยอะซีติคแอนไฮไดรด์ จำนวน 2 มิลลิลิตร แล้วค่อยๆ เติมกรดกำมะถันเข้มข้น 1 มิลลิลิตร สังเกตผลที่เกิดขึ้น (ตารางที่ 1)
   (3) 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)

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

2. การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีรงคเลขผิวบาง

(1) การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

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

(2) การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ละลายสารมาตรฐาน genistein-7-O- [rhamnopyranosyl-(1→6)]-glucopyranoside จำนวน 1 มิลลิกรัม ใน 50% เอธานอล 1 มิลลิลิตร

(3) น้ำยาแยก

เตรียมน้ำยาแยกโดยผสมเมธานอล และน้ำ ในอัตราส่วน 40 : 60 ให้เข้ากันดี นำมาใส่ในถังทำโครมาโทกราฟีทิ้งไว้อย่างน้อย 1 ชั่วโมงก่อนใช้ เพื่อให้บรรยากาศในถังอิ่มตัวด้วยน้ำยาแยก

(4) วิธีการ

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

(5) การตรวจสอบ

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

3. การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีโครมาโทกราฟสมรรถนะสูง

(1) การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

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

(2) การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ละลายสารมาตรฐาน genistein-7-O- [rhamnopyranosyl-(1→6)]-glucopyranoside จำนวน 4 มิลลิกรัม

ใน 50 % เอธานอล 1 มิลลิลิตร

(3) น้ำยาแยก

ใช้น้ำ อะซีโตไนไตรล์และ1% กรดอะซีติกผสมกันแบบ 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[19] โดยใช้ตัวอย่างจำนวน 1 กรัม (ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน) ในการทดสอบหาค่าน้ำหนักที่สูญเสียไปเมื่ออบให้แห้ง (ตารางที่ 3)

5. **ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำและสารสกัดด้วย 50 % เอธานอล**

ทำตามวิธีที่กำหนดไว้ในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย[19] โดยใช้ตัวอย่างจำนวน 1 กรัม (ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน) ในการทดสอบ (ตารางที่ 3)

7. **ดัชนีการเกิดฟอง**

ทำตามวิธีที่กำหนดไว้ในวิธีการควบคุมคุณภาพของสมุนไพรตามองค์การอนามัยโลก[19] (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 ทุกหลอดให้ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 10 มิลลิลิตรทุกหลอด เขย่าขึ้นลงให้ได้อัตรา 30 ครั้งต่อ15 วินาที แล้วตั้งทิ้งไว้ 15 นาที เมื่อครบเวลาให้วัดส่วนสูงของฟอง และคำนวณดัชนีการเกิดฟองโดยใช้สูตรดังนี้ "ดัชนีการเกิดฟอง = 1000/ปริมาตรของสารสกัดน้ำที่ใช้ในการทดสอบที่ทำให้เกิดฟองสูงกว่า 1 เซนติเมตร"

ผลการวิจัย

จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยปฏิกิริยาการเกิดสีของเถาวัลย์เปรียง จำนวน 9 ตัวอย่าง พบว่าทุกตัวอย่างให้ผลบวกกับ Froth Test, Liebermann-Burchard Test, Fehling Test และ Cyanidin Reaction (ดังแสดงในตารางที่ 1) เมื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีรงคเลขผิวบางโดยใช้สารละลายเอ็นพี-พีอีจี แล้วนำไปส่องด้วยแสงอัลตรา

ไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร พบว่า ทุกตัวอย่างให้ผลบวกกับการทดสอบสารประกอบฟลาโวนอยด์ โดยพบสารสำคัญ genistein-7-O- [rhamnopyranosyl-(1→6)]-glucopyranoside ในทุกตัวอย่าง (ดังแสดงในตารางที่ 2 และรูปที่ 2) นอกจากนี้ การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง พบว่า สารสกัดเถาวัลย์เปรียงด้วย 50 % เอธานอล มีองค์ประกอบทางเคมีตั้งแต่ 5-6 ชนิด และในทุกตัวอย่างตรวจพบสารสำคัญ genistein-7-O- [rhamnopyranosyl-(1→6)]-glucopyranoside (ดังแสดงในรูปที่ 3)

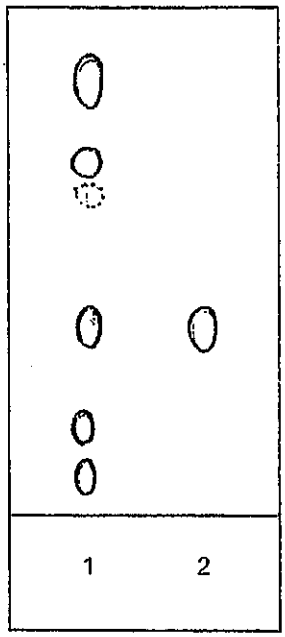
<u>ตารางที่ 1</u> ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยปฏิกิริยาการเกิดสี

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

<u>ตารางที่ 2</u> ค่า hR_f และผลการตรวจสอบสารประเภทฟลาโวนอยด์ในสารสกัดด้วยเมธานอลจากเถาวัลย์เปรียง

จุดสี	ค่า hR_f	การตรวจสอบ
		เรืองแสงภายใต้ UV 366 กับสารละลาย เอ็นพี-พีอีจี
1	7-8	ฟ้าอ่อน
2*	16-18	เขียวอ่อน
3	37-41	เขียวอ่อน
4	65-67	เขียวอ่อน
5	70-71	เขียวอ่อน
6	80-82	ฟ้าอ่อน

<u>หมายเหตุ</u> * genistein-7-O- [α-rhamnopyranosyl-(1→6)]-β-glucopyranoside

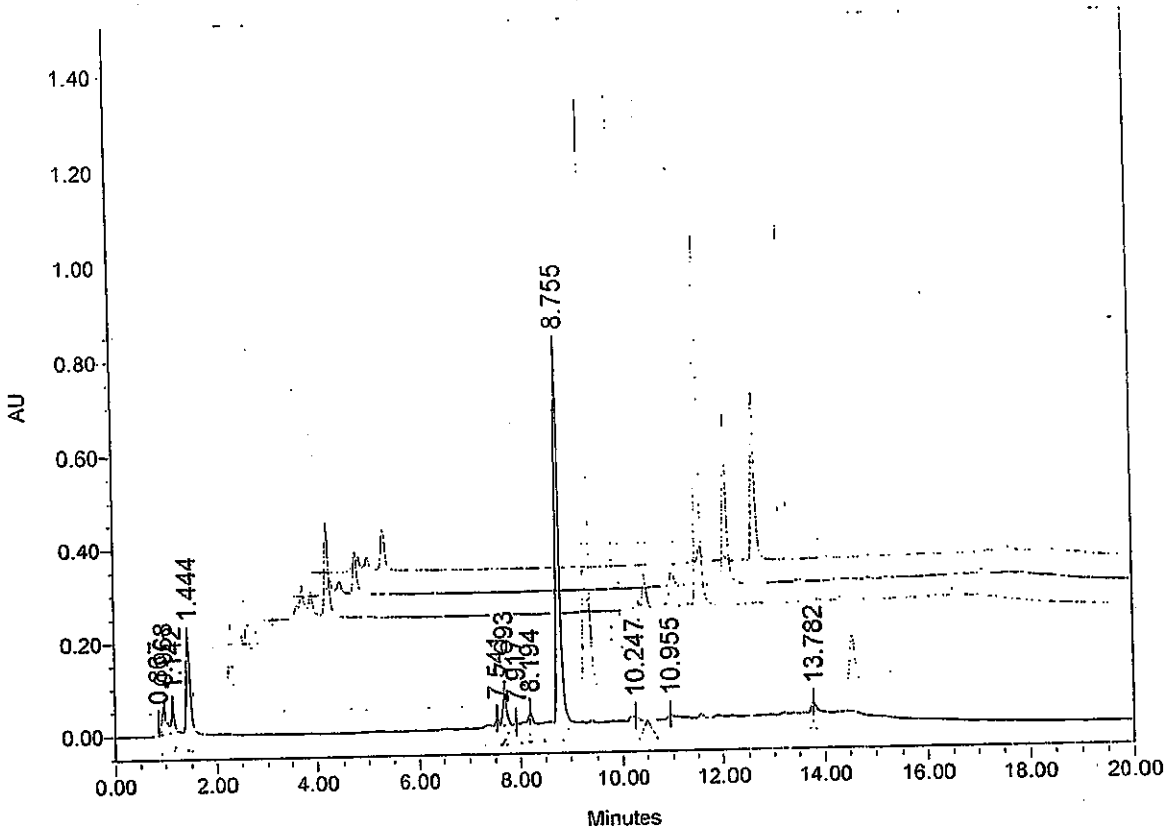


<u>รูปที่ 2</u> ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีรงคเลขผิวบางของสารสกัดด้วย50 % เอธานอลจากเถาวัลย์เปรียง เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน เมื่อใช้สารละลายผสมของเมธานอล : น้ำ ในอัตราส่วน 40 : 60 เป็นน้ำยาแยก ตรวจสอบโดยใช้ สารละลาย เอ็นพี-พีอีจี

1 = สารสกัดด้วย 50% เอธานอลจากเถาวัลย์เปรียง

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

◌ = จุดสีที่พบในบางตัวอย่าง



<u>รูปที่ 3</u> ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูงของสารสกัดด้วย 50 % เอธานอลจากเถาวัลย์เปรียงเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน โดยใช้ น้ำ : อะซีโตไนไตรล์ : กรดอะซีติก ในอัตราส่วน 92 : 0 : 8 (t=0), 65 :0 : 35 (t=10), 0 : 85 : 15 (t=20) เป็นน้ำยาแยก และใช้คอลัมน์ Novopak ® C18 (ขนาด 3.9 x 150 ซม. 60 Å 4 μm)

การทดสอบคุณสมบัติทั่วไปทางกายภาพและทางเคมีของเถาวัลย์เปรียง ทำโดยการวิเคราะห์หาปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ ปริมาณสารสกัดด้วย 50 % เอธานอล ปริมาณความชื้น ดัชนีการเกิดฟอง และค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลาย 1.0 % ในสรรพพบว่า มีค่าเฉลี่ย ดังนี้ 74.55 ± 13.40, 38.37 ± 3.09, 4.68 ± 0.61, 500 ± 0 และ 6.21 ± 0.08 ตามลำดับ ซึ่งค่าเฉลี่ยดังกล่าวและเกณฑ์ที่ใช้ในการกำหนดได้แสดง ไว้ในตารางที่ 3

<u>ตารางที่ 3</u> ผลการประเมินคุณภาพทางเคมีและกายภาพของเถาวัลย์เปรียง

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

วิจารณ์

จากการตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีของตัวอย่างสารสกัดลำต้นแห้งของเถาวัลย์เปรียง ซึ่งเก็บจากแหล่งธรรมชาติต่างๆ ในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลางของประเทศไทย จำนวน 9 ตัวอย่าง พบว่า ทุกตัวอย่างให้ผลเหมือนกันในการทดสอบด้วยปฏิกริยาการเกิดสี ดังนี้ ตรวจพบสารประเภทซาโปนินโดยใช้ Forth Test ตรวจพบสารประเภทเทอร์ปีนส์โดยใช้ Liebermann-Burchard Test ตรวจพบสารประเภทน้ำตาล ที่สูญเสียอิเล็กตรอนได้ง่ายโดยใช้ Fehling Test และตรวจพบสารประเภทฟลาโวนอยด์โดยใช้ Cyanidin Test การทดสอบยืนยันผลเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีรงคเลขผิวบางโดยพ่นด้วยสารละลายเอ็นพี (Natural Products)-พีอีจี (Polyethylene Glycol) แล้วนำไปส่องดูการเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร สามารถตรวจพบสารประเภทฟลาโวนอยด์จำนวน 6-7 ชนิด ซึ่งการทดสอบตรวจพบ genistein-7-O- [rhamnopyranosyl-(1→6)]-glucopyranoside ในสารสกัดด้วยเอธานอลของเถาวัลย์เปรียงทุกตัวอย่าง สำหรับการทดสอบสารสกัดเถาวัลย์เปรียง โดยวิธีโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง (HPLC) พบว่า มี genistein-7-O-[rhamnopyranosyl-(1→6)]-glucopyranoside เป็นองค์ประกอบโดยมีค่า Retention time (T_R) ที่ 8.7 นาที ดังแสดงในรูปที่ 3

การประเมินคุณภาพของสมุนไพรตามมาตรฐานสากลนั้น นอกจากการตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีแล้ว ยังต้องตรวจคุณภาพทางกายภาพและทางเคมีด้วย โดยการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ ปริมาณสารสกัดด้วย 50 % เอธานอล ปริมาณความชื้น และดัชนีการเกิดฟอง[19,21] ในการกำหนดปริมาณความชื้น มีความสำคัญต่ออายุของสารสกัดสมุนไพร หากสารสกัดสมุนไพรมีความชื้นสูง จะทำให้เกิดการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ได้ง่าย และอาจทำให้เสื่อมคุณภาพได้เร็ว รวมทั้งเมื่อนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ก็จะทำให้มีคุณภาพต่ำไปด้วย นอกจากนี้ ค่าสารสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ที่เหมาะสม เป็นอีกดัชนีหนึ่งที่จะบ่งชี้คุณภาพของสารสำคัญในสารสกัดสมุนไพร หากสารสกัดสมุนไพรนั้นยังไม่ทราบสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ หรือยังไม่มีวิธีวิเคราะห์สารสำคัญที่เหมาะสม[20] ดังนั้น การศึกษาวิจัยนี้ จึงวิเคราะห์หาปริมาณสารสกัดด้วยน้ำและปริมาณสารสกัดด้วย 50 % เอธานอล ส่วนค่าดัชนีการเกิดฟองแสดงถึงปริมาณสารประเภทซาโปนินในสมุนไพร เนื่องจากสารประกอบซาโปนินมีคุณสมบัติเฉพาะตัว คือเกิดฟองที่คงทนเมื่อเขย่ากับน้ำ ถึงแม้ว่า ค่าดัชนีการเกิดฟองควรไม่น้อยกว่า 450 จากการกำหนดเกณฑ์ค่าล่าง แต่เนื่องจากวิธีการหาค่าดังกล่าวจากสมการที่กำหนดให้ จะเห็นว่า ค่าที่ได้จากการทดสอบ

ที่น้อยกว่า 500 ควรมีค่าเท่ากับ 333 สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่างของสารสกัดมีความสำคัญในการเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์ เนื่องจากหากมีความเป็นกรด-ด่างที่สูงเกินไปจะมีผลต่อคุณภาพและอายุความคงตัวของผลิตภัณฑ์ ดังนั้น พบว่า ค่าที่เหมาะสมสำหรับสารสกัดเถาวัลย์เปรียง ควรมี pH ระหว่าง 4.5 ถึง 5.5

ผลการศึกษาวิจัยนี้ ทำให้สามารถทราบถึงคุณภาพทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดสมุนไพรชนิดนี้ ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพที่มีคุณภาพที่ดี ส่วนการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ในสารสกัดนั้น คณะผู้วิจัยจะดำเนินการต่อไปในอนาคต

สรุปผลการทดลอง

ผลการศึกษา แสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากลำต้นแห้งของเถาวัลย์เปรียงประกอบด้วยสารประเภทซาโปนิน น้ำตาลกลุ่มที่สูญเสียอิเล็กตรอนได้ง่าย เทอร์ปีนส์ และฟลาโวนอยด์ จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีรงคเลขผิวบางและวิธีโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง พบว่า สารสกัดทุกตัวอย่างมี genistein-7-O- [rhamnopyranosyl-(1→6)]-glucopyranoside ซึ่งเป็นสารประเภทไอโซฟลาโวนกลัยโคไซด์ที่ตรวจพบในวัตถุดิบด้วย [23] ดังนั้น เพื่อประโยชน์ในการควบคุมคุณภาพทางเคมีและกายภาพของสมุนไพรชนิดนี้ จึงได้กำหนดเกณฑ์สูงสุด โดยกำหนดค่าบนจากค่าเฉลี่ยบวกด้วย 10 % สำหรับปริมาณที่ระบุว่า "ไม่เกิน" และเกณฑ์ต่ำสุดโดยกำหนด ค่าล่างจากค่าเฉลี่ยลบด้วย 10 % (ยกเว้นค่าดัชนีการเกิดฟอง) สำหรับปริมาณที่ระบุว่า "ไม่น้อยกว่า" ดังแสดงในตารางที่ 4

<u>ตารางที่ 4</u> สรุปผลข้อกำหนดคุณภาพของสารสกัดเถาวัลย์เปรียง

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

<u>กิตติกรรมประกาศ</u>

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ดร. บุษราวรรณ ศรีวรรธนะ ห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันแบบอาศัยเซลล์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ทดสอบฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อุทัย โสธนะพันธุ์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่ให้ความอนุเคราะห์ พิสูจน์โครงสร้างของสารมาตรฐาน 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. นันทวัน บุณยะประภัศร และ อรนุช โชคชัยเจริญพร. สมุนไพรไม้พื้นบ้าน (2). กรุงเทพมหานคร : บริษัท ประชาชน จำกัด, 2541 : 290-291.
6. Laupattarakasem P, Houghton PJ, Hoult JR. Anti-inflammatory isoflavonoid glycosides from Derris scandens. Planta Med. 2004; 70 (6) , 496-501.
7. Laupattarakasem P, Houghton PJ, Hoult JR, Itharat A. An evaluation of the activity related to the inflammation of four plants used in Thailand to treat arthritis. J Ethnopharmacol. 2003 ; 85 (2-3) : 207-215.
8. Jansakul C, Srichanbarn A, and Saelee A. Some pharmacological studies of a hypotensive fraction from *Derris scandens*. J. Sci. Soc. Thailand. 1997 ; 23 : 323-334.
9. 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.
10. 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.
11. Rukachaisirikul V, Sukpondma Y, Jansakul C, Taylor WC. Isoflavone glycosides from *Derris scandens*. Phytochem. 2002 ; 60(8) : 827-834.
12. Sekine T, Inagaki M, Ikegami F, Fuji Y, Ruangrungsi N. Six deprenylisoflavones, derrisisoflavones A-F, from *Derris scandens*. Phytochem. 1999 ; 52 (1) : 87-94.
13. Dianpeng L. Mingan O, Jansakul C, Chongren Y. Two isoflavonoids from the stems of Derris scandens. Yaoxue Xuebao. 1999; 34 : 43-45.
14. Rao MN, Krupadanam GLD, Srimannarayana G. Four isoflavones and two 3-aryl coumarins from stems of *Derris scandens*. Phytochem 1994 ; 37 (1) : 267-269.
15. Johnson AP, Pelter A, Slainton P. Extractive from *Derris scandens* II. The structures of scandenin and Lonchocarpic acid. J. Chem. Soc. C. 1966 ; 2 : 192-203.

16. 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.

17. 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.

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

19. 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.

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

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

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

23. ประไพ วงศ์สินคงมั่น, ธิดารัตน์ บุญรอด, เย็นจิตร เตชะดำรงสิน, จารีย์ บันสิทธิ์, ปราณี ชวลิตธำรง. ข้อกำหนดทางเคมีและกายภาพของเถาวัลย์เปรียง. วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก. 2547; 2(3).