

มาตรฐานวัตถุดิบสมุนไพรสำหรับโรงงานผลิตยาสมุนไพร

Standard of Herbal Raw Materials in Manufacturing

ธีระวัฒน์ บุญโสม¹ และปิรอนรัตน์ เดชบำรุง²

Teerawat Boonsom¹ and Piroonrat Dechbumroong²

^{1,2} คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอีสเทิร์นเอเซีย

^{1,2} Faculty of Pharmacy, Eastern Asia University

ตอนที่ 1 เทคนิคใหม่ทางชีววิทยาโมเลกุล ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของวัตถุดิบสมุนไพร

New biomolecular methods for authentication of herbal raw materials

บทคัดย่อ

สถานการณ์ปัจจุบัน ประชากรโลกหันมาให้ความสนใจผลิตภัณฑ์ที่ใช้วัตถุดิบจากธรรมชาติเพิ่มขึ้น ส่งผลให้มีความต้องการใช้วัตถุดิบจากธรรมชาติเพิ่มสูงขึ้นด้วย โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันและรักษาโรค ในขณะที่มาตรฐานของวัตถุดิบสมุนไพรหรือผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรยังไม่มีข้อกำหนดที่ชัดเจน โดยเฉพาะด้านการระบุเอกลักษณ์ของวัตถุดิบสมุนไพรด้วยวิธีดั้งเดิมยังคงมีข้อด้อยอยู่ จึงทำให้ในปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีการพิสูจน์เอกลักษณ์ของวัตถุดิบสมุนไพรในระดับโมเลกุลด้วยเทคนิคใหม่ๆ ขึ้น เช่น ดีเอ็นเอบาร์โค้ด, การวิเคราะห์ความแตกต่างของเบสหนึ่งตำแหน่ง, ไมโครอาร์เรย์ในหลอดทดลอง, อนุภาคนาโนของทองคำ, นิวคลีอิกแอซิดแอมพลิฟิเคชันเทคโนโลยี เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องของวัตถุดิบในโรงงานผลิตยาสมุนไพร

คำสำคัญ: เทคนิคใหม่ทางชีววิทยาโมเลกุล, การพิสูจน์เอกลักษณ์, ดีเอ็นเอบาร์โค้ด, วัตถุดิบสมุนไพร

Abstract

Current situation, the world's population increasingly turned their attention to the use of natural materials. As a result, demand of natural products has increased with the use, especially, the product on the prevention and treatment of disease. But the quality and standards relating to raw materials or products from medicinal herbs have been ignored. Since the authentication of herbal medicine with traditional methods still weaknesses. Currently, new molecular identification has developed, such as a DNA barcode, single-nucleotide polymorphism identification (SNP), microarray-in-a-tube, gold nanoparticles technology (GNP), nucleic acid amplification test strip method (NAT), to verify the correctness of the herbal raw material used in pharmaceutical factory.

Keywords: new biomolecular method, authentication, DNA barcode, herbal raw materials



บทนำ

สถานการณ์ปัจจุบัน ประชากรโลกหันมาให้ความสนใจผลิตภัณฑ์ที่ใช้วัตถุดิบจากธรรมชาติเพิ่มขึ้น ส่งผลให้มีความต้องการใช้วัตถุดิบจากธรรมชาติเพิ่มสูงขึ้นด้วย โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันและรักษาโรค เช่น ยาเครื่องสำอางหรืออาหารเสริมเพื่อสุขภาพผลการวิจัยระดับนานาชาติหลายเรื่อง ได้ผลสรุปที่สอดคล้องกันว่า ผู้บริโภคผลิตภัณฑ์ธรรมชาติหรือบริการทางการแพทย์แบบองค์รวมต้องการข้อมูลที่สำคัญในเรื่องประสิทธิภาพ ความปลอดภัย และข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่น่าเชื่อถือ (ภาณุโชติ ทองยัง, 2558) แต่ปัญหาสำคัญของการนำพืชสมุนไพรมาใช้เป็นวัตถุดิบในระดับอุตสาหกรรมยาเครื่องสำอาง อาหารเสริม คือ ความถูกต้องของชนิดและส่วนที่นำมาใช้ รวมทั้งปริมาณสารสำคัญของสมุนไพร ซึ่งจะส่งผลต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์และความปลอดภัยของผู้บริโภค (จิราณู มิ่งเมือง, 2556)

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีทรัพยากรธรรมชาติอุดมสมบูรณ์และหลากหลาย เป็นแหล่งของวัตถุดิบสมุนไพรที่สำคัญหลายชนิด เช่น ขมิ้นชัน ฟ้ายะลวย โข้วขาว ซึ่งเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจทั้งด้านการผลิตเพื่อใช้ในประเทศและการส่งออกไปยังตลาดต่างประเทศแต่ยังพบปัญหาสำคัญของการนำวัตถุดิบสมุนไพรมาใช้ เช่น การตรวจพบการปลอมปนของสมุนไพร การปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อจุลินทรีย์และการปนเปื้อนจากยาปราบศัตรูพืชเนื่องจากมาตรฐานของสมุนไพรที่มีอยู่ยังขาดเทคนิคที่ทันสมัยในการควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบสมุนไพร ดังนั้นการจัดทำมาตรฐานของวัตถุดิบสมุนไพรให้ครบถ้วนสมบูรณ์จึงมีความสำคัญและจำเป็น

วัตถุดิบสมุนไพรที่มีคุณภาพควรคำนึงถึงประเด็นหลักที่สำคัญ (ทัศนีย์ โชคเจริญรัตน์, 2548) ต่อไปนี้

1. ควรมีการระบุชนิดตามหลักการทางพฤกษศาสตร์ (Balick, 1999)
2. ควรมีสารออกฤทธิ์ปริมาณสูงและมีความสม่ำเสมอ พร้อมทั้งมีวิธีการทดสอบ (assay) ที่ได้มาตรฐาน (สมภพ ประธานธนารักษ์ และคณะ, 2543)
3. ไม่ควรมีการปลอมปนด้วยสมุนไพรชนิดอื่น

(De Smet, P.A.G.M., 1992)

4. ไม่ควรมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์และสารพิษจากเชื้อจุลินทรีย์ (อรุณฉวี จันทกิจ และคณะ, 2541; กรรณิกา จิตติยศรา และคณะ, 2543)

5. ไม่ควรมีการปนเปื้อนของยาปราบศัตรูพืช (ทัศนีย์ โชคเจริญรัตน์, 2548; De Smet P.A.G.M., 1992)

ปัจจุบันมาตรฐานของสมุนไพรจะกำหนดเป็นโมโนกราฟ (monograph) ของสมุนไพรนั้น ๆ โดยในแต่ละโมโนกราฟของแต่ละตัวยาหรือวัตถุดิบสมุนไพร จะประกอบด้วยข้อกำหนดที่ถือว่าเป็นข้อบังคับ (requirements) ข้อกำหนดที่เป็นข้อมูลทั่วไป (information) และข้อสังเกตทั่วไป (general notices) (World Health Organization, 2002) ซึ่งเป็นข้อมูลเกี่ยวกับการตรวจเอกลักษณ์และการปนเปื้อนของสมุนไพร โดยข้อมูลเกี่ยวกับการตรวจเอกลักษณ์สมุนไพรจะใช้ 3 วิธี ร่วมกัน ได้แก่ การศึกษาและจดจำรูปแบบลักษณะภายนอกของพืชสมุนไพร (macroscopic characterization) การศึกษาลักษณะโครงสร้างภายในโดยการส่องกล้องจุลทรรศน์ (microscopic characterization) และการวิเคราะห์หาสารเคมี (chemical constituent)

การศึกษาและจดจำรูปแบบลักษณะภายนอกของพืชสมุนไพรจะต้องทำโดยผู้เชี่ยวชาญและมีประสบการณ์ เป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว ใช้เพียงการสังเกตและจดจำลักษณะภายนอกที่โดดเด่นของสมุนไพร เช่น ขนาด รูปร่าง ลักษณะ สี จำนวนเส้นใบ สีของเนื้อไม้ กลิ่นเฉพาะตัว เป็นต้น จึงอาจมีข้อจำกัดในการแยกความแตกต่างของสมุนไพรที่มีลักษณะภายนอกคล้ายกันมากออกจากกัน

การศึกษาลักษณะโครงสร้างภายในโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อศึกษาเนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ ที่เป็นลักษณะเด่นของสมุนไพรชนิดนั้น ๆ วิธีนี้มักจะใช้ในกรณีที่สมุนไพรนั้นถูกนำมาแปรรูปเป็นผง เช่น สมอพิเภก และสมอไทย สามารถแยกความแตกต่างด้วยลักษณะเนื้อเยื่อของส่วนผล โดยสมอพิเภกจะพบลักษณะสำคัญคือ unicellular trichome ส่วนสมอไทยจะไม่พบลักษณะที่สำคัญดังกล่าว ซึ่งสมุนไพรทั้งสองชนิดมิใช่ในตำรับตรีผลา ตำรับยาหอมนวโกฐ ยามหาจักรใหญ่ ยาตรีพิภัก เป็นต้น หรือสมุนไพรบางชนิดเช่น โกงฐน้ำเต้า พบผลึกสาร

ที่เป็นลักษณะเฉพาะตัวคือ ผลึกของแคลเซียมออกซาเลต (calcium oxalate) ชนิดรูปดอกกุหลาบ (rosette aggregate) (Thai Herbal Pharmacopoeia, 2000) อีกทั้งยังสามารถใช้ระบุการปลอมปนของสมุนไพรอื่นอีกด้วย นอกจากนี้ข้อจำกัดของทั้ง 2 วิธีดังกล่าว คือการขาดผู้มีประสบการณ์ และเชี่ยวชาญ ดังนั้นจึงส่งผลให้ต้องหาวิธีพิสูจน์เอกลักษณ์ของสมุนไพรวิธีอื่น ๆ เพื่อให้มีความถูกต้องแม่นยำและง่ายต่อการใ้หมากยิ่งขึ้น

การวิเคราะห์หาสารเคมี เนื่องจากสมุนไพรแต่ละชนิดมีสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบต่างกัน ดังนั้นการตรวจหาสารสำคัญก็เป็นการช่วยระบุชนิดของพืชสมุนไพรได้ แต่ข้อจำกัดของวิธีนี้คือปริมาณสารสำคัญอาจมีการเปลี่ยนแปลงได้จากอิทธิพลของสิ่งแวดล้อม เช่น แหล่งปลูก อายุพืช วิธีปลูก การเก็บเกี่ยว และกรรมวิธีหลังการเก็บเกี่ยว (จิราบุษ มิ่งเมือง, 2556) การเสื่อมสภาพจากการเก็บสมุนไพรเป็นเวลานานหรือไม่ถูกวิธี จะส่งผลให้สมุนไพรมีคุณภาพต่ำ (Zeng, et al., 2011)

จากข้อมูลข้างต้นการตรวจสอบเอกลักษณ์ของพืชสมุนไพรด้วยวิธีดั้งเดิมยังคงมีข้อด้อยอยู่หลายประการ จึงเกิดการศึกษาและพัฒนาวิธีการพิสูจน์เอกลักษณ์สมุนไพรในระดับโมเลกุลขึ้น โดยใช้ข้อมูลทางพันธุกรรมของพืช ซึ่งเป็นข้อมูลที่จำเพาะของพืชแต่ละชนิด สามารถแบ่งได้เป็น 3 วิธี โดยขึ้นกับเทคนิคพื้นฐานที่นำมาใช้ (สุชาดา สุขหรรษ์, 2553) ได้แก่

1. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ใช้เทคนิคไฮบริไดเซชันเป็นพื้นฐาน (hybridization-based DNA fingerprinting)
2. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เป็นพื้นฐาน (PCR-based DNA fingerprinting)
3. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ใช้เทคนิคการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นพื้นฐาน (sequencing-based DNA fingerprinting)

โดยลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีการใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เป็นพื้นฐาน เป็นที่นิยมศึกษาและวิจัยเนื่องจากสามารถนำไปพัฒนาเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอชนิดอื่นๆ ได้อีกหลายชนิด เช่น ลายพิมพ์ชนิดอาร์เอฟพีดี (random amplified polymorphic DNA; RAPD) สามารถใช้พิสูจน์เอกลักษณ์ของพืชสมุนไพรสกุล *Derris* (Sukrong, et al.,

2005), ลายพิมพ์ชนิดสการ์ (sequence characterized amplified region; SCAR) สามารถใช้พิสูจน์เอกลักษณ์สมุนไพรในสกุล *Echinacea* (Adinolfi, et al., 2007) ลายพิมพ์ชนิดเอเอฟแอลพี (amplified fragment length polymorphism; AFLP) สามารถใช้พิสูจน์เอกลักษณ์สมุนไพรในสกุล *Plectranthus* (Passinho-Soares, et al., 2006) ลายพิมพ์ชนิดพีซีอาร์อาร์เอฟแอลพี (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism; PCR-RFLP) สามารถใช้พิสูจน์เอกลักษณ์สมุนไพรในสกุล *Panax* (Ngan, et al., 1999), กระเทียม (*Mitragyna speciosa*) ที่มีทั้งชนิดที่นำมาใช้เป็นยาและชนิดที่ใช้เป็นสารเสพติด (Sukrong, et al., 2007) และพืชในสกุล *Asparagus* โดยสามารถแยกชนิด *A. racemosus* ที่นำมาใช้เป็นยาและสร้างสารไฟโตเอสโตรเจน (phytoestrogen) ออกจากพืชชนิดอื่นภายในสกุลเดียวกันได้ (Boonsom, et al., 2012), ลายพิมพ์ชนิดเอสเอสซีพี (single strand conformation polymorphism; SSCP) สามารถใช้พิสูจน์เอกลักษณ์สมุนไพรในสกุล *Boesenbergia* (Techaprasan, et al., 2008), ลายพิมพ์ชนิดเอสเอ็นพี (single nucleotide polymorphism; SNP) สามารถใช้พิสูจน์เอกลักษณ์สมุนไพรของโสมเกาหลี (Korean ginseng) (Park, et al., 2006), ลายพิมพ์ชนิดไมโครแซเทลไลท์ (microsatellite) สามารถใช้พิสูจน์เอกลักษณ์สมุนไพรของ *Dendrobium officinale* (Shen, et al., 2006) และลายพิมพ์มินิแซเทลไลท์ (minisatellite) สามารถใช้พิสูจน์เอกลักษณ์สมุนไพรและแยกความแตกต่างของโสม 2 ชนิดที่มีลักษณะภายนอกคล้ายกันมากคือโสมเกาหลี (*Panax ginseng*) และโสมอเมริกา (*Panax quinquefolius*) (Ha, et al., 2002) ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคใหม่อย่างต่อเนื่อง ในบทความนี้ประสงค์จะให้ทราบเทคนิคใหม่ทางชีววิทยาโมเลกุลในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของวัตถุดิบสมุนไพร

เทคนิคใหม่ทางชีววิทยาโมเลกุลพัฒนามาจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ใช้เทคนิคการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นพื้นฐานและอาศัยตำแหน่งพหุสัณฐาน (polymorphism) ในการแยกความแตกต่างของสมุนไพรแต่ละชนิด เช่น ดีเอ็นเอบาร์โค้ดและการวิเคราะห์ความแตกต่างของเบสหนึ่งตำแหน่ง อีกทั้งยังได้พัฒนาระบบการติดตามย้อนหลังเพื่อให้สามารถนำข้อมูลมาใช้ได้สะดวกและรวดเร็วยิ่งขึ้น (Wang, et al., 2015)

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode)

Paul Hebert (2003) นักสัตวศาสตร์ชาวแคนาดา ได้นำเสนอสมมติฐานของดีเอ็นเอบาร์โค้ดขึ้นเป็นครั้งแรก ในปี ค.ศ. 2003 โดยอาศัยหลักการวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอบริเวณที่เหมาะสม ช่วงสั้น ๆ ประมาณ 400-800 คู่เบส ซึ่งแตกต่างกันในสิ่งมีชีวิตแต่ละ ชนิด และนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลนิวคลีโอไทด์ เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต นอกจากนี้ข้อมูลลำดับ นิวคลีโอไทด์ที่ได้ยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการ ค้นพบสิ่งมีชีวิตใหม่และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิง วิวัฒนาการ คุณสมบัติของดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่เหมาะสม ในการทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด (Kress, W. J. and Erickson, D. L., 2008) ได้แก่ บริเวณที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic variability) ในระดับสปีชีส์ต้องมีบริเวณขนาบข้าง ที่อนุรักษ์ (conservative flanking site) เพื่อใช้เป็นตำแหน่ง เข้าเกาะของไพรเมอร์สากล (universal primer) ในปฏิกิริยา พีซีอาร์ และเป็นดีเอ็นเอช่วงสั้น ๆ เพื่อให้ง่ายในขั้นตอน การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ปัจจุบัน การทำ ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในพืชแนะนำให้ใช้ดีเอ็นเอสองส่วนร่วมกัน คือ ดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่เป็นหลัก (core barcode) และดีเอ็นเอ บริเวณเสริม (additional barcode) โดยดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่เป็นหลัก คือ ดีเอ็นเอบาร์โค้ดยีน large subunit ของ ribulose-bisphosphate carboxylate/oxygenase (*rbcL*) ร่วมกับยีน maturase K (*matK*) (CBOL Plant Working Group, 2009) ซึ่งเป็นดีเอ็นเอในส่วนคลอโรพลาสต์ ยีน *rbcL* ในพืช โดยทั่วไป มีขนาด 1,428, 1,431 หรือ 1,434 คู่เบส เป็นยีน ที่ไม่มีส่วนอินตรอน (intron) เมื่อถอดและแปลรหัสจะได้ large subunit ของ ribulose-bisphosphate carboxylate/oxygenase หรือที่เรียกว่าเอนไซม์รูบิสโก (rubisco) ทำหน้าที่ ในการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ (carbon dioxide fixation) ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ยีน *rbcL* มีรายงานว่า สามารถใช้ในการจำแนกพืชระดับวงศ์หรือเหนือกว่าวงศ์ ได้ดีที่สุดใน (Soltis, et al., 1998) และยีน *matK* มีขนาด ประมาณ 1,500 คู่เบสแทรกตัวอยู่ในส่วนอินตรอน (intron) ระหว่าง 5' และ 3' ของยีน *trnK* ซึ่งมีขนาดประมาณ 2,600 คู่เบส เมื่อถอดและแปลรหัสยีน *matK* จะได้เอนไซม์ maturase ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างกรดอะมิโนไลซีน (lysine: K) เมื่อเปรียบเทียบกับยีนที่อยู่ในคลอโรพลาสต์

ด้วยกัน พบว่ายีน *matK* มีวิวัฒนาการเร็วที่สุด (Soltis, et al., 1998) ส่วนดีเอ็นเอบริเวณเสริม คือ ดีเอ็นเอบริเวณ ไอทีเอส (internal Transcribed Spacer หรือ ITS) ซึ่งเป็น ดีเอ็นเอในนิวเคลียส และดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ที่อยู่ ระหว่างยีน *trnH* และยีน *psbA* (Fazekas, et al., 2012) โดย ดีเอ็นเอบริเวณ ITS แบ่งได้เป็น 2 บริเวณ คือ ITS1 และ ITS2 ซึ่งอยู่ระหว่าง 18S-5.8S และ 5.8S-26S ตามลำดับ ทำหน้าที่เพียงช่วยให้ 26S และ 5.8S ซึ่งจะรวมตัวกัน large subunit rRNA และ 18S จะทำหน้าที่เป็น small subunit rRNA ของไรโบโซม เมื่อเคลื่อนที่มาใกล้กันจะรวมตัวกัน เป็นโดเมน ส่งผลต่อการสร้างโปรตีนขึ้น (White, et al., 1990) เนื่องจากดีเอ็นเอบริเวณนี้เป็นดีเอ็นเอช่วงสั้น ๆ และ มีความจำเพาะต่อสิ่งมีชีวิตในระดับสปีชีส์ จึงเหมาะสม สำหรับการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสมุนไพรมากที่สุด ส่วนดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* และยีน *psbA* มีขนาด ประมาณ 450 คู่เบส และมีการแปรผันของดีเอ็นเอภายใน สปีชีส์ (intraspecific variation) สูงที่สุดในพืชมีดอก (Kress, et al., 2005) จึงเป็นอีกหนึ่งบริเวณที่นิยมนำมาใช้ในการ พิสูจน์เอกลักษณ์ของสมุนไพร

การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดสามารถทำได้โดยการ วิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่ต้องการใน สิ่งมีชีวิต แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov/) ซึ่งเป็นฐานข้อมูลสากลที่ รวบรวมข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตที่ได้ศึกษา ไว้แล้วตัวอย่างการนำไปใช้เช่น ทีมวิจัยของ Chen และคณะ (2010) ได้พัฒนาเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด โดยเลือกใช้ดีเอ็นเอ ส่วน ITS2 และดีเอ็นเอบาร์โค้ด *trnH-psbA* และประสบความสำเร็จในการระบุชนิดพืชสมุนไพรในระดับสกุลและ ระดับชนิด เช่น สมุนไพรในวงศ์ Rosaceae, Asteraceae, Rutaceae, Euphorbiaceae และ Fabaceae หรือทีมวิจัยของ พิรุณรัตน์ เดชบำรุงและคณะ (2558) ได้พัฒนาวิธีดีเอ็นเอ บาร์โค้ดของยีน *matK* ร่วมกับข้อมูลทางพฤกษเคมีในการ พิสูจน์เอกลักษณ์ของสมุนไพรไทยที่เรียกว่าไคร้เครือที่ใช้ เป็นวัตถุดิบในการผลิตยาหอมตำรับต่าง ๆ เช่น ยาหอม นวโกฐยาหอมอินทจักร์ยาธาตุบรรจบ ซึ่งได้จากพืชในสกุล *Aristolochia* หรือพืชสกุลอื่น เช่น สกุล *Jasminum* แต่พบว่า เฉพาะไคร้เครือที่ได้จากพืชสกุล *Aristolochia* เท่านั้นที่มีสาร

aristolochic acid (AA) ซึ่งเป็นสารพิษที่ก่อให้เกิดมะเร็งที่ท่อไตและเชิงกราน ผลการทดลองพบว่าสามารถแยกต้นที่เป็นพิษออกจากต้นที่ไม่เป็นพิษได้

บุคคลสำคัญในวงการวิทยาศาสตร์มีความเชื่อว่าหลังจากโครงการถอดรหัสพันธุกรรมมนุษย์ (The human genome project) เสร็จสิ้น จะส่งผลให้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดกลายมาเป็นงานวิจัยที่นิยมทำทั่วโลก ในปีค.ศ. 2004 มีการใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อระบุชนิดของพืชโดยความร่วมมือระหว่างประเทศภายใต้โครงการ The Consortium for the Barcode of Life (CBOL) (www.barcoding.si.edu) ในการสร้างฐานข้อมูลระบบบิโอดีทริกซ์ในการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืชอย่างรวดเร็วและง่ายขึ้นจากการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่เพิ่มมากขึ้นส่งผลให้เกิดการตรวจสอบสมุนไพรได้อย่างรวดเร็วและน่าเชื่อถือ อีกทั้งยังสามารถใช้ได้กับวัตถุดิบพืชสมุนไพรที่ยังไม่ได้แปรรูปและที่แปรรูปแล้ว เช่น วัตถุดิบสมุนไพรต่าง ๆ ผงยาสมุนไพร เครื่องสำอางที่ใช้สมุนไพรเป็นวัตถุดิบในการผลิต เทคนิคนี้จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมในการตรวจเอกลักษณ์ของวัตถุดิบสมุนไพรในโรงงานผลิตยานอกจากนี้ การพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืชสมุนไพรยังมีวิธีอื่นอีก เช่น วิธี microarray แต่เป็นเทคนิคที่มีต้นทุนสูงในการพัฒนา จึงได้หันมาพัฒนาวิธีการอื่น ๆ เช่น การประยุกต์ใช้และพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ความแตกต่างของเบสหนึ่งตำแหน่ง การวิเคราะห์ความแตกต่างของเบสหนึ่งตำแหน่ง (single-nucleotide polymorphism identification; SNP)

หลักการของเทคนิคนี้คืออาศัยความแตกต่างของลำดับดีเอ็นเอที่ตำแหน่งพหุสัณฐาน (polymorphism) เพียงหนึ่งหรือสองตำแหน่งที่สามารถแยกความแตกต่างของพืชสมุนไพรได้ในระดับชนิดได้โดยจะอาศัยข้อมูลจากเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด (Chen, et al., 2013) ตัวอย่างเช่น ทีมวิจัยของ Chen และคณะ (2013) ได้ศึกษาลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณ ITS2, *matK* และ *trnH-psbA* ของโสม 4 ชนิดในท้องตลาด ได้แก่ โสมเกาหลี (*Panax ginseng*) โสมจีน (*P. notoginseng*) โสมอเมริกา (*P. quinquefolius*) และโสมญี่ปุ่น (*P. japonicas*) พบว่าดีเอ็นเอของทั้งสามบริเวณมีลำดับเบสที่มีความแตกต่างกันสามารถแยกโสมทั้งสี่ชนิดออกจากกันได้ แต่เนื่องจากโสม 2 ชนิดที่นิยมใช้คือโสมเกาหลีและโสมอเมริกานั้นมีลักษณะภายนอกที่

คล้ายคลึงกันมาก แต่โสมเกาหลีมีสารสำคัญในปริมาณมากกว่าส่งผลให้มีราคาสูงกว่าจึงมีการปลอมปน ทีมวิจัยจึงพัฒนาเทคนิค SNP โดยอาศัยความแตกต่างที่ตำแหน่งที่ 32 และ 43 ของดีเอ็นเอส่วนไอทีเอสเพื่อใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของโสม 2 ชนิดดังกล่าวได้

เทคนิคการวิเคราะห์ความแตกต่างของเบสหนึ่งตำแหน่งกำลังได้รับความนิยมและมีการศึกษาเพิ่มมากขึ้นจึงได้มีการพัฒนาเครื่องมือเพื่อการวิเคราะห์ความแตกต่างของเบสหนึ่งตำแหน่งที่มีศักยภาพที่ดีและสามารถตรวจวัดได้เร็ว เช่น ไมโครอาร์เรย์ในหลอดทดลอง, อนุภาคนาโนของทองคำและนิวคลีโอไทด์เอชไอเอ็มพลีฟิเคชัน เทคโนโลยี

ไมโครอาร์เรย์ในหลอดทดลอง (microarray-in-a-tube)

เทคนิคไมโครอาร์เรย์ในหลอดทดลองเป็นเทคนิคใหม่ que พัฒนาต่อจากเทคนิคการวิเคราะห์ความแตกต่างของเบสหนึ่งตำแหน่งโดยการออกแบบโพรบ (probe) ที่ถูกตรึงอยู่บนผิวของไมโครเซนตริฟิวให้มี ความจำเพาะต่อเบสที่เป็นพหุสัณฐานของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ โดยโพรบที่พัฒนาขึ้นนี้จะถูกตรึงบนฟิล์มอะกาโรสที่เคลือบบน plastic substrate ซึ่งต่างจากแบบดั้งเดิมที่เป็น glass microarray เมื่อมีการนำไมโครอาร์เรย์ชนิดนี้ไปใช้ จะมีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอตัวอย่างภายในหลอดทดลอง จากนั้นผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จะมีรูปร่าง (conformation) ในการเข้าจับอย่างจำเพาะต่อโพรบ ส่งผลให้สามารถระบุชนิดของพืชสมุนไพรได้อย่างแม่นยำและช่วยลดการปนเปื้อนจากขั้นตอนต่าง ๆ ระหว่างการทดลองได้ (Lu, Z.H., Liu, Q. J., Wang, H., 2013) ทีมวิจัยของ Liu และคณะ (2006) ประสบความสำเร็จในการตรวจพบการกลายพันธุ์ของเบสหนึ่งตำแหน่งในบริเวณยีนที่มีการดื้อยาของเชื้อ HIV-1 และเมื่อพัฒนาต่อด้วยวิธีไมโครอาร์เรย์ในหลอดทดลองโดยใช้การการแปลผลด้วย quenching ratio ที่เกิดจากการจับกันแบบไม่เข้าคู่ (mismatch) ของเบส พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสที่กลายพันธุ์ได้อย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพ นอกจากนั้น Wang และคณะ (2002) ได้ศึกษาเปรียบเทียบด้านราคากับระยะเวลาระหว่างการตรวจวิเคราะห์ด้วยชุดตรวจไมโครอาร์เรย์ในหลอดทดลองนี้กับวิธีการตรวจทางคลินิกแบบเดิม พบว่าชุดตรวจนี้มีความคุ้มค่ามากกว่า

ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคไมโครอาร์เรย์ในหลอดทดลองมาพัฒนาอย่างต่อเนื่อง โดยอาศัยข้อมูลจากวิธี SNP ซึ่งเป็นวิธีที่มีความเหมาะสมในการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืชสมุนไพร และเทคนิคที่พัฒนาขึ้นสามารถพัฒนาต่อเป็นชุดคิทสามารถตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์พืชสมุนไพรได้อย่างถูกต้องและรวดเร็ว เช่น การนำมาใช้ตรวจโสมโสมเกาหลี (*P. ginseng*) และโสมอเมริกา (*P. quinquefolius*) และถั่งเช่า (*Ophiocordyceps sinensis*) ได้และยังได้มีการพัฒนาเทคนิคนี้สำหรับพืชสมุนไพรที่มีราคาสูงชนิดอื่น ๆ ซึ่งอยู่ในระหว่างขั้นตอนวิธีการพัฒนาวิธีการ

เทคโนโลยีอนุภาคนาโนของทองคำ (gold nanoparticles technology)

อนุภาคนาโนทองคำเป็นอนุภาคทองที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาจากโลหะทองคำให้มีขนาดเล็กในระดับนาโนเมตร ทำให้อนุภาคนาโนของทองคำมีคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีที่ต่างไปจากทองคำปกติ เช่น อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูงมีผลในการช่วยเร่งปฏิกิริยาเคมี นำไฟฟ้าได้ดี และมีสีที่เปลี่ยนไปตามขนาดอนุภาค จากข้อดีต่าง ๆ ของอนุภาคนาโนของทองคำ ทำให้สามารถประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย เช่น ด้านการแพทย์ ด้านสิ่งแวดล้อม ด้านอาหาร ตัวอย่างเช่น การประยุกต์ใช้ทางด้านการแพทย์จะอาศัยหลักการแปรผลทางเคมีไฟฟ้า เช่น การวิเคราะห์หาปริมาณแอลฟาอีโนเลส (α -Enolase; ENO1) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้เป็นสารบ่งชี้มะเร็งปอด โดยอาศัยหลักการอิมมูโนเซนเซอร์แอสเสย์แบบแซนวิช (sandwich immunoassay) ด้วยการตรึงแอนติบอดีของแอลฟาอีโนเลสบนชั้นของพอลิเมอร์ จากนั้นเติม casein เพื่อปิดช่องว่างบนขั้วไฟฟ้าเพื่อป้องกันการจับแบบไม่จำเพาะเจาะจง (nonspecific binding) แล้วจึงเติมตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ หากตัวอย่างมีแอลฟาอีโนเลสซึ่งเป็นเอนไซม์จะไปจับแอนติบอดีที่ถูกตรึงไว้บนพอลิเมอร์ หลังจากนั้นเติมแอนติบอดีของแอลฟาอีโนเลสที่ติดฉลากด้วยอนุภาคนาโนของทองคำแอนติบอดีนี้จะไปจับแอลฟาอีโนเลสอีกครั้งหนึ่ง ต่อไปอนุภาคนาโนของทองคำจะถูกออกซิไดซ์ให้เปลี่ยนจาก Au^0 เป็น Au^{3+} แล้วจึงเปลี่ยนกลับเป็น Au^{3+} ด้วยปฏิกิริยารีดักชันทำให้เกิดกระแสไฟฟ้า ซึ่งแปรผันตรงกับความเข้มข้นของเอนไซม์ในตัวอย่าง เทคนิคนี้ใช้เวลาวิเคราะห์เพียง 2.5 ชั่วโมงต่อตัวอย่าง

ในขณะที่วิธีทั่วไปที่ใช้ในโรงพยาบาลใช้เวลาวิเคราะห์ทั้งสิ้น 5 ชั่วโมงต่อตัวอย่าง (Ho, et al., 2010)

เทคนิคนี้กำลังถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของพืชโดยพัฒนาต่อมาจากเทคนิคการวิเคราะห์ความแตกต่างของเบสหนึ่งตำแหน่ง โดยใช้หลักการการเข้าจับกับเบสคู่สม (complementary-base) ของดีเอ็นเอต้นแบบที่ถูกตรึงไว้บนอนุภาคนาโนของทองคำ การตรวจวัดจะใช้หลักการในการเปลี่ยนสีหรือการเปลี่ยนแปลงของค่าศักย์ไฟฟ้าจากการจับกันของเบสคู่สม ตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Lei และคณะ 2015 ได้ประสบความสำเร็จในการพัฒนาเทคนิคการระบุเอกลักษณ์สมุนไพรจีนที่ได้จากพืชสกุล *Fritillaria* จำนวน 2 ชนิดคือ *F. thunbergii* และ *F. cirrhosa* ด้วยเทคโนโลยีอนุภาคนาโนของทองคำ จะเห็นได้ว่าวิธีนี้เป็นวิธีที่ให้ผลลัพธ์ในการตรวจวัดที่ดี มีประสิทธิภาพในการตรวจวัดสูง มีความไวและความจำเพาะ จึงเป็นแนวโน้มที่น่าสนใจในการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อนำมาใช้ในการระบุเอกลักษณ์สมุนไพรอีกวิธีหนึ่ง

เทคโนโลยีนิวคลีอิกแอซิดแอมพลิฟิเคชัน (nucleic acid amplification technology)

เทคนิคนี้จะอาศัยหลักการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมเพียงอุณหภูมิเดียว (isothermal nucleic acid amplification) โดยใช้ nicking enzyme ตัดสายดีเอ็นเอสายคู่เพียงเส้นเดียวเพื่อระบุตำแหน่งเพื่อให้เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสเข้ามาทำงานต่อซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณผลผลิตที่ไม่จำเพาะ หลังจากนั้นจะมีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง SNP (Hu, et al., 2012) เช่น งานวิจัยของ Wang และคณะ (2011) ใช้นิวคลีอิกแอซิดแอมพลิฟิเคชันเทคโนโลยีและได้ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะเพื่อหาลำดับเบสของยีน cry lab/ac ใน Bt-transgenic crops ซึ่งเป็นยีนที่ป้องกันแมลงศัตรูพืชผลการทดลองพบว่าสามารถตรวจพบตำแหน่ง SNP ใน Bt-transgenic crops อย่างรวดเร็ว ซึ่งวิธีนี้มีข้อดีคือ มีความจำเพาะและมีความคงตัวสูง อีกทั้งมีความน่าเชื่อถือสูง ส่วนที่วิจัยของ Qin และคณะ (2013) ได้ออกแบบและทำ cross-priming ในการเพิ่มปริมาณ DNA เพื่อตรวจหาเชื้อก่อโรคท้องร่วงชนิด *Vibrio cholerae* โดยใช้วิธีนิวคลีอิกแอซิดแอมพลิฟิเคชันเทคโนโลยีพบว่าวิธีนี้

เป็นวิธีที่มีความจำเพาะ มีความคงตัวและมีประสิทธิภาพสูง ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่รวดเร็วกว่าวิธีดั้งเดิม มีความไวต่อการตรวจง่ายต่อการติดตั้งเครื่องมือ เครื่องมือก็มีราคาไม่แพง Zhang และคณะ (2013) ได้นำเทคนิคนี้มาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาเชื้อก่อโรคนก Bursaphelenchus xylophilus ในสน เพื่อตรวจสอบแหล่งที่มาของสนในการป้องกันการลักลอบนำเข้า-ออกประเทศ

เทคนิคนี้มีข้อดีในด้านความถูกต้อง ความสะดวก และรวดเร็ว แต่ยังไม่แพร่หลายในการนำมาประยุกต์ใช้ในพืชมากนัก จึงเป็นเทคนิคที่น่าสนใจที่จะศึกษาเพิ่มเติมและพัฒนาต่อไป

การพัฒนาระบบการติดตามย้อนหลังของวัตถุดิบสมุนไพร

เทคโนโลยีระบบการติดตามย้อนหลังเป็นการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีสารสนเทศเพื่อให้มีการบันทึกข้อมูลต่างๆ ของวัตถุดิบสมุนไพร เช่น ชนิดของพืช ข้อมูลดีเอ็นเอ แหล่งที่ปลูก ส่วนที่เก็บ วิธีการเก็บและกระบวนการหลังการเก็บเกี่ยว ซึ่งเป็นปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพวัตถุดิบ โดยสามารถติดตามข้อมูลของสมุนไพรนั้น ๆ ได้ทั้งไปข้างหน้าและย้อนหลัง (Liao, et al., 2014) เทคโนโลยีสารสนเทศที่นำมาใช้ได้แก่ บาร์โค้ดหนึ่งมิติ (1D barcode) และบาร์โค้ดสองมิติ (2D barcode) (Sheng, L. M., Wei, X. T., 2013) โดยระบบบาร์โค้ดสองมิติจะสามารถเก็บข้อมูลได้มากกว่าระบบบาร์โค้ดหนึ่งมิติ ปัจจุบันระบบบาร์โค้ดสองมิติได้รับความนิยมนำมาใช้ในงานหลายด้าน เช่น การสื่อสารในรูปแบบคิวอาร์โค้ด (QR code) การซื้อขายสินค้าและบริการทั่วไป ระบบการติดต่อซื้อของทางออนไลน์ (Jin, K., 2013) และการหาข้อมูลย้อนหลังของผลิตภัณฑ์จากอาหาร (Shi, et al., 2013)

ทีมวิจัยของ Yan และคณะ (2014) จึงได้พัฒนาระบบบาร์โค้ดสองมิติขึ้นสำหรับการติดตามผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่ผลิตขึ้นเพื่อเป็นเครื่องมือสำหรับการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีสำหรับพืช (good agricultural practice: GAP) ขึ้น และทีมวิจัยของ Jin และคณะ (2013) ได้ใช้ระบบนี้ตรวจสอบความถูกต้องของสมุนไพรที่แห้งและเป็นขึ้นเพื่อควบคุมคุณภาพของสมุนไพรก่อนส่งขาย นอกจากนี้ ทีมวิจัยของ Liu และคณะ (2012) ได้ประสบความสำเร็จในการรวบรวมข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดไว้ภายใต้ระบบบาร์โค้ดสองมิติในฐานข้อมูล (<http://tcmbarcodes.cn/en/>) ผู้ใช้สามารถเข้าถึงข้อมูลได้ด้วยแอปพลิเคชันบนสมาร์ตโฟน

บทสรุป

เพื่อนำไปสู่มาตรฐานวัตถุดิบสมุนไพรที่ดีควรมีการใช้ข้อมูลร่วมกันระหว่างข้อมูลด้านการศึกษาและจดจำรูปแบบลักษณะภายนอกของพืชสมุนไพร การศึกษา ลักษณะโครงสร้างภายในโดยการส่องกล้องจุลทรรศน์ การวิเคราะห์หาสารเคมี และข้อมูลทางพันธุกรรมที่ได้จากเทคนิคใหม่ ๆ ทางชีววิทยาโมเลกุล เช่น ดีเอ็นเอบาร์โค้ด โดยสามารถนำข้อมูลทั้งหมดนี้ไปรวบรวมเป็นฐานข้อมูลที่สามารถเข้าถึงได้ผ่านทางเทคโนโลยีระบบการตรวจติดตามย้อนหลังได้อย่างถูกต้อง สะดวก รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพทันสมัยต่อโลกยุคโลกาภิวัตน์ อีกทั้งวิธีการวิเคราะห์ความแตกต่างของเบสหนึ่งตำแหน่ง ไมโครอาร์เรย์ในหลอดทดลอง และอนุภาคนาโนของทองคำ เป็นเทคนิคที่มีความถูกต้องและแม่นยำสูงในการระบุเอกลักษณ์ของวัตถุดิบสมุนไพร ซึ่งมีผลต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์สุขภาพ อันจะนำไปสู่ประสิทธิภาพและความปลอดภัยของผู้บริโภค



References

- Adinolfi, B., Chicca, A., Martinotti, E., Breschi, M., & Nieri, P. (2007). Sequence characterized region (SCAR) analysis on DNA from the three medicinal Echinacea species. *Fitoterapia*, 78(1), 43-45.
- Balick, M. J. (1999). *Good botanical practices*. Larchmont: Mary Ann Liebert.
- Boonsom, T., Waranuch, N., Ingkaninan, K., Denduangboripant, J., & Sukrong, S. (2012). Molecular analysis of the genus *Asparagus* based on *matK* sequences and its application to identify *A. racemosus*. *A Medicinally Phytoestrogenic Species*, 83(1), 947-953.
- CBOL Plant Working Group. (2009). A DNA barcode for land plants. *Proceeding of Natural Academy of Science USA*, 106(31), 12794-12797.
- Chen, S. L., Yao, H., Han, J. P., Liu, C., Song, J. Y., Shi, L. C., et al. (2010). Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLOS One*. 5:e8613.
- Chen, X. C., Liao, B. S., Song, J. Y., Pang, X. H., Han, J. P., & Chen, S. L. (2013). A fast SNP identification and analysis of intraspecific variation in the medicinal *Panax* species based on DNA barcoding. *Gen*, 530, 39-43.
- Chittirankyodsara, K., Teerapapthammakul, S., Sangkai, L., & Juthamorakot, T. (2000). Study on quality and safety of herbal teas. *Bulletin of the Department of Medical Sciences*, 42(1), 345-353. (in Thai)
- Chokchalearnrat, T., & Leangchonlatarn, S. (2005). *The quality control of herbal medicines*. Nonthaburi: Food and drug Administration Thailand. (in Thai)
- Chuntakit, A., Suntornruk, W., & Kanawut, W. (1998). Contamination of microorganisms in traditional medicine. *Pharmacopoeial Newsletter*, 6(1), 88-95. (in Thai)
- Dachbumroong, P., Aumnuaaypon, S., & Sukrong, S. (2014). Sequencing analysis of the *matK* DNA of *Aristoligia* Plants used as “Krai-Krue” herb. 5th *The National Graduate Research Conference. 16-17 July 2015*. (in Thai)
- De Smet, P. A. G. M. (1992). Toxicological outlook on the quality assurance of herbal remedies. In: De Smet, P.A.G.M., Keller, K., Haensel, R., Chandler, R.F., eds. *Adverse effects of herbal drugs*. Berlin: Springer-Verlag; 1-72.
- Fazekas, A. J., Kuzmina, M. L., Newmaster, S.G., & Hollingsworth, P. M. (2012). *DNA barcoding methods for land plants: Methods in Molecular Biology*. New York: Humana Press.
- Ha, W. Y., Shaw, P. C., Liu, J., Yau, F. C., & Wang, J. (2002). Authentication of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius* using amplified fragment length polymorphism (AFLP) and directed amplification of minisatellite region DNA (DAMD). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(7), 1871-1875.
- Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceeding of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270, 313-321.

- Ho, J. A., Chang, H. C., Shih, N. Y., Wu, L. C., Chang, Y. F., Chen, C. C., & Chou, C. (2010). Diagnostic detection of human lung cancer-associated antigen using a gold nanoparticle-based electrochemical immunosensor. *Analytical Chemistry*, 82(1), 5944-5950.
- Hu, L., Xu, G. L., You, Q. M., Wang, H. Y., Gao, Q., Zhang, W.H., et al. (2012). Inventors; Ustar Biotechnologies (Hangzhou) Ltd., assignee. Method and kit for rapidly detecting single nucleotide polymorphisms (SNPs). China Patent CN102618626A. 2012 Aug 1.
- Jin, K. (2013). Study on two-dimensional code consumers behavior [dissertation]. Shanghai: Shanghai Normal University.
- Jin, L., Zhang, J., Shen, F., Huang, Y., & Wu, Y. K. (2013). Application of ePS platform in logistics management of small package of TCM decoction pieces storehouse. *China Pharmaceutical*, 24(1), 271-272.
- Jirawongse, V. (2000). *Thai herbal pharmacopoeia*. Bangkok: Prachachon. (in Thai)
- Kress, W. J., & Erickson, D. L. (2008). DNA barcodes: Genes, genomics, and bioinformatics. *Proceeding of Natural Academy of Science USA*, 105(8), 2761-2762.
- Kress, W. J., Wurdack, K. J., Zimmer, E. A., Weigt, L. A., & Janzen, D. H. (2005). Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceeding of Natural Academy of Science USA*, 102(23), 8369-8374.
- Lei, Y., Yang, F., Tang, L., Chen, K., & Zhang, G. J. (2015). Identification of chinese herbs using a sequencing-free nanostructured electrochemical DNA biosensor. *Sensors*, 15(12), 29882-29892.
- Liao, B. S., Han, J. P., Chen, X. C., & Chen, S. L. (2013). *Method for rapid identification of Ophiocordyceps sinensis*. China Patent CN102888456A. 2013 Jan 23.
- Liao, B. S., Song, J. Y., Xie, C. X., Han, J. P., & Chen, S. L. (2014). Study on traceability system of genuine medicinal materials. *The Journal of Chinese Mater Medicine*. 39(1), 3881-3888.
- Liu, C., Shi L.C., Xu, X., Li, H., Xing, H., Liang, D., et al. (2012). DNA barcode goes two-dimensions: DNA QR code web server. *PLoS One*. 7: e35146.
- Liu, Q. J. (2006). *Development of three novel integrated DNA microarrays and detection instruments*. Nanjing: Southeast University.
- Lu, Z. H., Liu, Q. J., & Wang, H., (2013). *Flushing-free PCR amplification tube capable of directly detecting gene*. China patent CN1448500.
- Mingmuang, J. (2013). *The development and manufacture of medicinal products to the international community*. Bangkok: Medicinal Plant Research Institute. (in Thai)
- Ngan, F., Shaw, P., & Wang. (1999). Molecular authentication of *Panax* species. *Phytochemistry*, 50(5), 787-791.
- Park, M. J., & Kim, M. J., (2006). Molecular identification of Korean ginseng by amplification of refractory mutation system-PCR. *Food Research International*, 39(5), 568-574.

- Passinho-Soares, H., Felix, D., Kaplan, M. A., Margis-Pinheiro, M., & Margis, R. (2006). Authentication of medicinal plant botanical identify by amplified fragmented length polymorphism dominant DNA marker: Inferences from the *Plectranthus* genus. *Planta Medica*, 72(10), 929-931.
- Pratarntunarak, S., Suakul, W., Sornlum, P., & Suntornjalearnnon, N. (2000). Turmeric quality raw materials from various sources in Thailand. *Seminar on development of herbs in Thailand*. 122-126. (in Thai)
- Qin, Q., & Zhu, J. L. (2013). Establishment and optimization of CPA-nucleic acid test strip for rapid detection of *vibrio cholerae*. *Biotechnology Bulletin*, 7(1), 167-171.
- Shen, J., Ding, X., Liu, D., Ding, G., He, J., Li, X., Tang, F., & Chu, B. (2006). Intersimple sequence repeats (ISSR) molecular fingerprinting markers for authenticating populations of *Dendrobium officinale* KIMURA et MIGO. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(3), 240-422.
- Sheng, L. M., & Wei, X. T. (2013). Application of two-dimensional code in the traceability of agricultural products. *Modification Agriculture and Science Technology*, 18(1), 330-332.
- Shi, L. M., Guo, C. Z., Gai, Z. H., & Chen, Z. F. (2013). Design and implementation of green food traceability system based on two-dimension code. *Manuf Autom*, 16(1), 144-146.
- Soltis, D. E., Soltis, P. S., & Doyle, J. J. (1998). *Molecular systematic of Plants II : DNA sequencing*. Massachusette: Kluwer Academic Publishers.
- Sukrong, S. (2010). *DNA fingerprinting of herbs*. Bangkok: Chulalongkorn University. (in Thai)
- Sukrong, S., Phadungcharoen, T., & Ruangrunsi, N. (2005). DNA fingerprinting of medicinally used Derris species by RAPD markers. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*, 29(3-4), 155-163.
- Sukrong, S., Zhu, S., Ruangrunsi, N., Phadungcharoen, T., Palanuvej, C., & Komatsu, K. (2007). Molecular analysis of the *Mitragyna* existing in Thailand based on rDNA ITS sequences and its application to identify a narcotic species: *Mitragyna speciosa*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30(7), 1284-1288.
- Techaprasan, J., Klinbunga, S., & Jenjittikul, T. (2008). Genetic relationships and species authentication of *Boesenbergia* (Zingiberaceae) in Thailand based on AFLP and SSCP analyses. *Biochemical and Systematics and Ecology*, 36(5-6), 408-416.
- Tongyong, P. (2015). *Herbal pharmacy guide Vol.1 herbal not bitter*. Bangkok. Paramut Prining.
- Wang, H., Li, J., Liu, H. P., Liu, Q. J., Mei, Q., Wang, Y. J., et al. (2002). Label-free hybridization detection of a single nucleotide mismatch by immobilization of molecular beacons on an agarose film. *Nucleic Acids Research*, 30(1), e61.
- Wang, L., Kong, W., Yang, M., Han, J., & Chen, S. (2015). Safety issues and new rapid detection methods in traditional Chinese medicinal. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5(1), 38-46.
- Wang, L., Zhao, Y. Z., Luo, Y., Zhou, Q., Lai, P. A., Zhang, X. D., et al. (2011). Rapid detection of transgenic Bt crops by isothermal nucleic amplification. *Journal of Inspection and Quarantine*, 21(1), 11-5.
- World Health Organization. (2002). *WHO monographs on selected medicinal plants*. Geneva: N.P.

- Yan, L. H., Luo, Z. H., & Yang, J. Y. (2014). Applications of Chinese herbal medicines GAP mode of production based on two-dimensional code technology. *Chinese Journal Traditional Medicine and Science Technology*, 32(1), 286-287.
- Zeng, J. G., Tan, M. L., Peng, X., & Luo, Q. (2011). *Standardization and quality control of herbal extracts and products*. In: Liu WJH, ed. Traditional herbal medicine research methods. Hoboken: John Wiley & Sons.
- Zhang, J. F., Sun, L. P., Li, H., Wang, X. Y., & Zhang, Q. Q. (2008). Gold nanoparticles application in gene mutation detection and SNP analysis. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 24(1), 489-495.
- Zhang, J. L., Li, G. G., Dong, B., Bai, Q. C., & Qiao, L. L. (2013). Isothermal amplification test strips for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens. *Journal of Medical Pest Control*, 29(1), 1093-1094.
- Zhang, Y. J., Wang, J. C., & Wei, Y. D. (2013). Visual nucleic acid test strips for rapid detection of *Bursaphelenchus xylophilus*. *Plant Protection Science*, 39(1), 94-98.

