

การตรวจตำแหน่งสปีด้วยการประยุกต์ใช้วิธีปฏิกิริยาถูกลูโซโพลีเมอร์แบบเวลาจริงร่วมกับ
เทคนิคการวิเคราะห์การคลายเกลียวของสายดีเอ็นเอเพื่อระบุชนิดของพืชสมุนไพร
Detection of SNP by Application of Real-Time PCR Couple High Resolution Melting
Analysis for Authentication of Medicinal Plants

ธีระวัฒน์ บุญโสม
Teerawat Boonsom

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอีสเทิร์นเอเชีย
Faculty of Pharmacy, Eastern Asia University

บทคัดย่อ

การใช้วิธีปฏิกิริยาถูกลูโซโพลีเมอร์แบบเวลาจริงนำมาใช้ร่วมกับการวิเคราะห์ด้วยการคลายเกลียวของสายดีเอ็นเอ จะส่งผลให้การตรวจสอบสมุนไพรมีความรวดเร็ว ถูกต้องแม่นยำและเป็นวิธีที่ทำได้จำนวนมาก ตัวอย่างในการตรวจสอบความถูกต้องของพืชสกุล *Hypericum* เนื่องจากมีฤทธิ์เป็นยาและมีรายงานประโยชน์ต่อสุขภาพของพืชสกุลนี้มากขึ้นจึงส่งผลให้มีการใช้พืชสกุลนี้มากขึ้น โดยเฉพาะ *Hypericum perforatum* (St John's wort) เป็นที่รู้จักกันดีว่ามีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ด้านอาการซึมเศร้า ฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส ตำรายาโบราณของโปรตุเกส ใช้ *Hypericum androsaemum* อย่างแพร่หลาย ในการปกป้องตับและขับปัสสาวะ โดยในการวิจัยจะศึกษาดีเอ็นเอในส่วน ITS1 และ *matK* ที่มีศักยภาพในการนำมาทำดีเอ็นเอมินิบาร์โค้ด โดยจะนำมาใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของ *H. perforatum* และ *H. androsaemum* ที่อยู่ในรูปแบบขาชงได้ ผลจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS1 และ *matK* สามารถนำไปพัฒนาต่อเป็นไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเพื่อใช้วิธีปฏิกิริยาถูกลูโซโพลีเมอร์แบบเวลาจริงร่วมกับการวิเคราะห์ด้วยการคลายเกลียวของสายดีเอ็นเอ จากผลการทดลองพบว่าไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะในการเพิ่มผลผลิตด้วยปฏิกิริยาถูกลูโซโพลีเมอร์ของดีเอ็นเอในแต่ละส่วน รวมทั้งการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอในส่วน ITS1 มีความเหมาะสมในการนำมาใช้แยกพืชในระดับชนิด สำหรับผลการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอในส่วน *matK* เหมาะสมที่จะนำมาใช้ทำดีเอ็นเอมินิบาร์โค้ด ซึ่งดีเอ็นเอทั้ง 2 ส่วนเมื่อนำมาใช้กับวิธีปฏิกิริยาถูกลูโซโพลีเมอร์แบบเวลาจริงสามารถนำมาใช้ร่วมกับการวิเคราะห์ด้วยการคลายเกลียวของสายดีเอ็นเอ โดยวิธีดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการแยกสมุนไพรที่ผสมกันในรูปแบบขาชงได้ อีกทั้งยังสามารถประยุกต์ใช้วิธีนี้ในการตรวจสอบชนิดของพืชที่ระบุไว้บนฉลากเพื่อแยกพืชที่ปนปลอมได้

คำสำคัญ: การตรวจตำแหน่งสปี, วิธีปฏิกิริยาถูกลูโซโพลีเมอร์แบบเวลาจริง, เทคนิคการวิเคราะห์การคลายเกลียวของสายดีเอ็นเอ, ระบุชนิดของพืชสมุนไพร

Abstract

Real-time PCR technique couple with high resolution melting (HRM) are rapid, accuracy and high-through put for detection of medicinal plants. For example, *Hypericum* species are among the medicinal plants that are being increasingly used due to their reported health benefits. *Hypericum perforatum* (St. John's wort) is well known for its anti-inflammatory, anti-depressive and anti-viral properties. In Portuguese folk medicine, *Hypericum androsaemum*

is largely used for its hepatic protective and diuretic properties. This work aimed at searching the potential use of two DNA mini-barcode candidates (ITS1 and *matK*) for the authentication of *H. perforatum* and *H. androsaemum* in herbal infusions. The sequencing results from ITS1 and *matK* regions were the basis for the development of species-specific PCR and real-time PCR assays coupled to high resolution melting (HRM) analysis, as simple approaches for the reliable discrimination of both species. The barcode regions were successful in the species-specific PCR identification of each target. ITS1 region revealed some intra-species variability from sequencing results, which compromises HRM analysis, while *matK* showed to be an adequate mini-barcode for the differentiation of both species by real-time PCR coupled to HRM analysis. The assays were effectively applied to commercial herbal infusions, enabling the consistent identification of two labels with non-declared *Hypericum* species.

Keywords: detection of SNP, real-time PCR, high resolution melting analysis, authentication of medicinal plants



บทนำ

ปัจจุบันพืชสมุนไพรกำลังได้รับความนิยมนำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำคัญในการผลิตยาแผนโบราณ ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร และเครื่องสำอาง แต่พืชสมุนไพรจำนวนมากยังไม่มีข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่น่าเชื่อถือ เช่นชนิดหรือพันธุ์ของพืช เนื่องจากสมุนไพรบางชนิดมีชื่อไทยเดียวกัน แต่อาจมาจากต้นไม้อันละชนิด (species) คนละสกุล (genus) หรือคนละวงศ์ (family) หากแยกโดยวิธีพิสูจน์เอกลักษณ์ทางมหรรณ (macroscopic identification) แต่พืชอาจมีลักษณะภายนอก (phenotype) ที่คล้ายกันมาก ยากต่อการระบุว่าเป็นพืชต้นใดหรือมาจากต้นใดของพืช หากแยกโดยการใช้ปริมาณสารสำคัญหรือองค์ประกอบทางเคมีเพียงอย่างเดียวก็อาจไม่แน่นอนเนื่องจากปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม เช่น บริเวณที่ปลูกและสภาพภูมิอากาศ อาจมีผลต่อการสร้างปริมาณสารสำคัญให้มากขึ้นหรือน้อยลงได้ รวมทั้งอาจพบสมุนไพรที่แปรรูปแล้ว เช่น อยู่ในรูปแบบชันหรือรูปแบบผง การตรวจสอบทำได้จากการดูลักษณะของผลึกที่เป็นองค์ประกอบนั้น ๆ ที่เรียกว่าวิธีพิสูจน์เอกลักษณ์ทางจุลทรรศน์ (microscopic identification) แต่ผู้ตรวจสอบต้องมีประสบการณ์และมีข้อมูลอ้างอิง หากไม่มีข้อมูลดังกล่าวก็เป็นการยากในการระบุชนิดของสมุนไพร สมุนไพรที่อยู่ในรูปผงจะไม่เหลือเค้าโครงเดิมอยู่เลย ทำให้ยากต่อการตรวจสอบว่าเป็นพืชสมุนไพรชนิดใด ดังนั้นการยืนยันความถูกต้องของสมุนไพรจึงเป็น

สิ่งสำคัญและจำเป็นที่ต่องานการนำมามาตรฐานสมุนไพรโดยใช้ข้อมูลทางพันธุกรรม เช่น ดีเอ็นเอ (DNA) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดและไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม จึงเข้ามามีบทบาทเป็นอีกวิธีหนึ่งในการช่วยจำแนกและพิสูจน์เอกลักษณ์ (identification) ของชนิดหรือสายพันธุ์พืช

การพัฒนาการตรวจสอบเชิงวิทยาศาสตร์ จำเป็นต้องลดขั้นตอนวิธีการตรวจสอบเพื่อให้มีความรวดเร็ว แม่นยำ และทำได้จำนวนมาก (high-throughput) ในการนำมามาตรฐานสมุนไพรโดยใช้ข้อมูลทางพันธุกรรมมีหลายวิธีในการศึกษาแต่วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบเวลาจริง (real-time polymerase chain reaction, real-time PCR) ก็เป็นวิธีทำได้จำนวนมากวิธีหนึ่ง ซึ่งการใช้เครื่อง real-time PCR จะสามารถวัดปริมาณดีเอ็นเอในแต่ละรอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ และสามารถยืนยันความถูกต้องของผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) ที่ผลิตขึ้นได้ ปัจจุบันมีการนำวิธี real-time PCR มาประยุกต์กับเทคนิคการวิเคราะห์การคลายเกลียวของสายดีเอ็นเอ (High Resolution Melting Analysis--HRM) เพื่อตรวจหาพื้นที่สนใจหรือการตรวจหา single nucleotide polymorphism (SNP) ซึ่งทั้งสองวิธีที่กล่าวมาข้างต้นมีตัวอย่างการนำมาประยุกต์ใช้ตรวจพืชคัดแปลงพันธุกรรม (Nettuwakul, et al., 2013) การตรวจหาความหอมของข้าวหอม (Soontrajarn, et al., 2013) การตรวจแยกสายพันธุ์ของเชื้อไวรัส Human

Papillomavirus ชนิดเสี่ยงสูงต่อการเกิดมะเร็งปากมดลูก (Uthaiwat, et al., 2015) เป็นต้น ซึ่งวิธีนี้ได้รับการยอมรับกันอย่างกว้างขวาง

ในบทความวิชาการนี้ ผู้เขียนขอแนะนำการตรวจตำแหน่ง SNP ด้วยการประยุกต์ใช้วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบเวลาจริงร่วมกับเทคนิคการวิเคราะห์การคลายเกลียวของสายดีเอ็นเอ เพื่อระบุชนิดของพีชสมุนไพรมาน

เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบเวลาจริง (real-time polymerase chain reaction, real-time PCR) และเทคนิคการวิเคราะห์การคลายเกลียวของสายดีเอ็นเอ (high resolution melting analysis--HRM)

โดยทั่วไปการตรวจมาตรฐานสมุนไพรมาน โดยใช้ข้อมูลพันธุกรรมเพื่อแยกสายพันธุ์ของพีชสมุนไพรมานหรือสิ่งมีชีวิตอื่น นิยมใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction-PCR) แต่พบปัญหาการใช้เวลานาน ค่าใช้จ่ายสูง และเสี่ยงต่อสารเคมีที่อาจก่อให้เกิดมะเร็ง เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบเวลาจริง (real-time polymerase chain reaction, real-time PCR) จึงเป็นเทคนิคที่ได้พัฒนาขึ้นจากข้อจำกัดของวิธีพีซีอาร์แบบดั้งเดิม (conventional PCR) โดยการพัฒนาเทคนิค real-time PCR หรือ kinetics PCR ขึ้น เกิดจากการพัฒนาเทคโนโลยี 2 ส่วนใหญ่ ๆ คือ การพัฒนาเทคโนโลยีในการตรวจหาผลผลิตพีซีอาร์ (PCR products) ในสารละลายโดยการใส่สารเรืองแสง (fluorescence reporters) ต่าง ๆ และการพัฒนาเครื่อง thermocycler ซึ่งแต่เดิมเป็นเพียงเครื่องควบคุมอุณหภูมิให้ขึ้นลงตามโปรแกรมที่กำหนด มาเป็นเครื่อง real time thermocycler โดยเพิ่มส่วนที่เป็นแหล่งกำเนิดแสงที่ไปก่อให้เกิดการเรืองแสงของผลผลิตพีซีอาร์ และส่วนตรวจวัดการเรืองแสงที่เกิดจากผลผลิตพีซีอาร์ในหลอดปฏิกิริยา ดังนั้นการทำ real-time PCR จึงเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและสามารถตรวจวัดปริมาณผลผลิตพีซีอาร์ที่เกิดขึ้นจริง ณ เวลานั้น ๆ ซึ่งต่างจากวิธีพีซีอาร์แบบดั้งเดิมที่การตรวจผลผลิตพีซีอาร์ จะทำได้หลังจากปฏิกิริยาการเพิ่มผลผลิตพีซีอาร์สิ้นสุดลง การวัดผลผลิตพีซีอาร์เกิดจากการทำให้ผลผลิตพีซีอาร์เกิดสัญญาณ

การเรืองแสงได้ โดยการเรืองแสงได้เกิดจากการใช้สีและการติด probe ซึ่งมีอยู่ 2 วิธีใหญ่ ๆ คือการใช้ SYBR green I dye และ การใช้ probes ติดคนลากสาร fluorochrome โดยอาศัยเทคโนโลยีของ fluorescence resonance energy transfer (FRET) เช่น hybridization probe, hydrolysis probe (Taqman) และ molecular beacons

โดยวิธี real-time PCR สามารถประยุกต์ใช้ร่วมกับหลายงาน เช่น การตรวจวินิจฉัยโรคอย่างรวดเร็ว การตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณ การวิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์โดย melting curve และการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนที่สนใจหรือการตรวจหา single nucleotide polymorphism (SNP) โดยในสิ่งมีชีวิตการเรียงตัวกันของดีเอ็นเอ พบว่ามีนิวคลีโอไทด์ที่มีเบส 4 ชนิด คือเบสกลุ่มพิวรีน (purine) ได้แก่ อะดีนีน (adenine; A) และกวานีน (guanine; G) กับเบสกลุ่มไพริมิดีน (pyrimidine) ได้แก่ ไซโทซีน (cytosine; C) และไทมีน (thymine; T) ในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันการเรียงตัวของลำดับเบสบนดีเอ็นเอแทบจะเหมือนกันทั้งหมด แต่จะมีบางตำแหน่งที่ลำดับเบสแตกต่างกันไป ความแตกต่างนี้เกิดจากการแทนที่คู่เบส (base-pair substitution) ซึ่งอาจเกิดขึ้นได้ 4 รูปแบบจากการแทนที่คู่เบสทั้ง 4 ชนิดในประชากรหนึ่ง ๆ ถ้าพบตำแหน่งของเบส 1 เบสถูกแทนที่บนสายดีเอ็นเอบริเวณเดียวกัน น้อยกว่าร้อยละ 1 ของจำนวนประชากรและมักทำให้เกิดความผิดปกติในสิ่งมีชีวิต จัดเป็นการกลายพันธุ์ (mutation) เช่น คนที่เป็นโรค sickle cell anemia เกิดจากการแทนที่ไทมีนด้วยอะดีนีนในยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเซลล์เม็ดเลือดแดง ทำให้เกิดการสังเคราะห์กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ส่งผลให้เกิดการสร้างเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีลักษณะผิดปกติ แต่ในกรณีที่ประชากรหนึ่ง ๆ พบว่าตำแหน่งของเบส 1 เบสถูกแทนที่ในบริเวณเดียวกันบนสายดีเอ็นเอมากกว่าร้อยละ 1 ของจำนวนประชากรและมักไม่ทำให้เกิดความผิดปกติในสิ่งมีชีวิต จัดเป็น single nucleotide polymorphism ใช้คำย่อว่า SNP และนิยามอ่านว่าสนิป โดย SNP เป็นความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic polymorphism) รูปแบบหนึ่ง

ส่วนเทคนิคการวิเคราะห์การคลายเกลียวของสายดีเอ็นเอ (High Resolution Melting Analysis--HRM) เป็นเทคนิคที่สามารถวิเคราะห์ตำแหน่ง SNP ได้หลังจาก

เทคนิค real-time PCR เมื่อทำพีซีอาร์เสร็จสิ้นสามารถทำการวิเคราะห์ HRM ต่อซึ่งสามารถแยกสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตทันที โดยทำการวิเคราะห์ melting curve ที่จะค่อย ๆ เพิ่มอุณหภูมิให้กับผลผลิตพีซีอาร์ จาก 56-95 °C และวัดสัญญาณ fluorescence ที่ลดลงตลอดเวลา เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิจะทำให้ผลผลิตพีซีอาร์ที่เดิมเป็นดีเอ็นเอสายคู่ แยกตัวออกจากกันมากขึ้น (ทำให้ SYBR green หลุดเป็นอิสระไม่สามารถเรืองแสงได้) ทั้งนี้ดีเอ็นเอสายคู่จากผลผลิตพีซีอาร์ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะมี

ค่า melting temperature (T_m) เป็นค่าเฉพาะตัว ดังนั้นเมื่อทำ HRM แล้วพบ melting peak ที่แตกต่างกัน ก็สามารถแยกชนิดหรือสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตได้ ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว ราคาเหมาะสม ลดการสัมผัสกับสารเคมีที่เป็นพิษ โดยการแบ่งระดับของ SNP แบ่งได้เป็น 4 ระดับคือ SNP class 1, 2, 3, 4 ซึ่งเมื่อมีการเกิดตำแหน่ง SNP ขึ้นแล้วมีการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRM จะพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงไปของอุณหภูมิ melting (ตาราง 1)

ตาราง 1

การแบ่งชนิดของ SNP และการเพิ่มหรือลดของอุณหภูมิ melting (T_m)

ชนิดของ SNP	เบสที่เปลี่ยนแปลง	การเพิ่มหรือลดของอุณหภูมิ (T_m)	โอกาสที่พบการเกิดในจีนอมของมนุษย์
1	C/T และ G/A	Large (> 0.5, ค่าเฉลี่ย 1.0 °C)	64%
2	C/A และ G/T	Large (> 0.5, ค่าเฉลี่ย 1.0 °C)	20%
3	C/G	Small (0.2-0.5 °C)	9%
4	A/T	Very small (< 0.2 °C)	7%

ดังนั้นการพัฒนาเทคนิคปฏิกิริยาถูกใช้เพื่อวิเคราะห์แบบเวลาจริงร่วมกับเทคนิคการวิเคราะห์การคลายเกลียวของสายดีเอ็นเอสามารถใช้ตรวจหาความผิดปกติของยีนและใช้หาจีโนมใหญ่ของยีนต่าง ๆ ที่สนใจได้ (Wittwer, et al., 2003) ตัวอย่างงานวิจัยของ Costa, et al. (2016) ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสมุนไพร 2 ชนิดในสกุล *Hypericum* คือ *Hypericum perforatum* และ *Hypericum androsaemum* เป็นพืชในวงศ์ Hypericaceae ที่มีอยู่ประมาณ 450 ชนิด ทั่วโลก พบว่ามี 27 ชนิดที่มีคุณสมบัติทางยา (Penso, 1983) โดยชนิดที่รู้จักกันดีและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ คือ *Hypericum perforatum* (St. John's wort) เนื่องจากมีการนำมาใช้เป็นยารักษาโรควิตกกังวล (anxiety) โรคซึมเศร้า (depression) และรักษาแผลที่ผิวหนัง (topical wounds) กันอย่างแพร่หลาย (Guedes, Franklin & Fernandes-Ferreira, 2012) ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมาการศึกษาสารสำคัญจากพืช *H. perforatum* ที่นำมาใช้ในการรักษาทางคลินิกของโรคซึมเศร้าเพิ่มมากขึ้น โดยพบว่าได้ผลดีกว่ายาหลอก (placebo) (Woelk, 2000; Sarris, 2007) ปัจจุบันในประเทศ

ที่พัฒนาแล้วมีการนำสารสำคัญจากพืชนี้มาใช้มากขึ้นและมีการพัฒนาตำรับยาหลายชนิดออกจำหน่ายเพิ่มมากขึ้น ทั้งในรูปยาแผนโบราณและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร (Franz, et al., 2011) ส่วน *Hypericum* ชนิดอื่น ๆ ที่นิยมนำมาใช้คือ *Hypericum androsaemum* (sweet-amber หรือ tutsan) พบในประเทศโปรตุเกส โดยใช้ส่วนเหนือดิน (erial parts) พบว่ามีฤทธิ์ในการขับปัสสาวะ (diuretic) และปกป้องตับ (hepatoprotective effects) (Almeida, et al., 2009) พืชชนิดนี้อาจมีจำนวนน้อยแต่ได้รับความนิยมในการนำมาใช้เพิ่มขึ้นมาก ส่งผลให้ราคาสูงกว่า St. John's wort (Valentao, et al., 2003) เนื่องจากพืชทั้งสองชนิดมีความต้องการในตลาดสูง และมักถูกขายในรูปแบบชิ้นส่วนหรือผงแห้ง จึงมีแนวโน้มที่จะมีความปนเปื้อนสูงทั้งโดยตั้งใจคือ ใส่พืชชนิดอื่นที่มีราคาถูกกว่าไปแทนหรือพืชในสกุลเดียวกันที่มีลักษณะคล้ายกันไปแทน หรือโดยไม่ตั้งใจคือการระบุชนิดผิดพลาดเนื่องลักษณะที่คล้ายกันของพืช ดังนั้นการหาวิธีที่น่าเชื่อถือที่สามารถระบุชนิดของพืชได้ทั้งวัตถุดิบสมุนไพรและผลิตภัณฑ์สมุนไพรจึงเป็นสิ่งที่มีความสำคัญและจำเป็น โดยเทคนิคที่นิยมใช้คือเทคนิค

real-time PCR ร่วมกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRM โดยขั้นตอนการทำดังนี้

การเตรียมตัวอย่าง การสกัดดีเอ็นเอและคุณภาพของดีเอ็นเอ (sample preparation, DNA extraction and quality of DNA)

ปกติการสกัดดีเอ็นเอจะเลือกส่วนที่มีการเจริญ เช่น ใบอ่อนหรือยอดอ่อนของพืช แต่หากต้องการข้อมูลของดีเอ็นเอที่เป็นต้นกำเนิดจะต้องสกัดจากเมล็ดที่ได้จากสถานที่เก็บพันธุ์พืชแห่งชาติ เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ตัวอย่างงานวิจัยจะใช้เมล็ดของพืช 2 ชนิด คือ *H. perforatum* และ *H. androsaemum* โดยเมล็ดตัวอย่างได้มาจาก 3 แหล่งและ 2 แหล่งที่ต่างกันตามลำดับ โดยการสกัดดีเอ็นเอมี 2 วิธี คือการสกัดด้วยวิธี (Cetyltrimethyl ammonium bromide-polyvinylpyrrolidone) CTAB-PVP ใช้สกัดส่วนใบและจากตัวผลิตภัณฑ์ในห้องตลาดและวิธีการสกัดด้วย Nucleospin Plant kit ใช้สกัดจากส่วนเมล็ด ส่วนการประเมินคุณภาพของดีเอ็นเอ โดยการใช้ UV spectrophotometric ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ส่วนการประเมินคุณภาพของสารสกัดดีเอ็นเอจากส่วนต่าง ๆ ของพืช แสดงให้เห็นว่าจากส่วนใบและจากตัวผลิตภัณฑ์ในห้องตลาดมีปริมาณแห้งพอ (89-335 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) และมีความบริสุทธิ์ (1.8 ± 0.2) ซึ่งได้จากค่าวัดการดูดกลืนแสง (Absorbance) และนำมาเข้าสมการ A_{260}/A_{280} (A_{260} คือค่าการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ A_{280} คือค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร) ถ้าได้ค่าระหว่าง 1.65-1.85 แสดงว่าดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ ถ้าหากได้ค่ามากกว่า 1.85 แสดงว่าในการเตรียมดีเอ็นเอมีโปรตีนหรือฟีนอลปะปนอยู่ ถ้าหากได้ค่าน้อยกว่า 1.65 แสดงว่ามีโปรตีนหรือฟีนอลปะปนอยู่) ส่วนสารสกัดจากเมล็ด แสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอปริมาณน้อย (< 5 ng/mL) แต่มีความบริสุทธิ์สูง (1.9 ± 0.2) สาเหตุที่สกัดดีเอ็นเอจากส่วนเมล็ดได้ปริมาณน้อยอาจเกิดจากความแข็งของเปลือกเมล็ด ทำให้บดได้ยากและส่วนมากในเมล็ดมีปริมาณโปรตีนที่เป็นแหล่งอาหารของ endosperm จำนวนมาก

การเลือกตำแหน่งของดีเอ็นเอเพื่อนำมาวิเคราะห์และการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะ (DNA regions for design specific primers)

ปัจจุบันมีดีเอ็นเอหลายบริเวณที่สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืชสมุนไพร โดยดีเอ็นเอในส่วนที่ไม่ถูกถอดรหัสพันธุกรรม (noncoding intergenic spacers) เช่น ITS, *trnH-psbA* และส่วนที่ถูกถอดรหัสพันธุกรรม (plastidial coding sequences) เช่น *matK*, *rbcL* โดยดีเอ็นเอที่ได้รับความนิยมสำหรับแยกความแตกต่างของพืชแต่ละชนิด จะมี 2 ส่วน คือ *matK* และ *rbcL* ซึ่งได้รับการรับรองว่าเป็นส่วนที่ดีที่จะใช้ในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืช นอกจากนี้ในดีเอ็นเอส่วน internal transcribed spacer (ITS) ซึ่งอยู่ระหว่างยีน 18S และ 5.8S rRNA จะพบดีเอ็นเอส่วน ITS1 ส่วนระหว่างยีน 5.8S และ 28S rRNA จะพบดีเอ็นเอส่วน ITS2 ซึ่งได้รับความนิยมให้เป็นบาร์โค้ดเนื่องจากมีศักยภาพในการระบุชนิดของพืชสมุนไพร

ในปัจจุบันมีการนำข้อมูลเกี่ยวกับดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชไปใช้ เพื่อช่วยแยกพืชที่มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์คล้ายกัน โดยการแยกพืชในสกุล *Hypericum* คือ *H. perforatum* และ *H. androsaemum* และใช้ดีเอ็นเอจาก 2 ยีน ที่ได้รับความนิยม คือ ITS1 ซึ่งถูกพิจารณาว่ามีศักยภาพที่สามารถแยกความแตกต่างของพืชแต่ละสายพันธุ์ได้ และ *matK* ซึ่งมีวิวัฒนาการสูง มีความยาวเหมาะสม และมีอัตราการเปลี่ยนแปลงต่ำ (Little, 2014) ข้อมูลของดีเอ็นเอส่วน ITS1 และ *matK* ของพืชทั้ง 2 ชนิด ได้มาจาก NCBI database (ตาราง 2) หลังจากนั้นนำสายดีเอ็นเอมาเปรียบเทียบกัน (alignment) เพื่อออกแบบไพรเมอร์ใหม่ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพืชสกุล *Hypericum* ได้ซึ่งไพรเมอร์ที่ได้ถูกสังเคราะห์โดยบริษัท Eurofins MWG Operon นอกจากนี้ไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ได้ยังนำไปทำการวิเคราะห์การข้ามสายพันธุ์ของพืช (cross-reaction) กับข้อมูลดีเอ็นเอของพืชอีก 37 ชนิด เพื่อใช้วิเคราะห์การข้ามสายพันธุ์ของพืช ผลการทดลองพบว่าไม่เกิดการข้ามสายพันธุ์ และในการทำ real-time PCR จะใช้ปฏิกิริยา (ตาราง 3) โดยแยกการดำเนินการตามไพรเมอร์ที่ออกแบบมาให้จำเพาะกับพืชแต่ละชนิด

ตาราง 2

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณผลผลิตพีซีอาร์ของพืชสกุล *Hypericum*

ตำแหน่งเป้าหมาย	ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'→3')	ขนาดผลผลิต พีซีอาร์ (bp)	อ้างอิงและ Genbank accession no.
ITS1 sequencing			–	
<i>H. androsaemum</i> / <i>H. perforatum</i>	ITS1-F ITS1-R	TGAACCTGCGGAAGGATCATT AGATATCCGTTGCCGAGAGT	297/298	AY573012.1/ EU796888.1
ITS1 species-specific				
<i>H. androsaemum</i>	HA-ITS-F2 HA-ITS-R2	TTTATCCCCGTAACCCCGTG AGGTTCCCTTGCGCGTGCC	116	Costa, et al. (2016)
<i>H. perforatum</i>	FO2 HRI-S	CATAAGAAGTGTAAGGCTCCCGG AGAGTCGTTATTGTTATGAA- CAGAACAGAAAGGAG	85	Crockett, et al. (2004)
matK sequencing				
<i>H. androsaemum</i> / <i>H. perforatum</i>	matK-F matK-R	ATCCAACCATTTTCGGGTTTC TCGTATCGCTGAAGGACTGA	358	HM850934/ HQ331618
matK species-specific				
<i>H. androsaemum</i>	HA-matK-F1 HA-matK-R1	TACTATACAGTTGTTCAAGGACCC TCATTAAAGTGCCGTACTCCTG	92	Costa, et al. (2016)
<i>H. perforatum</i>	HP-matK-F1 HP-matK-R1	TAAATATACAGTGTTC AAGGACC CATTATAAGTGGCGTACTCCTT	92	Costa, et al. (2016)

ตาราง 3

ขั้นตอนการทำ real-time PCR แยกตามไพรเมอร์ที่จำเพาะกับพืชแต่ละชนิด

ขั้นตอนพีซีอาร์	ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับพืชในสกุล	ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับในระดับชนิด (species) ในพืชสกุล
	Hypericum	Hypericum
	ไพรเมอร์ ITS1-F/ITS1-R หรือ matK-F/matK-R	ไพรเมอร์ FO2/HRI-S, HA-ITS1-F2/HA-ITS1-R2, HAMatK-F1/HA-matK-R1 หรือ HP-matK-F1/HP-matK-R1
Pre-Denaturation	อุณหภูมิ 95 °C ใช้เวลา 5 นาที	อุณหภูมิ 95 °C ใช้เวลา 5 นาที
Denaturation	อุณหภูมิ 95 °C ใช้เวลา 30 วินาที	อุณหภูมิ 95 °C ใช้เวลา 30 วินาที
Annealing	อุณหภูมิ 61 °C หรือ 59 °C ใช้เวลา 45 วินาที	อุณหภูมิ 65 °C , 64 °C , 62 °C หรือ 59 °C ใช้เวลา 30 วินาที ตามลำดับของไพรเมอร์
Extension	อุณหภูมิ 72 °C ใช้เวลา 1 นาที	อุณหภูมิ 72 °C ใช้เวลา 30 วินาที
Final Extension	อุณหภูมิ 72 °C ใช้เวลา 5 นาที	อุณหภูมิ 72 °C ใช้เวลา 5 นาที

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing)

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ เมื่อสามารถเพิ่มผลผลิตพีซีอาร์ได้ จะนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยเครื่อง Sequencer โดยดีเอ็นเอส่วน ITS1 ของ *H. perforatum* 3 ตัวอย่าง และ *H. androsaemum* 2 ตัวอย่าง ที่ใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับดีเอ็นเอส่วน ITS1 ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 297-298 bp เมื่อได้ลำดับดีเอ็นเอของส่วน ITS1 ของพืช *H. androsaemum* และ *H. perforatum* (ภาพ 1)

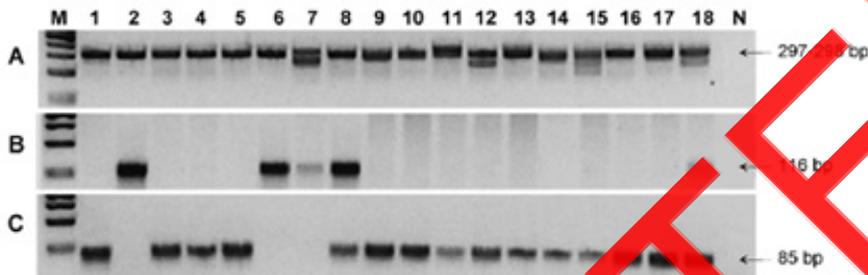
นำมาเปรียบเทียบกันพบว่ามีความแตกต่างกันหลายตำแหน่งของสายนิวคลีโอไทด์จากความแตกต่างของลำดับเบสของสายนิวคลีโอไทด์สามารถนำมาออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับพืชแต่ละชนิด สำหรับ *H. androsaemum* ไพรเมอร์ที่จำเพาะคือ HA-ITS1-F2/HA-ITS1-R2 เมื่อทำพีซีอาร์จะได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาดเท่ากับ 116 bp และไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ *H. perforatum* คือ FO2/HRI-S เมื่อทำพีซีอาร์มีขนาดผลผลิตพีซีอาร์ขนาดเท่ากับ 85 bp



ภาพ 1 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน ITS1 ของพืช *Hypericum androsaemum* และ *Hypericum perforatum*

จากผลการทดลองพบว่า ไพรเมอร์ HA-ITS1-F2 /HA-ITS1-R2 และ FO2/HRI-S สามารถเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอเป้าหมายของพืชในสกุล *Hypericum* ได้ และพบว่า มี 2 ตัวอย่างที่ผลการทดลองไม่สอดคล้องกับผลจากคือ ตัวอย่างใน lane 8 เป็นผลิตภัณฑ์ในท้องตลาดมีการเขียน ฉลากระบุไว้ว่าเป็น 100% *H. androsaemum* แต่ผลการ

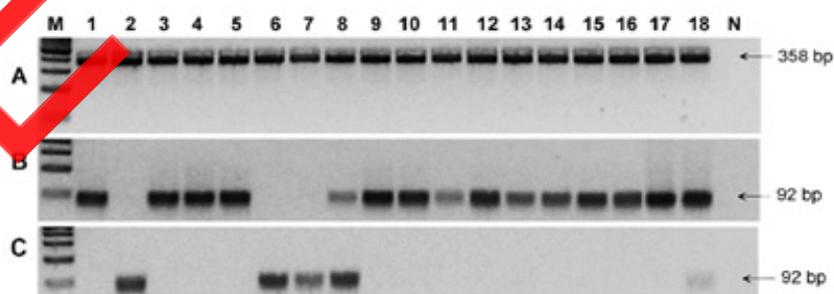
ทดลองพบว่า มีแบนเกิดขึ้น 2 แบนแสดงว่า ตรวจพบพืช ทั้งสองชนิด (ภาพ 2) และตัวอย่างใน lane 18 ระบุในฉลาก ว่าคือ *H. perforatum* แต่ผลการทดลองพบว่า ยังปรากฏ แถบดีเอ็นเอจาง ๆ ของ *H. androsaemum* (ภาพ 2) แสดง ให้เห็นว่ามีการผสมกันของพืชทั้ง 2 ชนิด



ภาพ 2 ผลผลิตพีซีอาร์ของดีเอ็นเอส่วน ITS1 โดยผลผลิตพีซีอาร์ของดีเอ็นเอส่วน *matK* (A) *Hypericum* sp. (B) *H. androsaemum* และ (C) *H. perforatum* โดย Lane 1 คือ *H. perforatum* 100%, Lane 2 คือ *H. androsaemum* 100%, Lane 3-5 คือ *H. perforatum* ที่ได้จาก USDA-ARS Germplasm, Lane 6-7 คือ *H. androsaemum* ที่ได้จาก USDA-ARS Germplasm และ Kew garden, Lane 8 คือ *H. androsaemum* 100%, Lane 9-18 คือ *H. perforatum* ที่ได้จากผลิตภัณฑ์ ในท้องตลาด

ส่วนการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ซึ่งเป็นยีนได้รับเลือกกว่าเป็นยีนที่เหมาะสมที่จะนำมา ทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด ได้รับความนิยมนับเป็นอันดับสองใน การนำมาใช้ในการระบุความแตกต่างของพืช โดยการ ทดลองพืชในสกุล *Hypericum* ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ

พืชสกุล *Hypericum* จะได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 358 bp แต่เนื่องจากการอ่านลำดับเบสในช่วง 50 bp มีความไม่ แน่นอนจึงทำให้เหลือขนาดลำดับเบสที่มีความถูกต้อง คือ 320 bp หลังจากนั้นนำมาออกแบบไพรเมอร์ใหม่ที่มีความ จำเพาะให้ได้ยีนดีเอ็นเอขนาด 92 bp



ภาพ 3 ผลผลิตพีซีอาร์ของดีเอ็นเอส่วน *matK* (A) *Hypericum* sp. (B) *H. androsaemum* และ (C) *H. perforatum* โดย Lane 1 คือ *H. perforatum* 100%, Lane 2 คือ *H. androsaemum* 100%, Lane 3-5 คือ *H. perforatum* ที่ได้จาก USDA-ARS Germplasm, Lane 6-7 คือ *H. androsaemum* ที่ได้จาก USDA-ARS Germplasm และ Kew garden, Lane 8 คือ *H. androsaemum* 100%, Lane 9-18 คือ *H. perforatum* ที่ได้จากผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด



ภาพ 4 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน *matK* ของพืช *Hypericum androsaemum* และ *Hypericum perforatum*

การประยุกต์ใช้วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบเวลาจริงร่วมกับเทคนิคการวิเคราะห์การคลายเกลียวของสายดีเอ็นเอ (application of Real-Time PCR couple high resolution melting analysis)

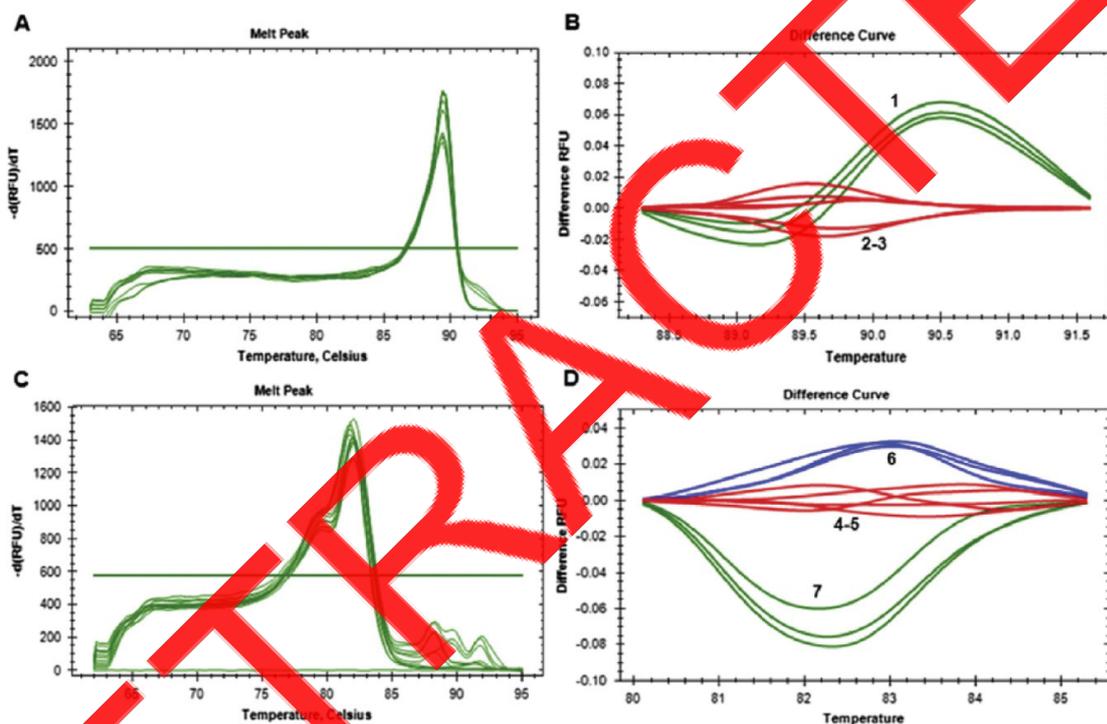
จากหลักการดังกล่าวข้างต้นสามารถประยุกต์ใช้กับพืชสมุนไพร โดยในการทำ real-time PCR จะแสดงผลการทดลองเมื่อจบในแต่ละรอบของปฏิกิริยา และประมวลผลโดยใช้โปรแกรม Bio-Rad CFX Manager 3.1 และการวิเคราะห์ HRM จะนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาให้อุณหภูมิเพิ่มขึ้นครั้งละ 0.02 °C/s จนถึง 95 °C นำข้อมูลที่ได้มาหาค่า melting curve ค่าที่ได้สามารถระบุความ

แตกต่างของพืชแต่ละชนิดได้ เนื่องจากความแปรปรวนของดีเอ็นเอภายในส่วน ITS1 จะมีความแปรปรวนสูงกว่าส่วน *matK* เมื่อทำ real-time PCR โดยใช้ Evagreen เป็นสีย้อมเรืองแสงเพื่อหาเป้าหมายในพืชแต่ละชนิดคือ *H. androsaemum* หรือ *H. perforatum* ผลการทดลองพบว่าพืช *H. androsaemum* มีอุณหภูมิ melting คือ 89.6 °C (ภาพ 5) ซึ่งไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพืชที่เป็นต้นแบบและตัวอย่างผลิตภัณฑ์จากท้องตลาดได้ แต่เมื่อวิเคราะห์ต่อโดยใช้ HRM พบว่ามีกลุ่มที่แตกต่างกัน 2 กลุ่ม มีความแม่นยำในระดับสูง (> 98.8%) โดยผลการวิเคราะห์ HRM จะสามารถแยกพืชที่ได้มาจาก NCBI database accession no.0122906 และ herbal infusion

ของ *H. androsaemum* ที่ระบุว่ามีควมบริสุทธิ์ 100% เป็นกลุ่มที่ 1 ในขณะที่พืชอีกชนิดที่ได้ข้อมูลจาก NCBI database accession no. PI618712 จะแยกออกมาอยู่เป็นกลุ่มที่ 2 (ภาพ 5)

ส่วนผลการทดลอง real-time PCR สำหรับ *H. perforatum* พบว่ามีอุณหภูมิ melting คือ 82.0 °C และจุดรองคือ 79.6 °C (ภาพ 5) หลังจากนั้นนำไปทำการวิเคราะห์ต่อยุ่ด้วยเทคนิค HRM พบว่าผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้สามารถแยกความแตกต่างของพืชได้ 3 กลุ่ม (ภาพ 5) โดย

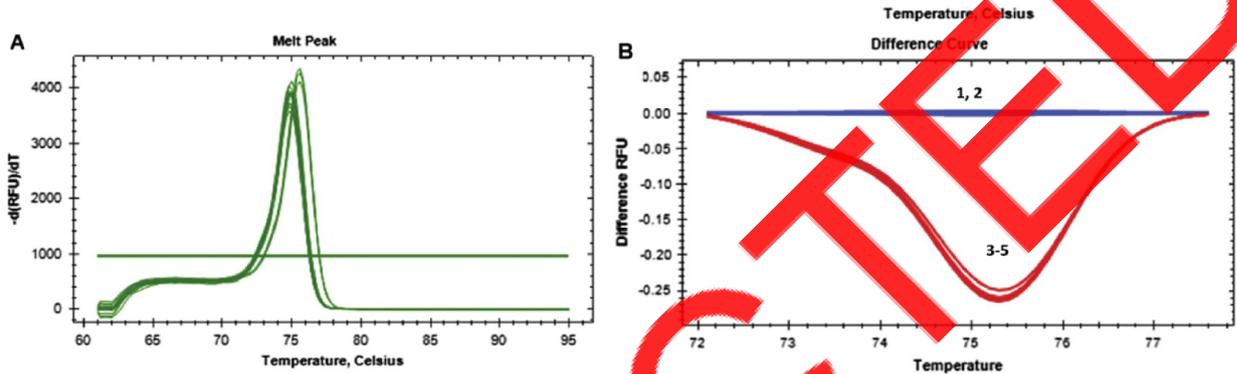
มีระดับความน่าเชื่อถือสูง (98.0 %) ผลของการวิเคราะห์ HRM สามารถอธิบายได้ว่ามีความแปรปรวนสูงภายในของ ITS1 ส่งผลให้เทคนิค HRM สามารถแยกความแตกต่างระดับ intra-species ได้ (ภาพ 5) โดยการวิเคราะห์ด้วย HRM นั้น เป็นวิธีการวิเคราะห์ขั้นสูงที่ใช้สำหรับบอกความแตกต่างของพืชสองชนิดที่มีลำดับเบสที่ใกล้เคียงกันมาก ๆ เป็นวิธีที่รวดเร็วและแม่นยำ จึงถูกนำมาใช้เป็นเครื่องมือสำหรับยืนยันการประเมินผลของ DNA mini-barcode ในส่วน ITS1 สำหรับพืช *Hypericum* ทั้ง 2 ชนิด



ภาพ 5 ผลจากการทำ real-time PCR (A, C) และการวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค HRM (B, D) ของดีเอ็นเอในส่วน ITS1 ส่วน (A, B) คือ *H. androsaemum* และ (C, D) คือ *H. perforatum* หมายเลข 1, 2 คือ *H. androsaemum* (accessions PI618712 และ 0122906 provided by USDA-ARS Germplasm (Beltsville, MD, USA) และ by RBG (Kew, Ardingly, UK) ตามลำดับ) หมายเลข 3 คือ 100% *H. androsaemum* (commercial herbal infusion) หมายเลข 4 คือ 100% *H. perforatum* (commercial herbal infusion) หมายเลข 5-7 คือ *H. perforatum* (accessions PI325351, Ames27495 และ PI664858 provided by USDA-ARS Germplasm (Beltsville, MD, USA)

ผลการทดลองจาก real-time PCR พบว่ามีอุณหภูมิ melting คือ 75.8 °C สำหรับพืช *H. androsaemum* และ อุณหภูมิ melting คือ 75 °C สำหรับพืช *H. perforatum* (ภาพ 6) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบจาก peak ที่ได้จะมีลักษณะของ peak ที่คล้ายกันจึงไม่สามารถแยกความแตกต่างของพืชได้ เมื่อนำมาวิเคราะห์ต่อยุทธวิธีด้วยเทคนิค HRM พบว่าลักษณะของ peak มีความแตกต่างกัน สามารถแยก

ความแตกต่างกันระหว่างพืชทั้ง 2 ชนิดได้ (ภาพ 6) ซึ่งมีความน่าเชื่อถือสูง (> 99.5%) นอกจากนี้การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRM ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืชสมุนไพรในท้องตลาดเพื่อระบุความถูกต้องของพืช *Hypericum* ทั้ง 2 ชนิดได้และมีความน่าเชื่อถือสูง (ตาราง 4)



ภาพ 6 ผลจากการทำ real-time PCR (A) และการวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค HRM (B) ของดีเอ็นเอในส่วน *matK* หมายเลข 1, 2 คือ *H. androsaemum* (accessions PI618712 และ 0122906, provided by USDA-ARS Germplasm (Beltsville, MD, USA) และ by RBG (Kew, Ardingly, UK) หมายเลข 3-5 คือ *H. perforatum* (accessions PI325351, Ames27495 และ PI664858, respectively provided by USDA-ARS Germplasm (Beltsville, MD, USA)), using specific primers for each species in single assay

บทสรุป

การใช้วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบเวลาจริงนำมาใช้ร่วมกับการวิเคราะห์ด้วยการคลายเกลียวของสายดีเอ็นเอ จะส่งผลให้การตรวจสอบสมุนไพรที่มีความรวดเร็วถูกต้องแม่นยำและเป็นวิธีที่ทำได้จำนวนมาก เป็นวิธีที่น่าสนใจ สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับพืชสมุนไพรที่ต้องการระบุความถูกต้องได้ การศึกษาดีเอ็นเอในส่วน ITS1 และ *matK* ที่มีศักยภาพในการนำมาทำดีเอ็นเอมินิบาร์โค้ด สามารถนำมาใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของ

H. perforatum และ *H. androsaemum* ที่อยู่ในรูปแบบชาขงได้ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS1 และ *matK* สามารถนำไปพัฒนาต่อเป็นไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อพืชแต่ละชนิดเพื่อใช้ในวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบเวลาจริงร่วมกับการวิเคราะห์ด้วยการคลายเกลียวของสายดีเอ็นเอ โดยวิธีดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการแยกสมุนไพรที่ผสมกันในรูปแบบชาขงได้ อีกทั้งยังสามารถประยุกต์ใช้วิธีนี้ในการตรวจสอบชนิดของพืชที่ระบุไว้บนฉลากเพื่อแยกพืชที่ปนปลอมได้

ตาราง 4

การประยุกต์ใช้วิธี RT-PCR ร่วมกับ HRM ในการตรวจสอบความถูกต้องของผลิตภัณฑ์สมุนไพร 18 ตัวอย่างในท้องตลาด

ตัวอย่าง	Species declared in label		<i>H. perforatum</i>		<i>H. androseamum</i>	
	<i>H. perforatum</i>	<i>H. androseamum</i>	PCR results	HRM (% of confidence \pm SD ^d)	PCR results	HRM (% of confidence \pm SD ^d)
1	X		+	99.3 \pm 0.2	-	
2		X	-		-	98.7 \pm 0.4
3	X ^a		+	99.9 \pm 0.0	-	
4	X ^b		+	99.5 \pm 0.2	-	
5	X ^a		+	99.9 \pm 0.1	-	
6		X ^a	-		+	99.7 \pm 0.1
7		X ^d	-		+	99.8 \pm 0.2
8	X		+	99.5 \pm 0.1	+	99.1 \pm 0.5
9	X		+	99.8 \pm 0.1	-	
10	X		+	99.7 \pm 0.1	-	
11	X		+	98.9 \pm 0.2	-	
12	X		+	99.7 \pm 0.1	-	
13	X		+	99.7 \pm 0.3	-	
14	X		+	99.8 \pm 0.1	-	
15	X		+	99.9 \pm 0.1	-	
16	X		+	99.8 \pm 0.2	-	
17	X ^c		+	99.5 \pm 0.3	-	
18	X		+	99.5 \pm 0.4	+	98.9 \pm 0.1

^aVoucher seeds provided by USDA-ARS Germplasm (Beltsville, MD, USA) and by.

^bRBG (Kew, Ardingly, UK).

^cLabels state the presence of “Hipericao” without specifying *Hypericum* species.

^dMean of % of confidence \pm standard deviation.

โดย หมายเลข 1 คือ *H. perforatum* 100%, หมายเลข 2 คือ *H. androsaemum* 100%, หมายเลข 3-5 คือ *H. perforatum* ที่ได้จาก USDA-ARS Germplasm, หมายเลข 6-7 คือ *H. androsaemum* ที่ได้จาก USDA-ARS Germplasm และ Kew garden, หมายเลข 8 คือ *H. androsaemum* 100%, หมายเลข 9-18 คือ *H. perforatum* ที่ได้จากผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด



References

- Almeida, I. F., Fernandes, E., Lima, J. L., Costa, P. C., & Bahia, M. F. (2009). In vitro protective effect of Hypericum androsaemum extract against oxygen and nitrogen reactive species. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 105(4), 222-227.
- Costa, J., Campos, B., Amaral, J. S., Nunes, M. E., Oliveira, M., & Mafra, I. (2016). HRM analysis targeting ITS1 and matK loci as potential DNA mini-barcodes for the authentication of Hypericum perforatum and Hypericum androsaemum in herbal infusions. *Food Control*, 61(2016), 105-114.
- Crockett, S. L., Douglas, A. W., Scheffler, B. E., & Khan, I. A. (2004). Genetic profiling of Hypericum (St. John's Wort) species by nuclear ribosomal ITS sequence analysis. *Planta Medica*, 70(10), 929-935.
- Franz, C., Chizzola, R., Novak, J., & Sponza, S. (2011). Botanical species being used for manufacturing plant food supplements (PFS) and related products in the EU member states and selected third countries. *Food & Function*, 2(12), 720-730.
- Guedes, A. P., Franklin, G., & Fernandes-Ferreira, M. (2012). Hypericum sp.: Essential oil composition and biological activities. *Phytochemistry Reviews*, 11(1), 127-152.
- Little, D. P. (2014). A DNA mini-barcode for land plants. *Molecular Ecology Resources*, 14(3), 437-446.
- Nettuwakul, C., Rungroj, N., Sawasdee, N., Sudtachat, N., & Yenchitsomanus, P. (2013). Detection of SNP rs5989 in prothrombin gene by polymerase chain reaction and high resolution melting analysis. *Thai Journal of Genetics*, 6(1), 54-59. (in Thai)
- Penso, G. (1983). *Index plantarum medicinalium totius mundi eorumque synonymorum: INPLAMED*. Milan: OEMF.
- Sarris, J. (2007). Herbal medicines in the treatment of psychiatric disorders: A systematic review. *Phytotherapy Research*, 21(8), 557-559.
- Soontrajarn, K., Sanyapeung, M., Phromwong, N., & Chotechuen, S., (2013). Detection of a fragrant gene in rice by real-time PCR. *The 36th Rice and Temperate Cereal Crops Annual Conference 2013*, Bangkok. (in Thai)
- Uthaiwat, P., Poomthong, A., Swangvaree, S., Teerajetgul, Y., Changtrakun, D., & Pooart, J. (2015). Genotyping of human papillomavirus high risk type by high resolution melting analysis. *KKU Science Journal*, 43(1), 60-68. (in Thai)
- Valentao, P., Dias, A., Ferreira, M., Silva, B., Andrade, P. B., Bastos, M. L., & Seabra, R. M. (2003). Variability in phenolic composition of Hypericum androsaemum. *Natural Product Research*, 17(2), 135-140.
- Wittwer, C. T., Reed, G. H., Gundry, C. N., Vandersteen, J. G., & Pryor, R. J. (2003). High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clinical Chemistry*, 49(6), 853-860.
- Woelk, H. (2000). Comparison of St. John's wort and imipramine for treating depression: Randomised controlled trial. *British Medical Journal*, 321(7260), 536-539.

