การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อแยกความแตกต่างของกุ่มบกและกุ่มน้ำ

Study of DNA profiling for discriminating between *Crateva adansonii* and *Crateva magna*

พุทธิดา เทพนรรัตน์[1*], พินภัทร ไตรภัทร[2], ณัฐชยา เซี่ยงฉิน[3], พรนภา เจริญกิจ[4], สุชาดา สุขหร่อง[5] และประวิทย์ อัครเสรีนนท์[6]

Puthida Thepnorarat[1*], Pinpat Tripatara[2], Natchaya Ziangchin[3], Phornnapa Charoenkij[4], Suchada Sukrong[5] and Pravit Akarasereenont[6]

[1] นักศึกษาระดับปริญญาโท, หลักสูตรการแพทย์แผนไทยประยุกต์มหาบัณฑิตและวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล, มหาวิทยาลัยมหิดล

[1] Graduate student, Center of Applied Thai Traditional Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University.

[2] ผู้ช่วยศาสตรจารย์ ดร., ภาควิชาเภสัชวิทยา, คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล, มหาวิทยาลัยมหิดล

[2] Assistant Professor, Ph.D., Department of Pharmacology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University.

[3] สถานการแพทย์แผนไทยประยุกต์, คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล, มหาวิทยาลัยมหิดล

[3] Center of Applied Thai Traditional Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University.

[4] ภาควิชาเภสัชวิทยา, คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล, มหาวิทยาลัยมหิดล

[4] Department of Pharmacology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University.

[5] ศาสตรจารย์ ดร., ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์, คณะเภสัชศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

[5] Professor, Ph.D., Department of Pharmacology and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University.

[6] รองศาสตราจารย์ ดร., สถานการแพทย์แผนไทยประยุกต์, คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล, มหาวิทยาลัยมหิดล

[6] Associate Professor, Ph.D., Center of Applied Thai Traditional Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University.

[*]**Corresponding author, E-mail:** puthida.the@mahidol.edu

บทคัดย่อ

กุ่มบกมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Crateva adansonii* DC. และกุ่มน้ำมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Crateva magna* (Lour.) DC. อยู่ในวงศ์ CAPPARACEAE เป็นสมุนไพรที่ใช้รักษากันมาอย่างยาวนาน กุ่มบกมีสรรพคุณช่วยขับลม กระตุ้นความอยากอาหารและบำรุงร่างกาย กุ่มน้ำช่วยเพิ่มความอยากอาหารและบำรุงร่างกาย อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าส่วนของเปลือกและใบของกุ่มน้ำมีสารไฮโดรเจนไซยาไนด์ที่เป็นพิษ หากนำมาใช้อาจทำให้เกิดพิษต่อร่างกายได้ แต่เปลือกของกุ่มบกและกุ่มน้ำ ยังมีขายอยู่ตามท้องตลาดทั่วไป และแทบจะไม่สามารถจำแนกเครื่องยาได้ ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบเพื่อแยกสมุนไพรสองชนิดนี้ โดยใช้เทคนิคแถบรหัสดีเอ็นเอ

ตัวอย่างพืชทั้ง 2 ชนิด ถูกนำมาตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยเก็บตัวอย่างจากพื้นที่ต่าง ๆ ในประเทศไทย 11 ตัวอย่าง จัดทำพรรณไม้อ้างอิงเก็บในพิพิธภัณฑ์พืช ตรวจสอบและระบุชนิดโดยผู้เชี่ยวชาญพบว่าเป็น *Crateva adansonii* DC. จำนวน 5 ตัวอย่าง และ *Crateva magna* (Lour.) DC. จำนวน 6 ตัวอย่าง จากนั้นทำการศึกษาแถบรหัสดีเอ็นเอ 2 บริเวณ คือยีน *mat*K, *ycf*1 พบว่าบริเวณยีน *ycf*1 มีความแตกต่างภายในนิวคลิโอไทด์ จึงออกแบบไพรเมอร์ที่บริเวณจุดต่างและใช้เทคนิคมัลติเพล็กพีซีอาร์ พบว่าสามารถแยกความแตกต่างของตัวอย่างทั้งหมดได้ จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการใช้เทคนิคทางพันธุกรรม สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์และจำแนกตัวอย่างกุ่มบก และกุ่มน้ำได้

คำสำคัญ: กุ่มบก, กุ่มน้ำ, แถบรหัสดีเอ็นเอ, มัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

Abstract

Crateva adansonii DC. (CA) and *Crateva magna* (Lour.) DC. (CM) belong to the Capparaceae family. They are medicinal plants that have been used in Thai traditional medicine for a long time. CA are traditionally used as a decoction for carminative effects, stimulate appetite and body tonic. The bark of CM is mixed in the decoction for enhancing appetite and body tonic. However, the leaf and stem of CM contain some toxic compounds, especially hydrogen cyanide, but the dried barks of CA and CM are still sold in the market and hardly to clarify in terms of a quality control process. Thus, this study aims to recognize and discriminate CA and CM's bark using DNA barcoding technique.

The results revealed the authentic plant samples were identified by morphological characteristics. A total of eleven samples were collected from the different locations in Thailand. Five samples of *Crateva adansonii* DC. (CA) and six samples of *Crateva magna* (Lour) DC. (CM). were authentically identified and by botanists and specialists. The voucher specimens were deposited at Herbarium. In the part of DNA barcoding technique, two DNA barcode regions were studied, *mat*K and *ycf*1 regions and the

sequences were analyzed. The multiplex polymerase chain reaction (PCR) based on *ycf*1 regions were examined and successfully applied for the discrimination of CA and CM. The results from this study indicated the genetic assessment was useful for the identification and discrimination of CA and CM, and such techniques will be of benefit in identifying the obtained CA or CM.

Keywords: *Crateva adansonii*, *Crateva magna*, DNA barcoding, Multiplex PCR

บทนำ

ปัจจุบันพืชสมุนไพร ยาและผลิตภัณฑ์สมุนไพรเป็นที่สนใจมากขึ้น มีการใช้เป็นทางเลือกในการรักษาโรคต่าง ๆ รวมถึงการดูแลสุขภาพเชิงป้องกัน การตรวจสอบความถูกต้องและมาตรฐานของวัตถุดิบสมุนไพรจึงเป็นปัญหาสำคัญในการผลิต และกระบวนการควบคุมคุณภาพของสมุนไพร นอกจากนี้อุตสาหกรรมยาสมุนไพรจำนวนมากประสบปัญหาการทดแทน การระบุที่ผิดพลาด และการปลอมปนของวัตถุดิบสมุนไพรที่มีสายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกันอย่างใกล้ชิด ซึ่งส่งผลต่อคุณภาพ ประสิทธิภาพ และความปลอดภัยของยาและผลิตภัณฑ์จากสมุนไพร (Techen et al., 2014)

ในปัจจุบันมีวิธีการพิสูจน์พืชสมุนไพร เช่น การใช้อนุกรมวิธาน สัณฐานวิทยา คีโมเมทริก และวิธีการโมเลกุล (Zhao Z et al., 2006) รวมไปถึงการวิเคราะห์ทางเคมี เช่น รงขเลขผิวบาง หรือ Thin Layer Chromatography (TLC), โครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง หรือ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) เป็นต้น แต่การตรวจสอบทางเคมีมีข้อจำกัดบางประการในการพิจารณาพันธุ์พืชที่มีสปีชีส์ (species) เดียวกัน เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีที่คล้ายคลึงกันและสภาวะแวดล้อมอาจส่งผลต่อองค์ประกอบพฤกษเคมี (Phoolcharoen & Sukrong, 2013; Techen et al., 2014). เทคนิคทางอณูชีววิทยาได้ถูกนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบ ได้แก่ การวิเคราะห์เมตาบอลิซึมและการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ซึ่งมีประโยชน์ในการจำแนก การระบุพืชสมุนไพรที่มีความสับสนหรือสายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องอย่างใกล้ชิด (Parveen et al., 2016)

ตามศาสตร์การแพทย์แผนไทยมีการใช้เปลือกกุ่ม 2 ชนิด คือ กุ่มบก หรือ *Crateva adansonii* DC. (CA) และ กุ่มน้ำ หรือ *Crateva magna* (Lour.) DC. (CM) เป็นยารักษาทางการแพทย์แผนไทยมาอย่างยาวนาน (Smitinand and Larsen, 1991) ในกุ่มบกสรรพคุณทางแผนไทย กล่าวว่า *เปลือก* มีรสร้อน ขับลม แก้ปวดท้อง แก้ท้องเสีย ขับผายลม แก้บวม บำรุงธาตุ กระตุ้นลำไส้ให้ทำงาน บำรุงหัวใจ แก้โรคผิวหนัง แก้นิ่ว มีคุณเสมอกับเปลือกมะรุมและเปลือกกุ่มน้ำ ยาพื้นบ้านใช้*เปลือกต้น* ผสมในตำรับยาต้ม เป็นยาเจริญอาหารและยาอายุวัฒนะ (Chuakul et al., 1997). โดยใช้ในปริมาณน้อย เพราะหากใช้มากเกินไปอาจส่งผลให้ร่างกายเกิดภาวะขาดออกซิเจนและทำให้เสียชีวิตได้ แต่เปลือกกุ่มที่มีขายอยู่ในท้องตลาดไม่ได้มีการระบุชนิด ซึ่งเมื่อถูกนำมาเป็นเครื่องยาแล้ว ไม่สามารถแยกได้ด้วยตาเปล่า ทำให้มีความเสี่ยงในการนำไปใช้ได้ การแยกความแตกต่างของเครื่องยากุ่มบกและกุ่มน้ำ จึงมีความจำเป็น

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

พิสูจน์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกุ่มบกและกุ่มน้ำ ของยีน *mat*K และ *ycf*1 เพื่อแยกความแตกต่างของเครื่องยากุ่มบกและกุ่มน้ำ

วิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บตัวอย่าง และการตรวจสอบพันธุ์พืช (Plant collection and authentication)

ตัวอย่างพืชทั้งหมดถูกเก็บจากพื้นที่ต่าง ๆ ในประเทศไทย ได้แก่ กรุงเทพมหานคร, นครปฐม, เพชรบุรี, สุรินทร์ และอุบลราชธานี ตรวจสอบชื่อพืชกับหนังสือชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย (เต็ม สมิตินันท์, 2557). จัดทำพรรณไม้อ้างอิง (Herbarium specimen) ส่งให้ผู้เชี่ยวชาญด้านพฤษศาสตร์ตรวจสอบเก็บตัวอย่างไว้ที่พิพิธภัณฑ์สำนักหอพรรณไม้แห่งประเทศไทย กรุงเทพมหานคร และพิพิธภัณฑ์พืชสมุนไพร ภาควิชาเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

การพิสูจน์เอกลักษณ์สมุนไพรด้วยแถบรหัสดีเอ็นเอ (DNA barcoding authentication)

1. การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (Genomic DNA extraction) สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากตัวอย่างพืชสดด้วยด้วยชุดสกัด DNesasy® Plant Mini Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีของบริษัท

2. การหาปริมาณดีเอ็นเอ (DNA quantification) ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ของแต่ละตัวอย่างประเมินโดยการเปรียบเทียบความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่สกัดกับเครื่องหมาย Lambda/Hind III (Promega, USA) และนำไปตรวจสอบคุณภาพของตัวอย่างดีเอ็นเอ

3. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR amplification) นำจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้ มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยไพรเมอร์ *mat*K และ *ycf*1 รายละเอียดดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์

Primer regions	Primer names	Primer sequences (5'-3')	Tm (°C)	References
*mat*K	*mat*K-390F	CGA TCT ATT CAT TCA ATA TTT C	48.79	Cuénoud *et al.*, 2002
	*mat*K-1326R	TCT AGC ACA CGA AAG TCG AAG T	59.71	
*ycf*1	*ycf*1bF	TCT CGA CGA AAA TCA GAT TGT TGT GAA T	57.0	Dong *et al.*, 2015
	*ycf*1bR	ATA CAT GTC AAA GTG ATG GAA AA	51.1	

4. วิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ของดีเอ็นเอเป้าหมาย (DNA amplification and nucleotide sequencing) ผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) จะถูกวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติ จากนั้นนำผลการวิเคราะห์ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากฐานข้อมูลสากล คือ GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)

5. การออกแบบไพรเมอร์ (Primer design) ยีนเป้าหมายที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ คือ ยีน *ycf*1 โดยใช้ข้อมูลจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ที่มีจุดต่างมาออกแบบไพรเมอร์ ได้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) จากนั้นนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิคการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าผ่านเจลอะกาโรส เพื่อทดสอบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอนั้นสามารถใช้จำแนกความแตกต่างของกุ่มบกและกุ่มน้ำได้หรือไม่

ผลการวิจัย

การระบุชนิดพืช

ตัวอย่างกุ่มบก 5 แหล่ง และกุ่มน้ำ 6 แหล่ง จากตารางที่ 2 เมื่อตรวจสอบชื่อพืชจากหนังสือชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย (เต็ม สมิตินันท์, 2557) และจัดทำพรรณไม้อ้างอิง (Herbarium specimen) ส่งให้ผู้เชี่ยวชาญด้านพฤษศาสตร์ตรวจสอบ พบว่ากุ่มบกจากทั้ง 5 แหล่ง (CA1 CA3 CA13 CA14 และ CA15) มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Crateva adansonii* DC. และกุ่มน้ำจากทั้ง 6 แหล่ง (CM2 CM4 CM8 CM10 CM11 และ CM12) มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Crateva magna* (Lour.) DC.

ตารางที่ 2 ข้อมูลแหล่งเก็บพืชสมุนไพรจากพื้นที่ต่าง ๆ ในประเทศไทย

ชื่อพืช	รหัส	วันที่เก็บ	แหล่งที่เก็บ
กุ่มบก *Crateva adansonii* DC.	CA1	25 มี.ค. 2559	นครปฐม
	CA3	27 ก.ย. 2559	กรุงเทพมหานคร
	CA13	19 พ.ย. 2559	เพชรบุรี
	CA14	20 พ.ย. 2559	สุรินทร์
	CA15	22 ก.ย. 2559	กรุงเทพมหานคร
กุ่มน้ำ *Crateva magna* (Lour.) DC.	CM2	25 มี.ค. 2559	นครปฐม
	CM4	16 ธ.ค. 2559	กรุงเทพมหานคร
	CM8	23 ต.ค. 2559	อุบลราชธานี
	CM10	31 มี.ค. 2560	อุบลราชธานี
	CM11	20 เม.ย. 2560	เพชรบุรี
	CM12	20 เม.ย. 2560	เพชรบุรี

การวิเคราะห์แถบรหัสดีเอ็นเอของตัวอย่างพืช

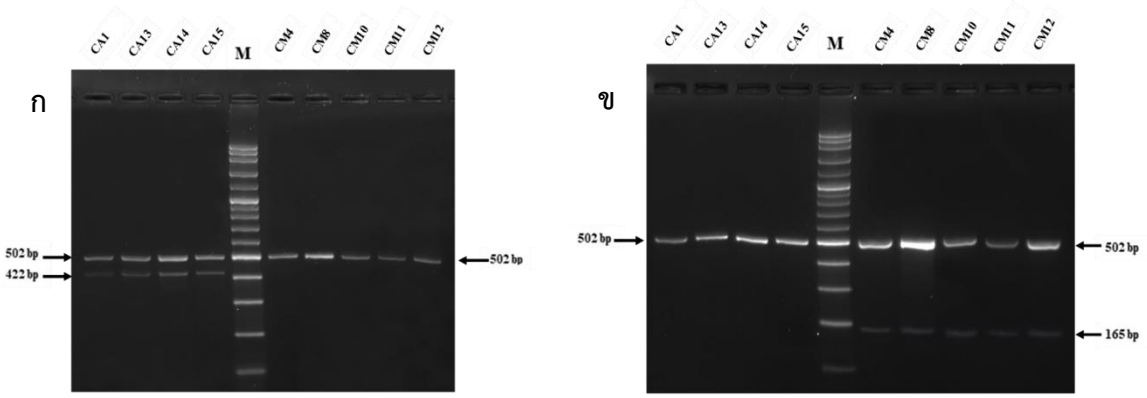
การวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของยีนบริเวณ *ycf*1 และ *mat*K ของ *Crateva adansonii* DC. และ *Crateva magna* (Lour.) DC. แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์**แถบรหัสดีเอ็นเอ**ของพืช 11 ตัวอย่าง ที่บริเวณ *ycf*1 และ *mat*K

Species	*mat*K			*ycf*1		
	obtained sequence length (bp)	GC content (%)	Average variation (%)	obtained sequence length (bp)	GC content (%)	Average variation (%)
CA1	827	32.89	0.117	743	27.46	0.371
CM2	693	32.32		793	28.12	
CA3	784	33.55		792	28.54	
CM4	810	33.33		625	26.72	
CM8	815	33.25		782	27.75	
CM10	816	33.21		807	28.50	
CM11	783	33.33		437	26.09	
CM12	817	33.05		602	27.41	
CA13	548	32.12		681	27.75	
CA14	746	31.77		755	27.68	
CA15	835	33.05		782	27.88	

การออกแบบไพรเมอร์ และมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

ในยีน *ycf*1 นิวคลิโอไทด์ตำแหน่งที่ 222 มีความจำเพาะต่อ *Crateva adansonii* DC. และตำแหน่งที่ 452 มีความจำเพาะต่อ *Crateva magna* (Lour.) DC. ชุดไพรเมอร์จำเพาะ CA_ycf1-F และ CM_ycf1-F ขนาด 422 และ 165 คู่เบส ตามลำดับ ถูกนำไปทดลองมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ โดยใช้ int_ycf1-F และ int_ycf1-R ขนาด 502 คู่เบส เป็นชุดไพรเมอร์ควบคุม จากนั้นตรวจสอบด้วยเทคนิคการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าผ่านเจลอะกาโรส ชุดไพรเมอร์จำเพาะสามารถใช้จำแนกความแตกต่างของ *Crateva adansonii* DC. และ *Crateva magna* (Lour.) DC. ได้ (ภาพที่ 1ก และ 1ข)



ภาพที่ 1 2.5% เจลอะกาโรสของผลผลิตพีซีอาร์ที่ใช้ชุดไพรเมอร์จำเพาะ ก : int_ycf1-F, CA_ycf1-F และ int_ycf1-R ที่บริเวณ *ycf*1 ของ *Crateva adansonii* DC. และ *Crateva magna* (Lour) DC. ข : int_ycf1-F, CM_ycf1-F และ int_ycf1-R บริเวณ *ycf*1 ของ *Crateva adansonii* DC. และ *Crateva magna* (Lour) DC.

สรุปและอภิปรายผล

การพิสูจน์ตัวตนและการระบุชนิดเป็นกระบวนการพื้นฐานสำหรับการประกันคุณภาพ ทำให้สมุนไพรมีความน่าเชื่อถือ เปลือกของ *Crateva adansonii* DC. (กุ่มบก) และ *Crateva magna* (Lour) DC. (กุ่มน้ำ) ที่อยู่ในวงศ์ Capparaceae ในท้องตลาด มีความคล้ายคลึงจนไม่สามารถแยกด้วยตาเปล่าได้ การศึกษานี้จึงได้ทำการตรวจสอบโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับการใช้เทคนิคแถบรหัสดีเอ็นเอ และออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อสมุนไพร พัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุล เพื่อใช้ในการพิสูจน์ตัวตนและการระบุชนิดได้

ตัวอย่างพืช 11 แหล่ง ระบุชนิดเบื้องต้นด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ประกอบด้วยกุ่มบก 5 ตัวอย่าง และกุ่มน้ำ 6 ตัวอย่าง นำมาตรวจสอบด้วยเทคนิคแถบรหัสดีเอ็นเอที่ตำแหน่งยีน 2 บริเวณ คือ *mat*K และ *ycf*1 เพื่อแยกพืชในสกุล *Crateva* ออกจากสายพันธุ์อื่น ๆ พบว่ายีนบริเวณ *ycf*1 มีความแตกต่างของลำดับนิวคลิโอไทด์ จึงออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะ และนำไปทดสอบพบว่าสามารถแยกสมุนไพรทั้ง 2 ชนิดได้ ข้อมูลที่ได้จากการทดลองนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการตรวจสอบและควบคุมการใช้สมุนไพรให้ปลอดภัยได้ อีกทั้งยังสามารถพัฒนาวิธีการตรวจสอบและพิสูจน์ตัวตน เพื่อนำไปใช้กับสมุนไพรให้หลากหลายชนิดที่กำลังประสบปัญหาความสับสนในการใช้ เพื่อให้เกิดความปลอดภัยในการใช้ยามากยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

เต็ม สมิตินันทน์. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ. 2557 กรุงเทพมหานคร: ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้; 2544. 810 หน้า.

Techen, N., Parveen, I., Pan, Z., & Khan, I. A. (2014). DNA barcoding of medicinal plant material for identification. *Curr Opin Biotechnol, 25*, 103-110. doi: 10.1016/j.copbio.2013.09.010

Zhao Z, Hu Y, Liang Z, Yuen JP, Jiang Z, & Leung KS. (2006). Authentication is fundamental for standardization of Chinese medicines. *Planta Med, 72*(10), 865-874.

Phoolcharoen, W., & Sukrong, S. (2013). Molecular analysis of Vitex species using candidate DNA barcoding and PCR-RFLP of the matK gene for authentication of Vitex glabrata. *Nat Prod Commun, 8*(1), 125-128. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23472476

Parveen, I., Gafner, S., Techen, N., Murch, S. J., & Khan, I. A. (2016). DNA Barcoding for the Identification of Botanicals in Herbal Medicine and Dietary Supplements: Strengths and Limitations. *Planta Med, 82*(14), 1225-1235. doi:10.1055/s-0042-111208

Smitinand, T., & Larsen, K. (1991). *Flora of Thailand. Vol.5 part 3*. Bangkok: Royal Forest Department.

Chuakul, W., Saralamp, P., Paonil, W., Temsiririrkkul, R., & Clayton, T. (1997). *Medicinal Plants in Thailand. Vol.2* (Vol. 2). Bangkok: Department of Pharmaceutical Botany, Mahidol university.