



E47219

ข้อกำหนดทางเภสัชวิทยาและเภสัชภัณฑ์ทางเภสัชของใบฉันทินิจฉัย

นายวรชัย คูณิศรพงศ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชวิทยา การศึกษาเภสัชวิทยาและเภสัชภัณฑ์ทุกภาคส่วน
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553
ฉบับตีพิมพ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

๒๐๐๒๕๔๑๓๒



E47219

ข้อกำหนดทางเภสัชเวชและเอกลักษณ์ทางโมเลกุลของไบอินทินิลน้ำ



นาย วรรัช จูติกรพงศ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชเวช ภาควิชาเภสัชเวชและเภสัชพฤษศาสตร์

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา ๒๕๕๓

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



5 1 7 6 5 8 3 6 3 3

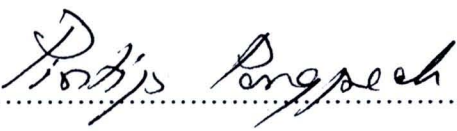
PHARMACOGNOSTIC SPECIFICATION AND MOLECULAR
AUTHENTICATION OF *LAGERSTROEMIA SPECIOSA* LEAVES

Mr. Woratouch Thitikornpong


A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy Program in Pharmacognosy
Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2010
Copyright of Chulalongkorn University


Thesis Title	Pharmacognostic specification and molecular authentication of <i>Lagerstroemia speciosa</i> leaves
By	Mr. Woratouch Thitikornpong
Field of Study	Pharmacognosy
Thesis Advisor	Assistant Professor Suchada Sukrong, Ph.D.
Thesis Co-Advisor	Associate Professor Thatree Padungcharoen, M.Sc. in Pharm.

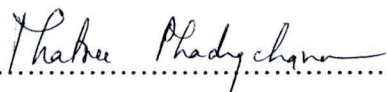
Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn
University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree



..... Dean of the Faculty of
Pharmaceutical Sciences
(Associate Professor Pinthip Pongpech, Ph.D.)


THESIS COMMITTEE


..... Chairman
(Professor Kittisak Likhitwitayawuid, Ph.D.)


..... Thesis Advisor
(Assistant Professor Suchada Sukrong, Ph.D.)


..... Thesis Co-Advisor
(Associate Professor Thatree Phadungcharoen, M.Sc. in Pharm)


..... Examiner
(Associate Professor Nijisri Ruangrunsi, Ph.D.)


..... External Examiner
(Piyarat Chareonsap, Ph.D.)

วรัช จูติกรพงศ์ : ข้อกำหนดทางเภสัชเวทและเอกลักษณ์ทางโมเลกุลของใบ
อินทนิลน้ำ. (PHARMACOGNOSTIC SPECIFICATION AND
MOLECULAR AUTHENTICATION OF *LAGERSTROEMIA SPECIOSA*
LEAVES) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ. ร.ต.อ. หญิง ดร. สุชาดา สุขหรั่ง,
อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ธาตรี ผดุงเจริญ, 131 หน้า.

E47219

อินทนิลน้ำ (*Lagerstroemia speciosa* L. Pers.) จัดอยู่ในวงศ์ Lythraceae ใช้ใบ
ชงดื่มเป็นยาแก้เบาหวาน สารสำคัญในใบได้แก่โคโรโซลิก แอซิด ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม
โพรเทอร์พีน การวิจัยนี้เป็นการศึกษาถึงคุณสมบัติทางเภสัชเวทของใบอินทนิลน้ำที่เก็บจาก
แหล่งปลูกและร้านขายยาแผนโบราณจำนวน 17 ตัวอย่าง และจัดทำมาตรฐานตามข้อกำหนด
ของตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย จากการศึกษาลักษณะทางกายวิภาคและเนื้อเยื่อวิทยา พบ
ปากใบชนิดอะนโมไซติกและผลึกแคลเซียมออกซาเลตรูปดอกกุหลาบสะสมในชั้นพารากิมา
ค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำหนักรที่หายไปเมื่อทำให้แห้ง ความชื้น แฉะรวม แฉะที่ไม่ละลายในกรด มี
ค่าร้อยละ 8.2141, 7.8593, 7.4725 และ 1.2176 โดยน้ำหนักแห้งตามลำดับ ขณะที่ค่าปริมาณสิ่ง
สกัดในเอทานอล สิ่งสกัดในน้ำ และสิ่งสกัดในไดคลอโรมีเทนมีค่าอยู่ที่ร้อยละ 9.0280, 2.9442
และ 13.1895 โดยน้ำหนักแห้งตามลำดับ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาลักษณะทางโครมาโท
กราฟีโดยแสดงกระสวนขององค์ประกอบทางเคมีบนรังคเลขผิวบางของสารสกัดเมทานอล
และศึกษาเชิงปริมาณวิเคราะห์โดยการตรวจสอบปริมาณสารสำคัญโคโรโซลิก แอซิดโดย
เทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิกวิดโครมาโทกราฟี

การวิจัยนี้ยังได้วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสมุนไพรอินทนิลน้ำและพืชสกุล
ใกล้เคียง ได้แก่ อินทนิลบก ตะแบกนา เสดาใบใหญ่ โดยใช้เทคนิค Amplified Fragment
Length Polymorphism ผลการศึกษาพบแถบดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ของสมุนไพร
อินทนิลน้ำ ข้อมูลทั้งหมดจากงานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้พิสูจน์เอกลักษณ์สมุนไพรอินทนิลน้ำ
เพื่อให้เกิดประสิทธิผลและความปลอดภัยต่อผู้ใช้สมุนไพร

ภาควิชา เภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต..... ไร่ไร่ ไร่ไร่
สาขาวิชา เภสัชเวท..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
ปีการศึกษา 2553..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5176583633 : MAJOR PHARMACOGNOSY

KEYWORDS : *LAGERSTROEMIA SPECIOSA* / LYTHRACEAE /
PHARMACOGNOSTIC SPECIFICATION / DNA FINGERPRINT / AFLP

WORATOUCH THITIKORNPONG : PHARMACOGNOSTIC
SPECIFICATION AND MOLECULAR AUTHENTICATION OF
LAGERSTROEMIA SPECIOSA LEAVES. THESIS ADVISOR: ASST. PROF.
SUCHADA SUKRONG, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: ASSOC. PROF.
THATREE PHADUNGCHAROEN, M.Sc. in Pharm., 131 pp.

E47219

Lagerstroemia speciosa L. Pers. (Lythraceae) leaf is used as infusion tea for antidiabetes. Corosolic acid, a triterpene compound, was found in this leaf. In this study, seventeen dried leaves of *L. speciosa* were collected from natural sources and traditional drugstores for pharmacognostic specifications and setting up the standardization according to Thai Herbal Pharmacopoeia. Anatomical and histological characteristics were the presence of anomocytic stomata and parenchyma containing rosette aggregate crystals of calcium oxalate. The mean contents of loss on drying, moisture content, ash content, acid-insoluble ash were 8.2141, 7.8593, 7.4725, 1.2176% of dry weight respectively. Whereas the ethanol extractive value, water extractive value and dichloromethane extractive value were 9.0280, 13.1895, and 2.9442% w/w, respectively. In addition, chromatographic pattern was investigated. Thin layer chromatographic patterns of methanolic extract were demonstrated. The quantitative analysis by high performance liquid chromatography method using corosolic acid as a marker was also reported.

Moreover, this study gave detailed analysis of the DNA fingerprinting of *Lagerstroemia*. *L. speciosa* and closely related species, *L. macrocarpa*, *L. floribunda* and *L. loudinii* using the AFLP technique. A species-specific band of *L. speciosa* was found. All of these results provide highly useful information for the authentication of *L. speciosa* leaves. It will contribute to effectiveness and safety prior to use.

Department : Pharmacognosy and
Pharmaceutical botany

Field of Study : Pharmacognosy

Academic Year : 2010

Student's Signature Woratouch Thitikornpong

Advisor's Signature Suchada Sukrong

Co-Advisor's Signature Thatree Phadungcharoen

ACKNOWLEDGEMENTS

The success of this thesis has been attributed to the extensive support and assistance from his advisor, Assistant Professor Dr. Suchada Sukrong, Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University. The author would like to declare the deepest sense of thankfulness for her meaningful guidance and invaluable advices in every stage of the preparations for his thesis and support in publication and presentation concerning this study in several conferences. He thanks her also for providing him an opportunity to grow as a good student.

His deepest gratitude and appreciation is also expressed to Assoc. Prof. Thatree Phadungcharoen, his thesis co-advisor, for her great help, guidance, valuable suggestions, and kindness in collecting specimens.

His gratitude is sincerely grateful to the thesis committee for their important and constructive suggestions and crucial reviews of his thesis.

A large debt of his gratitude is owed to Dr. Thitaporn Phumchai, Rubber Research Institute of Thailand, Miss Intira Jarupeng, Mrs. Prapai Mojarin, Dr. Natthaporn Rujikachorn, Plant Genetic Conservation Project Under The Royal Initiation of H.R.H. Princess Maha chakri Sirindhorn, Mrs. Apinya Vetchapongsa, Vetchapong Drugstore, and his friends at the Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, who kindly offer their assistance, encouragement and helpful comments throughout his research.

The author would like to express grateful thanks to the Museum of Natural Medicines, Chulalongkorn University for allowing the use of microscope and a digital camera, the Pharmaceutical Research Central Laboratory Unit, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for providing High Performance Liquid Chromatography (HPLC) equipment, and the Chulalongkorn University Drug & Health products Innovation Promotion Center (CU.D.HIP), Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for providing Sequi-Gen GT Nucleic acid Electrophoresis cell and PCR instruments throughout the research study.

For the financial support, he is grateful to the Thailand Research Fund for a Master Research Grant (TRF-MAG Window I) and the Chulalongkorn Graduate School for a Thesis Grant.

CONTENTS

	Page
ABSTRACT (Thai).....	iv
ABSTRACT (English).....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	x
LIST OF FIGURES.....	xi
ABBREVIATIONS.....	xii
 CHAPTER	
I INTRODUCTION.....	1
II LITERATURE REVIEWS.....	4
2.1 Botanical data of <i>Lagerstroemia speciosa</i> L. Pers.....	4
2.2 The chemical constituents and the biological activities.....	8
2.3 Quality control methods for medicinal plants materials.....	11
2.3.1 Macroscopic examination.....	11
2.3.2 Inspection by microscopy.....	12
2.3.3 Constant values of leaves.....	14
2.3.3.1 Determination of stomatal index and stomatal number.....	14
2.3.3.2 Palisade ratio examination.....	17
2.3.3.3 Inspection of Vein-islet number.....	17
2.3.3.4 Investigation of Veinlet termination number.....	17
2.3.4 Thin layer chromatography (TLC).....	18
2.3.5 Phytochemical screening.....	19
2.3.6 Determination of physicochemical values.....	20
2.3.6.1 Loss on drying.....	20
2.3.6.2 Moisture content.....	20
2.3.6.3 Ash content.....	21

	Page
CHAPTER	
2.3.6.4 Extractive value	21
2.4 DNA Fingerprinting.....	22
III PHARMACOGNOSTIC SPECIFICATION	28
3.1 Materials and methods	29
3.1.1 Macroscopic and microscopic characterizations of	
<i>L. speciosa</i> leaves	29
3.1.2 Microscopic determination of constant numbers of leaf.....	32
3.1.3 Thin-layer chromatographic patterns of leaves extract.....	34
3.1.4 Phytochemical screening.....	35
3.1.5 Physicochemical determination.....	37
3.1.5.1 Loss on drying.....	37
3.1.5.2 Total ash.....	37
3.1.5.3 Acid insoluble ash.....	37
3.1.5.4 Extractive value.....	38
3.1.5.5 Determination of water.....	38
3.1.6 Quantitative analysis of corosolic acid by HPLC method....	39
3.2 Results.....	41
3.2.1 Organoleptic and microscopic investigations of	
<i>L. speciosa</i> leaves.....	41
3.2.2 The constant number of leaf.....	46
3.2.3 TLC analysis.....	46
3.2.4 Preliminary phytochemical test.....	46
3.2.5 Physico-chemical parameter.....	46
3.2.6 Corosolic acid contents in <i>L. speciosa</i> leaves.....	55
3.3 Discussion.....	59

	Page
CHAPTER	
IV AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (AFLP).....	63
4.1 Plant materials	63
4.2 Methods	65
4.2.1 Genomic DNA extraction	65
4.2.2 AFLPs Procedures	65
4.2.2.1 Digestion of genomic DNA	65
4.2.2.2 Ligation of genomic DNA	66
4.2.2.3 Pre-selective amplification	67
4.2.2.4 Selective amplification	68
4.2.3 Detection of AFLPs bands using denaturing polyacrylamide gel electrophoresis	70
4.2.4 Data analysis	70
4.3 Results	71
4.3.1 AFLP analysis	71
4.3.2 Genetic relationship	80
4.4 Discussion	81
V CONCLUSION	83
REFERENCES	85
APPENDICES	93
APPENDIX A	94
APPENDIX B	104
APPENDIX C	121
VITA	131

LIST OF TABLES

Table	Page
2.1 The list of <i>Lagerstroemia</i> species in Thailand.....	5
2.2 The chemical constituents of <i>L. speciosa</i> leaves and its biological activity.....	8
3.1 The fresh samples of <i>L. speciosa</i> used in this study.....	29
3.2 Intanin nam which were purchased from traditional drugstores.....	30
3.3 The constant values of <i>L. speciosa</i> leaves.....	48
3.4 R _f values of components in methanol extract of the leaves of <i>L. speciosa</i> leaves. Chloroform and acetone (4:1) was used as solvent system.....	50
3.5 R _f values of components in methanol extract of the leaves of <i>L. speciosa</i> leaves. Chloroform and methanol (95:5) was used as solvent system.....	52
3.6 Chemical test of powdered <i>L. speciosa</i> leaves.....	53
3.7 Physicochemical values (% w/w) in 17 samples of <i>L. speciosa</i> leaves..	54
3.8 Corosolic acid content (% w/w) in seventeen <i>L. speciosa</i> leaves.....	58
3.9 The constant number of <i>L. speciosa</i> leaves.....	59
3.10 General specification of <i>L. speciosa</i> leaves.....	61
4.1 Plant materials for AFLPs evaluation.....	64
4.2 Reaction mixture for digesting genomic DNA with restriction enzymes.....	65
4.3 Sequences of adapters and primers used for AFLPs analysis.....	66
4.4 Reaction mixture for nucleotide adapter ligation.....	67
4.5 Reaction mixture for pre-amplification reaction.....	67
4.6 Reaction mixture for selective amplification reaction.....	69
4.7 Primer combination, the number of AFLP bands, size range and the percentage of polymorphic bands resulted from AFLP analyses of this study.....	71

LIST OF FIGURES

Figure		Page
2.1	<i>Lagerstroemia speciosa</i> (L.) Pers.	6
2.2	Twig of <i>Lagerstroemia speciosa</i> , inflorescence and fruit.....	7
2.3	The chemical structure of corosolic acid.....	10
2.4	Micrometer.....	13
2.5	Epidermis in surface view illustrating patterns formed guard cells and surrounding cells.....	16
2.6	The process of Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) technique.....	25
3.1	Compound microscope Zeiss model Axiostar attached with digital camera Sony Cyber-shot DSC-S85.....	31
3.2	Azeotropic distillation method.....	40
3.3	Epidermal cell of <i>L. speciosa</i> leaf.....	42
3.4	Transverse section of midrib of <i>L. speciosa</i> leaves.....	43
3.5	Transverse section of lamina of <i>L. speciosa</i> leaves.....	43
3.6	Powdered drug of the leaf of <i>L. speciosa</i>	45
3.7	Vein-islet and veinlet termination of the <i>L. speciosa</i> leaves.....	47
3.8	Four upper contiguous epidermal cells with underlying palisade cells of <i>L. speciosa</i> leaves.....	47
3.9	TLC patterns of methanolic extracts of <i>L. speciosa</i> leaves using chloroform and acetone (4:1) as solvent system.....	49
3.10	TLC patterns of methanolic extracts of <i>L. speciosa</i> leaves using chloroform and methanol (95:5) as solvent system.....	51
3.11	HPLC/DAD chromatograms detected at 204 nm of corosolic acid, crude methanolic extract of <i>L. speciosa</i> leaves, and crude methanolic extract spiked with standard acid.....	56
3.12	Standard curve of corosolic acid, peak area at 204 nm.....	57
4.1	AFLP profile generated by primer combination of ER3AAC, MS3CAG.....	72

LIST OF FIGURES

Figure		Page
4.2	AFLP profile generated by primer combination of ER3AAC, MS3CAT.....	73
4.3	AFLP profile generated by primer combination of ER3AAC, MS3CTT.....	74
4.4	AFLP profile generated by primer combination of ER3AAG, MS3CTG.....	75
4.5	AFLP profile generated by primer combination of ER3ACC, MS3CAC.....	76
4.6	AFLP profile generated by primer combination of ER3ACC, MS3CAT.....	77
4.7	AFLP profile generated by primer combination of ER3ACC, MS3CTA.....	78
4.8	AFLP profile generated by primer combination of ER3ACC, MS3CTT.....	79
4.9	UPGMA dendrogram based on Jaccard’s similarity coefficient among <i>Lagerstroemia</i> and <i>Lawsonia inermis</i> accessions.....	80

ABBREVIATIONS

°C	=	degree Celsius
µg	=	microgram
µl	=	microliter
µM	=	micromolar
µm	=	micrometer
A, T, G, C	=	nucleotides containing the base adenine, thymine, guanine and cytosine, respectively.
AFLP	=	Amplified Fragment Length Polymorphism
AP-PCR	=	Arbitrarily Primed-PCR
ARMS	=	amplification refractory mutation system
AUC	=	area under curve
bp	=	base pair
BP	=	British Pharmacopoeia
CAPS	=	Cleaved Amplified Polymorphic Sequence
cm	=	centimeter
DALP	=	Direct Amplification of Length Polymorphism
DAMD	=	Directed Amplification of Minisatellite-region
ddNTPs	=	dideoxynucleotide triphosphates (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP)
DNA	=	deoxyribonucleic acid
dNTPs	=	deoxynucleotide triphosphates (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)

EP	=	Europe Pharmacopoeia
h	=	hour
HPLC	=	High Performance Liquid Chromatography
kb	=	kilobase
L	=	liter
M	=	mole
mg	=	milligram
MgCl ₂	=	Magnesium chloride
min	=	minute
ml	=	milliliter
mm	=	millimeter
mM	=	millimole
mm ²	=	square millimeter
ng	=	nanogram
nm	=	nanometer
PCR	=	Polymerase Chain Reaction
PCR-RFLP	=	Polymerase chain reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism
ppm	=	part per million
r ²	=	correlation coefficient
RFLP	=	Restriction Fragment Length Polymorphism
RP-PCR	=	Random Primed-Polymerase Chain Reaction
RT	=	retention time

SCAR	=	Sequence Characterized Amplified Regions
SD	=	standard deviation
sec	=	second
THP	=	Thai Herbal Pharmacopoeia
TLC	=	Thin-Layer Chromatography
USP	=	United State Pharmacopoeia
UV	=	ultraviolet light
V	=	volt
v	=	volume
w	=	weight
W	=	watt
WHO	=	World Health Organization