

ผลของสารควบคุมการเจริญต่อการผลิต
สารกลุ่มไดเทอร์พีนแลคโตนจากแคลลัสฟ้าทะลายโจร
Effect of Plant Growth Regulators on Diterpene Lactone
Production in Callus Culture of *Andrographis paniculata*

ชุตินา แก้วพิบูลย์*

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง

ตำบลบ้านพร้าว อำเภอบำพะยอม จังหวัดพัทลุง 93210

ณวงศ์ บุณนา

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์พื้นฐาน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ

วิทยาเขตสงขลา ตำบลเขารูปช้าง อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา 90000

Chutima Kaewpiboon*

Department of Biology, Faculty of Science, Thaksin University, Phatthalung Campus,

Ban Phrao, Pa Payom, Phatthalung 93210

Nawong Boonnak

Department of Basic Science and Mathematics, Faculty of Science, Thaksin University,

Songkhla campus, Khoa Roob Chang, Muang, Songkhla 90000

บทคัดย่อ

ฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*) เป็นสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เนื่องจากมีสารทุติยภูมิที่สำคัญกลุ่มแลคโตนรวม ซึ่งมีองค์ประกอบหลัก 4 ชนิด คือ andrographolide, neoandrographolide, 14-deoxy-11,12 didehydroandrographolide และ 14-deoxyandrographolide ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเมล็ดของฟ้าทะลายโจรในอาหารสังเคราะห์สูตรของ Murashige และ Skoog (MS) ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นนำชิ้นส่วนของใบไปชักนำให้เกิดแคลลัสในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญกลุ่มไซโตไคนินชนิด benzylaminopurine (BAP) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และกลุ่มออกซินชนิด 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส ซึ่งมีลักษณะเกาะกันอย่างหลวม ๆ (friable callus) จากนั้นสกัดสารจากแคลลัสฟ้าทะลายโจร ระบุชนิดของสารสกัด

ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (TLC) และวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มแลคโตนรวมด้วยเครื่อง UV-Vis สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ พบปริมาณสารแลคโตนรวมในแคลลัสของฟ้าทะลายโจรร้อยละ 7.31 ± 0.15 โดยน้ำหนัก

คำสำคัญ : ฟ้าทะลายโจร; แคลลัส; สารทุติยภูมิ; สารแลคโตนรวม

Abstract

Andrographis paniculata is a medicinal plant which attributes for diverse pharmacological properties. The main secondary metabolite of *A. paniculata* is total lactones which comprise of 4 compounds, such as andrographolide, neoandrographolide, 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide and 14-deoxyandrographolide. This research aims to induce callus for secondary metabolite production by cell culture technique. The effect of growth regulators, i.e. cytokinins as benzylaminopurine (BAP) and auxins as 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), on the induction of callus from explants cultured on Murashige and Skoog (MS) was studied. From the result, MS supplemented with BAP and 2,4-D at concentrations of 1 and 1 mg/L, respectively, can induce callus formation. Then compounds in the callus extract were analyzed by the TLC techniques, and lactones were determined by colorimetric method using UV-Vis spectrophotometer. The result showed that *Andrographis paniculata* callus contains 7.31 ± 0.15 %w/w total lactones.

Keywords: *Andrographis paniculata*; callus; secondary metabolite; total lactone

1. บทนำ

ฟ้าทะลายโจร [*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Wall. ex Nees] เป็นสมุนไพรที่จัดอยู่ในบัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2558 มีสรรพคุณบรรเทาอาการเจ็บคอและบรรเทาอาการโรคหวัด (common cold) เช่น เจ็บคอ ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ [1] นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ทางยาอีกหลายประการ เช่น ฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือด [2] ฤทธิ์ด้านการอักเสบ [3] ฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน และยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งหลายชนิด [4] กระทรวงสาธารณสุขจึงให้หน่วยงานบริการในสังกัดทุกระดับสั่งใช้ยาสมุนไพรฟ้าทะลายโจรเป็นยาลำดับแรก (first line drug) เนื่องจากพบสารทุติยภูมิกลุ่มแลคโตน (lactone) ซึ่งมีองค์ประกอบหลัก 4 ชนิด

deoxy-11,12-didehydroandrographolide และ 14-deoxyandrographolide [5,6] อย่างไรก็ตาม สารสำคัญดังกล่าวมีปริมาณต่างกัน ซึ่งแปรผันตามปัจจัยต่าง ๆ เช่น สภาพแวดล้อมของพื้นที่ปลูก ฤดูกาล ดังนั้นจึงใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อผลิตสารสำคัญทดแทนการผลิตสารจากการเพาะปลูกพืชตามธรรมชาติ เนื่องจากเซลล์พืชมีเยื่อหุ้มเซลล์ที่สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในกระบวนการชีวสังเคราะห์ต่าง ๆ และสร้างสารสำคัญได้เช่นเดียวกับพืชที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ ซึ่งข้อดีของการเพาะเลี้ยงเซลล์พืช คือ สามารถผลิตสารอย่างต่อเนื่อง สามารถควบคุมสภาวะแวดล้อมในการผลิต ปราศจากเชื้อก่อโรคพืช และไม่มีปัจจัยการผลิตอันเนื่องมาจากสิ่งแวดล้อมภายนอกเข้ามาเกี่ยวข้อง อีกทั้งขั้นตอนการ

สกัดและแยกสารให้บริสุทธิ์จากการเพาะเลี้ยงเซลล์พืช นั้นง่ายกว่าการสกัดจากชิ้นส่วนพืชอื่น ๆ ในธรรมชาติ [7] ปัจจุบันมีการผลิตสารทุติยภูมิจากการเพาะเลี้ยง เซลล์พืชหลายชนิด ได้แก่ องุ่น [8] ฟ้ายะลวย [9] บัวบก [10] เป็นต้น การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าองุ่น สามารถเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและสามารถชักนำให้เกิด แคลลัส [11] อีกทั้งยังพบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงฟ้ายะลวย ใจสามารถผลิตสารกลุ่มแลคโตนรวม โดยเฉพาะสาร andrographolide ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะในพืช มีหน้าที่ ป้องกันพืชไม่ให้เกิดโรค และมีฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาอิทธิพลของสาร ควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำ และการเจริญ เติบโตของแคลลัสฟ้ายะลวยใจ เพื่อใช้เป็นแหล่งผลิต สารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ ฟ้ายะลวยใจ

2. อุปกรณ์ และวิธีการ

2.1 การชักนำต้นอ่อนฟ้ายะลวยใจในหลอด ทดลอง

ฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดฟ้ายะลวยใจ โดยนำ เมล็ดฟ้ายะลวยใจแช่ในแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 เป็น เวลา 5 นาที จากนั้นแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 20 เป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างน้ำ กลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นแช่ เมล็ดฟ้ายะลวยใจที่ฟอกฆ่าเชื้อในน้ำกลั่นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารดัดแปลงสูตร MS เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

2.2 การชักนำแคลลัสฟ้ายะลวยใจในหลอด ทดลอง

นำชิ้นส่วนใบและก้านฟ้ายะลวยใจที่เจริญ ในหลอดทดลอง เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลซูโครส

3 เปอร์เซ็นต์ และผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยง ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกการเปลี่ยนแปลงของแคลลัส พร้อมกับชั่งน้ำหนักสดของแคลลัส

2.3 การสกัดสารจากแคลลัสฟ้ายะลวยใจ

ชั่งน้ำหนักแคลลัสจากใบฟ้ายะลวยใจอายุ 4 สัปดาห์ จากสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญ เติบโต 0.5 กรัม น้ำหนักสด แล้วนำไปอบที่ 40 องศาเซลเซียส แล้วบดให้ละเอียด และแช่สกัดสกัดด้วย สารละลายเอทานอล เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบ สูญญากาศ ตรวจสอบชนิดของสารด้วยเทคนิคโครมา โทกราฟีแบบแผ่นบาง (TLC) โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ คือ เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซนร้อยละ 70 และสังเกต ตำแหน่งของสารโดยใช้แสงอัลตราไวโอเลตความยาว คลื่น 254 นาโนเมตร จากนั้นนำไปหาค่า rate of flow (R_F) ซึ่งเป็นค่าเฉพาะตัวของสาร แสดงระยะทางที่สาร เคลื่อนตัวไปต่อระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ไปได้ แล้วเปรียบเทียบกับสารแลคโตนรวมมาตรฐาน

2.4 การวิเคราะห์เชิงปริมาณสารกลุ่ม แลคโตนรวมด้วยเทคนิคสเปกโตรโฟโตมิทรี

การวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเทคนิคการทำ ให้เกิดสีจากปฏิกิริยาเคมีที่จำเพาะกับสารกลุ่มแลคโตน รวม โดยชั่งแคลลัสฟ้ายะลวยใจแห้ง 260 มิลลิกรัม แช่สกัดในเอทานอล 200 มิลลิลิตร เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารสกัดใบฟ้ายะลวยใจปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย 3,5-ไดไนโตรเบนโซอิก แอซิด ความเข้มข้นร้อยละ 2 และสารละลายโซเดียม ไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 5 อย่างละ 30 ไมโคร ลิตร เขย่าต่อเนื่องเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นวัดค่าการ ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 541 นาโนเมตร และ คำนวณปริมาณสารกลุ่มแลคโตนรวมจากสมการ เส้นตรง (linear regression) ของกราฟมาตรฐาน โดย

ทดลอง 3 ซ้ำ

2.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลแสดงด้วยค่า $\text{mean} \pm \text{S.D.}$ ($n = 3$) ใช้โปรแกรม GraphPad Prism version 4 ในการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่าง 2 กลุ่ม ด้วยสถิติ Student's t-test โดยใช้ค่าความเชื่อมั่นทางสถิติที่ 0.05

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การชักนำแคลลัสฟัทะลายโจรในหลอดทดลอง

การชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบและก้านของฟัทะลายโจรที่เจริญจากเมล็ดในหลอดทดลองโดยเฉพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าเนื้อเยื่อมีการเปลี่ยนแปลงรูปเกิดเป็นแคลลัสเฉพาะใบ ซึ่งแคลลัสมีลักษณะร่วนฟู (friable callus) สีครีม (รูปที่ 1)

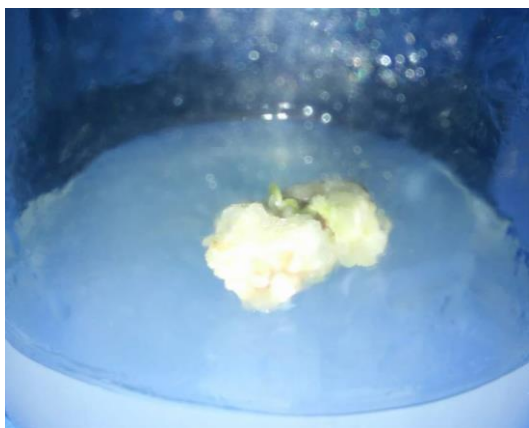


Figure 1 Callus from *Andrographis paniculata* leaf was induced by MS medium with BAP 1.0 mg/L and 2,4-D 1.0 mg/L in 14 h light for 4 weeks at 25 °C

ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sharmila

และคณะ 2013 ที่ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญกลุ่มไซโตไคนินและออกซินต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสฟัทะลายโจร พบว่าเติมการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดแคลลัสได้สูงสุด [12]

3.2 การสกัดสารทุติยภูมิจากแคลลัสฟัทะลายโจร

ผลการทดลองการสกัดสารทุติยภูมิจากแคลลัสฟัทะลายโจรด้วยการแช่สกัดในเอทานอล พบว่าค่าร้อยละผลผลิตของสารสกัดหยาบ (% extraction yield) คือ ร้อยละ 30

3.2.1 การตรวจสอบเอกลักษณ์ของสารทุติยภูมิจากแคลลัสฟัทะลายโจรด้วยเทคนิคแรงเคลื่อนบาง (thin layer chromatography, TLC)

ตรวจสอบเอกลักษณ์สารทุติยภูมิของสารสกัดจากแคลลัสฟัทะลายโจรด้วยเทคนิค TLC (silica gel 60 F₂₅₄) โดยใช้ระบบ 70 เปอร์เซ็นต์เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน แล้วตรวจสอบภายใต้แสงยูวี $\lambda = 256$ นาโนเมตร พบลักษณะแถบการแยกดังรูปที่ 2A โดยที่สารมาตรฐาน A คือ 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide และสารมาตรฐาน B คือ andrographolide จากนั้นสเปรย์แผ่น TLC ด้วยสาร cerium (IV) sulfate ที่เกิดปฏิกิริยาเคมีจำเพาะกับกลุ่มแลคโตน ทำให้เกิดแถบสีน้ำตาลดังรูปที่ 2B โดยสารมาตรฐาน C คือ neoandrographolide ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลอ้างอิง [13] ผลการทดลองตรวจสอบเอกลักษณ์สารทุติยภูมิของสารสกัดจากแคลลัสฟัทะลายโจร พบสารกลุ่มแลคโตน 3 ชนิด ได้แก่ 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide, andrographolide และ neoandrographolide มีค่า R_f ใกล้เคียงกับสารมาตรฐานกลุ่มแลคโตนรวม

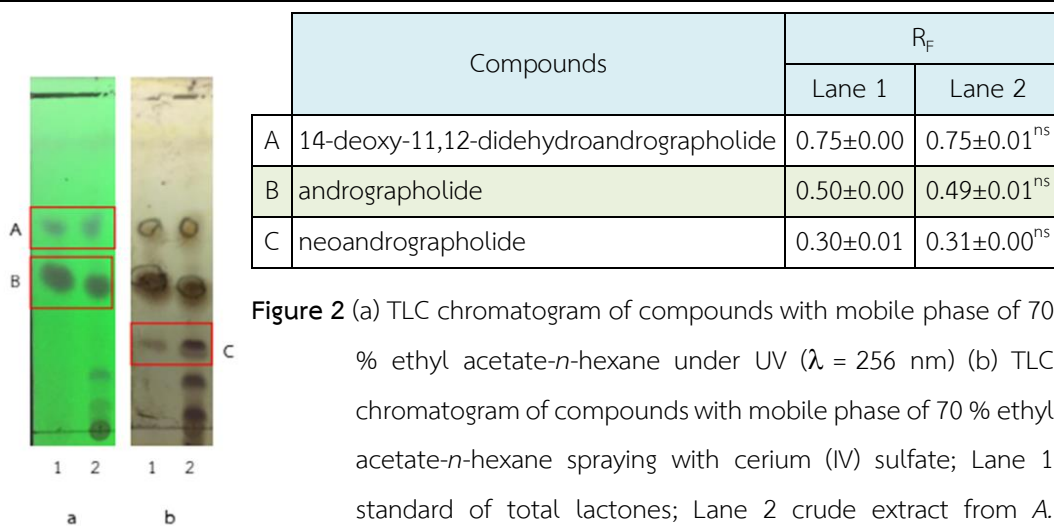


Figure 2 (a) TLC chromatogram of compounds with mobile phase of 70 % ethyl acetate-*n*-hexane under UV ($\lambda = 256$ nm) (b) TLC chromatogram of compounds with mobile phase of 70 % ethyl acetate-*n*-hexane spraying with cerium (IV) sulfate; Lane 1 standard of total lactones; Lane 2 crude extract from *A. paniculata* callus

โดยที่มีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (รูปที่ 2) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ศึกษาการผลิตสารทุติยภูมิกลุ่มแลคโตน ได้แก่ andrographolide ของการเพาะเซลล์แขวนลอย [14] แคลลัส [15] และราก [16] ของฟ้าทะลายโจร นอกจากนี้มีงานวิจัยที่สนใจเพิ่มปริมาณของสารแอนโดรกราโฟไลด์จากเซลล์เพาะเลี้ยงฟ้าทะลายโจร โดยการใช้การกระตุ้น (elicitation) ด้วยวิธีต่าง ๆ เช่น การใช้สารจากสิ่งมีชีวิต (biotic) ตัวอย่าง เช่น สารโคโคซาน กรดซาลิไซลิก [17]

3.3 การวิเคราะห์เชิงปริมาณสารกลุ่มแลคโตนรวมด้วยเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี

การวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเทคนิคการทำให้เกิดสีจากปฏิกิริยาเคมีที่จำเพาะกับสารกลุ่มแลคโตนรวม พบปริมาณสารกลุ่มแลคโตนรวมในแคลลัสฟ้าทะลายโจรร้อยละ 7.31 ± 0.15 โดยน้ำหนัก

4. สรุป

การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสฟ้าทะลายโจรเพื่อการผลิต

สารทุติยภูมิ พบว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบของฟ้าทะลายโจรในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีสัดส่วนกลุ่มไซโทไคนินเท่ากับออกซิน โดยใช้ BAP ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และพบว่าแคลลัสที่ได้จากฟ้าทะลายโจรมีลักษณะร่วนฟูและมีการสะสมสารทุติยภูมิกลุ่มแลคโตนรวม 3 ชนิด ได้แก่ 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide, andrographolide และ neoandrographolide เช่นเดียวกันกับที่พบในใบฟ้าทะลายโจร ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ฟ้าทะลายโจรเพื่อการผลิตสารกลุ่มแลคโตน และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาและพัฒนากระบวนการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อเพื่อการผลิตสารกลุ่มแลคโตนต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยโครงการวิจัยเงินรายได้มหาวิทยาลัยทักษิณ ประเทพทุนวิจัย

บูรณาการ กองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยทักษิณ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2562 และเงินทุนรายวิชาโครงการวิจัยสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง และขอขอบคุณข้อมูลสนับสนุนบางส่วนจาก นางสาวฤทัยรัตน์ ชัยศิริ

6. References

- [1] Jarukamjorn, K. and Nemoto, N., 2008, Pharmacological Aspects of *Andrographis paniculata* on health and its major diterpenoid constituent andrographolide, *J. Health Sci* 54: 370-381.
- [2] Akhtar, M.T., Sarib, M.S.B.M., Ismail, I.S., Abas, F., Ismail, A., Lajis, N.H. and Shaari, K., 2016, Anti-diabetic activity and metabolic changes induced by *Andrographis paniculata* plant extract in obese diabetic rats, *Molecules* 21(8): 1026.
- [3] Low, M., Khoo, C.S., Münch, G., Govindaraghavan, S. and Sucher, N.J., 2015, An in vitro study of anti-inflammatory activity of standardised *Andrographis paniculata* extracts and pure andrographolide, *BMC Complem. Altern. Med.* 15(1): 18.
- [4] Menon, V. and Bhat, S., 2010, Anticancer activity of andrographolide semisynthetic derivatives. *Nat Prod Commun.* 5(5): 717-720.
- [5] Hossain, M.S., Urbi, Z., Sule, A. and Hafizur Rahman, K.M., 2014, *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Wall. ex Nees: A review of ethnobotany, phytochemistry, and pharmacology, *Sci. World J.* 2014: 274905-274905.
- [6] Santos-Neto, L.L.D., de Vilhena Toledo, M.A., Souza, P.M. and de Souza, G.A., 2006, The use of herbal medicine in Alzheimer's disease – a systematic review, *Evidence-based Complem. Altern. Med.* 3: 441-445.
- [7] Dias, M.I., Sousa, M.J., Alves, R.C. and Ferreira, I.C.F.R., 2016, Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review, *Ind. Crops Prod.* 82: 9-22.
- [8] Saw, N.M.M.T., Riedel, H., Cai, Z., Kütük, O. and Smetanska, I., 2012, Stimulation of anthocyanin synthesis in grape (*Vitis vinifera*) cell cultures by pulsed electric fields and ethephon. *Plant Cell, Tiss. Organ Cult.* 108: 47-54.
- [9] Marwani, D.P.E., Wardhani, K. and Esyanti, R., 2015, Development of hairy root culture of *Andrographis paniculata* for in vitro andrographolide production, *J. Med. Bioeng.* 4: 446-450.
- [10] Loc, N.H. and Nhat, N.T.D., 2013, Production of asiaticoside from centella (*Centella asiatica* L. Urban) cells in bioreactor, *Asian Pacific J. Trop. Biomed.* 3: 806-810.
- [11] Kaewpiboon, C., 2004, Effect of Plant Growth Regulators to the Differentiation and Development of Grape Callus,

- Bachelor's Special Project in Applied Biology, King Mongkut's institute of Technology Ladkrabang, Bangkok. (in Thai)
- [12] Sharmila, R., Subburathinam, K.M. and Sugumar, P., 2013, Effect of growth regulators on andrographolide production in callus cultures of *Andrographis paniculata*, Adv. Biotech. 12(9): 17-19.
- [13] Sombut, S., Bunthawong, R., Sirion, U., Kasemsuk, T., Piyachaturawat, P., Suksen, K., Suksamrarn, A. and Saeeng, R., 2017, Synthesis of 14-deoxy-11,12-didehydro andrographolide analogues as potential cytotoxic agents for cholangiocarcinoma, Bioorg. Med. Chem. Lett. 27: 5139-5143.
- [14] Sharma, S.N. and Jha, Z., 2012, Production of andrographolide from callus and cell suspension culture of *Andrographis paniculata*, J. Cell Tiss. Res. 12: 3423-3429.
- [15] Jindal, N., Kajla, S. and Chaudhury, A., 2016, Establishment of callus cultures of *Andrographis paniculata* for the assesment of andrographolide content, Int. J. Res. Ayurveda Pharm. 7: 197-201.
- [16] Praveen, N., Manohar, S.H., Naik, P.M., Nayeem, A., Jeong, J.H. and Murthy, H.N., 2009, Production of andrographolide from adventitious root cultures of *Andrographis paniculata*, Curr. Sci. 96: 694-697.
- [17] Vakil, M. and Mendhulkar, V., 2013, Salicylic acid and chitosan mediated abiotic stress in cell suspension culture of *Andrographis paniculata* (Burm.F.) Nees. for andrographolide synthesis, Int. Pharm. Sci. Res. 4: 3453-3459.