

การศึกษาการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดกึ่งสังเคราะห์จากกระท่อม (7-Hydroxymitragynine) โดยใช้แบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* และ *Escherichia coli* (WP2 *uvrA*) ด้วยวิธีทดสอบเอมส์
สุจิต อุ่นกาส^{1,*} พราว สุภจริยาวัตร¹ วิจิตรา สุธ่วง¹ ปัทยา ศิรินันท์ธนานนท์¹ วีระชัย พิพัฒน์รัตนเสรี²
พรชัย สันเจริญโกไคย¹

¹สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000

²ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12 สงขลา

บทคัดย่อ

กระท่อม (*Mitragyna speciosa*, Korth) พบในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ตามตำรายาแพทย์แผนไทย ระบุสรรพคุณใช้ระงับอาการปวดท้อง แก้บิด แก้ท้องเสีย ระงับอาการปวดเมื่อยตามร่างกาย และระงับประสาท โดยมีสารสำคัญเป็นสารในกลุ่มอัลคาลอยด์ สารหลักซึ่งพบมากที่สุด คือ ไมทราไจนิน (mitragynine) และยังมีสารอนุพันธ์ เช่น 7-hydroxymitragynine (7-OHMG) ออกฤทธิ์แรงกว่า mitragynine เหมาะสำหรับนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์และสาธารณสุข แต่ข้อมูลด้านความปลอดภัยของสารออกฤทธิ์จากพืชชนิดนี้ยังมีอย่างจำกัด การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดกึ่งสังเคราะห์จากกระท่อม 7-OHMG ในเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537) และ *Escherichia coli* (WP2*uvrA*) ด้วยวิธีทดสอบเอมส์ (Ames test) ที่ความเข้มข้น 6 ระดับ (15, 50, 150, 500, 1,500 และ 5,000 µg/plate) ในระบบที่มีและไม่มีเอนไซม์กระตุ้น ผลการทดสอบไม่เกิดการก่อกลายพันธุ์ในเชื้อแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ ทั้งในระบบที่มีและไม่มีเอนไซม์กระตุ้น โดยเชื้อสายพันธุ์ TA98, TA100, และ WP2*uvrA* จำนวนโคโลนีไม่เป็น 2 เท่า เชื้อสายพันธุ์ TA1535 และ TA1537 จำนวนโคโลนีไม่เป็น 3 เท่า เมื่อเทียบกับ negative control และไม่พบความผิดปกติของ Background lawn ทุกสายพันธุ์และทุกความเข้มข้น ในขณะที่องค์การอนามัยโลก ประเมิน 7-OHMG เป็นสารสำคัญที่ต้องติดตามด้านความปลอดภัย จากการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นถึงข้อมูลเบื้องต้นด้านความปลอดภัยและใช้ข้อมูลเป็นแนวทางสำคัญในการพัฒนาต่อยอดสาร 7-OHMGสู่การเป็นเภสัชภัณฑ์หรือผลิตภัณฑ์สุขภาพที่มีคุณภาพ เป็นที่ยอมรับในระดับสากล สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้จริงทั้งในทางการแพทย์แผนปัจจุบันและสร้างนวัตกรรมของสมุนไพรไทยต่อไป

คำสำคัญ: การก่อกลายพันธุ์ วิธีทดสอบเอมส์ ไมทราไจนิน 7-ไฮดรอกซีไมทราไจนิน

รับบทความ: 1 กรกฎาคม 2568 แก้ไข: 20 สิงหาคม 2568 ตอรับ: 25 สิงหาคม 2568

***ผู้รับผิดชอบบทความ**

สุจิต อุ่นกาส

ห้องปฏิบัติการพิษวิทยา สถาบันวิจัยสมุนไพร 88/7 กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

ต.ตลาดขวัญ อ.เมือง จ.นนทบุรี 11000

อีเมล: sutjarit.a@dmsc.mail.go.th

Mutagenicity Study of Semi-Synthetic 7-Hydroxymitragynine from *Mitragyna speciosa* Using *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* (WP2 *uvrA*) by the Ames Test

Sutjarit Aunkat^{1,*} Praw Suppajariyawat¹ Wijittra Sudhong¹ Padtaya Sirinantananon¹
Weerachai Pipatrattanaseree² Pornchai Sincharoenpokai¹

¹Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Tiwanon Road, Mueang, Nonthaburi 11000

²Regional Medical Sciences Center 12 Songkhla

Abstract

Kratom (*Mitragyna speciosa*, Korth), found in Southeast Asia, has been traditionally used in Thai medicine to alleviate abdominal pain, dysentery, diarrhea, and muscle aches, and as a sedative. Its primary active compounds are alkaloids, with mitragynine being the most abundant. Another derivative, 7-hydroxymitragynine (7-OHMG), exhibits more potent activity than mitragynine, making it suitable for medical and public health applications. However, safety data regarding the active compounds from this plant remain limited. This study aimed to investigate the mutagenicity of a semi-synthetic kratom extract (7-OHMG) using the Ames test with *Salmonella typhimurium* strains (TA98, TA100, TA1535, TA1537) and *Escherichia coli* (WP2*uvrA*). The test was conducted at six concentrations (15, 50, 150, 500, 1,500 and 5,000 µg/plate) both with and without metabolic activation. The results indicated no mutagenic activity in any of the 5 bacterial strains, either with or without metabolic activation. Specifically, the number of revertant colonies for strains TA98, TA100, and WP2*uvrA* did not double, and for strains TA1535 and TA1537, it did not triple, relative to the negative control. Furthermore, no abnormalities were observed in the background lawn for any strain at any concentration. While the World Health Organization has identified 7-OHMG as a substance requiring safety monitoring, this study provides crucial preliminary safety data. These findings serve as a foundational guideline for the further development of 7-OHMG into high-quality, internationally accepted pharmaceuticals or health products. This could enable its practical use in modern medicine and foster innovation in Thai herbal products.

Keywords: Mutagenicity, Ames test, Mitragynine, 7-hydroxymitragynine

Received: 1 July 2025, **Revised:** 20 August 2025, **Accepted:** 25 August 2025

*Corresponding author

Sutjarit Aunkat

Toxicology Laboratory, Medicinal Plant Research Institute 88/7 Department of Medical Sciences,
Ministry of Public Health Taladkwan Muang Nonthaburi 11000

E-mail: sutjarit.a@dmisc.mail.go.th

บทนำ

พืชกระท่อมมีประวัติการใช้มาอย่างยาวนานในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และเป็นที่น่าสนใจตามองในฐานะพืชเศรษฐกิจใหม่ทั้งในตลาดประเทศไทยและมีมูลค่าในตลาดโลก ระบุปี 2024 มีมูลค่าประมาณ 2.19 พันล้านดอลลาร์สหรัฐ และคาดว่าจะเติบโตเฉลี่ยต่อปี (Compound Annual Growth Rate (CAGR)) ที่ 17.2% ตั้งแต่ปี 2025 ถึงปี 2032 ซึ่งจะไปถึง 7.80 พันล้านดอลลาร์¹ และกระท่อมในประเทศไทยสหรัฐอเมริกาถือเป็นตลาดผู้บริโภคสินค้าจากกระท่อมที่ใหญ่ที่สุดในโลก คิดเป็นมูลค่าตลาดทั้งสิ้นประมาณ 1.13 พันล้านดอลลาร์สหรัฐต่อปี² ในประเทศไทยพืชกระท่อมได้ถูกยกเลิกเป็นยาเสพติดให้โทษประเภทที่ 5 ตามพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ (ฉบับที่ 8) พ.ศ. 2564 ประชาชนจึงสามารถครอบครอง บริโภค และสร้างรายได้ ส่งผลให้พืชกระท่อมกลายเป็นหนึ่งในสมุนไพรที่มีศักยภาพสำหรับใช้ในทางการแพทย์และสามารถพัฒนาสารสกัดมาตรฐานเพื่อส่งออกไปยังตลาดที่มีความต้องการสูง โดยเฉพาะกลุ่มผลิตภัณฑ์สุขภาพ (nutraceuticals) และเกิดการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูงในทางเศรษฐกิจ

กระท่อม ชื่อวิทยาศาสตร์ *Mitragyna speciosa* Korth. อยู่ในวงศ์ Rubiaceae เป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ปานกลาง มีแก่นเป็นไม้เนื้อแข็ง สูง 10-15 เมตร ใบคล้ายใบกระดังงา มีชนิดก้านใบแดงและใบเขียว ดอกกลมโตขนาดเท่าผลพุทรา ใบเป็นใบเดี่ยวสีเขียว เรียงตัวเป็นคู่ตรงข้าม แผ่นใบขนาดกว้างประมาณ 5-10 ซม. ยาวประมาณ 8-14 ซม. ดอกมีสีขาวอมเหลืองออกเป็น

ช่อค้ำกลมขนาด 3-5 ซม.³ เป็นพืชพื้นถิ่นที่พบมากในป่าฝนเขตร้อนในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะในประเทศไทย มาเลเซีย และอินโดนีเซีย รู้จักกระท่อมเป็นอย่างดีเนื่องจากถูกนำมาใช้เป็นยารักษาโรคมานาน⁴ ตามตำรายาแพทย์แผนไทยใบกระท่อมใช้เป็นเครื่องยาหลัก ระบุสรรพคุณใช้ระงับอาการปวดท้อง แก้บิด แก้ท้องเสีย ระงับอาการปวดเมื่อยตามร่างกาย และระงับประสาท⁵ ด้วยฤทธิ์ของสารกลุ่ม indole alkaloids เป็นสารกลุ่มใหญ่ที่พบในพืชกระท่อม โดยเฉพาะสารสำคัญหลัก mitragynine ที่มีปริมาณสูงถึงร้อยละ 66 เมื่อเทียบกับปริมาณสารสกัด alkaloids ทั้งหมด^{6,7,8} โดยออกฤทธิ์คล้ายมอร์ฟินแต่มีความแรงน้อยกว่า 10 เท่า^{8,9} และพบว่าไมทราจินีนเองไม่ได้มีฤทธิ์ระงับปวดโดยตรง แต่ต้องผ่านกระบวนการเมแทบอลิซึมในตับโดยเอนไซม์ไซโตโครม P450 3A (CYP3A) เพื่อเปลี่ยนเป็นสารเมแทบอลิต์ที่มีฤทธิ์แรงกว่าคือ 7-hydroxymitragynine (7-OHMG)¹⁰ ซึ่งพบในปริมาณน้อยแต่มีฤทธิ์เด่นในการระงับปวดได้ดี สารสำคัญเหล่านี้ส่งผลต่อระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system)⁸

สาร 7-hydroxymitragynine หรือ 7-OHMG มีฤทธิ์เป็นตัวกระตุ้นตัวรับมิวโอปิออยด์ (μ -opioid receptor agonist) ที่มีประสิทธิภาพมากกว่าไมทราจินีนซึ่งเป็นอัลคาลอยด์หลักของกระท่อม^{10,11} 7-OHMG แสดงฤทธิ์ที่สูงกว่ามอร์ฟินประมาณ 13 เท่า และสูงกว่าไมทราจินีนประมาณ 46 เท่า¹² ยังมีอาการไม่พึงประสงค์ที่น้อยกว่ามอร์ฟิน¹⁰ แม้ว่า 7-OHMG จะพบในปริมาณน้อยแต่กลับมีความสำคัญอย่างมาก มีศักยภาพพัฒนาเป็นยาแก้ปวดใหม่ที่มีผลข้างเคียง

น้อยกว่าและไปใช้ทดแทนสารหรือยาในกลุ่ม opioids ได้⁶ ซึ่งหน่วยงานระดับสากลองค์การอนามัยโลก (World Health Organization (WHO)) ได้ประเมินว่า 7-OHMG เป็นสารสำคัญที่ต้องติดตามด้านความปลอดภัย⁷ เพื่อคลายความกังวลที่เพิ่มขึ้นเกี่ยวกับศักยภาพในการเสพติดของกระท่อม บ่งชี้ถึงความจำเป็นเร่งด่วนในการประเมินอย่างรอบด้านทั้งในแง่ประโยชน์ทางการแพทย์และความเป็นพิษที่อาจเกิดขึ้น ข้อมูลรายงานการศึกษาความเป็นพิษในหลอดทดลอง (*in vitro*) ของ 7-OHMG มีอยู่อย่างจำกัดและเพื่อให้เป็นการครอบคลุมเหมาะสมต่อการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีการศึกษาทางพิษวิทยาที่แน่นอนเพื่อประเมินความปลอดภัยเป็นการคุ้มครองผู้บริโภคและสร้างความเชื่อมั่นในการใช้พืชกระท่อมนี้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงสกัดสารกึ่งสังเคราะห์ 7-OHMG เพื่อศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดในระบบพันธุกรรม (genotoxicity) ด้วยวิธีทดสอบแอมส์ (Ames test) เป็นการทดสอบการก่อกลายพันธุ์ (mutagenicity) แบบย้อนกลับในระบบที่มีเอนไซม์กระตุ้น (+S9) ซึ่งเป็นการจำลองการเมแทบอลิซึมของสารเคมีในตับ เพื่อดูว่าสารนั้นเมื่อผ่านการเมแทบอลิซึมแล้วจะทำให้เกิดการกลายพันธุ์หรือไม่ และในระบบไม่มีเอนไซม์กระตุ้น (-S9) โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, และ TA1537) และ *Escherichia coli* (WP2uvrA) ที่ผ่านการคัดเลือกพันธุกรรมให้ไม่สามารถสร้างกรดอะมิโนที่จำเป็น (เช่น histidine หรือ tryptophan) หากเชื้อแบคทีเรียสามารถย้อนกลับเป็นสายพันธุ์ปกติได้จะส่งผลให้สารนั้นเป็นสาร

ก่อกลายพันธุ์ (mutagen) โดยอ้างอิงวิธีจากองค์กรเพื่อความร่วมมือและการพัฒนาทางเศรษฐกิจ Organization for Economic Co-operation and Development Principles of Good Laboratory Practice, OECD GLP (OECD-Test guideline 471)¹³ โดยเป็นหนึ่งในการทดสอบมาตรฐานด้านพิษวิทยาเพื่อประเมินความเป็นสารก่อกลายพันธุ์ ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้เบื้องต้นของความเสี่ยงในการก่อมะเร็ง (carcinogenic potential) ของสารเคมีต่าง ๆ และเป็นส่วนหนึ่งของการประเมินความปลอดภัยทางพิษวิทยา (toxicological safety assessment) ให้ผู้ประกอบการนำข้อมูลผลการทดสอบเพื่อจะขอขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์กับหน่วยรับขึ้นทะเบียนได้แก่ สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กรมวิชาการเกษตร กรมปศุสัตว์ และสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม ที่ต้องใช้ข้อมูลประเมินด้านความปลอดภัยนี้ ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นถึงข้อมูลเบื้องต้นด้านความปลอดภัยและใช้ข้อมูลเป็นแนวทางสำคัญในการพัฒนาต่อยอดสาร 7-OHMG ตูการเป็นเภสัชภัณฑ์หรือผลิตภัณฑ์สุขภาพที่มีคุณภาพ เป็นที่ยอมรับในระดับสากล สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้จริงทั้งในทางการแพทย์แผนปัจจุบัน และสร้างนวัตกรรมของสมุนไพรไทยต่อไป

วัสดุ สารเคมี และวิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุ

เครื่องชั่งไฟฟ้า 2 ตำแหน่ง (Mettler Toledo, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์), เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง (Sartorius; ประเทศเยอรมนี), ตู้ชีวนิรภัย (biological Safety Cabinet Class II, BIOAIR,

ประเทศอิตาลี), อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิและเขย่า (shaking water bath, Julabo, ประเทศเยอรมนี), ตู้บเพาะเชื้อ (incubator, (SalvisLAB, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์), เครื่องเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (Intrega, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์), plastic plate, ปิเปตอัตโนมัติ (autopipette), micropipette tip ขนาด 10-100, 20-200, 100-1,000 ไมโครลิตร (Rainin, ประเทศสหรัฐอเมริกา), ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask), ขวดปริมาตร (volumetric flask), ขวดแก้ว (duran bottle) (Schott Duran, ประเทศเยอรมนี), ปีกเกอร์ (Beaker) (Pyrex, ประเทศเยอรมนี), ช้อนตักสาร (spatula), Blank paper disc (Whatman, ประเทศจีน), ปากคีบ (forcep), ลูปเย็บเชื้อ (loop), หลอดทดลองแบบมีฝาปิด (test tube), หลอดเซนติฟิวจ์พลาสติก (centrifuge tube) (SLP Life Sciences, ประเทศเกาหลีใต้), ตัวกรองแบบปราศจากเชื้อขนาด 0.45 ไมครอน ชนิด nylon (GVS ;ประเทศสหรัฐอเมริกา), เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH meter) (Eutech Instruments ;ประเทศสิงคโปร์), เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) (Metertech ;ประเทศไต้หวัน), เครื่องให้ความร้อนแบบบล็อก (dry block incubator) (Ohaus ;สหรัฐอเมริกา), เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อแบบออโตเคลฟ (autoclave) (Tuttnauer Autoclave ;ประเทศอิสราเอล), เครื่องบันทึกภาพและนับโคโลนีอัตโนมัติ (Interscience Scan 4000, ประเทศฝรั่งเศส), กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (inverted microscope) (EVOS™ Imaging System, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

สารเคมี

น้ำ deionized water (DI) type II, L-histidine ($C_6H_9N_3O_2$) (Sigma-ALDRICH ;CAS No. 71-

00-1), biotin ($C_{10}H_{16}N_2O_3S$) (Sigma-ALDRICH ;CAS No. 58-85-5), L-tryptophan ($C_{11}H_{12}N_2O_2$) (Sigma-ALDRICH ;CAS No. 73-22-3), nutrient broth No.2 (OXOID ;Code: CM0067), LB broth (Miller) (Sigma-ALDRICH ;Code: L3522) , agar (Merck ;CAS No. 9002-18-0), sodium chloride (NaCl) (Merck ;CAS No. 7647-14-5), D-(+)-glucose (Merck ;CAS No. 14431-43-7), magnesium sulfate heptahydrate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) (Merck ;CAS No. 10034-99-8), citric acid monohydrate ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) (Merck ;CAS No. 5949-29-1), di-potassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4) (Merck ;CAS No. 7758-11-4), ammonium sodium phosphate dibasic tetrahydrate ($NaNH_4HPO_4 \cdot 4H_2O$) (Sigma-ALDRICH ;CAS No. 7783-13-3), potassium chloride (KCl) (Merck ;CAS No. 7447-40-7), dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-ALDRICH ;CAS No. 67-68-5), mitomycin C (Sigma-ALDRICH ;CAS No. 50-07-7), ampicillin ($C_{16}H_{19}N_3O_4S$) (Sigma-ALDRICH ;CAS No. 69-53-4), crystal violet (Sigma-ALDRICH ;CAS No. 548-62-9), S9 enzyme (MOLTOX), cofactor-I (Oriental yeast ;CAS No. 309-50611), sodium azide (SA) (Sigma-ALDRICH ;CAS No. 26628-22-8), 2-nitrofluorene (2-NF) (Sigma-ALDRICH ;CAS No. 607-57-8), 4-nitroquinoline-n-oxide (4NQNO) (Sigma-ALDRICH ;CAS No. 56-57-5), 4-nitro-o-phenylenediamine (NPD) (Sigma-ALDRICH ;CAS No. 99-56-9), acridine mutagen ICR191 (ICR191) (Sigma-ALDRICH ;CAS No. 17070-45-0), 2-aminoanthracene (2AA) (Sigma-ALDRICH ;CAS No. 613-13-8)

การสกัดสารกึ่งสังเคราะห์จากกระท่อม 7-OHMG

ขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบ

ใบกระท่อมเก็บจากจังหวัดตรัง ตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ตามหลักอนุกรมวิธาน โดยนักพฤกษศาสตร์ ตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิง หมายเลข DMSC 5290 เก็บในพิพิธภัณฑ์พืช สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ขั้นตอนการสกัด

นำใบกระท่อมล้างทำความสะอาด อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาบด และทำการสกัดด้วยวิธี reflux โดยใช้ตัวทำละลายน้ำ เป็นเวลา 30 นาที สารสกัดถูกรองด้วยกระดาษกรอง ส่วนที่เหลือทำการสกัดซ้ำด้วยกระบวนการเดียวกันอีกครั้ง จากนั้นทำให้สารเข้มข้นขึ้นด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator) และทำให้สารสกัดแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dry) ได้สารสกัดหยาบจากใบกระท่อม

นำสารสกัดหยาบจากใบกระท่อมดำเนินตามขั้นตอนและกรรมวิธีที่ระบุไว้ในอนุสิทธิบัตร เลขที่ 2303000098 ได้สารสกัดกระท่อมที่มีปริมาณ 7-OHMG 13.5% w/w สารสกัดถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ลักษณะทางกายภาพเป็นผงละเอียดสีน้ำตาล ทำละลายด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO)

เชื้อแบคทีเรีย

- *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98, TA100, TA1535, และ TA1537
- *E. coli* สายพันธุ์ WP2uvrA

ขั้นตอนการเตรียมเชื้อ

นำเชื้อ *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เติมลงใน nutrient broth No.2 ปริมาตร 12 มิลลิลิตร ส่วนเชื้อ *E. coli* WP2uvrA ใช้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เติมลงใน LB Broth ปริมาตร 12 มิลลิลิตร เชื้อในอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิและเขย่า (shaking water bath) อุณหภูมิ 37±2 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 rpm เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง

ขั้นตอนการทดสอบคุณสมบัติเชื้อ *S. typhimurium*

1) ความต้องการกรดอะมิโนฮิสทีดีน (histidine requirement)

เตรียม minimal glucose agar plate (MGA) ที่ไม่ได้เคลือบฟิววันและเคลือบฟิววันด้วย 0.1 M L-Histidine และ 1 mM D-biotin โดยวิธี spread plate นำเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ 1 คืน (bacterial culture) ประมาณ 8-12 ชั่วโมง ชีดลงบนฟิววัน นำ plate บ่มที่ตู้ incubator อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2) การตรวจ *rfa* mutation, R-factor และ *uvr* mutation

เตรียม MGA ที่ไม่ได้เคลือบฟิววัน แบ่ง plate เป็น 3 ส่วน เพื่อตรวจ *rfa* mutation, R-factor และ *uvr* mutation ใน plate เดียวกัน ผสม 0.1 M L-histidine ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กับ bacterial culture ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เข้าด้วยกันในหลอดทดลองแบบมีฝาปิด เติม Top agar ที่มีส่วนผสมของ 0.5 mM histidine และ 0.5 mM biotin ปริมาตร 2,000 ไมโครลิตร แล้วเทส่วนผสมลงบน

MGA วางไว้จนแห้ง หยด crystal violet ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ampicillin ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ mitomycin C ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงใน blank paper disc ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว วางในช่องที่แบ่งไว้ในตู้บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

ขั้นตอนการทดสอบคุณสมบัติเชื้อ *E. coli*

1) ความต้องการกรดอะมิโนทริปโตเฟน (tryptophan requirement)

เตรียม MGA ที่ไม่ได้เคลือบผิววุ้นและแบบที่ผสมกับ tryptophan นำ bacterial culture ขีดลงบนวุ้น นำ plate บ่มที่ตู้ Incubator อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2) การตรวจ *rfa* mutation และ R-factor

เตรียม MGA ที่ไม่ได้เคลือบผิววุ้น แบ่ง plate ครั้ง plate เพื่อตรวจ *rfa* mutation และ R-factor ใน plate เดียวกัน ผสม 0.05 mM tryptophan ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กับ bacterial culture ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เข้าด้วยกันในหลอดทดลองแบบมีฝาปิด เติม top agar ที่มีส่วนผสมของ 0.5 mM tryptophan ปริมาตร 2,000 ไมโครลิตร แล้วเทส่วนผสมลงบน MGA วางไว้จนแห้ง หยด Crystal violet ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ampicillin ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงใน Blank paper disc ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว วางในช่องที่แบ่งไว้ บ่มในตู้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

3) *uvr* mutation

เตรียม MGA แบบที่ผสมกับ tryptophan จากนั้นผสม 0.05 mM tryptophan ปริมาตร 100

ไมโครลิตร กับ bacterial culture ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เข้าด้วยกันในหลอดทดลองแบบมีฝาปิด เติม Top agar ที่มีส่วนผสมของ 0.5 mM tryptophan ปริมาตร 2,000 ไมโครลิตร แล้วเทส่วนผสมลงบน MGA วางไว้จนแห้ง หยด Mitomycin C ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงใน Blank paper disc ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว วางบนวุ้น แล้วบ่มในตู้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

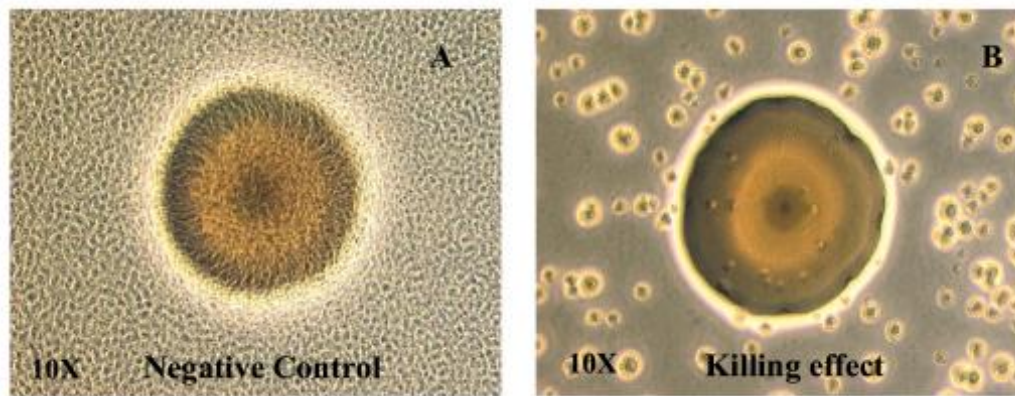
การทดสอบการก่อกลายพันธุ์โดยใช้วิธีเอ็มส์ในระบบที่มีและไม่มีเอนไซม์กระตุ้น (อ้างอิงวิธีจาก OECD-Test guideline 471)¹³

สำหรับการทดสอบการก่อกลายพันธุ์ อ้างอิงวิธีการทดสอบจาก OECD test guideline¹³ ด้วยวิธี Plate Incorporation test เตรียมสารสกัดกึ่งสังเคราะห์จากกระท่อม 7-OHMG จำนวน 6 ความเข้มข้น ที่ความเข้มข้น 15, 50, 150, 500, 1,500 และ 5,000 µg/plate (ทำการเจือจางแบบ half log ประมาณ 3.16 เท่า) ทำการเตรียมเชื้อโดยลงเชื้อ *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, และ TA1537 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงใน nutrient broth No.2 ส่วนเชื้อ *E. coli* WP2uvrA ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงใน LB broth บ่มด้วยอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิและเขย่า อุณหภูมิ 37±2 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 rpm เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำเชื้อมาวัดค่าความขุ่น ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เตรียม top agar ที่เติมส่วนผสมของ 0.5 mM L-histidine และ 0.5 mM biotin ใช้สำหรับเชื้อ *S. typhimurium* และเติมส่วนผสมของ 0.5 mM tryptophan ใช้

สำหรับเชื้อ *E. coli* จากนั้นเปิด top agar ที่ผสมแล้วปริมาตร 2 มิลลิตร ลงในหลอดทดลองแบบมีฝาปิด โดยให้ความร้อนและรักษาอุณหภูมิหลอดที่อุณหภูมิ 45 ± 2 องศาเซลเซียส ในเครื่องให้ความร้อนแบบหลุม (dry block incubator) การทดสอบในระบบที่มีเอนไซม์กระตุ้น (+S9) เปิดตัวทำลาย (negative control) คือ DMSO สารก่อกลายพันธุ์ (positive control) ในเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ TA98 และ TA100 คือ 4-nitro-o-phenylenediamine (NPD), TA1535 คือ 4-nitroquinoline-n-oxide (4NQNO), TA1537 คือ 2-nitrofluorene (2-NF), และ WP2uvrA คือ 2-aminoanthracene (2AA) ตัวอย่างสารสกัดกึ่งสังเคราะห์จากกระท่อม 7-OHMG ที่ความเข้มข้น (15, 50, 150, 500, 1,500 และ 5,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรของแต่ละความเข้มข้นที่ทดสอบ ตามด้วยเชื้อแต่ละสายพันธุ์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเปิดสาร S9mix (S9 Enzyme + Cofactor-I) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ส่วนการทดสอบในระบบที่ไม่มีเอนไซม์กระตุ้น (-S9) เปิดสาร 0.5 M $\text{NaPO}_4\text{-KCl}$ buffer, pH 7.4 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เปิดตัวทำลาย (negative control) คือ DMSO สารก่อกลายพันธุ์ (positive control) ในเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ TA98 คือ 2-nitrofluorene (2-NF), TA100 และ TA1535 คือ sodium azide (SA), TA1537 คือ acridine mutagen ICR191 (ICR191), และ WP2uvrA คือ 4-nitroquinoline-n-oxide (4NQNO) ตัวอย่างสารสกัดกึ่งสังเคราะห์จากกระท่อม 7-OHMG ที่ความเข้มข้น (15, 50,

150, 500, 1,500 และ 5,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรของแต่ละความเข้มข้นที่ทดสอบ ตามด้วยเชื้อแต่ละสายพันธุ์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมสารทุกอย่างให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลง จากนั้น overlay ให้ทั่วลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MGA เมื่อหน้าเพลทแห้งแล้ว ให้คว่ำเพลทและนำไปบ่มในตู้บเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 50 ± 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำเพลทมาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (inverted microscope) (EVOS™ Imaging System ; ประเทศสหรัฐอเมริกา) เพื่อดู background lawn (ดังรูปที่ 1) จากนั้นนำเพลทมานับจำนวนโคโลนี กลายพันธุ์ (revertant colony) ด้วยเครื่องบันทึกภาพและนับโคโลนีอัตโนมัติ (interscience Scan 4000 ; ประเทศฝรั่งเศส)

การแปลผล คือ สารที่ทดสอบมีการก่อกลายพันธุ์จะพบความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารที่ทดสอบกับจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ (revertant colony) ดังนี้ ทั้งในระบบที่มีและไม่มีเอนไซม์กระตุ้น สำหรับเชื้อสายพันธุ์ TA98 TA100 และ WP2uvrA จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์มีจำนวนอย่างน้อย 2 เท่า ส่วนเชื้อสายพันธุ์ TA1535 และ TA1537 มีจำนวนอย่างน้อย 3 เท่า เมื่อเทียบกับจำนวนที่กลายพันธุ์ตามธรรมชาติ (negative control) โดยทั้ง 5 สายพันธุ์ นี้มีการเกิดโคโลนีกลายพันธุ์เพิ่มขึ้นเป็นแบบ dose response เมื่อทำการทดสอบซ้ำจะต้องพบจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ที่เพิ่มขึ้นในความเข้มข้นเดียวกัน จึงนับว่าสารที่นำมาทดสอบนี้เป็นสารก่อกลายพันธุ์



รูปที่ 1. ภาพแสดง Background lawn โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับที่กำลังขยาย 10X ภาพ A แสดง background lawn ที่ปกติจะเห็นภาพพื้นหลังเต็มไม่มีการตายของเชื้อ ภาพ B แสดงการเกิด Killing effect background lawn จะพบลักษณะของช่องว่างที่พื้นหลัง แสดงถึงการตายของเชื้อ

ผลการวิจัย

ผลการตรวจสอบคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรีย

ทดสอบความต้องการการกระดะมิโนฮิสทีดิน ทริปโตเฟน จะพบเชื้อที่มีการเจริญใน histidine, His + Bi และ tryptophan ทดสอบ *rfa* mutation พบว่าเชื้อที่มี *rfa* จะเกิดโซนใส (clear zone) ไม่มีเชื้อเจริญอยู่, ทดสอบ R-factor ในสายพันธุ์ TA98

และ TA100 เป็นสายพันธุ์ที่มี R-factor เชื้อต้าน ampicillin ได้ ทำให้ไม่เกิดโซนใส (no clear zone) ส่วนสายพันธุ์อื่นจะเกิด clear zone และทดสอบ *uvr* mutation พบว่าเชื้อทุกสายพันธุ์เกิด clear zone ดังนั้นคุณสมบัติเชื้อแบคทีเรียก่อนทำการทดสอบเอ็มส์ในเชื้อ *S. typhimurium* ทั้ง 4 สายพันธุ์ และ *E. coli* 1 สายพันธุ์ มีคุณสมบัติครบถ้วน ทุกการทดสอบ แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1. ตารางแสดงผลการทดสอบคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์

Verification of phenotypic characteristics of <i>S. typhimurium</i> and <i>E. coli</i>								
Strains	Histidine and Tryptophan requirement					<i>rfa</i> mutation	R-factor	<i>uvr</i> mutation
	Neg	Biotin	Histidine	His + Bi	Tryptophan			
TA98	-	-	++	+++	N/A	Clear zone	No Clear zone	Clear zone
TA100	-	-	++	+++	N/A	Clear zone	No Clear zone	Clear zone
TA1535	-	-	++	+++	N/A	Clear zone	Clear zone	Clear zone
TA1537	-	-	++	+++	N/A	Clear zone	Clear zone	Clear zone
WP2 _{uvrA}	-	N/A	N/A	N/A	+++	Clear zone	Clear zone	Clear zone
-	means no growth			+++	means growth faster than ++			
++	means moderate growth			N/A	means not applicable			

ผลการทดสอบการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดกึ่งสังเคราะห์จากกระท่อม 7-OHMG ในระบบที่มีเอนไซม์กระตุ้น (+S9)

การศึกษาการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดกึ่งสังเคราะห์จากกระท่อม 7-OHMG ในเชื้อแบคทีเรีย *S. typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, และ TA1537) และ *E. coli* (WP2uvrA) ในระบบที่มีเอนไซม์กระตุ้น (+S9) ที่ความเข้มข้น

6 ระดับ (15, 50, 150, 500, 1,500 และ 5,000 µg/plate) ผลการทดลองไม่พบความผิดปกติของ Background lawn ทุกสายพันธุ์และทุกความเข้มข้น เชื้อสายพันธุ์ TA98 TA100 และ WP2uvrA พบจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ไม่เป็น 2 เท่า เชื้อสายพันธุ์ TA1535 และ TA1537 ไม่เป็น 3 เท่า เมื่อเทียบกับจำนวนที่กลายพันธุ์ตามธรรมชาติ พบว่าไม่เกิดการก่อกลายพันธุ์ในเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ (ตารางที่ 2 และ รูปที่ 2)

ตารางที่ 2. แสดงค่าเฉลี่ยผลการทดสอบการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดกึ่งสังเคราะห์จากกระท่อม (7-OHMG) ต่อเชื้อแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ ในระบบที่มีเอนไซม์กระตุ้น (+S9)

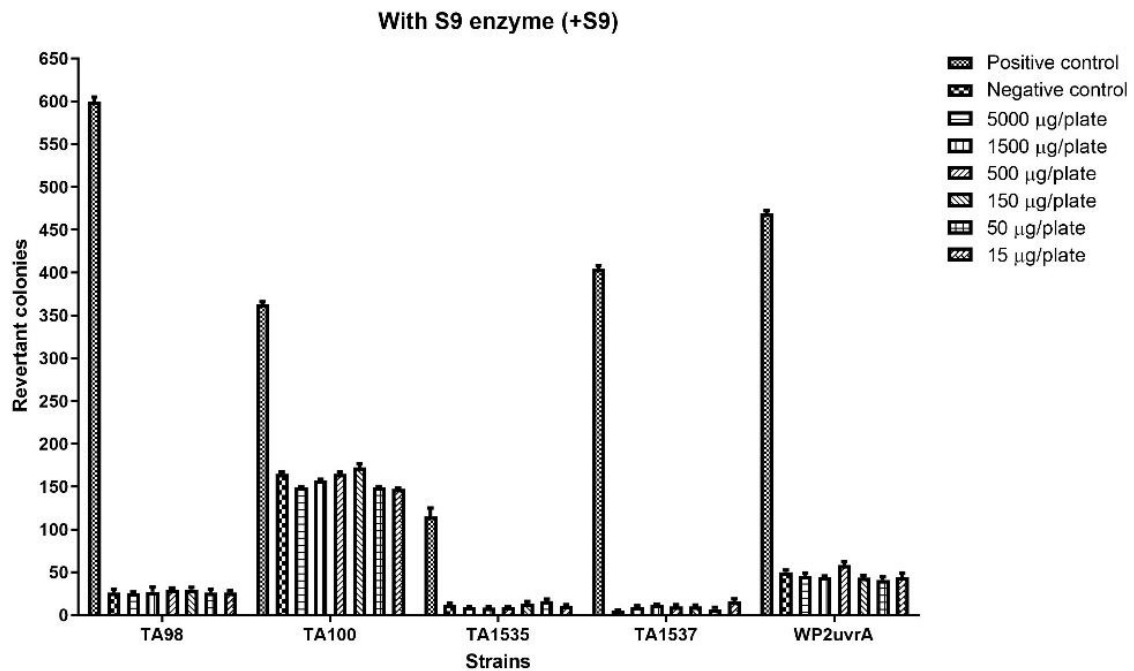
สารสกัดกึ่งสังเคราะห์จากกระท่อม (7-OHMG) ในระบบที่มีเอนไซม์กระตุ้น (+S9)										
ความเข้มข้น (µg/plate)	โคโลนีกลายพันธุ์ (mean±SD)									
	TA98	BL	TA100	BL	TA1535	BL	TA1537	BL	WP2uvrA	BL
Negative	26.33±6.66	N	164.50±3.54	N	12.33±3.06	N	5.00±1.41	N	50.33±3.79	N
Positive	599.50±7.78	N	362.50±4.95	N	155.00±14.14	N	404.33±6.43	N	469.00±5.29	N
5,000	25.67±2.52	N	149.00±1.41	N	9.33±1.53	N	9.00±2.83	N	46.00±5.20	N
1,500	27.33±9.02	N	157.00±2.65	N	8.67±2.31	N	12.00±1.41	N	44.00±3.00	N
500	29.67±3.79	N	164.50±3.54	N	9.33±0.58	N	10.00±2.83	N	58.33±7.02	N
150	30.00±4.00	N	172.33±7.51	N	13.50±3.54	N	10.00±3.00	N	43.67±5.13	N
50	26.33±6.66	N	149.33±1.53	N	16.33±4.04	N	7.00±2.83	N	41.00±6.56	N
15	26.33±3.79	N	147.00±1.47	N	10.67±2.52	N	15.50±4.95	N	44.00±8.66	N

หมายเหตุ: BL หมายถึง Background lawn, N หมายถึง Normal

ผลการทดสอบการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดกึ่งสังเคราะห์จากกระท่อม 7-OHMG ในระบบที่ไม่มีเอนไซม์กระตุ้น (-S9)

การศึกษาการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดกึ่งสังเคราะห์จากกระท่อม 7-OHMG ในเชื้อแบคทีเรีย *S. typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, และ TA1537) และ *E. coli* (WP2uvrA) ในระบบที่ไม่มีเอนไซม์กระตุ้น (-S9) ที่ความ

เข้มข้น 6 ระดับ (15, 50, 150, 500, 1,500 และ 5,000 µg/plate) ผลการทดลองไม่พบความผิดปกติของ background lawn ทุกสายพันธุ์และทุกความเข้มข้น เชื้อสายพันธุ์ TA98 TA100 และ WP2uvrA พบจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ไม่เป็น 2 เท่า เชื้อสายพันธุ์ TA1535 และ TA1537 ไม่เป็น 3 เท่า เมื่อเทียบกับจำนวนที่กลายพันธุ์ตามธรรมชาติ พบว่าไม่เกิดการก่อกลายพันธุ์ในเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ (ตารางที่ 3 และ รูปที่ 3)

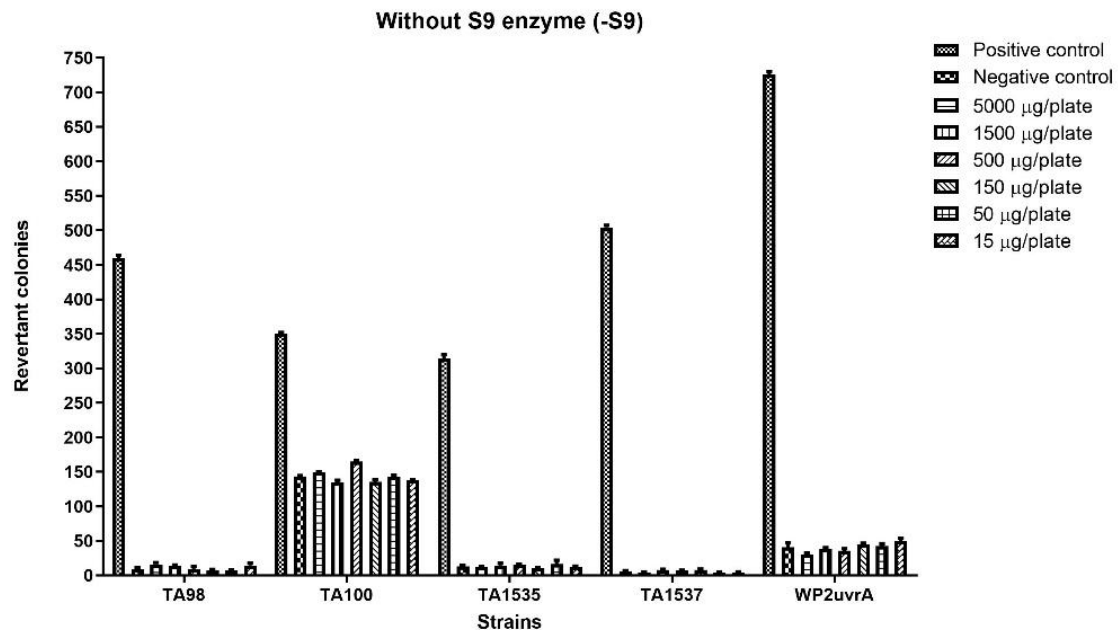


รูปที่ 2. กราฟแสดงจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ของสารสกัดกึ่งสังเคราะห์จากกระท่อม (7-OHMG) ต่อเชื้อแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ ในระบบที่มีเอนไซม์กระตุ้น (+S9)

ตารางที่ 3. แสดงค่าเฉลี่ยผลการทดสอบการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดกึ่งสังเคราะห์จากกระท่อม (7-OHMG) ต่อเชื้อแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ ในระบบที่ไม่มีเอนไซม์กระตุ้น (-S9)

สารสกัดกึ่งสังเคราะห์จากกระท่อม (7-OHMG) ในระบบที่ไม่มีเอนไซม์กระตุ้น (-S9)										
ความเข้มข้น (µg/plate)	โคโลนีกลายพันธุ์ (mean±SD)									
	TA98	BL	TA100	BL	TA1535	BL	TA1537	BL	WP2uvrA	BL
Negative	9.00±4.36	N	143.33±2.31	N	13.00±2.65	N	6.33±1.15	N	40.67±10.69	N
Positive	459.67±7.51	N	350.00±3.46	N	314.00±9.85	N	504.33±4.93	N	725.67±7.23	N
5,000	16.00±4.36	N	149.00±1.41	N	12.00±1.73	N	4.67±0.58	N	30.00±3.61	N
1,500	13.33±3.21	N	135.00±4.24	N	14.33±5.13	N	8.00±1.73	N	38.00±3.46	N
500	9.33±6.03	N	165.00±2.65	N	16.00±1.00	N	7.00±1.00	N	35.67±5.13	N
150	7.00±2.65	N	135.50±4.95	N	10.67±1.53	N	8.00±2.00	N	45.33±2.08	N
50	7.00±1.73	N	142.67±4.73	N	16.33±9.61	N	4.50±0.71	N	42.33±6.35	N
15	14.33±6.03	N	137.67±1.53	N	11.67±3.06	N	4.33±1.53	N	50.00±6.56	N

หมายเหตุ: BL หมายถึง Background lawn, N หมายถึง Normal



รูปที่ 3. กราฟแสดงจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ของสารสกัดกึ่งสังเคราะห์จากกระท่อม (7-OHMG) ต่อเชื้อแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ ในระบบที่ไม่มีเอนไซม์กระตุ้น (-S9)

วิจารณ์ผลการวิจัย

พืชกระท่อมมีความเกี่ยวข้องกับวิถีชีวิตของผู้คนในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งการใช้กระท่อมมีลักษณะผสมผสานใช้ประโยชน์ในการแพทย์ดั้งเดิมและการแพทย์พื้นบ้านโดยใช้เป็นยารักษาโรคมานาน ส่งผลให้พืชกระท่อมได้รับความสนใจจากแวดวงวิชาการและการแพทย์ เนื่องจากศักยภาพของสารในกลุ่ม indole alkaloids โดยเฉพาะไมทราจินิน และ 7-OHMG ซึ่งเป็นเมแทบอไลต์ของไมทราจินิน มีฤทธิ์เป็นตัวกระตุ้นตัวรับมิวโอปิออยด์ (μ -opioid receptor agonist) ที่แรงกว่าไมทราจินิน และมีลักษณะทางเภสัชวิทยาที่คล้ายกับมอร์ฟิน มีบทบาทสำคัญในการออกฤทธิ์ระงับปวดได้ดีแล้วนั้น¹⁰ ใบของกระท่อมยังถูกนำมาใช้เป็นยากระตุ้นและรักษาอาการติดยาเสพติดโดยตลอด แม้ว่าปัจจุบัน

พืชกระท่อมไม่ถูกระบุให้เป็นยาเสพติดให้โทษในทางกฎหมายไทยแล้ว อย่างไรก็ตามหากมีการนำไปใช้ในทางที่ไม่เหมาะสมก็มีความเสี่ยงต่อสุขภาพ การนำไปใช้ควรเป็นไปอย่างระมัดระวังและคำนึงถึงปริมาณที่เหมาะสม ควรปรึกษาแพทย์หรือผู้เชี่ยวชาญทางการแพทย์ก่อนการใช้ เพื่อป้องกันผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์จึงจำเป็นต้องเร่งวิจัยเพื่อวางมาตรฐานคุณภาพ ยาอาหาร และเวชภัณฑ์ที่ใช้กระท่อม ซึ่งงานวิจัยทางด้านพิษวิทยาก็เป็นส่วนสำคัญในการประเมินความปลอดภัยของผู้บริโภค โดยการศึกษาการก่อกลายพันธุ์ด้วยวิธีเอ็มเอส ใช้เชื้อแบคทีเรียที่ถูกดัดแปลงทางพันธุกรรมให้ไวต่อการกลายพันธุ์ทั้งในแบบ frameshift mutation และ base-pair substitution mutation เพื่อประเมินสารเคมีอาหาร ยา สารสกัดสมุนไพร และผลิตภัณฑ์สุขภาพ ซึ่งหากสารที่ทดสอบสามารถทำให้

จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียย้อนกลับได้ แสดงว่าสารนั้นเป็น สารก่อกลายพันธุ์สามารถนำไปสู่โรคมะเร็ง หรือความผิดปกติทางพันธุกรรมได้ โดยอ้างอิงวิธีจากองค์กรเพื่อความร่วมมือและการพัฒนาทางเศรษฐกิจ OECD-test guideline 471 ซึ่งเป็นการศึกษาความเป็นพิษทางพันธุกรรม (genotoxicity testing) ในหลอดทดลอง จากผลการศึกษาการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดกึ่งสังเคราะห์จากกระท่อม 7-OHMG โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *S. typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, และ TA1537) และ *E. coli* (WP2*uvrA*) ด้วยวิธีเอ็มส์ ในระบบที่มีและไม่มีเอนไซม์กระตุ้น ที่ความเข้มข้น 15, 50, 150, 500, 1,500 และ 5,000 µg/plate ส่องดู background lawn ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ไม่พบความผิดปกติของ Background lawn ทุกสายพันธุ์และทุกความเข้มข้น เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ TA98, TA100, และ WP2*uvrA* จำนวนโคโลนีไม่เป็น 2 เท่า เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ TA1535 และ TA1537 จำนวนโคโลนีไม่เป็น 3 เท่า เมื่อเทียบกับจำนวนที่กลายพันธุ์ตามธรรมชาติ โดยเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ ไม่เกิดการก่อกลายพันธุ์ ทั้งระบบที่มีและไม่มีเอนไซม์กระตุ้น ดำเนินการทดสอบภายใต้ห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองมาตรฐาน OECD GLP จากหน่วยตรวจสอบขึ้นทะเบียนแห่งชาติ (National Compliance Monitoring Authority: National CMA) เป็นหน่วยศึกษาวิจัย (test facility) ด้านพิษวิทยา (toxicity) และการก่อกลายพันธุ์ (mutagenicity) ตามหลักปฏิบัติที่ดีทางห้องปฏิบัติการ โดยสารทดสอบหรือผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการทดสอบความปลอดภัยจากห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองมาตรฐาน

OECD GLP สามารถนำไปขึ้นทะเบียนจำหน่ายได้ทั้งในประเทศและต่างประเทศ โดยเฉพาะประเทศสมาชิก OECD ไม่ต้องทำการทดสอบซ้ำในต่างประเทศ ช่วยให้ผู้ประกอบการประหยัดค่าใช้จ่ายและลดระยะเวลาในการขึ้นทะเบียน จึงเป็นการเพิ่มศักยภาพให้ผู้ประกอบการภายในประเทศยกระดับขีดความสามารถในการแข่งขันทางการค้าและลดการกีดกันทางการค้าในตลาดโลก

จากการทบทวนวรรณกรรมที่มีอยู่ในปัจจุบันเกี่ยวกับการทดสอบด้าน genotoxicity ยังไม่พบข้อมูลการศึกษาความเป็นพิษทางพันธุกรรมของสารสกัดกึ่งสังเคราะห์จากกระท่อม 7-OHMG แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานวิจัยการทดสอบการก่อการกลายพันธุ์ของสารสกัดน้ำจาก *M. speciosa* ในเชื้อแบคทีเรีย *S. typhimurium* TA98 และ TA100 ด้วยวิธีเอ็มส์ ในระบบที่มีและไม่มีเอนไซม์กระตุ้น ผลการทดสอบพบว่าไม่เกิดการก่อการกลายพันธุ์ในเชื้อแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ทั้งในระบบที่มีและไม่มีเอนไซม์กระตุ้น¹⁴ โดยสารสกัดน้ำจาก *M. speciosa* เป็นสารสกัดหายาจากกระท่อม มีสารสำคัญอย่าง ไมทราจินิน และ 7-OHMG ซึ่งเกิดจากการเมแทบอลิซึมของไมทราจินินเป็นองค์ประกอบของสารสกัดนี้ ซึ่งรายงานการวิจัยข้างต้นสอดคล้องกับผลการศึกษาครั้งนี้ และจากรายงานวิจัยการทดสอบความเสียหายของ DNA ด้วยวิธี comet assay โดยใช้เซลล์ Caco-2 ทดสอบสารมาตรฐานไมทราจินินและผลิตภัณฑ์ตัวอย่างจากกระท่อม 3 ชนิด ได้แก่ Kr10BR, Kr11BE15x, และ Kr12BEg พบว่าผลิตภัณฑ์ตัวอย่างจากกระท่อมทั้ง 3 ชนิด มีความเสียหายของ DNA แต่ในทางกลับกันสาร

มาตรฐานไมทราจินินไม่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อ DNA ไม่ก่อให้เกิดผลการตอบสนองทางพันธุกรรมที่เป็นพิษอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์จากกระท่อมที่นำมาวิเคราะห์กลับก่อให้เกิดความเสียหายต่อดีเอ็นเอซึ่งเป็นประเด็นที่น่าวิตกอย่างยิ่งต่อความปลอดภัยในการใช้ผลิตภัณฑ์เหล่านี้¹⁵ หากผู้ประกอบการที่ขายผลิตภัณฑ์จากกระท่อมมีการเจือปนผลิตภัณฑ์ด้วยสารอื่น อาจส่งผลให้เกิดความเป็นพิษในหลอดทดลองที่พบได้ในงานวิจัยข้างต้นนี้ ผลการศึกษาข้างต้นสะท้อนถึงความซับซ้อนของข้อมูลด้านพิษวิทยา ซึ่งเน้นย้ำถึงความจำเป็นในการประเมินความปลอดภัยอย่างครอบคลุม ทั้งในระดับของสารแอลคาลอยด์เดี่ยวและสารสกัดรวมจากพืชกระท่อม จากรายงานการวิจัยเพื่อประเมินความปลอดภัยของสารสกัดจากพืชในสกุล *Mitragyna* จำนวน 4 ชนิด ซึ่งรวมถึงกระท่อม โดยนำมาทดสอบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติของมนุษย์ (PBMC) เพื่อดูผลกระทบ 2 ด้านหลัก ๆ คือ ความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ผลการทดสอบด้วยวิธี MTT assay ยืนยันว่าสารสกัดเอทานอลและเฮกเซนจากพืชทั้ง 4 ชนิด ไม่มีความเป็นพิษ และไม่ทำลายเซลล์ และความเสียหายต่อสารพันธุกรรม ผลการทดสอบด้วยวิธี comet assay พบว่าสารสกัดจากกระท่อมทั้งชนิดเอทานอลและเฮกเซน ไม่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อ DNA อย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกับสารสกัดส่วนใหญ่อื่น ๆ (ยกเว้นสารสกัดเฮกเซนจาก *M. hirsuta* ที่พบความเสียหาย)¹⁶ ประเด็นสำคัญคือ แม้ในพืชทั้ง 4 ชนิด จะมีสารไมทราจินินและ 7-OHMG ในปริมาณที่แตกต่างกัน แต่สารสกัดจากกระท่อมกลับไม่แสดงผลกระทบที่เป็นพิษต่อพันธุกรรม

ในการทดสอบนี้ ซึ่งเป็นข้อมูลที่สอดคล้องกับการทดสอบการก่อกลายพันธุ์ด้วยวิธีเอ็มส์ในครั้งนี้อีกก็ตาม จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่า ยังไม่เคยมีการศึกษาความเป็นพิษต่อพันธุกรรมของสาร 7-OHMG ในรูปแบบสารประกอบบริสุทธิ์มาก่อน ดังนั้นผลการวิจัยนี้จึงเป็นเพียงข้อมูลเบื้องต้นที่สนับสนุนความปลอดภัยของ "สารสกัดกระท่อม" ในภาพรวม แต่ยังคงเป็นช่องว่างทางความรู้ที่สำคัญโดยเฉพาะเกี่ยวกับความปลอดภัยของสาร 7-OHMG

ผลการศึกษาชิ้นนี้ชี้ให้เห็นถึงข้อมูลเพื่อช่วยสนับสนุนความปลอดภัยเบื้องต้นในเชิงความเป็นพิษต่อพันธุกรรม และควรมีการทดสอบวิจัยเชิงลึก เช่น การศึกษาพิษเรื้อรังในสัตว์ทดลอง การทดสอบ micronucleus test เพื่อตรวจสอบความเสียหายของโครโมโซม และการทดสอบ comet assay เพื่อตรวจสอบความเสียหายของสาย DNA เป็นต้น และใช้เป็นข้อมูลต่อยอดในการทดสอบทางคลินิกในมนุษย์พร้อมทั้งยังเป็นการยืนยันผลให้เกิดความมั่นใจเพื่อเป็นแนวทางสำคัญในการพัฒนาต่อยอดสาร 7-OHMGสู่การเป็นเภสัชภัณฑ์หรือผลิตภัณฑ์สุขภาพที่มีคุณภาพต่อไป

สรุป

การศึกษาการก่อกลายพันธุ์และพิษของสารสกัดกึ่งสังเคราะห์จากกระท่อม ได้แก่ สาร 7-OHMG ต่อระบบพันธุกรรมในเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ TA98, TA100, TA1535, TA1537, และ WP2uvrA ด้วยวิธีเอ็มส์ ในระบบที่มีและไม่มีเอนไซม์กระตุ้น ที่ความเข้มข้น 15, 50, 150, 500, 1,500, และ 5,000 µg/plate ไม่พบความผิดปกติของ background lawn ทุกสายพันธุ์และทุกความ

เข้มข้น ไม่เกิดการก่อกลายพันธุ์เมื่อเทียบกับจำนวนที่กลายพันธุ์ตามธรรมชาติในเชื้อแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ ทั้งในระบบที่มีและไม่มีเอนไซม์กระตุ้น ซึ่งผลการศึกษาก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดกึ่งสังเคราะห์จากกระท่อม 7-OHMG ในครั้งนี้เป็นเพียงการศึกษาหนึ่งใน mutagenicity scope ของ OECD GLP และควรนำไปศึกษาวิจัยเชิงลึก เช่น การทดสอบในสัตว์ทดลอง, micronucleus test และ comet assay เป็นต้น เพื่อให้ได้ข้อมูลเบื้องต้นด้านความปลอดภัยและใช้ข้อมูลเป็นแนวทางสำคัญในการพัฒนาต่อยอดสาร 7-OHMG สำหรับการเป็นเภสัชภัณฑ์หรือผลิตภัณฑ์สุขภาพที่มีคุณภาพ เป็นที่ยอมรับในระดับสากล สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้จริงทั้งในทางการแพทย์แผนปัจจุบันและสร้างนวัตกรรมของสมุนไพรไทยต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนเงินงบประมาณจากสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ขอขอบพระคุณ นายวีระชัย พิพัฒน์รัตนเสรี ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12 สงขลา ในการจัดหาวัตถุดิบและสกัดสารกึ่งสังเคราะห์จากกระท่อม 7-OHMG และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการพิษวิทยาทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัยนี้เป็นอย่างดี

ผลประโยชน์ทับซ้อน

คณะผู้วิจัยขอยืนยันว่าไม่มีผลประโยชน์ทับซ้อนใด ๆ

เอกสารอ้างอิง

1. Maximize Market Research. Kratom Market: Industry Analysis and Forecast (2025–2032). Maximize Market Research, 2025. Available at https://www.maximizemarketresearch.com/market-report/kratom-market/216883/?utm_source=chatgpt.com, accessed on May 25, 2025.
2. สำนักงานวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 8. กระท่อม ตอนที่ 3 : ตลาด. [อินเทอร์เน็ต]. 2568 [เข้าถึงเมื่อ 18 มิถุนายน 2568] เข้าถึงได้จาก https://www.doa.go.th/oard8/?page_id=4440&utm_source=chatgpt.com
3. กองควบคุมวัตถุเสพติด. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข. กระท่อม (Kratom). [อินเทอร์เน็ต]. 2566 [เข้าถึงเมื่อ 23 พฤษภาคม 2568] เข้าถึงได้จาก <https://narcotic.fda.moph.go.th/information-about-drugs/kratom>
4. ดวงแก้ว ปัญญาภู, สุเมธี นามเกิด, นิตาภา อินชัย และคณะ. กระท่อม: สมุนไพรหรือยาเสพติด. ว. การแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก 2559; 14: 242-56.
5. จุไรทิพย์ หวังสินทวีกุล. พืชกระท่อมในตำรับยาแผนไทย กับการใช้ประโยชน์ทางการแพทย์. ว. สำนักงานคณะกรรมการป้องกันและปราบปรามยาเสพติด 2562; 35: 19-22.
6. วุฒิเชษฐ รุ่งเรือง. พิษวิทยาของพืชกระท่อม. วารสารเภสัชกรรมโรงพยาบาล 2563; 30: 118-24.
7. World Health Organization. Pre-Review Report: Kratom (*Mitragyna speciosa*), mitragynine, and 7-hydroxymitragynine. 2021. Available at <https://www.who.int/publications/m/item/kratom-mitragynine-7-hydroxymitragynine-critical-review-report.pdf>, accessed on May 24, 2025.
8. สถาบันบำบัดรักษาและฟื้นฟูผู้ติดยาเสพติดแห่งชาติบรมราชชนนี. ข้อมูลวิชาการ พืชกระท่อม.

- [อินเทอร์เน็ต]. 2566 [เข้าถึงเมื่อ 25 พฤษภาคม 2568] เข้าถึงได้จาก <http://www.pmnidat.go.th/thai/downloads/text/T01-61.pdf>
9. Watanabe K, Yano S, Horie S, *et al.* Inhibitory effect of mitragynine, an alkaloid with analgesic effect from Thai medicinal plant *Mitragyna speciosa*, on electrically stimulated contraction of isolated guinea pig ileum through the opioid receptor. *Life Sci* 1997; 60(12): 933-42.
 10. Kruegel AC, Uprety R, Grinnell SG, *et al.* 7-Hydroxymitragynine is an active metabolite of mitragynine and a key mediator of its analgesic effects. *ACS Cent Sci* 2019; 5(6): 992–1001.
 11. Hiranita T, Sharma A, León F, *et al.* Potential contribution of 7-hydroxymitragynine, a metabolite of the primary kratom (*Mitragyna speciosa*) alkaloid mitragynine, to the μ - opioid activity of mitragynine in rats. *FASEB J* 2020; 34(S1): 1.
 12. Takayama H, Ishikawa H, Kurihara M, *et al.* Studies on the synthesis and opioid agonistic activities of mitragynine-related indole alkaloids: discovery of opioid agonists structurally different from other opioid ligands. *J Med Chem* 2002; 45(9): 1949–56.
 13. OECD. Test No. 471: bacterial reverse mutation test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Paris: OECD Publishing; 1997.
 14. Ghazali AR, Abdullah R, Ramli N, *et al.* Mutagenic and antimutagenic activities of *Mitragyna speciosa* Korth extract using Ames test. *J Med Plants Res* 2011; 5(8): 1345–8.
 15. Oliveira AS, Fraga S, Carvalho F, *et al.* Chemical characterization and in vitro cyto- and genotoxicity of ‘legal high’ products containing Kratom (*Mitragyna speciosa*). *Forensic Toxicol* 2016; 34(2): 213–26.
 16. Sudmoon R, Tanee T, Wonok W, *et al.* Discovery of rhynchophylline and mitraphylline in two Thai *Mitragyna* species and the investigation of their biological activity via opioid gene expression analysis. *Sci Rep* 2025; 15: 5865.