

ศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสมุนไพรบางชนิดหลังทำปฏิกิริยากับไนไตรท์โดยวิธีเอมส์

The determination on mutagenicity of nitrite treated extracts from some herbs using Ames test

สุพัตรา เกิดสุข¹ จันทร์เพ็ญ แสงประกาย² นฤพร เพ็ชรกลาง¹ และ ศิริลักษณ์ เอี่ยมธรรม^{1*}

Supattra Keadsuk¹, Junpen Sangprakai², Naruporn Pedklang¹ and Siriluck Iamtham^{1*}

¹สาขาพันธุศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน นครปฐม 73140

²สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10903

¹Department of Genetics, Faculty of Liberal Art and Science, Kasetsart University, Kampaengsaen campus, Nakornpratom 73140

²Institute of Food Research and Product Development, Kasetsart University, Bangkok 10903

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อศึกษาการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดพืชสมุนไพร 17 ชนิด (18 ตัวอย่าง) ได้แก่ มะขามป้อม บอระเพ็ด เหงือกปลาหมอ ดอกม่วง กระเทียม ฟักทะลายโจร หญ้าปักกิ่ง เห็ดหลินจือ ขิง ขี้เหล็ก สะเดา มะแว้งเครือ มะแว้งต้น มะระจีน (ผล) มะระจีน (เถา) ลูกใต้ใบ ผักเป็ดแดง ดอกสายน้ำผึ้ง หญ้าแห้วหมู และศึกษาสารสกัดสมุนไพรที่ทำปฏิกิริยากับไนไตรท์ กลายเป็นสารเคมีพวกสารประกอบ nitroso ทำให้เกิดการก่อกลายพันธุ์ชนิดการเลื่อนของเบส (frameshift mutation) โดยการทดสอบเอมส์ (Ames test) ใช้แบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* TA98 โดยนำสมุนไพร 17 ชนิด (18 ตัวอย่าง) มาสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด คือน้ำและเอทานอล นำสารสกัดมาทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์โดยทำปฏิกิริยากับไนไตรท์ จากนั้นทดสอบโดยวิธีเอมส์ โดยใช้ความเข้มข้นของสารที่ 1.3, 2.5, 5 และ 10 มิลลิกรัม/จานอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารที่ทดสอบ กับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญขึ้น พบว่าสารสกัดน้ำและสารสกัดเอทานอลของสมุนไพร ที่ไม่ทำปฏิกิริยากับไนไตรท์ไม่แสดงฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ แต่เมื่อสมุนไพรทำปฏิกิริยากับไนไตรท์ในสภาวะกรด (ค่าพีเอช 3-3.5) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง สารสกัดเอทานอลของสมุนไพรเกือบทุกตัวอย่างยกเว้นลูกใต้ใบและมะระจีน (ผล) แสดงฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์อย่างชัดเจน ซึ่งเป็นการกลายพันธุ์ชนิดการเลื่อนของเบส และสารสกัดน้ำของสมุนไพร 4 ชนิด ได้แก่ บอระเพ็ด ขิง ขี้เหล็ก และมะระจีน (เถา) แสดงฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์แบบอ่อน

ABSTRACT

The objective of this study is to investigate the mutagenicity of 17 herb extracts (18 samples), including *Phyllanthus emblica* Linn., *Tinospora crispa* Linn., *Acanthus ilicifolius* Linn., *Allium sativum* Linn., *Andrographis paniculata* Wall. Ex Nees, *Murdannia loriformis* (Hassk.), *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst., *Zingiber officinale* Roscoe, *Cassia siamea* Britt., *Azadirachta indica*, *Solanum trilobatum* Linn., *Solanum indicum* Linn., *Momordica charantia* Linn., *Phyllanthus amarus* Schum&Thonn., *Alternanthera bettzickiana* (Regel) Nichols., *Lonicera japonica* Thumb., and *Cyperus rotundus* Linn. The herbs were extracted using two different solvents, water and ethanol, and were treated with nitrite to observe mutagen expression as nitroso compound corresponding to frameshift mutation. The extracts from both treated solvents at concentration of 1.3, 2.5, 5 and 10 mg/plate were subjected to Ames test. The growth of *Salmonella typhimurium* TA98 was displayed as the indicator to detect the mutagenicity. The results showed that there was no mutagenic activity from the herb extracts without sodium nitrite treatment. However, after being treated with nitrite in an acidic condition (pH 3-3.5) at 37 °C for 4 h, almost of the ethanol extracts showed direct mutagenic activity towards the bacteria except the extracts from *Phyllanthus amarus* Schum&Thonn. and *Momordica charantia* Linn. The water extracts from *Tinospora crispa* Linn., *Zingiber officinale* Roscoe, *Cassia siamea* Britt., and *Momordica charantia* Linn. expressed low level of mutagenic activity.

คำสำคัญ: ฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์, พืชสมุนไพร, การทดสอบแอมส์

Keywords: mutagenicity, herbs, Ames test

บทนำ

ปัจจุบันมีการศึกษาวิจัยเพื่อนำพืชสมุนไพรมาใช้เป็นยาแทนยาแผนปัจจุบัน เพื่อหลีกเลี่ยงผลข้างเคียงของยาแผนปัจจุบัน และนำไปใช้ประโยชน์เป็นอาหาร ใช้เตรียมเป็นเครื่องดื่ม ใช้เป็นอาหารเสริมเป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอาง ใช้แต่งกลิ่น แต่งสีอาหารและยา ตลอดจนใช้เป็นยาฆ่าแมลง จะเห็นได้ว่าสมุนไพรเป็นที่ต้องการทั้งในระดับประเทศและระดับโลก สมุนไพรจึงเป็นทางเลือกสำคัญในการรักษาหรือบรรเทาโรคสำหรับคนในยุคปัจจุบัน สมุนไพรบางชนิดได้ผ่านการศึกษาดูทางเภสัชวิทยา และทดสอบความเป็นพิษอย่างแน่ใจก่อนที่จะผลิตเป็นยารักษาโรค อย่างไรก็ตามยังคงมีสมุนไพรไทยอีกจำนวนมากที่ไม่มีข้อมูลการทดสอบทางพิษวิทยาก่อนที่จะนำสมุนไพรไปใช้ประโยชน์ได้อย่างปลอดภัย ตลอดจนการศึกษาถึงโอกาสที่อาจจะเกิดพิษจาก

สมุนไพร ในกรณีที่สมุนไพรอาจทำปฏิกิริยากับสารเคมีบางตัวในอาหารแล้วกลายเป็นสารพิษขึ้น ซึ่งสมุนไพรบางชนิดประกอบด้วยสารอัลคาลอยด์ ซึ่งเป็นกลุ่มของสารที่มีศักยภาพที่จะก่อพิษเมื่อมีการบริโภคมากเกินไปได้มีการศึกษาถึงสารพิษในสมุนไพร เช่น ลูกจันทน์ (nutmeg) อบเชยลังกา (Ceylon cinnamon) กานพลู (clove) พืชตระกูลพริกไทย (piper) และโสม (ginseng) พบว่าความเป็นพิษของสารสกัดที่ได้จากอบเชยลังกานั้น แสดงฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ (mutagenicity) เมื่อทดลองใช้ใน *Bacillus subtilis* ซึ่งเป็นการศึกษาผลกระทบของสารเคมีต่อดีเอ็นเอ (Ungsurungsie et al., 1984) นอกจากนั้นสารสกัดจากกานพลู เปลือกอบเชย ได้แสดงศักยภาพในการก่อกลายพันธุ์ เมื่อทดสอบระยะสั้นโดยวิธีแอมส์ ในเครื่องทดสอบตระกูลพริกไทยนั้น มีสารอัลคาลอยด์ที่สำคัญกลุ่มหนึ่งคือ ไพเพอรีน (piperine) สามารถ

ทำให้หนูเป็นหมัน เนื่องจากพบว่าทำให้เซลล์ของมดลูกทำงานผิดปกติ (Piyachaturawat *et al.*, 1982) สำหรับความเป็นพิษอย่างเฉียบพลันของไปเปอร์นินนี้ ได้มีการทดสอบแล้วในสัตว์ทดลองหลายชนิด (Piyachaturawat *et al.*, 1982) นอกจากนี้โสมตังกุย ซึ่งมักใช้เป็นองค์ประกอบของยาบำรุงโลหิตสตรีนั้น ก็ได้ถูกทดสอบพบว่ามียุทธก่อกลายพันธุ์อ่อนๆ ในแบคทีเรีย เช่นเดียวกับฤทธิ์การทำลายดีเอ็นเอ และยังมีรายงานที่พบว่าเครื่องเทศบางชนิดโดยเฉพาะลูกจันทน์และพริกไทยนั้น ทำปฏิกิริยากับเกลือไนไตรท์ในสภาวะกรด ได้สารเคมีที่มียุทธก่อกลายพันธุ์ เมื่อทดสอบด้วยวิธีเอ็มเอส (Namiki *et al.*, 1984) สำหรับในงานวิจัยนี้ได้นำพืชสมุนไพร ในกลุ่มยาอายุวัฒนะ กระตุ้นภูมิคุ้มกัน และทำให้เจริญอาหาร ได้แก่ มะขามป้อม บอระเพ็ด เหงือกปลาหมอ ดอกม่วง หล้าเหว้หมู ผักเป็ดแดง กระเทียม ฟ้าทะลายโจร หล้าปักกิ่ง เห็ดหลินจือ มะระจีนก (ผล) มะระจีนก (เถา) ดอกสาหร่ายฝัก ลูกใต้ใบ จิง ใบจีเหล็ก ใบสะเดา มะแว้งเครือ มะแว้งต้น มาศึกษาถึงโอกาสการเกิดพิษของพืชสมุนไพรเหล่านี้ โดยเฉพาะเมื่อทำปฏิกิริยากับไนไตรท์ เพื่อเป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภคและการศึกษาในขั้นของสัตว์ทดลองต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

เตรียมตัวอย่างพืชสมุนไพร

นำพืชสมุนไพรที่คัดเลือกไว้ 17 ชนิด (18 ตัวอย่าง) คือ มะขามป้อม บอระเพ็ด เหงือกปลาหมอ ดอกม่วง กระเทียม ฟ้าทะลายโจร หล้าปักกิ่ง เห็ดหลินจือ ผลมะระจีนก/เถา มะระจีนก จิง ใบจีเหล็ก ใบสะเดา มะแว้งเครือ มะแว้งต้น ลูกใต้ใบ ผักเป็ดแดง ดอกสาหร่ายฝัก และ หล้าเหว้หมู มาคัดเลือกสิ่งปนเปื้อนออก และบดให้เป็นผงละเอียด โดยใช้เครื่องบดอาหารขนาดใหญ่

สกัดพืชสมุนไพรตัวอย่างด้วยน้ำ

นำสมุนไพรที่บดเป็นผงน้ำหนัก 10 กรัม ใส่

ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นกรองสารสกัดด้วยผ้าขาวบางผ่านเครื่องกรอง และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บที่ตู้ -70 องศาเซลเซียส

สกัดพืชสมุนไพรตัวอย่างด้วยเอทานอล 95%

นำสมุนไพรที่บดเป็นผงน้ำหนัก 6 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำเอทานอล 95% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นกรองสารสกัดสมุนไพรทั้งหมดด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 ผ่านเครื่องกรอง และนำสารสกัดสมุนไพรทั้งหมด ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ภายใต้อากาศดันต่ำ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นหาค่าน้ำหนักสารสกัด ละลายสารสกัดโดยใช้ dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้ได้ความเข้มข้นที่ 0.1 มิลลิกรัม/ไมโครลิตร ของสมุนไพรสกัดทั้งหมด เก็บสารสกัดในขวดแก้วสีชา ที่ตู้ -20 องศาเซลเซียส

การทดสอบยุทธก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดสมุนไพร

เติมตัวอย่างสารสกัดสมุนไพรปริมาตร 13, 25, 50, 100 ไมโครลิตร ในหลอดทดลอง จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ (0.1M phosphate buffer) ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 1000 ไมโครลิตร และเติมเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* TA98 ที่เพาะไว้ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หลอดละ 100 ไมโครลิตร นำไปเขย่าในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำ top agar ปริมาตร 100 มิลลิลิตร มาเติม 0.5 M L-histidine.HCl/0.5 mM biotin ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วจึงนำไปใส่ในหลอดทดลองที่เขย่าแล้ว 20 นาที หลอดละ 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เทลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อในจานเพาะเชื้อ นำเข้าตู้บ่มเชื้อ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และนับจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ที่เจริญขึ้น

การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดสมุนไพร โดยทำปฏิกิริยากับไนโตรท์

ใส่ตัวอย่างสารสกัดสมุนไพรปริมาณ 100 ไมโครลิตรในหลอดทดลอง โดยใช้สารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน 1-aminopyrine (1-AP) แทนตัวอย่างสารสกัดสมุนไพรปริมาณ 10 ไมโครลิตร เป็น positive control และใช้ตัวทำละลายสารสกัด (น้ำ หรือ DMSO) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เป็น negative control จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริก 0.2 นอร์มอล ให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1000 ไมโครลิตร เพื่อให้ระบบมีค่าความเป็นกรดต่างในช่วง 3.0-3.5 จากนั้นเติมโซเดียมไนโตรท์ 2 โมลาร์ หลอดละ 250 ไมโครลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 1 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา เติมแอมโมเนียมซัลฟามेट (ammonium sulfamet) 2 โมลาร์ หลอดละ 250 ไมโครลิตร นำไปแช่น้ำแข็ง 10 นาที ได้ nitrosation product นำไปทดสอบด้วยวิธีเอ็มเอส

การทดสอบโดยวิธีเอ็มเอส

นำ nitrosation product ปริมาตร 13, 25, 50, 100 ไมโครลิตร มาเติมบัฟเฟอร์ (0.1 M phosphate buffer) ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 1000 ไมโครลิตร และเติมเชื้อแบคทีเรีย *S. typhimurium* TA98 ที่เพาะไว้ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หลอดละ 100 ไมโครลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วผสม top agar หลอดละ 2 มิลลิลิตร (top agar ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.5 M L-histidine.HCl/ 0.5 mM biotin ปริมาตร 10 มิลลิลิตร) เขย่าให้เข้ากัน เทลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อในจานเพาะเชื้อให้ส่วนผสมกระจายสม่ำเสมอ นำเข้าตูบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ที่เจริญขึ้น

การวิเคราะห์ข้อมูลและการแปลผล

ผลการทดลองแสดงเป็นจำนวนโคโลนีที่กลาย

พันธุ์ต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะใช้นาความเข้มข้นที่ 1.3, 2.5, 5.0, และ 10 มิลลิกรัม/จานอาหารเลี้ยงเชื้อ และหาค่าเฉลี่ยจากการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง ครั้งละ 2 จานเลี้ยงเชื้อ ในแต่ละขนาดความเข้มข้นที่ต่างกันของสมุนไพรตัวอย่าง โดยมีหลักการอธิบายผลการทดลองเพื่อวิเคราะห์ว่าสารสกัดสมุนไพรมีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ดังนี้

1. มีความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารที่ทดสอบ กับจำนวนโคโลนีที่เจริญขึ้น ว่าเป็น dose response relationship คือ เมื่อความเข้มข้นของสารเพิ่มขึ้น จะพบว่าจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์เพิ่มขึ้น

2. มีตัวอย่าง อย่างน้อย 2 ความเข้มข้น ที่ทำให้จำนวนแบคทีเรียที่กลายพันธุ์ มีจำนวนมากกว่าจำนวนที่กลายพันธุ์ตามธรรมชาติ

3. มีตัวอย่าง อย่างน้อย 1 ความเข้มข้น ที่ทำให้จำนวนแบคทีเรียกลายพันธุ์มากกว่า 2 เท่า ของการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ

ผลการทดลอง

การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์โดยวิธีเอ็มเอสของพืชสมุนไพร 17 ชนิด (18 ตัวอย่าง) สกัดด้วยน้ำทั้งที่ทำปฏิกิริยากับไนโตรท์และไม่ทำปฏิกิริยากับไนโตรท์

เมื่อนำสารสกัดพืชสมุนไพรด้วยน้ำที่ทำปฏิกิริยากับไนโตรท์ และไม่ทำปฏิกิริยากับไนโตรท์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 1.3, 2.5, 5 และ 10 มิลลิกรัม/จานอาหารเลี้ยงเชื้อ มาทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์โดยวิธีเอ็มเอส พบว่าสารสกัดสมุนไพรด้วยน้ำที่ไม่ทำปฏิกิริยากับไนโตรท์ ให้ผลไม่ต่างจาก negative control คือ ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ ขณะที่สารสกัดสมุนไพรด้วยน้ำที่ทำปฏิกิริยากับไนโตรท์ของบอระเพ็ด จิงจี้เหล็ก และมะระจีนก (เถา) ให้จำนวนโคโลนี 49 ± 5 , 43 ± 3 , 58 ± 2 , 44 ± 4 ตามลำดับ สารสกัดสมุนไพรด้วยน้ำของสมุนไพรทั้ง 4 ชนิดนี้ แสดงฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์แบบอ่อน ดังแสดงผลตามตารางที่ 1 เนื่องจากมีอย่างน้อย 1 ความเข้มข้นที่ทำให้จำนวนแบคทีเรียกลายพันธุ์มากกว่า 2 เท่า ของการกลายพันธุ์ตาม

ธรรมชาติ (negative control) ซึ่งมีจำนวนโคโลนีเท่ากับ 15 ± 5

การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์โดยวิธีเอนม์ของสารสกัดพืชสมุนไพร 17 ชนิด (18 ตัวอย่าง) ด้วยเอทานอล 95 % ทั้งที่ทำปฏิกิริยากับไนไตรท์และไม่ทำปฏิกิริยากับไนไตรท์

เมื่อนำสารสกัดสมุนไพรด้วยเอทานอล 95 % ที่ทำปฏิกิริยากับไนไตรท์ และไม่ทำปฏิกิริยากับไนไตรท์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 1.3, 2.5, 5 และ 10 มิลลิกรัม/จานอาหารเลี้ยงเชื้อ มาทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์โดยวิธีเอนม์ พบว่าสารสกัดสมุนไพรด้วยเอทานอล 95 % ที่ไม่ทำปฏิกิริยากับไนไตรท์ ไม่แสดงฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์เมื่อเทียบกับการทดลองควบคุม เนื่องจากไม่พบสารสกัดสมุนไพรใด ที่ทำให้จำนวนแบคทีเรียกลายพันธุ์มากกว่า 2 เท่า ของการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ (negative control) ซึ่งมีจำนวนโคโลนีเท่ากับ 10 ± 3 ขณะที่สารสกัดสมุนไพรด้วยเอทานอล 95 % ที่ทำปฏิกิริยากับไนไตรท์ พบว่าสารสกัดสมุนไพรเกือบทุกชนิด ยกเว้นลูกใต้ใบ และมะระขี้นก (ผล) ที่แสดงฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์อย่างชัดเจน โดยบอระเพ็ดให้จำนวนโคโลนีสูงสุดคือ 418 ± 6 รองลงมาคือ กระเทียมให้จำนวนโคโลนี 150 ± 12 และ มะแว้งต้นให้จำนวนโคโลนี 145 ± 18 ที่น่าสังเกตคือ เกิดปรากฏการณ์ partial killing effect คือ สารสกัดสมุนไพรด้วยเอทานอลที่ทำปฏิกิริยากับไนไตรท์ สามารถฆ่าเซลล์แบคทีเรียตายที่ความเข้มข้นสูง ซึ่งพบในมะขามป้อม ลูกใต้ใบ และขี้เหล็กที่ความเข้มข้น 2.5 และ 5 มิลลิกรัม/จานอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ยังพบการเกิด killing effect คือไม่พบเชื้อขึ้นเลยในขี้เหล็กที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (ตารางที่ 1)

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดน้ำและสารสกัดเอทานอลของพืชสมุนไพรทั้ง 18 ตัวอย่าง

ไม่แสดงฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ เมื่อทดสอบด้วย *S. typhimurium* TA 98 ในระบบที่ไม่ต้องการการกระตุ้นจากเอนไซม์ที่สกัดจากตับหนู นั่นคือสารสกัดน้ำของสมุนไพรไม่มีผลทำให้เกิดการกลายพันธุ์ และสารสกัดของสมุนไพรทั้ง 18 ตัวอย่างไม่แสดงบทบาทเป็นสารที่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ชนิดตรง (direct mutagen) และเมื่อนำสารสกัดสมุนไพร มาทดสอบการเกิดพิษภายหลังที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับไนไตรท์ ในสภาวะเลียนแบบกระเพาะอาหาร (พีเอช 3-3.5) พบว่าสารสกัดน้ำของสมุนไพร 4 ตัวอย่าง ได้แก่ บอระเพ็ด ขิง ใบขี้เหล็ก และมะระขี้นก (เถา) แสดงฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์แบบอ่อน ในขณะที่สารสกัดเอทานอลของสมุนไพรเกือบทั้งหมด ยกเว้น มะระขี้นก (ผล) และลูกใต้ใบ แสดงฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์อย่างชัดเจนเข้าตามหลักเกณฑ์ คือ จำนวนโคโลนีที่กลายพันธุ์ต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ แปรผันตามความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพร สารสกัดสมุนไพรอย่างน้อย 2 ความเข้มข้น มีจำนวนโคโลนีมากกว่าจำนวนโคโลนีที่กลายพันธุ์ตามธรรมชาติ และสารสกัดสมุนไพรอย่างน้อย 1 ความเข้มข้นมีจำนวนโคโลนีที่กลายพันธุ์มากกว่า 2 เท่าของการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ

ผลการทดลองนี้บางส่วนสอดคล้องกับงานวิจัยของชนิพรธณ (2533) คือสารสกัดจากสมุนไพรฟ้าทะลายโจร และหญ้าแห้วหมู มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์หลังจากผ่านการทำปฏิกิริยากับไนไตรท์ในกระบวนการ nitrosation ในสภาวะเลียนแบบกระเพาะอาหาร (พีเอช 3-3.5) โดยไม่มีระบบเอนไซม์กระตุ้นสารพิษ เมื่อทดสอบด้วยเชื้อ *S. typhimurium* TA98 (ตรวจวัดสารก่อกลายพันธุ์ชนิด frameshift mutagen) และ TA100 (ตรวจวัดสารก่อกลายพันธุ์ชนิด base-pair substitute mutagen) แต่เมื่อทดสอบในสภาวะที่มีระบบเอนไซม์กระตุ้นสารพิษ กลับพบว่าฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นนั้นอ่อนกำลังลง ส่วนสารสกัดขิงนั้นได้รายงานไว้ว่า ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์หลังทำปฏิกิริยากับไนไตรท์ ขณะที่ในงานวิจัยนี้พบว่า สารสกัดเอทานอลของขิงแสดง

ฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์แบบอ่อน หลังจากผ่านการทำปฏิกิริยากับไนไตรท์ ซึ่งคาดว่าเป็นสาเหตุเนื่องจากความเข้มข้นของสารสกัดเอทานอลของพืชที่ใช้ทดสอบในงานวิจัยของชนิพรรณ (2533) นั้น ต่ำกว่าขนาดที่ใช้ในงานวิจัยนี้ถึง 40 เท่า อย่างไรก็ตาม สารสกัดพืชในตัวอย่างหลายเฮกเซนแสดงฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์หลังปฏิกิริยากับไนไตรท์ เมื่อทดสอบด้วยเชื้อ *S. typhimurium* TA100 (ชนิพรรณ, 2533) และงานวิจัยของ Chavalittumrong *et al.* (1997) ที่ศึกษา

ความเป็นพิษของบอระเพ็ดก็ให้ผลทำนองเดียวกันคือพบว่าบอระเพ็ดไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์โดยตัวมันเอง แต่หากนำไปทำปฏิกิริยากับไนไตรท์ก็จะกลายเป็นสารที่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์เกิดขึ้น

สารสกัดน้ำของใบขี้เหล็กมีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ชนิดอ่อน ส่วนสารสกัดเอทานอลของใบขี้เหล็กมีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ และฤทธิ์ฆ่าเซลล์ (partial killing effect) มีรายงานวิจัยพบว่า สารสกัดเมทานอลของใบขี้เหล็กไม่มีความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็ง (Raji cells)

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบเอมส์ของสารสกัดสมุนไพร 17 ชนิด (18 ตัวอย่าง) ที่สกัดด้วยน้ำและเอทานอลที่ความเข้มข้นสูงสุดคือ 10 มิลลิกรัม/จานอาหารเลี้ยงเชื้อ ทั้งที่ทำปฏิกิริยากับไนไตรท์และไม่ทำปฏิกิริยากับไนไตรท์ โดยพิจารณาจากค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีที่กลายพันธุ์ต่อจานเลี้ยงเชื้อ

ชนิดพืชสมุนไพร	จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์/จานอาหารเลี้ยงเชื้อ			
	สกัดด้วยน้ำ ไม่ทำปฏิกิริยากับไนไตรท์	สกัดด้วยน้ำ ทำปฏิกิริยากับไนไตรท์	สกัดด้วยเอทานอล ไม่ทำปฏิกิริยากับไนไตรท์	สกัดด้วยเอทานอล ทำปฏิกิริยากับไนไตรท์
มะขามป้อม	24±3	19±6	11±3	9±3 pk
บอระเพ็ด	19±2	49±5	33±7	418±6
เหงือกปลาหมอดอกม่วง	17±4	23±6	36±5	100±18
กระเทียม	23±3	25±4	28±4	150±12
ฟ้าทะลายโจร	20±5	31±7	27±1	67±11
หญ้าปักกิ่ง	28±7	21±4	35±7	128±12
เห็ดหลินจือ	19±6	21±7	34±5	108±7
ขิง	20±3	43±3	16±7	44±5
ใบขี้เหล็ก	23±3	58±2	0±0	k
ใบสะเดา	23±9	33±10	28±2	93±23
มะแว้งเครือ	24±5	26±10	30±6	102±13
มะแว้งต้น	20±6	21±4	37±4	145±18
ผลมะระขี้นก	22±5	31±1	27±3	30±5
เถามะระขี้นก	23±6	44±4	29±3	58±9
ลูกใต้ใบ	23±7	37±4	16±4	14±3 pk
ผักเป็ดแดง	27±5	23±7	33±4	121±13
ดอกสายน้ำผึ้ง	21±3	36±2	21±3	49±8
หญ้าแห้วหมู	21±8	30±5	33±4	80±13
Negative control	15±5	17±8	10±3	18±4
Positive control	ND	919±143	ND	977±73

หมายเหตุ ND = ไม่ได้ทำการทดสอบ pk = partial killing effect, k = killing effect

(Murakami *et al.*, 1993) แต่พบว่า สารบาราโคลดจากใบอ่อนของขี้เหล็กเป็นพืชต่อเซลล์ P19 embryonal carcinoma cells โดยมีค่า IC_{50} ที่ 0.57, 0.62, 0.53 และ 0.43 มิลลิโมลาร์ ที่เวลา 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ หลังจากได้รับสารดังกล่าว (Permtersin *et al.*, 2002) ซึ่งเป็นประโยชน์ในแง่ของการศึกษาหาสารฆ่าเซลล์มะเร็ง ถึงแม้ว่าสารสกัดดังกล่าวจะมีฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งก็ตาม การศึกษาความปลอดภัยในการใช้สมุนไพรที่ยังคงจำเป็น หากสารสกัดดังกล่าวมีฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งและฆ่าเซลล์ปกติ เช่น เซลล์ภูมิคุ้มกันด้วย โอกาสที่จะนำไปใช้ประโยชน์ในแง่ด้านมะเร็งก็จะลดลง

สารสกัดเอทานอลของมะขามป้อมมีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์แบบอ่อน และฤทธิ์ฆ่าเซลล์ (partial killing effect) ซึ่งมีผลสอดคล้องกับงานวิจัยที่พบว่า สารสกัดน้ำของผลมะขามป้อม เมื่อทำการทดสอบกับ cells-L929 พบว่ามีความเป็นพืชต่อเซลล์อย่างอ่อน โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 16.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (Jose *et al.*, 2001) และสารสกัดผลมะขามป้อมด้วยอะซิโตน คลอโรฟอร์ม น้ำ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิลิตร/จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Grover and Kaur, 1989) สามารถต้านการก่อกลายพันธุ์ต่อเชื้อ *S. typhimurium* TA97, TA100 ได้ ซึ่งถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการก่อกลายพันธุ์ด้วยสาร sodium azide และ NPD (4-nitro-s-phenylenediamine)

จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นชัดว่าสมุนไพรเกือบทั้งหมดถูก nitrosation ทำให้เกิดสารใหม่ที่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์เมื่อใช้กรดเกลือเป็นสภาวะแวดล้อมในกรณีที่ไม่มีระบบกระตุ้นด้วยเอนไซม์จากตับหนู สามารถสรุปได้ว่า ปฏิกริยาต่อต้านระหว่างสมุนไพรไทยกับไนโตรที่นั้น เกิดสารก่อกลายพันธุ์ ซึ่งบางชนิดหรือส่วนใหญ่อาจเป็นสารประกอบ nitroso ที่สามารถจับตัวกับหน่วยพันธุกรรมของแบคทีเรีย ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ใน *S. typhimurium* TA98 แปลผลได้ว่าสารก่อกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นนั้น เป็นสารก่อกลายพันธุ์แบบ frameshift mutagen เนื่องจาก

S. typhimurium TA98 ที่ใช้นี้ เป็นสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์แบบ frameshift mutagen ถึงแม้ว่าความเป็นพืชที่เกิดขึ้นนี้จะบอกค่าเป็นปริมาณไม่ได้ แต่ก็จัดว่าสารสกัดพืชสมุนไพรนั้นมีพิษในระดับยีน อย่างไรก็ตาม จากข้อมูลงานวิจัยของชนิพรรณ (2533) มีข้อน่าสังเกตคือสารก่อกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยานitrosation นั้น จะมีฤทธิ์ลดลงภายหลังที่ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์จากตับหนู นั้นแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์จากตับ มีฤทธิ์ในการทำให้สารก่อกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นนั้น ลดความรุนแรงลง จากงานวิจัยนี้สรุปได้ว่าพืชสมุนไพรทั้ง 17 ชนิด (18 ตัวอย่าง) ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์โดยตัวเอง แต่มีศักยภาพในการก่อกลายพันธุ์ได้ ถ้าได้รับการกระตุ้นจากสารประเภทไนโตรที่ ดังนั้นวิธีที่ดีที่สุดในการลดความเสี่ยงต่อการสัมผัสกับสารก่อกลายพันธุ์ คือ พยายามหลีกเลี่ยงอาหารที่มีเกลือไนเตรดหรือไนไตรท์เมื่อบริโภคพืชสมุนไพรดังกล่าว

สรุปผลการทดลอง

การประเมินความเป็นพิษโดยวิธีระยะสั้น ของสารสกัดน้ำและสารสกัดเอทานอลของพืชสมุนไพรทั้ง 18 ตัวอย่าง ได้แก่ มะขามป้อม บอระเพ็ด เหงือกปลาหมอ ดอกม่วง กระทือ พื้ทะเลลายโจร หนุ่ยปากกิ่ง เห็ดหลินจือ ขี้เหล็ก สะเดา มะแว้งเครือ มะแว้งต้น มะระขี้นก (ผล) มะระขี้นก (เถา) ลูกใต้ใบ ผักเป็ดแดง ดอกสายน้ำผึ้ง หนุ่ยเหว้า พบว่า ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ เมื่อทดสอบด้วย *S. typhimurium* TA98 ในระบบที่ไม่ต้องการการกระตุ้นจากเอนไซม์ นั่นก็คือสารสกัดของสมุนไพรทั้ง 18 ตัวอย่างไม่แสดงบทบาทเป็นสารก่อกลายพันธุ์ ชนิด frameshift mutation

เมื่อนำสารสกัดสมุนไพรมาทดสอบการเกิดพิษภายหลังที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับไนโตรที่ ในสภาวะเลียนแบบกระเพาะอาหาร (พีเอช 3-3.5) พบว่า สารสกัดน้ำของสมุนไพร 4 ตัวอย่าง ได้แก่ บอระเพ็ด ขี้เหล็ก และมะระขี้นก (เถา) แสดงฤทธิ์ก่อกลาย

พันธุ์แบบอ่อน ในขณะที่สารสกัดเอทานอลของสมุนไพรรอบทั้งหมด ยกเว้น มะระขี้นก (ผล) และถูกได้ใบแสดงฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์อย่างชัดเจนซึ่งสรุปได้ว่าสารสกัดน้ำจากพืชสมุนไพร 18 ตัวอย่าง มีโอกาสที่จะทำปฏิกิริยากับไนไตรท์ แล้วเกิดเป็นสารก่อกลายพันธุ์ 22 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสารสกัดเอทานอลมีโอกาที่จะทำปฏิกิริยากับไนไตรท์ แล้วเกิดเป็นสารก่อกลายพันธุ์ 89 เปอร์เซ็นต์

เอกสารอ้างอิง

- ชนิพรรณ เอี่ยมวรพรม. 2533. ผลของสารกันเสียไนไตรท์ต่อฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของยาสมุนไพรไทย ซึ่งทดสอบโดยใช้เอมส์เทสต์. วิทยานิพนธ์มหาวิทยาลัยมหิดล.
- Chavalittumrong, P., Attawish, A., Chuthaputti, A. and Chuntapet, P.1997. Toxicological study of crude extract of *Tinospora crispa* Miers ex Hook.f. & Thoms. *Thai J Pharm Sci* 21: 199-210.
- Grover, I.S. and Kaur, S. 1989. Effect of *Emblica officinalis* Gaertn. (Indian gooseberry) fruit extract on sodium azide and 4-nitro-O-phenylenediamine induced mutagenesis in *Salmonella typhimurium*. *Indian J Exp Biol* 27: 207-209.
- Jose, J.K., Kuttan, G. and Kuttan, R. 2001. Antitumour activity of *Emblica officinalis*. *J Ethnopharmacol* 75: 65-69.
- Murakami, A., Kondo, A., Nakamura, Y., Ohigashi, H. and Koshimizu, K.1993. Possible anti-tumor promoting properties of edible plants from Thailand, and identification of an active constituent, cardamomin, of *Boesenbergia pandurata*. *Biosci Biotech Biochem* 57: 1971-1973.
- Namiki, K., Yamanaka, M., Osawa, T. and Nomiki, M. 1984. Mutagen formation by nitrite-spice reactions. *J Agric food Chem* 32: 948-952.
- Permtersin, C., Chaichanthipyuth, C. and Lipipun, V. 2002. Evaluation of cytotoxic effect of barakol on P19 embryonal carcinoma cell. *Thai J Pharm Sci* 26(suppl.): 29.
- Piyachaturawat, P., Glinsukon, T. and Peungvicha, P. 1982. Antifertility activity of an alkaloid from *Piper nigrum*. In: *Third South East Asia and Western Regional Meeting of Pharmacologist*. pp. 25-28.
- Ungsurungsie, M., Paovalo, C. and Noonai, A. 1984. Mutagenicity of extracts from Ceylon cinnamon in the rec assay. *Food Chem Toxic* 20: 109-114.