



การศึกษาฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ในยาสีฟันด้วยวิธีเอมส์

มณฑล เลิศคณาวนิชกุล, วิภาวรรณ ภมร, ศรัณญา ศศิธร, วิภาดา พรหมวัง

บทคัดย่อ

ศึกษาฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ของยาสีฟันประเภทต่างๆ จำนวน 30 ตัวอย่าง กับเชื้อแบคทีเรียทดสอบ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ด้วยวิธีเอมส์ (Ames' test) ในการทำให้เกิดการกลายพันธุ์กลับ (reverse mutation) ทำให้สามารถเจริญได้ในจานเพาะเชื้อที่ไม่มี histidine โดยมีเกณฑ์ว่าหากจำนวน revertant colonies ในจานทดสอบของตัวอย่างยาสีฟันเท่ากับหรือมากกว่า 4 เท่า ของ spontaneous colonies จาก negative control แสดงว่าสารสกัดจากยาสีฟันดังกล่าวมีฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ ปรากฏว่ายาสีฟันจำนวน 8 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 26.67 ของตัวอย่างยาสีฟันทั้งหมด และแบ่งตามรูปแบบยาสีฟันได้เป็นยาสีฟันที่ไม่มีส่วนผสมของสมุนไพร และยาสีฟันประเภทผงขัดให้ผลบวกต่อการทดสอบหาฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ด้วยวิธีเอมส์ในเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ TA98 เท่านั้น คิดเป็นร้อยละ 50 (7/14) และร้อยละ 6.25 (1/16) ตามลำดับ แต่พบว่ายาสีฟันที่มีส่วนผสมของสมุนไพรทุกตัวอย่าง ในรูปแบบเจลหรือครีมให้ผลลบต่อการทดสอบหาฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ด้วยวิธีเอมส์ในแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์

คำรหัส: การทดสอบด้วยวิธีเอมส์ • ยาสีฟัน • *Salmonella typhimurium*

บทนำ

คุณสมบัติอย่างหนึ่งของสิ่งมีชีวิตและเป็นกลไกสำคัญอันดับแรกที่ทำให้เกิดความแตกต่างแปรผันในองค์ประกอบของพันธุกรรม (genetic variation) ในส่วนของดีเอ็นเอหรือยีน และสามารถถ่ายทอดการเปลี่ยนแปลงนั้นไปยังลูกหลานได้ คือ การกลายพันธุ์ (mutation)¹⁻² โดยพบที่สามารถเกิดได้ 2 ลักษณะ คือ point mutation ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับยีนเพียงยีนเดียว และ chromosomal mutation ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโครโมโซม³ วิธีการเกิดการกลายพันธุ์สามารถแบ่งได้ 2 วิธี คือ การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ (spontaneous mutation) ซึ่งมีอัตราการเกิดค่อนข้างต่ำโดยเฉลี่ยประมาณระหว่าง $1/10^5$ ถึง $1/10^6$ และการกลายพันธุ์ที่เกิดจากการกระตุ้น (induced mutation) โดยพบมีอัตราการกลายพันธุ์สูงกว่าอัตราการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ

ประมาณ 150 เท่า ซึ่งถูกชักนำจากปัจจัยภายนอกที่สำคัญ 2 ประการ คือ ปัจจัยทางกายภาพและปัจจัยทางเคมี โดยฤทธิ์จากสารเคมีชนิดต่างๆ ซึ่งมักเป็นไปในทางเลื่อม¹ และเป็นที่ยอมรับกันอย่างแพร่หลายแล้วว่าขบวนการกลายพันธุ์ที่เกิดจากสารเคมีมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับขบวนการเกิดมะเร็ง (carcinogenesis) โดยมีข้อพิสูจน์ที่แน่นอนว่าประมาณร้อยละ 80-90 ของสารก่อการกลายพันธุ์ (mutagen) สามารถเป็นสารก่อมะเร็งได้ (carcinogen)⁴⁻⁵ ซึ่งได้มีรายงานเป็นจำนวนมากเกี่ยวกับสารก่อมะเร็งและสารก่อการกลายพันธุ์หรือก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีนโดยสารดังกล่าวส่วนใหญ่ถูกผลิตขึ้นมาโดยมนุษย์และได้นำมาใช้ภายใต้สิ่งแวดล้อมใกล้ตัว เช่น สารเคมี อุตสาหกรรม ยารักษาโรค ยาฆ่าแมลง สีสันอาหาร เครื่องสำอาง เป็นต้น ซึ่งในปัจจุบันเครื่องสำอางได้เข้ามามีบทบาทในชีวิต

สำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

Study on mutagenicity of toothpastes by Ames' test

Monthon Lertcanawanichakul, Wipawan Phamorn, Saranya Sasithorn, Wikanda Promwang

Abstract

To study mutagenicity of different 30 toothpastes by means of Ames' test, using the tested bacterial strains, ie; *Salmonella typhimurium* strains TA98 and TA100. The positive result was considered when number of revertant colonies were equal to or greater than 4 times spontaneous colonies in negative control plate. Eight extracts from all 30 samples (26.67%) showed mutagenicity in TA98 strain, but not in TA100 strain. These samples were seven non-herbal contained toothpastes and one herbal contained toothpaste (scrub toothpaste) in percentage of 50 and 6.25, respectively. Interestingly, the herbal contained toothpastes (gel or cream) did not show mutagenicity in any strains used in this study by Ames' test.

Key words: Ames'test • toothpastes • *Salmonella typhimurium*

ประจำวันเป็นอย่างมาก ไม่ว่าจะเป็นเครื่องสำอางที่มีส่วนประกอบจากสารเคมีหรือจากพืชธรรมชาติ เช่น สบู่ แชมพู ครีมนวดผม ฝอยล้างหน้า น้ำยาล้างปาก ยาสีฟัน เป็นต้น ผลิตภัณฑ์เหล่านี้ล้วนสัมผัสโดยตรงต่อร่างกายของมนุษย์ โดยเฉพาะยาสีฟันซึ่งสัมผัสโดยตรงต่อเยื่อช่องปากซึ่ง เป็นเนื้อเยื่อบางๆ ที่ง่ายต่อการซึมผ่านของสารต่างๆ โดยเฉพาะสารซักฟอก (detergent) ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ระคายเคือง โดยยาสีฟันจัดเป็นสาร detergent ชนิดหนึ่ง ดังนั้น จึงมีฤทธิ์ระคายเคืองเยื่อช่องปาก และอาจกล่าวได้ว่าภัยจากสารเคมีนี้มีผลโดยตรงต่อสุขภาพและชีวิตของมนุษย์ ด้วยเหตุนี้การตรวจสอบสารก่อการกลายพันธุ์ในสิ่งแวดล้อมรวมถึงของใช้ประจำวันจึงมีความจำเป็นอย่างมาก โดยวิธีตรวจสอบการกลายพันธุ์นั้นมีหลายวิธี ซึ่งมีทั้งอาศัยจุลินทรีย์ แมลง เซลล์เนื้อเยื่อเลี้ยง และสัตว์ทดลอง สำหรับวิธีที่นิยมที่สุดคือการใช้จุลินทรีย์ เพราะทำได้ง่าย ประหยัด และให้ผลรวดเร็ว เช่น Rec assay, Ames' Test, Forward mutation เป็นต้น ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้

ได้เลือกใช้วิธีเอมส์ (Ames' Test)⁵⁻⁶ ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้คัดกรองหาฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ของสารเคมี สารสกัดสมุนไพร ในการทำให้เกิดการกลายพันธุ์กลับของเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* TA98 หรือ TA100⁴ โดยมีแนวคิดที่ว่าสารที่ทำให้เกิดการเสียหายของดีเอ็นเอและเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในแบคทีเรีย อาจส่งผลให้เกิดการก่อการกลายพันธุ์ในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mammalian cells) ได้เช่นเดียวกัน⁵ และการกลายพันธุ์นั้นอาจส่งผลปรากฏในรุ่นต่อๆ ไป

วัสดุและวิธีการ

1. ตัวอย่างยาสีฟันและการเตรียมสารละลายตัวอย่างยาสีฟัน

เลือกซื้อตัวอย่างยาสีฟันรูปแบบครีม เจล หรือ ผงขัด จากร้านค้าในจังหวัดนครราชสีมา โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มตามส่วนผสมคือ 1) ยาสีฟันที่ไม่มีส่วนผสมของสมุนไพรรูปแบบเจลหรือครีม (C1-C14)

และ 2) ยาสีฟันที่มีส่วนผสมของสมุนไพรรูปแบบเจลหรือครีม (H1-H13) และผงขัด (HP1-HP3) รวมจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 30 ตัวอย่าง ในสัดส่วน 14:16

ซึ่งตัวอย่างยาสีฟันแต่ละตัวอย่างจำนวน 20 กรัม มาละลายในน้ำประปาปริมาตร 20 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1:2) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 และทำปราชจากเชื้อด้วยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาดรูผ่าน 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นนำสารสกัดยาสีฟันที่ได้มาทำการเจือจางแบบ 2 เท่า (two-fold dilution) เพื่อทำการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของยาสีฟันที่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98 หรือ TA100

2. แบคทีเรียทดสอบ

เชื้อที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ของยาสีฟัน ได้แก่ *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ทั้ง 2 สายพันธุ์ได้รับความอนุเคราะห์จากคณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

S. typhimurium สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ถูกชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับดีเอ็นเอตรงส่วนของยีน histidine (*his-*) แบบ frameshift mutation และ base pair substitution ตามลำดับ ทำให้ไม่สามารถเจริญได้ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มี histidine

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เพื่อทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารละลายยาสีฟันในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ ได้แก่ Mueller Hinton (M-H) Agar/Broth ส่วนชนิดที่ใช้เพื่อทดสอบฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ ได้แก่ Nutrient Broth (NB) No.2 (Oxoid), minimal agar, Vogel Bonner medium E (VB salt) และ Top agar

4. สารเคมีและสารก่อการกลายพันธุ์

สารเคมีสำคัญที่ใช้ ได้แก่ sodium phosphate buffer (pH 7.4), sodium dodecyl sulfate (SDS), histidine และ biotin ส่วนสารก่อการกลายพันธุ์คือ 4-Nitroquinoline-N-Oxide (4NQO: Sigma, USA)

5. วิธีทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารละลายยาสีฟันในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ

ใช้วิธี paper disk diffusion ตามที่แนะนำโดย Bauer และคณะ⁷ โดยดัดแปลงเล็กน้อยดังนี้ เพาะเชื้อแบคทีเรีย (*S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว M-H บ่มเพาะที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB No.2 และปรับให้มีความขุ่นเทียบเท่ากับ McFarland No.0.5 แล้วใช้ไม้ปั่นสำลีปราชจากเชื้อจุ่มสารแขวนลอยเชื้อที่เตรียมได้ นำไปป้ายให้ทั่วลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง M-H

จุ่มกระดาษกลมเปล่า (blank disc) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ลงในสารละลายตัวอย่างยาสีฟันที่ได้ทำการเจือจางไว้แบบ two-fold dilution ดังกล่าวข้างต้น จากนั้นนำ disc ที่จุ่มลงในสารละลายยาสีฟันวางบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง M-H โดยมี SDS 2.5% และตัวทำลายคือ น้ำประปาปราชจากเชื้อ เป็นตัวควบคุมวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งดังกล่าวด้วย จากนั้นนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดไปบ่มเพาะที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูขนาดบริเวณใสที่ปรากฏขึ้นภายหลังการบ่มเพาะโดยถือว่าความเข้มข้นดังกล่าวมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ เลือกความเข้มข้นที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเชื้อทดสอบทั้ง 2 สายพันธุ์ (ไม่เกิดวงใสรอบ disc) จึงนำความเข้มข้นดังกล่าวไปทำการทดสอบหาฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ด้วยวิธีเอ็มเอส

6. การทดสอบฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ด้วยวิธีเอ็มเอส

ใช้วิธี preincubation ของการทดสอบด้วยวิธีเอ็มเอสชนิดไม่มี metabolic activation ตามวิธีของ Yahagi และคณะ⁶ วิธีการทำมีดังนี้ นำเชื้อ *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ที่เก็บไว้ใน 15% กลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาแยกเป็นโคโลนีเดี่ยวโดยวิธีการขีดเชื้อ (streak) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง nutrient agar (NA) ซึ่งเป็นส่วนผสมของ 16% NB No.2 กับ 15% Agar นำไปบ่มเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเช็ดโคโลนีเดี่ยวของเชื้อทิ้ง

2 สายพันธุ์ สายพันธุ์ละ 5 โคโลนี ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB No.2 ปริมาตร 12 มิลลิลิตร ที่บรรจุในหลอดแก้วทรงสูงขนาด 16x150 มิลลิเมตร ฝาเกลียวนำไปบ่มเลี้ยงในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (shaking incubator) 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ด้วยเครื่อง spectrophotometer (Biosystem BTS-330) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.30 ซึ่งมีปริมาณเชื้อ 10^6 - 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

นำตัวอย่างสารละลายยาสีฟันที่ความเข้มข้นที่ไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด จากนั้นเติม Sodium phosphate buffer (pH 7.4) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงไปแล้วใส่เชื้อที่เพาะไว้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มใน shaking incubator 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เมื่อครบเวลาเติม top-agar ที่มี ส่วนผสม ของสารละลาย 0.5 มิลลิโมล histidine/biotin (histidine/biotin : top agar เท่ากับ 1:10) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันโดยเขย่าเบาๆ แล้วเทลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ minimal agar ซึ่งมีส่วนผสมของ agar, VB salt และ 40% glucose ให้กระจายอย่างสม่ำเสมอทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนับจำนวน revertant colonies (สามารถเจริญได้ในจานเพาะเชื้อที่ไม่มี histidine) ในจานทดสอบตัวอย่างสารละลายยาสีฟันมีมากกว่า 4 เท่าของ spontaneous colonies เทียบกับ negative control แสดงว่ายาสีฟันชนิดนั้นน่าจะมีฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์

สำหรับ positive control ที่มีเฉพาะสารก่อการกลายพันธุ์ประกอบด้วย 4NQO ความเข้มข้น 20, 2 และ 0.2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร phosphate buffer 500 ไมโครลิตร และเชื้อ 100 ไมโครลิตร ส่วน negative control เตรียมเช่นเดียวกันโดยมีน้ำประปา 100 ไมโครลิตร แต่ไม่มี 4-NQO

ผลการศึกษา

เนื่องจากการทดสอบหาฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์จากยาสีฟันด้วยวิธีเอ็มเอสไม่สามารถอ่านผลได้ ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากยาสีฟันบางชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ จึงต้องมีการทดสอบหาความเข้มข้นของสารละลายยาสีฟันที่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบ กล่าวคือไม่มีความเป็นพิษต่อเชื้อทดสอบ พบว่ายาสีฟันส่วนใหญ่ที่เตรียมให้อัตราส่วน 1:2 (1 กรัม/มิลลิลิตร) มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ซึ่งต้องมีการทำเจือจางต่อไปแบบ 2 เท่า (two-fold serial dilution) จนพบว่าที่ความเข้มข้นที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเชื้อทดสอบ โดยเฉลี่ยของยาสีฟันที่ไม่มีส่วนผสมของสมุนไพร (C1-C14) และยาสีฟันที่มีส่วนผสมของสมุนไพร (H1-H13, HP1-HP3) เท่ากับ 0.0877, 0.0628 และ 0.5 กรัม/มิลลิลิตร (ยารูปแบบผง) ใน TA98 และ 0.1693, 0.0704 และ 0.5 กรัม/มิลลิลิตร ใน TA100 ตามลำดับ ซึ่งแสดงเป็นค่าความเจือจางได้ดังตารางที่ 1 จากนั้นจึงนำยาสีฟันที่ความเข้มข้นดังกล่าวไปทดสอบฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ด้วยวิธีเอ็มเอสต่อไป

ตารางที่ 1 ค่าความเจือจางสูงสุดของยาสีฟันทั้ง 2 ประเภท และ sodium dodesyl sulfate (SDS) ที่ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเชื้อแบคทีเรีย *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ของยาสีฟันท

หมายเลขผลิตภัณฑ์*	ค่าเจือจางของสารละลายที่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเชื้อทดสอบ	
	TA98	TA100
C1	1:8192	1:8192
C2	1:64	1:64
C3	1:128	1:32
C4	1:2	1:2
C5	1:128	1:32
C6	1:256	1:256
C7	1:32	1:2
C8	1:16384	1:8192
C9	1:8192	1:8192
C10	1:4096	1:1024
C11	1:128	1:64
C12	1:128	1:128
C13	1:4096	1:4096
C14	1:32	1:32
H1	1:16	1:16
H2	1:256	1:256
H3	1:32	1:16
H4	1:1024	1:512
H5	1:64	1:64
H6	1:16384	1:4096
H7	1:256	1:256
H8	1:1024	1:512
H9	1:128	1:128
H10	1:128	1:128
H11	1:64	1:32
H12	1:4	1:4
H13	1:128	1:128
HP1	1:2	1:2
HP2	1:4	1:4
HP3	1:256	1:256
SDS	1:4	1:4

*C = ยาสีฟันทที่ไม่มีส่วนผสมของสมุนไพรรูปแบบเจลหรือครีม (C1-C14)

H = ยาสีฟันทที่มีส่วนผสมของสมุนไพร (H1-H13) รูปแบบเจลหรือครีม

HP = ยาสีฟันทประเภทผงขัดที่มีสมุนไพร (HP1-HP3)

สารสกัดยาสีฟันจำนวน 30 ตัวอย่าง แบ่งเป็น 2 ประเภท คือ 1) ยาสีฟันที่ไม่มีส่วนผสมของสมุนไพรแบบครีมหรือเจล (C1-C14) และ 2) ยาสีฟันที่มีส่วนผสมของสมุนไพรแบบครีมหรือเจล (H1-H13) และรูปแบบผงขัด (HP1-HP3) เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์โดยดูความสามารถเหนี่ยวนำให้เกิด revertant colonies ของเชื้อแบคทีเรีย *S. typhimurium*

สายพันธุ์ TA98 หรือ TA100 ปรากฏว่ายาสีฟันกลุ่มที่ไม่มีส่วนผสมของสมุนไพรมีฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์คิดเป็นร้อยละ 50 (7/14) และพบเพียง 1 ตัวอย่างในยาสีฟันที่มีส่วนผสมของสมุนไพรแบบผงขัด คิดเป็นร้อยละ 6.25 (1/16) โดยนับจำนวน revertant colonies ได้มากกว่า 4 เท่าของ spontaneous mutation จาก negative control ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ความสามารถในการก่อการกลายพันธุ์ของตัวอย่างยาสีฟันในเชื้อ *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100

สารเคมี/ผลิตภัณฑ์ ¹	ค่าเฉลี่ยของโคโลนี ²				ฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ ³	
	TA98		TA100		พันธุ์	
	Spontaneous	Revertant	Spontaneous	Revertant	TA98	TA100
4-NQO 20.0 µg/ml	36	>1,000	152	>1,000	+	+
4-NQO 2.0 µg/ml	36	>1,000	152	>1,000	+	+
4-NQO 0.2 µg/ml	36	>1,000	152	329	+	-
C1	29	28	129	57	-	-
C2	29	21	129	40	-	-
C3	29	18	129	60	-	-
C4	29	75	129	315	-	-
C5	29	75	129	66	-	-
C6	29	>1,000	129	61	+	-
C7	29	>1,000	129	76	+	-
C8	29	377	129	61	+	-
C9	29	569	129	81	+	-
C10	29	980	129	58	+	-
C11	36	>1,000	152	51	+	-
C12	36	9 18	152	51	+	-
C13	36	20	152	46	-	-
C14	36	16	152	56	-	-
H1	28	31	168	65	-	-
H2	28	25	168	54	-	-
H3	28	30	168	60	-	-
H4	28	32	168	61	-	-
H5	28	36	168	101	-	-
H6	28	28	168	78	-	-
H7	28	22	168	57	-	-

ตารางที่ 2 ความสามารถในการก่อการกลายพันธุ์ของตัวอย่างยาสีฟันในเชื้อ *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 (ต่อ)

สารเคมี/ผลิตภัณฑ์ ¹	ค่าเฉลี่ยของโคโลนี ²				ฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ ³	
	TA98		TA100			
	Spontaneous	Revertant	Spontaneous	Revertant	TA98	TA100
H8	28	24	168	79	-	-
H9	28	19	168	79	-	-
H10	36	16	152	75	-	-
H11	36	12	152	60	-	-
H12	36	10	152	48	-	-
H13	36	29	152	186	-	-
HP1	36	>1,000	152	55	+	-
HP2	36	26	152	54	-	-
HP3	36	21	152	48	-	-
2.5% SDS	36	60	152	321	-	-

¹ แถบสีเทา หมายถึง สารเคมีหรือผลิตภัณฑ์ยาสีฟันที่ให้ผลบวกต่อวิธีการทดสอบเอมส์: negative control, น้ำประปา; positive control, 4- nitroquinoline-N-oxide (4-NQO)

² ค่าเฉลี่ยของ revertant colonies จาก 2 จานเพาะเชื้อ (duplicate) ของเชื้อทดสอบ *S. typhimurium* ปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^6 - 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ($OD_{600} \sim 0.3$)

³ ฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ พิจารณาโดยใช้เกณฑ์จำนวน revertant colonies เป็น 4 เท่าของ spontaneous colonies จาก negative control: +, มีฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์; -, ไม่มีฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

ยาสีฟันทั้งหมด 30 ตัวอย่าง ถูกจัดแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือยาสีฟันประเภทไม่มีส่วนผสมของสมุนไพรแบบครีมหรือเจล และยาสีฟันที่มีส่วนผสมของสมุนไพรแบบครีมหรือเจลและรูปแบบผงขัดในสัดส่วน 14:16 มีตัวอย่างยาสีฟันที่ให้ผลบวกกับวิธีเอมส์จำนวน 8 ตัวอย่าง แต่จะเกิดการกลายพันธุ์กลับเฉพาะในแบคทีเรีย *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98 เท่านั้น พบว่ายาสีฟันประเภทไม่มีส่วนผสมของสมุนไพรก่อให้เกิด revertant colonies มากที่สุด สำหรับยาสีฟันที่มีส่วนผสมของสมุนไพรไม่มีแนวโน้มของการก่อการกลายพันธุ์แต่อย่างใด

การเตรียมสารสกัดยาสีฟัน

สารสกัดที่นิยมใช้กันโดยทั่วไปในการทดสอบหาฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ด้วยวิธีเอมส์ คือ dimethylsulfoxide (DMSO) แต่ในการทดสอบครั้งนี้ได้ใช้สารสกัดคือน้ำประปา เนื่องจากมีรายงานพบว่าคลอรีนในน้ำประปาสามารถทำปฏิกิริยากับไตรโคซาน (trichosan) ที่เป็นส่วนผสมในยาสีฟันเกิดเป็นก๊าซคลอโรฟอร์มซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง แต่ทั้งนี้ต้องได้รับในปริมาณที่มากพอจึงก่อให้เกิดมะเร็งได้ นอกจากนี้ไตรโคซานยังมีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์⁸⁻¹⁰ ทำให้การทดสอบหาฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ในครั้งแรกที่ยังไม่ได้มีการเจือจางสารละลายยาสีฟันไม่

สามารถหาฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ได้ เนื่องจากไทโรโคซาน มีฤทธิ์ทำลายเชื้อทดสอบ (*S. typhimurium* สายพันธุ์ TA 98 และ TA100) จึงได้นำตัวอย่างสารละลายยาสีฟันทั้งหมดมาหาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยวิธีการเจือจางสารละลายยาสีฟันเป็นแบบ 2 เท่า แล้วเลือกเอาความเข้มข้นที่สารสกัดไม่มีผลในการทำลายเชื้อแบคทีเรียทดสอบ (ตารางที่ 1) มาทดสอบหาฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ด้วยวิธีเอ็มเอสโดยใช้แบคทีเรีย *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ซึ่งถูกทำให้กลายพันธุ์จนไม่สามารถสังเคราะห์ histidine ได้ หากตัวอย่างยาสีฟันที่นำมาศึกษามีฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ก็จะสามารถเหนี่ยวนำให้ *S. typhimurium* เกิดการผ่าเหล่ากลับ (reverse mutation) มาสังเคราะห์ histidine ได้อีกครั้งหนึ่งซึ่งจะสามารถเจริญบนจานเพาะเชื้อที่ไม่มี histidine ได้ (revertant colonies) โดยใช้เกณฑ์ชี้วัดการกลายพันธุ์เมื่อจำนวน revertant colonies มีค่าเท่ากับหรือมากกว่า 4 เท่าของจำนวน spontaneous colonies จาก negative control³

การทดสอบฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์

เมื่อเตรียมสารละลายยาสีฟันให้มีความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อแบคทีเรียทดสอบแล้วนำมาศึกษาหาฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ด้วยวิธีเอ็มเอส ปรากฏว่ามีสารสกัด 8 ตัวอย่างจากจำนวนรวมทั้งหมด 30 ตัวอย่างที่มีฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ในแบคทีเรีย *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98 เท่านั้น ประกอบด้วยยาสีฟันประเภทที่ไม่มีส่วนผสมของสมุนไพร และยาสีฟันที่มีส่วนผสมของสมุนไพรประเภทผงจัดจำนวน 7 ตัวอย่าง และ 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละการก่อการกลายพันธุ์ร้อยละ 50 (7/14) และ 6.25 (1/16) ตามลำดับ ส่วนยาสีฟันที่มีส่วนผสมของสมุนไพรแบบครีมหรือเจลนั้นไม่มีฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ในแบคทีเรีย *S. typhimurium* ทั้ง 2 สายพันธุ์ (TA98 และ TA100) แต่อาจช่วยลดฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ดังที่ได้มีรายงานพบว่าสมุนไพรบางชนิดมีฤทธิ์ในการลดความสามารถของสารเคมีซึ่งก่อให้เกิดมะเร็ง¹¹⁻¹² อย่างไรก็ตาม พบว่าสมุนไพรบางชนิดมีความสามารถในการส่งเสริมฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์¹² แต่อาจขึ้นอยู่กับปริมาณของสมุนไพรที่ใช้เป็นส่วนผสมของ

ผลิตภัณฑ์อย่างเช่นตัวอย่างยาสีฟันที่มีส่วนผสมของสมุนไพรแบบผงจัดจะมีปริมาณของสมุนไพรสูงกว่ารูปแบบครีมหรือเจลเช่นเดียวกับที่พบในยาสมุนไพรทั่วไป เช่น ยาสมุนไพรประเภทผง ลูกกลอน จะพบว่ามีการใช้ปริมาณของสมุนไพรเป็นส่วนประกอบมากกว่ายาสมุนไพรที่เป็นชนิดน้ำหรือซีฟิง รวมทั้งยังตรวจพบว่ามีฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์มากกว่าสมุนไพรในรูปแบบอื่นๆ¹³ เนื่องจากยาสมุนไพร 2 ชนิดหลังจำเป็นต้องมีส่วนประกอบอื่นผสมอยู่ด้วยเพื่อประโยชน์ในการออกฤทธิ์ของสมุนไพรได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้น เมื่อมีการสกัดยาสีฟันรูปแบบผงจัดด้วยน้ำประปาก็คาดว่าจะได้ปริมาณสารที่สกัดมากกว่ายาสีฟันรูปแบบเจลหรือครีม ทำให้สามารถตรวจสอบฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ได้มากกว่ายาสีฟันสมุนไพรแบบเจลหรือครีม¹¹⁻¹⁴ อย่างไรก็ตาม สารเคมีที่ได้มีรายงานว่าเป็นตัวชักนำให้เกิดมะเร็งคือไทโรโคซานนั้นไม่ปรากฏเป็นส่วนผสมอยู่ในยาสีฟันที่เหนี่ยวนำให้เกิด revertant colonies ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเป็นผลมาจากสารเคมีชนิดอื่นที่มีฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์แต่เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการกลายพันธุ์กลับของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ต่อตัวอย่างยาสีฟันที่นำมาใช้ทดสอบจะเห็นได้ว่าบางตัวอย่างให้ผลไม่แน่นอน (+/-) ซึ่งอาจเนื่องจากความไม่เหมาะสมของสายพันธุ์ของเชื้อที่นำมาทดสอบโดยเฉพาะ TA100 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Varella และคณะ¹⁵ ที่ได้รายงานว่ายาสายพันธุ์ TA100 ยากต่อการตอบสนองต่อการเหนี่ยวนำกลับของสารเคมีที่นำมาศึกษา โดยให้เหตุผลว่าอาจเนื่องจากการทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงยีนต่างจากสายพันธุ์ TA98 กล่าวคือ TA 100 มีกลไกการกลายพันธุ์แบบ base-pair substitution ที่มักไม่ปรากฏการแสดงออกทาง phenotype อย่างเด่นชัดเมื่อเกิดการกลายพันธุ์ ต่างจาก TA 98 ที่มีกลไกการกลายพันธุ์แบบ frameshift mutation ซึ่งมีผลต่อการแสดงออกของ phenotype ที่เด่นชัดหากมีการกลายพันธุ์เกิดขึ้น ซึ่งควรมีการพัฒนาสายพันธุ์ของ *S. typhi-* *murium* เพื่อให้มีความไว และความจำเพาะต่อการทดสอบฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์มากขึ้นต่อไป¹⁵⁻¹⁶ นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่

สารที่ทำให้เกิดฟอง ได้แก่ SDS ที่ใช้ในแชมพูและยาสีฟันจะเป็นสารสำคัญที่ทำให้เกิดมะเร็งได้ และจากการพิจารณาส่วนผสมข้างกล่องของ ผลิตภัณฑ์ยาสีฟันที่นำมาศึกษาพบว่า SDS เป็นส่วนประกอบ สำคัญในตัวอย่างยาสีฟันทุกชนิดที่นำมาทดสอบ อย่างไรก็ตาม ยังไม่ปรากฏว่ายาสีฟันที่นำมาศึกษาจะมีฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ทั้งหมด ดังนั้น จึงอาจสรุปได้ว่าทั้งไตรโคซานและ SDS ไม่ใช่สารเคมีเพียงอย่างเดียวที่ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้หรืออาจเนื่องจากมีปริมาณของสารเคมีทั้งสองในระดับต่ำ หรืออาจเป็นเพราะมีสาเหตุมาจากสารเคมีผสมอื่นๆ ที่อาจตรวจพบได้ในผลิตภัณฑ์ยาสีฟัน ซึ่งอาจเป็นสารที่ก่อให้เกิดการระคายเคืองในช่องปากชนิดอื่นๆ ที่ไม่สามารถสกัดได้ด้วยน้ำประปาและอาจจะต้องใช้สารอื่นๆ มาช่วยสกัด เช่น dimethylsulfoxide, dichloromethane และ 70% ethanol^{11,15-16} หรือใช้วิธีการสกัดใหม่ๆ สำหรับสารที่มีอยู่ในปริมาณน้อย เช่น blue rayon ซึ่งควรมีการทำการศึกษาต่อไป นอกจากนี้ การที่จะสามารถสรุปได้ว่าตัวอย่างยาสีฟันที่นำมาทดสอบมีสารเคมีที่เป็นพิษต่อยีนของมนุษย์นั้นควรมีการทดสอบเพิ่มเติมโดยใช้การทดสอบที่ใช้ยีนของสิ่งมีชีวิตที่ใกล้เคียงกับมนุษย์ เช่น หนู ได้แก่ วิธี mouse lymphoma assay หรือการใช้ยีนของมนุษย์ ได้แก่ วิธี chromosome aberration¹⁵⁻¹⁶ ซึ่งควรมีการพิจารณานำไปวิจัยต่อไปถึงฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ในมนุษย์ อย่างไรก็ตาม เนื่องจากการเกิดมะเร็งมาจากการที่ได้รับสารที่เป็นพิษต่อยีนและทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับดีเอ็นเอ¹⁷ จึงควรทำการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ด้วยวิธีเอนไซม์โดยแบคทีเรียก่อนเพื่อเป็นการคัดกรองหาสารเคมีที่มีฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ เพราะสามารถทำได้ง่าย สะดวก ราคาถูก และให้ผลที่รวดเร็ว¹⁸

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ จังหวัดนครศรีธรรมราช และขอขอบคุณสำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และวัสดุอุปกรณ์บางอย่างในการทำงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. ไพศาล เหล่าสุวรรณ. พันธุศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 5. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช จำกัด, 2542.
2. วิสุทธิ์ ไบไม้. พันธุศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 5. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์เอ็นพีซีเพลย์พรีนติ้ง, 2538.
3. สุภาพร คงสวัสดิ์. Teratogenicity test. เอกสารประกอบการเรียนวิชาพิษวิทยาสิ่งแวดล้อมและอาชีวอนามัย. นครศรีธรรมราช: มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์, 2547. (เอกสารอัดสำเนา)
4. อมรา คัมภีรานนท์. พันธุศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 5. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2546.
5. Ames BN, Durston WE, Yamaaki E, Lee FD. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. Proc Nation Acad Sci USA 1973;70:2281-5.
6. Yahagi T, Degawa M, Seino Y, Matsushima T, Nagao M, Sugimura T, Hashimoto Y. Mutagenicity of carcinogenic azo dyes and their derivatives. Cancer Lett 1975;1:91-6.
7. Bauer AW, Kirby WLM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. Am J Clin Pathol 1986;45:493-6.
8. Triclosan. [serial online] [cited 2005 June]. Available from: URL:www.info@quantexlabs.com
9. ตลาตยาสีฟัน 5 พันล้านบาทระดมสำ สรก่อนมะเร็ง “ไตรโคซาน” หลอน. [serial online] [cited 2005 May 23]. Available from: URL:http://www.siamturakij.com
10. ผลวิจัยสหรัฐเตือนยาสีฟันเจอสารก่อมะเร็ง. [serial online] [cited 2005 May 23]. Available from: URL:http://www.matichon.co.th/khaosod

11. กลุ่มเนื้ตื้นแซมพู-ยาสีฟีนมีสารก่อมะเร็ง. [serial online] [cited 2005 May 23]. Available from: URL:<http://www.fda.moph.go.th/fda-net/html/product/apr/bulletin/vol14/title7.htm>
12. อุษณีย์ วิจิเขตคํานวณ.ฤทธิ์ก่อการกลายและฤทธิ์ต้านการกลายของสารสกัดสมุนไพรนนาง สัน โศกและหญํ้าหวานในการทดสอบเอมส์. เชียงใหม่วารสาร 2544;40:147-3.
13. รุ่งระวี เต็มศิริฤกษ์กุล, พร้อมจิต ศรีลัมพ์, อีราภา แสนแสนา, นกตล กิตติวราฤทธิ์, มาลิน จุลศิริ. ฤทธิ์ต้านเชื้อและฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ของพืชตระกูลส้ม. วาสารเภสัชศาสตร์มหิดล 2537;21:7-15.
14. มณฑล เลิศคณาวนิชกุล, สุภาวดี ศิลปินประสาธน์, สุภาภรณ์ คงสวัสดิ์, ปนัดดา พิบูลย์. การตรวจหาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ โลหะหนักและกลุ่มจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์สุขภาพชุมชน. รายงานการวิจัยโครงการถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่ชุมชน สนับสนุนโดยสถาบันการการอุดมศึกษา 2548.
15. Varella SD, Pozetti GL, Vilegas W, Varanda EP. Mutagenic activity in waste from an aluminium products factory in Salmonella typhimurium/ microsome assay. Toxicol in vitro 2004;18:895-900.
16. Ismene J, Christoph H, Klaus S. Mutagenicity of different textile dye products in Salmonella typhimurium and mouse lymphoma cells. Mutation Research/Genetic Toxicol and Environ Mutagen 2004;561:35-44.
17. อภิวัฒน์ มุทิตางกูร. เวชศาสตร์โมเลกุล. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: Text and Journal Pub, 2546: 178-94.
18. อีรวรรณ ชันทอง. พันธุศาสตร์ทางการแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 1. ขอนแก่น: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2543:109-20.