20/0 263/49



# MUTAGENICITY AND ANTI-MUTAGENICITY OF THAI TRADITIONAL MEDICINE: YA-RID-SI-DUANG-MAHAKAL

*Linna Tongyonk*[1,*] *Tanasorn Tunsaringkarn*[2] *Chanida Palanuvej*[2] *Anusorn Rungsiyothin*[2] *Somchai Issaravanich*[2] *Anchalee Chuthaputti*[4] *Nijsiri Ruangrungsi*[2,3]

## Abstract

The mutagenic and anti-mutagenic effects of Thai traditional medicine (Ya-rid-si-duang-mahakal) were evaluated. The drug was prepared by mixing authentic plant materials according to the traditional recipe, extracted by ethyl alcohol and water respectively. The alcohol extract, the water extract and the whole extract (the mixture of alcohol and water extract) were studied for their mutagenicity on *Salmonella typhimurium* strain TA98 and TA100 of the Ames test in an acidic condition (pH 3 - 3.5) without enzyme activating system. None of them exhibited direct mutagenicity whilst all showed mutagenic effect on both strains after nitrosation. Alcohol extract showed higher mutagenic activity than whole extract and water extract respectively. All extracts expressed dose dependent inhibitory effect against nitrite treated 1- aminopyrine (except water extract at 1.125 milligram per plate) on both strains. The anti- mutagenic activity of alcohol extract was higher than whole extract and water extract respectively.

**Key words:** mutagenicity, anti-mutagenicity, Ames test, Thai traditional medicine, Ya-rid-si-duang-mahakal

[1]Department of Food Chemistry, [2]Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, [3]Institute of Health Reasearch, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

[4]Department for Development of Thai Traditional and Alternative Medicine, Ministry of Public Health, Nonthaburi 11000

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: linna.t@chula.ac.th, Tel: 0 2218 8293

นิพนธ์ต้นฉบับ

# ฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์และฤทธิ์ยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ของตำรับยาไทย: ยาริดสีดวงมหากาฬ

*ลินนา ทองยงค์[1,*] ธนสร ตันศฤงฆาร[2] ชนิดา พลานุเวช[2] อนุสรณ์ รังสิโยธิน[2]*
*สมชาย อิสระวาณิชย์[2] อัญชลี จูฑะพุทธ[4] นิจศิริ เรืองรังษี[2,3]*

## บทคัดย่อ

ศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์และฤทธิ์ยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ของยาริดสีดวงมหากาฬ โดยคัดเลือกสมุนไพรและปรุงยาตามอัตราส่วนที่กำหนดในตำรับยา สกัดยาสมุนไพรที่เตรียมด้วยเอทิลแอลกอฮอล์และน้ำตามลำดับ นำสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์ สารสกัดด้วยน้ำ และสารสกัดทั้งหมด (ส่วนผสมของสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์และด้วยน้ำ) ทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ด้วยวิธีเอมส์ โดยใช้ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA 98 และ TA 100 ภายใต้สภาวะที่เป็นกรด (pH 3.0-3.5) และไม่มีระบบเอนไซม์กระตุ้นสารพิษ พบว่าสารสกัดทั้งสามไม่แสดงฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์โดยตรง แต่เมื่อนำสารสกัดดังกล่าวไปทำปฏิกิริยากับไนไตรทในสภาวะแบบเดียวกัน พบว่ามีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ต่อเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ สารสกัดด้วยแอลกอฮอล์มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์สูงกว่าสารสกัดทั้งหมดและสารสกัดด้วยน้ำตามลำดับ การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการก่อกลายพันธุ์พบว่าสารสกัดทั้งสามสามารถยับยั้งฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารก่อกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาระหว่างอมิโนพัยรีนกับไนไตรทต่อเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยความสามารถในการยับยั้งจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น (ยกเว้นสารสกัดด้วยน้ำที่ปริมาณสาร 1.25 มิลลิกรัมต่อจานเลี้ยงเชื้อ) สารสกัดด้วยแอลกอฮอล์มีฤทธิ์ยับยั้งการก่อกลายพันธุ์มากกว่าสารสกัดทั้งหมดและสารสกัดด้วยน้ำตามลำดับ

**คำสำคัญ:** ฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ ฤทธิ์ยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ การทดสอบเอมส์ ตำรับยาไทย ยาริดสีดวงมหากาฬ

[1]ภาควิชาอาหารเคมี [2]ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ [3]สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานครฯ 10330
[4]กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข นนทบุรี 11000
*ติดต่อได้ที่ linna.t@chula.ac.th โทรศัพท์ 0 2218 8293

## บทนำ

โรคริดสีดวงทวารเป็นโรคที่พบได้บ่อยในคนไทย นอกจากการรักษาโดยใช้ยาแผนปัจจุบันแล้วการใช้ยาสมุนไพรก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่ง ซึ่งควรได้รับการสนับสนุนและส่งเสริมเพื่อให้มีการใช้ทดแทนยาที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ตำรับยาสมุนไพรรักษาโรคริดสีดวงทวารตำรับหนึ่งที่ได้รับความนิยมคือ ยาริดสีดวงมหากาฬ ยาสมุนไพรตำรับนี้ เป็นยาที่มีการผลิตโดยแพทย์อายุรเวทในหลายโรงพยาบาลเพื่อใช้กับผู้ป่วยโรคริดสีดวงทวาร ซึ่งก็ได้ผลดี และผู้ป่วยที่ได้รับยาส่วนมากก็มีความพอใจในผลการรักษา แต่ถึงอย่างไรก็ตาม การที่จะส่งเสริมให้แพทย์เปลี่ยนมาใช้ยาจากสมุนไพรโดยเฉพาะถ้าเป็นยาที่ต้องรับประทานติดต่อกันเป็นเวลาหลายสัปดาห์เพื่อทดแทนยาแผนปัจจุบันนั้น จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องสร้างความมั่นใจให้เกิดขึ้นในแง่ของความปลอดภัย ดังนั้นการทดสอบความเป็นพิษของตำรับยาสมุนไพรจึงเป็นสิ่งสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแง่การเป็นสารก่อกลายพันธุ์ ทั้งนี้เพราะมีการศึกษาพบว่าสารสกัดจากสมุนไพรและเครื่องเทศบางชนิด เช่น พริกไทย เมื่อทำปฏิกิริยากันไนไตรทในสภาวะที่เป็นกรดเลียนแบบกระเพาะอาหาร จะได้สารประกอบไนโตรโซซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์โดยตรง (direct mutagen)[1] สารประกอบไนโตรโซนั้นจากการศึกษาพบว่าอาจมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มความเสี่ยงในการเป็นมะเร็งกระเพาะอาหาร[2] การศึกษาของสถาบันวิจัยโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล พบว่า ไนไตรทเมื่อทำปฏิกิริยากับอาหาร ยา และวัตถุเจือปนอาหารต่าง ๆ มักจะเกิดสารก่อกลายพันธุ์ที่มีฤทธิ์โดยตรงขึ้น[3] ไนไตรทเป็นวัตถุเจือปนอาหารที่นำมาใช้เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *Clostridium botulinum* ซึ่งสร้างสารพิษที่ร้ายแรงมากคือ บอททูลิน (botulin)[4] ไนไตรทพบได้ในอาหารหลายชนิด เช่น ไส้กรอก แหนม กุนเชียง เป็นต้น หรือแม้แต่จากผักสวนครัว ซึ่งจะพบในรูปเกลือไนเตรท โดยมาจากการใช้ปุ๋ยไนเตรทนั่นเอง (ไนเตรทสามารถเปลี่ยนเป็นไนไตรทโดยแบคทีเรียในน้ำลาย)

ที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่า การหลีกเลี่ยงไนเตรทและไนไตรทจากอาหารที่เราบริโภคเป็นประจำทุกวันนั้นทำได้ยาก จึงมีความเป็นไปได้ที่ประชาชนมีโอกาสบริโภคอาหารที่มีไนไตรทร่วมกับการรับประทานตำรับยาไทย ดังนั้นการวิจัยนี้จึงได้ทำการประเมินฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดจากยาริดสีดวงมหากาฬ โดยให้ทำปฏิกิริยากับไนไตรท ในสภาวะที่เป็นกรดเลียนแบบกระเพาะอาหาร เพื่อศึกษาว่าการเกิดปฏิกิริยาในสภาวะดังกล่าวอาจทำให้เกิดสารก่อกลายพันธุ์ที่ออกฤทธิ์โดยตรงหรือไม่ และพิจารณาผลของสารสกัดจากยาริดสีดวงมหากาฬ ในการปรับเปลี่ยนฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน คือ 1- อมิโนพัยรีน (1- aminopyrine) ทั้งนี้เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับประเมินความเสี่ยงในการเกิดสารก่อกลายพันธุ์จากการรับประทานยาริดสีดวงมหากาฬร่วมกับอาหารที่มีไนไตรท และบทบาทของยาริดสีดวงมหากาฬ ในแง่ของการป้องกันหรือลดความเสี่ยงในการเกิดมะเร็ง ซึ่งหากผลการศึกษาวิจัยชี้ให้เห็นว่ายาตำรับนี้มีความปลอดภัย ก็จะเป็นข้อมูลพื้นฐานทางพิษวิทยาที่จะสนับสนุนการศึกษาวิจัยทางคลินิกเพื่อประเมินประสิทธิผลและความปลอดภัยของยาตำรับนี้ในผู้ป่วยโรคริดสีดวงทวาร และส่งเสริมให้มีการใช้ยานี้ในสถานบริการ

สาธารณสุขของรัฐ รวมทั้งนำไปสู่การบรรจุยาตำรับนี้เข้าในบัญชียาหลักแห่งชาติเพื่อประโยชน์ของผู้ป่วยต่อไป

## วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

### การเตรียมตำรับยา

รวบรวมวัตถุดิบสมุนไพรแห้งที่เป็นส่วนประกอบยาริดสีดวงมหากาฬ ถ่ายภาพ บันทึกลักษณะของสมุนไพรแต่ละชนิด และเก็บวัตถุดิบสมุนไพรบางส่วนไว้เพื่อการอ้างอิง

บดวัตถุดิบสมุนไพรที่เหลือเป็นผง แล้วผสมสมุนไพรในอัตราส่วนที่กำหนดในตำรับยา (แสดงในตารางที่ 1) ทั้งนี้จะไม่รวมชาดก้อน เนื่องจากมีส่วนประกอบทางเคมีเป็นสารปรอท (mercuric sulphide) ซึ่งในปัจจุบันไม่อนุญาตให้ใช้ในตำรับยา

**ตารางที่ 1** ส่วนประกอบของเครื่องยาในตำรับยาริดสีดวงมหากาฬ

| เครื่องยา | ชื่อวิทยาศาสตร์ | ปริมาณ (กรัม) |
|---|---|---|
| เทียนดำ | *Nigella sativa* Linn. | 13.3 |
| เทียนแดง | *Lepidium sativum* Linn. | 13.3 |
| เทียนขาว (ยี่หร่า) | *Cuminum cyminum* Linn. | 13.3 |
| เทียนข้าวเปลือก | *Foeniculum vulgare* Mill. | 13.3 |
| เทียนตาตั๊กแตน | *Anethum graveolens* Linn. | 13.3 |
| โกฐสอ | Angelica sylvestris Linn. | 66.7 |
| โกฐกักกรา | *Anacyclus pyrethrum* (L.) DC. | 66.7 |
| โกฐจุฬาลัมพา | *Artemisia vulgaris* Linn. | 66.7 |
| โกฐก้านมะพร้าว | *Picrorrhiza kurroa* Royle. ex Benth. | 66.7 |
| โกฐพุงปลา | *Terminalia chebula* Retz. | 66.7 |
| ดอกจันทน์ (รกหุ้มเมล็ด) | *Myristica fragrans* Linn. | 66.7 |
| ลูกจันทน์ (เมล็ด) | *Myristica fragrans* Linn. | 66.7 |
| ขิง | *Zingiber officinale* Roscoe. | 22.2 |
| พริกไทย | *Piper nigrum* Linn. | 22.2 |
| ดีปลี | *Piper chaba* Hunt หรือ *P. retrofractum* Vahl. | 22.2 |
| สะค้าน | *Piper ribesioides* Wall. | 66.7 |
| มดยอบ | *Commiphora abyssinica* (Berg) Engler (*C. molmol* Engler) | 66.7 |
| สนเทศ | *Platycladus orientalis* (L.) Franco | 66.7 |
| สมุลแว้ง | *Cinnamomum bejolghotha* (Ham.) Sweet | 66.7 |
| อบเชยเทศ | *Cinnamomum zeylanicum* Linn. | 66.7 |
| ขอบชะนางแดง | *Pouzolzia pentandra* J.J. Bennett | 33.3 |
| ขอบชะนางขาว | *Pouzolzia pentandra* J.J. Bennett | 33.3 |

**การเตรียมตัวอย่างสารสกัดจากยาริดสีดวงมหากาฬ**

สกัดยาริดสีดวงมหากาฬ 1 กิโลกรัม ด้วยแอลกอฮอล์ (95% ethanol) 600 มิลลิลิตร แช่ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง กรองเพื่อแยกสารสกัดออกจากกาก จากนั้นนำมาระเหยแอลกอฮอล์ออกโดยใช้เครื่อง rotary evaporator ได้สารสกัดด้วยแอลกอฮอล์ มีลักษณะข้นเหนียว (paste) มีน้ำหนัก 215 กรัม

นำส่วนกากมาสกัดต่อด้วยน้ำกลั่น 600 มิลลิลิตร แช่ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง กรองเพื่อแยกสารสกัดออกจากกาก จากนั้นนำมาระเหยให้แห้งโดยใช้เครื่อง lyophilier ได้สารสกัดด้วยน้ำ มีลักษณะเป็นผง (solid) มีน้ำหนัก 180 กรัม

นำสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์กับสารสกัดด้วยน้ำตามสัดส่วนที่สกัดได้มาผสมให้เข้ากัน ได้เป็นสารสกัดทั้งหมดจากยาริดสีดวงมหากาฬ

**การศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดจากยาริดสีดวงมหากาฬ ในสภาวะที่ทำและไม่ทำปฏิกิริยากับไนไตรท**

นำสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์และสารสกัดทั้งหมดจากยาริดสีดวงมหากาฬ มาละลายด้วยไดเมธิลซัลฟอกไซด์ นำสารสกัดด้วยน้ำมาละลายด้วยน้ำกลั่น ให้ได้ความเข้มข้นร้อยละ 5 (5% w/v) ทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์โดยใช้วิธีเอมส์[5] ซึ่งเป็นการทดสอบการกลายพันธุ์แบบย้อนกลับ (Backward or reverse mutation) ในแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่ต้องใช้กรดอะมิโนฮิสทิดีน (Histidine) ในการเจริญเติบโต เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียชนิดนี้ในตัวกลางที่ขาดกรดอะมิโนฮิสทิดีน จะไม่สามารถเจริญเป็นโคโลนีได้ แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียนี้ในตัวกลางที่มีสารก่อกลายพันธุ์ สารดังกล่าวสามารถเปลี่ยนแปลงเบสในสาย DNA ให้เกิดความผิดปกติคือแบคทีเรียสามารถกลับมาสร้างกรดอะมิโนฮิสทิดีนขึ้นเองได้ และเจริญเติบโตจนเห็นเป็นโคโลนีเรียกว่า โคโลนีกลายพันธุ์ (revertant colony) วิธีที่ใช้ในการศึกษานี้ ใช้เชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA 98 จะทดสอบการกลายพันธุ์จากการเลื่อนของเบส (Frameshift mutation) และ TA 100 ทดสอบการกลายพันธุ์จากการแทนที่ของเบส (Basepair substitution mutation) ในสภาวะที่ไม่มีระบบเอนไซม์กระตุ้นสารพิษ

การศึกษานี้ใช้เทคนิค preincubation[6] โดยมีวิธีการดังนี้ นำสารสกัดจากยาริดสีดวงมหากาฬทั้ง 3 ส่วนดังกล่าว ความเข้มข้นร้อยละ 5 (5% w/v) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำมาแยกทดสอบโดยแต่ละส่วนใช้ปริมาตร 50, 100, 200 และ 300 ไมโครลิตร (คิดเป็นปริมาณสารต่อจานเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 0.2, 0.4, 0.8 และ 1.2 ตามลำดับ) นำมาเติมกรดไฮโดรคลอริก 0.2 นอร์มอล เพื่อปรับค่าความเป็นกรดด่างให้อยู่ในช่วง 3.0 ถึง 3.5 เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วหรือไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (ขึ้นกับสารละลายที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่าง) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ได้ปริมาตรสุดท้าย 1000 ไมโครลิตร จากนั้นเขย่าในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำหลอดทดลองแช่ในอ่างน้ำแข็ง 1 นาทีเพื่อหยุดปฏิกิริยา เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วหรือไดเมธิลซัลฟอกไซด์ 250 ไมโครลิตร จากนั้นแช่ในอ่างน้ำแข็งอีกครั้งเป็นเวลา 10 นาที นำไปทำการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์โดยใช้ปริมาตรของสารผสม 100 ไมโครลิตร เติมบัฟเฟอร์

($Na_3PO_4$-KCl) ที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.4 และเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* ที่เพาะเชื้อไว้เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (1-2 x $10^8$ เซลล์) หลังจากนั้นนำไปเขย่าในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จึงเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ (top agar) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เทส่วนผสมทั้งหมดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อในจานเพาะเชื้อ โดยเอียงจานไปมาเล็กน้อยเพื่อให้ส่วนผสมกระจายสม่ำเสมอ อบในตู้อบ (incubator) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ที่ได้ (ทุกขั้นตอนใช้เทคนิคปลอดเชื้อ)

สำหรับการศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดจากยาริดสีดวงมหากาฬทำปฏิกิริยากับไนไตรท (ปฏิกิริยาไนโตรเซชัน) นั้น ให้ทำการทดสอบเช่นเดียวกับวิธีข้างต้น แต่หลังจากปรับค่าความเป็นกรดด่างให้อยู่ในช่วง 3.0 ถึง 3.5 แล้วให้เติมโซเดียมไนเตรท 2 โมลาร์ หลอดละ 250 ไมโครลิตร (ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1000 ไมโครลิตร) เขย่าในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนครบ 4 ชั่วโมง จากนั้นแช่หลอดทดลองในอ่างน้ำแข็ง 1 นาทีเพื่อหยุดปฏิกิริยา เติมแอมโมเนียมซัลฟาเมต 2 โมลาร์ หลอดละ 250 ไมโครลิตร แช่ในอ่างน้ำแข็งอีก 10 นาที นำไปทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์เช่นเดียวกับการศึกษาก่อนหน้านี้

**การศึกษาผลของสารสกัดจากยาริดสีดวงมหากาฬต่อการปรับเปลี่ยนฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐานอมิโนพัยรีนหลังทำปฏิกิริยากับไนไตรท**

การทดลองนี้ศึกษาถึงผลของสารสกัดจากยาริดสีดวงมหากาฬปริมาณต่าง ๆ (คิดเป็นปริมาณสารเท่ากับ 1.25, 2.50 และ 3.75 มิลลิกรัมต่อจานเลี้ยงเชื้อ) ต่อการยับยั้งฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ ของสารก่อกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาระหว่างอมิโนพัยรีนกับไนไตรท โดยเติมสารสกัดจากยาริดสีดวงมหากาฬหลังจากปฏิกิริยาไนโตรเซชันดำเนินไปแล้ว 4 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์เช่นเดียวกับการศึกษาก่อนหน้านี้

**การควบคุมบวก**

วิธีการเช่นเดียวกับการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดจากยาริดสีดวงมหากาฬหลังทำปฏิกิริยากับไนไตรท แต่จะใช้ 1-อมิโนพัยรีน (1-Aminopyrene) ซึ่งเป็นสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน ความเข้มข้น 0.075 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร สำหรับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ TA 98 และ 40 ไมโครลิตร สำหรับสายพันธุ์ TA 100 แทนสารสกัดจากยาริดสีดวงมหากาฬ เพื่อดูผลการตอบสนองต่อสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐานของเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ จัดเป็นตัวควบคุมชนิดบวก (positive control)

**การควบคุมลบ หรือการกลายพันธุ์ของแบคทีเรียตามธรรมชาติ (spontaneous reversion)**

เนื่องจากแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ อาจเกิดการกลายพันธุ์ได้เองตามธรรมชาติโดยไม่มีการเหนี่ยวนำจากสารเคมีใด ๆ ทำให้สามารถเห็นเป็นโคโลนีได้ เรียกว่า Spontaneous reversion colony โดยปกติจะมีจำนวนโคโลนีจำนวนหนึ่งซึ่งถือเป็นตัวควบคุมชนิดลบ (negative control) ซึ่งสามารถนำไปหักลบจากค่าโคโลนีกลายพันธุ์ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำของสารเคมี การทดสอบการกลายพันธุ์

ของแบคทีเรียที่ที่เกิดตามธรรมชาติ จะทดสอบหาจำนวนโคโลนีที่กลายพันธุ์ตามธรรมชาติ โดยใช้ตัวทำละลายคือน้ำหรือไดเมธิลซัลฟอกไซด์ เป็นสารทดสอบ

## การวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดจากยาริดสีดวงมหากาฬ แสดงโดยค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อ จากการทดลอง 2 ครั้ง ครั้งละ 3 จาน และแสดงเป็นค่าดัชนีการกลายพันธุ์ (Mutagenicity index) ซึ่งคำนวณได้จากจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อที่เกิดจากสารสกัดจากยา หารด้วยจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อที่เกิดตามธรรมชาติ ซึ่งถ้าพบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารสกัดที่ทดสอบกับจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ คือ เมื่อปริมาณสารสกัดเพิ่มขึ้น จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์เพิ่มขึ้น และพบว่าอย่างน้อย 2 ความเข้มข้นที่ศึกษาให้ค่าจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อ มากกว่าจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อที่เกิดตามธรรมชาติ และต้องมีอย่างน้อย 1 ความเข้มข้นที่สามารถทำให้จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อสูงเกิน 2 เท่าของจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อที่เกิดตามธรรมชาติ แสดงว่าสารสกัดมีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์[7]

ส่วนการศึกษาผลของการยับยั้งการกลายพันธุ์ของสารสกัดจากยาริดสีดวงมหากาฬ แสดงโดยร้อยละการยับยั้ง (Percent Inhibition, PI) ซึ่งมีสูตรการคำนวณดังนี้

$$PI = A-B \times 100 / A-C$$

โดยที่

A = จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ต่อจานเลี้ยงเชื้อที่เหนี่ยวนำโดยสารก่อกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาระหว่างอมิโนพัยรีนกับไนไตรท

B = จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ต่อจานเลี้ยงเชื้อที่เหนี่ยวนำโดยสารก่อกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาระหว่างอมิโนพัยรีนกับไนไตรทในสภาวะที่มีการเติมสารสกัดจากยาริดสีดวงมหากาฬ

C = จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ต่อจานเลี้ยงเชื้อที่เกิดตามธรรมชาติ

## ผลการศึกษา

### ฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดจากยาริดสีดวงมหากาฬ ในสภาวะที่ทำและไม่ทำปฏิกิริยากับไนไตรท

ผลการศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์โดยทางตรงของสารสกัดจากยาริดสีดวงมหากาฬทั้ง 3 ส่วน คือ สารสกัดทั้งหมด สารสกัดด้วยแอลกอฮอล์ และสารสกัดด้วยน้ำ ต่อเชื้อ *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA 98 และ TA 100 ในระบบที่ไม่มีเอนไซม์กระตุ้นสารพิษ พบว่าสารสกัดทั้ง 3 ส่วน ไม่แสดง

ฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์โดยตรงในเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ (ตารางที่ 2) แต่เมื่อนำสารสกัดดังกล่าวไปทำปฏิกิริยากับไนไตรท ภายใต้สภาวะที่เป็นกรด พีเอช 3-3.5 และไม่มีระบบเอนไซม์กระตุ้นสารพิษ พบว่าสารสกัดทั้ง 3 ส่วน แสดงฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ให้เห็นอย่างชัดเจนเป็นไปตามเงื่อนไขเมื่อทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียทั้งสายพันธุ์ TA 98 และ TA 100 นอกจากนั้นยังพบว่า สารสกัดด้วยแอลกอฮอล์ มีแนวโน้มที่จะแสดงฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์โดยตรงเมื่อทำปฏิกิริยากับไนไตรท สูงกว่าสารสกัดด้วยน้ำ (ตารางที่ 3)

**ตารางที่ 2** จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ต่อจานเลี้ยงเชื้อและค่าดัชนีการกลายพันธุ์ (MI) ของเชื้อ *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA 98 และ TA 100 ที่ได้จากการทดสอบสารสกัดจากยาริดสีดวงมหากาฬ ภายใต้สภาวะที่เป็นกรด (พีเอช 3-3.5) และไม่มีระบบเอนไซม์กระตุ้นสารพิษ

| สารสกัดจากยาริดสีดวงมหากาฬ | ปริมาณสารสกัด (มิลลิกรัมต่อจานเลี้ยงเชื้อ) | จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ต่อจานเลี้ยงเชื้อ[1] | | ค่าดัชนีการกลายพันธุ์ (MI)[2] | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | TA 98 | TA100 | TA 98 | TA 100 |
| สารสกัดทั้งหมด | 0[3] | 12 ± 2 | 77 ± 3 | 1.00 | 1.00 |
| | 0.2 | 10 ± 4 | 77 ± 34 | 0.83 | 1.00 |
| | 0.4 | 9 ± 3 | 69 ± 17 | 0.75 | 0.90 |
| | 0.8 | 10 ± 2 | 101 ± 15 | 0.83 | 1.31 |
| | 1.2 | 11 ± 2 | 92 ± 11 | 0.92 | 1.19 |
| สารสกัดด้วยแอลกอฮอล์ | 0 | 12 ± 2 | 77± 3 | 1.00 | 1.00 |
| | 0.2 | 10 ± 4 | 71 ± 19 | 0.83 | 0.92 |
| | 0.4 | 8 ± 6 | 77 ± 15 | 0.67 | 1.00 |
| | 0.8 | 12 ± 4 | 88 ± 6 | 1.00 | 1.14 |
| | 1.2 | 10 ± 3 | 85 ± 6 | 0.83 | 1.10 |
| สารสกัดด้วยน้ำ | 0 | 12 ± 2 | 85 ± 15 | 1.00 | 1.00 |
| | 0.2 | 8 ± 4 | 71 ± 21 | 0.67 | 0.84 |
| | 0.4 | 9 ± 4 | 80 ± 20 | 0.75 | 0.94 |
| | 0.8 | 13 ± 2 | 101 ± 3 | 1.08 | 1.19 |
| | 1.2 | 13 ± 4 | 125 ± 2 | 1.08 | 1.47 |

[1]ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อจากการทดลอง 2 ครั้งๆ ละ 3 จาน

[2]MI หรือ Mutagenicity index คำนวณจากจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อหารด้วยจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อที่เกิดตามธรรมชาติ

[3]จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อที่เกิดตามธรรมชาติ

**ตารางที่ 3** จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ต่อจานเลี้ยงเชื้อและค่าดัชนีการกลายพันธุ์ (MI) ของเชื้อ *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA 98 และสายพันธุ์ TA 100 ที่ได้จากการทดสอบสารสกัดจากยาริดสีดวงมหากาฬ หลังทำปฏิกิริยากับสารละลายไนไตรท 50 มิลลิโมลาร์ ภายใต้สภาวะที่เป็นกรด (พีเอช 3-3.5) และไม่มีระบบเอนไซม์กระตุ้นสารพิษ

| สารสกัดจากยาริดสีดวงมหากาฬ | ปริมาณสารสกัด (มิลลิกรัมต่อจานเลี้ยงเชื้อ) | จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ต่อจานเลี้ยงเชื้อ[1] | | ค่าดัชนีการกลายพันธุ์ (MI)[2] | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | TA 98 | TA100 | TA 98 | TA 100 |
| สารสกัดทั้งหมด | 0[3] | 12 ± 2 | 77 ± 3 | 1.00 | 1.00 |
| | 0.2 | 18 ± 8 | 184 ± 61 | 1.50 | 2.39 |
| | 0.4 | 33 ± 10 | 254 ± 59 | 2.75 | 3.30 |
| | 0.8 | 88 ± 7 | 472 ± 39 | 7.33 | 6.12 |
| | 1.2 | 36 ± 11 | 315 ± 8 | 3.00 | 4.09 |
| สกัดด้วยแอลกอฮอล์ | 0 | 12 ± 2 | 77 ± 3 | 1.00 | 1.00 |
| | 0.2 | 22 ± 8 | 224 ± 60 | 1.83 | 2.91 |
| | 0.4 | 33 ± 9 | 329 ± 55 | 2.75 | 4.27 |
| | 0.8 | 86 ± 4 | 509 ± 43 | 7.17 | 6.61 |
| | 1.2 | 121 ± 21 | 564 ± 28 | 10.08 | 7.32 |
| สกัดด้วยน้ำ | 0 | 12 ± 2 | 85 ± 15 | 1.00 | 1.00 |
| | 0.2 | 15 ± 9 | 128 ± 9 | 1.25 | 1.51 |
| | 0.4 | 27 ± 12 | 216 ± 18 | 2.25 | 2.54 |
| | 0.8 | 61 ± 7 | 371 ± 44 | 5.08 | 4.36 |
| | 1.2 | 55 ± 7 | 429 ± 57 | 4.58 | 5.05 |

[1]ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อจากการทดลอง 2 ครั้ง ๆ ละ 3 จาน

[2]MI หรือ Mutagenicity index คำนวณจากจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อหารด้วยจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อที่เกิดตามธรรมชาติ

[3]จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อที่เกิดตามธรรมชาติ

## ผลของสารสกัดจากยาริดสีดวงมหากาฬต่อการปรับเปลี่ยนฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐานอมิโนพัยรีนหลังทำปฏิกิริยากับไนไตรท

ผลการศึกษาแสดงเป็นค่าร้อยละการยับยั้ง (Percent Inhibition) จากการศึกษาพบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดยาทั้ง 3 ตัวอย่าง จาก 1.25 ถึง 3.75 มิลลิกรัมต่อจานเลี้ยงเชื้อ ความสามารถในการยับยั้งการเกิดโคโลนีกลายพันธุ์จะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น ซึ่งในช่วงความเข้มข้น 2.50 ถึง 3.75 มิลลิกรัมต่อจานเลี้ยงเชื้อ มีค่าร้อยละการยับยั้งมากกว่าร้อยละ 50 (ยกเว้นสารสกัดด้วยน้ำที่ปริมาณสาร 2.50 มิลลิกรัมต่อจานเลี้ยงเชื้อ เมื่อทดสอบในสายพันธุ์ TA 100) เป็นที่น่าสังเกตว่า

สารสกัดด้วยแอลกอฮอล์ มีแนวโน้มในการยับยั้งฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารก่อกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาระหว่างอมิโนพัยรีนกับไนไตรท ได้ดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำ และผลการยับยั้งเป็นไปในทำนองเดียวกันเมื่อศึกษาในเชื้อแบคทีเรีย สายพันธุ์ TA 98 และ TA 100 (ตารางที่ 4)

**ตารางที่ 4** ผลของสารสกัดจากยาริดสีดวงมหากาฬในการปรับเปลี่ยนฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารมาตรฐาน 1-อะมิโนพัยรีน หลังทำปฏิกิริยากับละลายไนไตรท 50 มิลลิโมลาร์ ภายใต้สภาวะกรด (พีเอช 3-3.5) โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA 98 และ TA100 และไม่มีระบบเอนไซม์กระตุ้นสารพิษ แสดงผลโดยจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อ และค่าร้อยละการยับยั้ง (Percent Inhibition)

| สารสกัดจากยาริดสีดวงมหากาฬ | ปริมาณสารสกัด (มิลลิกรัมต่อจานเลี้ยงเชื้อ) | TA 98 | | TA100 | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ต่อจานเลี้ยงเชื้อ[1] | ค่าร้อยละการยับยั้ง | จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ต่อจานเลี้ยงเชื้อ[1] | ค่าร้อยละการยับยั้ง |
| สารสกัดทั้งหมด | 0[2] | 623 ± 68 | - | 489 ± 65 | - |
| | 1.25 | 211 ± 25 | 67.21 | 340 ± 62 | 35.81 |
| | 2.50 | 117 ± 12 | 82.54 | 219 ± 30 | 64.90 |
| | 3.75 | 76 ± 8 | 89.23 | 167 ± 16 | 77.40 |
| สกัดด้วยแอลกอฮอล์ | 0 | 458 ± 81 | - | 331 ± 24 | - |
| | 1.25 | 128 ± 12 | 73.66 | 141 ± 26 | 73.64 |
| | 2.50 | 71 ± 14 | 86.38 | 102 ± 27 | 88.76 |
| | 3.75 | 48 ± 10 | 91.15 | 65 ± 6 | 103.10 |
| สกัดด้วยน้ำ | 0 | 609 ± 135 | - | 365 ± 25 | - |
| | 1.25 | 339 ± 79 | 45.30 | 393 ± 27 | -9.79 |
| | 2.50 | 278 ± 28 | 55.53 | 283 ± 76 | 28.67 |
| | 3.75 | 271 ± 31 | 56.71 | 204 ± 47 | 56.29 |

[1]ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อจากการทดลอง 2 ครั้งๆ ละ 3 จาน

[2]จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อที่เกิดจากสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน อะมิโนพัยรีน ทำปฏิกิริยากับสารละลายไนไตรท 50 มิลลิโมลาร์ ภายใต้สภาวะกรด (พีเอช 3-3.5) โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA 98 (ปริมาณ1-อมิโนพัยรีน ต่อจานเลี้ยงเชื้อ = 0.06 ไมโครกรัม) และ สายพันธุ์ TA100 ( ปริมาณอมิโนพัยรีน ต่อจานเลี้ยงเชื้อ = 0.12 ไมโครกรัม) โดยไม่มีการเติมสารสกัดจากยาริดสีดวงมหากาฬ

## วิจารณ์

จากการศึกษาพบว่าสารสกัดจากยาริดสีดวงมหากาฬ ทั้ง 3 ส่วน แสดงฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์โดยตรง เมื่อทดสอบด้วยวิธีเอมส์ โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA 98 และ TA 100 ภายใต้สภาวะที่เป็นกรด (pH 3.0-3.5) และไม่มีระบบกระตุ้นสารพิษ แต่เมื่อนำสารสกัดดังกล่าวไปทำปฏิกิริยากับไนไตรทในสภาวะแบบเดียวกัน พบว่าสารสกัดทั้งสามแสดงฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ต่อเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยเฉพาะสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์ มีแนวโน้มที่จะแสดงฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์โดยตรง เมื่อทำปฏิกิริยากับไนไตรท สูงกว่าสารสกัดทั้งหมดและสารสกัดด้วยน้ำ มีงานวิจัยที่ทำในลักษณะเดียวกัน คือการศึกษาของแก้ว กังสดาลอำไพ และวรรณี โรจนโพธิ์ (2531)[8] ได้ประเมินฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของยาสตรีแผนโบราณ 8 ตำรับ โดยใช้การทดสอบเอมส์ในแบคทีเรีย *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA 98 และ TA 100 พบว่ายาสตรีแผนโบราณไม่แสดงฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ แต่เมื่อยาทำปฏิกิริยากับไนไตรทในสภาวะแวดล้อมที่เป็นกรด เลียนแบบกระเพาะอาหารของคน พบว่ายาทุกตำรับที่ทำปฏิกิริยากับไนไตรทแสดงฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ ซึ่งผู้วิจัยเสนอว่าสารที่เกิดขึ้นใหม่นั้นน่าจะเป็นสารกลุ่มไนโตรโซ นอกจากนี้การศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของยาสตรีแผนโบราณ 8 ตำรับ ที่ทำปฏิกิริยากับไนไตรท โดยใช้การทดสอบ SMART ในแมลงหวี่ *Drosophila melanogaster* พบว่ายาทุกตำรับมีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ และความรุนแรงของการก่อกลายพันธุ์ของยาสตรีนั้นเพิ่มขึ้นเมื่อมีไนไตรทในปฏิกิริยา[9]

การที่สารสกัดจากยาริดสีดวงมหากาฬ แสดงฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์โดยตรงเมื่อทำปฏิกิริยากับไนไตรท อาจเป็นผลมาจากสมุนไพรบางชนิดที่เป็นส่วนประกอบของตำรับยา เช่น อบเชย อบเชยเทศ ดอกจันทน์ และพริกไทย การศึกษาในเครื่องเทศที่นิยมใช้ในประเทศไทย 31 ชนิด โดยใช้ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ H17 (rec+) และ M45 (rec-) เป็นดัชนี พบว่า อบเชยลังกา มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์[10] นอกจากนี้มีงานวิจัยพบว่า เครื่องเทศตระกูลพริกไทยมีสารอัลคาลอยด์ที่สำคัญกลุ่มหนึ่งคือ ไปเปอรีน (piperine) มีฤทธิ์ทำให้เซลล์ของมดลูกทำงานผิดปกติ สามารถทำให้หนูเป็นหมัน[11] และยังมีรายงานที่พบว่าเครื่องเทศบางชนิดโดยเฉพาะจันทร์เทศและพริกไทยทำปฏิกิริยากับไนไตรทในสภาวะกรด ได้สารที่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์เมื่อทดสอบด้วยวิธีเอมส์ [1]

อย่างไรก็ตาม มีการศึกษาที่ระบุถึงฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ของสมุนไพรหลายชนิดที่นำมาใช้เป็นตำรับยาในประเทศต่าง ๆ เช่น การศึกษาของ Kaur และคณะ (2002)[12] พบว่า สารสกัดจากยาตำรับอินเดีย ที่ใช้รักษาโรคหัวใจและตับ ชื่อ “Triphala” ซึ่งประกอบด้วยสมุนไพร 3 ชนิด เมื่อนำมาทดสอบโดยวิธีเอมส์ ใช้เชื้อ *S. typhimurium* ทั้งสายพันธุ์ TA 98 และ TA 100 และนับจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ พบว่าในส่วนที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม และ อะซีโตน มีฤทธิ์ยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ของสารทั้งที่เป็นสารก่อกลายพันธุ์โดยตรง และสารก่อกลายพันธุ์ที่ต้องถูกกระตุ้นโดยเอนไซม์จากตับก่อนจึงจะออกฤทธิ์ ขณะที่สารที่สกัดด้วนน้ำไม่พบฤทธิ์ดังกล่าว ผู้วิจัยได้ให้ความเห็นว่า ฤทธิ์ในการยับยั้งสารก่อกลายพันธุ์ อาจเกิดจากสารประกอบกลุ่มโพลีฟีนอลที่พบใน

สมุนไพรในตำรับยาดังกล่าว โดยอาจมีกลไกการออกฤทธิ์หลาย ๆกลไกประกอบกัน เช่น เป็น scavenger หรือมีผลต่อระบบเอนไซม์ที่กระตุ้นหรือทำลายสารพิษ เป็นต้น

การศึกษาในกลุ่มของสมุนไพรจีน 36 ชนิด ซึ่งเป็นสมุนไพรต้านมะเร็ง โดยการทดสอบเอมส์ ใช้เชื้อ *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA 98 พบว่าสารสกัดด้วยน้ำของสมุนไพรจีน 7 ใน 36 ชนิด แสดงฤทธิ์ต้านผลของ picrolonic acid ซึ่งเป็นสารก่อกลายพันธุ์โดยตรง และ 15 ใน 36 ชนิด ยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ของ benzo[a]pyrene ซึ่งเป็นสารก่อกลายพันธุ์ที่ต้องถูกกระตุ้นโดยเอนไซม์ และในจำนวนนี้ มี 5 ชนิดที่ยับยั้งได้ทั้ง picrolonic acid และ benzo[a]pyrene[13]

Horikawa และคณะ ในปี 1994[14] ศึกษาผลของสารสกัดจากสมุนไพรจีน 6 ชนิด ต่อฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารก่อมะเร็ง benzo[a]pyrene 1,6-dinitropyrene และ 3,9-dinitrofluoranthene โดยวิธีเอมส์ ใช้เชื้อ *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA 98 พบว่าสารสกัดจากสมุนไพรสามารถยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ของสารทั้ง 3 ชนิด และเพื่อเป็นการยืนยันผล *in vitro* ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาในหนูเพศผู้ (F344/DuCrj) โดยฉีด benzo[a]pyrene เข้าใต้ผิวหนังเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดก้อนเนื้องอก และเลี้ยงหนูด้วยสารสกัดจากสมุนไพรจีนทั้ง 6 ชนิด เป็นเวลา 50 สัปดาห์ ผลการศึกษาพบว่า หนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากสมุนไพร *Polygonum multiflorum* มีขนาดของก้อนเนื้องอกลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่า สมุนไพรซึ่งถูกนำมาใช้ในตำรับยาต่าง ๆนั้น อาจมีผลพลอยได้ในแง่ของการช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดมะเร็ง ซึ่งจากการวิจัยในครั้งนี้ ได้ทำการศึกษาเพื่อประเมินศักยภาพของสารสกัดจากยาริดสีดวงมหากาฬ ในการปรับเปลี่ยนฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างสาร 1- อมิโนพัยรีน กับไนไตรท ภายใต้สภาวะกรด (พีเอช 3-3.5) โดยวิธีเอมส์ พบว่า สารสกัดจากยาริดสีดวงมหากาฬ โดยเฉพาะในส่วนที่ได้จากการสกัดด้วยแอลกอฮอล์ สามารถยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ได้ดี สำหรับสารที่ออกฤทธิ์นั้น อาจมาจากสารกลุ่ม ฟลาโวนอยด์ที่เป็นส่วนประกอบของเครื่องยาหลายชนิดในตำรับยาริดสีดวงมหากาฬ ซึ่งมีรายงานว่า มีฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์[15-17] อย่างไรก็ตามนอกจากสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ แล้ว ในสมุนไพรยังมีความหลากหลายของกลุ่มสารที่เป็นองค์ประกอบ ซึ่งความสามารถในการยับยั้งสารก่อกลายพันธุ์ อาจเกิดจากการทำงานร่วมกันของสารเหล่านี้

## สรุปผลและข้อเสนอแนะ

สารสกัดจากตำรับยาริดสีดวงมหากาฬ ทั้ง 3 ส่วน คือ สารสกัดทั้งหมด สารสกัดด้วยน้ำ และสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์ ไม่แสดงฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์โดยตรงเมื่อทดสอบด้วยวิธีเอมส์ ในเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA 98 และ TA 100 แต่เมื่อนำสารสกัดดังกล่าวไปทำปฏิกิริยากับไนไตรท ภายใต้สภาวะที่เป็นกรด พีเอช 3-3.5 โดยไม่มีระบบเอนไซม์กระตุ้นสารพิษ พบว่าสารสกัดทั้ง 3 ส่วนแสดงฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ให้เห็นอย่างชัดเจน ซึ่งจากผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่า ควรหลีกเลี่ยงการรับประทานตำรับยาดังกล่าวร่วมกับอาหารที่มีการเติมไนไตรท และเมื่อ

ทำการประเมินศักยภาพของสารสกัดในการยับยั้งฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ที่เกิดจากสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน อมิโนพัยรีนทำปฏิกิริยากับไนไตรท พบว่าความสามารถในการยับยั้งการเกิดโคโลนีกลายพันธุ์จะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น (ยกเว้นสารสกัดด้วยน้ำที่ปริมาณสาร 1.25 มิลลิกรัมต่อจานเลี้ยงเชื้อ) โดยเฉพาะส่วนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ มีแนวโน้มในการยับยั้งฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ได้ดีกว่าส่วนที่สกัดด้วยน้ำ ยาริดสีดวงมหากาฬนั้นประกอบด้วนสมุนไพรหลาย ๆ ชนิด ซึ่งผลในการยับยั้งการกลายพันธุ์ อาจเกิดจากการทำงานร่วมกันของสารเหล่านี้ จึงน่าจะเป็นประเด็นปัญหาที่ควรทำการวิจัยต่อไป

## กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณกรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยครั้งนี้ ตลอดจนผู้ช่วยนักวิจัยที่ช่วยให้งานนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างดี

## เอกสารอ้างอิง

1. Namiki K., Yamanaka M., Osawa T. and Namiki M. 1984. Mutagen formation by nitrite-spice reaction. J Agric Food Chem 32: 948-952.
2. Mirvish SS. 1983. The etiology of gastric cancer: intragastric nitrosamide formation and other theories. J Natl Cancer Inst 7: 629-647.
3. แก้ว กังสดาลอำไพ. 2537. พิษวิทยา หลักการเบื้องต้น ประยุกต์อาหารและโภชนาการ. กรุงเทพมหานคร. สถาบันวิจัยโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล.
4. นิธิยา รัตนาปนนท์ และวิบูลย์ รัตนาปนนท์. 2543. สารพิษในอาหาร. กรุงเทพมหานคร. โอเดียนสโตร์.
5. Maron DM. and Ames BN. 1983. Revised method for the *Salmonella* mutagenicity test. Mutat Res 113: 173-215.
6. Yahagi T., Degawa M., Seino Y., Matsushima T. and Nagao M. 1975. Mutagenicity of carcinogenic azo dyes and their derivatives. Cancer Lett 1: 91-96.
7. De Serres FJ. and Shelby MD. 1979. Recommendation on data production and analysis using the *Salmonella* /microsome mutagenic assay. Mutat Res 64: 159-165.
8. แก้ว กังสดาลอำไพ และ วรรณี โรจนโพธิ์. 2531. การประเมินความเป็นพิษของยาบำรุงโลหิตสตรีด้วยการทดสอบทางพิษวิทยาระยะสั้น. รายงานการวิจัยเสนอต่อสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.
9. Sroysa-ard H. 1997. Genotoxicity testing of emmenagogues with and without nitrite using the wing somatic mutation and recombination test (SMART) in

*Drosophila melanogaster*. Master'Thesis. Faculty of Science (Nutrition). Mahidol University.

10. Ungsurungsie M., Suthienkul O. and Paovalo C. 1982. Mutagenicity screening of popular Thai spice. Food Chem Toxico 20: 527-530.
11. Piyachaturawat P., Glinsukon T. and Peungvicha P. 1982. Antifertility activity of an alkaloid from *Piper longum* and *Piper nigra*. In Third South East Asia and Western Pacific Regional Meeting of Pharmacologist. May 25-28.
12. Kaur S., Arora S., Kaur K. and Kumar S. 2002. The *in vitro* antimutagenicity activity of Triphala-an Indian herbal drug. Food Chem Toxico 40: 527-534.
13. Huei L. and Jung-Yaw L. 1988. Antimutagenic activity of extracts from anticancer drugs in Chinese medicine. Mutat Res 204: 229-234.
14. Horikawa K., Mohri T., Tanaka Y. and Tokiwa H. 1994. Moderate inhibition of carcinogenicity of benzo[a]pyrene, 1,6-dinitropyrene and 3,9-dinitrofluoranthene by Chinese medicinal herbs. Mutagenesis 9: 523-526.
15. Friedman FK., Wesr D., Sugimura T. and Gelboin HV. 1985. Flavone modulators of rat hepatic aryl hydrocarbon hydroxylase. Pharmacol 31: 203-207.
16. Guengerich FP. and Kim D-H. 1990. *In vitro* inhibition of dihydropyridine oxidation and aflatoxin B1 activation in human liver microsomes by naringenin and other flavonoids. Carcinogenesis 11: 2275-2279.
17. Peterson J. and Dwyer J. 1998. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. Mutat Res 18: 1995- 2018.