วารสารวิชาการวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษม

การศึกษาการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดมะแขว่นด้วยวิธีทดสอบเอมส์

Mutagenicity Study of *Zanthoxylum myriacanthum* Wall. ex Hook.f. Extract Using the Ames Test

วิจิตรา สุดห่วง[1*], สุจริต อุ่นกาศ[1], ปัถยา ศิรินันท์ธนานนท์[1], พราว ศุภจริยาวัตร[1], พรชัย สินเจริญโภไคย[1], ศรายุธ ระดาพงษ์[1] และ ศักดิ์วิชัย อ่อนทอง[1]

Wijittra Sudhong[1*], Sutjarit Aunkat[1], Padtaya Sirinantananon[1], Praw Suppajariyawat[1], Pornchai Sincharoenpokai[1], Sarayut Radapong[1] and Sakwichai Onthong[1]

[1] สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

[1] Medicinal Plat Research Institute, Department of Medical Sciences

บทคัดย่อ

มะแขว่น (*Zanthoxylum myriacanthum* Wall. ex Hook.f.) เป็นพืชสมุนไพรที่มีการใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลายในภาคเหนือของประเทศไทยทั้งในด้านอาหารและการแพทย์แผนไทย โดยมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลากหลาย เช่น ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ต้านเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อรา รวมถึงการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ แต่ข้อมูลด้านความปลอดภัยของสารสกัดมะแขว่น ยังมีจำกัด ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงศึกษาการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดมะแขว่นด้วยวิธีทดสอบเอมส์ ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีเอนไซม์ S9 กระตุ้นโดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* 4 สายพันธุ์ ได้แก่ TA98, TA100, TA1535, TA1537 และ *Escherichia coli* สายพันธุ์ WP2 *uvr*A ผลการทดลองพบว่า สารสกัดมะแขว่นไม่เกิดการก่อกลายพันธุ์ ชี้ให้เห็นว่าสารสกัดมะแขว่นมีความปลอดภัยในระดับหนึ่ง หากมีการนำสารสกัดมะแขว่นไปพัฒนาเป็นยาหรือผลิตภัณฑ์จำเป็นต้องศึกษาในเชิงลึกต่อไปเพื่อให้มีความปลอดภัยและน่าเชื่อถือมากขึ้น

สำคัญ: การก่อกลายพันธุ์ สารสกัดมะแขว่น วิธีทดสอบเอมส์

** Corresponding author: wijittra.s@dmsc.mail.go.th*

***Received**: 28 เมษายน 2568* ***Revised:** 18 มิถุนายน 2568* ***Accepted**: 24 กรกฎาคม 2568*

Abstract

Makwan (*Zanthoxylum myriacanthum* Wall. ex Hook.f.) is a medicinal plant widely utilized in northern Thailand for both culinary and traditional medicine purposes. It exhibits various pharmacological properties, including antioxidant, anti- inflammatory, antibacterial, and antifungal activities, and has been developed into various products. However, safety information regarding Makwan extract remains limited. Therefore, this study investigated the mutagenicity of Makwan extract using the Ames test under conditions with and without S9 metabolic activation, employing four strains of *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537) and one strain of *Escherichia* coli (WP2 *uvr*A). The results indicated that Makwan extract did not induce mutagenicity indicating a certain level of safety. Nevertheless, if Makwan extract is to be developed into pharmaceutical products, further in-depth safety studies are necessary to ensure greater safety and reliability.

Keywords: Mutagenicity, *Zanthoxylum myriacanthum* Wall. ex Hook.f., Ames test

1. บทนำ

มะแขว่น มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Zanthoxylum myriacanthum* Wall. ex Hook.f. เป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดทางภาคเหนือ เช่น น่าน พะเยา แม่ฮ่องสอน ลำปาง และลำพูน มะแขว่นเป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ สูงประมาณ 10-20 เมตร ลำต้นมีหนามยาว 3 เซนติเมตร กิ่งกลวง มีหนามแหลมตรงจำนวนมาก ใบประกอบแบบขนนกปลายคี่ โคนใบมน กิ่งหัวใจ หรือเบี้ยวเล็กน้อย ขอบใบหยัก 6-8 หยัก ผลมีลักษณะแห้งกลม ผิวขรุขระสีน้ำตาล เมื่อแก่ผลจะแตกจนเห็นเมล็ดสีดำกลมผิวเรียบเป็นมัน มีรสเผ็ดเล็กน้อย คนท้องถิ่นภาคเหนือนิยมนำใบอ่อน เมล็ด และผลแห้ง มาใช้ในการประกอบอาหาร เพื่อลดกลิ่นคาว เพิ่มกลิ่นหอม และทำให้รสอาหารเผ็ดร้อนคล้ายพริกไทย เช่น ลาบ หลู้ ยำ และแกงต่าง ๆ (ณัฐกานต์ วงศ์สีสม, 2557) ในทางการแพทย์ตามภูมิปัญญาไทยได้นำทุกส่วนของมะแขว่นมาใช้เป็นยาสมุนไพรรักษาโรค เช่น เปลือกมะแขว่น ใช้ในการลดไข้ ขับเหงื่อ ขับปัสสาวะ ส่วนผลมะแขว่น มีฤทธิ์ในการไล่ยุงและรักษาฟันผุ นอกจากนี้ยังใช้เป็นส่วนประกอบในยาบำรุงหัวใจ แก้โลหิตเป็นพิษ บำรุงโลหิต บำรุงธาตุ ขับลมในทา งเดินอาหาร แก้วิงเวียนศีรษะ (ชุลี ยมภักดี และวรินทร ชวศิริ, 2554) ซึ่งในผลมะแขว่นมีองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ น้ำมันระเหยยาก (Fixed oil) น้ำมันหอมระเหย (Volatile oil) เช่น Limonene Alpha-phellandrene และ Trans-beta-ocimene รวมทั้ง แอลคาลอยด์ ลิกแนน คูมาริน เทอร์พีน แทนนิน ฟลาโวนอยด์ ฟีโนลิก และไกลโคไซด์ ซึ่งสารเหล่านี้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (Anti-oxidation) ต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory) ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Anti-bacterial) ต้านเชื้อรา (Anti-fungal) และต้านมะเร็ง (Anti-cancer) (Tangjitjaroenkun et al., 2012) นอกจากนี้สารแอลคาลอยด์ที่พบในมะแขว่นบางชนิด แสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ เช่น 8-methoxy-N-methylflindersine ซึ่งเป็นองค์ประกอบในเปลือกลำต้น แสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์อย่างอ่อนจากการทดสอบด้วย Brine shrimp lethality bioassay มีค่า LC_{50} 53.96 µg/mL (Ahsan et al., 2000) สาร 6-Acetonyldihydrochelerythrin และ arnottianamide ที่แยกได้จากหนามลำต้น แสดงฤทธิ์ความเป็นพิษอย่างอ่อนต่อเซลล์มะเร็งของมนุษย์ ได้แก่ เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa มะเร็งตับชนิด Hep G2 มะเร็งเต้านมชนิด SK-BR-3 และ MDA-MB-231 มะเร็งลำไส้ชนิด HCT 116 และ SW480 และมะเร็งผิวหนังชนิด A375 ที่ค่า IC_{50} ในช่วง 29.74-500.00 µM (Sreelekha et al., 2014) ส่วนการทดสอบทางพิษวิทยาในการทดสอบสารออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์จากมะแขว่น พบว่าสารสกัดเมล็ดมะแขว่นไม่เกิดการก่อกลายพันธุ์ต่อเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีเอนไซม์กระตุ้น (ชุลี ยมภักดี และวรินทร ชวศิริ, 2554) และการศึกษาในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) พบว่าเจลที่มีส่วนประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากผลแห้งของมะแขว่น สามารถยับยั้งพฤติกรรมแบบ licking ของหนูที่เกิดแผลที่เยื่อบุปากทำให้ช่วยลดจำนวนของเซลล์อักเสบได้ (Netweera et al., 2016) ซึ่งจากการศึกษางานวิจัยพบว่าข้อมูลด้านพิษวิทยาของสารสกัดมะแขว่นยังมีรายงานอยู่น้อย ส่วนใหญ่แล้วจะเป็นข้อมูลฤทธิ์ทางชีวภาพทั้ง

ในระดับเซลล์ (*in vitro*) และในสัตว์ทดลอง (*in vitro*) ทำให้ปัจจุบันได้มีการนำสารสกัดจากมะแขว่นมาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น เอสเซ้นส์บำรุงผิวหน้ามะแขว่นที่มีสารประกอบฟีนอลิคสูงมีฤทธิ์ในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (มหาวิทยาลัยแม่โจ้, 2565) ผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียในช่องปากจากสารสกัดมะแขว่นที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสแตฟิโลค็อกคัสมิวแทน (พัชรวรรณ ตันอมาตยรัตน์, 2558) ผลิตภัณฑ์น้ำมันหอมระเหยจากผลมะแขว่นที่มีฤทธิ์ในการบรรเทาอาการปวด (จุรีภรณ์ อิ้มพัฒน์ และนันทกานต์ วุฒิศิลป์, 2564) จากความต้องการนำสารสกัดมะแขว่นมาพัฒนาเป็นยารักษาโรคหรือผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มมากขึ้น จึงทำให้พืชสมุนไพร ถูกมองว่ามีประสิทธิภาพสูงกว่าการใช้ยาบริสุทธิ์ อาจเนื่องมาจากสารสกัดประกอบด้วยสารที่มีโครงสร้างแตกต่างกันอย่างหลากหลายและร่วมกันแสดงฤทธิ์อย่างมีประสิทธิภาพสูงด้วยกลไกที่ซับซ้อน ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเล็งเห็นถึงความสำคัญของการใช้สมุนไพรอย่างปลอดภัย จึงได้มีการศึกษาในหลอดทดลองโดยการประยุกต์ใช้การทดสอบในสารสกัดสมุนไพรโดยใช้เชื้อแบคทีเรีย เรียกว่าการทดสอบการก่อกลายพันธุ์โดยวิธีทดสอบเอมส์ (Ames test) หรือที่เรียกว่าการทดสอบการก่อกลายพันธุ์แบบย้อนกลับของแบคทีเรีย อ้างอิงจาก OECD Guideline No.471 ซึ่งการทดสอบนี้ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* และ *Escherichia coli* ที่มีการกลายพันธุ์ในยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ฮิสทิดีนและทริปโตเฟน เพื่อตรวจสอบว่าสารเคมีและสารสมุนไพรสามารถ ทำให้เกิดความผิดปกติในระดับ DNA หรือไม่ หากสารเคมีหรือสารสมุนไพรดังกล่าว เป็นการก่อกลายพันธุ์ (Mutagen) จะแสดงให้เห็นว่าสารนั้นอาจจะไม่ปลอดภัยที่จะบริโภค เนื่องจากอาจจะก่อโรคที่ผิดปกติทางพันธุกรรมหรือโรคมะเร็งได้ โดยมีการทดสอบทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีเอนไซม์ S9 กระตุ้น ซึ่งการทดสอบในสภาวะที่มีเอนไซม์ S9 กระตุ้น เป็นเอนไซม์จากตับหนูที่ทำการเลียนแบบการเผาผลาญของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและเพิ่มการตรวจจับกิจกรรมการกลายพันธุ์ (Vijay et al., 2018) ซึ่งการทดสอบเอมส์เป็นหนึ่งในการทดสอบที่เป็นความต้องการของผู้ประกอบการ เนื่องจากเป็นวิธีการทดสอบความปลอดภัยตามกฎข้อบังคับ การประเมินความปลอดภัยทางเคมี การเลือกและจัดลำดับสารเคมีที่อยู่ระหว่างการพัฒนาสารเคมีและผลิตภัณฑ์ใหม่ รวมทั้งการขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์สุขภาพกับคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) ที่เป็นหน่วยขึ้นทะเบียนที่ต้องใช้ข้อมูลด้านความปลอดภัยในการประเมินผลิตภัณฑ์สุขภาพต่าง ๆ ทำให้ (อย.) มีการร้องขอผลการทดสอบการก่อกลายพันธุ์ภายใต้ระบบ OECD GLP ในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น ยา อาหาร เครื่องสำอาง และสารเคมี เนื่องจากระบบมาตรฐาน OECD GLP เป็นระบบมาตรฐานสากลที่ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวาง โดยเน้นความน่าเชื่อถือและความสมบูรณ์ของข้อมูลการทดสอบ ส่งผลในการสร้างความมั่นใจให้กับผู้บริโภค และยังมีประโยชน์ทางเศรษฐกิจที่สำคัญโดยการลดต้นทุน ลดความซ้ำซ้อน เพิ่มประสิทธิภาพในการกำกับดูแล และส่งเสริมการเข้าสู่ตลาดโลก

ดังนั้น จึงได้มีการศึกษาการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดมะแขว่น โดยอาศัยวิธี Bacterial reverse mutation (Ames test) ในสภาวะที่มีและไม่มีเอนไซม์ S9 กระตุ้น โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* 4 สายพันธุ์ ได้แก่ TA98, TA100, TA1535, TA1537 และ *Escherichia coli* สายพันธุ์ WP2 *uvr*A ซึ่งหากสารทดสอบมีฤทธิ์การก่อกลายพันธุ์ จะพบว่าจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้น (Revertant colony) ของเชื้อแบคทีเรียจะมีจำนวนเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของตัวอย่างทดสอบ ดังนั้น ในการศึกษาการก่อกลายพันธุ์จึงใช้เป็นข้อมูลยืนยันทางด้านความปลอดภัย ซึ่งหากมีการนำสารสกัดมะแขว่นไปต่อยอดในการผลิตเป็นยาหรือผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ จำเป็นต้องมีการทดสอบในสัตว์ทดลองหรือเชิงลึกต่อไป เพื่อให้ผู้บริโภคเกิดความมั่นใจในการบริโภคสมุนไพรมากขึ้น

2. วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดมะแขว่นในเชื้อแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ (ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีเอนไซม์ S9 กระตุ้น) ด้วยวิธีทดสอบเอมส์ อ้างอิงจาก OECD Guideline No.471 (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, 2020)

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์ ได้แก่

3.1.1 เครื่องชั่งไฟฟ้าความละเอียดไม่เกิน 0.00001 กรัม ยี่ห้อ Sartorius รุ่น AX224

3.1.2 เครื่องชั่งไฟฟ้าความละเอียดไม่เกิน 0.001 กรัม ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น XS2002S

3.1.3 เครื่องผสมสำหรับหลอดทดลอง ยี่ห้อ Scientific Industries รุ่น G-560E

3.1.4 ตู้ชีวนิรภัย ยี่ห้อ EUROCLONE รุ่น Safemate EZ1.8

3.1.5 ขวดรูปชมพู่ ยี่ห้อ KIMA

3.1.6 หลอดทดลอง ยี่ห้อ SPLLIFESCIENCE

3.1.7 หลอดเซนติฟิวก์พลาสติก ยี่ห้อ VWR

3.1.8 ตะแกรงใส่หลอดทดลอง

3.1.9 ปิเปตอัตโนมัติแบบอิเล็คทรอนิกส์ ปริมาตร 10, 5 มิลลิลิตร และ 1000, 300, 100, 10 ไมโครลิตร ยี่ห้อ RAININ

3.1.10 จานเพาะเชื้อ ยี่ห้อ CLINAG

3.1.11 ขวดแก้วใส่สารเคมี ยี่ห้อ KIMA

3.1.12 อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า ยี่ห้อ Julabo รุ่น SW23

3.1.13 ตู้อบเพาะเชื้อ ยี่ห้อ SalvisLAB รุ่น IC400

3.1.14 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง ยี่ห้อ Metertech รุ่น SB8001

3.1.15 กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ ยี่ห้อ EVOS รุ่น M7000

3.1.16 เครื่องบันทึกภาพแบบนับโคโลนีอัตโนมัติ ยี่ห้อ Interscience รุ่น Scan4000

3.1.17 ตู้แช่แข็งแบบพิเศษ (-80องศาเซลเซียส) ยี่ห้อ ilshin รุ่น DF8524

3.1.18 ตู้แช่แข็ง (-30องศาเซลเซียส) ยี่ห้อ Haier รุ่น DW-40L262

3.1.19 ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส ยี่ห้อ Haier รุ่น HYC-390

3.1.20 เตาไมโครเวฟ ยี่ห้อ Electrolux

3.1.21 เครื่องให้ความร้อนแบบหลุม ยี่ห้อ Ohaus รุ่น HB6DG

3.2 สารเคมี ได้แก่

3.2.1 Nutrient broth No.2 ยี่ห้อ OXOID

3.2.2 Agar ยี่ห้อ Merck

3.2.3 Magnesium sulfate ยี่ห้อ Sigma- ALDRICH

3.2.4 Citric acid monohydrate ยี่ห้อ Sigma-ALDRICH

3.2.5 Potassium phosphate, dibasic (anhydrous) ยี่ห้อ Sigma-ALDRICH

3.2.6 Sodium ammonium phosphate ยี่ห้อ Sigma-ALDRICH

3.2.7 Sodium chloride (NaCl) ยี่ห้อ Merck

3.2.8 L-Histidine HCl ยี่ห้อ Sigma-ALDRICH

3.2.9 Biotin ยี่ห้อ Sigma-ALDRICH

3.2.10 Glucose ยี่ห้อ Sigma-ALDRICH

3.2.11 Potassium chloride ยี่ห้อ Merck

3.2.12 L-Typtoplan ยี่ห้อ Sigma-ALDRICH

3.3 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ

เชื้อทั้ง 5 สายพันธุ์เป็นเชื้อที่ได้กลายพันธุ์ไปจากสายพันธุ์ปกติ เพื่อให้มีความไวต่อการทดสอบการกลายพันธุ์ต่อสารเคมีต่าง ๆ และเป็นเชื้อที่ได้อ้างอิงจาก OECD test guideline No.471 เชื้อมาจาก Japan Collection of Microorganism

3.3.1 *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98

3.3.2 *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA100

3.3.3 *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA1535

3.3.4 *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA1537

3.3.5 *Escherichia coli* สายพันธุ์ WP2 *uvr*A

3.4 สารเคมีก่อกลายพันธุ์

3.4.1 2-Aminoanthracene (2-AA) ยี่ห้อ Sigma-ALDRICH

3.4.2 4-Nitro-o-phenylenediamine (NPD) ยี่ห้อ Sigma-ALDRICH

3.4.3 Sodium azide (SA) ยี่ห้อ Sigma-ALDRICH

3.4.4 2-Nitrofluorene (2-NF) ยี่ห้อ Sigma-ALDRICH

3.4.5 4-Nitroquinoline-N-oxide (4NQNO) ยี่ห้อ Sigma-ALDRICH

3.4.6 Acridine Mutagen ICR191 (ICR-191) ยี่ห้อ Sigma-ALDRICH

3.5 S9 mix

3.5.1 S9 Moltox จากประเทศสหรัฐอเมริกา

3.5.2 Cofactor-I จากประเทศญี่ปุ่น

3.6 ตัวทำละลาย

3.6.1 Dimethyl sulfoxide (DMSO) ยี่ห้อ Sigma-ALDRICH

3.7 ตัวอย่างทดสอบ

3.7.1 วัตถุดิบ: ตัวอย่างมะแขว่นแก่จัด อายุประมาณ 4 เดือน เก็บในเดือนพฤศจิกายน 2567 ในพื้นที่ อำเภอท่าวังผา จังหวัดน่าน ตัวอย่างได้รับการยืนยันข้อมูลทางด้านพฤกษศาสตร์และตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ของพืช โดยนายศักดิ์วิชัย อ่อนทอง นักพฤกษศาสตร์ของสถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และเก็บตัวอย่าง voucher specimen เลขที่ DMSC 5370 อ้างอิงที่พิพิธภัณฑ์พืช กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

3.7.2 ขั้นตอนการสกัดตัวอย่าง เก็บตัวอย่างมะแขว่น มาคัดและตัดก้านช่อผล ล้างทำความสะอาดและนำไปผึ่งลม จากนั้นนำไปอบแห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส เมื่ออบแห้งแล้วให้นำมาคัดเฉพาะผลมะแขว่นที่ประกอบด้วยส่วนของเนื้อผลและส่วนของเมล็ด นำไปบดเป็นผงหยาบ สกัดด้วยวิธีการหมักโดยใช้ตัวทำละลาย 95% เอทานอล เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำสารไปกรองและนำกากที่แยกได้ไปสกัดต่ออีก 1 รอบ หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้จากการสกัดไประเหยแห้งด้วยวิธี Rotary evaporator

3.8 การเตรียมสารสกัดมะแขว่น ชั่งสารสกัดมะแขว่นละลายด้วย Dimethyl sulfoxide (DMSO) โดยสารจะต้องละลายสมบูรณ์และไม่ตกตะกอน ใช้ความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถเตรียมได้ การทดสอบนี้ใช้ความเข้มข้นเริ่มต้น 5,000 µg/plate ทำการเจือจางแบบ half log (ประมาณ 3.16 เท่า) อีก 5 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 1,500 500 150 50 15 µg/plate

3.9 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

เชื้อที่ใช้ในการทดสอบถูกเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส โดยเชื้อที่นำมาใช้ต้องผ่านคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียและมีปริมาณเชื้อที่เหมาะสมต่อการทดสอบ คือ ต้องมากกว่าหรือเท่ากับ 10^9 CFU/ml ปิเปตเชื้อที่พร้อมทดสอบ *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98 TA100 TA1535 TA1537 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงใน Nutrient broth No.2 ส่วน *E. coli*

สายพันธุ์ WP2 *uvr*A ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ปิเปตลงใน Luria Broth เขย่าเชื้อที่ความเร็วรอบ 120 rpm ในอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิและเขย่าที่อุณหภูมิ 37±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาวัดค่าความขุ่นของเชื้อที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

3.10 การทดสอบการก่อกลายพันธุ์แบบย้อนกลับด้วยวิธีทดสอบเอมส์

1) เตรียม top agar ที่ผสม Histidine และ Biotin สำหรับใช้ Overlay หน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal Glucose Agar (MGA) ของเชื้อ *S. typhimurium* และเตรียม top agar ที่ผสม tryptophan สำหรับเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ WP2 *uvr*A

2) การทดสอบแบ่งออกเป็น 2 สภาวะ ได้แก่ สภาวะที่มีเอนไซม์ S9 กระตุ้น และสภาวะที่ไม่มีเอนไซม์ S9 กระตุ้น ทำการทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ โดยมีลำดับการนำสารใส่หลอดทดลอง ดังนี้

<u>สภาวะที่มีเอนไซม์ S9 กระตุ้น</u>
1. Top agar ปริมาตร 2000 ไมโครลิตร (เตรียมตามข้อ 1)
2. Negative/Positive/test item ปริมาตร 10 ไมโครลิตร
3. เชื้อแต่ละสายพันธุ์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร (เตรียมตามข้อ 3.9)
4. เอนไซม์ S9mix ปริมาตร 500 ไมโครลิตร

<u>สภาวะที่ไม่มีเอนไซม์ S9 กระตุ้น</u>
1. Top agar ปริมาตร 2000 ไมโครลิตร (เตรียมตามข้อ 1)
2. Buffer pH7.4 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร
3. Negative/Positive/test item ปริมาตร 10 ไมโครลิตร
4. เชื้อแต่ละสายพันธุ์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร (เตรียมตามข้อ 3.9)

3) ผสมสารที่เติมให้เข้ากัน จากนั้น overlay ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อหน้าเพลทแห้งแล้วนำไปบ่มในตู้อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50±2 ชั่วโมง

3.11 วิเคราะห์ผลการทดสอบการก่อกลายพันธุ์แบบย้อนกลับด้วยวิธีทดสอบเอมส์

1) ส่องดูการเกิด Killing effect บน background lawn ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบอินเวอร์ท

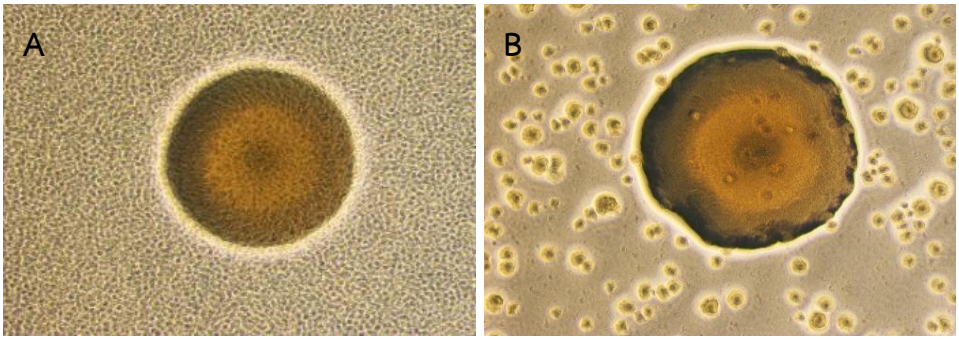
2) นับจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้เครื่องบันทึกภาพและนับจำนวนโคโลนีอัตโนมัติ

ภาพที่ 1 A. แสดงภาพกล้องจุลทรรศน์แบบอินเวอร์ท B. แสดงภาพเครื่องบันทึกภาพและโคโลนีแบบอัตโนมัติ

3.12 การแปลผลการทดสอบการก่อกลายพันธุ์แบบย้อนกลับด้วยวิธีทดสอบเอมส์

1) ต้องไม่พบตะกอนหรือเกิดการขุ่นบนหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ

2) ความเข้มข้นที่ไม่เหมาะสมต่อการทดสอบ ดูได้จากการเกิดความผิดปกติของ background lawn ซึ่งจะพบว่า background lawn บนอาหารเลี้ยงเชื้อเกิดการตายของเชื้อ (Killing effect) ภาพที่ 2



ภาพที่ 2 แสดงผลการส่องดู Background lawn โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ กำลังขยาย 10 เท่า A. แสดงถึง background lawn ที่ปกติ ไม่เกิดการตายของเชื้อ ส่วนภาพ B. เกิด Killing effect ซึ่งจะเห็นว่า background lawn ไม่เต็ม มีช่องว่างที่พื้นหลัง แสดงถึงการตายของเชื้อเนื่องจากความเข้มข้นไม่เหมาะสมต่อการทดสอบ

3) ตัวอย่างทดสอบที่เกิดการก่อกลายพันธุ์ จะพบความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของตัวอย่างทดสอบกับจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ (Revertant colony) โดยจะพบว่าเชื้อสายพันธุ์ TA98, TA100 และ *E. coli* สายพันธุ์ WP2 *uvr*A จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ มีจำนวนสูงเกิน 2 เท่า เมื่อเทียบกับจำนวนโคโลนีที่กลายพันธุ์ตามธรรมชาติ (Negative Control) ส่วนเชื้อสายพันธุ์ TA1535 และTA1537 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์สูงเกิน 3 เท่า เมื่อเทียบกับจำนวนโคโลนีที่กลายพันธุ์ตามธรรมชาติ (Negative Control)

4. ผลการวิจัย

การศึกษาการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดมะแขว่น ในเชื้อแบคทีเรีย *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98, TA100, TA1535, TA1537 และ *E. coli* สายพันธุ์ WP2 *uvr*A แบ่งความเข้มข้นออกเป็น 6 ความเข้มข้น ได้แก่ 5,000 1,500 500 150 50 และ 15 µg/plate ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีเอนไซม์ S9 กระตุ้น ผลการทดลองพบว่าสารสกัดมะแขว่นทุกระดับความเข้มข้นไม่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ (ดังตารางที่ 1 และ 2) แต่เมื่อทำการส่องเพลทภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบการเกิด Killing effect ที่ระดับความเข้มข้น 5,000 µg/plate ของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ TA1535 และ TA1537 ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีเอนไซม์ S9 กระตุ้น (ดังภาพที่ 3)

ตารางที่ 1 แสดงค่าจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ (Revertant colony) ของสารสกัดมะแขว่นในเชื้อแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ (ในสภาวะที่มีเอนไซม์ S9 กระตุ้น) ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

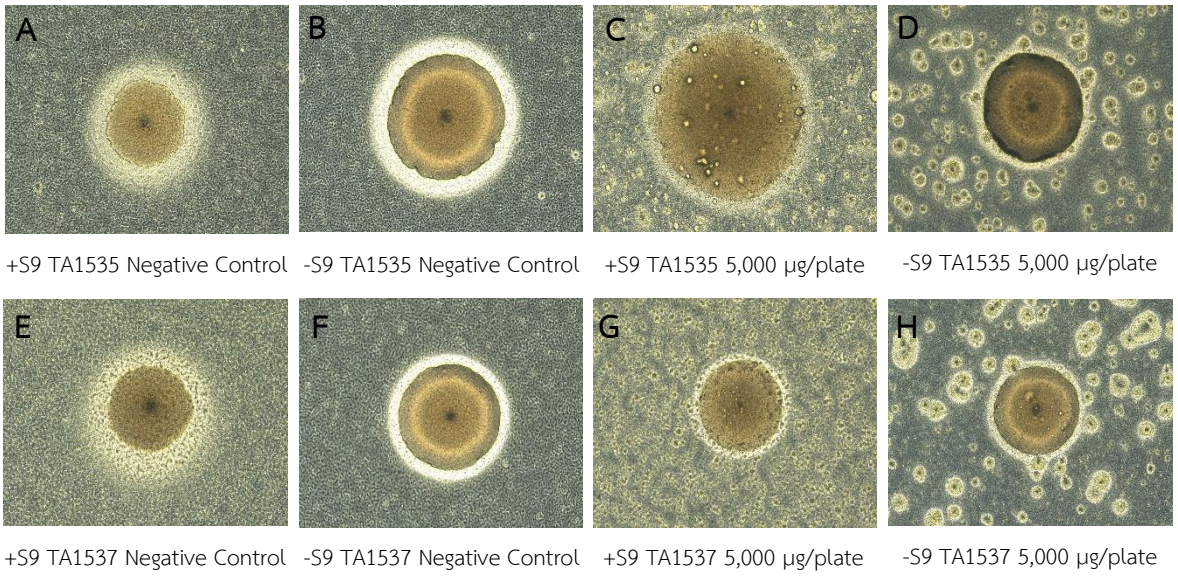
Concentration	Revertant colony (Mean±S.D.) With S9									
(µg/plate)	TA98	BL	TA100	BL	TA1535	BL	TA1537	BL	WP2 *uvr*A	BL
Negative Control	27.33±5.51	N	164.00±12.12	N	12.33±2.89	N	14.67±0.58	N	54.67±5.86	N
Positive Control	634.33±51.73	N	333.33±19.43	N	147.00±8.54	N	205.33±21.73	N	433.67±18.45	N
5,000	35.00±6.00	N	124.00±10.39	N	7.00±2.65	K	3.00±0.00	K	62.67±1.53	N
1,500	27.00±6.00	N	144.33±6.03	N	12.33±3.51	N	9.00±2.65	N	54.33±2.31	N
500	20.33±4.04	N	157.67±9.29	N	11.50±0.71	N	13.50±2.12	N	54.67±4.93	N

Concentration (µg/plate)	Revertant colony (Mean±S.D.) With S9									
	TA98	BL	TA100	BL	TA1535	BL	TA1537	BL	WP2 *uvr*A	BL
150	25.33±6.11	N	175.00±11.31	N	15.33±3.21	N	11.67±0.58	N	50.00±2.83	N
50	24.00±2.00	N	157.33±7.64	N	10.00±0.00	N	11.00±1.41	N	51.00±1.41	N
15	21.67±1.53	N	155.00±8.54	N	15.00±2.65	N	15.50±3.54	N	57.00±0.00	N

ตารางที่ 2 แสดงค่าจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ (Revertant colony) ของสารสกัดมะแขว่น ในเชื้อแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ (ในสภาวะที่ไม่มีเอนไซม์ S9 กระตุ้น) ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

Concentration (µg/plate)	Revertant colony (Mean±S.D.) With S9									
	TA98	BL	TA100	BL	TA1535	BL	TA1537	BL	WP2 *uvr*A	BL
Negative Control	11.67±3.06	N	147.00±13.89	N	13.67±5.03	N	4.67±3.21	N	56.33±5.77	N
Positive Control	76.00±5.66	N	394.00±8.19	N	311.67±40.38	N	540.67±78.82	N	330.00±1.00	N
5,000	24.50±3.54	N	156.50±4.95	N	10.67±3.51	K	1.00±0.00	K	64.33±7.09	N
1,500	9.50±3.54	N	142.50±0.71	N	16.33±1.53	N	4.00±1.73	N	53.00±8.54	N
500	17.00±1.41	N	160.33±2.89	N	12.67±1.15	N	5.33±1.53	N	65.00±5.66	N
150	6.50±2.12	N	127.50±9.19	N	21.00±0.00	N	6.67±1.53	N	35.00±0.00	N
50	9.00±0.00	N	140.50±7.78	N	23.00±2.83	N	5.00±2.00	N	51.50±7.78	N
15	5.33±2.08	N	138.50±2.12	N	11.00±1.41	N	6.33±1.53	N	58.00±2.65	N

หมายเหตุ : BL= Background lawn N = Normal background lawn K = Killing effect background lawn



ภาพที่ 3 A. Background lawn ของ TA1535 ในสภาวะที่มีเอนไซม์กระตุ้น B. Background lawn ของ TA1535 ในสภาวะที่ไม่มีเอนไซม์กระตุ้น C. เกิด Killing effect Background lawn ที่ความเข้มข้น 5,000 µg/plate ของ TA1535 ในสภาวะ ที่มีเอนไซม์กระตุ้น D. เกิด Killing effect Background lawn ที่ความเข้มข้น 5,000 µg/plate ของ TA1535 ในสภาวะที่ไม่มีเอนไซม์กระตุ้น E. Background lawn ของ TA1537 ในสภาวะที่มีเอนไซม์กระตุ้น F. Background lawn ของ TA1537 ในสภาวะที่ไม่มีเอนไซม์กระตุ้น G. เกิด Killing effect Background lawn ที่ความเข้มข้น 5,000 µg/plate ของ TA1537 ในสภาวะที่มีเอนไซม์กระตุ้น H. เกิด Killing effect Background lawn ที่ความเข้มข้น 5,000 µg/plate ของ TA1537 ในสภาวะที่ไม่มีเอนไซม์กระตุ้น

5. อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การทดสอบการก่อกลายพันธุ์โดยวิธีทดสอบเอมส์ (Ames test) ในสภาวะที่มีและไม่มีเอนไซม์กระตุ้น เป็นการทดสอบเพื่อใช้คัดกรองหาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดสมุนไพร ที่จะนำไปสู่การเกิดมะเร็งได้ เรียกว่า การทดสอบการกลายพันธุ์แบบย้อนกลับ อ้างอิงจาก OECD test guideline 471 เป็นการทดสอบพิษวิทยาและการประเมินความปลอดภัย เนื่องจากแบคทีเรียที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ ถูกทำให้กลายพันธุ์ไปจนไม่สามารถสังเคราะห์กรดอะมิโน Histidine หรือ Tryptophan ได้ ทำให้ไม่สามารถเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดกรดอะมิโนชนิดนี้ แต่ถ้าสารทดสอบมีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์จะทำให้แบคทีเรียชนิดนี้ เกิดการกลายพันธุ์แบบย้อนกลับ ทำให้สามารถสร้าง Histidine หรือ Tryptophan ได้เองอีกครั้ง จึงสามารถกลับมาเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาด Histidine หรือ Tryptophan ได้อีก ในกระบวนการทดสอบด้วยวิธีทดสอบเอมส์ มีทั้งในสภาวะที่ไม่มีการเติมเอนไซม์และมีการเติมเอนไซม์จากตับหนูเพื่อกระตุ้นเมแทบอลิซึมของสารที่ทดสอบด้วยวิธีทดสอบเอมส์ จึงเป็นการทดสอบการก่อกลายพันธุ์ในสถานการณ์จำลองการย่อยสลายสารเคมี/สารสมุนไพรในร่างกาย (บรรจง วิทยวีรศักดิ์และคณะ, 2553) หากสารเคมี/สารสมุนไพรที่ส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์ต่อเซลล์ร่างกาย เมื่อมีการบริโภคเข้าไปนั้นอาจทำให้เซลล์ถูกพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็งหรือเกิดโรคความผิดปกติทางพันธุกรรมได้ ดังนั้นผลการทดสอบการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดมะแขว่นในเชื้อแบคทีเรีย *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98, TA100, TA1535, TA1537 และ *E. coli* สายพันธุ์ WP2 uvrA ด้วยวิธีทดสอบเอมส์ ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีเอนไซม์ S9 กระตุ้น โดยพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของตัวอย่างทดสอบกับจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ (Revertant colony) พบว่าสารสกัดมะแขว่นไม่เกิดการก่อกลายพันธุ์ เนื่องจากจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ สูงไม่เกิน 2-3 เท่าเมื่อเทียบกับจำนวนโคโลนีที่กลายพันธุ์ตามธรรมชาติ (Negative Control) จากการศึกษาพบว่ามะแขว่นมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์สูง ซึ่งสารเหล่านี้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยอนุมูลอิสระเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรที่สามารถทำลายเซลล์และ DNA ทำให้เกิดการกลายพันธุ์และนำไปสู่การเกิดมะเร็งได้ ดังนั้นเมื่อสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ไปจับและกำจัดอนุมูลอิสระ จึงช่วยลดความเสียหายต่อ DNA และลดความเสี่ยงของการกลายพันธุ์ได้ (Alam et al., 2019) แต่เมื่อพิจารณาความเข้มข้นที่ไม่เหมาะสมโดยดูจากความผิดปกติของ background lawn พบความผิดปกติของ background lawn ที่ระดับความเข้มข้น 5,000 µg/plate ของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ TA1535 และ TA1537 ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีเอนไซม์ S9 กระตุ้น โดยความผิดปกติของ background lawn ที่เกิดขึ้นจะเรียกว่า Killing effect background lawn ซึ่งลักษณะของ background lawn จะมีช่องว่างที่พื้นหลังแสดงถึงการตายของเชื้อ ส่วนระดับความเข้มข้นที่ลดลงถัดมา คือ 1,500 µg/plate ไม่เกิดความผิดปกติของ background lawn ซึ่งชี้ให้เห็นว่าสารสกัดมะแขว่นมีความปลอดภัยในระดับหนึ่ง โดยระดับความเข้มข้นที่นำไปใช้ในการศึกษาต่อต้องไม่เกิน 1,500 µg/plate ซึ่งเป็นเกณฑ์การตัดสินใจอย่างหนึ่งที่บ่งบอกถึงความเหมาะสมของระดับความเข้มข้นของสารทดสอบที่ปลอดภัย จากผลการทดลองข้างต้นสอดคล้องกับงานวิจัยของปฐมาวัลย์ วิภูษณพันธุ์ (2561) รายงานว่าสารสกัดเมล็ดมะแขว่นไม่มีฤทธิ์การก่อกลายพันธุ์ในเชื้อ *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98 TA100 ในสภาวะที่มีและไม่มีไนไตร์กระตุ้น โดยไม่มีผลทำให้เซลล์สิ่งมีชีวิตเกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งการทดสอบการก่อกลายพันธุ์มีประโยชน์อย่างมาก นอกจากจะใช้เป็นวิธีทดสอบศักยภาพของสารสมุนไพรในการที่จะก่อให้เกิดมะเร็งหรือทำนายว่าสารสมุนไพรชนิดนั้น ๆ มีฤทธิ์ก่อมะเร็งหรือไม่แล้ว ยังสามารถนำไปใช้หรือประยุกต์ใช้ในการจัดอับดับความสำคัญของสารสมุนไพรเพื่อทำการทดสอบฤทธิ์ก่อมะเร็งในสัตว์ทดลองต่อไป แต่อย่างไรก็ตามผลการศึกษาทดลองในครั้งนี้เป็นเพียงตัวชี้วัดทางด้านความปลอดภัยในระดับหนึ่ง แต่ก็ต้องมีการศึกษาในเชิงลึกเพิ่มเติมและจะต้องมีการศึกษาหาข้อมูลด้านความปลอดภัยที่ถูกต้องก่อนนำมาบริโภค

6. กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ผู้ให้การสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบพระคุณห้องปฏิบัติการพิษวิทยา สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้ความช่วยเหลืองานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

7. เอกสารอ้างอิง

จุรีภรณ์ อิ้มพัฒน์ และนันทกานต์ วุฒิศิลป์. (2564). การพัฒนาน้ำมันที่มีส่วนประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากผลมะแขว่นและฤทธิ์บรรเทาปวดที่มีต่อกล้ามเนื้อน่องในผู้เข้าร่วมวิจัยสุขภาพดี. *วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก, 19*(1), 147-160.

ชุลี ยมภักดี และวรินทร ชวศิริ. (2554). *สารออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์จากมะแขว่น Zanthoxylum limonella Alston. Anti-microbial Activity from Zanthoxylum limonella Alston* [รายงานผลการวิจัย]. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ณัฐกานต์ วงศ์สีสม, จามจุรี จินะตา, บุษบา มะโนแสน, จิรรัชต์ กันทะขู้, สุรีพร วันควร, และสุภาวดี ศรีแย้ม. (2557). การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคในอาหารของน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่น. *วารสารวิจัยและพัฒนา มจธ, 37*(1), 3-14.

บรรจง วิทยวีรศักดิ์, จันทิภา ปุรินทราภิบาล, กัญญารัตน์ หลงเศษ, และซูไฮณีย์ อิงดิง. (2553). *การตรวจหาสารก่อกลายพันธุ์ในน้ำทิ้งและในบรรยากาศการทำงานภายในโรงงานผลิตถุงมือยางในจังหวัดสงขลา: รายงานฉบับสมบูรณ์*. สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม.

ปฐมาวัลย์ วิภูษณพันธุ์. (2561). *ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดจากผนังผลและเมล็ดมะแขว่น* [วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต]. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พัชรวรรณ ตันอมาตยรัตน์. (2558). *การพัฒนาผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียในช่องปากจากสารสกัดผลมะแขว่น* [รายงานผลการวิจัย]. มหาวิทยาลัยพะเยา.

มหาวิทยาลัยแม่โจ้. (2565). *เอสเซ้นส์บำรุงผิวหน้ามะแขว่น (Ma-khaen Essence)*. องค์ความรู้มหาวิทยาลัยแม่โจ้. https://kb.mju.ac.th/product.aspx?id=3748

Ahsan, M., Zaman, A. T., Hasan, M. C., Ito, C., & Islam, K. S. (2000). Constituents and cytotoxicity of *Zanthoxylum rhetsa* stem bark. *Fitoterapia, 71*(6), 697-700. https://doi.org/10.1016/S0367-326X(00)00214-8

Alam, F., Saqib, Q. N., & Ashraf, M. (2019). Phenolic contents, elemental analysis, antioxidant and lipoxygenase inhibitory activities of *Zanthoxylum armatum* DC fruit, leaves and bark extracts. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, 32*(4), 1703-1708.

Netweera, V., Priprem, A., & Limsittichaikoon, S. (2016). In vitro and in vivo studies of a bioadhesive gel containing volatile oil extracted from fruits of *Zanthoxylum limonella* Alston. *International Journal of Scientific and Research Publications, 6*(1), 175-178.

OECD. (2020). *Test No. 471: Bacterial reverse mutation test*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. https://doi.org/10.1787/9789264071247-en

Sreelekha, M., Anto, N. P., Anto, R. J., & Shafi, P. M. (2014). Cytotoxicity of 6-acetonyldihydrochelerythrin, arnottianamide and 6-(2-hydroxypropyl)-dihydrocherythrine towards human cancer cell lines. *Indian Journal of Chemistry, 53B*, 647-651.

Tangjitjaroenkun, J., Supabphol, R., & Chavasiri, W. (2012). Antioxidant effect of *Zanthoxylum limonella* Alston. *Journal of Medicinal Plants Research, 6*(8), 1407-1414. https://doi.org/10.5897/JMPR10.846

Vijay, U., Gupta, S., Mathur, P., & Bhatnagar, P. (2018). Microbial Mutagenicity Assay: Ames Test. *Bio-protocol, 8*(6), Article e2763. https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2763