วารสารวิจัย มข. 14 (5) : พฤษภาคม 2552

ฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นและต้านการกลายพันธุ์ของสมุนไพร 5 ชนิด ในวงศ์ Euphorbiaceae ในเขตอนุรักษ์พันธุกรรมพืช พื้นที่โคกภูตากา อำเภอภูเวียง จังหวัดขอนแก่น

Antioxidation and Antimutagenicity of Five Plants in Euphorbiaceae in Plant Genetics Conservation at Khok Phutaka, Amphur Phuwiang, Khon Kaen

บังอร ศรีพานิชกุลชัย (Bungorn Sripanidkulchai)[1*]
นิรามัย ฝางกระโทก (Niramai Fangkrathok)[2]
จินตนา จุลทัศน์ (Jintana Junlatat)[2]
กิตติศักดิ์ ศรีพานิชกุลชัย (Kittisak Sripanidkulchai)[3]

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ได้ตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น ฤทธิ์กลายพันธุ์และต้านการกลายพันธุ์ของสารสกัด 6 ชนิดของสมุนไพร 5 ชนิดในวงศ์ Euphorbiaceae โดยตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นด้วยวิธี DPPH radical scavenging และฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์และต้านการกลายพันธุ์โดยวิธี preincubation bacterial mutation assay และตรวจสอบปริมาณสารฟีโนลิครวมโดยวิธี Folin-Ciocalteu พบว่าสารสกัดจากกิ่ง/ลำต้นมะขามป้อมมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นสูงสุด รองลงมาคือ สารสกัดจากส่วนกิ่ง/ลำต้นของเหมือดโลด > ใบของเหมือดโลด > ขางอำไพ(ทั้งต้น) > มะยมเถื่อน(ทั้งต้น) > ลูกใต้ใบ(ทั้งต้น) ซึ่งมีค่า EC50 เท่ากับ 4.92, 5.56, 5.87, 6.49, 22.94 และ 23.76 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นของสารสกัดเหล่านี้แปรผันตรงกับปริมาณสารฟีโนลิครวม สารสกัดทุกชนิดไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์เมื่อทดสอบในภาวะที่มีและไม่มี S-9 mix ต่อเชื้อ *Salmonella typhimurium* TA98 และ TA100 การทดสอบฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ต่อ TA98 ในภาวะที่ไม่มี S-9 mix และมีสารมาตรฐาน AF2 พบว่าสารสกัดมาจากมะขามป้อมมีฤทธิ์สูงสุด รองลงมาคือ สารสกัดจากขางอำไพ ลูกใต้ใบ มะยมเถื่อน ใบเหมือดโลด โดยสารสกัดจากกิ่ง/ลำต้นของเหมือดโลดมีฤทธิ์ต่ำสุด กรณีทดสอบกับ TA100 ในภาวะที่ไม่มี S-9 mix และ AF2 พบว่าสารสกัดทุกชนิดยกเว้นใบเหมือดโลดมีฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ต่ำ ส่วนผลการทดสอบในภาวะที่มี S-9 mix และ 2-AA พบว่าสารสกัดทุกชนิดต้านการกลายพันธุ์ได้ดีทั้งต่อ TA98 และ TA100 จากการศึกษานี้สรุปได้ว่าสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด นี้มีศักยภาพที่เหมาะสมจะนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพ

[1]*รองศาสตราจารย์ ศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพจากสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
[2]*นักวิจัย ศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพจากสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
[3]*รองศาสตราจารย์ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
[*]*corresponding author, e-mail: bungorn@kku.ac.th*

Abstract

Antioxidative, mutagenic and antimutagenic activities of six crude extracts from five medicinal plants of Euphorbiaceae were investigated in this study. Antioxidative activity was examined using DPPH radical scavenging assay while mutagenicity and antimutagenicity were evaluated by bacterial mutation assay. The total phenolic content was also determined using the Folin-Ciocalteu method. The results demonstrated that the extract of *Phyllanthus emblica* (twig/stem) had strongest antioxidative activity. The order of higher to lower antioxidative activity of the other extracts are from *Aporusa villosa* (twig/stem) > *A. villosa* (leaf) > *P. virgatus* (whole plant) > *Sauropus quadrangularis* (whole plant) > *P. amarus* (whole plant) with EC_{50} of 4.92, 5.56, 5.87, 6.47, 22.94 and 23.76 μg/ml, respectively. The EC_{50} of these extracts correlate with their total phenolic contents.

All extracts did not show mutagenicity in both - S-9 mix and +S-9 mix conditions in the tested *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100. The antimutagenicity studies revealed that *P. emblica* extract showed the highest activity to TA98 in the absence of S-9 mix condition with the standard mutagen AF2. The order of antimutagenicity for the other extracts are *P. virgatus* > *P. amarus* > *S. quadrangularis* > *A. villosa (leaf)* > *A. villosa* (twig/stem). For TA100 in the presence of S-9 mix and AF2, all extracts had very low antimutagenicity except *A. villosa* (leaf) extract. All extracts showed strong antimutagenicity to both TA98 and TA100 in the presence of S-9 mix and 2-AA. Therefore, it is concluded that these five plants in Euphorbiaceae have potential for future development of herbal health products.

คำสำคัญ: ฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น, ฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์, ยูฟอร์เบียซี, มะขามป้อม, เหมือดโลด, ขางอำไพ, มะยมเถื่อน, ลูกใต้ใบ

Keywords: antioxidative, antimutagenicity, euphorbiaceae, *Phyllanthus emblica, Aporusa villosa, P. virgatus, Sauropus quadrangularis, P .amarus*

บทนำ

ประเทศไทยมีความหลากหลายทางชีวภาพในด้านพืชเป็นอย่างมาก พบว่าพื้นที่ป่าไม้เหลืออยู่ประมาณ 106 ล้านไร่ หรือ ร้อยละ 33 ของพื้นที่ในประเทศ (สำนักอุทยานแห่งชาติ, 2545) การอนุรักษ์พื้นที่และพันธุ์พืชจึงเป็นสิ่งที่สำคัญอย่างยิ่ง โคกภูตากา เป็นพื้นที่สาธารณะอยู่ในเขตตำบลเมืองเก่าพัฒนา อำเภอภูเวียง จังหวัดขอนแก่น ติดกับอุทยานแห่งชาติภูเวียง ซึ่งราษฎรได้น้อมเกล้าถวายที่สาธารณนี้แด่สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี เพื่อใช้เป็นพื้นที่ดำเนินงานในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ พื้นที่ทั้งหมด 694 ไร่ 58 ตารางวา สภาพทั่วไปเป็นภูเขาหิน มีพันธุ์ไม้หลากหลายชนิด สังคมไม้ยืนต้นเป็นกลุ่มเต็งรัง สังคมไม้พื้นล่างประกอบด้วยพืชจำนวนมากกว่า 38 วงศ์ และส่วนใหญ่เป็นพืชวงศ์ถั่ว และยังมีพืชหลายชนิดในวงศ์ Euphorbiaceae

Euphorbiaceae หรือเรียกว่า Euphorb family เป็นวงศ์ที่มีพืชประมาณ 300 genus 7,500 species หลายชนิดเป็นพืชที่รู้จักดีและนำมาใช้เป็นส่วนประกอบของยาไทย ได้แก่ มะขามป้อม ลูกใต้ใบ เป็นต้น ได้มีรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพของลูกใต้ใบ

หลายด้าน ได้แก่ ฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์และต้านมะเร็ง (Sripanidkulchai et al., 2002a; Rajeshkumar et al., 2002) ต้านไวรัสตับอักเสบและมะเร็งตับ (Thyagarajan et al., 1998; Rajeshkumar and Kuttan, 2000; Jeena et al., 1999; Sripanidkulchai et al., 2002b) ปกป้องตับจากพิษของแอลกอฮอล์ (Faremi et al., 2008) และต้านการเกิดมะเร็งในกระเพาะอาหาร (Raphael et al., 2006) สำหรับมะขามป้อมมีรายงานฤทธิ์หลายชนิดเช่นกัน ได้แก่ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นและป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร (Liu et al., 2008; Bandyopadhyay et al., 2000) ฤทธิ์ต้านมะเร็งตับ (Jeena et al., 1999) นอกจากพืชสองชนิดนี้แล้วยังมีพืชในวงศ์ Euphorbiaceae อื่นๆที่มีรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ หญ้าใต้ใบมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นและพิษต่อหัวใจ (Chularojmontri et al., 2005) เป็นต้น พืชส่วนใหญ่พบมีสารโพลีฟีโนลิครวมเป็นองค์ประกอบ ดังนั้นจึงนิยมหาปริมาณโดยวิธี Folin-Ciocalteu โดยใช้กรดฟีโนลิค เช่น กรดแทนนิค เป็นสารมาตรฐาน (Makkar et al., 1993) จากการสำรวจและรวบรวมพืชในวงศ์ Euphorbiaceae ในพื้นที่โคกภูตากาพบมีหลายชนิด งานวิจัยนี้จึงประสงค์จะตรวจสอบเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นและต้านการหลายพันธุ์ของสารสกัดจากสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด เพื่อใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนความหลากหลายทางชีวภาพของพืชและฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งจะได้ใช้เป็นประโยชน์ในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพ

วิธีการวิจัย

1. สารเคมี และเชื้อที่ใช้ทดสอบ

สารเคมีก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน 2 ชนิด ได้รับอภินันทนาการจาก Professor T Matsushima (Japan Bioassay Laboratory, ประเทศญี่ปุ่น) คือ 2-aminoanthracene (2-AA) และ 2-aminofluorene (AF2) ; สารเคมีจาก Sigma คือ NADH และ NADPH, G-6-P, tannic acid, α-tocopherol; สารเคมีจาก Fluka คือ 2,2′-diphenyl-picrylhydrazine (DPPH); สารเคมีจาก Merck คือ Folin-Ciocalteu phenol reagent; สารเคมีจาก Ajax Finechem คือ sodium carbonate; วิตามินซีจาก Carlo; dimethylsulfoxide (DMSO) จาก Labscan; สารเคมีอื่นๆ เป็น AR grade ของ Merck หรือ BDH อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้คือ Bacto Ager (Difo) และ Oxoid nutrient (Unipath) ส่วนเชื้อที่ใช้ทดสอบ คือ *Salmonella typhimurium* TA98 และ TA100 (ได้รับอภินันทนาการจาก Professor T. Matsushima และ ศ.ดร. อุษณีย์ วินิจเขตคำนวณ)

2. การเตรียมสารสกัดสมุนไพร

เก็บตัวอย่างพืชจากเขตอนุรักษ์พันธุกรรมพืชพื้นที่โคกภูตากา อำเภอภูเวียง จังหวัดขอนแก่น ในวงศ์ Euphorbiaceae 5 ชนิด ซึ่งพิสูจน์เอกลักษณ์พืชโดยเปรียบเทียบกับข้อมูลจากหอพรรณไม้แห่งประเทศไทย และเก็บตัวอย่าง herbarium ไว้ที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพจากสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยเป็นพืชดังนี้ คือ 1) เหมือดโลด (*Aporusa villosa*, KP016), 2) มะขามป้อม (*Phyllanthus emblica*, KP021), 3) ลูกใต้ใบ (*P. amarus*, KP003), 4) ขางอำไพ (*P. virgatus*, KP004), 5) มะยมเถื่อน (*Sauropus quadrangularis*, KP029) มาล้างให้สะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ อบแห้งที่อุณหภูมิ 40°C จนน้ำหนักคงที่ จากนั้นบดให้ละเอียด นำมาหมักใน 50 % เอทานอล เป็นเวลา 7 วัน โดยคนเป็นระยะๆ จากนั้นกรอง นำส่วนใสมาปั่นเหวี่ยงที่ 500g เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนลอย (supernatant) มาทำให้แห้งโดยใช้เครื่องระเหยแห้งแบบหมุนและเครื่องระเหยแห้งโดยใช้ความเย็น ชั่งน้ำหนักแห้งจากส่วนสกัดสมุนไพรเพื่อหา % yield

3. การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีโนลิครวม

ใช้วิธี Folin-Ciocalteu (Makkar et al., 1993) โดยนำสารสกัดสมุนไพรมาละลายใน 50 % เอทานอล ให้มีความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้น sonicate เป็นเวลา 30 นาที หากมีตะกอนให้กรอง และนำสารละลายสมุนไพรปริมาตร 50-100 ไมโครลิตร

มาปรับด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Folin reagent จำนวน 0.25 มิลลิลิตร และ 20 % sodium carbonate 0.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 40 นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 725 นาโนมิเตอร์ จากนั้นคำนวณหาปริมาณสารฟีโนลิครวม โดยเปรียบเทียบกับ slope ของกราฟมาตรฐานของกรดแทนนิค และแสดงค่าเป็นสมดุลย์ของกรดแทนนิคในหน่วย มิลลิกรัม/ กรัม ของสารสกัด

4. การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น

ทดสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay (Aruoma et al., 1997) โดยละลายส่วนสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่างๆในเมทานอล และนำมาจำนวน 2.8 มิลลิลิตร ผสมกับ 1 มิลลิโมลาร์ DPPH ที่ละลายในเมทานอล จำนวน 0.2 มิลลิลิตร จากนั้นทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนมิเตอร์ เพื่อหาปริมาณ DPPH ที่เหลือเทียบกับหลอดควบคุมที่ไม่ใช้สารละลายสมุนไพร จากนั้นนำไปหาความสัมพันธ์ค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้น (r^2) ซึ่งต้องไม่ต่ำกว่า 0.95 และคำนวณหาความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรที่สามารถจับอนุมูลอิสระได้ 50 % (EC_{50}) โดยใช้วิตามินอีและวิตามินซีเป็นสารมาตรฐานเพื่อใช้เปรียบเทียบค่า EC_{50}

5. การทดสอบการกลายพันธุ์ และต้านการกลายพันธุ์

เตรียม S-9 mix ประกอบด้วย 10 % ของ microsomal fraction (S-9) ที่เตรียมจากตับของหนูขาว (Sprague Dawley rat) เพศผู้ โดยวิธีของ Matsushima et al. (1976) ซึ่งมีค่าโปรตีนประมาณ 35 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, KCl 33 มิลลิโมลาร์, $MgCl_2$ 8 มิลลิโมลาร์, G-6-P 5 มิลลิโมลาร์ , NADPH 4 มิลลิโมลาร์, NADH 4 มิลลิโมลาร์, sodium phosphate buffer 100 มิลลิโมลาร์, pH 7.4 ใช้วิธี preincubation method (Ames, 1972; Araki et al., 1984; Sripanidkulchai et al., 2001; 2002a) โดยนำสารสกัดสมุนไพรมาละลายใน DMSO ให้มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นกรองผ่านแผ่นเมมเบรนขนาด 0.2 ไมโครเมตร นำสารละลายสมุนไพรที่ได้ในความเข้มข้นต่างๆ ไปผสมกับเชื้อที่ใช้ทดสอบ 0.1 มิลลิลิตร (เป็นเชื้อ *S. typhimurium* TA98 และ TA100 ที่เลี้ยงไว้ 18 ชั่วโมง ให้ค่า OD650 เท่ากับ 0.3-0.5) เติม 0.5 มิลลิลิตร ของ S-9 mix (ภาวะ+S-9 mix) หรือ 0.5 มิลลิลิตร ของ 0.1 โมลาร์ phosphate buffer (ภาวะ-S- 9 mix) เมื่อ incubate ไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาเติม top agar และเทลง minimal glucose agar plate และ incubate ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวน revertant colony นำค่า background (ซึ่งเป็นค่าที่ได้จากการใช้ DMSO แทนสารละลายที่ทดสอบ) ไปลบออกก่อนการคำนวณจำนวน revertant ที่เพิ่มขึ้นจากการทดสอบการกลายพันธุ์ของสารสกัดสมุนไพร

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ ใช้วิธีการเดียวกับข้างต้นแต่เติมสารก่อการกลายพันธุ์มาตรฐาน ร่วมกับสารสกัดสมุนไพร โดยใช้ 2-AA (0.5 ไมโครกรัม ทั้งสำหรับ TA98 และ TA100) ในภาวะที่มี S-9 mix และใช้ AF2 (0.1 ไมโครกรัม สำหรับ TA98 หรือ 0.01 ไมโครกรัม สำหรับ TA100) ในภาวะที่ไม่มี S-9 mix โดยทำ positive control ที่มีเฉพาะสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐานคู่ขนานทุกการทดลอง ทุกการทดลองซ้ำ 2-3 ครั้ง

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

กรณีทดลองการกลายพันธุ์กำหนดว่าจะให้ผลบวกเมื่อสารสกัดสมุนไพรให้ค่า revertant colony สูงกว่าค่าของ background 2 เท่า และแสดง dose-response relationship (Sripanidkulchai et al., 2002c) ส่วนการทดสอบฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ แสดงค่าเป็น % inhibition ของการเกิด revertant ในภาวะที่มีสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน และเป็น dose response relationship (% inhibition = [a - b] 100/ a โดย a = ค่า revertant ในภาวะที่มีสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน และ b = ค่า revertant ในภาวะที่มีสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐานร่วมกับสารสกัดสมุนไพร)

ผลการวิจัย

1. ฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นและปริมาณสารฟีโนลิครวมของสารสกัดสมุนไพร

ผลการตรวจสอบสารสกัดของสมุนไพร 5 ชนิด ซึ่งรวมเป็น 6 สารสกัดในวงศ์ Euphorbiaceae พบว่าทุกชนิดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดี โดยสารสกัดจากส่วนกิ่ง/ลำต้นของมะขามป้อมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดจากส่วนกิ่ง/ลำต้นและใบของเหมือดโลด สารสกัดจากทั้งต้นของขางอำไพ มะยมเถื่อน และลูกใต้ใบ ซึ่งมีตัว EC_{50} เท่ากับ 4.92, 5.56, 5.87, 6.49, 22.94 และ 23.75 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยสารมาตรฐานวิตามินซี และวิตามินอีให้ค่า EC_{50} เท่ากับ 3.61 และ 6.12 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยที่ % CV (coefficient of variation) สำหรับ intra assay เท่ากับ 0.16 (n=8) และ intra assay เท่ากับ 0.11 (n=17) ซึ่งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดเหล่านี้สอดคล้องกับปริมาณสารฟีโนลิครวม ซึ่งพบได้สูงสุดในสารสกัดจากกิ่ง/ลำต้นมะขามป้อมและรองลงมาคือจากกิ่ง/ลำต้นเหมือดโลด, ส่วนทั้งต้นของขางอำไพ, ใบเหมือดโลด, ส่วนทั้งต้นของมะยมเถื่อนและลูกใต้ใบ ซึ่งเท่ากับ 506.6±12.9, 376.7±17.5, 366.5±18.4, 275.7±10.4, 160.1±4.4 และ 132.6±8.7 มิลลิกรัม/กรัม ตามลำดับ (ตารางที่1)

2. ฤทธิ์การกลายพันธุ์และต้านการกลายพันธุ์ของสารสกัดสมุนไพร

การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดสมุนไพร 6 ชนิดจากพืชทั้ง 5 ชนิด ไม่พบฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ต่อ TA98 และ TA100 ทั้งในภาวะที่มีและไม่มี S-9 mix โดยที่สารมาตรฐาน 2-AA และ AF2 แสดงผลบวกชัดเจน (ตารางที่2)

สำหรับฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ที่ทดสอบต่อ TA98 ในภาวะที่มีสารมาตรฐาน AF2 และไม่มี S-9 mix นั้นพบว่าสารสกัดจากมะขามป้อมมีฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์สูงสุด รองลงมาคือสารสกัดจากขางอำไพ ลูกใต้ใบ มะยมเถื่อน ใบเหมือดโลด โดยให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 4.9, 6.7, 8.0, 8.8, และ 9.3 มิลลิกรัม/ plate ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากกิ่ง/ลำต้นเหมือดโลดมีฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ต่ำสุด โดยมีค่า IC_{50} สูงกว่า 10 มิลลิกรัม/ plate (รูปที่1 ก และตารางที่ 3) กรณีทดสอบกับ TA100 ในภาวะที่มี AF2 และไม่มี S-9 mix นั้นพบว่าสารสกัดสมุนไพรเกือบทั้งหมดมีฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ต่ำ ทำให้ค่า IC_{50} มากกว่า 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ยกเว้นใบเหมือดโลดซึ่งมีฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ได้ และให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 8.3 มิลลิกรัม/ plate (รูปที่1 ข และตารางที่ 3)

การทดสอบในภาวะที่มี S-9 mix ต่อสารมาตรฐาน 2-AA พบว่าสารสกัดสมุนไพรทุกชนิดมีความสามารถในการต้านการกลายพันธุ์ได้ดี โดยพบว่ากรณี TA98 นั้นสารสกัดที่ให้ผลเรียงลำดับจากสูงสุดลงมาคือจากมะขามป้อม(กิ่ง/ลำต้น) > เหมือดโลด(กิ่ง/ลำต้น) > ขางอำไพ(ทั้งต้น) > เหมือดโลด(ใบ) > มะยมเถื่อน(ทั้งต้น) > ลูกใต้ใบ(ทั้งต้น) ซึ่งให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.5, 0.6, 1.1, 1.8, 2.1 และ 7.8 มิลลิกรัม/ plate ตามลำดับ(รูปที่1 ค และตารางที่ 3) กรณีทดสอบในภาวะที่มี S-9 mix ต่อสารมาตรฐาน 2-AA ต่อเชื้อ TA100 พบว่าสารสกัดทุกชนิดมีฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ได้ดี โดยเรียงลำดับจากที่มีฤทธิ์สูงสุด คือ มะขามป้อม(กิ่ง/ลำต้น) > เหมือดโลด(กิ่ง/ลำต้น) > เหมือดโลด(ใบ) > ขางอำไพ(ทั้งต้น) > มะยมเถื่อน(ทั้งต้น) > ลูกใต้ใบ(ทั้งต้น) ซึ่งให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.5, 0.6, 0.8,1.8 ,1.9 และ9.5 มิลลิกรัม/ plate ตามลำดับ(รูปที่1 ง และตารางที่ 3)

อภิปรายผลการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้พบว่าสารสกัด 6 ชนิด จากพืชจำนวน 5 ชนิดในวงศ์ Euphorbiaceae มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นได้ดี โดยพบว่าสารสกัดส่วนกิ่ง/ลำต้นของมะขามป้อมมีฤทธิ์สูงสุด ซึ่งได้เคยมีรายงานแล้วว่าผลของมะขามป้อมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดี เนื่องจากมีวิตามินซีและสารฟีโนลิคสูง (Liu et al., 2008) และยังมีผลต้านการเกิดแผลในกระเพาะอาหารได้ (Bandyopadhyay et al., 2000) ผลงานวิจัยนี้จึงให้ข้อมูลเบื้องต้นว่านอกจากผล

มะขามป้อมแล้วส่วนกิ่ง/ลำต้นมะขามป้อมก็มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นได้ดี และเนื่องจากมีสารฟีโนลิครวมปริมาณสูงซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นประโยชน์ในการพัฒนาผลผลิตได้ ทั้งนี้ผู้วิจัยได้พัฒนาผลิตภัณฑ์ครีมเพื่อรักษาส้นเท้าแตกจากสารสกัดกิ่ง/ลำต้นมะขามป้อม (อนุสิทธิบัตรเลขที่ 060300185) ซึ่งก็ให้ผลช่วยบรรเทาอาการอักเสบที่ส้นเท้าในอาสาสมัครได้ (Eaimtrakarn et al., 2006)

การทดลองครั้งนี้ยังพบว่า สารสกัดจากกิ่ง/ลำต้นมะขามป้อมไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์แต่มีฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ได้ดีทั้งในภาวะที่ไม่มีและมี S-9 mix ต่อเชื้อ TA98 หากเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นของพืช 3 ชนิด ใน Phyllanthus พบว่า มะขามป้อมมีฤทธิ์สูงสุด รองลงมา คือ ขางอำไพและลูกใต้ใบ และยังพบว่าค่า EC_{50} ของสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดแปรผกผันกับปริมาณสารฟีโนลิครวม พืชทั้ง 3 ชนิดไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ พบว่าฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ในภาวะที่ไม่มีและมี S-9 mix ต่อ TA98 และTA100 ในภาวะที่มี S-9 mix ของมะขามป้อม > ขางอำไพ > ลูกใต้ใบ ซึ่งยืนยันผลของลูกใต้ใบที่ได้เคยมีรายงานก่อนนี้แล้วว่ามีฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ได้ดี (Sripanidkulchai et al., 2002a) เมื่อเปรียบเทียบสมุนไพรอีก 2 ชนิดที่ศึกษาในครั้งนี้ คือ เหมือดโลดและมะยมเถื่อน พบว่า ส่วนใบและกิ่ง/ลำต้นของเหมือดโลดมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นได้ดี ใกล้เคียงกันซึ่งสูงกว่ามะยมเถื่อน โดยไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ และพบว่าสารสกัดของสมุนไพรทั้ง 2 ชนิดนี้ ต้านการกลายพันธุ์ได้ดีในภาวะที่มี S-9 mix ทั้งต่อ TA98 และTA100

ผลการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าพืชในวงศ์ Euphorbiaceae ทั้ง 5 ชนิด มีศักยภาพที่ดีในด้านฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น และต้านการกลายพันธุ์ นอกจากผลมะขามป้อมและลูกใต้ใบทั้งต้น ที่เคยมีรายงานฤทธิ์ในเชิงวิทยาศาสตร์ไว้แล้ว กิ่ง/ลำต้นมะขามป้อมและพืชอีก 3 ชนิด มีศักยภาพสูงที่น่าจะนำมาศึกษาฤทธิ์ด้านอื่นๆและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และมหาวิทยาลัยขอนแก่นที่สนับสนุนงบประมาณการทำวิจัย และศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพจากสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ที่อนุญาตให้ใช้อุปกรณ์สำหรับการทำวิจัย และขอขอบคุณผู้อำนวยการโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) มหาวิทยาลัยขอนแก่น และผู้อำนวยการ อพ.สธ. สวนจิตรลดา พระราชวังดุสิต กรุงเทพมหานคร ที่อำนวยความสะดวกและสนับสนุนการเข้าพื้นที่โคกภูตากาเพื่อเก็บตัวอย่างพืชสมุนไพรที่ศึกษา

เอกสารอ้างอิง

เต็ม สมิตินันท์. 2544. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม 2544. สวนพฤกษศาสตร์ป่าไม้, สำนักงานเขตป่าไม้ กรมป่าไม้: 44, 410, 411, 413, 467.

สำนักอุทยานแห่งชาติ. 2545. อุทยานแห่งชาติในประเทศไทย เอกสารเผยแพร่. สำนักอุทยานแห่งชาติ. กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช: 54.

Ames, B.N. 1972. A bacterial system for detecting mutagens and carcinogens. In: **Mutagen effects of environmental contaminants.** H.E. Sutton and M.I. Harris (Eds.), pp. 57-66, NY: Academic Press.

Araki, A., Marumatsu, M., Matsushima, T. 1984. Comparison of mutagenicities of N-nitrosamines on *Salmonella typhimurium* TA100 and *Escherichia coli* wp2 uvr A/pkm 101 using rat and hamster liver S9. **Gann** 75: 8-16.

Aruoma, O.I., Halliwell, B., Williamson, G. 1997. In vitro methods for characterizing potential prooxidant and antioxidant actions of non nutritive substances in plant foods. In: **Antioxidant methodology.** O.I. Aruoma and S.L. Cuppett (Eds.) pp. 173-204. AOCS Press, USA.

Bandyopadhyay, S.K., Pakrashi S.C., Pakrashi, S.C., Pakrashi, A. 2000. The role of antioxidant of Phyllanthus emblica fruits on prevention from indomethacin induced gastric ulcer. **J Ethnopharmacol** 70: 171-176.

Chularojmontri, L., Wattanapitayakul, S.K., Herunsalee, A., Charuchongkolwongse, S., Niumsakul, S., Srichairat, S. 2005. Antioxidation and cardioprotective effect of *Phyllanthus uninaria L.* on Doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Biol Pharm Bull** 28(7):1165-1171.

Eaimtrakarn, S., Vekavakayanondha, S., Uontaow, N., Suwisom, S., Sripanidkulchai, B. 2006. Evaluation on Consumer Satisfaction, Safety and Properties of Thai Cracked Heel Cream. In: **The 1st Sino-Thai on Traditional Medicine and Natural Health Products,** Nov. 13-19, 2006, Nanning-Guangxi, Chaina, pp. 143-146.

Faremi, T.Y., Suru, S.M., Fafunso, M.A., Obioha U.E. 2008. Hepatoprotective potentials of *Phyllanthus amarus* against ethanol-induced oxidation stress in rats. **Food Chem Toxicol** 46: 2658-2664.

Jeena, K.J., Joy, K.L., Kuttan, R. 1999. Effect of *Emblica officinalis, Phyllanthus amarus and Picrorhiza kurroa* on N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis Cancer Lett 136: 11-16.

Liu, X., Zhao, M., Wang, J., Yang, B., Jiang, Y. 2008. Antioxidant activity of methanolic extract of emblica fruit (*Phyllanthus emblica* L.) from six regions in Chaina. **J Food Compos Anal** 21: 219-228.

Makkar, H.P.S., Bluemmel, M., Borowy, N.K., Becker, K. 1993. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. **J Sci Food Agri** 61: 161-165.

Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugima, T., 1976. A safe substitute for polychlorinated biphenyls as an inducer of metabolic activation system. In: **In vitro metabolic activation in mutagenesis testing.** F.J. de Serres, J.R. Fouts, J.R. Bend and R.M. Philpot (Eds.), pp. 85-88. Amsterdam: Elsevier 1 North Holland.

Rajeshkumar, N.V., Kuttan, R. 2000. *Phyllanthus amarus* extract administration increase the life span of rats with hepatocellular carcinoma. **J Ethnopharmacol** 73: 215-219.

Rajeshkumar, N.V., Joy K.L., Kuttan, G, Rawsewak, R.S., Nair M.G., Kuttan, R. 2002. Antitumor and anticarcinogenic activity of *Phyllanthus amarus* extract. **J Ethnopharmacol** 81: 17-22.

Raphael, K.R., Sabu, M.C., Kuman, K.B.H. and Kuttan R. 2006. Inhibition of N-methyl N′-nitro-N- nitrosoguanidine (MNNG) induced gastric carcinogenesis by *Phyllanthus amarus* extract. **Asian Pacific J Cancer Prev** 7: 299- 302.

Santisuk, T., Larsen, K. 2007. Flora of Thailand: Euphobiaceae. 8(2): 473-507, 543-546 **The forest herbarium national park.** Wildlife and plant conservation department, Bangkok.

Sripanidkulchai, B., Tattawasart, U., Laupatarakasem, P., Sripanidkulchai, K. 2001. Antimutagenicity of eight indigenous medicinal plants. **KKU Res J** 6(1):23-33.

Sripanidkulchai, B., Tattawasart, U., Laupatarakasem, P., Vinitketkumneun, U., Sripanidkulchai, K., Furihata, C., Matsushima, T. 2002a. Antimutagenic and anticarcinogenic effects of Phyllanthus amarus. **Phytomedicine.** 9: 26-32.

Sripanidkulchai, B., Tattawasart, U., Laupatarakasem, P., Wongpanich, W. 2002b. Anti-inflammatory and antibacterial properties of selected Thai indigenous medicinal plants used for dysuria. **Thai J Pharm Sci** 26(1-2): 33-38.

Sripanidkulchai, B., Sripanidkulchai, K., Sirisangtrakul, W. 2002c. Effect of histidine on interpretation of positive mutagenicity of fermented fish. **KKU Res J** 7(1): 51-61.

Thygarajan, S. P., Subramanian, S.,

Thirunalasundari, T., Venkateswaran, P. S., Blumberg, B. S. 1988. Effect of Phyllantus amarus on chronic carriers of hepatitis B virus. **Lancet** 2(8614): 764-766.

ตารางที่1. ส่วนที่ใช้, % yield, ฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นและปริมาณสารฟีโนลิครวมของส่วนสกัดสมุนไพรในวงศ์ Euphorbiaceae

ชื่อพืช[1]	ส่วนที่ใช้	Voucher specimen number	% yield	ปริมาณสารฟีโนลิค[2] (equi. tannic acid, mg/ g)	$EC_{50}(r^2)$ (μg/ml)
1.เหมือดโลด (*Aporusa villosa* Wall. Ex Lindl.) Baill	ใบ	KP016	1.97	275.7±10.4	5.87 (0.922)
2. เหมือดโลด (*Aporusa villosa* Wall. Ex Lindl.) Baill	กิ่ง/ลำต้น	KP016	14.63	376.7±17.5	5.56 (0.977)
3.มะขามป้อม (*Phyllanthus emblica* L.)	กิ่ง/ลำต้น	KP021	5.40	506.6±12.9	4.92 (0.991)
4.ลูกใต้ใบเล็ก (*P. amarus* Schumach and Thonn.)	ทั้งต้น	KP003	13.40	132.6±8.7	23.75 0.998)
5.ขางอำไพ (*P. virgatus* G. Forst)	ทั้งต้น	KP004	11.65	366.5±18.4	6.49 (0.973)
6.มะยมเถื่อน (*Sauropus quadrangularis* Willd.) Miil. Arg.	ทั้งต้น	KP029	22.34	160.1±4.4	22.94 (0.978)
วิตามินซี					3.61 (0.997)
วิตามินอี					6.12 (0.977)

[1] ชื่อเรียกตาม เต็ม สมิตินันท์ (2544) และ Santisuk and Larsen (2007)

[2] แสดงค่าเป็น mean ± SD จากการทดสอบ 7 ความเข้มข้นทำซ้ำ 2 ครั้ง

ตารางที่ 2. ผลการทดสอบฤทธิ์กลายพันธุ์ของสารสกัดจากสมุนไพรวงศ์ Euphorbiaceae

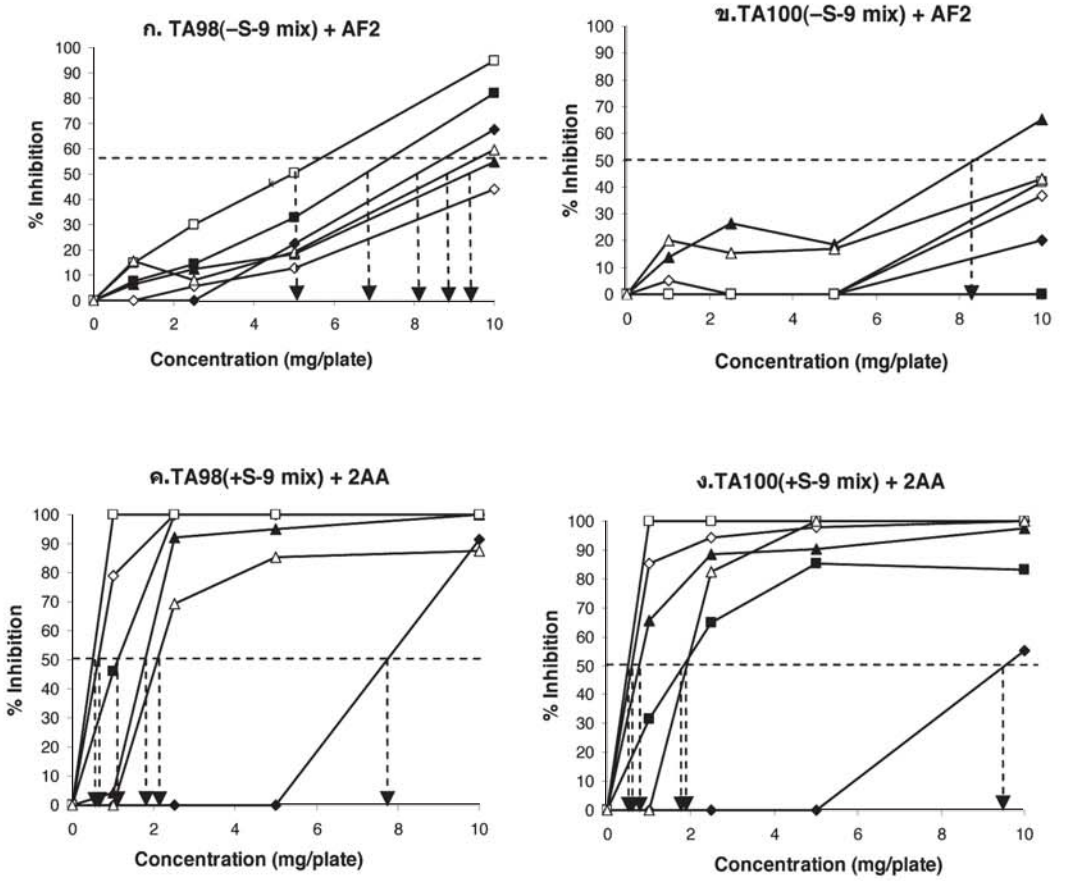
สารสกัด	TA98		TA100	
	–S-9 mix	+S-9 mix	–S-9 mix	+S-9 mix
1.เหมือดโลด (ใบ)	–	–	–	–
2.เหมือดโลด (กิ่ง/ลำต้น)	–	–	–	–
2.มะขามป้อม (กิ่ง/ลำต้น)	–	–	–	–
3.ลูกใต้ใบ (ทั้งต้น)	–	–	–	–
4.ขางอำไพ (ทั้งต้น)	–, t	–	–	–
5.มะยมเถื่อน (ทั้งต้น)	–	–	–	–
สารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน*				
AF2	461±107(n=5)		298±101(n=6)	
2-AA		288±105(n=5)		187±101(n=6)

หมายเหตุ ค่า background ของ TA98 เท่ากับ 23-42 และ 28-51 ส่วนของ TA100 เท่ากับ 128-177 และ 137-162 สำหรับ ภาวะที่ไม่มีและมี S-9 mix ตามลำดับ

– = ไม่พบฤทธิ์กลายพันธุ์เมื่อทดสอบที่ความเข้มข้น 1-10 มิลลิกรัม/ plate

t = toxicity ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ทดสอบ (10 มิลลิกรัม/ plate)

* = แสดงเป็นค่า revertant colony ที่หักค่า background แล้ว โดยทดสอบ AF2 ในภาวะที่ไม่มี S-9 mix และ 2-AA ในภาวะที่ต้องการS-9 mix



รูปที่1. ฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ของสารสกัดสมุนไพรวงศ์ Euphorbiaceae ต่อ TA98 และ TA100 ในภาวะที่มีสารมาตรฐานAF2 และไม่มี S-9mix (ก,ข) และภาวะที่มีสารมาตรฐาน 2-AA และ S-9 mix (ค,ง)
(—▲— ใบเหมือดโลด —◇— กิ่ง/ลำต้นเหมือดโลด —□— กิ่ง/ลำต้นมะขามป้อม —△— มะยมเถื่อน —◆— ลูกใต้ใบ —■— ขางอำไพ)

ตารางที่ 3. ค่าความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรที่ต้านการกลายพันธุ์ 50% (IC_{50})ทั้งในภาวะที่มีและไม่มี S-9 mix

ชื่อพืช (ส่วนที่ใช้)	IC_{50} (mg/ plate)			
	–S-9 mix (AF2)		+S-9 mix (2-AA)	
	TA 98	TA 100	TA 98	TA 100
1.เหมือดโลด (ใบ)	9.3	8.3	1.8	0.8
2.เหมือดโลด (กิ่ง/ลำต้น)	>10	>10	0.6	0.6
3.มะขามป้อม (กิ่ง/ลำต้น)	4.9	>10	0.5	0.5
4.ลูกใต้ใบ (ทั้งต้น)	8.0	>10	7.8	9.5
5.ขางอำไพ (ทั้งต้น)	6.7	>10	1.1	1.8
6.มะยมเถื่อน (ทั้งต้น)	8.8	>10	2.1	1.9