Thai Science and Technology Journal Vol. 34 No. 2 March-April 2026 ISSN 3027-6365 (Online)

Thai Science and Technology Journal
วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
Journal Homepage : http://li01.tci-thaijo.org/index.php/tstj

การประเมินความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของสารสกัดผลมะแขว่นด้วยวิธีทดสอบไมโครนิวเคลียสในเซลล์เพาะเลี้ยง

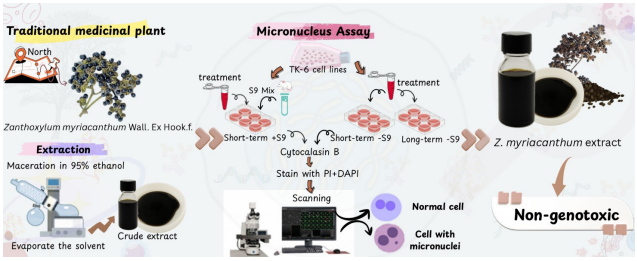
Genotoxicity Evaluation of *Zanthoxylum myriacanthum* Wall. Ex Hook.f. Extract Using *in vitro* Micronucleus Assay

ตีญานี สาหัด*, ณฐภัทร หาญกิจ, พรชัย สินเจริญโภไคย, ศรายุธ ระดาพงษ์
ห้องปฏิบัติการพิษวิทยา สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข นนทบุรี 11000

Tiyanee Sahad*, Nathaphat Harnkit, Pornchai Sincharoenpokai, Sarayut Radapong
Toxicology laboratory, Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Nonthaburi 11000

Received 29 May 2025; Received in revised 15 September 2025; Accepted 23 September 2025

GRAPHICAL ABSTRACT



ABSTRACT

Zanthoxylum myriacanthum, commonly known as Ma-Khwan, is a traditional medicinal plant predominantly found in the northern part of Thailand. Its fruits are extensively used in culinary practices and traditional medicine. However, comprehensive safety and toxicity data on its extracts remain limited. This study aimed to evaluate the genotoxic potential of *Z. myriacanthum* fruit extract using the *in vitro* micronucleus assay in human TK-6 lymphoblastoid cells, following the OECD Test Guideline No. 487. The extract was tested under three exposure conditions: short-term treatment with and without metabolic activation (S9 mix) for 4 hours, and long-term treatment without S9 mix for 24 hours. The results indicated that the extract did not induce a statistically significant increase in micronucleus frequency compared with the concurrent negative controls at any tested concentration. These findings suggested that the fruit extract of *Z. myriacanthum* does not exhibit genotoxicity under the specified experimental conditions. The study was conducted in accordance with OECD Good Laboratory Practice (GLP) standards and aligned with the Thai Food and Drug Administration guidelines for herbal product development. Nonetheless, further *in vivo* toxicity assessments are required to fully substantiate its safety profile, support consumer confidence, and facilitate its potential application in commercial product registration.

คำสำคัญ

สารสกัดผลมะแขว่น; การประเมินความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม; ไมโครนิวเคลียส; หลักการ OECD GLP

Keywords

Zanthoxylum myriacanthum; Genotoxicity; Micronucleus; OECD GLP principles

บทคัดย่อ

มะแขว่น (*Zanthoxylum myriacanthum*) เป็นสมุนไพรพื้นถิ่นที่พบส่วนใหญ่ทางภาคเหนือของประเทศไทย ผลของ มะแขว่นนิยมใช้ในการประกอบอาหาร และจัดเป็นสมุนไพรท้องถิ่นมีสรรพคุณทางยา แต่ข้อมูลความปลอดภัยและข้อมูลเกี่ยวกับความเป็นพิษของสารสกัดมะแขว่นยังมีอยู่อย่างจำกัด การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของสารสกัดผลมะแขว่นด้วยวิธีไมโครนิวเคลียสโดยใช้เซลล์ลิมโฟบลาสต์ของมนุษย์ชนิด TK-6 อ้างอิงวิธีตามแนวทาง OECD Test guideline No.487 โดยแบ่งการทดสอบเป็น 3 กลุ่มทดสอบ การทดสอบแบบระยะสั้นในระบบที่มีและไม่มีเอนไซม์ S9 (บ่มสาร 4 ชั่วโมง) และการทดสอบแบบระยะยาวในระบบที่ไม่มีเอนไซม์ S9 (บ่มสาร 24 ชั่วโมง) ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดผลมะแขว่นไม่ก่อให้เกิดไมโครนิวเคลียสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมทุกระดับความเข้มข้นของทุกกลุ่มทดสอบ ผลการทดสอบแสดงให้เห็นถึงความปลอดภัยต่อสารพันธุกรรมของสารสกัดผลมะแขว่นภายใต้เงื่อนไขการทดสอบที่ดำเนินการตามมาตรฐาน OECD GLP และแนวทางการพัฒนาสมุนไพรเพื่อสุขภาพของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา อย่างไรก็ตามการยืนยันความปลอดภัย ควรมีการศึกษาความเป็นพิษเพิ่มเติมในระดับสัตว์ทดลอง เพื่อสร้างความมั่นใจต่อผู้บริโภค รองรับการนำไปใช้ในเชิงพานิชย์ และประกอบการขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์เพื่อจำหน่ายในอนาคต

***ผู้รับผิดชอบบทความ:** tiyanee.s@dmsc.mail.go.th

DOI:

1. บทนำ

ในสถานการณ์ปัจจุบันที่มีทั้งมลพิษจากฝุ่น PM 2.5 และโรคระบาด การหันมาใช้สมุนไพรเพื่อดูแลสุขภาพ หรือการรับประทานสมุนไพรเป็นยาจึงเป็นทางเลือกที่ผู้คนสนใจมากขึ้น เนื่องจากสามารถช่วยเสริมสร้างภูมิคุ้มกัน ลดการอักเสบ และช่วยบำรุงสุขภาพ แต่การใช้สมุนไพรควรใช้ด้วยความระมัดระวังและใช้ในปริมาณที่เหมาะสม การใช้เป็นระยะเวลานานๆ หรือปริมาณมากเกินไปอาจส่งผลกระทบต่อร่างกายโดยตรงและโดยอ้อม หรือส่งผลกระทบให้เกิดความเป็นพิษขึ้นในระบบเมทาบอลิซึมของร่างกาย อาจทำให้เกิดการกลายพันธุในระดับยีน โครโมโซม หรือดีเอ็นเอ และนำไปสู่โรคร้าย เช่น โรคมะเร็งต่างๆ [1] ในปัจจุบันงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์มีความก้าวหน้ามากขึ้น เทคนิคต่างๆ ในห้องปฏิบัติการได้ถูกพัฒนาเพื่อใช้ในการเฝ้าระวังผลกระทบต่อสารพันธุกรรม โดยเทคนิคในการตรวจสอบแบ่งเป็น 2 ระดับ คือ ระดับดีเอ็นเอ และระดับโครโมโซม สำหรับการศึกษานี้มุ่งเน้นการทดสอบในระดับโครโมโซมด้วยวิธีการตรวจสอบไมโครนิวเคลียส (Micronucleus test; MN test) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ตรวจสอบไมโครนิวเคลียสที่เกิดจากชิ้นส่วนโครโมโซม acentric หรือ โครโมโซมทั้งแท่งที่ไม่ได้รวมอยู่ในนิวเคลียสหลักระหว่างกระบวนการแบ่งเซลล์ การเพิ่มขึ้นของไมโครนิวเคลียสสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ความไม่เสถียรทางพันธุกรรม (Cytogenetic marker) [2]

มะแขว่นมีชื่อวิทยาศาสตร์ *Zanthoxylum myriacanthum* ชื่อพ้องวิทยาศาสตร์ *Fagara odorata* (H.Lév.) Hand. - Mazz., *Zanthoxylum odoratum* (H.Lév.) H.Lév. เป็นต้น [3] จัดอยู่ในวงศ์ Rutaceae มีชื่ออื่นๆ เช่น พริกหอม, ลูกระมาศ, กำจัดต้น (ในภาคกลาง) มะแข่น (ในภาคเหนือ) มีถิ่นกำเนิดในทวีปเอเชียตะวันออกฉียงใต้ ในประเทศไทยพบส่วนใหญ่ในภาคเหนือ ลักษณะทางพฤษศาสตร์เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงใหญ่ ลำต้นมีเปลือกสีเทาอมขาว กิ่งมีตุ่มหนาม ใบเรียงสลับแบบขนนกชั้นเดียว ใบย่อยจำนวน 18-20 ใบ ดอกเป็นช่อกระจายบริเวณปลายยอดหรือก้านซอกใบ ผลกลม มีรสเผ็ดซ่า กลิ่นหอมฉุนคล้ายผักชี สรรพคุณทางยาแผนโบราณ เช่น ขับลม ลดความดัน และแก้ท้องอืด [4] ในทางการแพทย์แผนจีนใช้ในการล้างพิษ [5] สรรพคุณและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ [6] ต้านไวรัส และต้านมะเร็ง เป็นต้น [7, 8] ข้อมูลทางโภชนาการของมะแขว่นจะประกอบด้วยใยอาหาร และสารอาหารต่างๆ โดยเฉพาะวิตามิน E ที่มีคุณสมบัติในการละลายในไขมันได้ดี [9] ผลมีองค์ประกอบทางเคมีหลายชนิด เช่น Coumarins, Scopoletin, Xanthoxyletin, Limonene และ Terpinen-4-ol เป็นต้น [10,11] นอกจากนี้มะแขว่นยังมีศักยภาพทางเศรษฐกิจสูงจากการส่งออกเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร น้ำหอม และยา กรมวิชาการเกษตรได้รายงานผลการสำรวจว่าในปี 2560 การส่งออก มะแขว่นเพื่อนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์มีปริมาณมากกว่า 20,000 กิโลกรัมแห้ง [12] จากข้อมูลข้างต้นมะแขว่นเป็นแหล่งวัตถุดิบที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย และมีสรรพคุณในการรักษาโรคมากมาย เป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาวิจัยเกี่ยวกับมะแขว่น โดยมีรายงานการศึกษาในด้านพิษวิทยาพบว่า สารสกัดใบและผลด้วยเอทานอลและเฮกเซนที่ความเข้มข้น 500-2000 mg/kg ไม่ก่อพิษเฉียบพลันในสัตว์ทดลอง [13] และสารสกัดมะแขว่นด้วย 60% เอทานอลมีค่า IC_{50} ต่อเซลล์ Human dermal fibroblast เท่ากับ 391.8 ± 0.01 µg/mL [14] แต่ถึงอย่างไรก็ตามข้อมูลความปลอดภัยเชิงลึกโดยเฉพาะผลต่อสารพันธุกรรมยังมีอย่างจำกัด การทดสอบไมโครนิวเคลียส (Micronucleus test) ตาม OECD Test guideline No.487 จึงมีความสำคัญในการประเมินความเสียหายต่อโครโมโซมหรือการกลายพันธุ์ที่อาจเพิ่มความเสี่ยงต่อมะเร็งหรือโรคทางพันธุกรรม โดยการดำเนินการภายใต้มาตรฐาน OECD GLP (Good laboratory practice) จะช่วยรับรองความถูกต้อง ความน่าเชื่อถือ และการยอมรับในระดับสากล การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของสารสกัดผล

Science34-N2.indd 78 23/4/2569 BE 14:43

มะแขว่น เพื่อสนับสนุนการใช้ประโยชน์อย่างปลอดภัย และเพิ่มมูลค่าเชิงเศรษฐกิจอย่างยั่งยืน

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 สารมาตรฐานและสารเคมี

อาหารเลี้ยงเซลล์ Roswell park memorial institute medium 1640 (RPMI 1640) จัดซื้อจาก American type culture collection (ATCC) (Manassas, VA, USA), Fetal bovine serum และ 100X Antibiotics-Antimycotics (Gibco ,Grand island, USA), 4-Nitroquinoline N-oxide (4NQNO, CAS No. 99-56-9), Colchicine (COLCH, CAS No. 64-86-8), Cyclophosphamide monohydrate (CP, CAS No. 6055-19-2), Cytochalasin B (Cyto B, CAS No. 14930-96-2) และ Dimethyl sulfoxide (DMSO, CAS No. 67-68-5)(Sigma-Aldrich,St. Louis, MO, USA), Potassium chloride (KCl, CAS No. 7447-40-7), Sodium chloride (NaCl, CAS No. 7647-14-5), Methanol (CAS No. 67-56-1) และ Ethanol (CAS No. 64-17-5) (Merck,Darmstadt, Germany), Propidium iodide (PI, CAS No. 25535-16-4) และ Fluor shield mounting medium with DAPI (Abcam, MA ,USA), S9 Enzyme (Moltox, NC, USA) และ Cofactor-I (Oriental yeast, Tokyo, Japan)

2.2 เซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์มนุษย์สายพันธุ์ลิมโฟบลาสต์ชนิด TK-6 (Human lymphoblastoid cell line, TK-6) จัดซื้อจาก American type culture collection (Manassas, VA, USA), ได้รับการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI-1640 ที่มี fetal bovine serum (FBS) ร้อยละ 10 และยาปฏิชีวนะเพนิซิลลิน/สเตรปโตมัยซิน ร้อยละ 1 เลี้ยงภายใต้สภาวะควบคุมที่อุณหภูมิ 37°C คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 และความชื้นมากกว่าร้อยละ 70

2.3 วัตถุดิบสมุนไพร

ผลมะแขว่น อายุประมาณ 4 เดือน เก็บในเดือนพฤศจิกายน 2567 ในพื้นที่ อ.ท่าวังผา จ.น่าน ตัวอย่างสมุนไพรได้รับการตรวจสอบ ระบุชื่อทางวิทยาศาสตร์ให้ถูกต้อง และเก็บตัวอย่าง Voucher specimen เลขที่ DMSC 5370 อ้างอิงที่พิพิธภัณฑ์พืช กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

2.4 ขั้นตอนการสกัดผลมะแขว่นและควบคุมคุณภาพทางเคมี

มะแขว่นจะเก็บเฉพาะส่วนของผล ทำความสะอาดด้วยการล้างน้ำ ผึ่งลมให้หมาด และนำไปอบแห้งในตู้อบลมร้อน อุณหภูมิประมาณ 50°C จากนั้นบดตัวอย่างเป็นผงละเอียด สกัดโดยวิธีการหมัก (Maceration) ด้วย 95% เอทานอล เขย่าสารที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำสารไปกรองหยาบด้วยถุงกรอง และกรองซ้ำด้วยกระดาษกรอง Whatman® no.1 ทำให้สารเข้มข้นขึ้นด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) และทำให้สารแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze drying) ได้สารสกัดแห้งผลมะแขว่น (ZM) ควบคุมคุณภาพทางเคมีด้วยเทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC) ประยุกต์ตามวิธีของ Shu et al. [15] โดยใช้ L-Asarinin (Chengdu bio purify phytochemicals, China) เป็นสารบ่งชี้ (Marker) เตรียมสารสกัด ZM จำนวน 10 mg ละลายในเมทานอล 1 mL จากนั้นเขย่าด้วยเครื่อง Vortex เพื่อให้ละลายเข้ากันอย่างสมบูรณ์ นำไปผ่านเครื่องอัลตราโซนิก (Sonication) เป็นเวลา 5 นาที และปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge เพื่อให้ได้สารละลายตัวอย่างที่พร้อมสำหรับการวิเคราะห์ และวิเคราะห์ HPLC ด้วยเครื่อง Waters acquity ultra performance LC ใช้คอลัมน์ Hypersil GOLD C18 (2.1 × 100 mm ขนาดอนุภาค 1.9 µm) ต่อเข้ากับคอลัมน์การ์ด Acquity UPLC BEH C18 (20 × 4 mm ขนาดอนุภาค 1.7 µm) ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (Mobile phase) ประกอบด้วย อะซีโตไนไตรล์ (เฟส A) และน้ำ

Science34-N2.indd 79 23/4/2569 BE 14:43

ผสมกรดฟอร์มิก 0.1% (เฟส B) ใช้การไล่ระดับความเข้มข้น (Gradient elution) โดยมีอัตราการไหลที่ 0.3 mL/min ดังที่แสดงใน Table 1 ปริมาตรที่ฉีดเข้าสู่ระบบ 1 µL ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 235 nm

2.5 ขั้นตอนการทดสอบการก่อไมโครนิวเคลียสของสารสกัดผลมะแขว่นในเซลล์เพาะเลี้ยง TK-6 (อ้างอิงวิธีจาก OECD test guideline No. 487 [16])

2.5.1 การลงเซลล์

นับเซลล์ TK-6 และตรวจสอบความมีชีวิตของเซลล์ด้วยเครื่องนับจำนวนเซลล์แบบอัตโนมัติ ทำการคำนวณเซลล์เพื่อใช้ ในการทดสอบ โดยลงเซลล์ใน 6-Well plate ที่ความหนาแน่น 2.4×10^5 เซลล์ต่อหลุม หลุมละ 2 mL บ่มเลี้ยงเซลล์ในตู้บ่มแบบ ใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ 37ºC คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 และความชื้นมากกว่าร้อยละ 70 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.5.2 การทดสอบสาร

นำเซลล์ที่บ่มครบ 24 ชั่วโมงมาปั่นตกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ปิเปตสารละลายข้างบนทิ้งเหลือแค่ตะกอนเซลล์ เติมสารทดสอบทั้ง 3 กลุ่มได้แก่ (1) กลุ่มทดสอบระยะสั้นในระบบที่มีเอนไซม์ S9 (สัมผัสสาร 4 ชั่วโมง) (2) กลุ่มทดสอบระยะสั้นในระบบที่ ไม่มีเอนไซม์ S9 (สัมผัสสาร 4 ชั่วโมง) และ (3) กลุ่มทดสอบระยะยาวในระบบที่ไม่มีเอนไซม์ S9 (สัมผัสสาร 24 ชั่วโมง) แต่ละกลุ่ม ถูกบ่มด้วยสารสกัดผลมะแขว่น (ZM) ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน ช่วงความเข้มข้นทดสอบได้จากผลการทดสอบนำร่องเบื้องต้น (Preliminary test) (Table 2) กลุ่มควบคุมใช้ Deionized water (10% v/v) เป็นกลุ่มควบคุมเชิงลบ และ DMSO (1% v/v) เป็นกลุ่มควบคุมตัวทำละลาย ขณะที่ CP, 4NQNO และ COLCH ใช้เป็นสารควบคุมเชิงบวกตามความเหมาะสมของแต่ละระบบ บ่มเลี้ยงไว้ในตู้บ่มเซลล์เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำตัวอย่างการทดสอบแบบระยะสั้น (Short-term) ทั้งที่มีและไม่มีเอนไซม์ ทำการปั่นตก และเติมสารละลายไซโทคาลาซิน บี (Cyto B) ความเข้มข้น 3 µg/mL สำหรับการทดสอบแบบระยะยาว (Long-term) ที่ไม่มีเอนไซม์กระตุ้น (S9) เติมสารละลายไซโทคาลาซิน บี (Cyto B) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 3 µg/mL นำตัวอย่างการทดสอบแบบระยะสั้น และระยะยาวบ่มต่อในตู้บ่มเซลล์เป็นระยะเวลา 20 ชั่วโมงก่อนทำการเก็บเกี่ยวเซลล์

Table 1 Mobile phase gradient conditions

Time (min)	Acetonitrile (%)	0.1 % Formic acid in water (%)
initial	6	94
5	25	75
8	25	75
9	55	45
13	55	45
14	70	30
16	70	30
17	6	94
18	6	6

Science34-N2.indd 80 23/4/2569 BE 14:43

2.5.3 การเก็บเกี่ยวเซลล์

นำตัวอย่างเซลล์ไปปั่นตกและปิเปตสารละลายทิ้งเหลือแค่ตะกอนเซลล์ เติมสารละลาย 0.56% KCl ปริมาตร 1 mL นำไปปั่นตก เติมสารละลาย Fixative solution 1 (Fixative solution 2: 0.9% NaCl; 1:1) ปริมาตร 1 mL บ่มที่อุณหภูมิ 4ºC เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปั่นตก จากนั้นเติมสารละลาย Fixative solution 2 (Methanol: Acetic acid; 5:1) ปริมาตร 1 mL บ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปั่นตก และดำเนินขั้นตอนนี้ซ้ำอีก 2 ครั้ง นำตัวอย่างแช่ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 คืน แล้วนำตัวอย่างย้อมสีด้วย Propidium iodide (PI) ฉีดลงบนสไลด์จากนั้นหยดสี Fluoroshield mounting medium with DAPI และปิดด้วยกระจกสไลด์ (Cover slip)

2.5.4 การวิเคราะห์ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity) และค่าจำนวนไมโครนิวเคลียสด้วยระบบ Meta systems

วิเคราะห์ค่า Cytokinesis block proliferation index (CBPI) ของการนับเซลล์จำนวนอย่างน้อย 500 เซลล์/ตัวอย่าง และตรวจจับไมโครนิวเคลียสที่เกิดขึ้น (Micronucleus frequency) จากเซลล์ที่มีสองนิวเคลียส (Binucleate cells) จำนวนอย่างน้อย 2,000 เซลล์/ตัวอย่าง โดยคำนวณค่า CBPI และร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ตามแนวทาง OECD test guideline no.487 [16] สมการ ดังนี้

$$CBPI = \frac{[\text{Number of mononucleate cells; } N_{MONO}] + 2 \times [\text{Number of binucleate cells; } N_{BI}] + 3 \times [\text{Number of multinucleate cells; } N_{MULTI}]}{[\text{Total number of cells; } N_{TOTAL}]}$$

N_{MONO} = จำนวนเซลล์ที่มี 1 นิวเคลียส (ยังไม่แบ่งเซลล์)
N_{BI} = จำนวนเซลล์ที่มี 2 นิวเคลียส (ผ่านการแบ่ง 1 ครั้ง)
N_{MULTI} = จำนวนเซลล์ที่มีมากกว่า 2 นิวเคลียส
N_{TOTAL} = จำนวนเซลล์ทั้งหมดที่นับ

$$\%\text{Cytotoxicity} = 100 - 100 \times \frac{(\text{CBPI treated} - 1; CBPI_T - 1)}{(\text{CBPI control} - 1; CBPI_C - 1)}$$

$CBPI_T$ = ค่า CBPI ของกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบ
$CBPI_C$ = ค่า CBPI ของกลุ่มควบคุม (Control)

**เกณฑ์ในการกำหนดความเข้มข้นสูงสุดของการทดสอบควรอยู่ในระดับที่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ประมาณ 55 ± 5% [16]

Science34-N2.indd 81 23/4/2569 BE 14:43

2.5.5 การวิเคราะห์ผลและสถิติ

ข้อมูลความถี่ร้อยละของไมโครนิวเคลียส (%MN) ถูกนำเสนอในรูปแบบค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean ± SD) จากการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ (n = 3) และการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยการเกิดไมโครนิวเคลียสของกลุ่มทดสอบต่างๆ เทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบ วิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (p value < 0.05) ด้วยวิธีของ Tukey HSD โดยใช้ซอฟแวร์ Graph pad prism version 9.5.1 (CA, USA)

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 ผลการสกัดผลมะแขว่นและการควบคุมคุณภาพทางเคมี

สารสกัดผลมะแขว่นสกัดด้วย 95% เอทานอล ได้สารสกัดที่มีลักษณะกึ่งแข็งกึ่งเหลวสีน้ำตาล ได้ %Yield เท่ากับ 14.32% และผลการวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่า L- Asarinin ที่มีอยู่ในสารสกัดผลมะแขว่นมีค่าเท่ากับ 0.040 ± 0.001% w/w โครมาโทแกรมของสารสกัดมะแขว่นที่มี L- Asarinin (Figure 1)

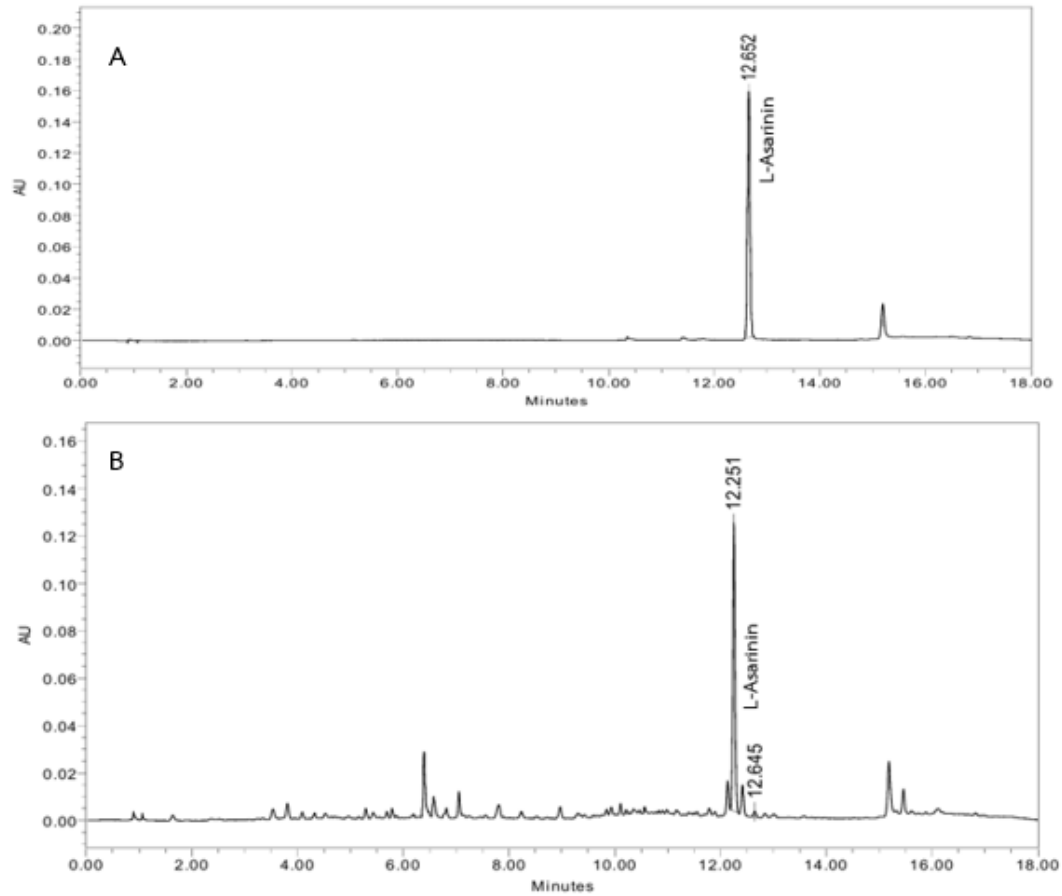


Figure 1 HPLC chromatograms of (A) 0.01 mg/mL L-asarinin and (B) 1.00 mg/mL ZM extract, each with an injection volume of 1 µL, detected at 235 nm.

Science34-N2.indd 82 23/4/2569 BE 14:43

3.2 ผลการทดสอบนำร่องเบื้องต้น (Preliminary test)

ในการทดสอบการก่อไมโครนิวเคลียสของสารสกัดผลมะแขว่นในครั้งนี้ ได้ดำเนินการทดสอบนำร่องเบื้องต้นเพื่อหาช่วง ความเข้มข้นเริ่มต้นที่มีความเป็นพิษอยู่ในช่วงที่กำหนด (55 ± 5%) ตามหลักเกณฑ์ OECD Test guideline no.487 ช่วงความเข้มข้นสำหรับการทดสอบหลักถูกเลือกหรือประเมินจากผลการทดสอบนำร่อง โดยการทดสอบแบบระยะสั้นในระบบที่มีเอนไซม์ S9 ทดสอบที่ความเข้มข้น 25, 50, 100, 200, และ 250 µg/mL ซึ่งความเข้มข้นเริ่มต้นที่เลือก คือ 200 µg/mL มีค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ (%Cytotoxicity) เท่ากับ 46.48 ± 0.15% การทดสอบแบบระยะสั้นในระบบที่ไม่มีเอนไซม์ S9 ทดสอบที่ความเข้มข้น 25, 50, 100, 125, 200 µg/mL โดยทำการประเมินช่วงความเข้มข้นระหว่าง 125–200 µg/mL เนื่องจากที่ความเข้มข้นที่ 125 µg/mL ค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ (%Cytotoxicity) ต่ำกว่าเกณฑที่กำหนดและความเข้มข้น 200 µg/mL สูงกว่าเกณฑ์ที่กำหนด จึงเลือกความเข้มเริ่มต้นที่ใช้ คือ 150 µg/mL และการทดสอบแบบระยะยาวในระบบที่ไม่มีเอนไซม์ S9 ทดสอบที่ความเข้มข้น 70, 75, 80, 100, 125 µg/mL พบว่าทุกระดับความเข้มข้นมีค่าความเป็นพิษเกินเกณฑ์ที่กำหนด จึงกำหนดความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 60 µg/mL สำหรับการทดสอบหลัก (Table 2)

3.3 ผลการทดสอบการก่อไมโครนิวเคลียสของสารสกัดผลมะแขว่น

3.3.1 ผลการทดสอบการก่อไมโครนิวเคลียสของสารสกัดผลมะแขว่นแบบระยะสั้นในระบบที่มีเอนไซม์ S9 (Short - term with S9)

การศึกษาการก่อไมโครนิวเคลียสของสารสกัดผลมะแขว่นที่สกัดด้วย 95% เอทานอล ในเซลล์ TK-6 แบบระยะสั้นในระบบที่มีเอนไซม์ S9 ขนาดทดสอบ 5 ระดับ ได้แก่ 12.5, 25, 50, 100 และ 200 µg/mL แสดงค่าร้อยละของการเกิดไมโครเคลียส เท่ากับ 1.33 ± 0.38, 1.52 ± 0.68, 0.73 ± 0.16, 0.82 ± 0.12 และ 1.44 ± 0.32 ตามลำดับ (Table 3) พบว่าทุกระดับความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบในครั้งนี้แสดงการเกิดไมโครนิวเคลียสไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ และการประเมินค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ (%Cytotoxicity) แสดงให้เห็นว่าระดับความเป็นพิษต่อเซลล์ของความเข้มข้นสูงสุดอยู่ในช่วงที่เหมาะสมตามหลักเกณฑ์ของ OECD Test guideline no.487 [16]

3.3.2 ผลการทดสอบการก่อไมโครนิวเคลียสของสารสกัดผลมะแขว่นแบบระยะสั้นในระบบที่ไม่มีเอนไซม์ S9 (Short - term without S9)

การศึกษาการก่อไมโครนิวเคลียสของสารสกัดผลมะแขว่นที่สกัดด้วย 95% เอทานอล ในเซลล์ TK-6 แบบระยะสั้นในระบบที่ไม่มีเอนไซม์ S9 ที่ขนาดทดสอบ 5 ระดับ ได้แก่ 25, 50, 75, 100 และ 150 µg/mL แสดงค่าร้อยละความถี่ของการเกิดไมโครเคลียส เท่ากับ 1.09 ± 0.24, 0.93 ± 0.21, 1.00 ± 0.11, 0.80 ± 0.33 และ 2.57 ± 0.92 ตามลำดับ (Table 4) พบว่าทุกระดับความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบในครั้งนี้แสดงความถี่ในการเกิดไมโครนิวเคลียสไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ ยกเว้นที่ระดับความเข้มข้น 150 µg/mL แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และการประเมินค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ (%Cytotoxicity) แสดงให้เห็นว่าระดับความเป็นพิษต่อเซลล์ของความเข้มข้นสูงสุดอยู่ในช่วงที่เหมาะสมตามหลักเกณฑ์ของ OECD Test guideline no.487 [16]

Science34-N2.indd 83 23/4/2569 BE 14:43

Table 2 Preliminary cytotoxicity test results for dose selection

กลุ่มทดสอบ	สารทดสอบ	ความเข้มข้น	%Cytotoxicity Mean ± SD (n = 3)
Short-term with S9	Negative control (DI)	10% v/v	0 ± 0.00
	Solvent control (DMSO)	1% v/v	0 ± 0.00
	CP	10 µg/mL	52.07 ± 0.83
	TI1	25 µg/mL	6.10 ± 2.34
	TI2	50 µg/mL	6.94 ± 1.47
	TI3	100 µg/mL	10.82 ± 2.10
	TI4	200 µg/mL	46.48 ± 0.15
	TI5	250 µg/mL	67.38 ± 6.32
Short-term without S9	Negative control (DI)	10% v/v	0 ± 0.00
	Solvent control (DMSO)	1% v/v	0 ± 0.00
	4NQNO	0.03 µg/mL	15.69 ± 4.89
	COLCH	0.02 µg/mL	25.30 ± 2.95
	TI1	25 µg/mL	3.32 ± 1.36
	TI2	50 µg/mL	9.69 ± 1.28
	TI3	100 µg/mL	24.23 ± 0.90
	TI4	125 µg/mL	26.11 ± 0.33
	TI5	200 µg/mL	65.03 ± 0.78
Long-term without S9	Negative control (DI)	10% v/v	0 ± 0.00
	Solvent control (DMSO)	1% v/v	0 ± 0.00
	4NQNO	0.03 µg/mL	17.32 ± 0.43
	COLCH	0.02 µg/mL	4.69 ± 2.77
	TI1	70 µg/mL	65.42 ± 3.29
	TI2	75 µg/mL	71.82 ± 5.77
	TI3	80 µg/mL	81.29 ± 0.49
	TI4	100 µg/mL	77.91 ± 0.65
	TI5	125 µg/mL	75.66 ± 0.48

DI: Deionize water used as negative control, DMSO: Dimethyl Sulfoxide used as solvent control.

CP: Cyclophosphamide monohydrate used as positive control (clastogen) with S9 enzyme.

4NQNO: 4-Nitroquinoline N-oxide used as positive control (clastogen) without S9 enzyme.

COLCH: Colchicine used as positive control (aneugen) without S9 enzyme.

TI: *Z. myriacanthum* extract (ZM)

SD: Standard deviation

Science34-N2.indd 84 23/4/2569 BE 14:43

Table 3 Cytotoxicity and micronucleus induction of ZM extract on TK6 cells following short-term exposure with S9 metabolic activation

Short-term with S9			
สารทดสอบ	**ความเข้มข้น**	**%Cytotoxicity Mean ± SD (n = 3)**	**%MN Mean ± SD (n = 3)**
Negative control (DI)	10% v/v	0 ± 0.00	1.28 ± 0.28
Solvent control (DMSO)	1% v/v	0 ± 0.00	1.21 ± 0.17 ^{ns}
CP	10 µg/mL	54.27 ± 0.08	2.23 ± 0.31*
TI1	12.5 µg/mL	3.19 ± 0.86	1.33 ± 0.38 ^{ns}
TI2	25 µg/mL	6.10 ± 2.34	1.52 ± 0.68 ^{ns}
TI3	50 µg/mL	6.94 ± 1.47	0.73 ± 0.16 ^{ns}
TI4	100 µg/mL	10.93 ± 2.10	0.82 ± 0.12 ^{ns}
TI5	200 µg/mL	47.04 ± 0.64	1.44 ± 0.32 ^{ns}

%MN: Percentage of cells containing micronuclei compared to the total number of cells scored.

DI: Deionize water used as negative control, DMSO: used as solvent control.

CP: Cyclophosphamide monohydrate used as positive control (clastogen) with S9 enzyme.

4NQNO: 4-Nitroquinoline N-oxide used as positive control (clastogen) without S9 enzyme.

COLCH: Colchicine used as positive control (aneugen) without S9 enzyme.

TI: *Z. myriacanthum* extract (ZM)

SD: Standard deviation

ns: Not significant differences compare with the negative control (p value < 0.05).

*: Significant differences compare with the negative control (p value ≤0.05).

Science34-N2.indd 85 23/4/2569 BE 14:43

Table 4 Cytotoxicity and micronucleus induction of ZM extract on TK6 cells following short-term exposure without S9 metabolic activation

Short-term without S9			
สารทดสอบ	**ความเข้มข้น**	**%Cytotoxicity** Mean ± SD (n = 3)	**%MN** Mean ± SD (n = 3)
Negative control (DI)	10% v/v	0 ± 0.00	1.12 ± 0.20
Solvent control (DMSO)	1% v/v	0 ± 0.00	1.11 ± 0.18^{ns}
4NQNO	0.03 µg/mL	24.29 ± 11.69	2.49 ± 0.26*
COLCH	0.02 µg/mL	27.30 ± 7.29	4.11 ± 2.08*
TI1	25 µg/mL	6.37 ± 1.32	1.09 ± 0.24^{ns}
TI2	50 µg/mL	16.32 ± 0.16	0.93 ± 0.21^{ns}
TI3	75 µg/mL	14.67 ± 0.57	1.00 ± 0.11^{ns}
TI4	100 µg/mL	27.93 ± 1.23	0.80 ± 0.33^{ns}
TI5	150 µg/mL	50.00 ± 3.02	2.57 ± 0.92*

%MN: Percentage of cells containing micronuclei compared to the total number of cells scored.

DI: Deionized water used as negative control, DMSO: used as solvent control.

4NQNO: 4-Nitroquinoline N-oxide used as positive control (clastogen) without S9 enzyme e.

COLCH: Colchicine used as a positive control (aneugen) without S9 enzyme.

TI: *Z. myriacanthum* extract (ZM)

SD: Standard deviation

ns: Not significant differences compared with the negative control (p value < 0.05).

*: Significant differences compared with the negative control (p value ≤0.05).

Science34-N2.indd 86 23/4/2569 BE 14:43

3.3.3 ผลการทดสอบการก่อไมโครนิวเคลียสของสารสกัดผลมะแขว่นแบบระยะยาวในระบบที่ไม่มีเอนไซม์ S9 (Long - term without S9)

การศึกษาการก่อไมโครนิวเคลียสของสารสกัดผลมะแขว่นที่สกัดด้วย 95% เอทานอล ในเซลล์ TK-6 แบบระยะยาวในระบบที่ไม่มีเอนไซม์ S9 ที่ขนาดทดสอบ 5 ระดับ ได้แก่ 6.25, 12.5, 25, 50 และ 60 µg/mL แสดงค่าร้อยละความถี่ของการเกิด ไมโครเคลียส เท่ากับ 1.30 ± 0.43, 1.38 ± 0.58, 1.15 ± 0.58, 1.15 ± 0.43 และ 1.49 ± 0.32 ตามลำดับ (Table 5) พบว่าทุกระดับความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบในครั้งนี้แสดงความถี่ในการเกิดไมโครนิวเคลียสไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ และการประเมินค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ (%Cytotoxicity) ในการทดสอบแสดงให้เห็นว่าระดับความเป็นพิษต่อเซลล์อยู่ในช่วงที่เหมาะสมตามหลักเกณฑ์ของ OECD Test guideline no.487 [16] ยกเว้นความเข้มข้น 60 µg/mL ให้ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์สูงกว่าเกณฑ์ที่กำหนด เท่ากับ 64.42 ± 7.26%

Table 5 Cytotoxicity and micronucleus induction of ZM extract on TK6 cells following long-term exposure without S9 metabolic activation.

Long-term without S9			
สารทดสอบ	**ความเข้มข้น**	**% Cytotoxicity Mean ± SD (n = 3)**	**% MN Mean ± SD (n = 3)**
Negative control (DI)	10% v/v	0 ± 0.00	1.18 ± 0.19
Solvent control (DMSO)	1% v/v	0 ± 0.00	1.28 ± 0.15^{ns}
4NQNO	0.03 µg/mL	29.40 ± 8.41	2.71 ± 0.33*
COLCH	0.005 µg/mL	6.43 ± 0.13	3.64 ± 1.03*
TI1	6.25 µg/mL	4.91 ± 0.79	1.30 ± 0.43^{ns}
TI2	12.5 µg/mL	10.46 ± 0.43	1.38 ± 0.58^{ns}
TI3	25 µg/mL	20.19 ± 1.51	1.15 ± 0.58^{ns}
TI4	50 µg/mL	53.75 ± 0.26	1.15 ± 0.43^{ns}
TI5	60 µg/mL	64.42 ± 7.26	1.49 ± 0.32^{ns}

%MN: Percentage of cells containing micronuclei compared to the total number of cells scored.

DI: Deionize water used as negative control, DMSO: used as solvent control.

4NQNO: 4-Nitroquinoline N-oxide used as positive control (clastogen) without S9 enzyme.

COLCH: Colchicine used as positive control (aneugen)without S9 enzyme.

TI: *Z. myriacanthum* extract (ZM)

SD: Standard deviation

ns: Not significant differences compare with negative control (p value < 0.05).

*: Significant differences compare with negative control (p value ≤0.05).

Science34-N2.indd 87 23/4/2569 BE 14:43

4. วิจารณ์

มะแขว่นเป็นพืชที่มีการใช้ในอาหารและยาพื้นบ้านหลายภูมิภาค เนื่องจากมีสารประกอบทางเคมีหลากหลาย เช่น Lignans, Alkaloids และ Essential oils ซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายด้าน การศึกษานี้มีการควบคุมคุณภาพทางเคมีของสารสกัดผลมะแขว่น โดยใช้สาร L- Asarinin เป็นสารมาตรฐาน วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC พบว่าสารสกัดจากผลมะแขว่นมีปริมาณ L- Asarinin เท่ากับ 0.040 ± 0.001% w/w จากงานวิจัยอื่นพบการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดเปลือกมะแขว่นจากปิโตรเลียมอีเทอร์ที่เป็นสายพันธุ์เดียวกันโดยใช้เทคนิค GC-MS พบ Asarinin ปริมาณ 6.48% ขององค์ประกอบทั้งหมด [7] ถึงแม้พบปริมาณ L- Asarinin ในผลของมะแขว่นต่ำกว่าซึ่งต่างจากรายงานที่ใช้ GC-MS กับเปลือก ความแตกต่างนี้น่าจะมาจากความหลากหลายของส่วนพืชที่ใช้ วิธีการสกัดและการวิเคราะห์ (Absolute vs relative quantification) แต่สามารถยืนยันได้ว่าในพืชมะแขว่นมีสาร L- Asarinin ทั้งในส่วนเปลือกและเมล็ด รวมถึงเพื่อเป็นข้อมูลการพัฒนา Multi-marker fingerprint เพื่อรองรับการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์จากมะแขว่นอย่างมีประสิทธิผลในอนาคต และจากงานวิจัยข้างต้นยังพบว่าสาร L- Asarinin ที่พบในเปลือกมีฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วย [7] จึงเป็นไปได้ว่า L- Asarinin เป็นสารบ่งชี้ทางพฤกษเคมี (Phytochemical marker) ที่สำคัญต่อฤทธิ์ดังกล่าว นอกจากนี้สาร L- Asarinin ที่เป็น Lignan พบข้อมูลจากการประเมินด้วยระบบ *In silico* ว่าเป็น Mutagen-positive (Ames mutagenesis: positive, ความน่าจะเป็นประมาณ 66%) และ Micronuclear positive (ความน่าจะเป็นประมาณ 63%) [17] ถึงแม้เป็นเพียงการคาดการณ์จากโครงสร้างโมเลกุล (Prediction) แต่ชี้ให้เห็นว่า L- Asarinin เป็นสารที่ควรพิจารณาในการใช้เป็นสารควบคุมคุณภาพในทดสอบครั้งนี้

การศึกษาการเกิดไมโครนิวเคลียสของสารสกัดผลมะแขว่นได้ดำเนินการให้สอดคล้องกับแนวทาง OECD test guideline no.487 การทดสอบครั้งนี้เลือกใช้เซลล์ลิมโฟบลาสต์ของมนุษย์ชนิด TK-6 ซึ่งมีความเสถียรทางพันธุกรรมและมีระบบซ่อมแซม DNA ที่สมบูรณ์ ส่งผลให้สามารถตรวจพบความผิดปกติของโครโมโซมได้อย่างแม่นยำ [18] และใช้การวิเคราะห์ภาพแบบอัตโนมัติด้วยระบบ Metafer 5 [19,20] เพื่อให้สามารถวิเคราะห์ข้อมูลในปริมาณมากภายในระยะเวลาอันสั้น โปรแกรมดังกล่าวเป็นที่ยอมรับในระดับนานาชาติ ทำให้ผลการศึกษามีความน่าเชื่อถือ สามารถนำไปประกอบการประเมินความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ในระดับสากลได้อย่างมีประสิทธิภาพ และการทดสอบการเกิดไมโครนิวเคลียสของสารสกัดผลมะแขว่นในครั้งนี้ พบว่าการเกิดไมโครนิวเคลียสของสารสกัดผลมะแขว่นที่สกัดด้วยเอทานอล 95% ในเซลล์ TK-6 รูปแบบการทดสอบแบบระยะสั้นทั้งที่มีและไม่มีเอนไซม์ S9 รวมถึงการทดสอบแบบระยะยาวที่ไม่มีเอนไซม์ S9 พบความถี่ของการเกิดไมโครนิวเคลียส (MN frequency) ในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ (Negative control) ในทุกช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบ ยกเว้นกลุ่มทดสอบแบบระยะสั้นในระบบที่ไม่มีเอนไซม์ S9 ที่ความเข้มข้นสูงสุดคือ 150 µg/mL พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) แต่เมื่อพิจารณาตามเกณฑ์ของ OECD Test guideline no.487 ซึ่งกำหนดว่าการพิจารณาผลเป็นบวก (Positive result) ต้องเข้าเกณฑ์อย่างใดอย่างหนึ่ง ได้แก่ (1) มีการเพิ่มขึ้นของความถี่ MN อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติมากกว่าหนึ่งความเข้มข้นขึ้นไปเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ (2) มีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นเป็น Dose-response และ (3) ค่าที่เพิ่มขึ้นต้องเกินช่วงค่าพื้นฐานของห้องปฏิบัติการภายใต้ระดับความเป็นพิษที่ยอมรับได้ (55 ± 5%) [16] ซึ่งผลการทดสอบไม่เข้าเกณฑ์ตามที่กำหนด จึงสามารถสรุปได้ว่าสารสกัดผลมะแขว่นไม่ก่อไมโครนิวเคลียสภายใต้เงื่อนไขการทดสอบนี้ และการประเมินค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ (%Cytotoxicity) ในการทดสอบแต่ละเงื่อนไขแสดงให้

Science34-N2.indd 88 23/4/2569 BE 14:43

เห็นว่าระดับความเป็นพิษต่อเซลล์ของความเข้มข้นสูงสุดอยู่ในช่วงที่เหมาะสมตามหลักเกณฑ์ของ OECD Test guideline no.487 ยกเว้นความเข้มข้นสูงสุดของการทดสอบแบบระยะยาวที่แสดงค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์เกินกว่าเกณฑ์ที่กำหนด จึงไม่ถูกนำมาประเมินการก่อไมโครนิวเคลียสของสารสกัด อย่างไรก็ตามผลการทดสอบยังครอบคลุมตามหลักเกณฑ์ที่กำหนดไว้ใน OECD Test guideline no.487 ซึ่งกำหนดไว้อย่างน้อยต้องมี 3 ระดับความเข้มข้นที่สามารถประเมินผลการก่อไมโครนิวเคลียส ซึ่งการเลือกใช้ความเข้มข้นดังกล่าวเป็นไปเพื่อให้ครอบคลุมขอบเขตสูงสุดของความเป็นพิษที่ยังสามารถประเมินผลได้อย่างเหมาะสมและเพื่อให้แน่ใจว่าสารสกัดไม่มีแนวโน้มก่อการกลายพันธุ์แม้ในสภาวะที่เซลล์มีความไวต่อสาร การคงความเข้มข้นที่มีความเป็นพิษมากกว่า 55 ± 5% จึงเป็นแนวทางที่ใช้ในเชิงวิชาการเพื่อรองรับความแปรผันของการตอบสนองต่อเซลล์แต่ละระบบ และยังสอดคล้องกับหลักการของการประเมินผลอย่างรอบด้านตามแนวทาง OECD โดยไม่ส่งผลกระทบต่อความน่าเชื่อถือของผลการประเมินความปลอดภัยทางพันธุกรรมเบื้องต้น และงานวิจัยของมะแขว่นในปัจจุบันเกี่ยวกับความเป็นพิษด้านพันธุกรรมยังมีอยู่น้อย โดยมีการศึกษาการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดจากเมล็ดและผนังผลของสารสกัดมะแขว่น (*Z. limonella*) ที่สกัดด้วย DMSO ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีไนไตรท์ต่อเชื้อ *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 โดยวิธีทดสอบเอมส์ พบว่าสารสกัดจากเมล็ดไม่มีฤทธิ์การก่อกลายพันธุ์ในสภาวะที่มีหรือไม่มีไนไตรท์กับเชื้อ *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ในทางกลับกันสารสกัดจากผนังผลพบว่ามีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ในสภาวะที่มีไนไตรท์ต่อเชื้อ *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98 [21] และมีงานวิจัยการศึกษาการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดผลมะแขว่น (*Z. myriacanthum*) ที่สกัดด้วย 95% เอทานอลด้วยวิธีเอมส์ต่อเชื้อแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ดำเนินการทดสอบตามหลักการ OECD Test guideline no.471 พบว่าสารสกัดผลมะแขว่นไม่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ต่อเชื้อแบคทีเรียทั้งในระบบที่มีและไม่มีเอนไซม์กระตุ้น (S9) [22] จากข้อมูลงานวิจัยข้างต้นจะเห็นได้ว่าสายพันธุ์ที่แตกต่างกันแสดงกันการก่อกลายพันธุ์ที่ต่างกัน อย่างไรก็ตามควรพิจารณาร่วมกับการทดสอบอื่นๆ เพื่อประเมินความเสี่ยงโดยรวมในระดับโมเลกุล และการศึกษาความปลอดภัยในสัตว์ทดลองของสารสกัดมะแขว่น (*Z. limonella*) ที่สกัดด้วยน้ำ โดยทดสอบพิษเฉียบพลันในหนูไมซ์สายพันธุ์ ICR ตามวิธี OECD Test guideline no.425 พบว่าสารสกัดมะแขว่นที่ความเข้มข้น 5,000 mg/kg ไม่แสดงความเป็นพิษและไม่แสดงอาการผิดปกติ ตลอดระยะเวลา 14 วัน แสดงให้เห็นว่า LD_{50} มีค่ามากกว่า 5,000 mg/kg [23]

จากผลการทดลองในครั้งนี้ ร่วมกับข้อมูลการศึกษาที่มีอยู่ในปัจจุบัน พบว่าข้อมูลด้านความปลอดภัยของมะแขว่นยังมีอยู่ค่อนข้างจำกัด โดยเฉพาะในระดับโมเลกุลและในสัตว์ทดลองของสายพันธุ์ *Z. myriacanthum* ซึ่งมะแขว่นเป็นพืชที่มีความหลากหลายทางสายพันธุ์และถูกนำมาใช้ในหลายรูปแบบ ความแตกต่างของสายพันธุ์มีผลต่อองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกัน จึงควรเป็นปัจจัยสำคัญที่นำมาพิจารณาในการประเมินความปลอดภัยของสมุนไพรดังกล่าว การศึกษานี้เลือกใช้มะแขว่นสายพันธุ์ *Z. myriacanthum* เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่พบได้มากในประเทศไทย และมีการนำมาใช้ในการประกอบอาหาร นอกจากนี้มีการส่งออกไปยังต่างประเทศเพื่อใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่างๆ การวิจัยนี้จึงเป็นส่วนหนึ่งของการประเมินความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม (Genotoxicity) เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนาเภสัชภัณฑ์หรือเวชสำอางจากสมุนไพรดังกล่าว โดยเฉพาะในกรณีการใช้สารสกัดเอทานอลเข้มข้นซึ่งมีความเสี่ยงในการดูดซึมเข้าสู่ร่างกายผ่านผิวหนังหรือเยื่อบุ เช่น เครื่องสำอาง หรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ข้อมูลที่ได้อาจนำไปสู่การศึกษาต่อยอดเพื่อแยกสารออกฤทธิ์และทดสอบในบริบทของการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง หรือการพัฒนาเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านอื่นๆ นอกจาก

Science34-N2.indd 89 23/4/2569 BE 14:43

นี้ ผลการศึกษานี้ยังสามารถใช้เป็นข้อมูลเปรียบเทียบเพื่อคัดเลือกวิธีการสกัดสมุนไพรที่มีความปลอดภัยสูงต่อเซลล์สำหรับการพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพ โดยอาจพิจารณาทำการศึกษา สารสกัดด้วยน้ำเพิ่มเติม เพื่อสะท้อนรูปแบบการบริโภคของประชาชนทั่วไป และใช้เป็นข้อมูลประกอบการกำหนดมาตรฐาน การควบคุมคุณภาพและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์สมุนไพรอย่างสมดุล ทั้งนี้ ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในกลไกอื่นในหลอดทดลอง เช่น การทดสอบการกลายพันธุ์ในเซลล์ (*In Vitro* mutagenicity testing) การทดสอบความเป็นพิษต่อโครโมโซมในสัตว์ทดลอง (*In Vivo* chromosomal aberration test) รวมถึงการศึกษาระยะยาวในสัตว์ทดลอง เพื่อสนับสนุนข้อมูลเชิงวิทยาศาสตร์ที่มีความถูกต้องและน่าเชื่อถือ ซึ่งจะช่วยยกระดับมาตรฐานความปลอดภัย การคุ้มครองผู้บริโภค และเพิ่มศักยภาพของพืชมะแขว่นในการส่งออกหรือการขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์ในอนาคต

5. สรุป

ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากผลมะแขว่น (ZM) ในชุดทดสอบ Short-term exposure ทั้งที่มีและไม่มีเอนไซม์ S9 ความถี่ของการเกิดไมโครนิวเคลียส (MN) ไม่แตกต่างเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และความเป็นพิษต่อเซลล์อยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับ สำหรับกลุ่ม Long-term exposure แม้ความถี่ของการเกิดไมโครนิวเคลียส (MN) ไม่แตกต่างเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้นสูงสุดเกินเกณฑ์ที่กำหนดตาม OECD Test guideline no.487 สะท้อนให้เห็นว่าการสัมผัสสารอย่างต่อเนื่องก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่าการสัมผัสระยะสั้น แต่สามารถบ่งชี้ได้ว่า แม้ในสภาวะการสัมผัสสารแบบเฉียบพลันและสัมผัสแบบสะสม สารสกัดดังกล่าวยังคงไม่มีแนวโน้มการก่อให้เกิดไมโครนิวเคลียส การศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงความปลอดภัยต่อระบบพันธุกรรมของสารสกัดจากผลมะแขว่น อย่างไรก็ตามการบริโภคในขนาดหรือปริมาณที่สูงเกินไป อาจส่งผลต่อสุขภาพในระยะยาว และที่สำคัญต้องคำนึงถึงการเลือกใช้สมุนไพรให้ถูกต้น ถูกส่วน และถูกต้องตรงตามสายพันธุ์ เนื่องจากพืชในสกุล *Zanthoxylum* มีความหลากหลายทางชีวภาพมากกว่า 250 ชนิดทั่วโลก อาจส่งผลต่อความแตกต่างขององค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อเสริมสร้างความมั่นใจด้านความปลอดภัย และเป็นแนวทางสำหรับการขอขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์สมุนไพรต่อไป

6. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ประจำปี 2568 ขอขอบพระคุณห้องปฏิบัติการพิพิธภัณฑ์พืชในจัดทำข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ ภก. เดช มนตรี วจีสุนทร ห้องปฏิบัติการเภสัชวิทยาในการควบคุมคุณภาพทางเคมีของสารสกัด และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการพิษวิทยาทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัยเป็นอย่างดี

7. References

[1] Vainio, H., Magee, P.N., McGregor, D.B. and McMichael, A.J. (Eds.), 1992, Mechanisms of Carcinogenesis in Risk Identification, IARC Scientific Publication No. 116, International Agency for Research on Cancer, Lyon.

[2] Fenech, M., 2000, The *in vitro* micronucleus technique, Mutat. Res. 455(1-2): 81-95.

[3] Plants of the World Online 2025, Facilitated by the Royal Botanic Gardens Kew, Available Source: https://powo.science.kew.org/, May 13, 2025.

Science34-N2.indd 90 23/4/2569 BE 14:43

[4] Dai, W., Zhang, L., Dai, L., Tian, Y., Ye, X., Wang, S. and Wang, Q., 2023, Comparative analysis of chemical composition of *Zanthoxylum myriacanthum* branches and leaves by GC-MS and UPLC-Q-Orbitrap HRMS, and evaluation of their antioxidant activities, Molecules. 28: 5631.

[5] Department of Agricultural Extension, 2020, Final Research Report on the Completed Experiment, Research Report, Department of Agricultural Extension, Bangkok, 45 p. (in Thai).

[6] Li, R., Yang, J.J., Shi, Y.X., Zhao, M., Ji, K.L., Zhang, P., Xu Y.K. and Hu, H.B., 2014, Chemical composition, antimicrobial and anti-inflammatory activities of the essential oil from Maqian (*Zanthoxylum myriacanthum* var. pubescens) in Xishuangbanna, SW China, J. Ethnopharmacol. 158: 43-48.

[7] Zhang, H.L., Gan, X.Q., Fan, Q.F., Yang, J.J., Zhang, P., Hu, H.B. and Song, Q.S., 2017, Chemical constituents and anti-inflammatory activities of Maqian (*Zanthoxylum myriacanthum* var. pubescens) bark extracts, Sci. Rep. 7: 45805.

[8] Lu, Q., Luo, S., Shi, Z., Yu, M., Guo, W. and Li, C., 2022, Nitidine chloride, a benzophenanthridine alkaloid from *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC., exerts multiple beneficial properties, especially in tumors and inflammation-related diseases, Front. Pharmacol. 13: 1046402.

[9] Chaisakul, P. and Boonprong, S., 2016, Nutritional composition and antioxidant activity of *Zanthoxylum limonella* essential oil, J. Med. Plants Res. 10: 135-141.

[10] Yang, J., Zhao, L., Li, R., Yan, Y., Yin, J., Dai, Q., Guo, X., Li, W., Li, Y., Liu, M., Ren, X., Yang, X., Hu, H., Zhong, W., Cao, R. and Li, S., 2022, *In vitro* and *in vivo* antiviral activity of Maqian (*Zanthoxylum myriacanthum* var. pubescens) essential oil and its major constituents against strains of influenza virus, Ind. Crops Prod. 177: 114524.

[11] Okagu, I.U., Ndefo, J.C., Aham, E.C. and Udenigwe, C.C., 2021, *Zanthoxylum* species: A comprehensive review of traditional uses, phytochemistry, pharmacological and nutraceutical applications, Molecules. 26: 4023.

[12] Posawang, S., Sornsuparb, B., Intachub, P. and Tongkhaw, K., 2019, Research on Species Diversity and Identification of Indigenous Plants Genus *Zanthozylum* (Rutaceae), Department of Agriculture, pp. 1-14 (in Thai)

[13] Barkatullah, U., Ibrar, M. and Muhammad, N., 2011, Evaluation of *Zanthoxylum armatum* DC for *in-vitro* and *in-vivo* biological activities, Afr. J. Pharm. Pharmacol. 5: 1170-1178.

[14] Laovitthayanggoon, S., Potduang, B., Ketmanee, N. and Banchonglikitkul, C., 2013, Cytotoxic evaluation of a fruit extract from *Zanthoxylum limonella* in

Science34-N2.indd 91 23/4/2569 BE 14:43

human dermal fibroblast cell line using MTT assay, Thai J. Pharm. Sci. 38: 103-105.

[15] Shu, L., Zhang, S., Qiu, H., Yao, Y., Liu, S., Qian, J., Chen, S., Zhao, Q. and Li, Y., 2024, Rapid classification and identification of chemical components in three different *Zanthoxylum* species by ultra-high-performance-liquid chromatography quadrupole-orbitrap-mass spectrometry, J. Sep. Sci. 47: e2300670.

[16] *In Vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test No.487 2025, OECD Guideline for Testing of Chemicals. Available Source: https://www.oecd.org/content/dam/oecd/en/publications/reports/2023/07/test-no-487-in-vitro-mammalian-cell-micronucleus-test_g1g6fb2a/9789264264861-en.pdf, May 2, 2025.

[17] Rushendran, R. and Chitra, V., 2024, Antimigraine activity of Asarinin by OPRM1 pathway with multifaceted impacts through network analysis, Sci. Rep. 14(1): 20207.

[18] Kasai, F., Hirayama, N., and Kohara, A., 2020, TK6 genome profile compared with WIL2-NS: Reference data to improve the reproducibility of genotoxicity studies, Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. 858: 503236.

[19] Verma, J. R., Rees, B. J., Wilde, E. C., Thornton, C. A., Jenkins, G. J. S., Doak, S. H. and Johnson, G. E. 2017, Evaluation of the automated MicroFlow® and Metafer™ platforms for high-throughput micronucleus scoring and dose response analysis in human lymphoblastoid TK6 cells, Arch. Toxicol. 91(7): 2689-2698.

[20] Meta Systems: Innovative Solutions for Automated Imaging, Available Source: https://metasystems-international.com/, May 15, 2025

[21] Wipoosanapan, P., Kangsadalampai, K. and Tongyonk, L., 2019, Antiformation and antimutagenic activities of extracts from pericarp and seed of *Zanthoxylum limonella* (Dennst.) Alston, Thai J. Pharm. Sci.43(2): 90-95.

[22] Sudhong, W., Aunkat, S., Sirinanthananon, P., Suppajariyawat, P., Sincharoenpokai, P., Radapong, S., and Onthong, S., 2025, Mutagenicity Study of *Zanthoxylum myriacanthum* Wall. Ex Hook.f. Extract Using the Ames Test, SCI J CRU. 35(2):8-17. (in Thai).

[23] Pattanawongsa, A., Klongsiriwet, C., Thaina, P., Prammano, A., Maneechai, N., Saengphrom, P. Yusakul, G. and Utsintong, M., 2021, *In vitro* and *in vivo* effects of *Zanthoxylum limonella* (Dennst.) Alston. crude extracts and volatile oil on blood glucose reduction, Thai J. Pharm. Sci. 45(6): 433-441.

Science34-N2.indd 92 23/4/2569 BE 14:43