

การศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัด จากช่อดอกกัญชาพันธุ์ไทย

พราว ศุภจริยาวัตร¹ สุจิต อุ่นกาศ¹ วิจิตรา สุดห่วง¹ ปิยา ศิริพันธ์ธนันท¹ เสกชดกร บัวเบา¹ ศรายุทธ ระดาพงษ์¹
พิเชฐ บัญญัติ¹ ศิริวรรณ ชัยสมบุรณ์พันธ์¹ แพรว ศุภจริยาวัตร² และพรชัย สันเจริญโกโคย¹

¹กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

²กระทรวงยุติธรรม ถนนประชาธิปไตย บางซื่อ กรุงเทพมหานคร 10800

บทคัดย่อ กัญชา (*Cannabis sativa* L.) เป็นพืชเสพติดที่มีการอนุญาตให้ใช้ทางการแพทย์ และได้รับความสนใจจากภาครัฐและภาคเอกชน โดยมีการดำเนินการศึกษาวิจัยพัฒนาผลิตภัณฑ์ และการนำมาศึกษาในผู้ป่วยอย่างกว้างขวาง การนำกัญชามาใช้ในการรักษาควรคำนึงถึงขนาดและปริมาณของสารออกฤทธิ์ชนิดต่าง ๆ ที่มีอยู่ในสมุนไพร ซึ่งต้องมีคุณภาพและปริมาณเพียงพอต่อการรักษาโรค ตลอดจนการประเมินความปลอดภัยของสมุนไพรชนิดนั้น ปัจจุบันประเทศไทยได้มีประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ระบุชื่อยาเสพติดให้โทษในประเภท 5 ประชาชนสามารถใช้ประโยชน์จากส่วนของกัญชา กัญชงที่ไม่จัดเป็นยาเสพติด ยกเว้นช่อดอกซึ่งยังเป็นยาเสพติด ทำให้มีการผลิตผลิตภัณฑ์สมุนไพรกัญชาออกมาใช้และบริโภคกันอย่างแพร่หลาย แต่ข้อมูลด้านพิษวิทยาและความปลอดภัยมีอยู่น้อย การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดช่อดอกกัญชาพันธุ์ไทย 3 พันธุ์ ได้แก่ PTC0601, PTC0602 และ PTC0729 ที่สกัดด้วย Supercritical Fluid Extraction อ้างอิงจาก OECD test guideline 471 ใช้เชื้อ *Salmonella typhimurium* 4 สายพันธุ์ (TA98, TA100, TA1535, TA1537) และ *Escherichia coli* WP2 ที่ขนาดทดสอบ 5 ระดับ (50, 150, 500, 1,500 และ 5,000 ไมโครกรัม/เพลท) ในระบบที่มีและไม่มีเอนไซม์กระตุ้น ผลการทดลองพบว่าสารสกัดช่อดอกกัญชาไทยทั้ง 3 พันธุ์ทุกขนาดทดสอบทุกสายพันธุ์ ทั้งในระบบที่มีและไม่มีเอนไซม์กระตุ้น ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ อย่างไรก็ตามควรมีการทดสอบยืนยันด้านความปลอดภัยในสัตว์ทดลองหรือกลไกเชิงลึกเพิ่มเติม เพื่อให้เกิดความมั่นใจในการนำมาบริโภคหรือทำผลิตภัณฑ์ต่อไป

คำสำคัญ: สารสกัดกัญชา, ฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์, กัญชาพันธุ์ไทย

Corresponding author E-mail: praw.s@dmsc.mail.go.th

Received: 19 March 2021

Revised: 22 June 2021

Accepted: 15 July 2021

บทนำ

ปัจจุบันประเทศไทยมีการกล่าวถึงการนำพืชกัญชามาใช้ประโยชน์กันหลากหลาย ไม่ว่าจะเป็นทางการแพทย์ และเชิงพาณิชย์ ซึ่งล่าสุดตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ระบุชื่อยาเสพติดให้โทษในประเภท 5 ลงราชกิจจานุเบกษา มีผลบังคับใช้ตั้งแต่ 15 ธันวาคม 2563 ประชาชนสามารถใช้ประโยชน์จากส่วนของกัญชา กัญชงที่ไม่จัดเป็นยาเสพติด ได้แก่ เมล็ดกัญชง น้ำมันและสารสกัดจากเมล็ดกัญชง ใบที่ไม่ติดกับช่อดอก กิ่ง ก้าน ลำต้น เปลือก ราก รวมถึง สารสกัด Cannabidiol (CBD) และกากที่เหลือจากการสกัดซึ่งต้องมีปริมาณ Tetrahydrocannabinol (THC) ไม่เกิน 0.2%⁽¹⁾ เพื่อประโยชน์ทางการแพทย์ การศึกษาวิจัย และการผลิตผลิตภัณฑ์สุขภาพ จึงทำให้มีผู้ประกอบการจำนวนมากที่สนใจจะนำกัญชามาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพ เครื่องสำอาง หรือทำเป็นอาหารเพื่อจำหน่ายและในปัจจุบัน มีการนำกัญชามาประกอบอาหารเพื่อจำหน่ายมากยิ่งขึ้น จึงได้มีประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 424 ซึ่ง นายอนุทิน ชาญวีรกูล รองนายกรัฐมนตรีและรัฐมนตรีว่าการกระทรวงสาธารณสุขลงนามเมื่อวันที่ 25 กุมภาพันธ์ 2564 โดยมีผลบังคับใช้ตั้งแต่วันที่ 26 กุมภาพันธ์ 2564 เป็นต้นไป ในเรื่องการนำใบกัญชามาทำอาหาร⁽²⁾ ส่วนเรื่องปริมาณ ของจำนวนใบยังไม่มีมีการกล่าวถึง ทางสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาจะมีคู่มือถึงข้อแนะนำในปริมาณ การใช้ต่อไป จะเห็นได้ว่าประเทศไทยพยายามผลักดันพืชกัญชาเป็นอย่างมาก สำหรับประเทศไทยถือเป็นประเทศแรก ในอาเซียนที่อนุญาตให้ใช้กัญชาอย่างถูกกฎหมายเพื่อประโยชน์ทางการแพทย์และการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ จากรายงาน The Global Cannabis Report คาดว่ามูลค่าตลาดกัญชาทั่วโลกจะมีแนวโน้มเติบโตต่อเนื่องหรือคิดเป็น มูลค่ากว่า 103.9 พันล้านดอลลาร์สหรัฐ⁽³⁾ และในปี 2567 จะมีตลาดกัญชาเพื่อการแพทย์มีสัดส่วนราวร้อยละ 60 ของมูลค่าตลาดกัญชาทั้งหมด⁽³⁾ นอกจากนี้ปัจจุบันเริ่มมีผู้ประกอบการกลุ่มอาหารและเครื่องดื่มรวมทั้งผลิตภัณฑ์ สุขภาพ สนใจที่จะใช้สารสกัดจากกัญชาเป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์กลุ่มดังกล่าว ส่งผลให้คาดว่ามูลค่าตลาดกัญชาโลก จะเติบโตและกระจายไปในหลายธุรกิจมากขึ้น

กัญชาเป็นพืชในวงศ์ Cannabaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Cannabis sativa* L. Subsp. indica (Lam.)⁽⁴⁾ มีชื่อเรียกอื่นๆ กัญชาจีน (ทั่วไป), ปาง (เงี้ยว-แม่ฮ่องสอน), ยานอ (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน), คุณเช่า คุณเช่า (จีน), ตำหมา (จีนกลาง) เป็นต้น ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของต้นกัญชามีดังนี้ กัญชาเป็นไม้ล้มลุกปีเดียว ลำต้นตั้งตรง สูง 0.9-1.5 เมตร มีขนสีเขียวอมเทาและไม่ค่อยแตกสาขา ใบเดี่ยว รูปฝ่ามือ เรียงสลับ ขอบใบเว้าลึกจนถึงจุดโคนใบ เป็น 5-7 แฉก แต่ละแฉกรูปยาวรี กว้าง 0.3-1.5 เซนติเมตร ยาว 6-10 เซนติเมตร โคนและปลายสอบ (oblongate leaf) ขอบจักฟันเลื่อย แผ่นใบด้านบนสีเขียวเข้มกว่าด้านล่าง ดอกแยกเพศต่างต้น ออกเป็นช่อกระจุกตามง่ามใบและปลายกิ่ง ช่อดอกและใบของต้นเพศผู้เรียงตัวกันห่างๆ ต่างจากต้นเพศเมียที่เรียงชิดกัน เกสรเพศผู้ 5 อัน ดอกเล็ก ดอกเพศเมีย มีกลีบเลี้ยงหุ้ม ไม่มีกลีบดอก รังไข่อยู่เหนือวงกลีบ มี 1 ช่อง มีออวุล 1 เม็ด ผลแบบผลแห้งเมล็ดล่อน เล็ก เรียบ สีน้ำตาล ยอดของต้นเพศเมียที่กำลังออกดอกเรียก กะหล่ำกัญชา เมื่อตากให้แห้งแล้วนิยมนำมาใช้สูบ^(5, 6) ปัจจุบัน สารสำคัญในกัญชาถูกพบมากกว่า 545 ชนิด และในจำนวนนี้สารกว่า 100 ชนิด ที่ถูกระบุว่าเป็นไฟโตแคนนาบินอยด์ (phytocannabinoids) ซึ่งเป็นสารกลุ่มหลัก มีโครงสร้างทางเคมีที่คล้ายคลึงกันและเป็นสารออกฤทธิ์ที่พบในกัญชา⁽⁷⁾ โครงสร้างทางเคมีของแคนนาบินอยด์ประกอบด้วยส่วนที่เป็นไขมัน (lipid) แอลคิลเรซอร์ซินอล (alkylresorcinol) เทอร์ปีน (terpene) และโมโนเทอร์ปีน (monoterpene)⁽⁸⁾ ซึ่งสารสำคัญของกัญชา 2 ชนิด ที่มีการกล่าวถึงค่อนข้างมาก คือ THC และ CBD

กัญชามีการใช้ประโยชน์ทางการแพทย์มาอย่างยาวนาน จากฤทธิ์ต่อจิตประสาทที่เกิดขึ้น ในปัจจุบันมีข้อมูล ที่กล่าวถึงการใช้ประโยชน์จากกัญชาอย่างหลากหลาย เช่น รักษาเมเร็ง⁽⁹⁾ เป็นยากันชัก⁽¹⁰⁾ ลดการปวด⁽¹¹⁾ ทั้งหมดเหล่านี้ ทำให้กัญชาเป็นกระแสในสังคมไทยเป็นอย่างมาก สารกลุ่มแคนนาบินอยด์ในกัญชาอาจยังมีประโยชน์ทางการแพทย์ อื่น ๆ เช่น ช่วยให้อาหาร เพื่อเพิ่มน้ำหนักในผู้ป่วย HIV/AIDS ลดความดันในลูกตาสำหรับโรคต้อหิน บำบัด ผู้ป่วยกลุ่มโรคระบบประสาท เช่น การช่วยให้นอนหลับ โรคพาร์กินสัน ความจำเสื่อม⁽¹²⁾ การนำกัญชามาใช้ในการ

รักษาควรต้องคำนึงถึงขนาดและปริมาณของสารออกฤทธิ์ชนิดต่าง ๆ ที่มีอยู่ในสมุนไพร ซึ่งต้องมีคุณภาพและปริมาณเพียงพอต่อการรักษาโรค ตลอดจนการประเมินความปลอดภัยของสมุนไพรชนิดนั้น และต้องมีงานวิจัยที่ได้รับการยอมรับในเรื่องของพิษวิทยา เพื่อความมั่นใจในการใช้สมุนไพรมากยิ่งขึ้น ซึ่งในปัจจุบันพบว่ารายงานข้อมูลการศึกษาทางพิษวิทยาของกัญชาไทยยังมีความไม่ชัดเจนและยังไม่สามารถสรุปได้ว่ากัญชามีความปลอดภัยจริงหรือไม่ ประกอบกับข้อมูลการศึกษาพิษวิทยาของกัญชาในปัจจุบันเป็นข้อมูลของกัญชาที่มีพันธุ์เจริญเติบโตในต่างประเทศ สำหรับกัญชาพันธุ์ที่มีการเจริญเติบโตและเพาะปลูกในประเทศไทยนั้นไม่มีข้อมูลการใช้เพื่อเป็นยารักษาโรคมานานกว่า 40 ปี จึงมีความจำเป็นต้องมีการศึกษาข้อมูลทางพิษวิทยาของพันธุ์กัญชาในประเทศไทยเพื่อสนับสนุนการพัฒนาเป็นยารักษาโรคหรือผลิตภัณฑ์สุขภาพอื่น ๆ ต่อไป

การทดสอบการก่อกลายพันธุ์โดยใช้แบคทีเรีย อ้างอิงวิธีจากองค์การเพื่อความร่วมมือและการพัฒนาทางเศรษฐกิจ (The Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) หรือเรียกว่าวิธีทดสอบเอมส์ (Ames test) เป็นการทดสอบในหลอดทดลองเพื่อหาการก่อกลายพันธุ์ของสารเคมี สารสมุนไพร เครื่องมือทางการแพทย์ ฯลฯ โดยจะพิจารณาความผิดปกติในระดับ DNA หากตัวอย่างสามารถทำตัวเสมือนสารก่อกลายพันธุ์ (Mutagen) จะชี้ให้เห็นว่าตัวอย่างนั้นๆ อาจจะไม่ปลอดภัยที่จะใช้ในการบริโภค และมีแนวโน้มในการก่อโรคที่ผิดปกติทางพันธุกรรม หรือโรคมะเร็งได้⁽¹³⁾ การทดสอบเอมส์ เป็นหนึ่งการทดสอบในความต้องการของผู้ประกอบการที่จะขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์สุขภาพจากสมุนไพร รวมถึงสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาที่เป็นหน่วยงานขึ้นทะเบียน ที่ต้องใช้ข้อมูลด้านความปลอดภัยในการประเมินผลิตภัณฑ์สุขภาพต่างๆ ดังนั้นผู้วิจัยจึงดำเนินการทดสอบนี้ตาม test guideline ที่เป็นมาตรฐาน เพื่อยกระดับให้ผลงานมีความน่าเชื่อถือทางวิชาการ อีกทั้งผลการทดสอบยังเป็นที่ยอมรับทั้งในและต่างประเทศ เป็นการลดการกีดกันทางการค้าได้ด้วย

วัสดุและวิธีการ

ขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบ

ตัวอย่างสมุนไพรช่อดอกเพศเมียกัญชาพันธุ์ไทย 3 พันธุ์ โดยให้รหัสตัวอย่าง PTC0601 (พันธุ์ที่มี THC : CBD เท่ากับ 2 : 1) รหัสตัวอย่าง PTC0602 (พันธุ์ที่มี THC : CBD เท่ากับ 10 : 1) และรหัสตัวอย่าง PTC0729 (พันธุ์ที่มี THC : CBD เท่ากับ 1 : 6)

ขั้นตอนการสกัดกัญชา

นำตัวอย่างช่อดอกเพศเมีย PTC0601 จำนวน 132 กรัม PTC0602 126 กรัม และ PTC0729 100 กรัม บดหยาบ ได้ปริมาณสารสกัด 10.92 กรัม 8.95 กรัม และ 7.07 กรัม คิดเป็น %yield เท่ากับ 8.27, 7.10 และ 7.07% ตามลำดับ สกัดด้วยของไหลวิกฤตยิ่งยวด (Supercritical Fluid Extraction) โดยใช้เครื่องสกัดรุ่น Speed SFE บริษัท Applied Separations ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยใช้แรงดัน 250 bar อุณหภูมิของตูบ (oven) 40 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ปริมาณ THC และ CBD ในสารสกัด ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยนำสารสกัด 20 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรด้วย methanol:chloroform 9:1 ใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร จากนั้น ปิเปตมา 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย methanol ใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร กรองด้วย nylon syringe filter 0.45 micron

ขั้นตอนการทดสอบคุณสมบัติเชื้อ

ความต้องการการกระดามีโนฮิสทีดินสำหรับเชื้อ *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537

เตรียม Minimal Glucose Agar plate (MGA) เคลือบผิววุ้นด้วย 0.1 M L-histidine และ 1 mM D-biotin ดังนี้ เพลทที่ 1 ไม่เคลือบผิววุ้น เพลทที่ 2 เคลือบผิววุ้นด้วย 1 mM D-biotin ปริมาณ 100 ไมโครลิตร

เพลทที่ 3 เคลือบผิวด้วย 0.1 M L-histidine ปริมาณ 100 ไมโครลิตร เพลทที่ 4 เคลือบผิวด้วย 0.1 M L-histidine ปริมาณ 100 ไมโครลิตร และเคลือบ 1 mM D-biotin ปริมาณ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำ single colony จากการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง ไปขีดลงบนวัน นำเพลทบ่มที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แบคทีเรียที่มีการเจริญมากที่สุดคือ เพลทที่ 4 ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการทดลองเพื่อทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ได้

ความต้องการกรดอะมิโนทริปโตเฟนสำหรับเชื้อ *E. coli* WP2

เตรียม MGA ที่ผสม 0.05 mM tryptophan นำ single colony ที่เลี้ยงไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง ไปขีดลงบนวัน นำเพลทบ่มที่ตู้บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดสอบแบคทีเรียต้องการเจริญบนผิววัน ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการทดลองเพื่อทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ได้

การตรวจ rfa mutation และ R-factor

เตรียม MGA plate ผสม 0.1 M L-histidine ปริมาณ 100 ไมโครลิตร สำหรับเชื้อ *S. typhimurium* ส่วนเชื้อ *E. coli* ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MGA ผสม 0.05 mM tryptophan และ bacterial culture ปริมาณ 300 ไมโครลิตร ลงใน top agar ที่มีส่วนผสมของ 0.5 mM histidine + 0.5 mM biotin ปริมาณ 2,000 ไมโครลิตร ส่วน *E. coli* 0.5 mM tryptophan ผสมเข้าไป จากนั้นเทส่วนผสมลงบน MGA plate ในการทดสอบ rfa mutation ทำได้โดย จุ่ม blank paper disc ที่ผ่านการฆ่าเชื้อลงใน 0.1% crystal violet วางลงบน MGA เพลทที่หน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง และในการทดสอบ R-factor ทำได้โดยจุ่ม blank paper disc ใน 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ampicillin วางไว้ อีกด้านหนึ่งของเพลท นำเพลทบ่มที่ตู้บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูผลการทดสอบโดยสังเกต รอบๆ paper disc ที่จุ่ม 0.1% crystal violet ถ้าเป็นเชื้อที่มี rfa จะเห็นโซนใส (clear zone) คือ ไม่มีแบคทีเรียเจริญอยู่ โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางได้ประมาณ 12-14 มิลลิเมตร ส่วนผลการทดสอบ R-factor ในพันธุ์ TA98 และ TA100 มี R-factor ทำให้แบคทีเรียต้าน ampicillin ส่วนพันธุ์อื่นจะเกิด clear zone รอบๆ disc ampicillin

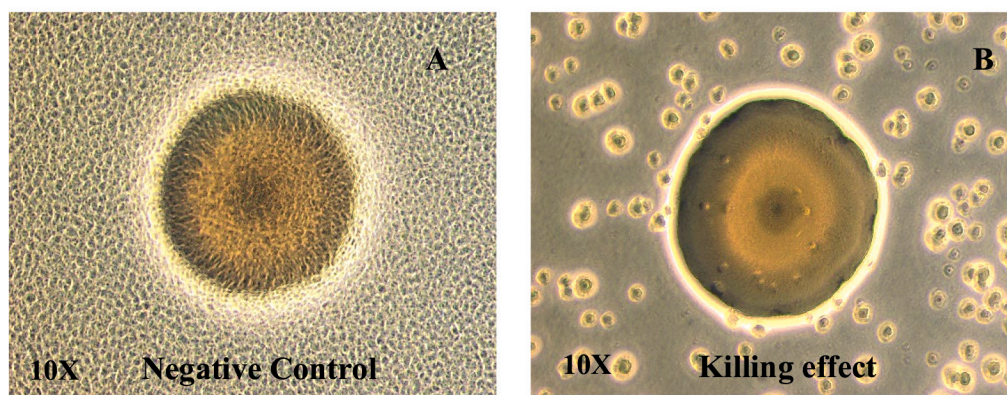
การตรวจความผิดปกติ *uvr* โดยใช้ mitomycin C

นำ mitomycin C ที่ความเข้มข้น 0.2 ไมโครกรัม/disc วางลงใน MGA plate ที่ผสม histidine และ biotin สำหรับเชื้อ *S. typhimurium* และผสม tryptophan สำหรับเชื้อ *E. coli* ดูผลการทดสอบโดยสังเกตรอบๆ paper disc จะเห็นโซนใส (clear zone)

ขั้นตอนการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ในเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดช่อดอกกัญชาไทย 3 พันธุ์ (อ้างอิงวิธีจาก OECD TG471, 2020)⁽¹³⁾

การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ใช้วิธี plate incorporation method ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ นำสารสกัดช่อดอกกัญชา ที่ขนาดทดสอบ 5 ระดับความเข้มข้น 50, 150, 500, 1,500 และ 5,000 ไมโครกรัม/เพลท ผสมกับเชื้อที่ใช้ทดสอบ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร (เชื้อที่ใช้คือ *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 และ *E. coli* WP2 บ่ม 8-12 ชั่วโมง และในกรณีที่มีการทดลองอยู่ในระบบไม่มีเอนไซม์กระตุ้น จะใช้ 0.1M Na₂PO₄-KCl buffer ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แทน S9 เอนไซม์ และสารสกัดสมุนไพรรวมทั้ง 5 ความเข้มข้นลงในแต่ละหลอด จากนั้นเติม top agar และเทลง MGA plate และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ส่วนการทดสอบ *E. coli* WP2 จะเติม tryptophan ลงไปแทน histidine/biotin เมื่อครบเวลา นำเพลทมาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ inverted microscope ว่าเกิด killing effect บน background lawn หรือไม่ ดังแสดงในภาพที่ 1 นำเพลทมานับจำนวน

revertant colony การแปลผลคือ ถ้าสารที่ทดสอบมีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์จะพบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารสมุนไพรรที่ทดสอบกับจำนวน revertant colony เพิ่มขึ้นด้วย และพบว่ามียาอย่างน้อย 2 ความเข้มข้น ที่ให้จำนวนแบคทีเรียกลายพันธุ์มีจำนวนมากกว่าจำนวนที่กลายพันธุ์ตามธรรมชาติ (negative control) ในขณะเดียวกันต้องมียาอย่างน้อย 1 ความเข้มข้นจุดหนึ่ง สามารถทำให้จำนวนแบคทีเรียกลายพันธุ์สูงเกิน 2 เท่า ของการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ จึงนับว่าสารที่นำมาทดสอบนี้เป็นสารก่อกลายพันธุ์



ภาพที่ 1 Background lawn ของเชื้อ *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA100 โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับที่กำลังขยาย 10X ภาพ 1A แสดง background lawn ที่ปกติจะเห็นภาพพื้นหลังเต็มไม่มีการตายของเชื้อ ภาพ 1B แสดงการเกิด Killing effect background lawn จะพบลักษณะของช่องว่างที่พื้นหลัง แสดงถึงการตายของเชื้อ

ผล

ผลการสกัดกัญชา

สารสกัดช่อดอกเพศเมียของกัญชาด้วย Supercritical Fluid Extraction ของกัญชาพันธุ์ไทย 3 พันธุ์ ได้สารสกัดที่มีลักษณะเป็นของกึ่งแข็งกึ่งเหลว (semisolid) สีเหลืองน้ำตาล จากการวิเคราะห์ตัวอย่างปริมาณกลุ่ม cannabinoids ได้ปริมาณสารสำคัญ THC และ CBD ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงสัดส่วนปริมาณ THC และ CBD ในพันธุ์กัญชาไทย 3 พันธุ์

รหัสตัวอย่างสารสกัดกัญชา	THC : CBD	Total THC (%)	Total CBD (%)
PTC0601	2 : 1	20.08	12.18
PTC0602	10 : 1	38.03	3.55
PTC0729	1 : 6	4.28	25.89

ผลการทดสอบคุณสมบัติเชื้อ

ผลการตรวจคุณสมบัติเชื้อก่อนทำการทดสอบเอนม์พบว่า เชื้อ *S. typhimurium* 4 พันธุ์ และ *E. coli* 1 พันธุ์ มีคุณสมบัติครบถ้วนทุกการทดสอบ คือ ความต้องการกรดอะมิโนฮิสทีดีน/ทริปโตเฟน rfa mutation R-factor และความผิดปกติ *uvr* mutation โดยใช้ mitomycin C ดังแสดงในตารางที่ 2

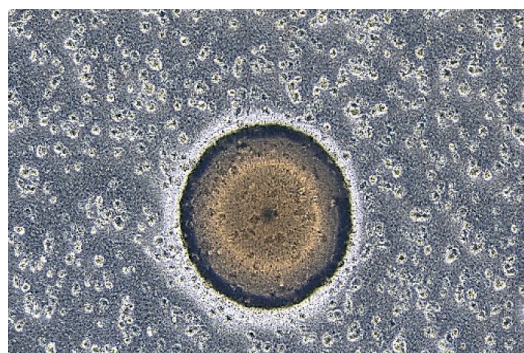
ตารางที่ 2 คุณสมบัติการทดสอบของ *S. typhimurium* และ *E. coli* ทั้ง 5 พันธุ์

สายพันธุ์	คุณสมบัติที่ทดสอบของ <i>S. typhimurium/E. coli</i>					<i>rfa</i> mutation	R-factor	<i>uvr</i> mutation
	ความต้องการกรดอะมิโนฮิสทีดิน/ทริปโตเฟน							
	Neg	His	Bi	His+bi	Tryp			
TA98	-	++	-	+++	N/A	เกิด clear zone	ไม่เกิด clear zone	เกิด clear zone
TA100	-	++	-	+++	N/A	เกิด clear zone	ไม่เกิด clear zone	เกิด clear zone
TA1535	-	++	-	+++	N/A	เกิด clear zone	เกิด clear zone	เกิด clear zone
TA1537	-	++	-	+++	N/A	เกิด clear zone	เกิด clear zone	เกิด clear zone
WP2	-	N/A	N/A	N/A	+++	เกิด clear zone	เกิด clear zone	เกิด clear zone

หมายเหตุ: เครื่องหมาย - หมายถึง ไม่มีการเจริญของเชื้อ
 เครื่องหมาย ++ หมายถึง เชื้อมีการเจริญแต่ไม่เท่ากับ +++
 เครื่องหมาย +++ หมายถึง เชื้อมีการเจริญมากที่สุด
 N/A หมายถึง ไม่ได้ทำการทดสอบ

ผลการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ในเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดกล้วยาพันธุ์ไทย PTC0601 ในระบบไม่มีเอนไซม์ S9 (Without S9 enzyme)

การศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดกล้วยาที่สกัดด้วย Supercritical Fluid Extraction ซึ่งใช้เชื้อแบคทีเรีย 5 พันธุ์ (*S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 และ *E. coli* WP2) ที่ขนาดทดสอบ 5 ระดับ (50, 150, 500, 1,500 และ 5,000 ไมโครกรัม/เพลท) ในระบบที่ไม่มีเอนไซม์ S9 ผลการทดลองพบว่าทุกพันธุ์และทุกขนาดทดสอบไม่ก่อให้เกิดการก่อกลายพันธุ์ โดยดูจากจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ไม่ได้มีจำนวนเพิ่มเป็น 2 เท่า เมื่อเทียบกับ negative control แต่พบความผิดปกติของ background lawn ที่พันธุ์ TA1537 ที่ขนาดทดสอบ 5,000 ไมโครกรัม/เพลท ดังแสดงในภาพที่ 2 ส่วนพันธุ์อื่นๆ และทุกขนาดทดสอบ background lawn ปกติ ดังแสดงในตารางที่ 3



TA1537 5,000 µg/plate (-S9), 10x

ภาพที่ 2 Background lawn ของเชื้อ *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA 1537 ที่ขนาดทดสอบ 5,000 ไมโครกรัม/เพลท ในระบบไม่มีเอนไซม์ S9 ที่กำลังขยาย 10X โดยจะเห็นการเกิด Killing effect background lawn จะพบลักษณะของช่องว่างที่พื้นหลัง แสดงถึงการตายของเชื้อ

ตารางที่ 3 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ (Revertant colony) ของสารสกัดกัญชาพันธุ์ PTC0601 ต่อเชื้อแบคทีเรีย 5 พันธุ์ ในระบบไม่มีเอนไซม์ S9 (Without S9 enzyme)

สารสกัด	ความเข้มข้น ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	โคโลนีกลายพันธุ์ (mean $\pm$ S.D.)									
		TA98	BL	TA100	BL	TA1535	BL	TA1537	BL	WP2	BL
สารสกัดกัญชา (PTC0601) (-S9)	Negative	24.6 $\pm$ 6.11	N	153.33 $\pm$ 10.07	N	9.00 $\pm$ 0.00	N	7.33 $\pm$ 4.93	N	52.33 $\pm$ 9.07	N
	5,000	25.67 $\pm$ 3.06	N	121.33 $\pm$ 15.57	N	7.33 $\pm$ 6.11	N	2.33 $\pm$ 0.58	K	32.33 $\pm$ 4.93	N
	1,500	20.00 $\pm$ 2.65	N	139.00 $\pm$ 11.53	N	7.33 $\pm$ 1.53	N	5.00 $\pm$ 2.00	N	49.00 $\pm$ 8.72	N
	500	17.33 $\pm$ 5.13	N	146.33 $\pm$ 5.03	N	9.00 $\pm$ 3.00	N	4.33 $\pm$ 2.52	N	50.67 $\pm$ 9.29	N
	150	21.33 $\pm$ 1.33	N	173.67 $\pm$ 6.11	N	10.00 $\pm$ 4.36	N	5.67 $\pm$ 2.31	N	59.33 $\pm$ 14.22	N
	50	20.67 $\pm$ 3.79	N	162.67 $\pm$ 10.26	N	7.00 $\pm$ 3.61	N	5.33 $\pm$ 1.53	N	46.33 $\pm$ 8.08	N

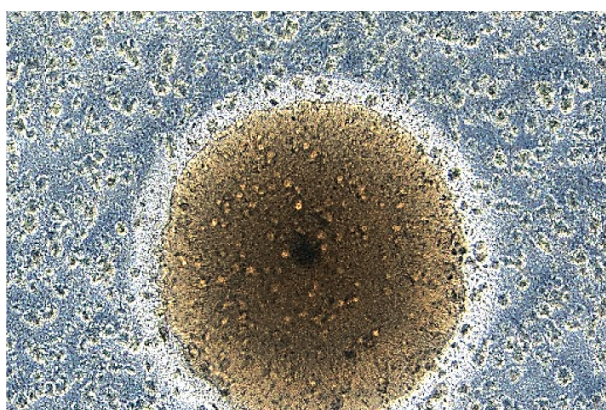
หมายเหตุ: BL หมายถึง Background lawn

N หมายถึง Normal background lawn

K หมายถึง Killing effect background lawn

ผลการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ในเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดกัญชาพันธุ์ไทย PTC0601 ในระบบมีเอนไซม์ กระตุ้น (With S9 enzyme)

การศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดกัญชาที่สกัดด้วย Supercritical Fluid Extraction ซึ่งใช้เชื้อแบคทีเรีย 5 พันธุ์ (*S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537) และ *E. coli* WP2 ที่ขนาดทดสอบ 5 ระดับ (50, 150, 500, 1,500 และ 5,000 ไมโครกรัม/เพลท) ในระบบที่มีเอนไซม์ S9 ผลการทดลองพบว่าทุกพันธุ์และทุกขนาดทดสอบไม่ก่อให้เกิดการก่อกลายพันธุ์ โดยดูจากจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ไม่ได้มีจำนวนเพิ่มเป็น 2 เท่า เมื่อเทียบกับ negative control แต่พบความผิดปกติของ background lawn ที่พันธุ์ TA1537 ที่ขนาดทดสอบ 5,000 ไมโครกรัม/เพลท ดังแสดงในภาพที่ 3 ส่วนพันธุ์อื่นๆ และทุกขนาดทดสอบ background lawn ปกติ ดังแสดงในตารางที่ 4



TA1537 5,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ (+S9), 10x

ภาพที่ 3 Background lawn ของเชื้อ *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA 1537 ที่ขนาดทดสอบ 5,000 ไมโครกรัม/เพลท ในระบบที่มีเอนไซม์ S9 ที่กำลังขยาย 10X โดยจะเห็นการเกิด Killing effect background lawn จะพบลักษณะของช่องว่างที่พื้นหลัง แสดงถึงการตายของเชื้อ

ตารางที่ 4 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ (Revertant colony) ของสารสกัดกัญชาต่อเชื้อแบคทีเรีย 5 พันธุ์ ในระบบมีเอนไซม์ S9 (With S9 enzyme)

สารสกัด	ความเข้มข้น ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	โคโลนีกลายพันธุ์ (mean $\pm$ S.D.)									
		TA98	BL	TA100	BL	TA1535	BL	TA1537	BL	WP2	BL
สารสกัดกัญชา (PTC0601) (+S9)	Negative	21.00 $\pm$ 6.00	N	159.00 $\pm$ 8.72	N	11.00 $\pm$ 1.00	N	10.00 $\pm$ 1.73	N	50.33 $\pm$ 5.77	N
	5,000	24.33 $\pm$ 7.09	N	158.00 $\pm$ 9.17	N	12.00 $\pm$ 2.65	N	9.00 $\pm$ 3.61	K	42.33 $\pm$ 4.73	N
	1,500	32.33 $\pm$ 1.15	N	163.00 $\pm$ 11.53	N	8.00 $\pm$ 3.00	N	7.33 $\pm$ 3.21	N	52.00 $\pm$ 5.00	N
	500	24.00 $\pm$ 2.65	N	170.33 $\pm$ 22.72	N	11.67 $\pm$ 4.04	N	5.67 $\pm$ 3.21	N	46.67 $\pm$ 3.51	N
	150	36.33 $\pm$ 1.15	N	158.00 $\pm$ 18.03	N	8.67 $\pm$ 0.58	N	11.33 $\pm$ 3.06	N	62.67 $\pm$ 7.77	N
	50	30.33 $\pm$ 8.50	N	153.00 $\pm$ 14.73	N	11.33 $\pm$ 4.04	N	12.67 $\pm$ 4.51	N	45.67 $\pm$ 7.64	N

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

ผลการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ในเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดกัญชาพันธุ์ไทย PTC0602 ในระบบไม่มีเอนไซม์ S9 (Without S9 enzyme)

การศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดกัญชาที่สกัดด้วย Supercritical Fluid Extraction ซึ่งใช้เชื้อแบคทีเรีย 5 พันธุ์ (*S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537) และ *E. coli* WP2 ที่ขนาดทดสอบ 5 ระดับ (50, 150, 500, 1,500 และ 5,000 ไมโครกรัม/เพลต) ในระบบที่ไม่มีเอนไซม์ S9 ผลการทดลองพบว่าทุกพันธุ์และทุกขนาดทดสอบไม่ก่อให้เกิดการก่อกลายพันธุ์ โดยดูจากจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ไม่ได้มีจำนวนเพิ่มเป็น 2 เท่า เมื่อเทียบกับ negative control และไม่พบความผิดปกติของ background lawn ในทุกพันธุ์และทุกขนาดทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ (Revertant colony) ของสารสกัดกัญชาพันธุ์ PTC0602 ต่อเชื้อแบคทีเรีย 5 พันธุ์ ในระบบไม่มีเอนไซม์ S9 (Without S9 enzyme)

สารสกัด	ความเข้มข้น ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	โคโลนีกลายพันธุ์ (mean $\pm$ S.D.)									
		TA98	BL	TA100	BL	TA1535	BL	TA1537	BL	WP2	BL
สารสกัดกัญชา (PTC0602) (-S9)	Negative	24.00 $\pm$ 1.73	N	153.67 $\pm$ 17.01	N	6.33 $\pm$ 2.52	N	3.67 $\pm$ 1.15	N	41.00 $\pm$ 13.11	N
	5,000	20.00 $\pm$ 5.00	N	140.00 $\pm$ 8.66	N	7.33 $\pm$ 4.04	N	5.00 $\pm$ 1.73	N	34.33 $\pm$ 5.03	N
	1,500	27.00 $\pm$ 1.73	N	132.00 $\pm$ 7.94	N	6.67 $\pm$ 3.79	N	2.33 $\pm$ 2.52	N	40.00 $\pm$ 1.00	N
	500	17.67 $\pm$ 1.53	N	152.00 $\pm$ 12.53	N	5.00 $\pm$ 2.52	N	5.67 $\pm$ 2.52	N	41.33 $\pm$ 9.49	N
	150	16.67 $\pm$ 5.77	N	161.67 $\pm$ 21.03	N	7.00 $\pm$ 3.81	N	3.00 $\pm$ 2.00	N	45.00 $\pm$ 7.21	N
	50	20.67 $\pm$ 3.06	N	170.67 $\pm$ 18.50	N	5.20 $\pm$ 1.73	N	4.00 $\pm$ 1.73	N	46.67 $\pm$ 5.86	N

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

ผลการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ในเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดกัญชาพันธุ์ไทย PTC0602 ในระบบมีเอนไซม์ S9 (With S9 enzyme)

การศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดกัญชาที่สกัดด้วย Supercritical Fluid Extraction ซึ่งใช้เชื้อแบคทีเรีย 5 พันธุ์ (*S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537) และ *E. coli* WP2 ที่ขนาดทดสอบ

5 ระดับ (50, 150, 500, 1,500 และ 5,000 ไมโครกรัม/เพลท) ในระบบที่ไม่มีเอนไซม์ S9 ผลการทดลองพบว่า ทุกพันธุ์และทุกขนาดทดสอบไม่ก่อให้เกิดการก่อกลายพันธุ์ โดยดูจากจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ไม่ได้มีจำนวนเพิ่มเป็น 2 เท่า เมื่อเทียบกับ negative control และไม่พบความผิดปกติของ background lawn ในทุกพันธุ์และทุกขนาดทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ (Revertant colony) ของสารสกัดกัญชาพันธุ์ PTC0602 ต่อเชื้อแบคทีเรีย 5 พันธุ์ในระบบมีเอนไซม์ S9 (With S9 enzyme)

สารสกัด	ความเข้มข้น ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	โคโลนีกลายพันธุ์ (mean $\pm$ S.D.)									
		TA98	BL	TA100	BL	TA1535	BL	TA1537	BL	WP2	BL
สารสกัดกัญชา (PTC0602) (+S9)	Negative	31.00 $\pm$ 6.08	N	18.00 $\pm$ 22.30	N	14.67 $\pm$ 2.02	N	10.00 $\pm$ 1.73	N	43.33 $\pm$ 10.69	N
	5,000	25.00 $\pm$ 3.61	N	164.00 $\pm$ 9.17	N	10.33 $\pm$ 1.43	N	11.67 $\pm$ 1.76	N	34.67 $\pm$ 6.43	N
	1,500	21.33 $\pm$ 4.16	N	175.67 $\pm$ 11.68	N	9.67 $\pm$ 4.07	N	5.00 $\pm$ 2.52	N	35.00 $\pm$ 1.00	N
	500	18.33 $\pm$ 4.73	N	136.33 $\pm$ 29.02	N	12.00 $\pm$ 4.00	N	6.33 $\pm$ 1.00	N	23.00 $\pm$ 2.65	N
	150	30.67 $\pm$ 8.74	N	180.67 $\pm$ 10.02	N	7.33 $\pm$ 1.59	N	10.00 $\pm$ 2.58	N	47.67 $\pm$ 7.37	N
	50	27.67 $\pm$ 9.50	N	169.67 $\pm$ 22.37	N	7.00 $\pm$ 1.53	N	6.00 $\pm$ 2.31	N	39.33 $\pm$ 3.06	N

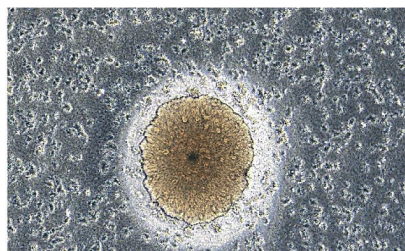
หมายเหตุ: BL หมายถึง Background lawn

N หมายถึง Normal background lawn

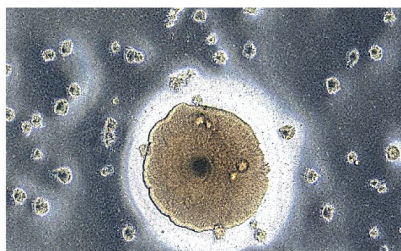
K หมายถึง Killing effect background lawn

ผลการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ในเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดกัญชาพันธุ์ไทย PTC0729 ในระบบไม่มีเอนไซม์ S9 (Without S9 enzyme)

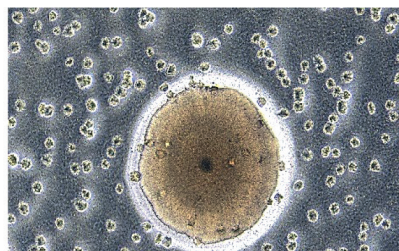
การศึกษากิจกรรมก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดกัญชาที่สกัดด้วย Supercritical Fluid Extraction ซึ่งใช้เชื้อแบคทีเรีย 5 พันธุ์ (*S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537) และ *E. coli* WP2 ที่ขนาดทดสอบ 5 ระดับ (50, 150, 500, 1,500 และ 5,000 ไมโครกรัม/เพลท) ในระบบที่ไม่มีเอนไซม์ S9 ผลการทดลองพบว่า ทุกพันธุ์และทุกขนาดทดสอบไม่ก่อให้เกิดการก่อกลายพันธุ์ โดยดูจากจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ไม่ได้มีจำนวนเพิ่มเป็น 2 เท่า เมื่อเทียบกับ negative control แต่พบความผิดปกติของ background lawn ที่พันธุ์ TA98, TA100 และ TA 1537 ที่ขนาดทดสอบ 5,000 ไมโครกรัม/เพลท ดังแสดงในภาพที่ 4 ส่วนพันธุ์อื่นๆ และทุกความเข้มข้น background lawn ปกติ ดังแสดงในตารางที่ 7



TA98 5,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ (-S9), 10x



TA100 5,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ (-S9), 10x



TA1537 5,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ (-S9), 10x

ภาพที่ 4 แสดง Background lawn ของเชื้อ *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98, TA100 และ TA1537 ที่ขนาดทดสอบ 5,000 ไมโครกรัม/เพลท ในระบบไม่มีเอนไซม์ S9 ที่กำลังขยาย 10X โดยจะเห็นการเกิด Killing effect background lawn จะพบลักษณะของช่องว่างที่พื้นหลัง แสดงถึงการตายของเชื้อ

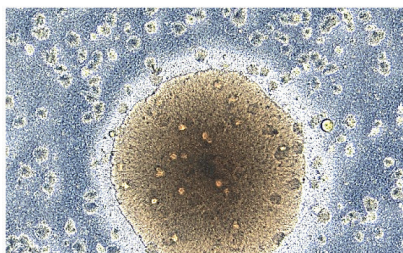
ตารางที่ 7 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ (Revertant colony) ของสารสกัดกัญชา PTC0729 ต่อเชื้อแบคทีเรีย 5 พันธุ์ ในระบบที่ไม่มีเอนไซม์ S9 (With S9 enzyme)

สารสกัด	ความเข้มข้น ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	โคโลนีกลายพันธุ์ (mean $\pm$ S.D.)									
		TA98	BL	TA100	BL	TA1535	BL	TA1537	BL	WP2	BL
สารสกัดกัญชา (PTC0729) (-S9)	Negative	12.33 $\pm$ 3.79	N	142.00 $\pm$ 13.08	N	11.00 $\pm$ 5.57	N	6.00 $\pm$ 1.00	N	39.33 $\pm$ 9.02	N
	5,000	6.67 $\pm$ 1.15	K	34.67 $\pm$ 2.52	K	9.00 $\pm$ 2.00	N	2.67 $\pm$ 0.58	K	43.33 $\pm$ 11.00	N
	1,500	11.67 $\pm$ 1.15	N	99.33 $\pm$ 3.51	N	6.00 $\pm$ 1.00	N	5.67 $\pm$ 1.53	N	43.00 $\pm$ 7.55	N
	500	11.67 $\pm$ 4.04	N	129.00 $\pm$ 6.24	N	6.33 $\pm$ 0.58	N	6.33 $\pm$ 2.52	N	38.67 $\pm$ 7.57	N
	150	9.00 $\pm$ 5.20	N	144.33 $\pm$ 15.31	N	11.00 $\pm$ 3.61	N	6.67 $\pm$ 1.31	N	41.67 $\pm$ 7.23	N
	50	13.33 $\pm$ 5.51	N	171.67 $\pm$ 22.23	N	7.67 $\pm$ 4.04	N	6.33 $\pm$ 1.15	N	48.33 $\pm$ 12.31	N

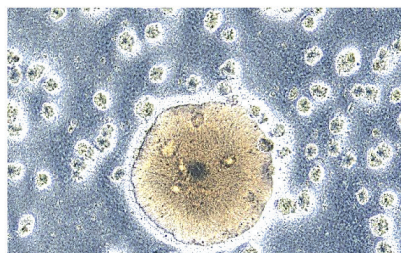
หมายเหตุ: BL หมายถึง Background lawn
N หมายถึง Normal background lawn
K หมายถึง Killing effect background lawn

ผลการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ในเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดกัญชาพันธุ์ไทย PTC0729 ในระบบมีเอนไซม์ S9 (With S9 enzyme)

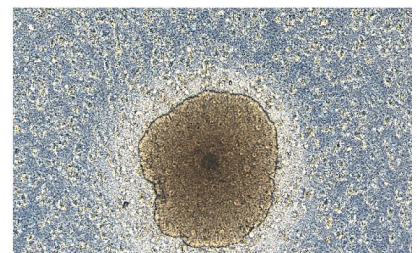
การศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดกัญชาที่สกัดด้วย Supercritical Fluid Extraction ซึ่งใช้เชื้อแบคทีเรีย 5 พันธุ์ (*S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537) และ *E. coli* WP2 ที่ขนาดทดสอบ 5 ระดับ (50, 150, 500, 1,500 และ 5,000 ไมโครกรัม/เพลท) ในระบบที่มีเอนไซม์ S9 ผลการทดลองพบว่าทุกพันธุ์และทุกขนาดทดสอบไม่ก่อให้เกิดการก่อกลายพันธุ์ โดยดูจากจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ไม่ได้มีจำนวนเพิ่มเป็น 2 เท่าเมื่อเทียบกับ negative control และเมื่อสังเกตจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ที่ขนาดทดสอบ 5,000 ไมโครกรัม/เพลท จะพบว่าโคโลนีลดลงประมาณ 2 เท่า เมื่อเทียบกับ negative control นอกจากนั้นพบความผิดปกติของ background lawn ที่พันธุ์ TA98, TA100 และ TA 1537 ที่ขนาดทดสอบ 5,000 ไมโครกรัม/เพลท ดังแสดงในภาพที่ 5 ซึ่งสอดคล้องกับจำนวนโคโลนีที่ลดลง ส่วนพันธุ์อื่นๆ และทุกขนาดทดสอบ background lawn ปกติ ดังแสดงในตารางที่ 8



TA98 5,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ (+S9), 10x



TA100 5,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ (+S9), 10x



TA1537 5,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ (+S9), 10x

ภาพที่ 5 Background lawn ของเชื้อ *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98 TA100 และ TA1537 ที่ขนาดทดสอบ 5,000 ไมโครกรัม/เพลท ในระบบมีเอนไซม์ S9 ที่กำลังขยาย 10X โดยจะเห็นการเกิด Killing effect background lawn จะพบลักษณะของช่องว่างที่พื้นหลัง แสดงถึงการตายของเชื้อ

ตารางที่ 8 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ (Revertant colony) ของสารสกัดกัญชา PTC0729 ต่อเชื้อแบคทีเรีย 5 พันธุ์ ในระบบมีเอนไซม์ S9 (With S9 enzyme)

สารสกัด	ความเข้มข้น ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	โคโลนีกลายพันธุ์ (mean $\pm$ S.D.)									
		TA98	BL	TA100	BL	TA1535	BL	TA1537	BL	WP2	BL
สารสกัดกัญชา (PTC0729) (+S9)	Negative	23.00 $\pm$ 1.41	N	178.00 $\pm$ 19.31	N	7.67 $\pm$ 1.53	N	12.00 $\pm$ 1.73	N	42.33 $\pm$ 10.50	N
	5,000	16.33 $\pm$ 3.79	K	69.67 $\pm$ 7.37	K	11.67 $\pm$ 3.51	N	6.00 $\pm$ 2.00	K	39.33 $\pm$ 9.29	N
	1,500	26.67 $\pm$ 8.02	N	120.67 $\pm$ 11.37	N	10.00 $\pm$ 1.73	N	11.67 $\pm$ 2.08	N	58.33 $\pm$ 7.64	N
	500	32.00 $\pm$ 5.29	N	177.33 $\pm$ 13.58	N	13.33 $\pm$ 5.77	N	14.67 $\pm$ 5.86	N	52.67 $\pm$ 6.43	N
	150	33.67 $\pm$ 11.37	N	188.00 $\pm$ 9.17	N	13.00 $\pm$ 0.00	N	16.33 $\pm$ 3.21	N	56.67 $\pm$ 10.07	N
	50	27.33 $\pm$ 11.93	N	214.33 $\pm$ 30.01	N	13.00 $\pm$ 1.73	N	14.67 $\pm$ 8.33	N	37.33 $\pm$ 1.15	N

หมายเหตุ: BL หมายถึง Background lawn

N หมายถึง Normal background lawn

K หมายถึง Killing effect background lawn

วิจารณ์

กัญชาเป็นพืชที่มีความน่าสนใจ เนื่องจากมีการใช้กันอย่างยาวนานโดยใช้เป็นเครื่องประกอบอาหารและยารักษาโรค รวมถึงเป็นยาตำรับแผนไทยที่มีกัญชาเป็นส่วนผสม 16 ตำรับ แต่อย่างไรก็ตามกัญชาก็มีความเสี่ยงอันตรายต่อสุขภาพ หากมีการนำมาใช้ในทางที่ไม่เหมาะสม ซึ่งเป็นเหตุผลที่ทำให้หลายประเทศมีการกำหนดมาตรการควบคุมที่เข้มงวด รัดกุม จึงทำให้การพัฒนางานวิจัยของพืชกัญชาเกิดความล่าช้า ดังนั้น การสร้างความเชื่อมั่นด้านความปลอดภัยด้านการรักษาโรค หรือผลข้างเคียงที่อาจจะเกิดขึ้นจากการใช้พืชกัญชา จึงเป็นประเด็นสำคัญและเร่งด่วนที่ต้องดำเนินการสำหรับประเทศไทยในปัจจุบันหลายหน่วยงานทั้งภาครัฐและเอกชนได้ดำเนินการศึกษาวิจัยเพื่อนำมาใช้ทางการแพทย์ภายใต้พระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษฉบับใหม่ (ฉบับที่ 7) พ.ศ. 2562 และได้มีการอนุญาตส่วนของพืชกัญชาเพื่อสวดกในการศึกษาวิจัยและเชิงพาณิชย์ งานวิจัยในส่วนความปลอดภัย หรืองานด้านพิษวิทยามีความสำคัญและความจำเป็นเร่งด่วนในการศึกษาวิจัย เพื่อประโยชน์และความปลอดภัยของผู้บริโภค การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์แบบย้อนกลับโดยใช้แบคทีเรีย ซึ่งอ้างอิงวิธีจาก OECD test guideline 471 เป็นการทดสอบพิษวิทยา ในส่วนของ genotoxicity เพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานก่อนจะทำการศึกษาในวิธีเชิงลึก เช่น ในสัตว์ทดลอง ทำให้ได้ข้อสรุปที่แน่นอนในด้านความปลอดภัยของสารที่นำไปทดสอบต่อไป ซึ่งการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ในเชื้อแบคทีเรีย เป็นการทดสอบสารเคมี สารสมุนไพร และผลิตภัณฑ์สุขภาพ เพื่อหาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างพันธุกรรมในเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งสารเคมีที่ส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์ต่อเซลล์ร่างกายเมื่อมีการบริโภคสิ่งเหี้ยมฉุนทำให้เกิดการก่อกลายพันธุ์นั้น ๆ อาจทำให้เซลล์ถูกพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็งหรือก่อให้เกิดโรคความผิดปกติทางพันธุกรรมได้ ผลการทดลองในการวิจัยครั้งนี้พบว่าสารสกัดกัญชาพันธุ์ไทย 3 พันธุ์ ที่สกัดด้วย Supercritical Fluid Extraction ทดสอบในเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 พันธุ์ (*S. typhimurium* พันธุ์ TA98, TA100, TA1535, TA1537 และ *E. coli* WP2) ทุกขนาดทดสอบไม่ก่อให้เกิดการก่อกลายพันธุ์ ทั้งในระบบที่มีและไม่มีเอนไซม์กระตุ้น โดยดูจากจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ไม่ได้มีจำนวนเพิ่มเป็น 2 เท่าเมื่อเทียบกับ negative control แต่พบความผิดปกติของ background lawn ในสารสกัดกัญชารหัสตัวอย่าง PTC0601 ของเชื้อแบคทีเรียพันธุ์ TA1537 ขนาดทดสอบที่ 5,000 ไมโครกรัม/เพลท และรหัสตัวอย่าง PTC0729 ของเชื้อแบคทีเรียพันธุ์ TA98 TA100 และ TA1537 ระดับขนาดทดสอบที่ 5,000 ไมโครกรัม/เพลท ซึ่งจะพบว่าเกิด Killing effect background lawn จะพบลักษณะของช่องว่างที่พื้นหลัง แสดงถึงการตายของเชื้อ ซึ่งในการทดสอบจะต้องทำการส่องดู background lawn ภายใต้กล้อง inverted microscope เนื่องจากลักษณะของ background lawn เป็นเกณฑ์หนึ่งของ guideline ที่ใช้ในการตัดสินใจว่าสารตัวอย่างมีการยับยั้งการเจริญของเชื้อ

ที่ใช้ทดสอบหรือไม่ ซึ่งการเกิด killing effect จะเป็นการเตือนภัยผู้บริโภคในส่วนของขนาดทดสอบที่เหมาะสมในการนำไปใช้ รายงานการวิจัยของ Tennille และคณะ (2018)⁽¹⁴⁾ ได้ทดสอบประเมินความปลอดภัยของสารสกัดกัญชาที่มีสาร CBD ประมาณ 96% และ THC น้อยกว่า 1% สกัดด้วย Supercritical Fluid Extraction โดยใช้วิธี bacterial Reverse Mutation ตาม OECD Guideline No.471 ที่ขนาดทดสอบ 5,000, 1,600, 500, 160, 50, 16, 5 ไมโครกรัม/เพลท ผลการทดลองพบว่าทุกพันธุ์และทุกขนาดทดสอบไม่ก่อให้เกิดการก่อกลายพันธุ์ ทั้งในระบบที่มีและไม่มีเอนไซม์ และรายงานการวิจัยของ Margitta และคณะ (2020)⁽¹⁵⁾ ซึ่งดำเนินการเหมือนกันกับของ Tennille และผลการทดลองก็สอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Jungae Jeun และคณะ (2011)⁽¹⁶⁾ ทดสอบฤทธิ์การก่อกลายพันธุ์และฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดเมล็ดกัญชาที่สกัดด้วยเฮกเซนโดยวิธีเอ็มเอส ต่อเชื้อแบคทีเรียพันธุ์ TA98 และ TA100 ทั้งในระบบที่มีและไม่มีเอนไซม์ S9 ที่ขนาดทดสอบ 25,000, 12,500, 6,250 และ 3,125 ไมโครกรัม/เพลท ผลการทดลองพบว่าไม่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์และมีฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ รายงานการวิจัยของ พรวา และคณะ (2563)⁽¹⁷⁾ ศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดกัญชาของกลางที่สกัดด้วยวิธีของไหลวิกฤตยิ่งยวด (supercritical fluid extraction) โดยใช้วิธีอ้างอิงจาก OECD test guideline 471 ในเชื้อแบคทีเรีย 5 พันธุ์ ที่ขนาดทดสอบ 5 ระดับ (1,250, 2,500, 5,000, 10,000 และ 20,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ในระบบที่มีและไม่มีเอนไซม์กระตุ้น ผลการทดลองพบว่าสารสกัดกัญชาของกลางที่มีปริมาณ THC สูง ทุกขนาดทดสอบทุกพันธุ์ ทั้งในระบบที่มีและไม่มีเอนไซม์กระตุ้น ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองของผู้วิจัยและคณะ พบว่าสารสกัดกัญชาพันธุ์ไทยทั้ง 3 พันธุ์ ไม่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์เช่นเดียวกัน ซึ่งกัญชาพันธุ์ไทยเป็นพันธุ์ที่แตกต่างจากของต่างประเทศ เพราะพันธุ์ต่างประเทศจะมีปริมาณสารสำคัญ CBD สูงมาก และ THC น้อยมาก แต่พบว่าผลการทดลองให้ผลที่เหมือนกัน คือ ทุกพันธุ์ทุกขนาดทดสอบไม่ก่อให้เกิดการก่อกลายพันธุ์ที่ขนาดทดสอบ ทั้งในระบบที่มีและไม่มีเอนไซม์ S9 ในงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาวิจัยในช่อดอกกัญชาซึ่งยังจัดเป็นยาเสพติด ดังนั้นผลการทดลองที่ไม่ได้กล่าวถึงการใช้ส่วนอื่น ๆ ของกัญชา ซึ่งผู้วิจัยจะมีการศึกษาส่วนต่างๆ ของกัญชา เช่น ใบ ราก ฯลฯ ต่อไป ข้อควรระมัดระวัง การนำกัญชาไปใช้ ผู้บริโภคที่มีโรคประจำตัวหรือมีการรับประทานยาแผนปัจจุบันหรือยาอื่นๆ ควรใช้กัญชาภายใต้คำปรึกษาของแพทย์เนื่องจากยังไม่มีข้อมูลการศึกษาถึงผลของอันตรกิริยาระหว่างสมุนไพรกัญชาและยาแผนปัจจุบัน รวมถึงยังมีการทดสอบด้าน genotoxicity อื่นๆ เพื่อเป็นการยืนยันผลให้มีความมั่นใจมากยิ่งขึ้น อาจต้องระมัดระวังในการใช้สมุนไพรชนิดนี้ ซึ่งผลการทดลองนี้สามารถนำผลไปอ้างอิงและใช้ในการวิจัยเชิงลึก เช่น การศึกษาพิษเรื้อรังในสัตว์ทดลอง การศึกษากลไกต่างๆ ในสัตว์ทดลองต่อไป

สรุป

การทดสอบการก่อกลายพันธุ์ในครั้งนี้เป็นการทดสอบหนึ่งใน mutagenicity scope ซึ่งยังต้องมีการศึกษาในการทดสอบอื่นๆ เช่น *In vitro* chromosome aberration assay, Mouse Lymphoma assay, *In vitro* และ *In vivo* micronucleus เป็นต้น เพื่อยืนยันผลการก่อกลายพันธุ์ด้วยวิธีอื่นเพิ่มเติม เนื่องจากสารสกัดกัญชาพันธุ์ไทย PTC0601 และ PTC0729 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ขนาดทดสอบ 5,000 ไมโครกรัม/เพลท ซึ่งเกณฑ์ของวิธีทดสอบระบุว่าหากมีการยับยั้งของเชื้อจะต้องไม่นำขนาดทดสอบที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อมาวิเคราะห์ผล และจะพิจารณาเฉพาะขนาดทดสอบที่ไม่เกิดการยับยั้งของเชื้อ ซึ่งในการทดสอบ ผู้วิจัยได้ทำการเจือจางความเข้มข้นเริ่มที่ 5,000, 1,500, 500, 150 และ 50 ไมโครกรัม/เพลท ดังนั้นผู้ที่นำกัญชาพันธุ์ไทยมาใช้จะต้องคำนึงถึงขนาดความปลอดภัย ซึ่งจากผลการทดสอบควรระมัดระวังในขนาดที่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 1,500 ไมโครกรัม/เพลท การทดสอบนี้เป็นข้อมูลด้านความปลอดภัยของสารสกัดกัญชาพันธุ์ไทย เพื่อใช้คุ้มครองผู้บริโภคและเตือนภัยประชาชนให้มีความมั่นใจในการใช้สมุนไพรไทยอย่างปลอดภัยมากยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนเงินจากงบประมาณกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ขอขอบพระคุณ นายสรเพชร มาสุด และนายกรวิชัย สมคิด พร้อมด้วยทีมงานห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและห้องปฏิบัติการ จีโนมิกส์พืชจากสถาบันวิจัยสมุนไพร สำนักงานสาธารณสุขจังหวัด องค์การบริหารส่วนตำบล โรงพยาบาล และ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่เกี่ยวข้อง ในการเก็บตัวอย่างสมุนไพรกัญชา ศูนย์ตรวจสอบและรับรองคุณภาพสมุนไพร ในการควบคุมคุณภาพทางเคมีและแยกปริมาณสารสำคัญ THC และ CBD ของตัวอย่างกัญชา และเจ้าหน้าที่ ห้องปฏิบัติการพิษวิทยาทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัยเป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

1. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ระบุชื่อยาเสพติดให้โทษในประเภท 5 (พ.ศ. 2563). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 137 ตอนพิเศษ ๒๙๐ ง (วันที่ 14 ธันวาคม 2563). หน้า 33.
2. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 424 (พ.ศ. 2564) เรื่อง กำหนดอาหารที่ห้ามผลิต นำเข้า หรือจำหน่าย. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 138 ตอนพิเศษ 45 ง (วันที่ 25 กุมภาพันธ์ 2564). หน้า 32.
3. ศูนย์วิจัยกสิกรไทย. “กัญชา” จะกลายเป็นพืชเศรษฐกิจไทย ได้หรือไม่? [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 14 ม.ค. 2563]; [2 หน้า]. เข้าถึงได้ที่ : URL : <https://kasikornresearch.com/th/analysis/k-social-media/Pages/FB-Cannabis-14-01-20.aspx>.
4. Small E, Cronquist A. A practical and natural taxonomy for Cannabis. Taxon 1976; 25(4) : 405-35.
5. ราชบัณฑิตยสถาน. อนุกรมวิธานพืช อักษร ก. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : ราชบัณฑิตยสถาน; 2547.
6. Anderson LC. Leaf variation among Cannabis species from a controlled garden. Bot Mus Leaflet 1980; 28(1) : 61-9.
7. Hanus LO, Meyer SM, Munoz E, Tagliabue S, Scafati O, Appendino G. Phytocannabinoids : a unified critical inventory. Nat Prod Rep 2016; 33(12) : 1357-92.
8. Hill AJ, Williams CM, Whalley BJ, Stephens GJ. Phytocannabinoids as novel therapeutic agents in CNS disorders. Pharmacol Ther 2012; 133(1) : 79-97.
9. Daris B, Tancer Verboten M, Knez Z, Ferk P. Cannabinoids in cancer treatment : therapeutic potential and legislation. Bosn J Basic Med Sci 2019; 19(1) : 14-23.
10. Szaflarski JP, Bebin EM, Cutter G, DeWolfe J, Dure LS, Gaston TE, et al. Cannabidiol improves frequency and severity of seizures and reduces adverse events in an open-label add-on prospective study. Epilepsy Behav 2018; 87 : 131-6.
11. Vuckovic S, Srebro D, Vujovic KS, Vucetic C, Prostran M. Cannabinoids and pain : new insights from old molecules. Front Pharmacol 2018; 9 : 1259. (19 pages).
12. National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine; Health and Medicine Division; Board on Population Health and Public Health Practice; Committee on the Health Effects of Marijuana : An Evidence Review and Research Agenda. The health effects of cannabis and cannabinoids : the current state of evidence and recommendations for research. Washington, DC : National Academies Press; 2017.

13. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Test No. 471 : bacterial reverse mutation test. [online]. 2020; [cited 2020 Jun 28]; [11 screens]. Available from : URL : https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-471-bacterial-reverse-mutation-test_9789264071247-en.
14. Marx TK, Reddeman R, Clewell AE, Endres JR, Béres E, Vértési A, et al. An assessment of the genotoxicity and subchronic toxicity of a supercritical fluid extract of the aerial parts of hemp. *J Toxicol* 2018; 2018 : 8143582. (26 pages).
15. Dziwenka M, Coppock R, Alexander M, Palumbo E, Ramirez C, Lerner S. Safety assessment of a hemp extract using genotoxicity and oral repeat-dose toxicity studies in Sprague-Dawley rats. *Toxicol Rep* 2020; 7 : 376-85.
16. Jeun JA, Cho HJ, Jun HJ, Lee JH, Jia YY, Cho KS, et al. Mutagenic and antimutagenic effects of hemp seed oil evaluated by Ames Salmonella testing. *Korean J Food Sci Tech* 2011; 43(3) : 396-400.
17. พรวา ศุภจริยาวัตร. การศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดกัญชาที่สกัดด้วยวิธีของไหลวิกฤตยิ่งยวด. ใน : เอกสารการประชุมวิชาการพิษวิทยาแห่งชาติครั้งที่ 10. วันที่ 28-29 ตุลาคม 2563. กรุงเทพฯ : สมาคมพิษวิทยาแห่งประเทศไทย; 2563. หน้า 41-53.

Investigation of Mutagenic Activity of Thai *Cannabis sativa* L. Extract

Praw Suppajariyawat¹ Sutjarit Aunkat¹ Wijittra Sudhong¹ Padtaya Sirinantananon¹
Sekrachatakorn Buabao¹ Sarayut Radapong¹ Phichet Banyati¹ Siriwan Chaisomboonphan¹
Praew Suppajariyawat² and Pornchai Sincharoenpokai¹

¹Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000

²Ministry of Justice, Prachachuen Road, Bang-sue, Bangkok 10800, Thailand

ABSTRACT *Cannabis sativa* L. is an addictive plant, which has been allowed for medical use in Thailand. This species has been recently drawn attention by the public conducting studies, research and development, and producing herbal products for medical purpose. The amount of active ingredients, the efficacy of the treatment and the safety for consumers should be taken into serious consideration. This herb has been legalized for medical purpose and daily consumption. The notification is enacted in the ministerial regulation regarding the names of narcotics in category 5, people can take advantage of any parts of cannabis and hemp (except trichomes of cannabis), which are not classified as a drug. However, toxicity and safety data are still limited. This study, therefore, aimed to investigate the mutagenic activity of the female Inflorescence extracts from three of Thai cannabis, including PTC0601, PTC0602 and PTC0729 extracted using supercritical fluid extraction and then investigated the mutagenic activity using method complied with OECD GLP test guideline 471. The four strains of *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537) and *Escherichia coli* (WP2) were treated with five different doses of the extracts at 50, 150, 500, 1,500 and 5,000 µg/plate with and without metabolic activation enzymes. The results showed that the three trichrome extracts did not produce significant revertant colonies in all strains of bacteria and all concentrations of the extracts (both non- and enzymatic activation). However, in-depth testing or mechanisms for safety in animal model should be confirmed in order to ensure that the Thai cannabis extracts can be consumed or continue to make products.

Keywords: *Cannabis sativa* L. extract, Mutagenic activity, Thai *Cannabis sativa* L.