Original Article

ผลของสารสกัดจากข้าวหอมนิลและข้าวเหนียวดำต่อสารสกัดซุปไก่ที่ทำปฏิกิริยากับโซเดียมไนไตรทโดยใช้การทดสอบเอมส์

กมลา สดับพจน์[1]*
ลินนา ทองยงค์[1]
แก้ว กังสดาลอำไพ[2]

Effect of Hom Nil Rice and Black Glutinous Rice Extracts during Treatment of Chicken Extract with Sodium Nitrite Using Ames Test.

Kamala Sadabpod[1], Linna Tongyonk[1], Kaew Kangsadalampai[2]

[1]Department of Food and Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Phathum Wan, Bangkok, 10330, Thailand.

[2]Institute of Nutrition, Mahidol University, Salaya, Nakhon Pathom, 73170, Thailand.

***E-mail: miss_amma4@yahoo.com**

Songkla Med J 2014;32(3):139-149

บทคัดย่อ:

การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าสารสกัดข้าวหอมนิลและข้าวเหนียวดำในรูปข้าวดิบ ข้าวหุง และข้าวหมัก นั้นไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์แต่จะแสดงฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์หลังทำปฏิกิริยากับไนไตรท ในการศึกษานี้เมื่อเติมสารสกัดข้าวหอมนิลและข้าวเหนียวดำในรูปข้าวดิบ ข้าวหุง และข้าวหมัก 0.8 1.2 และ 1.6 มิลลิกรัมต่อจานเลี้ยงเชื้อ พร้อมสารสกัดซุปไก่ก่อนทำปฏิกิริยากับไนไตรทด้วยการทดสอบเอมส์ โดยใช้เชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 พบว่าการเติมสารสกัดข้าวดิบและข้าวหุงเสริมฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์มากขึ้น แต่สารสกัดข้าวหมักของข้าวทั้งสองชนิดกลับสามารถลดฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารก่อกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นจากสารสกัดซุปไก่ทำปฏิกิริยากับไนไตรทได้ อาจเนื่องมาจากการหมักข้าวทำให้เกิดสารประกอบบางชนิดหรือเกิดเปลี่ยนแปลงสารบางชนิดที่ส่งผลลดการก่อกลายพันธุ์ได้ อย่างไรก็ตาม ดัชนีกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นจริง (actual mutagenicity

[1]ภาควิชาอาหารและเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
[2]สถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล อ.ศาลายา จ.นครปฐม 73170
รับต้นฉบับวันที่ 13 พฤศจิกายน 2556 รับลงตีพิมพ์วันที่ 12 มกราคม 2557

index; actual MI) จากสารผสมของสารสกัดซุปไก่และสารสกัดข้าวหลังทำปฏิกิริยากับไนไตรทน้อยกว่าดัชนีกลายพันธุ์ที่คาดว่าจะเกิดขึ้น (expected MI) ซึ่งได้จากผลรวมของค่า MI ของสารสกัดซุปไก่หลังทำปฏิกิริยากับไนไตรทและของสารสกัดข้าวหลังทำปฏิกิริยากับไนไตรทในเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ ยกเว้นสารสกัดข้าวเหนียวดำหุงปริมาณ 0.8 มิลลิกรัมต่อจานเลี้ยงเชื้อ ที่แสดงค่า actual MI สูงกว่า expected MI แต่เมื่อคำนวณเป็น percent modification แล้วถือว่าไม่มีฤทธิ์แต่อย่างใด อาจเนื่องจากสารประกอบบางชนิดในสารสกัดจากข้าวสามารถลดการเกิดปฏิกิริยา nitrosation หรือจับกับสารก่อกลายพันธุ์และ/หรืออนุมูลอิสระที่เกิดระหว่างการก่อกลายพันธุ์ หรือมีผลเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติบางอย่างของแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามควรหลีกเลี่ยงการบริโภคข้าวสองชนิดนี้ร่วมกับอาหารที่มีสารไนไตรท

คำสำคัญ: การทดสอบเอมส์, ข้าวหอมนิล, ข้าวเหนียวดำ, ฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์, ไนไตรท

Abstract:

The previous study indicated that the extracts of three form of Hom Nil rice (*Oryza sativa*) and black glutinous rice (*Oryza sativa* var. glutinosa); raw, cooked and fermented were not mutagenic. But after nitrite treatment, these rice extracts exhibited their mutagenicity. In this study, extracts of raw, cooked and fermented Hom Nil rice and black glutinous rice was explored using Ames test on *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100. Rice extracts was added to nitrite-treated chicken extract at levels of 0.8, 1.2 and 1.6 mg/plate. Addition of raw and cooked rice extracts enhanced the mutagenicity of nitrite-treated chicken extracts. However, extracts of both types of fermented rice inhibited mutagenic activity of mutagen occurred during nitrite-treated chicken extracts according to fermentation might increase some active compounds or change some certain compounds that resulting in reduced the mutagenicity of nitrite-treated chicken extracts. Nevertheless, the actual mutagenicity index (MI) of the mixture of sodium nitrite treated chicken extract in the presence of each rice extract was rather less than that of the expected MI that obtained from summation of individual MI obtained from sodium nitrite treated chicken extract and each sodium nitrite treated rice extract on both strains. Only the mixture of chicken extract and cooked black glutinous rice extract at the amount 0.8 mg/plate yielded actual MI greater than expected from summation of individual MI on *S. typhimurium* TA98. However, the cooked black glutinous rice extract showed the negligible effect. The effects of these rice extracts might be due to the presence of some antimutagen components that might reduce nitrosation reaction, and/or scavenge mutagen and/or free radicals that occur during mutagenesis, and/or changing some bacterial properties. The results from this study suggest that consumers should avoid the consumption of the black glutinous rice and Hom Nil rice with nitrite-containing food.

Keywords: Ames test, black glutinous rice, Hom Nil rice, mutagenicity, nitrite

บทนำ

ข้อมูลจำนวนการเสียชีวิตและอัตราการเสียชีวิตจำแนกตามสาเหตุการเสียชีวิต และเพศ ทั่วราชอาณาจักร พ.ศ. 2547-2554 โดยสำนักสถิติพยากรณ์ สำนักงานสถิติแห่งชาติ ระบุว่าในประเทศไทยมีผู้เสียชีวิตจากโรคมะเร็งเป็นอันดับ 1 มากกว่าโรคอื่นที่เคยเป็นปัญหาทางสาธารณสุขในอดีต เช่น โรคติดเชื้อ โรคขาดสารอาหาร โรคหัวใจและหลอดเลือด หรืออุบัติเหตุ ซึ่งจำนวนผู้ป่วยนอก จำนวนผู้ป่วยใน จำนวนการเสียชีวิต และอัตราการเสียชีวิต ที่มีสาเหตุมาจากโรคมะเร็งนั้นมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในแต่ละปีทั้งในเพศชายและเพศหญิง[1]

จากการศึกษาทางระบาดวิทยาในหลายประเทศพบว่าสารอาหารบางชนิดมีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเกิดหรือยับยั้งมะเร็งบางชนิด[2] อาหารที่ประกอบด้วยสารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพจึงมีบทบาทสำคัญต่อการป้องกันหรือลดความเสี่ยงของโรคต่างๆ เช่น โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคอัลไซเมอร์ และโรคมะเร็ง เป็นต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารพฤกษเคมี (phytochemical) ที่มีบทบาทสำคัญในร่างกาย เช่น มีส่วนช่วยในการทำงานของเอนไซม์กำจัดสารพิษ การกำจัดอนุมูลอิสระ การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย และการแสดงออกของยีนในขั้นตอนต่างๆ เป็นต้น[3]

แอนโทไซยานิน (anthocyanins) คือ รงควัตถุที่ละลายน้ำได้ จัดอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) โดยจะให้สีที่ต่างกันขึ้นกับสภาวะและโครงสร้างของสาร โดยคุณสมบัติและปริมาณของ anthocyanins ที่พบในพืชนั้นแตกต่างกันขึ้นกับปัจจัยต่างๆ เช่น ชนิดหรือสายพันธุ์ของพืช สภาวะที่พืชเจริญเติบโต เช่น แสงและอุณหภูมิ ระยะเวลาและสภาพในการเก็บรักษาหลังการเก็บเกี่ยว โดยสาร anthocyanins จะเกิดการสลายตัวจากปัจจัยต่างๆ เช่น สภาวะด่าง อุณหภูมิสูงและเอนไซม์บางชนิด (เช่น glucosidase)[4] สาร anthocyanins จะถูกดูดซึมในส่วนลำไส้ในระดับต่ำและมีปริมาณออกมากับอุจจาระน้อยมาก เนื่องจากเมื่อผ่านเข้าสู่ลำไส้แล้วจะถูกไฮโดรไลซ์โดยเอนไซม์จากลำไส้และแบคทีเรียในลำไส้[5] anthocyanins พบได้ในส่วนต่างๆ ของพืชชั้นสูงโดยเฉพาะส่วนดอกและผลที่มีสีม่วงและสีแดง เช่น ดอกผักบุ้ง ผลองุ่นแดง และผลเบอร์รี่ชนิดต่างๆ มีการนำไปใช้เป็นสารแต่งสีอาหารทดแทนการใช้สารแต่งสีสังเคราะห์ หรือนำมารับประทานเพื่อหวังผลทางสุขภาพต่างๆ ซึ่งคุณสมบัติที่สำคัญที่สุดของสาร anthocyanins คือ การเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูงจึงอาจมีส่วนสำคัญเกี่ยวกับโรคต่างๆ ที่เกิดขึ้นจากอนุมูลอิสระได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการช่วยยับยั้งการเกิดมะเร็งชนิดต่างๆ ได้โดยไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติ[5] ดังนั้นการเลือกบริโภคอาหารที่มี anthocyanins จึงอาจช่วยลดการเกิดโรคต่างๆ ได้ เช่น สารสกัดสีจากข้าวโพดม่วงมีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ในหนูตัวผู้ที่ได้รับ 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) และ 1,2-dimethylhydrazine[6] และมีฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ที่เกิดจากสาร 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-1)[7] การศึกษาในหนู mice ที่ถูกเลี้ยงด้วยถั่วดำซึ่งมี anthocyanins เป็นส่วนประกอบในเปลือกของเมล็ด พบว่า ดีเอ็นเอ (deoxyribonucleic acid; DNA) จะถูกทำลายจาก cyclophosphamide ต่ำกว่าหนูกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับถั่วดำ[8]

สำหรับข้าวที่เป็นอาหารหลักของประชากรไทยในบางสายพันธุ์ซึ่งมีสีดำ สีม่วงดำ และสีแดงนั้น ก็จัดเป็นแหล่งของ anthocyanins เช่นเดียวกัน เช่น ข้าวหอมนิล ข้าวเหนียวดำ ข้าวสังข์หยด และข้าวหอมแดง เป็นต้น โดยมีการศึกษาชนิดของสาร anthocyanins ที่พบได้ในข้าวสีแดงและสีม่วงดำ ได้แก่ สีม่วงเข้มจาก cyanidin-3-glucoside สีชมพูอ่อนจาก peonidin-3-glucoside และสีน้ำตาลจาก procyanidin ผสมกัน อาจพบสาร pelargonidin-3,5-diglucoside และ malvidin อยู่ด้วย ซึ่งสารดังกล่าวทั้งหมดนี้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ[9-11] โดยมีการศึกษาเกี่ยวกับประโยชน์ต่อสุขภาพของ anthocyanins ในข้าวต่างๆ เช่น สารสกัดจากข้าวสีดำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยป้องกันการทำลาย DNA และลดการเกิด LDL-cholesterol ในการทดลองแบบ *in vitro*[12] สามารถยับยั้งการแพร่กระจายและการเคลื่อนที่ของ SKHep-1 cells รวมทั้งทำให้การทำงานของ matrix

metalloproteinase (MMP)-9 และ urokinase-type plasminogen activator (u-PA) ลดลง นอกจากนี้ยังยับยั้งการจับคู่ของสาย DNA และกระบวนการ nuclear translocation ของเซลล์ AP-1 และลดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งอีกหลายตัว ได้แก่ SCC-4, Huh-7 และ HeLa ในการทดลองแบบ *in vivo*[13]

ข้าวเจ้าหอมนิล เกิดจากข้าวนิลซึ่งเป็นข้าวเจ้าสีดำที่มีเมล็ดใสสีม่วงเข้มที่ได้จากการคัดพันธุ์กลายของข้าวเหนียวดำต้นเตี้ยจากประเทศจีนผสมพันธุ์กับข้าวหอมมะลิโดยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ข้าวกล้องของข้าวเจ้าหอมนิลหุงสุก จะนุ่ม มีกลิ่นหอมแบบข้าวเหนียวดำและข้าวหอม เหนียวนุ่ม เมล็ดยาว และมีโภชนาการและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวขาว และมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระสูงประมาณ 293 ไมโครโมลต่อกรัม[14] ส่วนข้าวเหนียวดำหรือข้าวก่ำมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Oryza glutinosa L.* เป็นข้าวมีสีของไทยที่รู้จักมานาน โดยข้าวมีสีม่วงจนถึงดำและให้คุณค่าทางโภชนาการมากกว่าข้าวเหนียว[15]

สารก่อกลายพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษานี้ คือ ซุปไก่สกัดทำปฏิกิริยากับไนไตรท การต้มเนื้อไก่เป็นเวลานานติดต่อกันหลายชั่วโมง จะทำให้เกิดสารก่อกลายพันธุ์ในกลุ่ม heterocyclic amines (HCAs)[16-18] ซึ่งมีการศึกษาโดยวิธีเอมส์พบว่าซุปไก่สกัดไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์โดยตรง แต่เมื่อทำปฏิกิริยากับไนไตรทในสภาวะกรด (pH 3.0-3.5) พบว่ามีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ต่อเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* ทั้งสายพันธุ์ TA98 และ TA100 แบบ frameshift และ base-pair substitution ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเกิดจากปฏิกิริยา nitrosation ทำให้เกิดสารก่อกลายพันธุ์โดยตรง เช่น สารประกอบไนโตรโซ (nitroso compound)[19]

ในการศึกษานี้จะทำการประเมินและเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสกัดจากข้าวหอมนิลและข้าวเหนียวดำในรูปข้าวสาร ข้าวหุงสุก และข้าวหมัก ในการยับยั้งการเกิดสารก่อกลายพันธุ์จากซุปไก่สกัดที่ทำปฏิกิริยากับไนไตรทโดยวิธีทดสอบเอมส์ โดยข้อมูลที่จะได้จากการวิจัยนี้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงเพื่อส่งเสริมให้ประชาชนหันมาบริโภคข้าวหอมนิลและข้าวเหนียวดำต่อไป

วัสดุและวิธีการ

1. สารเคมีและเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้

สารก่อกลายพันธุ์ 1-Aminopyrene (1-AP) จาก Aldrich สารเคมีจาก Merck คือ methanol, L-Histidine monohydrochloride, sodium chloride, hydrochloric acid, magnesium sulfate heptahydrate, citric acid monohydrate, potassium chloride, di-sodium hydrogen phosphate และ Bacto agar สารเคมีจาก Sigma คือ D-Biotin และ ammonium sulfamate สารเคมีจาก Fluka คือ D(+)-Glucose monohydrate, sodium ammonium hydrogen phosphate tetrahydrate สารเคมีจาก BDH Chemical คือ sodium nitrite ส่วน Oxoid nutrient broth No.2 จาก Oxoid

2. การเตรียมตัวอย่างอาหาร

2.1. การเตรียมตัวอย่างสารสกัดซุปไก่

นำซุปไก่สกัดที่มีจำหน่ายในห้างสรรพสินค้ามาทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator) ที่ 45 องศาเซลเซียส จากนั้นทำให้แห้งโดยใช้เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze drier) แล้วจึงนำมาบดเป็นผงละเอียด นำมาละลายด้วยน้ำที่ความเข้มข้น 0.486 กรัมต่อมิลลิลิตร แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อโรค (autoclave) ก่อนนำมาใช้

2.2. การเตรียมตัวอย่างอาหาร

ข้าวหอมนิลและข้าวเหนียวดำมาจากห้างสรรพสินค้าในกรุงเทพฯ ข้าวดิบเตรียมโดยนำข้าวมาล้างด้วยน้ำประปา ข้าวสุกเตรียมโดยใช้หม้อหุงข้าวไฟฟ้าหุงด้วยน้ำกลั่นอัตราส่วน 2 ลิตรต่อข้าวดิบ 1 กิโลกรัม และข้าวหมักเตรียมโดยใช้ลูกแป้งสำหรับทำข้าวหมาก 1 ชิ้นต่อข้าวดิบ 1 กิโลกรัม นำมาหมักกับข้าวหุงสุกแล้ว ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 48 ชั่วโมง จากนั้นตัวอย่างข้าวทั้งหมดจะถูกอบที่ 40 องศาเซลเซียส ด้วยตู้อบลมร้อน (hot air oven) จนแห้งแล้วนำมาบดให้เป็นผงด้วยเครื่องปั่นผสมอาหาร ตัวอย่างข้าวแต่ละชนิดจะถูกสกัด 3 ครั้ง ครั้งละ 24 ชั่วโมง ด้วย acid alcohol

(0.1 N acetic acid ใน ethanol ที่ความเข้มข้นร้อยละ 70) 1.5 ลิตรต่อผงข้าว 1 กิโลกรัม สารสกัดที่ได้มาระเหยโดยใช้เครื่อง rotary evaporator แล้วทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง freeze drier สารสกัดข้าวที่ได้จะเก็บในขวดป้องกันแสงที่อุณหภูมิต่ำกว่า 5 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้

3. การศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์

3.1. การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์สำหรับทำการศึกษา

นำเชื้อ 10 ไมโครลิตร *S. typhimurium* TA98 และ TA100 มาเลี้ยงในอาหาร oxiod nutrient broth No. 2 (12 มิลลิลิตร) แล้วบ่มในเครื่องเขย่าพร้อมระบบควบคุมอุณหภูมิ (orbital shaking incubator) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที นาน 16 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางเชื้อลง 8 เท่าด้วย sodium chloride ความเข้มข้นร้อยละ 0.9 เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ให้มีค่าอยู่ในช่วง 0.3-0.4

3.2. ฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดข้าว

เติมสารละลายสารสกัดข้าว 50 75 หรือ 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง ปรับปริมาตรเป็น 300 ไมโครลิตร เติม 0.2 N hydrochloric acid 550 ไมโครลิตร และ 2 M sodium nitrite 250 ไมโครลิตร ตามลำดับ หลังจากนั้นนำสารที่เตรียมได้ไป incubate บน orbital shaking water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยการแช่ในน้ำแข็งนาน 1 นาที และทำการเติม 2 M ammonium sulfamate 250 ไมโครลิตร ลงในหลอดและนำไปแช่ในน้ำแข็งอีก 10 นาที หลังจากนั้นจึงทำขั้นตอน pre-incubation โดยนำหลอดทดลองใหม่มาเติม sodium phosphate-potassium chloride buffer pH 7.4 500 ไมโครลิตร และสารละลายที่ได้จากการทำปฏิกิริยากับไนไตรทข้างต้นจำนวน 100 ไมโครลิตร จากนั้นจึงเติม 100 ไมโครลิตร ของเชื้อ *S. typhimurium* TA98 หรือ TA100 ที่เตรียมไว้แล้ว incubate บน orbital shaking water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เติม top agar (ที่ผสม histidine และ biotin แล้ว) ปริมาณ 2 มิลลิลิตร ลงไป จากนั้นนำไปเทบนจานเลี้ยงเชื้อ แล้วนำจานเลี้ยงเชื้อไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาจึงนับจำนวนโคโลนีที่เจริญขึ้น แล้วนำจำนวนโคโลนีที่ได้มาคำนวณหาดัชนีการกลายพันธุ์ (mutagenicity index; MI) เพื่อดูจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้น โดยคำนวณจากจำนวนโคโลนีเฉลี่ยที่ได้จากการทดสอบสารสกัดข้าวหลังทำปฏิกิริยากับไนไตรท 3 ซ้ำ หารด้วยจำนวนโคโลนีเฉลี่ยที่ได้จาก negative control (ใช้น้ำปราศจากเชื้อ) ที่ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยค่า MI ที่มีค่ามากกว่า 2 และเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่ทดสอบหมายถึงสารนั้นมีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์

4. การศึกษาการต้านการเกิดสารก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดซุปไก่หลังทำปฏิกิริยากับไนไตรท

เติมสารสกัดข้าวความเข้มข้น 216 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 50 75 หรือ 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองจากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากเชื้อจนครบ 100 ไมโครลิตร แล้วจึงเติมสารละลายสารสกัดซุปไก่ 200 ไมโครลิตร 0.2 N hydrochloric acid 740 ไมโครลิตร และ 2 M sodium nitrite 250 ไมโครลิตร ตามลำดับ ก่อนนำไป incubate บน orbital shaking water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด หยุดปฏิกิริยาด้วยการแช่ในน้ำแข็งนาน 1 นาที แล้วเติม 2 M ammonium sulfamate 250 ไมโครลิตร ลงในทั้งสองหลอด และแช่ในน้ำแข็งอีก 10 นาที ก่อนทำขั้นตอน pre-incubation เช่นเดียวกับข้างต้น แล้วจึงนับจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้น นำไปคำนวณค่า MI (actual MI) และทำการเปรียบเทียบกับค่า MI ที่คาดว่าจะเกิดขึ้น (expected MI) ซึ่งได้จากค่า MI ของสารสกัดซุปไก่หลังทำปฏิกิริยากับไนไตรทบวกกับค่า MI ของสารสกัดข้าวหลังทำปฏิกิริยากับไนไตรท นำค่าที่ได้ไปคำนวณเป็น percent modification จากสูตร: percent modification = [(expected MI - actual MI) x 100]/ expected MI ซึ่งแสดงถึงการปรับเปลี่ยนฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดซุปไก่หลังทำปฏิกิริยากับไนไตรท

หาก percent modification เป็นบวกแสดงว่ามีฤทธิ์ลดการเกิดสารก่อกลายพันธุ์ได้ ถ้าค่าเป็นลบแสดงว่ามีฤทธิ์เสริมการเกิดสารก่อกลายพันธุ์ โดยแบ่งเป็นระดับต่างๆ คือ ร้อยละ 0-20 ไม่มีฤทธิ์ ร้อยละ 20-40 มีฤทธิ์อ่อน ร้อยละ 40-60 มีฤทธิ์ปานกลาง และมากกว่าร้อยละ 60 มีฤทธิ์สูง[20]

ผลการศึกษา

1. ฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดข้าว

สารสกัดข้าวแต่ละชนิดในปริมาณ 0.8 1.2 และ 1.6 มิลลิกรัมต่อจานเลี้ยงเชื้อ หลังจากทำปฏิกิริยากับไนไตรทแล้วมีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ต่อ *S. typhimurium* TA98 และ TA100 โดยได้จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์มากกว่า 2 เท่าของจำนวนโคโลนีเฉลี่ยที่ได้จาก negative control (ไม่ได้แสดงข้อมูล) และ mutagenicity index ที่ได้นั้นแสดงดังตารางที่ 1 และ 2

2. ผลของสารสกัดข้าวในการต้านการเกิดสารก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดซุปไก่ที่ทำปฏิกิริยากับไนไตรท

เมื่อเติมสารสกัดข้าวในปริมาณ 0.8 1.2 และ 1.6 มิลลิกรัมต่อจานเลี้ยงเชื้อ ร่วมกับสารสกัดซุปไก่ก่อนทำปฏิกิริยากับไนไตรทพบว่าสารสกัดข้าวหมักของข้าวทั้งสองชนิดทำให้เกิดจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ที่น้อยกว่าสารสกัดซุปไก่ที่ทำปฏิกิริยากับไนไตรทในเชื้อ *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 แต่เมื่อเติมสารสกัดของข้าวดิบและข้าวหุงของข้าวทั้งสองชนิดพบว่าทำให้เกิดจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ที่เพิ่มสูงขึ้นกว่าสารสกัดซุปไก่ที่ทำปฏิกิริยากับไนไตรท และทำให้ค่า MI เพิ่มสูงขึ้นทั้งในเชื้อ *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 (ไม่ได้แสดงข้อมูล) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบดัชนีกลายพันธุ์ที่คาดว่าจะเกิดขึ้น (expected MI) ที่ได้จากผลรวมของค่า MI ของสารสกัดซุปไก่หลังทำปฏิกิริยากับไนไตรทและของสารสกัดข้าวหลังทำปฏิกิริยากับไนไตรทกับดัชนีกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นจริง (actual MI) จากสารผสมของสารสกัดซุปไก่และสารสกัดข้าวหลังทำปฏิกิริยากับไนไตรทพบว่ามีค่าต่ำกว่าที่คำนวณได้ในเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ ยกเว้นสารสกัดข้าวเหนียวดำหุงที่ปริมาณ 0.8 มิลลิกรัมต่อจานเลี้ยงเชื้อที่แสดงค่า actual MI ที่สูงกว่า expected MI แต่เมื่อนำมาคำนวณเป็น percent modification แล้วถือว่าไม่มีฤทธิ์แต่อย่างใด ดังนั้นการเติมสารสกัดข้าวในสารสกัดซุปไก่ก่อนทำปฏิกิริยากับไนไตรทเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จึงช่วยลดการก่อกลายพันธุ์ของทั้งสารสกัดซุปไก่และสารสกัดข้าวได้ ดังแสดงในตารางที่ 1 และ 2

วิจารณ์

สารสกัดซุปไก่และสารสกัดข้าวหอมนิลและข้าวเหนียวดำในรูปข้าวดิบ ข้าวหุง และข้าวหมัก นั้นแสดงฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ต่อ *S. typhimurium* ทั้งสายพันธุ์ TA98 และ TA100 หลังจากทำปฏิกิริยากับไนไตรทที่สภาวะกรดในระบบที่ไม่มีเอนไซม์กระตุ้น อาจเนื่องจากสารสกัดข้าวมีสารประกอบบางชนิดเกิดเป็น nitrosated products ที่สามารถทำให้เกิดการก่อกลายพันธุ์แบบ frameshift (TA98) และแบบ base-pair substitution (TA100) ดังในการศึกษาของ กมลา สดับพจน์ และคณะ[21] ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้พบว่าการเติมสารสกัดข้าวลงไปพร้อมสารสกัดซุปไก่ก่อนการทำปฏิกิริยากับไนไตรทที่สภาวะกรดนั้นมีเพียงสารสกัดจากข้าวหมักของข้าวทั้งสองชนิดที่มีฤทธิ์ลดการก่อกลายพันธุ์ได้ ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากสารบางชนิดในข้าวหมักสามารถยับยั้งปฏิกิริยา nitrosation ได้ หรือการหมักอาจช่วยเพิ่มปริมาณสารในกลุ่ม aglycone ที่มีฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ขึ้นได้[22,23] ส่วนการเติมสารสกัดจากข้าวดิบและข้าวหุงของข้าวทั้งสองชนิดลงไปพร้อมสารสกัดซุปไก่ก่อนการทำปฏิกิริยากับไนไตรทนั้นไม่ได้ทำให้จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์น้อยกว่าการไม่เติมสารสกัดข้าว แต่พบว่าฤทธิ์ที่ควรจะเสริมการก่อกลายพันธุ์กันของสารสกัดข้าวและสารสกัดซุปไก่เมื่อทำปฏิกิริยากับไนไตรทที่สภาวะกรดนั้นกลับลดลงเมื่อมีการเติมสารสกัดข้าวก่อนการทำปฏิกิริยากับไนไตรท เห็นได้จากการที่ค่า actual MI มีค่าน้อยกว่า expected MI ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากสารสกัดข้าวที่เติมลงไปนั้นสามารถทำปฏิกิริยากับไนไตรทได้แต่ให้ผลก่อการกลายพันธุ์ที่น้อยกว่าต่อเชื้อ *S. typhimurium* ทั้ง 2 สายพันธุ์

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบ expected MI ของสารสกัดซุปไก่และสารสกัดข้าว กับ actual MI จากสารผสมของสารสกัดซุปไก่และสารสกัดข้าวหลังทำปฏิกิริยากับไนไตรทของเชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA98 ที่สภาวะกรดในระบบที่ไม่มีเอนไซม์กระตุ้น*

สารสกัดข้าว	ปริมาณสารสกัดข้าว (มิลลิกรัมต่อจานเลี้ยงเชื้อ)	Mutagenicity index**				
		A สารสกัดซุปไก่ทำปฏิกิริยากับไนไตรท***	B สารสกัดข้าวทำปฏิกิริยากับไนไตรท	ผลรวมของ A และ B (Expected MI)	Actual MI	Percent modification
ข้าวหอมนิลดิบ	0.8	9.60	8.98	18.58	12.27	51.47
	1.2	9.60	10.01	19.61	14.93	31.32
	1.6	9.60	10.10	19.70	15.67	25.74
ข้าวหอมนิลหุง	0.8	4.83	7.17	12.00	6.53	83.88
	1.2	4.83	8.13	12.96	7.67	69.09
	1.6	4.83	9.07	13.90	8.22	69.09
ข้าวหอมนิลหมัก	0.8	8.24	1.61	9.85	7.38	33.43
	1.2	8.24	1.85	1.09	7.62	32.41
	1.6	8.24	1.96	10.20	7.71	32.20
ข้าวเหนียวดำดิบ	0.8	9.40	5.67	15.07	10.93	37.84
	1.2	9.40	7.38	16.78	11.53	45.49
	1.6	9.40	7.58	16.98	16.87	0.67
ข้าวเหนียวดำหุง	0.8	7.83	3.40	11.23	11.61	-3.25
	1.2	7.83	6.88	14.71	13.22	11.28
	1.6	7.83	7.23	15.06	13.61	10.67
ข้าวเหนียวดำหมัก	0.8	8.06	1.97	10.03	7.44	34.67
	1.2	8.06	3.10	11.16	7.50	48.74
	1.6	8.06	3.33	11.39	8.50	33.95

*เมื่อใช้สารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน 1-aminopyrene (0.075 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 10 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับ sodium nitrite ได้จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้น 2103±95 โคโลนีต่อจานเลี้ยงเชื้อ

**Mutagenicity index (MI) คำนวณจากค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นต่อจานเลี้ยงเชื้อหารด้วยค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ โดยค่าเฉลี่ยได้มาจากการทดลอง 2 ครั้ง ครั้งละ 3 จานเลี้ยงเชื้อ (N=6)

***ค่า MI สารสกัดซุปไก่ต่อเชื้อ *S. typhimurium* TA98 ในหลอดทดลองที่ไม่มีสารสกัดจากข้าว

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบ expected MI ของสารสกัดซุปไก่และสารสกัดข้าว กับ actual MI จากสารผสมของสารสกัดซุปไก่และสารสกัดข้าวหลังทำปฏิกิริยากับไนไตรทของเชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA100 ที่สภาวะกรดในระบบที่ไม่มีเอนไซม์กระตุ้น*

สารสกัดข้าว	ปริมาณสารสกัดข้าว (มิลลิกรัมต่อจานเลี้ยงเชื้อ)	Mutagenicity index**				
		A สารสกัดซุปไก่ทำปฏิกิริยากับไนไตรท***	B สารสกัดข้าวทำปฏิกิริยากับไนไตรท	ผลรวมของ A และ B (Expected MI)	Actual MI	Percent modification
ข้าวหอมนิลดิบ	0.8	5.44	5.86	11.30	7.75	45.77
	1.2	5.44	6.00	11.44	8.33	37.30
	1.6	5.44	6.33	11.77	8.64	36.15
ข้าวหอมนิลหุง	0.8	8.53	5.70	14.23	10.44	36.32
	1.2	8.53	5.73	14.26	10.52	35.55
	1.6	8.53	5.76	14.29	10.80	32.29
ข้าวหอมนิลหมัก	0.8	7.96	1.25	9.21	6.56	40.27
	1.2	7.96	1.44	9.40	6.73	39.56
	1.6	7.96	1.68	9.64	7.14	34.90
ข้าวเหนียวดำดิบ	0.8	4.17	2.89	7.06	5.05	39.81
	1.2	4.17	3.37	7.54	5.93	27.18
	1.6	4.17	3.63	7.80	6.65	17.33
ข้าวเหนียวดำหุง	0.8	6.33	2.99	9.32	8.08	15.37
	1.2	6.33	4.27	10.60	8.60	23.24
	1.6	6.33	4.49	10.82	8.65	25.14
ข้าวเหนียวดำหมัก	0.8	5.02	1.70	6.72	4.44	51.29
	1.2	5.02	2.00	7.02	4.46	57.28
	1.6	5.02	2.48	7.50	4.91	52.87

*เมื่อใช้สารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน 1-aminopyrene (0.075 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 20 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับ sodium nitrite ได้จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้น 884±64 โคโลนีต่อจานเลี้ยงเชื้อ

**Mutagenicity index (MI) คำนวณจากค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นต่อจานเลี้ยงเชื้อหารด้วยค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ โดยค่าเฉลี่ยได้มาจากการทดลอง 2 ครั้ง ครั้งละ 3 จานเลี้ยงเชื้อ (N=6)

***ค่า MI สารสกัดซุปไก่ต่อเชื้อ *S. typhimurium* TA100 ในหลอดทดลองที่ไม่มีสารสกัดจากข้าว

สารสกัดข้าวหอมนิลและข้าวเหนียวดำอาจมีสารกลุ่ม polyphenols อยู่มาก รวมทั้งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงมาก[21] จึงอาจไปจับหรือทำปฏิกิริยากับสารบางชนิดที่เกิดขึ้นในกระบวนการ nitrosation ของสารก่อกลายพันธุ์ มีการศึกษาพบว่ากระบวนการ nitrosate reaction อาจถูกยับยั้งได้จากสารประกอบต่างๆ ในอาหาร เช่น สารที่สกัดจากผลไม้ ผัก สารประกอบฟีนอลิค และรวมไปถึงพฤกษเคมีต่างๆ[24,25] มีผลการวิจัยที่ระบุว่าสารต้านอนุมูลอิสระบางชนิด (เช่น flavonoids) และกรดอะมิโนบางชนิด (เช่น L-tryptophan) สามารถยับยั้งการเกิด heterocyclic amine ภายใต้สภาวะต่างๆ ได้[26-30] นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงสารที่มีผลยับยั้งการเกิดสาร nitro-compounds เช่น polyphenols สามารถยับยั้งการเกิด nitroso-proline ในการทดสอบการเกิดปฏิกิริยา nitrosation ในกระเพาะอาหารแบบ *in vivo*[31] สารประกอบที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสามารถยับยั้งการเกิด N-nitrosamine ได้ โดยขึ้นกับสภาวะของการเกิดปฏิกิริยาและโครงสร้างของสาร[32,33] โดยการทำหน้าที่เป็น nitrite scavengers จึงไปแข่งกับสาร amine และ amide ในการจับกับสารพวกไนไตรทที่จะมาทำปฏิกิริยาแทน[24] อย่างไรก็ตามอาจมีกลไกลที่เป็นไปได้อีกคือการแย่งจับของสารก่อกลายพันธุ์เอง จากการที่สาร nitro-compounds ของสารสกัดซุปไก่ในการศึกษานี้ต้องผ่านการเปลี่ยนโดยกระบวนการทางเมตาบอลิกภายในเซลล์แบคทีเรียเพื่อที่จะออกฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ต่อ DNA ของเชื้อ และการเติมสารสกัดข้าวซึ่งก็สามารถทำปฏิกิริยากับ sodium nitrite แล้วถูกเปลี่ยนไปเป็นสาร nitro-compounds ได้เช่นเดียวกัน อาจเข้าไปแย่งกันจับกับเอนไซม์ภายในเซลล์ของแบคทีเรียในช่วงการกระตุ้นให้ออกฤทธิ์ โดยอาจมี affinity ต่อเอนไซม์ภายในเซลล์ของแบคทีเรียมากกว่าแต่มี efficacy ต่อการจับกับ DNA ที่น้อยกว่า ทั้งนี้ Ferguson และคณะ[34] ได้ทำการเสนอกลไกที่สารต้านการกลายพันธุ์ในอาหารสามารถป้องกันการกลายพันธุ์ได้ โดยสารฟีนอลิคสามารถยับยั้งกระบวนการ nitrosation และ polyphenols รวมทั้ง anthocyanins ที่พบมากในข้าวหอมนิลและข้าวเหนียวดำ แสดงฤทธิ์กีดกันหรือแย่งจับกับสารก่อกลายพันธุ์ได้

Anthocyanins เป็นสาร flavonoids ที่พบในข้าวหอมนิลและข้าวเหนียวดำ โดยมีการศึกษาของ Hagiwara และคณะ[35] พบว่า anthocyanins อาจช่วยป้องกันการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำของสาร heterocyclic amines บางชนิดได้ นอกจากนี้ก็มีการศึกษาที่แสดงถึงฤทธิ์ในการเป็นสาร antitoxic และ anti-carcinogenic เช่น กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ phase II detoxification และเป็นตัวจับกับ reactive oxygen species (ROS) ลดการเกิดออกซิเดชันของสารที่จะไปจับกับ DNA จึงไปยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ โดยสารพิษจากสิ่งแวดล้อมและสารก่อมะเร็ง กระตุ้นการเกิด cell apoptosis และต้านการอักเสบ เป็นต้น[36] ยิ่งไปกว่านั้น anthocyanins ยังช่วยลด oxidative stress ที่เกิดจาก nitric oxide จึงช่วยลดการเกิดโรคทางหลอดเลือดหัวใจและโรคที่เกี่ยวกับการอักเสบได้[37]

จากการศึกษานี้เป็นเพียงการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดข้าวโดยใช้สารก่อกลายพันธุ์คือสารสกัดซุปไก่ทำปฏิกิริยากับไนไตรท ในขณะที่ผลของการเติมสารสกัดจากข้าวลงไปหลังจาก 1-AP ทำปฏิกิริยากับไนไตรทแล้วพบว่ามีฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ของ 1-AP ที่ทำปฏิกิริยากับไนไตรทได้ค่อนข้างดี[21] จึงควรทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงฤทธิ์ในการต้านการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดข้าวโดยใช้การทดลองด้วยระบบต่างๆ และใช้สารก่อกลายพันธุ์ที่แตกต่างกัน รวมถึงกลไกที่เกิดขึ้นและสารสำคัญที่พบในสารสกัดข้าวทั้ง 6 ตัวอย่าง ต่อไป

สรุป

ข้าวหอมนิลและข้าวเหนียวดำในรูปข้าวดิบ ข้าวหุง และข้าวหมัก สามารถช่วยลดฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดซุปไก่ได้เมื่อผสมสารสกัดข้าวกับสารสกัดซุปไก่ก่อนทำปฏิกิริยากับไนไตรทที่สภาวะกรดในระบบที่ไม่มีเอนไซม์กระตุ้น ดังนั้นการรับประทานข้าวหอมนิลและข้าวเหนียวดำพร้อมกับอาหารที่อาจก่อให้เกิดการกลายพันธุ์อาจช่วยลดความเสี่ยง

ในการเกิดการกลายพันธุ์ได้ แต่อย่างไรก็ตาม ควรหลีกเลี่ยงการรับประทานข้าวสองชนิดนี้ร่วมกับอาหารที่มีสารไนไตรท

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิต บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2552

เอกสารอ้างอิง

1. National Statistical Office of Thailand. Number of patients/causes of death [homepage on the Internet]. Bangkok: National Statistical Office of Thailand [cited 2014 Jan 3]. Available from: http://service.nso.go.th/nso/web/statseries/statseries09.html
2. Kangsadalampai K. Food and nutrition toxicology. Bangkok: Machalongkhun-CSB; 2546.
3. Liu RH. Health benefits of fruits and vegetables are from additive and synergistic combination of phytochemicals. Am J Clin Nutr 2003; 78 (Suppl 3): S517 - 20.
4. Markakis P. Anthocyanins as food colors. New York: Academic Press; 1982.
5. Galvano F, La Fauci L, Lazzarino G, et al. Cyanidins: metabolism and biological properties. J Nutr Biochem 2004; 15: 2 - 11.
6. Hagiwara A, Miyashita K, Nakanishi T, et al. Pronouced inhibition by a natural anthocyanin, purplecorn color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*] pyridine (Phip)- associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1,2-dimethyl-hydrazine. Cancer Lett 2001; 171: 17 - 25.
7. Pedreschi R, Cisneros-Zevallos L. Antimutagenic and antioxidant properties of phenolic fractions from Andean purple corn (*Zea mays* L.). J Agric Food Chem 2006; 54: 4557 - 67.
8. Azevedo L, Gomes JC, Stringheta PC, et al. Black bean (*Phaseolu svulgaris* L.) as a protective agent against DNA damage in mice. Food Chem Toxicol 2003; 40: 1671 - 6.
9. Ryu SN, Park SZ, Ho CT. High performance liquid chromatographic determination of anthocyanin pigments in some varieties of black rice. J Food Drug Anal 1998; 6: 729 - 36.
10. Escribano-Bailón MT, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo JC. Anthocyanins in cereals. J Chromatog A 2004; 1054: 129 - 41.
11. Zhang MW, Guo BJ, Zhang RF, et al. Separation, purification and identification of antioxidant compositions in black rice. Agric Sci China 2006; 5: 431 - 40.
12. Hu C, Zawistowski J, Ling W, et al. Black rice (*Oryza sativa* L. *indica*) pigmented fraction suppresses both reactive oxygen species and nitric oxide in chemical and biological model systems. J Agric Food Chem 2003; 51: 5271 - 7.
13. Chen PN, Kuo WH, Chiang CL, et al. Black rice anthocyanins inhibit cancer cells invasion via repressions of MMPs and u-PA expression. Chem-Biol Int 2006; 163: 218 - 29.
14. Kukam-oo A, Noenplab A, Im-mak S, et al. Assessment of the nutritional value of different color rice. Proceedings of rice and temperate cereal rops annual conference 2008; 2008 Apr 8-10; Chonburi, Thailand. Bangkok: Bureau of Rice Research and Development, Rice Department; 2008; 336 - 51.
15. Praditduang S. The dimensions of rice against disease. Bangkok: Tana Press; 2551.
16. Matsumoto T, Yoshida D, Tomita H. Determination of mutagens, amino-α-carbolines in grilled foods and cigarette smoke condensate. Cancer Lett 1981; 12: 105 - 110.
17. Skog K, Jägerstad M. Incorporation of carbon-atoms from glucose into the food mutagens MeIQx and 4,8-DiMeIQx using ^{14}C-labelled glucose in a model system. Carcinog 1993; 14: 2027 - 31.
18. Bermudo E, Ruiz-Calero V, Puignou L, et al. Analysis of heterocyclic amines in chicken by liquid chromatography with electrochemical detection. Anal Chim Acta 2005; 536: 83 - 90.
19. Peerawong K, Kangsadalampai K. Mutagenic potential of various chicken extracts after nitrosation. Mahidol J 1998; 5: 5 - 8.

20. Calomme M, Pieters L, Vlirtnck A, et al. Inhibition of bacterial mutagenesis by citrus flavonoids. Planta Med 1996; 62: 222 - 6.
21. Sadabpod K, Kangsadalampai K, Tongyonk L. Antioxidant activity and antimutagenicity of Hom Nil rice and black glutinous rice. J Health Res 2010; 24: 49 - 54.
22. Đorđević TM, Šiler-Marinkovića SS, Dimitrijević-Brankovića SI. Effect of fermentation on antioxidant properties of some cereals and pseudo cereals. Food Chem 2009; 119: 957 - 63.
23. Lee IH, Chou CC. Distribution profiles of isoflavone isomers in black bean kojis prepared with various filamentous fungi. J Agric Food Chem 2006; 54: 1309 - 14.
24. Biaudet H, Pignatelli B, Dedry G. N-Nitroso compound. In: Nullet LML, editor. Handbook of food analysis. New York: Marcel Dekker; 1996; volume 2, p.1605 - 13.
25. Bartsch H, Ohshima H, Pignatelli B. Inhibitors of endogenous nitrosation. Mechanism and implications in human cancer prevention. Mutat Res 1988; 202: 307 - 24.
26. Weisburger JH, Jones RC. Prevention of formation of important mutagens/carcinogens in the human food chain. In: Kuroda Y, Shankel DM, Waters MD, editors. Antimutagenesis and anticarcinogenesis mechanisms II. New York: Plenum Press; 1990; p.105 - 18.
27. Yen GC, Chau CF. Inhibition by xylose-lysine maillard reaction products of the formation of MeIQx in a heated creatinine, glycine, and glucose model system. Biosci Biotech Biochem 1993; 57: 664 - 5.
28. Yen GC, Hsieh PP. Possible mechanisms of anti-mutagenic effect of maillard reaction products prepared from xylose and lysine. J Agric Food Chem 1994; 42: 133 - 7.
29. Yen GC, Lii JD. Influence of the reaction conditions on the antimutagenic affect of maillard reaction product derived from xylose and lysine. J Agric Food Chem 1992; 40: 1034 - 7.
30. Oguri A, Suda M, Totsuka Y, et al. Inhibitory effects of antioxidants on formation of heterocyclic amines. Mutat Res 1998; 402: 237 - 45.
31. Mirvish SS. Role of N-nitroso compound (NOC) and N-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of know exposures to NOC. Cancer Lett 1995; 93: 17 - 48.
32. You WC, Zhang L, Yang CS, et al. Nitrite, N-nitroso compounds and other analytes in physiological fluids in relation to precancerous gastric lesion. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1996; 5: 47 - 52.
33. Serafini M, Bellocco R, Wolk A, et al. Total antioxidant potential of fruit and vegetables and risk of gastric cancer. Gastroenterology 2002; 123: 985 - 91.
34. Ferguson LR, Philpotta M, Karunasinghea N. Dietary cancer and prevention using antimutagens. Toxicol 2004; 198: 147 - 59.
35. Hagiwara A, Miyashitaa K, Nakanishia T, et al. Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in the male F344 rats pretreated with 1,2-dimethylhydrazine. Cancer Lett 2001; 171: 17 - 25.
36. Wang LS, Stoner GD. Anthocyanins and their role in cancer prevention. Cancer Letters 2008; 269: 281 - 90.
37. Wang J, Mazza G. Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor alpha in LPS/IFN-gamma-activated Raw 264.7 macrophages. J Agr Food Chem 2002; 50: 4183 - 9.