นิพนธ์ต้นฉบับ

การศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดปอบิด

พราว ศุภจริยาวัตร[*,#], สุจริต อุ่นกาศ[*], วิจิตรา สุดห่วง[*], เสกรชตกร บัวเบา[†], พรชัย สินเจริญโภไคย[*]

[*] *ห้องปฏิบัติการพิษวิทยา สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000*

[†] *ศูนย์ตรวจสอบและรับรองคุณภาพสมุนไพร สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000*

[#] ***ผู้รับผิดชอบบทความ*** : *praw.s@dmsc.mail.go.th*

บทคัดย่อ

ปอบิด (*Helicteres isora* L.) เป็นพืชที่ได้รับความสนใจจากประชาชนทั่วไปและนักวิจัยเป็นอย่างมาก โดยอ้างถึงสรรพคุณในการป้องกันและรักษาโรค รวมถึงผลิตภัณฑ์สมุนไพรปอบิด มีการวางจำหน่ายและการบริโภคของประชาชนอย่างแพร่หลาย แต่ข้อมูลด้านพิษวิทยาและความปลอดภัยมีอยู่น้อย การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดปอบิด 2 รูปแบบ (สกัดด้วยน้ำและ 95% เอทานอล) โดยใช้วิธีอ้างอิงจาก OECD test guideline 471 ใช้เชื้อ *Salmonella typhimurium* 4 สายพันธุ์ (TA98, TA100, TA1535, TA1537) และ *Escherichia coli* WP2 ที่ขนาดทดสอบ 5 ระดับ (625, 1,250, 2,500, 5,000 และ 10,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ในระบบที่ไม่มีเอนไซม์กระตุ้น ผลการทดลองพบว่าสารสกัดปอบิดด้วยน้ำ ทุกขนาดทดสอบทุกสายพันธุ์ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ และ background lawn ปกติ ส่วนสารสกัดปอบิดด้วย 95% เอทานอล ผลการทดลองพบว่า ทุกขนาดทดสอบทุกสายพันธุ์ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ แต่ในสายพันธุ์ TA100 เกิด killing effect ที่ขนาดทดสอบ 10,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ TA1537 เกิด killing effect ที่ขนาดทดสอบมากกว่า 2,500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร การศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นในเบื้องต้นว่า สารสกัดปอบิดด้วยน้ำอาจจะมีความปลอดภัยในการนำมาใช้เป็นส่วนประกอบผลิตภัณฑ์ในขนาดที่ทดสอบ แต่สารสกัดปอบิดด้วย 95% เอทานอล หากจะนำมาใช้ ความเข้มข้นต้องไม่เกิน 2,500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ผลที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นเรื่องความปลอดภัยและเตือนภัยการใช้ผลิตภัณฑ์ปอบิดแก่ประชาชน

คำสำคัญ: การก่อกลายพันธุ์, สารสกัดปอบิด, การทดสอบเอมส์

Received date 29/05/20; Revised date 01/10/20; Accepted date 30/10/20

Investigation of Mutagenic Activity of *Helicteres isora* L. Extract

Praw Suppajariyawat[*,#], Sutjarit Aunkat[*], Wijitra sudhong[*], Sekrachatakorn Buabao[†], Pornchai Sincharoenpokai[*]

[*] *Toxicology Laboratory, Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Tiwanon Rd, Nonthaburi 11000, Thailand*

[†] *Herbal Quality Assurance Center, Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Tiwanon Rd, Nonthaburi 11000, Thailand*

[#] ***Corresponding author:*** *praw.s@dmsc.mail.go.th*

Abstract

Helicteres isora L. (porbid, in Thai) is one of the medicinal plants that has gained special attention from researchers and the public regarding its preventive and therapeutic properties for some diseases. More interestingly, the products of this herb have been launched and consumed widely by the people, but their toxicity and safety data are still limited. This study aimed to investigate the mutagenic activity of two forms of *H. isora* L.'s extract based on the OECD GLP test guideline 471. Four strains of *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537) and *Escherichia coli* (WP2) were treated with five different concentrations of the extract (625, 1,250, 2,500, 5,000 and 10,000 µg/ml) without any metabolic activation enzyme. The results showed that the aqueous extract did not produce revertant colonies and showed a normal background lawn compared to the control in all extract concentrations and all bacterial strains. However, the 95% ethanol extract did not produce revertant colonies compared to the control in all concentrations and all strains, but the background lawn of TA100 exhibited the killing effect at 10,000 μg/ml; and also in TA1537, the killing effect was found at concentrations higher than 2,500 μg/ml. In conclusion, the compound did not cause mutagenicity. This preliminary study indicated that the aqueous compound may be safe for using as a product component at the treated doses. It was noted that the 95% ethanol compound should not be used at the extract concentration of more than 2,500 μg/ml. The data from this research can be used as safety data and for public warning of this herbal product.

Key words: mutagenic activity, *Helicteres isora* L.'s extract, Ames test

บทนำและวัตถุประสงค์

ปัจจุบันการใช้สมุนไพรเพื่อการรักษาโรคและส่งเสริมสุขภาพได้รับการยอมรับและนิยมอย่างแพร่หลาย โดยการใช้สมุนไพรอาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับผู้ป่วยที่ยังไม่พึงพอใจกับประสิทธิผลของยาแผนปัจจุบันหรือมีข้อจำกัดในการเข้าถึงยาแผนปัจจุบันที่มักจะมีราคาแพง และส่วนใหญ่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ หรือมีผลข้างเคียงอันไม่พึงประสงค์จากการใช้ยาแผนปัจจุบัน เป็นต้น ในปัจจุบันสมุนไพรถูกใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อผลิต ผลิตภัณฑ์ในอุตสาหกรรมต่อเนื่อง อาทิ อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อาหารเสริม ยาสมุนไพร ดังนั้นตลาดสมุนไพรจึงเป็นตลาดที่มีการเติบโตสูงอย่างต่อเนื่อง การบริโภคของประชาชนที่นิยมใช้สมุนไพรมีส่วนสำคัญในการเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์สมุนไพร เพราะเป็นทางเลือกในการดูแลสุขภาพ โดยมองว่าปลอดภัยและมาจาก

ธรรมชาติ รวมถึงนโยบายของภาครัฐที่ส่งเสริมผู้มีส่วนเกี่ยวข้องในอุตสาหกรรมสมุนไพร ผ่านแผนแม่บทว่าด้วยการพัฒนาสมุนไพรไทย ปี 2560-2564 ตามร่างแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติการพัฒนาในระยะแผนพัฒนาฯ ฉบับที่ 12 มีการสนับสนุนการใช้สมุนไพรควบคู่ไปกับการแพทย์แผนปัจจุบัน ทั้งนี้ประเทศไทยเข้าสู่ประชาคมเศรษฐกิจอาเซียน สมุนไพรจะดึงเงินเข้าประเทศไม่ต่ำกว่า 30,000 ล้านบาท[1] การแพทย์แผนไทยและสมุนไพรจึงเป็นโอกาสและความท้าทายที่สำคัญในการให้บริการสาธารณสุขในอนาคต

ปอบิดมีชื่อวิทยาศาสตร์ *Helicteres isora* L. เป็นพืชในวงศ์ Malvaceae[2] มีชื่อเรียกตามท้องถิ่น เช่น มะปิด ปอทับ ช้อ ขี้อ้นใหญ่ [3] เป็นพืชขึ้นตามป่าเบญจพรรณ ป่าเต็งรัง ป่าดิบแล้ง ชายป่าดิบชื้น สองข้างทาง รวมถึงกรุงเทพมหานคร และพบได้ทั่วไปทั้งในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จีน และอินเดีย เป็นไม้พุ่มสูง 1-5 ม. มีขนรูปดาวละเอียดหรือขนสั้นนุ่มตามกิ่ง หูใบ แผ่นใบด้านล่าง กลีบเลี้ยงด้านนอก และผล หูใบรูปเส้นด้าย ยาวได้ถึง 1 ซม. ใบรูปรีหรือรูปไข่กว้าง ยาว 8-20 ซม. ปลายจักเป็นแฉก ปลายแฉกแหลมยาวคล้ายหาง โคนกลมหรือรูปหัวใจ ขอบใบจักฟันเลื่อยสองชั้น เส้นโคนใบ 5-7 เส้น ก้านใบยาว 1-3 ซม. ช่อดอกออกสั้น ๆ 2-3 ช่อ เรียงชิดกันตามซอกใบ โค้งด้านเดียว หลอดกลีบเลี้ยงยาว 1.5-2 ซม. ดอกสีส้มหรืออมแดง โคนด้านในมีจุดดำละเอียด กลีบบน 2 กลีบ ขนาดใหญ่ รูปใบหอกกลับ ยาว 2.5-3 ซม. กลีบพับงอกลับ ยาว 1.2-1.5 ซม. รังไข่บิดเวียน มีตุ่มเป็นขน ปลายก้านเกสรเพศเมียมีจุดสีดำละเอียด ยอดเกสรแฉกตื้น ๆ 5 แฉก ผลรูปทรงกระบอก บิดเป็นเกลียว ปลายแหลม ผลแก่สีดำ ข้อมูลตำรายาไทยใช้เปลือกต้นและรากบำรุงธาตุ ผลใช้แก้บิด แก้ปวดเบ่งท้องเสีย ขับเสมหะ ตำพอก แก้ปวดเคล็ดบวม[4-5] สารสำคัญในส่วนของผลพบว่าประกอบด้วย rosmarinic acids และ isorinic acid[6]

การศึกษาวิจัยประสิทธิภาพของปอบิดพบว่าสารสกัดหยาบส่วนผลด้วยเอทานอลสามารถทำให้หนูขาวที่ถูกกระตุ้นด้วย Streptozotocin ให้มีภาวะไขมันในเลือดสูง (Hyperlipidemia) สู่ระดับปกติได้[7] สารกลุ่ม saponins และ sapogenin ซึ่งเป็นสารสำคัญในรากปอบิดสามารถเพิ่มการสร้างไกลโคเจนและเพิ่มการขนส่งน้ำตาลเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อของหนูได้[8] การทดสอบพิษเฉียบพลันของสารสกัดรากปอบิดด้วยน้ำพบว่ามีค่า LD_{50} มากกว่า 2,000 mg/ml และผลทดสอบพิษกึ่งเฉียบพลันพบว่าทำให้หนูแรทน้ำหนักลดลง ทำให้ eosinophil และ serum creatinine เพิ่มขึ้น[9] การศึกษาฤทธิ์ในการเป็นยาต้านมะเร็งของสารสกัดผลปอบิด โดยศึกษาสารสกัดผลปอบิดที่สกัดด้วย ethanol ต่อการตายของเซลล์มะเร็ง 2 ชนิด ที่มี p53 ต่างกันคือ เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) ผลจากการศึกษาพบว่า เซลล์มะเร็งเต้านม (wild type p53) มีความไวต่อสารสกัดผลปอบิดมากกว่าเซลล์มะเร็งลำไส้ (mutated p53) แต่กับเซลล์เต้านมปกติพบว่าสารสกัดมีความเป็นพิษต่ำมาก จึงสรุปได้ว่า สารสกัดจากผลปอบิดมีผลความเป็นพิษเฉพาะต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าเซลล์ปกติ ซึ่งการตอบสนองที่แตกต่างกันนี้น่าจะสัมพันธ์กับความแตกต่างกันใน cytosolic redox status ที่เกิดจาก antioxidants ในสารสกัด[10] การศึกษาฤทธิ์และกลไกในการลดระดับน้ำตาลในเลือดและลดระดับไขมันในเลือดของสารสกัดจากรากปอบิด โดยทำการศึกษาในหนูแรทที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วยสาร alloxan และทดสอบกับสารสกัดจากรากปอบิดที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ

ethanol กับ butanol พบว่า สารสกัดด้วย ethanol และ butanol ช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดลงได้ 69.13% และ 51.14% ลดระดับ total cholesterol ลง 22.60% และ 21.89% ลดระดับ triglyceride ลง 30.12% และ 19.96% ลดระดับ urea ลง 50.05% และ 34.29% ตามลำดับ[11]

จากข้อมูลที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่าปอบิดเป็นสมุนไพรที่มีศักยภาพสูงในหลาย ๆ ด้านรวมถึงมีความโดดเด่นในด้านของการเป็นสมุนไพรที่สามารถรักษาโรคได้ รัฐบาลสนับสนุนและส่งเสริมให้มีการใช้สมุนไพรทดแทนการใช้ยาเป็นจำนวนมากทั่วทั้งประเทศไทย แต่ข้อมูลด้านความปลอดภัยในการใช้ยังมีอยู่น้อยมาก ถ้าเทียบกับผลิตภัณฑ์ที่มีออกมาขายตามท้องตลาด การทดสอบการก่อกลายพันธุ์โดยใช้แบคทีเรีย โดยอ้างอิงวิธีจากองค์การเพื่อความร่วมมือและการพัฒนาทางเศรษฐกิจ หรือ โออีซีดี (OECD) test guideline ที่ 471 หรือเรียกว่าวิธีทดสอบเอมส์ (Ames test) เป็นการทดสอบที่ใช้ทดสอบขั้นแรก เพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานขั้นต้น ก่อนจะทำการศึกษาในวิธีเชิงลึก เช่น ในสัตว์ทดลอง เพื่อให้ได้ข้อสรุปที่แน่นอนในด้านความปลอดภัยของสารที่นำไปทดสอบต่อไป การทดสอบเอมส์เป็นการทดสอบในหลอดทดลองเพื่อหาการก่อกลายพันธุ์ของสารเคมี/สารสมุนไพร/เครื่องมือทางการแพทย์ ฯลฯ โดยจะดูความผิดปกติในระดับ DNA หากตัวอย่างสามารถทำตัวเสมือนสารก่อกลายพันธุ์ (mutagen) จะชี้ให้เห็นว่าตัวอย่างนั้น ๆ อาจจะไม่ปลอดภัยที่จะใช้ในการบริโภค เนื่องจากมีแนวโน้มในการก่อโรคที่ผิดปกติทางพันธุกรรม หรือโรคมะเร็งได้ ผู้วิจัยเล็งเห็นว่าการทดสอบเบื้องต้นนี้ไม่เพียงแต่ลดจำนวนสัตว์ทดลองแล้วยังสามารถใช้ข้อมูลนี้เตือนภัยแก่ผู้บริโภคและผู้ใช้ผลิตภัณฑ์สมุนไพรได้ การทดสอบเอมส์ เป็นหนึ่งการทดสอบในความต้องการของผู้ประกอบการที่จะขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์สุขภาพจากสมุนไพร รวมถึงสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาที่เป็นหน่วยขึ้นทะเบียน ที่ต้องใช้ข้อมูลด้านความปลอดภัยนี้ในการประเมินผลิตภัณฑ์สุขภาพต่าง ๆ ดังนั้นผู้วิจัยจึงดำเนินการทดสอบนี้ตาม test guideline ที่เป็นมาตรฐาน เพื่อยกระดับให้ผลงานมีความน่าเชื่อถือทางวิชาการ และผลการทดสอบเป็นที่น่าเชื่อถือทั้งในและต่างประเทศ เป็นการลดการกีดกันทางการค้าได้ด้วย

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดผลปอบิด ในเชื้อ *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 และ *Escherichia coli* WP2 ในระบบที่ไม่มีเอนไซม์กระตุ้น โดยอ้างอิงวิธีจาก OECD test guideline 471 เพื่อดูผลต่อการก่อกลายพันธุ์ต่อ DNA ซึ่งตัวแทนเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบมีการกลายพันธุ์ทั้งแบบ frameshift mutation และ base-pair substitution mutation เพื่อให้ทราบถึงแนวโน้มในการเป็นสารก่อกลายพันธุ์ของสมุนไพร

ระเบียบวิธีศึกษา

ขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบ

สมุนไพรผลปอบิด เก็บจากจังหวัดกาญจนบุรีและนครสวรรค์ เก็บตัวอย่างในช่วงต้นเดือนมกราคม-กุมภาพันธ์ 2560-2562 ตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ตามหลักอนุกรมวิธานโดยนักพฤกษศาสตร์ ตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงในงานวิจัย หมายเลข DMSC 5244 เก็บในพิพิธภัณฑ์พืช สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ขั้นตอนการสกัด

วิธีการเตรียมสารสกัดผลปอบิด วิธีสกัดด้วยน้ำ

นำผลปอบิด บดหยาบ จำนวน 800 กรัม ลงใน round bottom flask เติมน้ำ 2,000 มิลลิลิตร เขย่าให้สมุนไพรกระจายตัว ตั้งบนเตาให้ความร้อนแบบหลุม (heating mantle) จนเดือดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้จนเย็น จากนั้นนำมากรองด้วยถุงกรอง แยกส่วนกากออก ระเหยสารที่กรองได้ด้วยเครื่อง rotary evaporator จนได้สารสกัดเข้มข้นเตรียมสารสกัดเป็นผงแห้งด้วยเครื่อง freeze dry จะได้ %yield = 14.32% w/w

วิธีการเตรียมสารสกัดผลปอบิด วิธีสกัดด้วยเอทานอล

นำผลปอบิด บดหยาบ จำนวน 1,600 กรัม ใส่ลงในถุงกระดาษสำหรับสกัดด้วยเครื่อง soxhlet extraction เติม 95% ethanol จำนวน 6,000 มิลลิลิตร เปิดเครื่อง soxhlet extraction วันละ 8 ชั่วโมง ตั้งสกัดไว้ 1 สัปดาห์ นำสารสกัดที่ได้ มากรองด้วยกระดาษกรอง ระเหยสารที่กรองได้ด้วยเครื่อง rotary evaporator จนได้สารสกัดเข้มข้น แล้วเตรียมสารสกัดเป็นผงแห้งด้วยเครื่อง freeze dry ได้ %yield = 1.94% w/w

การควบคุมคุณภาพเคมี โดยวิธีหาปริมาณเถ้า ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด และปริมาณความชื้น ตามวิธีของตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย ปี 2019 (Thai Herbal Pharmacopoeia 2019)[12]

ขั้นตอนการทดสอบคุณสมบัติเชื้อ

ความต้องการกรดอะมิโนฮิสทิดีนสำหรับเชื้อ *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 เคลือบผิววุ้นด้วย 0.1 M L-histidine ปริมาณ 100 ไมโครลิตร เพลทที่ 4 เคลือบผิววุ้นด้วย 0.1 M L-histidine ปริมาณ 100 ไมโครลิตร และเคลือบ 1 mM D-biotin ปริมาณ 100 ไมโครลิตร นำ single colony ที่เลี้ยงไว้ 1 คืนไปขีดลงบนวุ้น นำเพลทบ่มที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แบคทีเรียที่มีการเจริญมากที่สุดคือ เพลทที่ 4 ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการทดลองเพื่อทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ได้

ความต้องการกรดอะมิโนทริปโตเฟนสำหรับเชื้อ *E. coli* WP2

เตรียม Minimal Glucose Agar plate ที่ผสม 0.05 mM tryptophan นำ single colony ที่เลี้ยงไว้ 1 คืนไปขีดลงบนวุ้น นำเพลทบ่มที่ตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดสอบแบคทีเรียต้องมีการเจริญบนผิววุ้น ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการทดลองเพื่อทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ได้

การตรวจ rfa mutation และ R-factor

เตรียม Minimal Glucose Agar plate ผสม 0.1 M L-histidine ปริมาตร 100 ไมโครลิตร สำหรับเชื้อ *S. typhimurium* ส่วนเชื้อ *E. coli* ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MGA ผสม 0.05 mM tryptophan และbacterial culture ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ลงใน top agar ที่มีส่วนผสมของ 0.5 mM histidine + 0.5 mM biotin ปริมาณ 2,000 ไมโครลิตร ส่วน *E.coli* 0.5 mM trypophan ผสมเข้าไป จากนั้นเทส่วนผสมลงบน MGA plate จุ่ม blank paper disc ที่ผ่านการฆ่าเชื้อลงใน 0.1% crystal violet แล้วจุ่ม blank paper disc ใน 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ampicillin วางไว้อีกด้านหนึ่งของเพลท นำเพลทบ่มที่ตู้ Incubator ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูผลการ

ทดสอบโดยสังเกตรอบ ๆ blank paper disc ที่จุ่ม 0.1% crystal violet ถ้าเป็นเชื้อที่มี rfa จะเห็นโซนใส (clear zone) คือ ไม่มีแบคทีเรียเจริญอยู่ โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางได้ประมาณ 12-14 มิลลิเมตร ส่วนผลการทดสอบ R-factor สังเกตเห็นการเจริญเติบโตของแบคทีเรียรอบ ๆ paper disc ที่จุ่ม 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ampicillin เพราะมี R-factor ซึ่งทำให้แบคทีเรียต้านทาน ampicillin ได้ ซึ่งสายพันธุ์ TA98 และ TA100 เชื้อจะต้าน ampicillin ส่วนสายพันธุ์อื่นจะเกิด clear zone รอบ ๆ disc ampicillin

การตรวจความผิดปกติ *uvr* B mutation โดยใช้ mitomycin

จุ่ม Blank paper disc ใน mitomycin ที่ความเข้มข้น 0.2 ไมโครกรัม/disc วางลงใน MGA plate ที่ผสม histidine และ biotin สำหรับเชื้อ *S. typhimurium* และผสม tryptophan สำหรับเชื้อ *E. coli* ดูผลการทดสอบโดยสังเกตรอบ ๆ paper disc จะเห็นโซนใส (clear zone)

ขั้นตอนการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ในเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดผลปอบิด (อ้างอิงวิธีจาก OECD TG471, 1997)[13]

ในการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ใช้วิธี plate incorporation method โดยนำสารสกัดปอบิด ที่ระดับ 5 ความเข้มข้น 625, 1,250, 2,500, 5,000 และ 10,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ผสมกับเชื้อที่ใช้ทดสอบ 0.1 มิลลิลิตร (เชื้อที่ใช้คือ *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 และ *E. coli* WP2 บ่มไว้ 8-12 ชั่วโมง การทดลองอยู่ในระบบไม่มีเอนไซม์กระตุ้น ทำการเติม 0.1M $NaPO_4$-KCl buffer ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และสารสกัดสมุนไพรทั้ง 5 ความเข้มข้นลงในแต่ละหลอด จากนั้นเติม top agar และเทลง minimal glucose agar plate และบ่มที่อุณหภูมิ 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 นำเพลทมานับจำนวน revertant colony การแปลผลคือ ถ้าสารที่ทดสอบมีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์จะพบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารสมุนไพรที่ทดสอบกับจำนวน revertant colony เพิ่มขึ้นด้วย และพบว่ามีอย่างน้อย 2 ความเข้มข้นที่ให้จำนวนแบคทีเรียกลายพันธุ์มีจำนวนมากกว่าจำนวนที่กลายพันธุ์ตามธรรมชาติ (negative control) ในขณะเดียวกันต้องมีอย่างน้อยที่ความเข้มข้นจุดหนึ่ง สามารถทำให้จำนวนแบคทีเรียกลายพันธุ์สูงเกิน 2 เท่า ของการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ จึงนับว่าสารที่นำมาทดสอบนี้เป็นสารก่อกลายพันธุ์

ผลการศึกษา

ผลการสกัดผลปอบิด

สารสกัดผลปอบิดด้วยน้ำ ได้สารสกัดผงละเอียดสีน้ำตาลเข้ม (yield = 14.32%) การควบคุมคุณภาพทางเคมี ผลการทดลองพบว่า สารสกัดผลปอบิดด้วยน้ำ มีค่าปริมาณเถ้ารวม 20.11 ± 0.19% ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด 0.06 ± 0.02% และปริมาณความชื้น 1.60 ± 0.47%

สารสกัดผลปอบิดด้วย 95% เอทานอล ได้สารสกัดในรูปแบบเหนียวและหนืดสีน้ำตาลเข้ม (yield = 1.94%) การควบคุมคุณภาพทางเคมี ผลการทดลองพบว่า สารสกัดผลปอบิดด้วย 95% เอทานอล มีค่าปริมาณเถ้ารวม 20.35 ± 0.10% ปริมาณเถ้าที่ไม่

ละลายในกรด 0.08 ± 0.03% และปริมาณความชื้น 4.46 ± 0.22%

ผลขั้นตอนการทดสอบคุณสมบัติเชื้อ

ผลการตรวจคุณสมบัติเชื้อก่อนทำการทดสอบเอมส์พบว่า เชื้อ *S. typhimurium* 4 สายพันธุ์ และ *E. coli* 1 สายพันธุ์ มีคุณสมบัติครบถ้วนทุกการทดสอบคือ ความต้องการกรดอะมิโนฮิสทิดีน/ทริปโตเฟน rfa mutation R-factor และความผิดปกติ *uvr* B mutationโดยใช้ mitomycin (ตารางที่ 1)

ผลการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ในเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดผลปอบิดด้วยน้ำ

การศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดผลปอบิดด้วยน้ำ ซึ่งใช้เชื้อแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ (*S. typhimurium* TA98, TA1535 TA100, TA1537) และ *E. coli* WP2 ที่ขนาดทดสอบ 5 ระดับ (625, 1,250, 2,500, 5,000 และ 10,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ในระบบที่ไม่มีเอนไซม์กระตุ้นการออกฤทธิ์ ผลการทดลองพบว่าทุกสายพันธุ์และทุกขนาดทดสอบไม่ก่อให้เกิดการก่อกลายพันธุ์ โดยดูจากจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ไม่ได้เป็น 2 เท่าเมื่อเทียบกับ negative control และไม่พบความผิดปกติของ background lawn ในทุกสายพันธุ์และทุกความเข้มข้น (ตารางที่ 2)

ผลการทดสอบการก่อกลายพันธุ์ในเชื้อแบคทีเรียต่อสารสกัดผลปอบิดด้วย 95% เอทานอล

การศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดผลปอบิดด้วย 95%เอทานอล ในแบคทีเรีย *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98, TA100, TA1535, TA1537 และ *E.coli* WP2 ที่ขนาดทดสอบ 5 ระดับ (625, 1,250, 2,500, 5,000 และ 10,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ผลการทดลองพบว่า ทุกระดับขนาดทดสอบไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ เมื่อทำการส่องเพลทภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ไม่พบความผิดปกติของ Background lawn ทุกระดับขนาดทดสอบในแบคทีเรียสายพันธุ์ TA98, TA1535 และ *E.coli* WP2 แต่พบการเกิดการตายของเชื้อ (kill-

ตารางที่ 1 ตารางแสดงคุณสมบัติที่ทดสอบของ *S. typhimurium* และ *E. coli* ทั้ง 5 สายพันธุ์

สายพันธุ์	คุณสมบัติที่ทดสอบของ *S. typhimurium/E. coli*							
	ความต้องการกรดอะมิโนฮิสทีดีน/ทริปโตแฟน					rfa mutation	R-factor	Uvr B mutation
	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

ตารางที่ 2 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ (Revertant colony) ต่อสารสกัดผลปอบิดสกัดด้วยน้ำ

ความเข้มข้น (μg/ml)	สารสกัดผลปอบิด (สกัดด้วยน้ำ) จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ (Mean ± S.D.)				
	TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2
Negative	37.67 ± 8.39	89.00 ± 9.54	9.67 ± 1.15	10.00 ± 2.00	65.67 ± 8.14
625	45.67 ± 2.52	113.00 ± 6.25	13.00 ± 1.73	8.67 ± 5.86	68.33 ± 17.04
1250	35.00 ± 2.00	91.67 ± 5.51	11.67 ± 3.51	7.33 ± 5.03	65.33 ± 16.17
2500	32.00 ± 6.25	79.33 ± 7.51	10.00 ± 2.65	11.00 ± 2.65	71.33 ± 14.57
5000	29.67 ± 6.66	80.67 ± 6.35	6.33 ± 2.08	9.33 ± 4.51	64.33 ± 8.74
10,000	32.33 ± 7.51	65.67 ± 7.64	6.67 ± 2.08	9.33 ± 4.51	70.67 ± 8.50

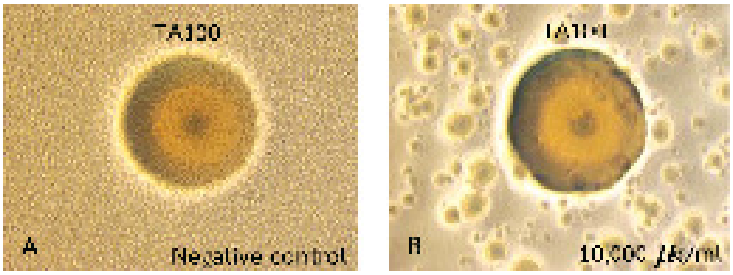
ตารางที่ 3 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ (Revertant colony) ต่อสารสกัดผลปอบิดด้วย 95% เอทานอล

ความเข้มข้น (μg/ml)	สารสกัดผลปอบิด (สกัดด้วย 95% เอทานอล) จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ (Mean ± S.D.)				
	TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2
Negative	48.00 ± 7.81	97.67 ± 15.01	16.00 ± 2.65	12.67 ± 4.73	49.00 ± 1.73
625	31.67 ± 10.26	118.00 ± 11.53	8.00 ± 1.00	11.00 ± 1.73	54.67 ± 3.51
1250	41.33 ± 13.05	100.33 ± 10.60	7.33 ± 1.53	11.33 ± 2.52	53.33 ± 9.29
2500	39.67 ± 2.31	83.67 ± 9.07	13.33 ± 3.21	9.33 ± 4.51	57.33 ± 5.03
5000	37.00 ± 10.54	89.00 ± 4.58	12.67 ± 0.58	7.00 ± 1.00	51.00 ± 12.77
10,000	27.00 ± 9.85	40.67 ± 3.06	9.00 ± 3.46	6.33 ± 2.08	44.67 ± 7.02

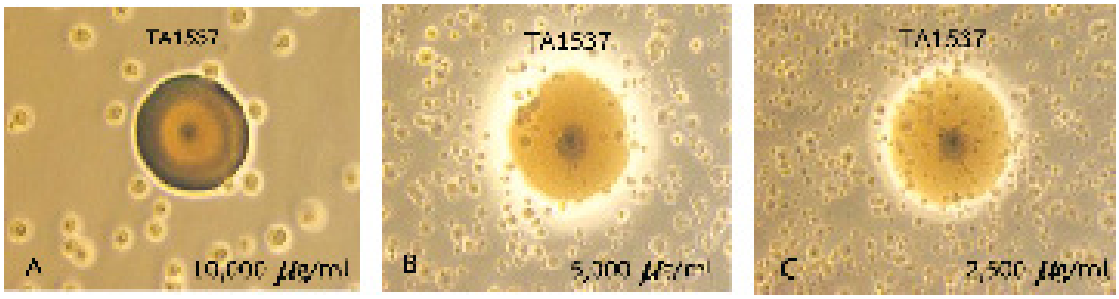
ing effect) ของ Background lawn ที่ขนาดทดสอบ 10,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในแบคทีเรียสายพันธุ์ TA100 และพบการเกิด killing effect ของ Background lawn ที่ขนาดทดสอบ 2,500, 5,000 และ 10,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรในแบคทีเรียสายพันธุ์ TA1537 (ดังตารางที่ 3) และ (ภาพที่ 1 และภาพที่ 2)

ผลการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดผลปอบิดด้วย 95% เอทานอล ต่อเชื้อแบคทีเรียที่ทำการลดความเข้มข้น

การศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดผลปอบิดด้วย 95% เอทานอล ซึ่งใช้เชื้อแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ (*S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537) และ *E.coli* WP2 ที่ขนาดทดสอบ 5 ระดับ (78.125, 156.25, 312.5, 625 และ 1,250 ไมโครกรัม/



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



ภาพที่ 2 Background lawn ของเชื้อ *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA1537 โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ ที่กำลังขยาย 10X ภาพ 2A 2B และ 2C แสดง background lawn ที่เกิด Killing effect background lawn จะพบลักษณะของช่องว่างที่พื้นหลัง แสดงถึงการตายของเชื้อ และจะเห็นว่าการตายเพิ่มขึ้นแบบ Dose response relationship ตามขนาดทดสอบที่เพิ่มขึ้น

มิลลิลิตร) ในระบบที่ไม่มีเอนไซม์กระตุ้น ผลการทดลองพบว่าทุกสายพันธุ์และทุกความเข้มข้นไม่ก่อให้เกิดการก่อกลายพันธุ์ โดยดูจากจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ไม่ได้เป็น 2 เท่าเมื่อเทียบกับ negative control และไม่พบความผิดปกติของ Background lawn ในทุกสายพันธุ์และทุกความเข้มข้น (ตารางที่ 4)

อภิปรายผล

การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์แบบย้อนกลับโดยใช้แบคทีเรียหรือเรียกว่าวิธีทดสอบเอมส์ (Ames test) ซึ่งอ้างอิงวิธีจาก OECD test guideline 471 เป็นการทดสอบขั้นแรก เพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานขั้นต้นก่อนจะทำการศึกษาในวิธีเชิงลึก เช่น ในสัตว์ทดลอง ทำให้ได้ข้อสรุปที่แน่นอนในด้านความปลอดภัยของสารที่นำไปทดสอบต่อไป ซึ่งการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ในเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีเอมส์ เป็นการทดสอบสารเคมี/สารสมุนไพร/ผลิตภัณฑ์สุขภาพเพื่อหาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างพันธุกรรมในเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งสารเคมีที่ส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์ต่อเซลล์ร่างกายเมื่อมีการบริโภคสิ่งเหนี่ยวนำให้เกิด

ตารางที่ 4 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ (revertant colony) ต่อสารสกัดปอบิดสกัดด้วย 95% เอทานอล ที่ทำการลดขนาดความเข้มข้น

ความเข้มข้น (μg/ml)	สารสกัดปอบิด (สกัดด้วย 95%เอทานอล) จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ (Mean ± S.D.)				
	TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2
Negative	23.00 ± 1.73	119.00 ± 5.57	14.33 ± 2.52	14.00 ± 3.46	47.33 ± 4.26
78.125	29.33 ± 8.39	145.67 ± 7.09	10.33 ± 3.79	9.67 ± 1.15	44.00 ± 1.73
156.25	29.33 ± 5.13	148.00 ± 1.73	16.00 ± 2.65	13.00 ± 1.00	55.67 ± 4.51
312.5	21.00 ± 1.00	143.00 ± 9.64	13.00 ± 5.00	13.33 ± 7.02	45.67 ± 1.25
625	26.67 ± 4.16	153.33 ± 2.08	15.00 ± 2.65	12.00 ± 4.00	44.00 ± 3.46
1,250	27.00 ± 1.00	133.00 ± 2.64	10.67 ± 2.89	9.33 ± 2.21	50.67 ± 7.51

การก่อกลายพันธุ์นั้น ๆ อาจทำให้เซลล์ถูกพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็งหรือก่อให้เกิดโรคความผิดปกติทางพันธุกรรมได้ ในปัจจุบันข้อมูลการทดสอบการก่อกลายพันธุ์เป็นหนึ่งในข้อมูลที่ถูกใช้เป็นเกณฑ์ในการประเมินความปลอดภัยของสารเคมี ยา เครื่องมือแพทย์ และอาหารทั่วโลก โดยมีหน่วยงานหลักในการใช้ข้อมูลเพื่อประเมินอยู่ 2 หน่วยงานใหญ่ ๆ ได้แก่ Environmental Protection Agency (EPA) และ Food and Drug Administration (FDA) รวมถึงเกณฑ์การขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรบางประเภทของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา และกรมการแพทย์แผนไทยก็ใช้ผลด้านความปลอดภัยเบื้องต้นในการประเมินการขึ้นทะเบียนเช่นเดียวกัน จากผลการทดลองในการวิจัยครั้งนี้พบว่าสารสกัดผลปอบิดที่สกัดด้วยน้ำและสกัดด้วย 95% เอทานอล เมื่อทำการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย (*S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98, TA100 TA1537, TA1535 และ *E. coli* WP2 ทุกขนาดทดสอบไม่ก่อให้เกิดการก่อกลายพันธุ์ โดยดูจากจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ไม่ได้เป็น 2 เท่าเมื่อเทียบกับ negative control ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบผู้วิจัยเริ่มที่ขนาดทดสอบ 10,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งในการทดสอบจะต้องทำการส่องดู background lawn ภายใต้กล้อง inverted microscope เนื่องจากลักษณะของ background lawn เป็นเกณฑ์หนึ่งของ guideline ที่ใช้ในการตัดสินใจว่าสารตัวอย่างมีการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ใช้ทดสอบหรือไม่ ถ้าพบว่าสารทดสอบสามารถยับยั้ง นั่นคือการเกิด killing effect ที่ background lawn จะต้องลดความเข้มข้นลง ผลการทดลองจึงจะอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ซึ่งพบว่าสารสกัดปอบิดที่สกัดด้วย 95% เอทานอล ส่งผลให้ *S. typhimurium* TA100 เกิดความผิดปกติ (killing effect background lawn) ในขนาดการทดสอบที่ 10,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ TA1537 เกิดความผิดปกติ ในขนาดการทดสอบที่ 10,000, 5,000 และ 2,500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการลดขนาดทดสอบลง 5 ระดับสำหรับสารสกัดปอบิดด้วย 95% เอทานอล ดังนี้ 78.125,

156.25, 312.5, 625 และ 1,250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ผลปรากฏว่าทุกสายพันธุ์ไม่ก่อให้เกิดการก่อกลายพันธุ์ทุกขนาดทดสอบ และ Background lawn ปกติ ซึ่งจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สารสกัดปอบิดที่สกัดด้วยน้ำอาจจะมีความปลอดภัยโดยไม่ส่งผลให้เกิดการก่อกลายพันธุ์ในการบริโภคที่ขนาดทดสอบ ส่วนสารสกัดปอบิดที่สกัดด้วย 95% เอทานอล หากจะนำมาใช้ควรใช้ที่ขนาดต่ำกว่าหรือเท่ากับ 2,500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แต่ทั้งนี้ในการนำไปใช้ในการบริโภคผู้บริโภคที่มีโรคประจำตัวและมีการรับประทานยาแผนปัจจุบันหรือยาอื่น ๆ ควรใช้สารสกัดผลปอบิดภายใต้คำปรึกษาของแพทย์เนื่องจากยังไม่มีข้อมูลการศึกษาถึงผลของอันตรกิริยาระหว่างสมุนไพรปอบิดและยาแผนปัจจุบัน รวมถึงมีรายงานวิจัยผู้ป่วยที่เป็นโรคตับและไตอาจต้องระมัดระวังในการใช้สมุนไพรชนิดนี้ การทดสอบการก่อกลายพันธุ์โดยวิธีเอมส์ในสารสกัดผลปอบิดยังไม่มีรายงานวิจัยจากที่ไหนมาก่อน ดังนั้นผลการทดลองนี้เป็นงานวิจัยแรกที่ทำสอดคล้องกับ OECD GLP test guideline 471 ซึ่งนักวิจัย ผู้ประกอบการ ประชาชน สามารถนำผลไปอ้างอิงและใช้ในการวิจัยเชิงลึก เช่น การศึกษาพิษเรื้อรังในสัตว์ทดลอง การศึกษากลไกต่าง ๆ ในสัตว์ทดลองต่อไปได้

ข้อสรุป

การทดสอบการก่อกลายพันธุ์ในครั้งนี้เป็นการทดสอบภายใต้วิธีที่ไม่มีการใช้ metabolic enzyme ซึ่งในการนำไปใช้รับประทานนั้น เมื่อได้รับประทานสารสกัดเข้าไปในร่างกายสารเคมีอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างได้ ดังนั้นจึงควรมีการทดสอบเพิ่มเติมภายใต้วิธีที่มีการเติม metabolic enzyme รวมถึงควรมีการทดสอบเพื่อยืนยันผลการก่อกลายพันธุ์ด้วยวิธีอื่นเพิ่มเติม เนื่องจากสารสกัดปอบิดที่สกัดด้วย 95% เอทานอล ในขนาดที่มากกว่าหรือเท่ากับ 2,500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งผู้ที่จะนำสารสมุนไพรผลปอบิดไปใช้ อาจต้องคำนึงถึงขนาดที่เหมาะสมในการนำไปทำเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพร หรือนำไปใช้บริโภค การทดสอบนี้เป็นข้อมูลด้านความปลอดภัยของสารสกัดปอบิด เพื่อใช้คุ้มครองผู้บริโภคและเตือนภัยประชาชน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนเงินงบประมาณจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ขอขอบพระคุณห้องปฏิบัติการพิพิธภัณฑ์พืช สถาบันวิจัยสมุนไพร ในการจัดหาวัตถุดิบ และระบุตัวอย่างสมุนไพรปอบิด ศูนย์ตรวจสอบและรับรองคุณภาพสมุนไพร ในการสกัดสารสมุนไพรและควบคุมคุณภาพเคมีของสมุนไพร และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการพิษวิทยาทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัยเป็นอย่างดี

References

1. Office of the National Economic and Social Development Council. The twelfth national economic and social development plan (2017-2021) [Internet]. 2016 December [cited 2020 May 26]; [224 pages]. Available from: http://plan.bru.ac.th/ (in Thai)
2. The plant list. Malvaceae [Internet]. 2013. [cited 2020 August 28]. Available from: http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=helicteres+isora
3. BGO Plant Databases, The Botanical Garden Organization, Ministry of Natural Resources and Environment. [Internet]. 2012 [cited 2020 October 29]; Available from: http://www.qsbg.org/database/botanic_book%20full%20option/search_detail.asp?botanic_id=2509.
4. Haynes RR, Landolt E, Phengklai C, Larsen K, Santisuk T. Flora of Thailand Vol. 7, part 3, Alismataceae, Aponogetonaceae, Ctenolophonaceae, Cymodoceaceae,

Hamamelidaceae, Hydrocharitaceae, Lemnaceae, Limnocharitaceae, Melastomataceae, Polygalaceae, Potamogetonaceae, Sterculiaceae. Bangkok: The Forest Herbarium, Royal Forest Department; 2001. p. 568.

5. Tang Y, Gilbert MG, Dorr LJ. Helicteres. In Flora of China Vol. 12. 2007. p. 318.
6. Kumar N, Kumar SA. Plant profile, phytochemistry and pharmacology of Avartani (*Helicteres isora* Linn.): a review. Asian Pac Journal of Tropical Biomedicine. 2014;4(Suppl1):22-6.
7. Boopathy RA, Elanchezhiyan C, Sethupathy S. Anti-hyperlipidemic activity of *Helicteres isora* fruit extract on streptozotocin induced diabetic male wistar rats. European Review for Medical and Pharmacological Sciences. 2010;14:191-6.
8. Bhavsar SK, Föller M, Gu Sh, Vir S, Shah MB, Bhutani KK, Santani DD, Lang F. Involvement of the PI3K/AKT pathway in the hypoglycemic effects of saponins from *Helicteres isora*. Journal of Ethnopharmacology. 2009;126:386-96.
9. Kumar G, Sharmila BG, Murugesan AG, Rajasekara PM. Preliminary Toxicity and Phytochemical Studies of Aqueous Bark Extract of *Helicteres isora* L. International Journal of Pharmaceutics. 2007;3(1):96-100.
10. Dayal R, Singh A and Mishra KP. Potential of enhancing tumor toxicity by crude ethanolic extracts of fruits of *Helicteres isora* (L.). Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 2017;6(1):417-23.
11. Venkatesh S, Reddy BM, Reddy GD, Mullangi R, Lakshman M. Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of *Helicteres Isora* roots in Alloxan-Induced Diabetic Rats: a possible mechanism of action. Journal of Natural Medicines. 2010;64(3):295-304.
12. Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. Thai Herbal Pharmacopoeia 2019. Volume II. Bangkok: Appendices 4-15 loss on drying 7-16 acid-insoluble ash 7-7 total ash. 2019.
13. OECD Guideline for testing of chemicals. Bacterial reverse mutation test [Internet]. 2020 [cited 2020 October 29]; [1-12 pages]. Available from: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-471-bacterial-reverse-mutation-test_9789264071247-en.1-12.