

Thesis title      Possible Mechanism of Inhibition of Aflatoxin-B<sub>1</sub>  
 Mutagenesis by Thai Medicinal Plants:  
Murdannia loriformis and Alpinia galanga

Author                      Mr. Tawee Rearungchom

Master of Science        Biochemistry

Examining committee

Assistant Professor. Dr.Usanee Vinitketkumnuen      Chairperson

Associate Professor.Dr.Maitree Suttajit                      Member

Assistant Professor. Dr.Umnat Mevatee                      Member

Dr.Werawan Ruangyuttikarn                                      Member

#### ABSTRACT

This investigation was to evaluate the antimutagenic effect of two Thai medicinal plants, stem and leaves of Hassk (Murdannia loriformis) and rhizomes of Greater galangal (Alpinia galanga) against aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) mutagenesis in short-term test, Salmonella mutation assay. The plant samples were ground into powder, then extracted with water, methanol and hexane at room temperature sequentially. The three extractable crude fractions were brought to check their mutagenicity and antimutagenicity in Salmonella mutation assay with preincubation technique using Salmonella typhimurium TA 98 and TA 100 with and without metabolic activation. All the crude extracts did not show any mutagenic activity. Since the highest yield of dried residue from the methanolic fraction was obtained and this fraction highly inhibited the mutagenicity of AFB<sub>1</sub> (0.05 µg), therefore it was used in the experiments of this study.

The preincubation of the extracts of both plants with cytochrome P 450 - dependent monooxygenase system (rat liver) had a marked inhibitory effect on AFB<sub>1</sub> - induced mutagenesis in S. typhimurium TA 98. Pretreatment of the plant extracts with AFB<sub>1</sub> or S9 fraction (without cofactors) before mixing with the bacteria did not significantly influence the number of colonies of the controls. After 30 min exposure of S. typhimurium to AFB<sub>1</sub>, the bacterial mutagenicity due to AFB<sub>1</sub> was significantly decreased by the addition of plant extracts. The antimutagenic substances were found in fractions isolated from the methanol extract of Greater galangal by Sephadex LH-20 column chromatography. Five fractions (1, 2, 3, 4 and 5) were separated. Only fractions 3, 4 and 5 exerted antimutagenicity to AFB<sub>1</sub> - mutagenesis in S. typhimurium TA 98 with dose-dependent relationship. Only fraction 4 could reduce AFB<sub>1</sub> mutagenicity. This reduction might be due to the deactivation of reactive intermediates from AFB<sub>1</sub> metabolism, or the inactivation of enzymes in S9 fraction, but not from AFB<sub>1</sub> destruction. Bio-antimutagenicities of substances in fractions 2, 3 and 4 were demonstrated.

Four antimutagenic substance in fractions (I,II,III and IV) were isolated from methanol extract of Hassk. It was found that all fractions could decrease AFB<sub>1</sub> mutagenesis. Fractions I, III and IV might inactivate enzymes in S9 fraction or destroy ractive intermediates of AFB<sub>1</sub> too. The antimutagenic fractions isolated from the extract did not contain bio-antimutagenicity.

It was demonstrated that divalent ions such as  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  had an inhibitory effect on desmutagenic activity of fraction 4 from Greater galangal and fraction I and IV from Hassk.

It was clear from this study that Hassk or Greater galangal definitely contained antimutagenic substances. The antimutagenicity property might be due to inactivation of enzyme in S9 fraction used in Salmonella mutation assay.

The exact nature and structure of antimutagenesis in the plants are still unknown. More investigation on the purified active compounds and their antimutagenicity activity have to be further done. Besides, their metabolic inactivation, biological effect on DNA repairing systems, as well as anticarcinogenesis of the putative antimutagenic plants should be also investigated.

ชื่อวิทยานิพนธ์ กลไกการยับยั้งการกลายที่เกิดจากอะฟลาทอกซิน  
 บีหนึ่งที่อาจเป็นไปได้ โดยสมุนไพรรไทย :  
 หญ้าปักกิ่ง และข่า

ชื่อผู้เขียน นายทวี เรืองโฉม  
 วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี  
 คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

ผศ.ดร.อุษณีย์ วินิจเขตคำนวน ..... ประธานกรรมการ  
 รศ.ดร.ไมตรี สุทธจิตต์ ..... กรรมการ  
 ผศ.ดร.อำนาจ มีเวที .....กรรมการ  
 อ. ดร. วีระวรรณ เรืองยุทธิการณ์ .....กรรมการ

บทคัดย่อ

การศึกษาคั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ด้านการกลายที่เกิดจาก  
 อะฟลาทอกซิน บีหนึ่ง ของสมุนไพรรไทย 2 ชนิด ได้แก่ ลำต้นและใบของหญ้า  
 ปักกิ่ง และเหง้าของข่า โดยการทดสอบการกลายในแบคทีเรีย ซัลโมเนลลา  
 รัยฟิมิวเรียม ผงสมุนไพรรทั้งสองถูกสกัดด้วยน้ำ เมทานอลและเอทเซน ตาม  
 ลำดับที่อุณหภูมิห้องเมื่อนำสารสกัดทั้งสามส่วน ไปทดสอบฤทธิ์ก่อกลายและ  
 ฤทธิ์ยับยั้งการกลาย โดยวิธีทดสอบในแบคทีเรียซัลโมเนลลา เทคนิค  
 preincubation โดยใช้แบคทีเรีย ซัลโมเนลลา รัยฟิมิวเรียม สายพันธุ์ TA98  
 และ TA100 ในภาวะที่มีและไม่มีสารกระตุ้นด้วยเอนไซม์ ทุกส่วนของ  
 สารสกัดในสมุนไพรรทั้ง 2 ชนิดไม่แสดงฤทธิ์ก่อกลาย และเนื่องจากสารสกัด  
 ด้วยเมทานอลมีปริมาณสารมากที่สุด และแสดงฤทธิ์ยับยั้งการกลายที่เกิด  
 จากอะฟลาทอกซิน บีหนึ่ง (0.05  $\mu\text{g}$ ) ได้ดีที่สุด จึงทดลองด้วยสารสกัดส่วนนี้

ตลอดงานวิจัย เมื่อผสมสารสกัด ของสมุนไพรทั้ง 2 ชนิดนี้กับ cytochrome P<sub>450</sub> -dependent monooxygenase system (จากตับหนูขาวใหญ่) ฤทธิ์ยับยั้ง การกลายในแบคทีเรีย ซัลโมเนลลา รัยพีมิวเรียม สายพันธุ์ TA98 ที่เกิด จากอะฟลาทอกซิน บีหนึ่ง ถูกยับยั้งอย่างชัดเจน เมื่อผสมสารสกัดของสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด ให้ทำปฏิกิริยากับอะฟลาทอกซิน บีหนึ่ง หรือ S9 fraction ก่อน ที่จะทำ ปฏิกิริยากับแบคทีเรีย ฤทธิ์ยับยั้งการกลายของสารสกัดแสดงผลไม่ ชัดเจน เมื่อเทียบกับกลุ่ม control สารสกัดสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด สามารถ ทำให้แบคทีเรียซัลโมเนลลา รัยพีมิวเรียมสายพันธุ์ TA 98 ที่กลายไปแล้วด้วย ฤทธิ์ของอะฟลาทอกซิน บีหนึ่ง กลับคืนเป็นสายพันธุ์เดิมได้อีกครั้งหนึ่ง (bio-antimutagenicity) การแยกสารสกัดจากชาด้วยเมทธานอลให้บริสุทธิ์บางส่วน โดย Sephadex LH-20 คอลัมน์โครมาโตกราฟี สามารถแยกสารสกัดได้ 5 ส่วน (ส่วนที่ 1, 2, 3, 4 และ 5) พบว่าส่วนที่ 3, 4 และ 5 มีฤทธิ์ต่อต้านการ กลายที่เกิดจากอะฟลาทอกซิน บีหนึ่ง ในแบคทีเรีย ซัลโมเนลลา รัยพีมิวเรียม สายพันธุ์ TA 98 และลักษณะการยับยั้งมากขึ้นตามปริมาณสาร ในส่วนที่ 4 อาจมีผลต่อการลดฤทธิ์ของสารสกัดตัวกลาง ในขบวนการเมตาบอลิซึม ของ อะฟลาทอกซิน บีหนึ่ง หรือ ทำให้เอนไซม์ใน S9 fraction ลดลง แต่ไม่มีฤทธิ์ทำ ลายอะฟลาทอกซิน บีหนึ่งโดยตรง และยังมีฤทธิ์เป็น bio-antimutagen ใน ส่วนที่ 3 และ 4

สารยับยั้งการกลายจากสารสกัดด้วยเมทธานอลของหญ้าปักกิ่ง สามารถแยกได้ 4 ส่วน (ส่วนที่ I, II, III และ IV) ทุกส่วนมีฤทธิ์ต้านการกลาย ที่เกิดจากอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง ส่วนที่ I, III และ IV อาจลดฤทธิ์ของ เอนไซม์ ใน S9 fraction หรืออาจไปทำลายสารตัวกลางด้วย แต่ไม่พบฤทธิ์ bio-antimutagen ในทุก ๆ ส่วนที่แยก จากการศึกษาค้นคว้าพบว่าอิออนบวกได้แก่ Ca<sup>2+</sup> และ Mg<sup>2+</sup> มีผล ทำให้การยับยั้งการกลายที่เกิดภายนอกเซลล์ได้

(desmutagenicity) ของส่วนที่ 4 ที่แยกจากชา และส่วนที่ I และ IV ที่แยกจาก  
หญ้าปักกิ่งลดลง

จากผลการทดลองครั้งนี้ พบว่า ชา และหญ้าปักกิ่ง มีฤทธิ์ยับยั้งการ  
กลายที่เกิดจาก อะฟลาทอกซิน บีหนึ่ง โดยอาจไปลดการทำงานของเอนไซม์  
ใน S9 fraction โดยการทดสอบการกลายในแบคทีเรียซัลโมเนลลา

ในขณะนี้ ยังไม่สามารถบอกลักษณะและโครงสร้างของสารต้านการ  
กลายในสมุนไพรร ทั้ง 2 ชนิดได้ ควรจะมีการศึกษาต่อไป โดยการแยกสาร  
สำคัญให้บริสุทธิ์และศึกษาถึงคุณสมบัติของสารที่มีฤทธิ์ต้านการกลายรวม  
ทั้งศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงที่ยับยั้งการกระตุ้นภายในร่างกาย ระบบ  
ซ่อมแซม DNA รวมทั้งฤทธิ์ต้านการเกิดมะเร็งของสมุนไพรร ทั้ง 2 ชนิด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved