Thesis title	**Antimutagenicity and DT-diaphorase inducing activity of *Murdannia loriformis***
Author	**Mrs. Wiriya Charoenkunathum**
Master of science	**Biochemistry**

Examining committee

Associate Professor Dr. Usanee Vinitketkumnuen	**Chairperson**
Assistant Professor Dr. Duangta Kanjanapothi	**Member**
Assistant Professor Dr. Umnat Mevatee	**Member**
Assistant Professor Dr. Prachya Kongtawelert	**Member**

ABSTRACT

This study reveals that an ethanolic extract of *Murdannia loriformis* (family Commelinaceae) had non-mutagenic effect in *S.typhimurium* TA 100 and TA 98 with and without metabolic activation. The extract had both DT-diaphorase inducing activity on murine hepatoma (Hepa 1c1c7) and antimutagenicity against MNNG (direct acting mutagen) and AFB_1, IQ, Glu-P-1, Glu-P-2, Trp-P-1, and Trp-P-2 (indirect acting mutagen) in modified Ames' test. The antimutagenic activity and DT-diaphorase inducing activity were dose-dependent. The cytotoxicity of extract was observed at dose 200 µg/ well in Hepa 1c1c7, which was about 60% of cytotoxicity. The extract can not inhibit the mutagenesis induced by NaN_3, AF-2, and B(a)P. It indicates that the extract contains antimutagenic substances, which

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

may be specific either to the kind of mutagen or the type of mutagenic activating isozymes. The antimutagenic effect of the extract may occur by interfering with the activating enzymes or by direct reaction to mutagen and resulted in less toxic compounds. Some antimutagenic factors may be heat labile, since its antimutagenicity was decreased after the extract was heated.

The antimutagenicity and DT-diaphorase inducer activity still persisted after fractionation by Sephadex LH-20 column chromatography and C-18 reverse-phase HPLC. Seven fractions were produced after Sephadex LH-20 column chromatography separation. Each fraction had antimutagenicity against MNNG. IQ, Glu-P-1, and AFB_1 with different in potency. DT-diaphorase inducing activity and cytotoxicity was observed remarkably in fraction 1, while fraction 2 and 3 had less effect.

Fraction 1, 4, and 7 were further purified by HPLC. Fraction 1 was separated into two peaks, 1a and 1b. Fraction 4 was fractionated into three peaks, 4a, 4b, and 4c. Two peaks 7a and 7b were separated from fracton 7. At the same amount(50 µg/pl) all HPLC-peaks had more antimutagenicity against AFB_1 and MNNG than their parent fractions, except the peak 4b, which its antimutagenicity against AFB_1 was less than fraction 4.

At the dose of 20 µg/well, Peak 1a, 4b, and 4c could induce DT-diaphorase specific activity which was more than 2 times of control. The antimutagenic activity and DT-diaphorase inducer activity were not present in the same fraction. This indicates that antimutagenic

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

and DT-diaphorase inducing principles presented in the extract were not the same.

Besides having an antimutagenicity, a co-mutagenicity was also observed in the extract. At lower concentration the extract could enhance the mutagenicity of Trp-P-2, while fraction 1 and 4 increased the mutagenicity of MNNG. The co-mutagenicity of fraction 1 and 4 was lost after fractionation by HPLC. It indicates that the co-mutagenicity may require the combination of the compounds presence in each fraction.

The present study has revealed that *Murdannia loriformis* possesses antimutagenic activity and DT-diaphorase inducing activity. Thus further evaluation and development of the plant as a cancer chemoprotective agent appears to be warranted.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อวิทยานิพนธ์ ฤทธิ์ด้านการกลายและฤทธิ์เหนี่ยวนำเอนไซม์ดีทีไดอะฟอเรส ของหญ้าปักกิ่ง

ชื่อผู้เขียน นาง วิริยา เจริญคุณธรรม

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาชีวเคมี

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

รศ.ดร.อุษณีย์ วินิจเขตคำนวณ	**ประธานกรรมการ**
ผศ.ดร.ดวงดา กาญจนโพธิ์	**กรรมการ**
ผศ.ดร.อำนาจ มีเวที	**กรรมการ**
ผศ.ดร.ปรัชญา คงทวีเลิศ	**กรรมการ**

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดเอธานอลของหญ้าปักกิ่ง (*Murdannia loriformis*) ซึ่งจัดอยู่ในตระกูล Commelinaceae ไม่มีฤทธิ์ก่อการกลาย เมื่อทดสอบในแบคทีเรีย ซัลโมเนลลา ธัยพีมิวเรียม สายพันธุ์ TA 100 และ TA 98 ทั้งในภาวะที่มีเอนไซม์กระตุ้นและไม่มี สารสกัดนี้ยังแสดงฤทธิ์เหนี่ยวนำเอนไซม์ ดีทีไดอะฟอเรส เมื่อทดสอบในเซลล์มะเร็งตับของหนูที่ชื่อว่า Hepa 1c1c7 และมีฤทธิ์ต้านการกลายต่อสารก่อการกลายทั้งชนิดที่ออกฤทธิ์โดยตรงคือ MNNG และสารก่อการกลายที่ต้องถูกเมแทบอไลท์เพื่อให้มีฤทธิ์ เช่น AFB_1, IQ, Glu-P-1, Glu-P-2, Trp-P-1 และ Trp-P-2 ฤทธิ์ยับยั้งการกลายและฤทธิ์เหนี่ยวนำเอนไซม์ขึ้นอยู่กับปริมาณของสารสกัด สารสกัดหญ้าปักกิ่งที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปริมาณ 200 ไมโครกรัมต่อหลุม พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์ Hepa 1c1c7 มากถึง 60% สารสกัดจากหญ้าปักกิ่งไม่สามารถยับยั้งการกลายที่เกิดจากสารก่อการกลาย NaN_3, AF-2, และ B(a)P แสดงให้เห็นว่าสารสำคัญในสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านการกลายนั้นมีความจำเพาะต่อชนิดของสารก่อการกลาย และอาจออกฤทธิ์จำเพาะต่อชนิดของเอนไซม์ที่เมแทบอไลท์สารก่อการกลาย ฤทธิ์ต้านการกลายของสารสกัดอาจเกิดจากการยับยั้งเอนไซม์ในกระบวนการกระตุ้นสารก่อการกลาย หรืออาจเกิดจากการทำปฏิกริยาโดยตรงระหว่างสารสกัดและสารก่อการกลายทำให้ได้สารที่มีฤทธิ์น้อยลง สารต้านการกลายบางส่วนเป็นสารที่ถูกทำลายด้วยความร้อน เนื่องจากฤทธิ์ต้านการกลาย ลดลงบางส่วน หลังจากนำสารสกัดไปผ่านความร้อน

ฤทธิ์ต้านการกลายและฤทธิ์เหนี่ยวนำเอนไซม์ดีทีไดอะฟอเรส ยังคงมีอยู่หลังจากสารสกัดถูกแยกส่วนโดย เจลโครมาโตรกราฟฟีชนิด Sephadex LH-20 และ reverse-phase HPLC เจลโครมาโตรกราฟฟีสามารถแยกสารสกัดออกได้เป็น 7 ส่วน ซึ่งแต่ละส่วนสามารถแสดงฤทธิ์ต้านการกลาย ต่อสารก่อการกลาย AFB_1, IQ, Glu-P-1, และ MNNG ได้ในระดับที่แตกต่างกัน สำหรับฤทธิ์เหนี่ยวนำเอนไซม์และความเป็นพิษต่อเซลล์พบมากที่สุดในสารสกัดส่วนที่ 1 ขณะส่วนที่ 2 และส่วนที่ 3 มีฤทธิ์น้อยที่สุด

สารสกัดส่วนที่ 1, 4, และ 7 ถูกนำมาแยกบริสุทธิ์บางส่วนต่อโดยใช้ HPLC ส่วนที่ 1 ถูกแยกออกอีกเป็น 2 ส่วนใหญ่ๆ คือ 1a และ 1b ส่วนที่ 4 ถูกแยกได้ 3 ส่วน คือ 4a, 4b และ 4c สำหรับส่วนที่ 7 แยกได้อีก 2 ส่วน คือ 7a และ 7b สารแต่ละส่วนที่ได้จาก HPLC พบว่ามีฤทธิ์ต้านการกลายต่อ AFB_1 และ MNNG ได้มากกว่าสารสกัดส่วนดั้งเดิมที่ความเข้มข้นเท่ากัน ยกเว้นเฉพาะส่วน 4b ซึ่งมีฤทธิ์ต้านการกลายต่อ AFB_1 น้อยกว่าสารสกัดส่วนที่ 4

สารสกัดส่วน 1a, 1b, และ 4c มีความสามารถเหนี่ยวนำเอนไซม์ ดีทีไดอะฟอเรสได้มากกว่า 2 เท่าของกลุ่มควบคุม ที่ความเข้มข้นเท่ากันคือ 20 ไมโครกรัมต่อหลุม เป็นที่น่าสังเกตว่าฤทธิ์ต้านการกลายและฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำเอนไซม์ไม่จำเป็นต้องเกิดขึ้นใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สาร สกัดส่วนเดียวกัน ซึ่งแสดงว่าสารสกัดประกอบด้วยสารต้านการกลายและสารเหนี่ยวนำเอนไซม์ ซึ่งอาจเป็นสารคนละชนิดกัน

นอกจากสารสกัดหญ้าปักกิ่งมีฤทธิ์ต้านการกลายแล้วยังมีฤทธิ์ร่วมก่อการกลายด้วย พบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้นต่ำสามารถเหนี่ยวนำการกลายที่เกิดจาก Trp-P-2 ได้ ในขณะที่สารสกัดส่วนที่ 1 และ 4 สามารถเพิ่มการกลายที่เกิดจาก MNNG ได้ แต่ไม่พบฤทธิ์ร่วมการกลายหลังจากถูกแยกโดย HPLC แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ร่วมก่อการกลายต้องการการรวมตัวกันของสารที่มีอยู่ในส่วนสารสกัดเดิม

การที่หญ้าปักกิ่งแสดงฤทธิ์ทั้งต้านการกลาย และฤทธิ์เหนี่ยวนำเอนไซม์ ดีทีไดอะฟอเรส จึงเป็นที่น่าสนใจที่ควรจะมีการศึกษาถึงฤทธิ์ป้องกันการเกิดมะเร็งของหญ้าปักกิ่งต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved