Thesis title : **Partial purification of antimutagenic substance from lemon grass (Cymbopogon citratus Stapf.) and their possible mechanism of inhibition.**

Author : **Miss Nattaka Lomsri**

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.Prachaya Kongtawelert	Member

ABSTRACT

The effect of lemon grass extracts on the mutagenicity of various known mutagens, both required metabolic activation such as aflatoxin B_1 (AFB_1), benzo(a)pyrene [B(a)P], 7,12-dimethylbenzanthracene (DMBA), and typical amino acid pyrolysates, imidazoquinoline (IQ), and Trp-P-1 as well as direct-acting mutagens such as, N-methyl-n'-nitro-N-nitroso guanidine (MNNG), sodium azide (NaN_3), 4-nitro quinoline oxide (4-NQO), and furylfuramide (AF-2) were investigated in the short-term Salmonella mutation assay, Ames test. Three extracts : aqueous, methanol and

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

hexane, at different amount were used. The extracts themselves were not mutagenic to Salmonella typhimurium strain TA98 and TA100 in the presence and absence of metabolic activation (S9 mix).

It was demonstrated that an aqueous extract showed lower efficiency to decrease the carcinogenic-induced mutation. It has antimutagenicity against only AFB_1 and IQ mutagenesis. The potent antimutagenicity was in methanol and hexane extracts. They depressed the mutagenicity of AFB_1, B(a)P, DMBA, Trp-P-1, IQ, MNNG, 4-NQO and AF-2, but did not affect on the mutagenicity of NaN_3. The inhibitory effect was dose -relationship. The methanol extract did not affect the survival of the bacterial tester strains but hexane extract did. When the amount of the hexane extract was increased more than 30.0 mg per plate, toxicity to bacteria was observed. The methanol extract did not reduce the number of background lawn growth of bacteria as seen under stereomicroscope. Heating neither altered the mutagenicity nor antimutagenicity of lemon grass extracts.

There are several antimutagenic substances presented in lemon grass. At least 6 antimutagenic substances were separated from methanol extract of lemon grass by Sephadex LH-20 column chromatography. Further separation by high performance liquid chromatography (HPLC), could partially purify at least 2 antimutagenic

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

substances. These two substances gave a single spot on thin layer chromatography with two different solvent systems. The partial purified substances exhibited the maximum absorption spectra as scanned by HPLC-analysis, peak $2a_1$ with its maxima at 220-240 nm and peak $2a_2$ showed a maximum absorption at 220-230 nm.

Future study of the identification of the two substances and other antimutagens in lemon grass may completely valilate the information which can be useful to assess whether these minor dietary components influence on cancer prevention.

Several mutagenesis inhibitors have been demonstrated to be carcinogenic inhibitors as well. It was anticipated that Thai medicinal plant, such as lemon grass (Cymbopogon citratus, Stapf.) might be a useful source of cancer chemopreventive agents.

This study have provided information on the presentation of the antimutagen factors in one of the Thai medicinal plants which is commonly used in part or in whole, as dietary or medicinal components. The information on the presence of antimutagens might be used to suggest to the public to realize how to prevent some disease by dietary means. In addition, the scientific information of Thai medicinal plant was documented.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

When active antimutagens were identified, further work will be directed toward anticarcinogenic activity. It might turn out that the active antimutagens are compounds that are already known, or on the other hand, it could lead to the discovery of some hitherto unregconized compound with antimutagenicity.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อวิทยานิพนธ์ การแยกบริสุทธิ์บางส่วนของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการกลายจากตะไคร้ และกลไกการยับยั้งที่อาจเป็นไปได้

ชื่อผู้เขียน น.ส.นัฏกา ลอมศรี

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

ผศ.ดร.อุษณีย์ วินิจเขตคำนวณ .... ประธานกรรมการ
รศ.ดร.ไมตรี สุทธจิตต์ ..... กรรมการ
ผศ.ดร.อำนาจ มีเวที ..... กรรมการ
อ. ดร.ปรัชญา คงทวีเลิศ ..... กรรมการ

บทคัดย่อ

การศึกษาฤทธิ์ต้านการกลายของสารสกัดจากตะไคร้ด้วยน้ำ เมทธานอลและเฮกเซน โดยศึกษาการยับยั้งกลายในแบคทีเรีย Salmonella typhimurium สายพันธ์ TA98 และ TA 100 ที่เกิดจากสารก่อการกลายมาตรฐานชนิดต่าง ๆ ที่ต้องการกระตุ้นเมตะบอลิสม์ ได้แก่ อะฟลาทอกซิน (AFB_1) เบนโซพัยรีน [(B (a) P], 7, 12- ไดเมธิลเบนซาแอนทราซีน (DMBA,) สารก่อการกลายที่เกิดจากความร้อน คือ อิมิดาโซควีโนลีน (IQ) และTrp-P-1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

และสารก่อการกลายที่ไม่ต้องการกระตุ้นด้วยเอ็นไซม์ ได้แก่ เมทธิลไนโตรโซกัวนิดีน (MNNG), โซเดียมเอซายด์ (NaN_3) และ ฟูริลฟูรามีด (AF-2), การทดสอบฤทธิ์การกลายของสารสกัดทั้งสามส่วนในแบคทีเรียไม่แสดงผลแต่อย่างใด ไม่ว่าจะกระตุ้นด้วยเอนไซม์ ที่แยกจากตับหนู (S9 mix) หรือไม่

จากการศึกษาพบว่าสารสกัดจากตะไคร้ในส่วนของน้ำแสดงฤทธิ์ยับยั้งการกลายที่เกิดจาก AFB_1 และ IQ ได้เล็กน้อย แต่สารสกัดจากเมทธานอลและเฮกเซน แสดงฤทธิ์ต้านการกลายได้มาก โดยยับยั้งการกลายที่เกิดจากการเหนี่ยวนำของ AFB_1, B(a) P, DMBA Trp-P-1 IQ, MNNG, 4-NQO และ AF-2 แต่ไม่มีผลกับ NaN_3 การยับยั้งมีมากขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณของสารสกัด สารสกัดในส่วนของเมทธานอล ไม่มีผลต่อการทำลายแบคทีเรีย แต่สารสกัดในส่วนของเฮกเซน เมื่อเพิ่มปริมาณมากกว่า 30 มิลลิกรัม/plate จะมีผลทำลายแบคทีเรีย เมื่อดูผ่านกล้องจุลทรรศน์ พบว่าส่วนสกัดจากเฮกเซนทำให้จำนวน โคโลนี ของแบคทีเรียลดลงแต่สารสกัด ส่วนเมทธานอล ไม่ทำ ให้จำนวน โคโลนี ของแบคทีเรียลดลง

นอกจากนี้ การทดลองพบว่าความร้อนไม่มีผลต่อฤทธิ์ก่อการกลายและฤทธิ์ต้านการกลายของสารสกัดจากตะไคร้

เมื่อนำสารสกัดจากตะไคร้ในส่วนของเมทธานอลไปแยกบริสุทธิ์บางส่วน โดยวิธีโครโมโตกราฟฟี่ โดยใช้ Sephadex LH-20 และ high performance liquid chromatography (HPLC) จากการแยกบางส่วนโดย Sephadex LH-20 colum ได้แยกสารสกัดออกเป็น 6 ส่วน ซึ่งแสดงฤทธิ์ต้านการกลายต่อ AFB และ MNNG ได้ทุกส่วน เมื่อนำส่วนที่แสดงฤทธิ์ต้านการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กลายได้ดีและมีปริมาณที่แยกได้มากที่สุดไปแยกให้บริสุทธิ์ต่อโดย HPLC พบว่าสามารถแยกส่วนที่แสดงฤทธิ์ต้านการกลายออกได้อีก 2 ส่วน สารประกอบสองส่วนนี้ เมื่อนำไปแยกบน Thin layer chromatography พบว่าแต่ละส่วนน่าจะประกอบด้วยสารประกอบเพียง 1 ชนิด เพราะแสดงการแยกเพียง 1 จุด ในแต่ละส่วน สารประกอบที่แยกจาก HPLC (peak $2a_1$ และ $2a_2$) สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 220 240 nm และ 220-230 nm ตามลำดับ

การศึกษาในอนาคต ถึงคุณลักษณะของสารทั้งสองตัวและสารที่มีฤทธิ์ต้านการกลายอื่น ๆ ในตะไคร้ อาจจะทำให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์ซึ่งมีประโยชน์ต่อการประเมินถึงความสามารถขององค์ประกอบย่อยในอาหารเหล่านี้ ในการป้องกันมะเร็งมากยิ่งขึ้น

มีการศึกษาที่ยืนยันว่าสารยับยั้งการกลายทั้งหลาย อาจเป็นสารยับยั้งการเกิดมะเร็งได้เป็นอย่างดี ดังนั้น พืชสมุนไพรไทย เช่นตะไคร้ ซึ่งพบมีการต้านการกลาย อาจจะนำมาวิเคราะห์หาสารที่มีประโยชน์ต่อการรักษาโรคมะเร็งในอนาคตต่อไปได้

ในการศึกษาครั้งนี้ ทำให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับองค์ประกอบที่ยับยั้งการกลายในตะไคร้ ซึ่งเป็นสมุนไพรที่ใช้กันทั่วไป ในรูปของอาหาร หรือองค์ประกอบของยาสมุนไพร ข้อมูลเกี่ยวกับสารยับยั้งการกลายที่มีอยู่ในสมุนไพร อาจจะสามารถนำไปเสนอให้แก่สาธารณชน เพื่อให้ตะหนักถึง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีในการป้องกันโรคบางอย่างโดยวิธีการเลือกอาหาร

หากสามารถวิเคราะห์จนได้รู้ถึงสารยับยั้งการกลายแล้ว งานที่ควรทำ ต่อไปก็คือ การศึกษาถึงฤทธิ์ยับยั้งมะเร็งของมัน ผลจากการศึกษาอาจจะได้ข้อมูลว่าสารยับยั้งการกลายอาจเป็นสารที่เคยมีรายงานแล้ว หรืออาจเป็นสารบางชนิดที่เป็นส่วนประกอบของพืชที่มีรายงานแต่ยังไม่เคยพบถึงคุณสมบัติของการเป็นสารยับยั้งการกลายของมัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved