

ฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์และฤทธิ์ด้านออกซิเดชันของดอกไม้บางชนิด

นางสาวอรนุช วงศ์วัฒนาเสถียร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# ANTIMUTAGENIC AND ANTIOXIDATIVE ACTIVITIES OF SOME FLOWERS

Miss Oranuch Wongwattanasathien

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Pharmaceutical Chemistry and

Natural Products

Faculty of Pharmaceutical Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2008


Copyright of Chulalongkorn University

510804

Thesis Title           ANTIMUTAGENIC AND ANTIOXIDATIVE ACTIVITIES OF  
SOME FLOWERS.  
By                       Miss Oranuch Wongwattanasathien  
Field of Study        Pharmaceutical Chemistry and Natural Products  
Advisor               Assistant Professor Linna Tongyonk, D.Sc.  
Co-Advisor          Associate Professor Kaew Kangsadalampai, Ph.D.  
Co-Advisor          Associate Professor Nijisiri Ruangrunsi, Ph.D.

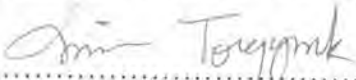
---


Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University in  
Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctoral Degree


 ..... Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences  
(Associate Professor Pornpen Pramyothin, Ph.D.)

#### THESIS COMMITTEE

 ..... Chairman  
(Associate Professor Oranong Kangsadalampai, Ph.D.)

 ..... Advisor  
(Assistant Professor Linna Tongyonk, D.Sc.)

 ..... Co-Advisor  
(Associate Professor Kaew Kangsadalampai, Ph.D.)

 ..... Co-Advisor  
(Associate Professor Nijisiri Ruangrunsi, Ph.D.)

 ..... Examiner  
(Associate Professor Surattana Amnuoypol, Ph.D.)

 ..... Examiner  
(Assistant Professor Maneewan Suksomtip, Ph.D.)

 ..... Exerternal Examiner  
(Associate Professor Wandee Gritsanapan, Ph.D.)

อรนุช วงศ์วัฒนาเสถียร : ฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์และฤทธิ์ด้านออกซิเดชันของดอกไม้บางชนิด.  
(ANTIMUTAGENIC AND ANTIOXIDATIVE ACTIVITIES OF SOME FLOWERS) อ. ที่ปรึกษา  
วิทยานิพนธ์หลัก : ผศ.ดร.ลินนา ทองรงค์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : รศ.ดร.แก้ว กังสดาลอำไพ,  
รศ.ดร. นิจศิริ เรืองรังษี, 191 หน้า.

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์คือศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัด เมธานอล และน้ำของดอกชบา (*Hibiscus rosa-sinensis* Linn.), พวงชมพู (*Antigonon leptopus* Hook. & Arn.), เข็ม (*Ixora coccinea* Linn.), ต้นทมชาว (*Plumeria obtusa* Linn.), ชมพู่มาเลเซีย (*Syzygium malaccense* (Linn.) Merr. & Perry), กระเจียว (*Curcuma sessilis* Gage), บัว (*Nelumbo nucifera* Gaertn.), ป๊อป (*Millingtonia hortensis* Linn.), ทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus* (Linn.) Kurz.) และทับทิม (*Punica granatum* Linn.) โดยใช้ brine shrimp พบว่าสารสกัดของดอกไม้ส่วนใหญ่ไม่มีพิษ นอกจากนี้ศึกษาฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากดอกไม้ ด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay (DPPH) และวิธี ferric reducing antioxidant power (FRAP) ส่วนปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกนั้นได้ทำการศึกษาโดยใช้ Folin-Ciocalteu เป็นตัวทำปฏิกิริยา พบว่าสารสกัดด้วยน้ำของดอกเข็มแสดงฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระสูงสุด (โดยวิธี FRAP) และแสดงปริมาณสารฟีนอลิกสูงสุด

นอกจากนี้ศึกษาฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดของดอกไม้ต่อผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาของอิมิโนพัยริน ทำปฏิกิริยากับไนไตรท ในสถานะที่ไม่มีการกระตุ้นด้วยเอนไซม์ ด้วยวิธีการทดสอบเอมส์ โดยใช้ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA 98 และ TA 100 และผลของสารสกัดถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์ต่อยิวรีเทนในแมลงหวี่สายพันธุ์ *Drosophila melanogaster* ด้วยวิธีโซมาติกมิวเตชันและรีคอมบินเนชัน ผลการศึกษาพบว่าทุกตัวอย่างไม่แสดงฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ ด้วยวิธีการทดสอบเอมส์และวิธีโซมาติกมิวเตชันและรีคอมบินเนชัน สารสกัดส่วนใหญ่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์หลังจากทำปฏิกิริยากับไนไตรท สารสกัดเมธานอลของดอกบัวทำปฏิกิริยากับไนไตรทแสดงฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์สูงทั้งในสายพันธุ์ TA 98 และ TA 100 คือพบโคโลนีกลายพันธุ์ 1194 โคโลนีที่ความเข้มข้น 3.2 มิลลิกรัมของสารสกัด โดยใช้ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA 98 และ 992 โคโลนีที่ความเข้มข้น 1.6 มิลลิกรัมของสารสกัด โดยใช้ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA 100 อย่างไรก็ตามสารสกัดด้วยไคลลอโรมีเทนของชบา, ต้นทม และ เกสรชมพู, สารสกัดเมธานอลของเกสรชมพู และสารสกัดน้ำของชบา ไม่แสดงฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์เมื่อทำปฏิกิริยากับไนไตรท สารสกัดด้วยไคลลอโรมีเทนของดอกไม้ทุกชนิดแสดงฤทธิ์ยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ต่อผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาของอิมิโนพัยรินทำปฏิกิริยากับไนไตรทในสถานะที่ไม่มีการกระตุ้นด้วยเอนไซม์ ทั้งในสายพันธุ์ TA 98 และ TA 100 พบว่าสารสกัดด้วยเมธานอลของดอกกระเจียวและสารสกัดด้วยเมธานอลของดอกทับทิมในขนาดที่ให้สูงสุด (15 มิลลิกรัมต่อจานเลี้ยงเชื้อ) มีฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์สูงสุดในสายพันธุ์ TA 98 (98%) และในสายพันธุ์ TA 100 (100%) ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าสารสกัดด้วยน้ำของดอกเข็ม แสดงฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์สูงสุดในวิธีโซมาติกมิวเตชันและรีคอมบินเนชัน ซึ่งอาจจะเป็นผลของสารฟลาโวนอยด์และไตรเทอร์ปีนที่แสดงคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ จากการศึกษาพบว่าสารสกัดของดอกไม้ช่วยลดความเสี่ยงจากการได้รับสารก่อกลายพันธุ์ ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระ

สาขาวิชาเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ.....

ลายมือชื่อนิติศ..... *ณิศา วงศ์วัฒนาเสถียร*.....

ปีการศึกษา 2551.....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก..... *ลินนา ทองรงค์*.....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม..... *K. Kung and Jany...*.....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม..... *ณิศา วงศ์วัฒนาเสถียร*.....

## 4776956333: MAJOR PHARMACEUTICAL CHEMISTRY AND NATURAL PRODUCTS  
KEYWORDS:ANTIMUTAGENICITY/SMART/AMES TEST/1-AMINOPYRENE/ URETHANE

ORANUCH WONGWATTANASATHIEN: ANTIMUTAGENIC AND ANTIOXIDATIVE ACTIVITIES OF SOME FLOWERS. ADVISOR: ASST. PROF. LINNA TONGYONK, D.Sc., CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. KAEW KANGSADALAMPAI, Ph.D., ASSOC. PROF. NIJSIRI RUANGRUNGSI, Ph.D., 191 pp.

The objectives of this study were aimed to determine the cytotoxicity of methanol and water extracts of red hibiscus (*Hibiscus rosa-sinensis* Linn.), Mexican creeper (*Antigonon leptopus* Hook. & Arn.), ixora (*Ixora coccinea* Linn.), white frangipani (*Plumeria obtusa* Linn.), malay apple (*Syzygium malaccense* (Linn.) Merr.& Perry), kra chiew (*Curcuma sessilis* Gage), sacred lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.), Indian cork tree (*Millingtonia hortensis* Linn.), thong pun chang (*Rhinacanthus nasutus* ((Linn.) Kurz.) and pomegranate (*Punica granatum* Linn.) in the brine shrimp. It was found that most flower extracts were not cytotoxic. Antioxidant activity of flower extracts was assessed by using two methods: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay (DPPH) and ferric reducing antioxidant power (FRAP). The content of phenolic compound in the flower extracts was also determined using Folin-Ciocalteu reagent. Water extract of ixora exhibited the strongest antioxidant activity (FRAP assay) and showed the highest total phenolic content.

This study was also aimed to determine the antimutagenicity of flower extracts against the product of the reaction mixture of 1-aminopyrene-nitrite model in the absence of metabolic activation on *Salmonella typhimurium* strains TA 98 and TA 100 in the Ames test. The antimutagenic potential against urethane induced somatic mutation and recombination test (SMART) using *Drosophila melanogaster* was also performed. The results showed that none of the samples was mutagenic in the Ames test and SMART. Most of the extracts were mutagenic after nitrite treatment. Nitrite treated methanol extract of sacred lotus exhibited the highest mutagenicity on both strains in the Ames test. It induced 1194 revertants of 3.2 mg of sample per plate on TA 98 and 992 revertants of 1.6 mg of sample per plate on TA 100. However, dichloromethane extracts of red hibiscus, white frangipani, malay apple, methanol extract of malay apple and water extract of red hibiscus were an exception because they were not mutagenic after nitrite treatment. All the dichloromethane extracts of flowers decreased the mutagenicity of the reaction mixture of 1-aminopyrene nitrite model on both tester strains. Methanol extract of kra chiew and pomegranate (15 mg/plate) showed the highest antimutagenic activity in TA 98 (98%) and TA 100 (100%), respectively. It was found that the water extract of ixora was the strongest antimutagenic activity in the SMART. The protective effects of these flower extracts may be due to the presence of flavonoids and triterpenes which exerted the antioxidant activity. The finding from this study suggested that the flower extracts minimize the risk of exposure to any mutagens possibly be due to their antioxidant activity.

Field of Study : Pharmaceutical Chemistry  
and Natural Product .....  
Academic Year: 2008.....

Student's Signature : ..Oranuch Wongwattanasathien  
Advisor's Signature : ..Linna Tongyongk  
Co-Advisor's Signature : ..K. Kangsadalampai  
Co-Advisor's Signature : ..Nij Siri Ruangrungsi

## ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere gratitude and deep appreciation to my advisor, Assistant Professor Dr. Linna Tongyonk for her valuable advice, guidance, and encouragement throughout my graduate study.

I am very grateful to my co-advisor Associate Professor Dr. Kaew Kangsadalampai, Institute of Nutrition, Mahidol University for his kindness, technical guidance, expertise, comments, and invaluable suggestions. I am deeply honored for his keen interest, dedication, and for giving me the privilege of using the laboratory.

I am very grateful to my co-advisor Associate Professor Dr Nijisiri Ruangrungsi. I am very much obliged and honored to the members of the thesis committee, Associate Professor Dr. Oranong Kangsadalampai, Associate Professor Dr. Surattana Amnuoypol, Assistant Professor Dr. Maneewan Suksomthip, and Associate Professor Dr. Wandee Gritsanapan for their supportive attitude and constructive criticisms over my thesis.

My special thanks go to Associate Professor Ing-on Mondranondra and Mr. Dokngam Sudjom who are very helpful and never ceased to show his cordiality and kindness towards me as well as all members of the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University and the Institute of Nutrition, Mahidol University for their solving technical problems, assistance, and encouragement as long as I took the lab.

I am grateful to my friends either at the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University or at the Institute of Nutrition, Mahidol University, who always cherished in my heart for all the help rendered and their timely assistance to overcome all difficulties.

I am really thankful to the Faculty of Graduate studies, Chulalongkorn University for the supporting scholarship which enabled me to undertake this study.

Finally, my special gratitude is expressed to my beloved family for their love, care, support and much encouragement throughout the period of my graduate study.

# CONTENT

	Page
ABSTRACT (THAI).....	iv
ABSTRACT (ENGLISH).....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENT.....	vii
LIST OF TABLES.....	x
LIST OF FIGURES.....	xii
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xv
<b>CHAPTER</b>	
<b>I INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1.1 Background and Significance of the Study.....	1
1.2 Objectives of the study.....	2
1.3 Benefits of the Study.....	3
<b>II LITERATURE REVIEW.....</b>	<b>4</b>
2.1 Major Natural Components in Flower.....	5
2.1.1 Flavonoids.....	5
2.1.2 Anthocyanins.....	7
2.1.3 Carotenoids.....	9
2.1.4 Chlorophyll.....	9
2.1.5 Triterpenoids.....	10
2.2 Selected Flowers.....	11
2.2.1 <i>Hibiscus rosa-sinensis</i> Linn. (Red hibiscus, หนาด).....	11
2.2.2 <i>Antigonon leptopus</i> Hook. & Arn (Mexican creeper, พวงชมพู).....	13
2.2.3 <i>Ixora coccinea</i> Linn. (Ixora, เข็ม).....	14
2.2.4 <i>Plumeria obtusa</i> Linn. (White frangipani, ต้นทนงา).....	15
2.2.5 <i>Syzygium malaccense</i> ((Linn.) Merr. & Perry) (Malay apple, ชมพู่หน้าหนังสือ).....	16

<b>CHAPTER</b>	<b>Page</b>
2.2.6 <i>Curcuma sessilis</i> Gage. (Kra chiew, กระเจี๊ยบ).....	17
2.2.7 <i>Nelumbo nucifera</i> Gaertn. (Sacred lotus, บัวหลวง).....	18
2.2.8 <i>Millingtonia hortensis</i> Linn. (Indian cork tree, ชีง).....	19
2.2.9 <i>Rhinacanthus nasutus</i> ((Linn.) Kurz.) (Thong pun chang, ทองพันชั่ง).....	20
2.2.10 <i>Punica granatum</i> Linn. (Pomegranate, ทับทิม).....	21
2.3 Nitrite as a Converter for Direct-Acting Mutagens.....	23
2.4 1-Aminopyrene-Nitrite Mutagenicity Model for Antimutagenicity Study.....	24
2.5 The Salmonella Mutagenicity Test (Ames Test).....	25
2.5.1 Screening of Histidine Mutants.....	25
2.5.2 Development of the Plate Incorporation Assay.....	26
2.5.3 Metabolic Activation Systems.....	27
2.5.4 The Salmonella Tester Strains.....	28
2.5.5 Validation Studies.....	29
2.5.6 Spontaneous Control Values.....	30
2.5.7 Toxicity Determination.....	30
2.6 Somatic Mutation and Recombination Test (SMART).....	31
2.6.1 Wing Spot Test in <i>Drosophila</i> .....	33
2.6.2 Standard Mutagens for Mutagenicity of SMART.....	36
2.6.2.1 Metabolic Activation and Detoxification of Urethane..	36
2.6.2.2 Mutagenicity of Urethane.....	38
2.6.2.3 Modification of the Mutagenicity of Urethane.....	39
2.7 Brine Shrimp Bioassays.....	40
2.8 Antioxidant Assays.....	41
2.8.1 2, 2'-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH) Assay.....	41
2.8.2 Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assay.....	42
2.8.3 Determination of Total Phenolic Contents.....	42
<b>III MATERIALS AND METHODS</b> .....	<b>43</b>
3.1 Sample Preparation.....	43
3.2 Experimental Design.....	46



<b>CHAPTER</b>	<b>Page</b>
3.3 Brine Shrimp Assay .....	48
3.4 Antioxidant Assay.....	49
3.5 Ames Test... ..	51
3.6 Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) .....	58
<b>IV RESULTS.....</b>	<b>62</b>
4.1 Brine Shrimp Bioassay.....	65
4.2 Antioxidant Activity.....	68
4.3 Mutagenicity of the Flower Extracts in Ames Test.....	71
4.4 Modulating Effect of the Flower Extracts in Ames Test.....	82
4.5 Survival Rate of Adult Flies and Mutagenicity of Samples in SMART.....	100
4.6 Antimutagenicity of samples in SMART .....	110
<b>V DISCUSSION.....</b>	<b>131</b>
5.1 Safety of the Extracts: Brine Shrimp Bioassay.....	132
5.2 Antioxidant Activity and Total Phenolic Content.....	133
5.3 Mutagenicity of Flower Extract in Ames Test .....	135
5.3.1 Modifying Effect of the Extracts of Flowers on the Mutagenicity of the Reaction Product of 1-Aminopyrene- Nitrite Model.....	137
5.4 Antimutagenicity of Samples in SMART.....	139
5.5 A Simple Criterion in the Selection of Flower for Further Study..	142
<b>VI CONCLUSION.....</b>	<b>144</b>
<b>REFERENCES.....</b>	<b>146</b>
<b>APPENDICES.....</b>	<b>174</b>
<b>BIOGRAPHY.....</b>	<b>191</b>

## LIST OF TABLES

Table	Page
1 Biomolecular activities of flavonoids.....	6
2 Genotype of the most commonly used <i>Salmonella</i> tester strains.....	28
3 Spontaneous revertant control values.....	30
4 Selected flowers in this study.....	44
5 Composition of media .....	59
6 The color of the flower extracts.....	63
7 Percent yield of the flower extracts from dry flower 20 g.....	64
8 Brine shrimp bioassay results of the flower extracts.....	66
9 Antioxidant activity and total phenolic content of the flower extracts.....	69
10 Mutagenicity of the flower extracts towards <i>Salmonella typhimurium</i> TA 98 without metabolic activation.....	72
11 Mutagenicity of the flower extracts towards <i>Salmonella typhimurium</i> TA 100 without metabolic activation.....	77
12 Modification effect of the flower extracts on the mutagenicity of sodium nitrite treated 1-aminopyrene (0.06 µg/plate) expressed as percent modification of number of revertants of <i>Salmonella typhimurium</i> strains TA 98 without metabolic activation.....	84
13 Modification effect of the flower extracts on the mutagenicity of sodium nitrite treated 1-aminopyrene (0.12 µg/plate) expressed as percent modification of number of revertants of <i>Salmonella typhimurium</i> strains TA 100 without metabolic activation.....	92
14 The percentage of survival adult flies fed on control and sample medium containing flower extracts (400 mg per tube).....	101
15 Mutagenicity of dichloromethane extracts of flowers reported as wing spot induction on <i>Drosophila melanogaster</i> from 100 trans heterozygous ( <i>mwh</i> <sup>+</sup> / <i>flr</i> <sup>3</sup> ) larvae of improved high bioactivation cross.....	102
16 Mutagenicity of methanol extracts of flowers reported as wing spot induction on <i>Drosophila melanogaster</i> from 100 trans heterozygous ( <i>mwh</i> <sup>+</sup> / <i>flr</i> <sup>3</sup> ) larvae of improved high bioactivation cross.....	105

<b>Table</b>	<b>Page</b>
17 Mutagenicity of water extracts of flowers reported as wing spot induction on <i>Drosophila melanogaster</i> from 100 trans heterozygous ( <i>mwh+/+flr<sup>3</sup></i> ) larvae of improved high bioactivation cross.....	108
18 Antimutagenicity of each dichloromethane extracts of flowers on urethane induced wing spots of <i>Drosophila melanogaster</i> derived from 100 trans-heterozygous ( <i>mwh+/+flr<sup>3</sup></i> ) larvae of improved high bioactivation cross in the co-administration study.....	111
19 Antimutagenicity of each methanol extracts of flower on urethane induced wing spots of <i>Drosophila melanogaster</i> derived from 100 trans-heterozygous ( <i>mwh+/+flr<sup>3</sup></i> ) larvae of improved high bioactivation cross in the co- administration study.....	117
20 Antimutagenicity of each water extracts of flower urethane induced wing spots of <i>Drosophila melanogaster</i> derived from 100 trans-heterozygous ( <i>mwh+/+flr<sup>3</sup></i> ) larvae of improved high bioactivation cross in the co-administration study.....	123

## LIST OF FIGURES

Figure	Page
1 Basic monomeric structure of flavonoids.....	5
2 Hypothesis of inhibition of carcinogenesis by flavonoids (FN).....	7
3 Structural identification of anthocyanidins (aglycons).....	8
4 <i>Hibiscus rosa-sinensis</i> Linn. (Red Hibiscus, ราชพฤกษ์).....	12
5 <i>Antigonon leptopus</i> Hook. & Arn (Mexican Creeper, พวงชมพู).....	14
6 <i>Ixora coccinea</i> Linn. (Ixora, เข็ม).....	15
7 <i>Plumeria obtusa</i> Linn. (White Frangipani, ต้นทวนขาว).....	16
8 <i>Syzygium malaccense</i> (Linn.) Merr. & Perry (Malay Apple, ชมพู่มาเลเซีย).....	17
9 <i>Curcuma sessilis</i> Gage. (Kra Chiew, กระเจี๊ยบ).....	17
10 <i>Nelumbo nucifera</i> Gaertn. (Sacred Lotus, บัวหลวง).....	19
11 <i>Millingtonia hortensis</i> Linn. (Indian Cork Tree, ปีน).....	20
12 <i>Rhinacanthus nasutus</i> ((Linn.) Kurz) (Thong Pun Chang, ทองพันชั่ง).....	21
13 <i>Punica granatum</i> Linn. (Pomegranate, ทับทิม).....	23
14 Mutagenic dose response with strain TA 100 and sodium azide. Control: spontaneous revertants; dose 1: 2.5 µg/plates; dose 2: 5 µg/plates.....	27
15 Marker mutations of wing surface to show clone of cuticle secreted by cells homozygous for multiple wing hairs.....	33
16 Genetics schemes illustrating various ways of spot formation in the somatic mutation and recombination test with the wing cell markers multiple wing hairs ( <i>mwh</i> ) and flare ( <i>flr<sup>3</sup></i> ).....	35
17 Known and probable activation and inactivation pathways of metabolism of urethane (ethyl carbamate), vinyl carbamate and vinyl carbamate epoxide.....	37
18 Schematic structures of urethane and its metabolites.....	38
19 The steps of flower extraction.....	45

<b>Figure</b>	<b>Page</b>
20 Overall investigations to elucidate the biological activities of selected flowers.....	47
21 Steps to determine the mutagenicity of samples using the Ames mutagenicity test (pre-incubation modification) in the absence of S-9 mix...	56
22 Steps to determine the antimutagenicity of samples using the Ames mutagenicity test (pre-incubation modification) in the absence of S-9 mix...	57
23 Normal half mesothorax showing the regions A-E of the wing surface scored for spots according to Graf et al. (1984).....	60
24 Co-administration study of sample on mutagenicity of urethane induced wing spots of <i>Drosophila melanogaster</i> .....	61
25 Modification effect of flower extracts (5 mg/plate) on the mutagenicity of sodium nitrite treated 1-aminopyrene on <i>Salmonella typhimurium</i> strains TA 98 without metabolic activation.....	89
26 Modification effect of flower extracts (10 mg/plate) on the mutagenicity of sodium nitrite treated 1-aminopyrene on <i>Salmonella typhimurium</i> strains TA 98 without metabolic activation.....	90
27 Modification effect of flower extracts (15 mg/plate) on the mutagenicity of sodium nitrite treated 1-aminopyrene on <i>Salmonella typhimurium</i> strains TA 98 without metabolic activation.....	91
28 Modification effect of flower extracts (5 mg/plate) on the mutagenicity of sodium nitrite treated 1-aminopyrene on <i>Salmonella typhimurium</i> strains TA 100 without metabolic activation.....	97
29 Modification effect of flower extracts (10 mg/plate) on the mutagenicity of sodium nitrite treated 1-aminopyrene on <i>Salmonella typhimurium</i> strains TA 100 without metabolic activation.....	98
30 Modification effect of flower extracts (15 mg/plate) on the mutagenicity of sodium nitrite treated 1-aminopyrene on <i>Salmonella typhimurium</i> strains TA 100 without metabolic activation.....	99
31 Antimutagenicity of dichloromethane, methanol and water extract of flower in co-administration in trial I.....	129

<b>Figure</b>	<b>Page</b>
32 Antimutagenicity of dichloromethane, methanol and water extract of flower in co-administration in trial II.....	130

**LIST OF ABBREVIATIONS**

His+	Histidine prototrophy
His-	Histidine dependent
SMART	Somatic Mutation and Recombination Test
GST	Glutathione-S-transferase
°C	degree Celsius
O <sub>2</sub> <sup>·-</sup>	superoxide radical
NO <sup>·</sup>	nitric oxide radical
g	gram
mg	milligram
µg	microgram
mM	millimolar
ml	millilitre
mm	millimetre
µl	microlitre
µM	micromolar
ppm	part per million
N	normality
min	minute
h	hour
SD	standard deviation
<i>et al.</i>	<i>et alia</i> (and others)
<i>etc.</i>	<i>et cetera</i> (and other similar things)