

ผลของสารสกัดจากผักบางชนิดต่อฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐานและ  
สารสกัดเนื้อวัวหลังทำปฏิกิริยากับไนไตรท โดยใช้ในการทดสอบเอมส์



นางสาวนิติตา คมสาคร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาอาหารเคมีและโภชนศาสตร์ทางการแพทย์ ภาควิชาอาหารเคมี  
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2548  
ISBN 974-14-2269-5  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECT OF SOME VEGETABLE EXTRACTS ON MUTAGENICITY OF  
NITRITE TREATED STANDARD MUTAGEN AND  
BEEF EXTRACT USING AMES TEST

Miss Nisita Komsakorn

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Pharmacy Program in Food Chemistry and Medical Nutrition

Department of Food Chemistry

Faculty of Pharmaceutical Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2005

ISBN 974-14-2269-5

481891



นิสิตา คมสาคร : ผลของสารสกัดจากผักบางชนิดต่อฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐานและสารสกัดเนื้อวัวหลังทำปฏิกิริยากับไนโตรท โดยใช้ในการทดสอบเอมส์

(EFFECT OF SOME VEGETABLE EXTRACTS ON MUTAGENICITY OF NITRITE TREATED STANDARD MUTAGEN AND BEEF EXTRACT USING AMES TEST)

อ. ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.ลินนา ทองยงค์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร.แก้ว กังสดาลอำไพ 93 หน้า. ISBN 974-14-2269-5.

จากการศึกษาผลของสารสกัดคลอโรฟอร์ม และเอทานอลของผักชีลาว ผักแขยง ผักไผ่ ผักกูด และผักคราดหัวแหวน ต่อฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสาร 1-อะมิโนไพรีนและสารสกัดเนื้อวัวหลังทำปฏิกิริยากับไนโตรท โดยดูผลการก่อกลายพันธุ์ในเชื้อ *Salmonella typhimurium* TA98 และ TA100 พบว่า สารสกัดคลอโรฟอร์ม และเอทานอลของพืชทุกตัว ยกเว้นสารสกัดเอทานอลของผักกูดสามารถยับยั้งฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสาร 1-อะมิโนไพรีนที่ทำปฏิกิริยากับไนโตรทได้ แต่เมื่อทำการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ในสารสกัดเนื้อวัวหลังทำปฏิกิริยากับไนโตรท พบว่า สารสกัดคลอโรฟอร์ม และเอทานอลจากผักแขยง และผักไผ่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ ใน *S. typhimurium* TA100 แต่มีเพียงสารสกัดคลอโรฟอร์มจากผักไผ่เท่านั้นที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ ใน *S. typhimurium* TA98 นอกจากนี้ยังพบฤทธิ์กระตุ้นการก่อกลายพันธุ์ที่เกิดจากสารสกัดเนื้อวัวหลังทำปฏิกิริยากับไนโตรทในสารสกัดคลอโรฟอร์มของ ผักชีลาว ผักกูด และผักคราดหัวแหวน และสารสกัดเอทานอลของผักทั้ง 5 ชนิดในเชื้อ *Salmonella typhimurium* TA98 ด้วย ซึ่งเชื่อว่าการที่สารสกัดของผักสามารถยับยั้งฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ได้ อาจเนื่องมาจาก สารประกอบบางชนิดที่มีอยู่ในสารสกัดจากผัก เช่น คลอโรฟิลล์ ฟลาโวนอยด์ และเทอร์ปีนอยด์ เป็นต้น โดยจะไปยับยั้งเอนไซม์ nitroreductase หรือ O-acetyltransferase ในเซลล์แบคทีเรียเปลี่ยนแปลงความสามารถในการเข้าเซลล์แบคทีเรียของสารก่อกลายพันธุ์ และ/หรือ เกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างสารสกัดจากผักบางชนิดกับสารก่อกลายพันธุ์ จากผลการศึกษา จึงแนะนำว่าการรับประทานผักหลายชนิดในปริมาณที่เหมาะสมน่าจะสามารถลดความเสี่ยงจากการเกิดโรคมะเร็งในกระเพาะอาหารที่มีสาเหตุจากสารที่ทำปฏิกิริยากับไนโตรทได้

ภาควิชา อาหารเคมี  
สาขาวิชาอาหารเคมีและโภชนศาสตร์ทางการแพทย์  
ปีการศึกษา 2548

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม


4576574033 : FOOD CHEMISTRY


KEY WORD: *Anethum graveolens* Linn / *Limnophila aromatica* Merr / *Polygonum odoratum* Lour / *Diplazium esculentum* (Retz.) / *Spilanthes acmella* Murr

NISITA KOMSAKORN : EFFECT OF SOME VEGETABLE EXTRACTS ON MUTAGENICITY OF NITRITE TREATED STANDARD MUTAGEN AND BEEF EXTRACT USING AMES TEST. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. LINNA TONGYONK, D.Sc. THESIS COADVISOR : ASSOC. PROF. KAEW KANGSADALAMPAI, Ph.D., 92 pp. ISBN 974-14-2269-5.

The objective of this study was to investigate the antimutagenicity of chloroform and ethanol extract of vegetables, namely Pak Chee Lao (*Anethum graveolens* Linn), Pak Ka Yang (*Limnophila aromatica* Merr), Pak Pai (*Polygonum odoratum* Lour), Pak Gud (*Diplazium esculentum* Retz.) and Pak Krad Hua Wan (*Spilanthes acmella* Murr) on mutagenicity of nitrite treated 1-aminopyrene and nitrite treated beef extract on *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100. Both chloroform and ethanol extracts of all vegetables showed antimutagenicity against nitrite treated 1-aminopyrene, except ethanol extract of Pak Gud. On nitrite treated beef extract, chloroform and ethanol extracts of Pak Ka Yang and Pak Pai showed antimutagenicity on *S. typhimurium* TA100, but only chloroform extract of Pak Pai showed antimutagenicity on *S. typhimurium* TA98. However, chloroform extract of Pak Chee Lao, Pak Gud and Pak Krad Hua Wan and ethanol extract of five vegetables enhanced mutagenicity of nitrite treated beef extract in *S. typhimurium* TA98. This evidence might be due to some substances in sample extracts such as chlorophyll, flavonoids and terpenoids inhibiting enzyme nitroreductase or O-acetyltransferase in the bacterial cell, modifying the permeability of mutagen across bacterial membranes and/or complex formation between vegetable extracts and a mutagen. This suggested that daily consumption of various types of vegetable in appropriate amount could reduce the risk of the gastric cancer.

Department..... Food Chemistry.....

Student's signature..... 

Field of study..... Food Chemistry and Medical Nutrition..... Advisor's signature..... 

Academic year..... 2005.....

Co-advisor's signature..... 

## ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere gratitude and deep appreciation to Assistant Professor Dr.Linna Tongyonk, my advisor, for her guidance, invaluable advice, helpfulness, kindness, understanding, patience and encouragement throughout this study.

I am very grateful to Associate Professor Dr.Kaew Kangsadalampai, my co-advisor, for his guidance, kindness, helpfulness, comment and encouragement.

I would like to thank Associate Professor Dr.Oranong Kangsadalampai for her advice and comments. My appreciation is expressed to the other members of this thesis committee, Associate Professor Dr. Nijsiri Ruangrunsi and Dr. Suyanee Pongthananikorn, for their valuable helpful suggestions.

I would like to thank all staff members of the Department of Food chemistry for their assistances and encouragements.

I would like to thank the Graduate School of Chulalongkorn University for providing the research funding for this study.

Special thanks to my friends and my family, without whom this thesis would not have been completed.

Finally, I wish to express my deep gratitude to my family for their loves, warmness and encouragements.

# CONTENTS

	Page
ABSTRACT (THAI).....	iv
ABSTRACT (ENGLISH).....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	x
LIST OF FIGURES.....	xii
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xiii
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
CHAPTER II LITERATURE REVIEW.....	3
2.1 Antimutagenesis and Cancer Prevention.....	3
2.2 Anticarcinogenic and Antimutagenic Mechanisms.....	6
2.3 Antimutagens in Plants.....	8
2.4 Nitrite and Gastric Cancer.....	13
2.5 Nitrite as a Converter for Direct mutagen.....	14
2.6 1-Aminopyrene Nitrite Mutagenicity Model.....	17
2.7 Conversion of Precursors in Beef Extract to Direct-Acting Mutagens (Beef Extract-Nitrite Mutagenicity Model).....	18
2.8 The <i>Salmonella</i> Mutagenic Assay (Ames test).....	26
2.9 The mutagenicity Test (preincubation Method) Using <i>Salmonella typhimurium</i> .....	28
CHAPTER III MATERIALS AND METHODS.....	30
3.1 Materials.....	30
3.1.1 Chemicals for Ames Test.....	31
3.1.2 Samples.....	31

	Page
3.1.2 Instruments .....	31
3.2 Method .....	32
3.2.1 Experimental Design .....	32
3.2.2 The Preparation of Bacterial Tester Strains .....	32
3.2.3 Nutrient Agar Preparation .....	34
3.3 Preparation of Beef Extract .....	34
3.4 Preparation of Vegetable Extracts .....	34
3.5 Mutagenicity of 1-Aminopyrene-Nitrite and Beef Extract .....	36
3.6 Mutagenicity of Vegetable Extracts .....	40
3.7 Antimutagenicity of Vegetable Extracts .....	40
3.8 Data Manipulation .....	42
 CHAPTER IV RESULTS .....	 44
4.1 Positive Controls .....	44
4.1.1 1-Aminopyrene .....	44
4.1.2 Mutagenicity of Beef Extract .....	44
4.2 Mutagenicity of Chloroform Extracts from the Vegetables .....	45
4.3 Mutagenicity of Ethanol Extracts from the Vegetables .....	46
4.4 Antimutagenicity of the Vegetable Extracts .....	51
 CHAPTER V DISCUSSION .....	 56
5.1 Mutagenicity of Nitrite Treated 1-Aminopyrene and Nitrite treated Beef Extract .....	 56
5.2 Mutagenicity of Chloroform and Ethanol Extract from the Vegetables .....	57
5.3 Effect of Chloroform and Ethanol Extracts from the Vegetables on Mutagenicity of Nitrite Treated 1-Aminopyrene .....	 58



	Page
5.4 Effect of Chloroform and Ethanol Extracts from the Vegetables on Mutagenicity of Nitrite Treated Beef Extract .....	60
CHAPTER VI CONCLUSION .....	62
REFERENCES .....	64
APPENDICES .....	83
VITA .....	93

## LIST OF TABLES

	Page
Table 2.1 Categories of foods with the most prominent chemopreventers.....	4
Table 2.2 List of some phytochemicals in fruits and vegetables with inhibitory effects on carcinogenesis in animal models.....	5
Table 2.3 Mechanisms by which dietary antimutagens could protect against mutation.....	7
Table 2.4 Mutagenicity of cooked foods after nitrite treatment.....	15
Table 2.5 Mutagenicity of HCAs in <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 and TA100 with S9 mix.....	23
Table 3.1 Criteria of evaluation as the inhibition or enhancement of mutagenicity.....	43
Table 4.1 Mutagenicity of beef extract treated with and without nitrite in acid condition pH 3.0-3.5 without metabolic activation on <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 and TA100.....	45
Table 4.2 Mutagenicity of chloroform extracts of vegetables in acid condition pH 3.0-3.5 on <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 (frameshift mutation) without metabolic activation.....	47
Table 4.3 Mutagenicity of chloroform extracts of vegetables in acid condition pH 3.0-3.5 on <i>Salmonella typhimurium</i> TA100 (base-pair substitution) without metabolic activation.....	48
Table 4.4 Mutagenicity of ethanol extracts of vegetables in acid condition pH 3.0-3.5 on <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 (frameshift mutation) without metabolic activation.....	49
Table 4.5 Mutagenicity of ethanol extracts of vegetables in acid condition pH 3.0-3.5 on <i>Salmonella typhimurium</i> TA100 (base-pair substitution) without metabolic activation.....	50
Table 4.6 Effect of the chloroform extracts of the vegetables on the mutagenicity of nitrite treated 1-aminopyrene and nitrite treated beef extract on <i>S. typhimurium</i> strains TA98 and TA100.....	52

Table 4.7 Effect of the ethanol extracts of the vegetables on the mutagenicity of nitrite treated 1-aminopyrene and nitrite treated beef extract on <i>S. typhimurium</i> strains TA98 and TA100.....	54
---	----

## LIST OF FIGURES

	Page
Figure 2.1 Chemical structure of Aminoimidazozaarenes (IQ-type , polar) Quinolines.....	20
Figure 2.2 Chemical structure of Carboline and analogues (Non-IQ type , non-polar).....	21
Figure 2.3 Bioactivation of heterocyclic amines. Pathway of Aminoimida- zozaarenes metabolic activation leading to DNA adduct formation.....	25
Figure 3.1 Experimental designs for determining the mutagenicity modification of some vegetable extracts on the mutagenicity of nitrite treated 1-Aminopyrene and Beef extract.....	33
Figure 3.2 Solvent extractions of vegetable samples.....	36
Figure 3.3 Steps to determine the mutagenicity of sample extract using the Ames mutagenicity test (pre-incubation modification) in the absence of metabolic activation.....	38
Figure 3.4 Steps to determine the mutagenicity of nitrite treated sample extract using the Ames mutagenicity test (pre-incubation modification) in the absence of metabolic activation.....	39
Figure 3.5 Steps to determine the antimutagenicity of vegetable extract on nitrite treated 1-aminopyrene using the Ames mutagenicity test (pre-incubation modification) in the absence of metabolic activation.....	41

## LIST OF ABBREVIATIONS

°C	=	degree celcius
<i>et al.</i>	=	et alli (and others)
i.e.	=	id est (this is)
e.g.	=	example gratia (for example)
g	=	gram
h	=	hour
µg	=	microgram
µl	=	microlitre
mg	=	milligram
ml	=	milliliter
mM	=	millimolar
min	=	minute
M	=	Molar
MW	=	Molecular Weight
ppm	=	part per million
W/V	=	Weight/Volume
His <sup>+</sup>	=	histidine prototrophy
N	=	normality
1-AP	=	1-aminopyrene