ผลของสารสกัดจากข้าวหอมนิลและข้าวเหนียวดำต่อฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของอะมิโนพัยรีน และสารสกัดซุปไก่หลังทำปฏิกิริยากับไนไตรทโดยใช้การทดสอบเอมส์

สำนักงานวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นางสาวกมลา สดับพจน์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอาหารเคมีและโภชนศาสตร์ทางการแพทย์ ภาควิชาอาหารและเภสัชเคมี
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2552
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5076553733

EFFECTS OF HOM NIL RICE AND BLACK GLUTINOUS RICE EXTRACTS ON MUTAGENICITY OF NITRITE-TREATED AMINOPYRENE AND NITRITE-TREATED CHICKEN EXTRACT USING AMES TEST

Miss Kamala Sadabpod

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 and Pharmaceutical Chemistry
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2009
Copyright of Chulalongkorn University

522156

Thesis Title	EFFECTS OF HOM NIL RICE AND BLACK GLUTINOUS RICE EXTRACTS ON MUTAGENICITY OF NITRITE-TREATED AMINOPYRENE AND NITRITE-TREATED CHICKEN EXTRACT USING AMES TEST
By	Miss Kamala Sadabpod
Field of Study	Food Chemistry and Medical Nutrition
Thesis Advisor	Assistant Professor Linna Tongyonk, D.Sc.
Thesis Co-Advisor	Associate Professor Kaew Kangsadalampai, Ph.D.

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

.....Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences

(Associate Professor Pintip Pongpech, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

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

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

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

..... Examiner
(Assistant Professor Suyanee Pongthananikorn, Dr.P.H.)

..... External Examiner
(Mr. Suniyom Taprab, M.Sc.)

กมลา สดับพจน์ : ผลของสารสกัดจากข้าวหอมนิลและข้าวเหนียวดำต่อฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของอะมิโนพัยรีนและสารสกัดซุปไก่หลังทำปฏิกิริยากับไนไตรท โดยใช้การทดสอบเอมส์ (EFFECTS OF HOM NIL RICE AND BLACK GLUTINOUS RICE EXTRACTS ON MUTAGENICITY OF NITRITE-TREATED AMINOPYRENE AND NITRITE-TREATED CHICKEN EXTRACT USING AMES TEST) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ.ดร. ลินนา ทองยงค์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ.ดร.แก้ว กังสดาลอำไพ, 135 หน้า.

สารสกัดจากข้าวสาร ข้าวหุงสุก และข้าวหมัก ของข้าวหอมนิล (*Oryza sativa* L.) และข้าวเหนียวดำ (*Oryza sativa* L.) ไม่แสดงฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ในแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 โดยใช้การทดสอบเอมส์ แต่เมื่อทำปฏิกิริยากับไนไตรทที่สภาวะกรด (pH 3.0-3.5) พบว่ามีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ การศึกษาการปรับเปลี่ยนฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดจากข้าวใช้แบบจำลองการเกิดสารก่อกลายพันธุ์ 2 แบบคือ แบบจำลองปฏิกิริยาระหว่างซุปไก่สกัด-ไนไตรท และ 1-อะมิโนพัยรีน-ไนไตรท และแบบจำลองการต้านฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ 2 แบบคือ การเติมสารสกัดจากข้าวในช่วงเริ่มต้นพร้อมสารก่อกลายพันธุ์จากนั้นจึงให้ทำปฏิกิริยากับไนไตรท และการเติมสารสกัดจากข้าวหลังจากสารก่อกลายพันธุ์ทำปฏิกิริยากับไนไตรทแล้ว พบว่าสารสกัดจากข้าวหอมนิลหุงและสารสกัดจากข้าวหมักมีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดสารก่อกลายพันธุ์จาก 1-อะมิโนพัยรีนที่ทำปฏิกิริยากับไนไตรท และสารสกัดซุปไก่ที่ทำปฏิกิริยากับไนไตรท ตามลำดับ ฤทธิ์ยับยั้งการเกิดสารก่อกลายพันธุ์อาจเพราะมีสารบางชนิดที่มีอยู่ในข้าวหอมนิลและออกฤทธิ์เมื่อผ่านการหุง นอกจากนี้การหมักอาจทำให้มี aglycone ที่เป็นสารออกฤทธิ์เพิ่มมากขึ้น โดยสารดังกล่าวอาจยับยั้งปฏิกิริยา nitrosation และ/หรือ จับกับสารก่อกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นระหว่างปฏิกิริยา nitrosation ได้ ขณะที่สารสกัดจากข้าวอื่นเสริมฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารก่อกลายพันธุ์ทั้งสองชนิด การศึกษาฤทธิ์ต้านก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดซุปไก่ที่ทำปฏิกิริยากับไนไตรท และ1-อะมิโนพัยรีนที่ทำปฏิกิริยากับไนไตรทพบว่าสารสกัดจากข้าวสามารถต้านฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารก่อกลายพันธุ์ทั้ง 2 ชนิดได้ ฤทธิ์ต้านก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดข้าวอาจมาจากสารประกอบบางชนิดในสารสกัดจากข้าวจับกับสารก่อกลายพันธุ์ และ/หรือ มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ nitropyrene reductase และ *O*-acetyltransferase ของแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังพบแนวโน้มที่คล้ายคลึงกันระหว่างฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์และปริมาณสารต้านออกซิเดชันและสารประกอบฟีนอลิคของสารสกัดจากข้าวเหนียวดำซึ่งสูงกว่าสารสกัดจากข้าวหอมนิล โดยสารสกัดจากข้าวหมักให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด จากผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าการบริโภคข้าวทั้งสองชนิดนี้ปลอดภัยและเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งเป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภค

ภาควิชา.....อาหารและเภสัชเคมี..... ลายมือชื่อนิสิต....กมลา สดับพจน์.....

สาขาวิชา..อาหารเคมีและโภชนศาสตร์ทางการแพทย์..ลายมือชื่อ อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา.....2552..... ลายมือชื่อ อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

##5076553733 : MAJOR FOOD CHEMISTRY AND MEDICAL NUTRITION
KEYWORDS : MUTAGENIC / ANTIMUTAGENIC /HOM NIL RICE / BLACK GLUTINOUS RICE / AMES TEST

KAMALA SADABPOD: EFFECTS OF HOM NIL RICE AND BLACK GLUTINOUS RICE EXTRACTS ON MUTAGENICITY OF NITRITE-TREATED AMINOPYRENE AND NITRITE-TREATED CHICKEN EXTRACT USING AMES TEST. THESIS ADVISOR: ASST. PROF. LINNA TONGYONK, D.Sc., THESIS CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. KAEW KANGSADALAMPAI, Ph.D., 135 pp.

The extracts from raw, cooked, and fermented of Hom Nil rice (*Oryza sativa L.*) and black glutinous rice (*Oryza sativa* L.) showed no mutagenicity on *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100 in Ames test. After nitrite treatment in acid condition (pH3.0-3.5) the mutagenicity was detected. The mutagenic modification of rice extracts was evaluated using two models of mutagen; nitrite-treated chicken extract and nitrite-treated 1-aminopyrene, and two models of antimutagenicity; antiformation and antimutagen. The results showed that the extract of cooked Hom Nil rice and all kinds of fermented rice could inhibit the formation of mutagen occurred during the reaction between nitrite and chicken extract and reaction between nitrite and 1-aminopynene respectively. The antiformation effect might be due to some components only in Hom Nil rice which increased after cooking and some components in fermented rice such as aglycone. These components might inhibit nitrosation and/or scavenge mutagen that occurred during nitrosation. However, the other rice extracts enhanced the mutagenicity of both mutagens. The study of antimutagenicity of rice extracts toward nitrite-treated chicken extracts and nitrite-treated 1-aminopyrene showed that all of rice extracts reduced the mutagenicity of both nitrite-treated mutagens. The protective effects of these rice extracts might be due to the presence of some components that might scavenge mutagens and/or inhibit bacterial enzyme. In addition, there were similar trends between the antimutagenicity of black glutinous rice extracts and the antioxidant activity and total phenolic contents assays; it was higher than that of Hom Nil rice extracts. The fermented rice extracts had the highest antioxidant activity and total phenolic contents. The results from this study suggested that black glutinous rice and Hom Nil rice were safe and were good sources of antioxidants which might be appreciated by health concerning consumers.

Department:.....Food and Pharmaceutical Chemistry.... Student's Signature..Kamala.....
Field of Study:....Food Chemistry and Medical Nutrition.. Advisor's Signature.....
Academic Year:..2009..... Co-Advisor's Signature..

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 and Associate Professor Dr. Oranong Kangsadalampai, Ph.D for their kindness, technical guidance, expertise, comments, and invaluable suggestions.

I am very much obliged and honored to the members of the thesis committee, Associate Professor Dr. Oranong Kangsadalampai, Assistant Professor Dr. Suyanee Pongthananikorn, and Mr. Suniyom Taprab for their supportive attitude and constructive criticisms over my thesis.

I am duly grateful to my friends at the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn 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.

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
	1.1.Background and Significance of the Study	1
	1.2.Objectives of the Study	2
	1.3.Benefits of the Study	2
II	**LITERATURE REVIEW**	3
	2.1 Black Rice	3
	2.1.1 Rice Bran Oil	8
	2.1.2 Anthocyanins	9
	2.1.3 Antioxidant Activity	11
	2.1.4 Biological Properties	13
	2.2 Gastric Cancer	13
	2.3 Dietary Mutagens	14
	2.3.1 Nitrosating and Nitrating Species	14
	2.3.2 Nitrite as a Converter for Direct Mutagen	17
	2.4 Mutagenicity Models for Antimutagenicity	18
	2.4.1 Nitrite-treated Chicken Extract Model	22
	2.4.2 Nitrite-treated 1-Aminopyrene Model	23
	2.5 Ames Test	24
	2.5.1 Development of the Plate Incorporation	25
	2.5.2 Metabolic Activation Systems	25
	2.5.3 The Salmonella Tester Strains	26
	2.5.4 Testing of Chemicals in a Reduced Oxygen Atmospher	27
	2.5.5 Validation Studies	27

CHAPTER **Page**

2.5.6 Spontaneous Control Values 28

2.5.7 Experimental Design 28

2.6 Antioxidant Assays 31

2.6.1 DPPH Assay for Free Radical Scavenging Activity 31

2.6.2 Ferric Reducing Antioxidation Power (FRAP) Assay 32

2.6.3 Total Phenolic Content Assay 32

III MATERIALS AND METHODS 33

3.1 Materials 33

3.1.1 Chemicals for Ames Test 33

3.1.2 Samples 33

3.2 Experimental Design 33

3.3 Sample preparations 35

3.3.1 Preparation of Chicken Extract 35

3.3.2 Hom Nil Rice and Black Glutinous Rice Extracts Preparation 35

3.4 Antioxidant Assays 36

3.4.1 Sample preparation 36

3.4.2 2,2′-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH) Assay 36

3.4.3 Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assay 36

3.4.4 Determination of Total Phenolic Contents 37

3.5 Mutagenicity Test 37

3.5.1 Preparation of Bacterial Tester Strain 37

3.5.2 Nutrient Agar Preparation 38

3.5.3 Mutagenicity of 1-Aminopyrene 38

3.5.4 Mutagenicity of Chicken Extract 39

3.5.5 Mutagenicity of Rice Extract 39

3.6 Mutagenicity Modification Test 39

3.6.1 Antimutagenic effect of Rice Extracts 39

3.6.2 Anti-Mutagen Forming Effect of Rice Extracts 40

3.7 Data Evaluation 46

CHAPTER		Page
IV	**RESULTS**	48
	4.1 Antoxidant Assays	48
	4.2 Mutagenicity of Chicken Extract	50
	4.3 Mutagenicity of Rice Extracts	50
	4.4 Antimutagenicity of Rice Extracts on Mutagen Formed During Nitrite Treated Chicken Extract	53
	4.5 Antimutagenicity of Rice Extracts on Mutagen Formed During Nitrite Treated 1-Aminopyrene	56
	4.6 Anti-Mutagen Forming Effect of Rice Extracts during Treatment Chicken Extract with Sodium Nitrite	59
	4.7 Anti-Mutagen Forming Effect of Rice Extracts during Treatment 1-Aminopyrene with Sodium Nitrite	66
V	**DISCUSSIONS**	73
	5.1 Antoxidant Assays	73
	5.2 Mutagenicity of Rice Extracts	74
	5.3 Antimutagenicity of the Rice Extracts on Standard Mutagens	75
	5.4 Anti-Mutagen Formation Effect of Rice Extracts	77
VI	**CONCLUSION**	80
REFERENCES		81
APPENDICES		112
	APPENDIX A	113
	APPENDIX B	121
	APPENDIX C	122
BIOGRAPHY		135

LIST OF TABLES

Table		Page
1	Distribution of nutrients in milled rice.....	4
2	The nutritive values of Hom Nil rice and black glutinous rice.....	7
3	Nitrosamines found in foods.....	16
4	Mutagenicity of cooked meats after nitrite treatment.....	18
5	Genotype of the most commonly used Salmonella tester strains.....	26
6	Spontaneous revertant control value per plate.....	28
7	Positive control chemicals with concentration per plate.....	30
8	Criteria for evaluation as the inhibition or enhancement of mutagenicity.....	46
9	Antagonistic interaction between each rice extract and chicken extract during nitrite treatment on *S. typhimurium* TA98.....	62
10	Antagonistic interaction between each rice extract and chicken extract during nitrite treatment on *S. typhimurium* TA100.....	64
11	Antagonistic interaction between each rice extract and 1-aminopyrene during nitrite treatment on *S. typhimurium* TA98.....	69
12	Antagonistic interaction between each rice extract and 1-aminopyrene during nitrite treatment on *S. typhimurium* TA100.....	71

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	A detailed structure of the rice grain	3
2	Hom Nil rice (a) and black glutinous rice (b)	6
3	The chemical structure of the oryzanol (24-methylene-cycloartanol ester of ferulic acid)	8
4	The chemical structure of the flavylium ion or 2-phenylbenzoryrilium and anthocyanidins	10
5	The main form of dehydrogenation reaction of cyanidin-3-glucoside	12
6	Formation of *N*-nitrosamines	16
7	Chemical structures of pyrolytic mutagens (aminocarbolines)	20
8	Chemical structures of thermic mutagens (aminoimidazoazaarenes)	20
9	Chemical structures of PAHs	21
10	Overall investigations to elucidate the antioxidant activity and the effect of rice extracts using Ames test	34
11	Steps to determine the mutagenicity of the chicken extract, with and without sodium nitrite, using Ames mutagenicity test (preincubation modification)	41
12	Steps to determine the mutagenicity of the sodium nitrite treated 1-aminopyrene using Ames mutagenicity test (preincubation modification)	42
13	Steps to determine the mutagenicity of the rice extract, with and without sodium nitrite, using Ames mutagenicity test (preincubation modification)	43
14	Steps to determine the antimutagenic effect of the rice extract using Ames mutagenicity test (preincubation modification)	44
15	Steps to determine the anti-mutagen forming effect of the rice extract using Ames mutagenicity test (preincubation modification)	45

LIST OF FIGURES (CONT.)

Figure		Page
16	Antioxidant activity determined by DPPH savenging assay (a), Frap assay (b) and determination of total phenolic content (c) of the rice extracts; raw Hom Nil rice extract (RH), cooked Hom Nil rice extract (CH), fermented Hom Nil rice extract (FH), raw black glutinous rice extract (RB), cooked black glutinous rice extract (CB) and fermented black glutinous rice extract (FB)	49
17	Mutagenicity index of the rice extracts without and with sodium nitrite treatment in acid condition (pH 3.0-3.5) on *S. typhimurium* TA98.....	51
18	Mutagenicity index of the rice extracts without and with sodium nitrite treatment in acid condition (pH 3.0-3.5) on *S. typhimurium* TA100.....	52
19	Effect of the rice extracts on the mutagenicity of mutagen formed during sodium nitrite treated chicken extract on *S. typhimurium* TA98..	54
20	Effect of the rice extracts on the mutagenicity of mutagen formed during sodium nitrite treated chicken extract on *S. typhimurium* TA100	55
21	Effect of the rice extracts on the mutagenicity of mutagen formed during sodium nitrite treated 1-aminopyrene on *S. typhimurium* TA98..	57
22	Effect of the rice extracts on the mutagenicity of mutagen formed during sodium nitrite treated 1-aminopyrene on *S. typhimurium* TA100	58
23	Mutagenicity index of chicken extract treated sodium nitrite in the presence of each rice extract on *S. typhimurium* TA98.....	60
24	Mutagenicity index of chicken extract treated sodium nitrite in the presence of each rice extract on *S. typhimurium* TA100.....	61
25	Mutagenicity index of 1-aminopyrene treated sodium nitrite in the presence of each rice extract on *S. typhimurium* TA98.....	67
26	Mutagenicity index of 1-aminopyrene treated sodium nitrite in the presence of each rice extract on *S. typhimurium* TA100.....	68

LIST OF ABBREVIATIONS

°C	degree Celsius
g	gram
HAs	heterocyclic amines
His^+	histidine prototrophy
hr	hour
mg	milligram
mM	millimolar
ml	millilitre
mm	millimetre
M	molar
MI	Mutagenicity Index
µl	microlitre
PAHs	polycyclic aromatic hydrocarbons
SD	standard deviation
et al.	*et alia* (and others)