

ผลกึ่งเฉียบพลันของสารสกัดกระเจียบแดงด้วยน้ำต่อเอนไซม์ไซโตโครม พี450 ในตับ  
และค่าเคมีคลินิกในเลือดของหนูขาว



นางสาวพรหมพร พรหมเมตตา

ศูนย์วิทยทรัพยากร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชวิทยา ภาควิชาเภสัชวิทยา

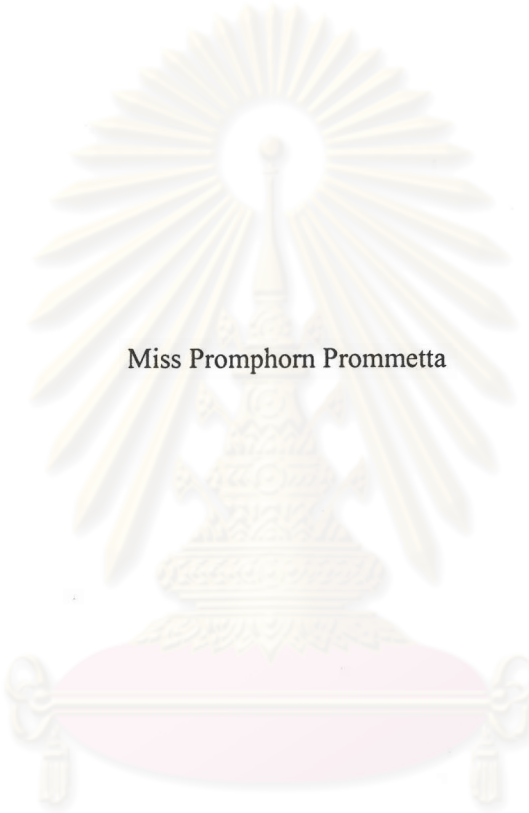
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-17-6911-3

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SUBACUTE EFFECTS OF *HIBISCUS SABDARIFFA* AQUEOUS EXTRACT ON HEPATIC  
CYTOCHROME P450 AND CLINICAL BLOOD CHEMISTRY IN RATS



Miss Promphorn Prommetta

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Pharmacy in Pharmacology

Department of Pharmacology  
Faculty of Pharmaceutical Sciences  
Chulalongkorn University

Academic Year 2004

ISBN 974-17-6911-3



พรหมพร พรหมเมตตา : ผลกึ่งเฉียบพลันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงด้วยน้ำต่อเอนไซม์ไซโตโครม พี450 ใน  
 ตับ และค่าเคมีคลินิกในเลือดของหนูขาว. (SUBACUTE EFFECTS OF *HIBISCUS SABDARIFFA*  
 AQUEOUS EXTRACT ON HEPATIC CYTOCHROME P450 AND CLINICAL BLOOD CHEMISTRY  
 IN RATS) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. พ.ศ.ท.หญิง สมทรง ลาวัณย์ประเสริฐ, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ. ดร. ถัดดาวลัย  
 ผิวทองงาม 122 หน้า. ISBN 974-17-6911-3.

กระเจี๊ยบแดง มีชื่อทางพฤกษศาสตร์ว่า *Hibiscus sabdariffa* Linn. เป็นสมุนไพรที่มีรายงานว่ามีสรรพคุณใน  
 การรักษาโรคหลายชนิด การศึกษานี้มุ่งศึกษาผลกึ่งเฉียบพลันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงด้วยน้ำต่อสมรรถนะของ  
 เอนไซม์ไซโตโครม พี450 (cytochrome P450, CYP) ที่เกี่ยวข้องกับการเมแทบอลิซึมของยาและการกระตุ้นฤทธิ์ของสาร  
 ก่อมะเร็ง/สารก่อการกลายพันธุ์ ได้แก่ CYP 1A1, 1A2, 2B1/2, 2E1 และ 3A นอกจากนี้ยังได้ศึกษาผลของสารสกัดนี้ต่อ  
 ค่าเคมีคลินิกและโลหิตวิทยาในเลือดของหนูขาวด้วย การทดลองใช้หนูขาวเพศผู้พันธุ์วิสตาร์ จำนวน 30 ตัว โดยแบ่งหนู  
 ขาวแบบสุ่มเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว กลุ่มแรกเป็นกลุ่มควบคุม ได้รับความน้ำกลั่น ขนาด 1 มิลลิลิตร/กิโลกรัม/วัน เป็นเวลา  
 30 วัน กลุ่มที่สองและสามเป็นกลุ่มที่ได้รับสารสกัดกระเจี๊ยบแดงในขนาด 250 และ 1,000 มิลลิลิตร/กิโลกรัม/วัน  
 ตามลำดับ เป็นเวลา 30 วัน เมื่อครบระยะเวลา ทำให้หนูหมดความรู้สึก เก็บตัวอย่างเลือดจากหัวใจเพื่อตรวจค่าโลหิต  
 วิทยาและแยกซีรัมเพื่อตรวจค่าเคมีคลินิก นำคัมมาเตรียมไมโครโซมเพื่อใช้ตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ total CYP,  
 สมรรถนะของ CYP 1A1, 1A2, 2B1/2, 2E1 และ 3A ผลการทดลองพบว่า สารสกัดกระเจี๊ยบแดงด้วยน้ำทั้งสองขนาดไม่  
 มีผลต่อปริมาณของ total CYP และสมรรถนะของ CYP 1A1, 1A2, 2B1/2, 2E1 และ 3A สารสกัดกระเจี๊ยบแดงด้วยน้ำทั้ง  
 สองขนาดไม่มีผลต่อค่าเคมีคลินิก และโลหิตวิทยาต่างๆ ต่อไปนี้ คือ ALT, AST, ALP, total bilirubin, direct bilirubin,  
 total protein, albumin, globulin, BUN, SCr, total cholesterol, TG, LDL-C, HDL-C, glucose, uric acid, calcium, sodium,  
 potassium, chloride, hemoglobin, hematocrit, RBC count, RBC indices (mean corpuscular volume, MCV; mean  
 corpuscular hemoglobin, MCH; mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC), RBC morphology, platelet  
 count, white blood cell (WBC) count และ % differential WBCs จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดกระเจี๊ยบ  
 แดงด้วยน้ำไม่มีผลเปลี่ยนแปลงสมรรถนะของเอนไซม์ส่วนใหญ่ในเฟสหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในการเมแทบอลิซึมของ  
 ยาและการกระตุ้นฤทธิ์ของสารก่อมะเร็ง/สารก่อการกลายพันธุ์ นอกจากนี้พบว่าสารสกัดกระเจี๊ยบแดงด้วยน้ำไม่มีผลพิษต่อ  
 การทำงานของอวัยวะหรือระบบของร่างกายที่สำคัญหลายอย่าง เช่น ตับ ไต ระบบเลือด อิเล็กโตรไลต์ รวมทั้งเมแทบอลิ  
 ซึมของไขมันและคาร์โบไฮเดรต ซึ่งชี้ให้เห็นถึงความปลอดภัยของการใช้สารสกัดดังกล่าว

ภาควิชา เกษัตริวิทยา  
 สาขาวิชา เกษัตริวิทยา  
 ปีการศึกษา 2547

ลายมือชื่อนิสิต.....  
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....  
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....



## 4676577033 : MAJOR PHARMACOLOGY

KEY WORD: *HIBISCUS SABDARIFFA* / HEPATIC CYTOCHROME P450 / CLINICAL BLOOD CHEMISTRY / SUBACUTE TOXICITY

PROMPHORN PROMMETTA : SUBACUTE EFFECTS OF *HIBISCUS SABDARIFFA* AQUEOUS EXTRACT ON HEPATIC CYTOCHROME P450 AND CLINICAL BLOOD CHEMISTRY IN RATS. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. POL. LT. COL. DR. SOMSONG LAWANPRASERT, THESIS COADVISOR : ASST. PROF. DR. LADDAWAL PHIVTHONG-NGAM, 122 pp. ISBN 974-17-6911-3.

*Hibiscus sabdariffa* Linn. is commonly called in Thai as “ Krachiap-daeng ”. *H. sabdariffa* has been reported to have a broad range of therapeutic effects. This study examined subacute effects of *H. sabdariffa* aqueous extract on the activities of cytochrome P450 (CYP), involving in drug metabolism and carcinogenic/mutagenic bioactivation, such as CYP 1A1, 1A2, 2B1/2, 2E1 and 3A in rats. In addition, effects of this extract on clinical blood chemistry and hematology were also determined. Thirty male Wistar rats were randomly divided into 3 groups, each group comprised 10 rats. Rats in the first group were given distilled water 1 ml/kg/day orally for 30 days, serving as a control group. The other two groups of rats were given *H. sabdariffa* aqueous extract orally at dosages of 250 and 1,000 mg/kg/day for 30 days. At the end of the treatment, rats were anesthetized. Blood samples were collected by heart puncture and serum was prepared for measuring hematology and clinical blood chemistry. Microsomes were prepared from livers and being used for determining of total CYP contents as well as the activities of CYP 1A1, 1A2, 2B1/2, 2E1 and 3A. The results showed that *H. sabdariffa* aqueous extract at both doses did not affect hepatic total CYP contents and the activities of CYP 1A1, 1A2, 2B1/2, 2E1 and 3A. Both dosage regimens of *H. sabdariffa* did not cause any significant changes of these following clinical blood chemistry and hematology in rats: ALT, AST, ALP, total bilirubin, direct bilirubin, total protein, albumin, globulin, BUN, SCr, total cholesterol, TG, LDL-C, HDL-C, glucose, uric acid, calcium, sodium, potassium, chloride, hemoglobin, hematocrit, RBC count, RBC indices (mean corpuscular volume, MCV; mean corpuscular hemoglobin, MCH; mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC), RBC morphology, platelet count, white blood cell (WBC) count and % differential WBCs. These results suggested that *H. sabdariffa* aqueous extract at both doses used in this study did not modulate the activities of most phase I hepatic CYPs involving in drug metabolism and carcinogenic/mutagenic bioactivation. In addition, this extract did not exhibit harmful effects on several important organs/systems such as liver, kidney, blood system, electrolytes as well as lipid and carbohydrate metabolism.

Department Pharmacology

Field of study Pharmacology

Academic year 2004

Student's signature...Promphorn Prommetta..

Advisor's signature...Pol. Lt. Col. Somsong Lawanprasert

Co-advisor's signature...L. Phivthong-Ngam.

## ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest appreciation and sincere gratitude to my advisor, Associate Professor Pol. Lt. Col. Dr. Somsong Lawanprasert and my thesis co-advisor, Assistant Professor Dr. Laddawal Phivthong-ngam for their helpful advise, guidance, encouragement and constructive criticism throughout my research study which enable me to accomplish this thesis.

I would like to thank Associate Professor Dr. Chaiyo Chaichantipyuth and Associate Professor Nuansri Niwattisaiwong for their valuable advice, guidance, comments on the preparation and identification of *H. sabdariffa* aqueous extract used in this study and being a committee member. Thank are also extended to Associate Professor Dr. Mayuree Tantisira, the committee member, for useful comments and kind assistance.

My appreciation is also expressed to Associate Professor Dr. Supatra Srichairat for kind assistance.

This study was supported partly by the Graduate School, Chulalongkorn University.

I wish to thank all staff members of the Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University as well as all staff members of the Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University for their helps.

I wish to thank Professional Laboratory Management Corp Co., Ltd. for the assistance on determining of clinical blood chemistry and hematology.

Finally, I would like to express my deepest appreciation to my family and my friends for their helps, encouragement and morale that have made me to complete this work.

## CONTENTS

	page
ABSTRACT (THAI).....	iv
ABSTRACT (ENGLISH).....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	x
LIST OF FIGURES.....	xii
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xiv
CHAPTER	
I INTRODUCTION.....	1
Hypothesis.....	3
Anticipated benefit from the study.....	3
Study design and process.....	3
II LITERATURE REVIEW.....	5
<i>Hibiscus sabdariffa</i> Linn. ....	5
Pharmacological effects.....	12
Toxicological effects.....	16
Metabolic bioactivation of xenobiotics.....	18
Phase I reactions.....	19
Mechanism of induction of CYPs.....	30
Mechanism of inhibition of CYPs.....	32
III MATERIALS AND METHODS.....	34
MATERIALS.....	34
Experimental animals.....	34
Instruments.....	34
Chemicals.....	35
METHODS.....	35
Preparation of <i>H. sabdariffa</i> aqueous extract.....	35



## CONTENTS (continued)

	page
Preliminary identification of <i>H. sabdariffa</i>	
aqueous extract.....	36
Effects of <i>H. sabdariffa</i> aqueous extract on	
hepatic CYP and clinical blood chemistry.....	37
Animal treatment.....	37
Blood sampling for determination of hematology	
and clinical blood chemistry.....	38
Hematology.....	38
Clinical blood chemistry.....	38
Liver microsome preparation.....	38
Determination of protein concentrations.....	39
Spectral determination of total CYP contents.....	40
Determinations of CYP activities.....	41
Alkoxyresorufin <i>O</i> -dealkylation assays.....	41
Aniline 4-hydroxylation assay.....	44
Erythromycin N-demethylation assay.....	45
Data analysis.....	47
IV RESULTS.....	48
Preparation of <i>H. sabdariffa</i> aqueous extract.....	48
Preliminary identification of <i>H. sabdariffa</i>	
aqueous extract.....	48
Effects of <i>H. sabdariffa</i> aqueous extract on	
body weight, food & water consumption, liver	
weight and % relative liver weight.....	49
Effects of <i>H. sabdariffa</i> aqueous extract on clinical	
blood chemistry and hematology.....	49
Effects of <i>H. sabdariffa</i> aqueous extract on	
hepatic CYPs.....	50



**CONTENTS (continued)**

	page
V DISCUSSION AND CONCLUSION.....	78
REFERENCES.....	82
APPENDICES.....	88
VITAE.....	122



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## LIST OF TABLES

Table		page
1	The major biotransformation reactions.....	19
2	Human CYP enzymes, their specific substrates and their percent participation in drug metabolism.....	25
3	Role of rat and human CYPs in the activation of some potential carcinogens/mutagens.....	27
4	Sequential homology between rat and human CYP forms.....	29
5	Differences in induction mechanisms for cytochrome P450s.....	30
6	Effects of <i>H. sabdariffa</i> aqueous extract on body weight, liver weight and % relative liver weight.....	51
7	Seven-day body weight of individual rat.....	89
8	Terminal body weight of individual rat.....	90
9	Liver weight of individual rat.....	90
10	Food consumption of individual rat.....	91
11	Relative food consumption of individual rat.....	92
12	Water consumption of individual rat.....	93
13	Relative water consumption of individual rat.....	94
14	Serum ALT concentration of individual rat.....	95
15	Serum AST concentration of individual rat.....	95
16	Serum alkaline phosphatase concentration of individual rat.....	96
17	Serum total bilirubin concentration of individual rat.....	96
18	Serum direct bilirubin concentration of individual rat.....	97
19	Serum total protein concentration of individual rat.....	97
20	Serum albumin concentration of individual rat.....	98
21	Serum globulin concentration of individual rat.....	98
22	BUN concentration of individual rat.....	99
23	SCr concentration of individual rat.....	99
24	Serum total cholesterol concentration of individual rat.....	100

25	Serum TG concentration of individual rat.....	100
26	Serum LDL-C concentration of individual rat.....	101
27	Serum HDL-C concentration of individual rat.....	101
28	Serum glucose concentration of individual rat.....	102
29	Serum uric acid concentration of individual rat.....	102
30	Serum calcium concentration of individual rat.....	103
31	Serum sodium concentration of individual rat.....	103
32	Serum potassium concentration of individual rat.....	104
33	Serum chloride concentration of individual rat.....	104
34	Hb of individual rat.....	105
35	Hct of individual rat.....	105
36	RBC count of individual rat.....	106
37	RBC indices (MCV, MCH and MCHC).....	107
38	Platelet count of individual rat.....	108
39	WBC count of individual rat.....	108
40	RBC morphology of individual rat.....	109
41	Percent differential WBCs of individual rat.....	110
42	Microsomal protein concentration of individual rat.....	111
43	Hepatic microsomal total CYP content of individual rat.....	111
44	Hepatic microsomal EROD activity of individual rat.....	112
45	Hepatic microsomal MROD activity of individual rat.....	112
46	Hepatic microsomal BROD activity of individual rat.....	113
47	Hepatic microsomal PROD activity of individual rat.....	113
48	Hepatic microsomal aniline 4-hydroxylase activity of individual rat.....	114
49	Hepatic microsomal erythromycin N-demethylase activity of individual rat.....	114
50	Normal values of hematology and clinical blood chemistry parameters in rat.....	115

## LIST OF FIGURES

Figure	page
1 The calyx of <i>Hibiscus sabdariffa</i> Linn. ....	6
2 Chemical constituents found in <i>H. sabdariffa</i> .....	9
3 Synthesis and degradation of the functional components of the hepatic mixed function oxidase system.....	31
4 The chromatographic fingerprint of <i>H. sabdariffa</i> aqueous extract.....	48
5 Subacute effects of <i>H. sabdariffa</i> aqueous extract on body weigh gain of rats.....	52
6 Subacute effects of <i>H. sabdariffa</i> aqueous extract on relative food consumption.....	53
7 Subacute effects of <i>H. sabdariffa</i> aqueous extract on relative water consumption.....	54
8 Subacute effects of <i>H. sabdariffa</i> aqueous extract on serum ALT.....	55
9 Subacute effects of <i>H. sabdariffa</i> aqueous extract on serum AST.....	56
10 Subacute effects of <i>H. sabdariffa</i> aqueous extract on serum ALP.....	57
11 Subacute effects of <i>H. sabdariffa</i> aqueous extract on serum total bilirubin (a) and direct bilirubin (b).....	58
12 Subacute effects of <i>H. sabdariffa</i> aqueous extract on serum total protein (a), albumin (b) and globulin (c).....	59
13 Subacute effects of <i>H. sabdariffa</i> aqueous extract on BUN (a) and SCr (b).....	60
14 Subacute effects of <i>H. sabdariffa</i> aqueous extract on serum total cholesterol (a) and triglyceride (b).....	61
15 Subacute effects of <i>H. sabdariffa</i> aqueous extract on serum LDL-C (a) and HDL-C (b).....	62
16 Subacute effects of <i>H. sabdariffa</i> aqueous extract on serum glucose.....	63
17 Subacute effects of <i>H. sabdariffa</i> aqueous extract on serum uric acid concentration.....	64
18 Subacute effects of <i>H. sabdariffa</i> aqueous extract on serum calcium (a), sodium (b), potassium (c) and chloride (d) concentration.....	65
19 Subacute effects of <i>H. sabdariffa</i> aqueous extract on Hb (a) and Hct (b).....	66
20 Subacute effects of <i>H. sabdariffa</i> aqueous extract on RBC.....	67
21 Subacute effects of <i>H. sabdariffa</i> aqueous extract on RBC indices.....	68



Figure	page
22 Subacute effects of <i>H. sabdariffa</i> aqueous extract on platelet count (a) and WBC count (b).....	69
23 Subacute effects of <i>H. sabdariffa</i> aqueous extract on % differential WBCs.....	70
24 Subacute effects of <i>H. sabdariffa</i> aqueous extract on rat hepatic total CYP contents.....	71
25 Subacute effects of <i>H. sabdariffa</i> aqueous extract on rat hepatic CYP 1A1 activity.....	72
26 Subacute effects of <i>H. sabdariffa</i> aqueous extract on rat hepatic CYP 1A2 activity.....	73
27 Subacute effects of <i>H. sabdariffa</i> aqueous extract on rat hepatic CYP 2B1/2 (BROD) activity.....	74
28 Subacute effects of <i>H. sabdariffa</i> aqueous extract on rat hepatic CYP 2B1/2 (PROD) activity.....	75
29 Subacute effects of <i>H. sabdariffa</i> aqueous extract on rat hepatic CYP 2E1 activity.....	76
30 Subacute effects of <i>H. sabdariffa</i> aqueous extract on rat hepatic CYP 3A activity.....	77
31 Verification of alkoxyresorufin O-dealkylation.....	116
32 Verification of aniline 4-hydroxylation.....	117
33 Verification of erythromycin N-demethylation.....	118
34 Standard curve of catechin.....	119

**LIST OF ABBREVIATIONS**

ALP	= alkaline phosphatase
ALT	= alkaline aminotransferase
ANOVA	= analysis of variance
AOM	= azoxymethane
AST	= aspartate aminotransferase
B(a)P	= benzo(a)pyrene
BR	= benzyloxyresorufin
BROD	= benzyloxyresorufin O-dealkylase
BSA	= bovine serum albumin
BUN	= blood urea nitrogen
BW	= body weight
CD	= cluster of differentiation
cm	= centimeter
CYP	= cytochrome P450
DMSO	= dimethyl sulfoxide
DNA	= deoxyribonucleic acid
ED <sub>50</sub>	= median effective dose
e.g.	= <i>exempli gratia</i>
ER	= ethoxyresorufin
EROD	= ethoxyresorufin O-dealkylase
et al.	= <i>et alii</i> (and other)
etc.	= and so on
fL	= femtoliter
g	= gram
G6P	= glucose 6-phosphate
G6PD	= glucose 6-phosphate dehydrogenase
GSH	= glutathione
GST	= glutathione S-transferase
HAs	= <i>Hibiscus</i> anthocyanins

**LIST OF ABBREVIATIONS (continued)**

Hb	= hemoglobin
Hct	= hematocrit
HDL-C	= high density lipoprotein cholesterol
i.p.	= intraperitoneal
kg	= kilogram
L	= liter
LD <sub>50</sub>	= median lethal dose
LDL-C	= low density lipoprotein cholesterol
LDH	= lactate dehydrogenase
LPS	= lipopolysaccharide
M	= molar (mole per liter)
MCH	= mean corpuscular hemoglobin
MCHC	= mean corpuscular hemoglobin concentration
MCV	= mean corpuscular volume
MDA	= malondialdehyde
mEq	= milliequivalent
mg	= milligram
ml	= milliliter
mM	= millimolar (millimole per liter)
mmol	= millimole
MR	= methoxyresorufin
mRNA	= messenger ribonucleic acid
MROD	= methoxyresorufin O-dealkylase
MW	= molecular weight
NADP	= nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADPH	= nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form)
nm	= nanometer
nmol	= nanomole
PAH	= polycyclic aromatic hydrocarbon

LIST OF ABBREVIATIONS (*continued*)

PCA	= <i>Hibiscus</i> protocatechuic acid
pg	= picogram
PhIP	= 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5- <i>b</i> ]pyridine
pmol	= picomole
PR	= pentoxyresorufin
PROD	= pentoxyresorufin O-dealkylase
RBC	= red blood cell
rpm	= revolutions per minute
SCr	= serum creatinine
SD	= Sprague-Dawley
SEM	= standard error of mean
SER	= smooth endoplasmic reticulum
sec	= second
<i>t</i> -BHP	= <i>tert</i> -butyl hydroperoxide
TCA	= trichloroacetic acid
TG	= triglyceride
TPA	= 12- <i>O</i> -tetradecanoylphorbol-13-acetate
Tris	= Tris (hydroxymethyl) aminomethane
vs	= versus
v/v	= volume by volume
WBC	= white blood cell
w/v	= weight by volume
w/w	= weight by weight
°C	= degree celsius
β	= beta
γ	= gamma
μg	= microgram
μl	= microliter
μM	= micromolar (micromole per liter)