การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เอมส์ และไมโครนิวคลีไอของสารสกัดกวาวเครือขาว *Pueraria mirifica* กวาวเครือแดง *Butea superba* กวาวเครือดำ *Mucuna collettii* และผักปีดผี *Pueraria lobata*

นางสาว วันดี สุทธจิตร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาเทคโนโลยีทางชีวภาพ หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-4933-3

THE ANTIOXIDANT TEST, AMES' TEST AND MICRONUCLEI TEST OF CHEMICAL EXTRACT FROM WHITE KWAO KRUA *Pueraria mirifica*, RED KWAO KRUA *Butea superba*, BLACK KWAO KRUA *Mucuna collettii* AND KUDZU *Pueraria lobata*

Miss Wandee Sutjit

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2003

ISBN 974-17-4933-3

Thesis Title	The Antioxidant test, Ames's test and Micronuclei test of chemical extract from White Kwao Krua Pueraria mirifica, Red Kwao Krua Butea superba, Black Kwao Krua Mucuna collettii and Kudzu *Pueraria lobata*
By	Miss Wandee Sutjit
Field of study	Biotechnology
Thesis Advisor	Associate Professor Dr. Wichai Cherdshewasart

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

.....Dean of Faculty of Science
(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman
(Professor Siriwat Wongsiri, Ph.D.)

.....Thesis Advisor
(Associate Professor Wichai Cherdshewasart, D.Sc.)

.....Member
(Associate Professor Kingkaew Wattanasirmkit, Ph.D.)

.....Member
(Associate Professor Sirirat Rengpipat, Ph.D.)

.....Member
(Assistant Professor Nattaya Ngamrojnavanich, Ph. D.)

วันดี สุทธจิตร : การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เอมส์ และไมโครนิวคลีไอของสารสกัดกวาวเครือขาว *Pueraria mirifica* กวาวเครือแดง *Butea superba* กวาวเครือดำ *Mucuna collettii* และผักปีดผี *Pueraria lobata*. (THE ANTIOXIDANT TEST, AMES' TEST AND MICRONUCLEI TEST OF CHEMICAL EXTRACT FROM WHITE KWAO KRUA *Pueraria mirifica*, RED KWAO KRUA *Butea superba*, BLACK KWAO KRUA *Mucuna collettii* AND KUDZU *Pueraria lobata*) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. วิชัย เชิดชีวศาสตร์ จำนวน 128 หน้า. ISBN 974-17-4933-3.

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ของกวาวเครือขาวจาก 28 จังหวัด กวาวเครือแดง 23 จังหวัด กวาวเครือดำ 4 จังหวัดในประเทศไทย เปรียบเทียบกับ *Pueraria lobata* จากประเทศจีน พบว่าสารสกัดกวาวเครือดำจากจังหวัดเชียงรายให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดในกลุ่มประชากร (IC_{50} = 55.53 $\pm$ 2.66 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) สารสกัดกวาวเครือแดงจากจังหวัดเลยให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดในกลุ่มประชากร (IC_{50} = 227.08$\pm$0.38 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และสารสกัดกวาวเครือขาวจากจังหวัดอุทัยธานีให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดในกลุ่มประชากร (IC_{50} = 2,470.38 $\pm$ 37.81 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และ *Pueraria lobata* ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำ (IC_{50} = 2,482 $\pm$ 66.11 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับปริมาณสารไอโซฟลาโวน 5 ชนิดจากหัวกวาวเครือขาว ซึ่งวิเคราะห์ผลโดยวิธี HPLC พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณ Daidzein ได้ทำการเลือกกวาวเครือดำ กวาวเครือแดง และกวาวเครือขาว ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดในแต่ละกลุ่มประชากร สำหรับทดสอบฤทธิ์การก่อกลายพันธุ์และฤทธิ์ยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ โดยวิธีเอมส์ และทดสอบไมโครนิวเคลียส พบว่าสารสกัดกวาวเครือขาว กวาวเครือแดง กวาวเครือดำ และ *Pueraria lobata* ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์แต่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ต่อแบคทีเรียซัลโมเนลลาทั้งสายพันธุ์ TA98 และ TA100 ทั้งที่มีเอนไซม์และไม่มีเอนไซม์กระตุ้น กวาวเครือขาว กวาวเครือแดง กวาวเครือดำ และ *Pueraria lobata* ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ โดยไม่ก่อให้เกิดไมโครนิวเคลียสที่ความเข้มข้นสูงสุด (16 กรัม/ผงปั่นแห้ง) ในช่วงเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง.

ภาควิชา.....-.....**ลายมือชื่อนิสิต**.....วันดี สุทธจิตร.....
สาขาวิชา.....**เทคโนโลยีชีวภาพ**.....**ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา**.....
ปีการศึกษา.....2546.....**ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม**.....-.....

###4472401323 : MAJOR : BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: ***P. mirifica*** / ***B. superba*** / ***M. collettii*** / ***P. lobata*** / **Antioxidant activity / Mutagenicity / Antimutagenicity / Micronucleus test**

WANDEE SUTJIT: THE ANTIOXIDANT TEST, AMES' TEST AND MICRONUCLEI TEST OF CHEMICAL EXTRACT FROM WHITE KWAO KRUA *Pueraria mirifica*, RED KWAO KRUA *Butea superba*, BLACK KWAO KRUA *Mucuna collettii* AND KUDZU *Pueraria lobata*. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. DR. WICHAI CHERDSHEWASART. 128 pp. ISBN 974-17-4933-3

Antioxidant activity assay by DPPH scavenging method was submitted to *Pueraria mirifica* from 28 provinces, *Butea superba* from 23 provinces and *Mucuna collettii* from 4 provinces in comparison with *Pueraria lobata* from China. Our studies revealed that *Mucuna collettii* from Chiang Rai exhibited the strongest activity (IC_{50} = 55.53 $\pm$ 2.66 µg/ml) in their population, *Butea superba* from Loei exhibited the strongest activity in their population (IC_{50} = 227.08$\pm$0.38µg/ml), *Pueraria mirifica* from Uthai Thani exhibited the strongest activity in their population (IC_{50} = 2,470.38 $\pm$ 37.81 µg/ml), *Pueraria lobata* showed the weakest activity (IC_{50} = 2,482 $\pm$ 66.11 µg/ml). The correlation study between five isoflavone contents in tubers analysed by HPLC and antioxidant activity, it was found that the antioxidant activity was directly correlated to daidzein content. The highest antioxidant activity plants in each group was analysed for the mutagenic and antimutagenicity by Ames' test and micronucleus test. The results revealed that *Pueraria mirifica*, *Butea superba*, *Mucuna collettii* and *Pueraria lobata* exhibited no mutagenicity in TA98 and TA100 strains either in the absence and presence of the activation enzyme. *Pueraria mirifica*, *Butea superba*, *Mucuna collettii* and *Pueraria lobata* exhibited antimutagenic activity in TA98 and TA100 strains in the absence and presence of the activation enzymes. The mutagenic activity of *Pueraria mirifica*, *Butea superba, Mucuna collettii* and *Pueraria lobata* were also examined in animals using the micronucleus test. The result revealed that *Pueraria mirifica*, *Butea superba*, *Mucuna collettii* and *Pueraria lobata* at highest dose (16 g/powder) had no mutagenic effect in the 24, 48 and 72 hour test period.

Department .....-.....**Student's signature**.....

Field of study.....**Biotechnology**.....**Advisor's signature**.....

Academic year.....**2003**..... **Co-advisor's signature**.....-.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my heartly appreciation and gratitude to my advisor, Associate Professor Dr. Wichai Cherdshewasart, for his accompany with my thought and experience, with full understanding, exhibiting throughout the period of my study.

I would like to express my sincere gratitude to Associate Professor Punya Temcharoen for his valuable suggestion, guidance and expert recommendations with full patience, on the techniques of Ames' test for in vitro and micronucleus test for *in vivo*.

I would like to acknowledge to my committees, Professor Dr. Siriwat Wongsiri, Associate Professor Kingkaew Wattanasirmkit, Associate Professor Dr. Sirirat Rengpipat, Assistant Professor Dr. Nattaya Ngamrojanavanich for valuable comments in my research.

I am also very thankful to Associate Professor Dr. Supranee Changbumrung, Head of Department of Tropical Nutrition and Food Science, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University for her kindness and full encouragement throughout the period of my graduate program.

Appreciation is expressed to Associate Professor Lakana Himakoun, Pranom Puchadapirom and Suraphol Kongtim, Department of Pathology, Faculty of Science, Mahidol University for their suggestion, comment and helpful suggestion on inspecting of slide micronucleus test.

Special thanks are also extending to Somchai Phudoung and Apanchanid Thepouyporn, Department of Tropical Nutrition and Food Science, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University for her comments and helpful suggestions of Ames' test techniques.

Thank to National Science and Technology Development Agency (NSTDA) for 2 years grant support.

Finally, I feel very indebted and heart thanks to all members in my family for their love, care and never leave me alone. To the warm feeling sent from my far away home, especially my parents.

CONTENTS

CONTENTS (continued)

CONTENTS (continued)

CONTENTS (continued)

CONTENTS (continued)

LIST OF TABLES

LIST OF TABLES (continued)

LIST OF TABLES (continued)

LIST OF FIGURES

LIST OF FIGURES (continued)

ABBREVIATIONS

Abbreviation or symbol	Term
AF_2	2-[2-furyl]-3-[5-nitro-2-furyl]acrylamide
ATP	adenosine triphosphate
B(a)P	benzo(a)pyrene
B.W.	body weight
B. superba	*Butea superba*
co.	company
DMSO	dimethylsulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
et. al.	at all
etc.	*et cetera*
G6P	glucose-6-phosphate
g/kg B.W.	gram per kilogram body weight
hr.	hour
his	histidine producing gene
his^-	histidine auxotrophy
his^+	histidine prototrophy
i.p.	intraperitoneal
IC_{50}	Inhibit concentration dose for 50%
KCl	potassium chloride
K_2HPO_4	potassium phosphate dibasic anhydrous
LD_{50}	Lethal dose for 50%
M. collettii	*Mucuna collettii*
pH	log concentration of H^+
µg	microgram
µg/ml	microgram per milliliter
µl	microlitre
mg/ml	milligram per millilitre
MGA	minimal glucose agar

ABBREVIATIONS (continued)

Abbreviation or symbol	Term
$MgCl_2$	magnesium chloride
$MgSO_4$	magnesium sulfate
mg/kg B.W.	milligram per kilogram body weight
ml	millilitre
mm	millimeter
min	minute
mM	milimolar
M	molar or mole per litre
MNPCE	micronucleated polychromatic erythrocyte
MW.	molecular weight
NaCl	sodium chloride
NADP	nicotinamide adenine dinucleotide hosphate
$NaHNH_4PO_4$	sodium hydrogen ammonium phosphate
NaOH	sodium hydroxide
NB	nutrient broth
NCEs	normochromatic erythrocytes
No.	number
N_o	number of observed revertant
N_t	number of induced revertant
PCEs	polychromatic erythrocytes
PI	percent inhibition
P. mirifica	*Pueraria mirifica*
P. lobata	*Pueraria lobata*
rpm	round per minute
sec	second
S.E	standard error of mean
S9	postmitochondrial supernatant (9000g supernatant)

ABBREVIATIONS (continued)

Abbreviation or symbol	Term
uvB	ultraviolet B radiation
VB	Vogel-Bonner medium E
w/v	weight by volume