Thesis Title Partial Characterization of Mutagen(s) in Shallot (Allium ascalonicum Linn.) and the Effect of Some Chemicals on Its Mutagenic Activity

Author Mr. Prayad Pantasri

M.Sc. Biochemistry

Examining Committee :

Assist.Prof. Dr.Vichai Wongchai.....Chairman
Assist.Prof. Dr.Usanee Vinitketkumnuen..Member
Assoc.Prof. Dr.Maitree Suttajit.....Member
Assist.Prof. Dr.Umnat Mevatee.....Member

ABSTRACT

Shallot mutagenicity and its modulation were studied by Salmonella mutation, preincubation technique. The methanol extract of shallot has stronger mutagenicity to S. typhimurium strain TA98 than to TA100, both with and without metabolic activation. The direct mutagenic substances of shallot reported could undergo metabolic activation to become higher by enzymes in rat-liver S9 fraction.

Modification of shallot mutagenesis in Salmonella mutation system by phase II reaction was studied by including glutathione (GSH) or uridine-5'-diphosphoglucuronic acid (UDPGA) in the system. The decrease mutagenicity of the mutagenic substances in shallot occurred through conjugation reaction both with either GSH or UDPGA. In addition, GSH could

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

react directly with the mutagenic substances in shallot. The chemical reaction might occur via -SH group of GSH. Another thiol-containing compound, dithiothreitol (DTT) also suppressed the mutagenicity of shallot without S9 mix.

Retinoic acid and ascorbic acid could not modify the shallot mutagenesis in Salmonella mutation system.

After nitrite treatment, the mutagenicity of shallot was demonstrated toward TA100, with and without metabolic activation. The nitrosation products might be probably formed from precursor in shallot.

Partial purification of active mutagenic substances in shallot by SEP-PAK (uBonda Pak) column was done. The mutagenic substances were eluted with 50 % and 100 % methanol. Further purification by Sephadex LH-20 column chromatography of 50 % methanol eluate gave 4 mutagenic peaks. The major mutagenic peak was further re-chromatographed. This peak had the same retention time as standard quercetin on Sephadex LH-20 column chromatography. By Silica gel 60 G thin-layer chromatography, the R_f value of this peak is closed to that of quercetin in a solvent system (chloroform : ethanol : butanone : acetyl acetone; 16:10:5:1) but different in the other system (chloroform : methanol : water ; 65:45:12).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Its UV absorption spectra showed a pattern similar to that of standard quercetin and quercetrin (quercetin-3-rhamnoside). Its co-chromatography of the compound under this peak with authentic quercetin did not show any enlargement of the peak but still showed some shoulder of the obtained peak. Therefore, the mutagenic compound in this peak might possibly be quercetin glycoside.

The 100 % methanol eluate still showed to contain more than one mutagenic peaks by sephadex LH-20 chromatography. However the major mutagenic peak was not sufficient for further purification.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การศึกษาคุณลักษณะของสารกลายพันธุ์ในหอมเล็กและผลของสารเคมีบางชนิดต่อฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์

ชื่อผู้เขียน นาย ประหยัด พันธะศรี

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

ผศ. ดร.วิชัย วงศ์ไชย.....ประธานกรรมการ

ผศ. ดร.อุษณีย์ วินิจเขตคำนวณ.....กรรมการ

รศ. ดร.ไมตรี สุทธจิตต์.....กรรมการ

ผศ. ดร.อำนาจ มีเวที.....กรรมการ

บทคัดย่อ

การศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ในหัวหอมเล็กและการเปลี่ยนแปลงฤทธิ์โดยศึกษาจากการกลายพันธุ์ของแบคทีเรีย Salmonella typhimurium (Salmonella mutation, preincubation technique) พบว่าสารสกัดจากหัวหอมด้วยเมธานอลนั้น แสดงฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ ต่อแบคทีเรีย Salmonella typhimurium สายพันธุ์ TA 98 ได้สูงกว่าสายพันธุ์ TA 100 ทั้งในสภาวะที่กระตุ้นหรือไม่ได้กระตุ้นเมตาโบลิสม นอกจากนั้นสารก่อกลายพันธุ์ยังแสดงฤทธิ์เพิ่มขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นเมตาโบลิสมด้วยเอนไซม์ S9 จากตับหนู

ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของหัวหอมในปฏิกิริยาระดับเฟส 2 ด้วยกลูตาไธโอน (GSH) หรือ กลูคิวโรไนด์ (UDPGA) นั้น พบว่าสามารถลดฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์โดยปฏิกิริยาคอนจูเกชั่นได้กับ GSH หรือ UDPGA นอกจากนี้ GSH สามารถทำปฏิกิริยากับสารก่อกลายพันธุ์จากหัวหอมซึ่งอาจจะเป็นปฏิกิริยาทางเคมีจากหมู่-SH ของ GSH เนื่องจากสารประกอบชนิดอื่นที่มีหมู่ไธออล เช่น dithiothreitol (DTT) ก็สามารถลดฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ได้ ในสภาวะที่ไม่มีเอ็นไซม์จาก S9 mix

ส่วนสารชนิดอื่น ๆ เช่น วิตามินเอและวิตามินซี พบว่าไม่สามารถเปลี่ยนแปลงฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ ของสารสกัดจากหัวหอมนี้ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภายหลังจากทำปฏิกริยากับไนไตรท์แล้วพบว่า สารสกัดจากหัวหอมแสดงฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ต่อแบคทีเรียสายพันธุ์ TA 100 ได้ทั้งในสภาวะที่มีการกระตุ้นหรือไม่มีการกระตุ้นด้วยเอนไซม์ แสดงว่าในหัวหอมอาจมีสารที่สามารถถูกเปลี่ยนไปเป็นสารประกอบไนโตรซามีนได้

เมื่อทำการแยกบริสุทธิ์บางส่วนของสารสกัดจากหัวหอมด้วยคอลัมน์ SEP-PAK พบว่าสารก่อกลายพันธุ์ถูกชะล้างออกมาได้ดี ทั้งเมธานอล 50 % และ 100 % จากนั้นนำส่วนที่ชะล้างได้ด้วยเมธานอล 50 % ไปแยกต่อโดยวิธีโครมาโตกราฟีด้วยคอลัมน์ Sephadex LH-20 ซึ่งชะล้างด้วยเมธานอลสามารถแยกได้ 4 peaks และพบว่า peak ที่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์สูงสุด มี retention time เท่ากันกับสาร quercetin เมื่อใช้วิธีโครมาโตกราฟีด้วยคอลัมน์ Sephadex LH-20 และจากการทดสอบโดยวิธี TLC ด้วย Silica gel 60 G พบว่า peak ที่แยกได้นี้ มีค่า R_f เท่ากับ quercetin ใน solvent ที่ประกอบด้วย chloroform : ethanol : butanone : acetyl acetone ; 16 : 10 : 5 : 1 แต่มีค่า R_f แตกต่างกันในอีก solvent หนึ่ง ซึ่งประกอบด้วย chloroform : methanol : water ; 65 : 45 : 12

ความสามารถในการดูดกลืนแสงของสารก่อกลายพันธุ์ที่แยกได้ พบว่ามีรูปแบบที่คล้ายคลึงกันกับสาร quercetin และ quercetrin(Quercetin-3-rhamnoside) เมื่อตรวจสอบกับสาร quercetin ด้วยวิธีโค-โครมาโตกราฟีพบว่าไม่ได้เสริม peak ให้ใหญ่ขึ้น แต่กลับเป็น peak ที่มีไหล่อยู่บ้าง ซึ่งแสดงว่าอาจจะเป็นสาร quercetin ที่อยู่ในรูปไกลโคไซด์

สำหรับส่วนที่ชะล้างได้ด้วย 100 % เมธานอล เมื่อแยกโดยวิธีโครมาโตกราฟีด้วย Sephadex LH-20 พบว่ามีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์มากกว่าหนึ่ง peak แต่ peak ที่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์สูงนั้นมีปริมาณต่ำจึงไม่สามารถนำไปแยกบริสุทธิ์ในขั้นนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved