การศึกษาความเป็นพิษในลูกเนียง
(Pithecolobium lobatim, Benth.)
และพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นในสัตว์ทดลอง

นางพิมพรรณ เกิดอุดม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
แผนกวิชาเภสัชวิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย
พ.ศ. ๒๕๑๙

002057

STUDIES ON THE TOXICITY OF NIANG'S SEED (*Pithecolobium lobatum* Benth.) AND ITS PATHOGENESIS IN THE EXPERIMENTAL ANIMALS

MRS. PIMPHAN KIRDUDOM

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy
Department of Pharmacology
Graduate School
Chulalongkorn University
1976

I16689904X

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in partial fulfillment of the requirements for the Degree of Master of Science in Pharmacy.

Kirid Prachuabmoh

Dean of the Graduate School

Thesis Committee:

K. Pengsritong.

Chairman

Pitidej Sudhi-Aroona

Plengvidhya, P.

Chamnong Vintasunthorn

Suvit Areekul

Thesis Supervisor: Dr. Suvit Areekul

CONTENTS

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

	Page
THAI ABSTRACT	iv
ENGLISH ABSTRACT	vi
ACKNOWLEDGEMENT	ix
LIST OF TABLES	xi
LIST OF FIGURES	xiii
CHAPTER I	
1. Introduction	1
Descriptions.....	2
Toxicity	7
Experiment in animals	10
Purposes.....	12
CHAPTER II	
2. Materials and Methods	13
Preparation of Niang extract using ethyl alcohol	13
Separation and determination of djenkolic acid from the Niang bean...	14
Analysis of the chemical state of djenkolic acid in the Niang bean....	17
Effects of boiling Niang beans with different solvents.....	19
Experiment in animals.....	21

CONTENTS (cont,)

Page

CHAPTER III

3. Results 23

Analysis of chemical components 23

Histological examination 43

CHAPTER IV

4. Discussion 46

CHAPTER V

5. Conclusion 51

REFERENCES 53

VITA 55

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การศึกษาความเป็นพิษในลูกเนียง (Pithecolobium lobatum Benth.) และพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นในสัตว์ทดลอง

ชื่อ นางพิมพรรณ เกิดอุดม

ปีการศึกษา ๒๕๑๘

บทคัดย่อ

เนียงเป็นต้นไม้ในตระกูล Leguminosae พบมากทางตอนใต้ของประเทศไทย รวมทั้งแหลมมะลายู พม่า มาเลเซีย บอร์เนียว สุมาตรา และอินโดนีเซีย ชาวภาคใต้นิยมใช้ลูกเนียงเป็นอาหารโดยรับประทานทั้งสด ๆ ต้ม หรือย่าง ชาวพื้นเมืองที่รับประทานลูกเนียงทราบกันดีว่า เนียงอาจทำให้เกิดการเป็นพิษได้ โดยมีอาการปัสสาวะเป็นเลือด ปวดท้องและหลัง ในบางรายอาจจะปัสสาวะไม่ออก การเป็นพิษของลูกเนียงนี้เกิดขึ้นไม่บ่อยนัก และเป็นเฉพาะบางคนเท่านั้น คนที่เคยมีอาการเป็นพิษจากการรับประทานลูกเนียงมาแล้วครั้งหนึ่ง ถ้ารับประทานอีกอาจไม่เกิดอาการก็ได้ ฉะนั้นชาวบ้านยังคงนิยมรับประทานลูกเนียงกันเป็นประจำ การศึกษานี้มีจุดประสงค์ที่จะวิเคราะห์หาส่วนประกอบทางเคมีและประเมินคุณค่าทางอาหารของลูกเนียง ตลอดจนหาวิธีสกัดกรดเดงโคลิกจากลูกเนียง และศึกษาความเป็นพิษของลูกเนียงในสัตว์ทดลองคือ หนูถีบจักร์ หนูขาว และลิง ผลการวิจัยพบว่า ลูกเนียงมีส่วนประกอบของโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรท วิตามินบีหนึ่ง บีสอง วิตามินซี กรดโฟลิค แคลเซียม ฟอสฟอรัส และเหล็ก ลูกเนียง ๑ กรัมจะให้พลังงาน ๑๘๓๐แคลอรี จากการวิเคราะห์หากรดอมิโนโดยเครื่องมือ Amino Acid Analyzer พบว่ามีกรดอมิโน ๑๘ ชนิด รวมทั้งกรดอมิโนที่จำเป็นครบทั้ง ๘ ชนิด

เมื่อสกัดลูกเนียงด้วย Ethyl Alcohol 70% และนำไปทดลองกับลิง หนูขาว หนูถีบจักร์ โดยวิธีกรอกทางปาก พบว่าสัตว์ทดลองเหล่านั้นจะถ่ายปัสสาวะเป็นสีเข้ม ขุ่น และกลิ่นฉุน ผลการทดลองในลิงพบว่าจะมีปริมาณของปัสสาวะลดลง ส่วนในหนูถีบจักร์พบผลึกรูปเข็มปรากฏในปัสสาวะเพียงตัวเดียว และพบเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือด

ขาว เยื่อบุเซลล์ในปัสสาวะของสัตว์ทดลองบ้างเป็นบางครั้ง

การตรวจเนื้อเยื่อของไตในหนูทั้งสองชนิดปรากฏว่า เซลล์ของหลอดไตมีลักษณะบวมน้ำ เซลล์ถูกทำลายเป็นหย่อม ๆ และมีโลหิตออก ถึงขั้น necrosis ของ tubular cells ในหนูถีบจักร์บางตัว

จากการวิเคราะห์หากรดเดงโคลิกในน้ำสกัดลูกเนียงโดยวิธี Paper Chromatography และใช้ ninhydrin spray เพื่อให้ติดสีเปรียบเทียบกับกรดเดง-โคลิกที่ทราบปริมาณ พบว่าในลูกเนียงมีกรดเดงโคลิกประมาณ ๑.๓-๑๐.๔ เปอร์เซ็นต์ โดยที่ ๙๓ เปอร์เซ็นต์ของกรดนี้จะอยู่ในสภาพอิสระ มีเพียง ๗ เปอร์เซ็นต์เท่านั้นที่อยู่ในสภาพรวมกับโปรตีน

จากการวิจัยนี้สามารถจะสกัดกรดเดงโคลิกจากลูกเนียงได้โดยการต้มกับน้ำโซเดียมไบคาบอเนต ๕% หรือ กรดเกลือ ๕% นาน ๑๐ นาที พบว่ากรดนี้จะเหลือในลูกเนียง ๓๐% และถ้าต้มด้วยโซเดียมไบคาบอเนต ๕% นานถึง ๒๐ นาที พบว่ามีเพียง ๑๓% เท่านั้นที่เหลืออยู่ในลูกเนียง

Thesis title: Studies on the toxicity of Niang's seed (*Pithecolobium lobatum* Benth) and its pathogenesis in the experimental animals

Name: Mrs. Pimphan Kirdudom Department of Pharmacology

Academic year: 1975

ABSTRACT

The Niang tree which belongs to the family of Leguminosae grows in southern part of Thailand, Malaysia, Borneo, Sumatra and Indonesia. Niang beans are relished as food or as a flavouring for food by the local inhabitants. They are eaten raw, fried or roasted. It is well known among the natives that the beans contained a toxin which caused haematuria, spasmodic pain in the loin and at the back and anuria in some persons who were susceptible to these beans. Since these symptoms occurred not quite frequently and persons who were previously poisoned can still consume them again without untoward manifestation, this hazard was therefore often disregarded by local inhabitants. The objectives of the present studies are to analyse for the chemical components of Niang beans and to assess its nutritive values. Various methods of extraction of djenkolic acid from Niang beans were performed and the toxicity of these beans were studied in mice, rats and monkeys.

Niang beans were analysed for the chemical components. They contained protein, fat, carbohydrate, vitamins B_1, B_2, C, folic acid, calcium, phosphorus and iron. They supplied 1830 calories per 1 gm. Niang beans were also analysed for amino acids content using amino acid analyzer. The results showed that they contain 18 amino acids including all 8 essential amino acids.

Niang beans extracted with 70% ethanol solution was used to feed to monkeys, mice and rats. All these animals showed darker, turbid, with faint odour urine. The experimental monkeys excreted lesser amount of urine. Only one mouse showed needle shaped crystals in the urine. Red blood cells, white blood cells, epithelial cells and some of casts were excreted in urine in some of these animals.

Microscopic examination of kidneys in mice and rats showed a cloudy swelling and hydropic degeneration with haemorrhage in tubules. Progressive necrosis of tubular cells was also observed in some mice.

Djenkolic acid was determined in the Niang bean extracts by the paper chromatography and sprayed with ninhydrin reagent in comparison with the standard solution run in parallel. The results showed that Niang beans contained djenkolic acid 1.7-10.4%. More than 93% of djenkolic acid was found to be in a free state and only 7% of this acid was bound to proteins.

Djenkolic acid could be reduced considerably after boiling Niang beans in water, 5% $NaHCO_3$ or 5% HCl. About 30% of djenkolic acid was left in Niang beans after boiling in these solvents for 10 minutes. If they were boiled in 5% $NaHCO_3$ for 20 minutes, only 13% of djenkolic acid was found in Niang beans.

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENT

The author is deeply indebted and grateful to her adviser, Assistant Professor Dr. Suvit Areekul, Head of the Department of Tropical Radioisotopes, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, for his excellent supervision during the performance of this study and the preparation of the manuscript.

The author wishes to acknowledge to Professor Chamlong Harinasuta, Dean of the Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, and Professor Captain Pisidhi Sudhi-Aromna RTN, Dean of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for giving her the opportunity to carry out this work.

The author wishes to express her deep sense of gratitude to Assistant Professor Dr. Payom Tantivatana, Head of the Department of Pharmaceutical Botany, Chulalongkorn University, Faculty of Pharmaceutical Sciences, for her helpful suggestions.

The author is also grateful to Assistant Professor Bamrung Tantisewie,, Instructor of the Department of Pharmacognosy, Chulalongkorn University, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Mrs. Suparb Suanpan of the Nutrition Division, Ministry of Public Health,and Mrs. Prungchan Tinakorn of the Department of Medical Science,for their useful suggestions and providing her some instrument for this study.

The author wishes to express her sincere appreciation to Dr. Kachorn Chaovanapricha of the Department of Pathology, Siriraj Hospital, for his valuable advices in histological examination.

The author wishes to express her heartfully thanks to all members of the Department of Tropical Radioisotopes who provided her the working facility during the study.

Finally, the author would like to thanks to Chulalongkorn University Graduate School for granting her partial financial support to conduct this research.

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table		Page
1.	The nutritive values of Niang beans.....	23
2.	The amino acids contents in Niang beans.....	24
3.	The amino acids contents in Niang beans as determined by various authors.....	25
4.	Amount of djenkolic acid in Niang beans after extraction with 70% ethanol.....	26
5.	The free and bound form of djenkolic acid in 35 gm Niang beans.....	27
6.	The djenkolic acid content (mg) in 10 gm Niang beans after boiling with water for 10 minutes.....	28
7.	The djenkolic acid content (mg) in 10 gm Niang beans after boiling with 5% $NaHCO_3$ for 10 minutes.....	29
8.	The djenkolic acid content (mg) in 10 gm Niang beans after boiling with 5% HCl for 10 minutes	30
9.	The djenkolic acid content (mg) in 10 gm Niang beans after boiling for 10 and 20 minutes.....	31
10.	The amount of djenkolic acid (mg/day) excreted in the urine of mice.....	32

LIST OF TABLES (cont.)

Table Page

11. The amount of djenkolic acid (% of dose given) in urine of mice..... 36
12. Changes of the volume of urine in rhesus monkeys before, during and after feeding with Niang extracts. The volumes are expressed as the mean values in ml/day..... 37
13. The amount of djenkolic acid (mg/day) in urine of monkeys 39
14. The amount of djenkolic acid (% of dose given) in urine of monkeys..... 40
15. The amount of djenkolic acid (mg/day) in urine of rats..... 41
16. The amount of djenkolic acid (% of dose given) in urine of rats..... 42

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1.	Pethecolobium lobatum Benth. Hook. Niang tree showing flowers and Pods.....	3
2.	Pods of the Niang tree.....	4
3.	Niang beans. One of the centre bean has the outer layer of the testa removed to expose the inner layer of the testa.....	5
4.	Paper chromatography of Niang extract.....	18
5.	Crystals of djenkolic acid prepared from a commercial L-djenkolic acid.....	33
6.	Crystals of djenkolic acid prepared from a commercial L-djenkolic acid.....	34
7.	Crystals from the urine of a mice during feeding with the extract of Niang beans.....	35
8.	Histological section of kidneys of mice No. 17, 10 days after feeding with Niang extract, kidneys showed moderate necrosis and cloudy swelling of tubular cells with an edema of glomerular cells.....	44

LIST OF FIGURES (Cont.)

Figure Page

9. Histological section of kidneys mice No. 25, 3 days after feeding with Niang extract, kidneys showed progressive necrosis of tubular cells with pyknosis, karyorrhexis. Some glomeruli also showed pyknotic nucleus of endothelial and mesengial cells..... 45