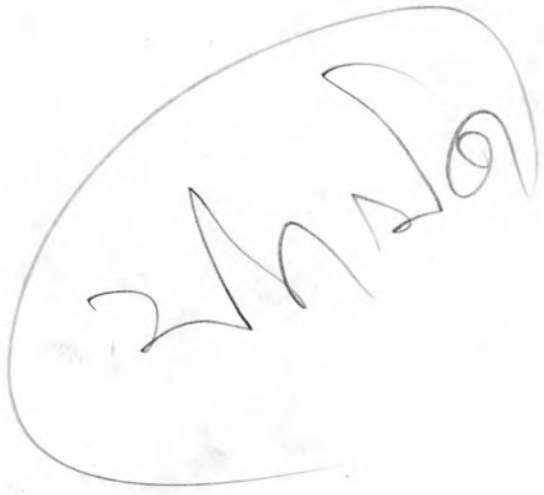
การวิเคราะห์เชิงปริมาณไอโซฟลาโวนอยด์โดยใช้เอชพีแอลซีและฤทธิ์ทางชีวภาพของกวาวเครือขาว (*Pueraria mirifica*) ในแปลงปลูก



นางสาวสุทธิจิต ศรีวัชรกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549

QUANTITATIVE HPLC ANALYSIS OF ISOFLAVONOIDS AND BIOASSAYS OF THE FARM-GROWN WHITE KWAO KRUA *Pueraria mirifica*

Miss Suttijit Sriwatcharakul

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2006

Thesis Title	QUANTITATIVE HPLC ANALYSIS OF ISOFLAVONOIDS AND BIOASSAYS OF THE FARM-GROWN WHITE KWAO KRUA *Pueraria mirifica*
By	Miss Suttijit Sriwatcharakul
Field of study	Biotechnology
Thesis Advisor	Associate Professor Wichai Cherdshewasart, D.Sc.

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctoral Degree

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

THESIS COMMITTEE

.....Chairman
(Assistant Professor Kumthorn Thirakhupt, Ph.D.)

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

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

..... Member
(Associate Professor Nattaya Ngamrojanavanich, Ph.D.)

..... Member
(Assistant Professor Kanokporn Sompornpailin, D.Pharm.Sc.)

สุทธิจิต ศรีวัชรกุล: การวิเคราะห์เชิงปริมาณไอโซฟลาโวนอยด์โดยใช้เอชพีแอลซีและฤทธิ์ทางชีวภาพของกวาวเครือขาว *Pueraria mirifica* ในแปลงปลูก (QUANTITATIVE HPLC ANALYSIS OF ISOFLAVONOIDS AND BIOASSAYS OF THE FARM-GROWN WHITE KWAO KRUA *Pueraria mirifica*) อ. ที่ปรึกษา: รศ.ดร.วิชัย เชิดชีวศาสตร์, 217 หน้า.

การวิเคราะห์ปริมาณสารไอโซฟลาโวนอยด์ของสารสกัดหัวกวาวเครือขาว 5 สายพันธุ์ ใน 3 ฤดู จากแปลงปลูกจังหวัดราชบุรี ในระยะเวลา 1 ปี ด้วยเทคนิคเอชพีแอลซี พบว่า สารไอโซฟลาโวนอยด์หลัก 5 ชนิด ได้แก่ พิวรารินไดด์ซิน เจนิสติน ไดด์เซอีน และเจนีสเตอีน ในหัวกวาวเครือขาวที่เก็บเกี่ยวในฤดูต่างๆมีปริมาณแตกต่างกัน ในการศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณน้ำฝนและการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิต่อปริมาณสารไอโซฟลาโวนอยด์ในหัวกวาวเครือขาว พบว่า ปริมาณเจนีสติน อัตราส่วนระหว่างไกลโคไซด์ต่ออะไกลโคไซด์ อัตราส่วนระหว่างอะไกลโคไซด์และไกลโคไซด์ต่อพิวรารินมีความสัมพันธ์ในทิศทางเดียวกับปริมาณน้ำฝนในฤดูฝนและฤดูหนาว แต่ในฤดูฝนอัตราส่วนระหว่างอะไกลโคไซด์ต่อไกลโคไซด์มีความสัมพันธ์ในทิศทางตรงข้ามกับปริมาณน้ำฝน ส่วนการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณสารไอโซฟลาโวนอยด์ สรุปได้ว่าปริมาณน้ำฝนมีผลต่อการสะสมของปริมาณสารไอโซฟลาโวนอยด์ในหัวกวาวเครือขาว กวาวเครือขาวทั้ง 5 สายพันธ์มีฤทธิ์กระตุ้นและยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ต่างกัน โดย PM-I, PM-II และPM-V ที่เก็บเกี่ยวในฤดูร้อน และ PM-III ที่เก็บเกี่ยวในฤดูหนาว มีฤทธิ์กระตุ้นการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม ส่วน PM-II ที่เก็บเกี่ยวในฤดูหนาว มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม ส่วนหัวกวาวเครือขาวที่เก็บเกี่ยวในฤดูฝนไม่มีทั้งฤทธิ์กระตุ้นและยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม แสดงว่าฤดูกาลในการเก็บเกี่ยวมีผลต่อฤทธิ์กระตุ้นและยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม เอนไซม์ S9 มีผลเพิ่มฤทธิ์กระตุ้นการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมในฤดูร้อนและฤดูฝน ปริมาณไดด์เซอีน เจนิสเตอีน และปริมาณอะไกลโคไซด์ มีผลต่อฤทธิ์เอสโทรเจนิกของกวาวเครือขาว ในการศึกษาฤทธิ์เอสโทรเจนิกของกวาวเครือขาวในหนูแรทเพศเมียตัดรังไข่ โดยให้สารแขวนลอยกวาวเครือขาวขนาด 100 และ 1000 มก./กก.นน.ตัว เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ป้อนน้ำกลั่น 0.7 มล./วัน และกลุ่มที่ฉีด 17β-estradiol การทดลองแบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ ระยะก่อนการทดลอง 14 วัน ระยะการทดลอง 14 วัน และระยะหลังการทดลอง 7 วัน โดยใช้ดัชนีชี้วัด 5 ชนิด ผลจากวันแรกที่ปรากฏการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่ผนังช่องคลอดเป็น cornified cell และจำนวนวันที่มี cornified cell ในระยะทดลองและระยะหลังการทดลอง พบว่ากวาวเครือขาวแสดงฤทธิ์เอสโทรเจนิกตามขนาดที่ให้ นั่นคือ กวาวเครือขาวในขนาด 1000 มก./กก.นน.ตัว สามารถกระตุ้นการเจริญของเซลล์ที่ผนังช่องคลอดได้เร็วและนานกว่าขนาด 100 มก./กก.นน.ตัว และการเจริญของเซลล์ผนังช่องคลอดสัมพันธ์กับการเพิ่มน้ำหนักของมดลูก จากดัชนีชี้วัดทั้ง 5 พบว่า ในฤดูร้อนและฤดูหนาว กวาวเครือขาวมีฤทธิ์เอสโทรเจนิกสูงกว่าในฤดูฝน โดยกวาวเครือขาวสายพันธุ์ PM-III มีฤทธิ์เอสโทรเจนิกสูงที่สุดกว่าสายพันธุ์อื่น โดยพบว่าปริมาณสารไอโซฟลาโวนอยด์ในหัวกวาวเครือขาวที่เก็บเกี่ยวในแต่ละฤดูมีผลต่อฤทธิ์เอสโทรเจนิก โดยเฉพาะปริมาณของอะไกลโคไซด์ (ไดด์เซอีนและเจนิสเตอีน) และไกลโคไซด์ (ไดด์ซินและเจนิสติน) ผลการทดลองสรุปได้ว่าปัจจัยทางกายภาพ และพันธุกรรมพืช มีผลต่อฤทธิ์เอสโทรเจนิกของหัวกวาวเครือขาว ดังนั้นสามารถนำช่วงเวลาการเก็บเกี่ยวที่เหมาะสมและการคัดเลือกสายพันธุ์กวาวเครือขาวที่มีฤทธิ์เอสโทรเจนิกสูงเป็นดัชนีชี้วัดในการคัดเลือกวัตถุดิบที่มีคุณภาพดีเพื่อใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ.....ลายมือชื่อนิสิต.....สุทธิจิต ศรีวัชรกุล.....

ปีการศึกษา.....2549.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

4573846223: MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD : *Pueraria mirifica* / Isoflavonoid / HPLC / Estrogenic activity / MCF-7 cell

SUTTIJIT SRIWATCHARAKUL: QUANTITATIVE HPLC ANALYSIS OF ISOFLAVONOIDS AND BIOASSAYS OF THE FARM-GROWN WHITE KWAO KRUA *Pueraria mirifica*. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. WICHAI CHERDSHEWASART, D.Sc., 217 pp.

HPLC isoflavonoid analysis of 5 clones of *Pueraria mirifica* tubers in a field trial at Ratchaburi province collected in 3 seasons revealed that the 5 isoflavonoids; puerarin, daidzin, genistin, daidzein and genistein were varied. Correlation analysis of the amount of rain and temperature change with tuberous isoflavonoid contents indicated the correlation between genistin, the ratio of glycoside/aglycoside, the ratio of aglycoside and glycoside/puerarin with the rainfall amount in rainy season and winter. In rainy season, the ratio of aglycoside/glycoside was negatively correlated with the rainfall amount. Whereas, temperature change had no correlation with isoflavonoid contents. We can conclude that the rainfall amount had influence on isoflavonoid storage in *P. mirifica* tubers. The 5 plants exhibited different proliferation effects on MCF-7. PM-I, PM-II and PM-V collected in summer and PM-III collected in winter exhibited proliferation while PM-II collected in winter exhibited antiproliferation effect. MCF-7 proliferation assay was much influenced by the presence of S9 mixture which could increase the proliferation response. The studies in ovariectomized rats treated with 100 and 1,000 mg/kg body weight (BW) of plant powder dissolved in 0.7 ml of distilled water, compared to rats fed with 0.7 ml of distilled water only and rats injected with a single dose of 17β-estradiol. The experiments were set into 3 phases, pre-treatment period for 14 days, treatment period for 14 days and post-treatment period for 7 days, with 5 parameters. From the first day of appearance of vaginal cornified cell in the treatment period and the total day of appearance of cornified cells in the treatment period and post-treatment period including, it was found that the estrogenic activity of *P. mirifica* was a dose dependent. The vaginal cornification in rats treated with1000 mg/kg BW occurred faster and longer than those of rats treated with 100 mg/kg BW. Differentiation of vaginal cells after *P. mirifica* treatment agreed with the increased uterine weight. From the 5 analyzed parameters, Samples collected in summer and winter showed stronger estrogenic activity than in rainy season. PM-III showed stronger estrogenic activity than other clones. Isoflavonoid activity, especially aglycoside (daidzein and genistein) and glycoside (daidzin and genistin) in differ seasonal collected *P. mirifica* had influence on estrogenic activities. The conclusion from this study is the physical factors and plant genetics exhibited influences on the plant estrogenic activities. Therefore, the right harvest season and plant clone selection for high estrogenic activity could be applied as parameters to establish high quality raw materials for industry demand.

Field of study...Biotechnology .....Student's signature.....S. Sriwatcharakul.....

Academic.....2006.....Advisor's signature.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deeply grateful thanks to my advisor, Associate Professor Dr. Wichai Cherdshewasart, Department of Biology, for his valuable suggestion, guidance, kindness, encouragements and helps throughout this study. Especially I would like to express my gratitude to my co-advisor Assistant Professor Dr. Kanokporn Sompornpailin, Department of Applied Biology King Mongkut's Institute of Technology, Ladkrabang for her guidance, supports and encouragement. Associate Professor Dr. Sirirat Rengpipat, Department of Microbiology, Associate Professor Dr.Nattaya Ngamrojanavanich, Program in Biotechnology, for their kindly valuable guidance and discussion.

I would like to thank Assistant Professor Dr. Orawan Sattayalai, Associate Professor Dr. Suchinda Malaivijitnond, Department of Biology and Chemistry, Program in Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University for permission to use the necessary instruments and laboratory facilities for my thesis.

Special thanks for Miss Sunan Limtiamcharoen and her colleagues to assistance for my study. Thankfulness would be given to all members in Kwao Krua Research Laboratory, Department of Biology, Ms. Rattana Panriansean, Ms. Subongkoch Subtang, Ms.Virasinee Trisub, Ms. Wanrawee Sangkapong, Ms. Yosaporn Kitsamai and Mr. Kade Pulchareon for their help and encouragement.

Sincere thanks to all my friends and finally, the deepest sincere gratitude to my parents and my family for their love, support, understanding and encouragement.

This project was granted by Central of Excellence in Biodiversity, Faculty of Science, Chulalongkorn University.

CONTENTS

LIST OF TABLES

Page

LIST OF FIGURES

Page

LIST OF ABBREVIATIONS

AU	Absorbance Unit
BW	Body weight
Co	Cornified cell
DW	Distilled water
Day	Day of study period
D	Day of treatment period
D'	Day of posttreatment
E_2	17β-Estradiol
ER	Estrogen Receptor
ERβ	Estrogen Receptor Beta
ERα	Estrogen Receptor Alpha
FSH	Follicle stimulating hormone
g	Gram
h	Hour
IC_{50}	Median Inhibitory Concentration
kg	Kilogram
L	Litre
L	Leucocyte cell
LH	Lutinizing hormone
mg	Milligram
mm	Millimetre
ml	Millilitre
M	Molar
O	Nucleated cell
OVX	Ovariectomy
PM	*Pueraria mirifica*
S.E.M.	Standard Error of Mean
µg	Microgram
µl	Microliter
µM	Micromolar
°C	Degree Celsius