

KHẢO SÁT HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA CÁC APORPHIN ALKALOID TỪ CÂY TƠ XANH (*Cassytha Filiformis* L.)

Bùi Thế Vinh^{1,2}, Nguyễn Thị Cẩm Duyên⁴

Võ Thị Ngọc Mỹ⁴, Trần Công Luận³

¹ Trung tâm Sâm và Dược liệu TP. Hồ Chí Minh

² Khoa sinh học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên Tp. HCM

³ Khoa Dược – Điều dưỡng, Trường Đại học Tây Đô

⁴ Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

Ngày nhận: 10/6/2017

Ngày phản biện: 20/6/2017

Ngày duyệt đăng: 10/7/2017

TÓM TẮT

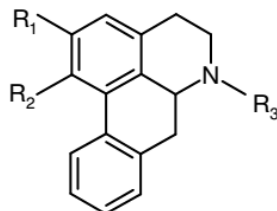
Tơ xanh (*Cassytha filiformis*) là một cây thuốc dân gian đã được dùng từ lâu và phổ biến tại nhiều nước trên thế giới như ở Indonesia và châu Phi dùng chữa giun sán, ký sinh trùng, Trung Quốc dùng chữa vàng da ở trẻ em. Các nghiên cứu trên aporphin alkaloid của Tơ xanh cho thấy chúng có hoạt tính độc tế bào, kháng ký sinh trùng trypanosoma, ức chế kết tập tiểu cầu và nhiều hoạt tính quan trọng khác. Mục tiêu nghiên cứu này nhằm khảo sát hoạt tính chống oxy hóa, độc tế bào của nhóm aporphin alkaloid từ Tơ xanh, làm tiền đề cho các thử nghiệm tiếp theo của nhóm chất này. Kết quả cho thấy hoạt tính chống oxy hóa của các chất thử nghiệm có giá trị IC_{50} trong khoảng 5-20 $\mu\text{g/ml}$, cao nhất là Cassamedine với IC_{50} là 4,98 $\mu\text{g/ml}$. Kết quả thử độc tế bào trên hai dòng tế bào A549 và HeLa của V0, V1 và Atp giá trị IC_{50} trong khoảng 20-40 $\mu\text{g/ml}$.

Từ khóa: Tơ xanh, aporphin alkaloid.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Aporphin alkaloid là một nhóm hợp chất phổ biến ở thực vật đã được quan tâm nghiên cứu, được phát hiện đầu tiên ở loài Sen (*Nelumbo nucifera*) từ

thế kỉ 19. Sau đó, ngày càng có nhiều phát hiện ra các hợp chất aporphin, là các alkaloid thuộc nhóm isoquinolin (Manske, 1973) (Hình 1).



Hình 1. Khung sườn aporphin căn bản

Trích dẫn: Bùi Thế Vinh, Nguyễn Thị Cẩm Duyên, Võ Thị Ngọc Mỹ và Trần Công Luận, 2017. Khảo sát hoạt tính sinh học của các Aporphin alkaloid từ cây Tơ xanh (*Cassytha Filiformis* L.). Tạp chí Nghiên cứu khoa học và Phát triển kinh tế Trường Đại học Tây Đô. 01: 153-167.

Nhóm aporphin alkaloid có nhiều hoạt tính quan trọng: Bất hoạt thụ thể hệ giao cảm (adreno-receptor) như domesticin và dicentrin (Indra et al., 2002). Trên thụ thể serotonin, Nantenin ức chế các chất 1-5-HTP và clorgylin gây ra co giật bằng cách chặn các thụ thể 5-HT_{2A} trong hệ thống thần kinh trung ương. (+) - Nantenin có thể ức chế thụ thể 5-HT (2A) làm giảm huyết áp và giảm nhịp tim (Francisco, 2004).

Dicentrin, roemerin, thalicminin, neolitsin, boldin là những aporphin alkaloid có khả năng gây độc tế bào, cơ chế chủ yếu là ức chế enzym topoisomerase II (Fernanda et al., 2011; Gören et al., 2003).

Boldin, bulbocapnin, glaucin, stepholidin có khả năng chống oxy hóa trên các mô hình thực nghiệm chống oxy hóa khác nhau như quét gốc hydroxy tự do, ức chế peroxid hóa lipid ở gan chuột, tự oxy hóa não chuột cô lập... (Cassels et al., 1995; Milián et al., 2004; Santanam et al., 2004; Ubeda et al., 1993)

Nhóm aporphin alkaloid của Tơ xanh đã được nghiên cứu thể hiện hoạt tính độc tế bào ung thư, kháng ký sinh trùng *trypanosoma*, chống kết tập tiểu cầu (Hoet et al., 2004; Stevigny et al., 2002; Yang et al., 1997)

Nghiên cứu này đánh giá hoạt tính chống oxy hóa và độc tế bào của nhóm aporphin alkaloid chiết tách từ Tơ xanh.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu nghiên cứu: Tơ xanh được thu hái ở tỉnh Long An, mẫu thu trong thời kỳ ra hoa, quả khoảng tháng 7-8. Mẫu được định danh bởi phòng Tài nguyên Dược liệu, Trung tâm Sâm và Dược liệu Tp.HCM. Mẫu thu hái được rửa sạch, cắt nhỏ, phơi khô và xay thành bột để nghiên cứu.

Môi trường DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) và RPMI được cung cấp bởi Gibco BRL (NY, USA). FBS (Fetal bovin serum) của hãng INC Biomedicals, Inc (CA, USA), WST-1 (4-[3-(4-Lodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disulfonat) của hãng Dojindo Laboratories (Kumamoto, Japan). Các kháng thể dùng trong phương pháp Western blot được mua từ hãng Cell Signaling Technology (MA, USA). ECL (Enhanced hemiluminescence) Western Blotting Detection Reagent của hãng Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK). Màng lai Immobilon-P mua từ hãng Millipore (MA, USA). BSA (Blocks Ace) của hãng Dainipponseiyaku (Osaka, Japan).

WCE (Whole cell extraction) được pha từ các thành phần: 25 mM HEPES (pH 7,7); 0,3 M NaCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM EDTA; 0,1% Triton X-100; 20 mM b-glycerophosphat; 0,1 mM natri orthovandat; 0,5 mM phenylmethylsufonyl fluorid (PMSF); 1mM dithiothreitol; 10 mg/ml aprotinin; 10 mg/ml leupeptin.

Phương pháp:

Chuẩn bị các mẫu thử:

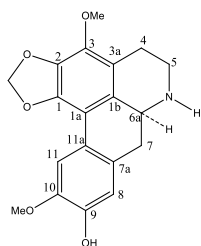
- Cao MeOH toàn phần (mẫu MeOH): Chiết ngâm kiệt 100 g nguyên liệu với MeOH 100 ml x 6 lần (tỷ lệ 1:6; KL:TT), lọc gộp các dịch lọc cô giảm áp đến cạn thu được cao MeOH làm mẫu thử.

- Alkaloid tổng (mẫu Atp): Cân chính xác khoảng 10 g dược liệu, làm ẩm bằng NH₄OH 10% và chiết hồi lưu trong 30 phút lần lượt với 50x40x40 ml ... cloroform. Lọc và gộp chung dịch chiết vào bình lắng gạn. Chiết alkaloid bằng dung dịch acid hydrocloric 2% (20x10x10 ml). Gộp chung dịch chiết acid vào bình lắng gạn, kiềm hóa bằng NH₄OH 10% cho tới pH 10, chiết alkaloid base bằng cloroform (20x10x10 ml). Gộp chung dịch chiết cloroform vào bình

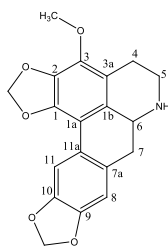
lắng gạn, rửa dịch chiết bằng nước cất. Gạn lớp cloroform vào một bercher khô và làm khan bằng Na₂SO₄ khan. Rửa lớp Na₂SO₄ bằng 5 ml cloroform 2 lần và gộp chung vào dịch chiết cloroform. Bốc hơi dịch cloroform trên bếp cách thủy cho tới cạn và sấy cạn ở 110 °C cho tới khối lượng không đổi.

- Các alkaloid chiết tách được V0, V1, V2, V3, V4, V5 từ Tơ xanh được Trung tâm Sâm và Dược liệu cung cấp (Hình 2) (Cassels B.K, et al, 1995 ; Fernanda R. Garcez, 2011).

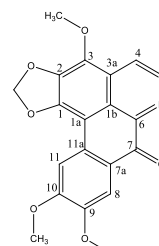
Mẫu thử được pha trong DMSO và pha loãng bằng môi trường đến nồng độ thích hợp. Mẫu chứng âm là mẫu có cùng nồng độ DMSO với mẫu thử, nồng độ DMSO sau cùng không vượt quá 0,1%.



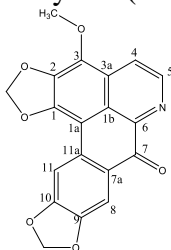
Cassythin (V0)



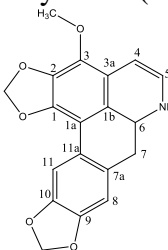
Cassythinidin (V1)



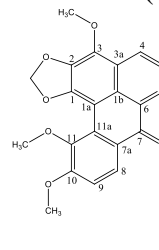
Thalictiminin (V2)



Cassamedin (V3)



1,2; 9,10-methylen dioxid-
3-methoxy-4-en aporphin.
(V4)



1,2-dimethylen dioxid -
3,10,11-
trimethoxy oxoaporphin
(V5)

Hình 2. Cấu trúc các alkaloid của Tơ xanh

2.1. Hoạt tính chống oxi hóa:

Hoạt tính đánh bắt gốc tự do DPPH

Chuẩn bị thuốc thử và mẫu:

- Dung dịch DPPH: Pha dung dịch DPPH 0,6 mM trong metanol bằng cách hòa tan 5,915 mg DPPH vào lượng methanol vừa đủ cho tan

hết DPPH, định mức bằng methanol cho đủ 25 ml.

Mẫu thử: Khảo sát hoạt tính kháng gốc DPPH của các mẫu: Alkaloid toàn phần (Atp), và các alkaloid tinh sạch (A1, V1, V2, V3, V4, V5). Chứng dương là vitamin C. Các mẫu thử được tiến hành khảo sát ở 5 nồng độ khác nhau theo Bảng 1.

Bảng 1. Dãy nồng độ của các mẫu thử hoạt tính quét gốc tự do DPPH.

Mẫu thử	Nồng độ (µg/ml)					
	0	1	2	3	4	5
Atp	0	2	4	6	8	10
V0	0	5	10	15	20	25
V1	0	5	10	15	20	25
V2	0	4	8	12	16	20
V3	0	2	4	6	8	10
V4	0	5	10	15	20	25
V5	0	4	8	12	16	20
Vit C	0	20	40	60	80	100

Tiến hành thí nghiệm

- Hút 4 ml mẫu thử lần lượt theo từng nồng độ vào ống nghiệm.

- Cho vào ống nghiệm 0,5 ml dung dịch DPPH, lắc đều.

- Mẫu được giữ trong tối, ở nhiệt độ phòng. Sau thời gian 30 phút, tiến hành đo độ hấp thụ ở bước sóng 517 nm.

- Hoạt tính chống oxy hóa (HTCO) được tính theo công thức:

$$HTCO(\%) = \frac{(OD_c - OD_t)}{OD_c} \times 100$$

OD_c: Mật độ quang của dung dịch DPPH và MeOH.

OD_t: Mật độ quang của DPPH và mẫu thử.

Từ HTCO (%) và nồng độ mẫu được dựng đường chuẩn biểu diễn cho mối quan hệ giữa HTCO (%) và nồng độ mẫu. Dựa vào phương trình đường chuẩn tính được IC₅₀ (khả năng quét gốc tự do 50% DPPH của mẫu) (Bảng 2).

Bảng 2. Quy trình thử hoạt tính quét gốc tự do DPPH

	Ống trắng	Ống chứng	Ống mẫu thử với dãy nồng độ thích hợp
Mẫu (ml)	0	0	4
Metanol (ml)	4	4	0
Dung dịch DPPH (ml)	0	0,5	0,5
Đề trong tối, ở nhiệt độ phòng trong 30 phút			
Đo OD _{517 nm}			

Quét gốc hydroxyl tự do (Hydroxyl radical scavenging assay)

- Tiến hành thí nghiệm
Pha mẫu thử thành các dãy nồng độ như sau:

Bảng 3. Dãy nồng độ của các mẫu thử hoạt tính quét gốc hydroxyl tự do

Mẫu thử	Nồng độ (µg/ml)							
	0	1	2	3	4	5	6	7
Atp	0	20	40	60	80	100	150	200
V0	0	25	50	75	100	125	150	200
V1	0	25	50	75	100	125	150	200
V2	0	20	40	60	60	100	150	200
V3	0	20	40	60	60	100	150	200
V4	0	25	50	75	100	125	150	200
V5	0	20	40	60	60	100	150	200
Vit C	0	200	400	600	800	1000		

Lần lượt cho các thành phần phản ứng vào các ống nghiệm như Bảng 4:

Bảng 4. Quy trình thử hoạt tính quét gốc hydroxyl tự do

Ống nghiệm		0	1	2	3	4	5
Mẫu (ml)		1	1	1	1	1	1
EDTA – Fe ²⁺ (ml)		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Safranin-O (ml)		0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
H ₂ O ₂ (ml)		1	1	1	1	1	1
Thêm đệm phosphate (0,15 M pH 7,4) cho đủ 5 ml. Lắc đều.							
Ủ ở 37 °C trong 30 phút							
Đo OD _{520nm}							

Hiệu quả quét gốc hydroxyl tự do của mẫu thử được tính theo công thức:

Hoạt tính quét gốc

$$OH^{\bullet} = [(A_i - A_0)/(A_c - A_0)] \times 100$$

A_i: Độ hấp thụ của mẫu thử ở bước sóng 520 nm.

A₀: Độ hấp thụ của mẫu thử không ở bước sóng 520 nm.

A_c: Độ hấp thụ của mẫu đối chứng ở bước sóng 520 nm.

Mẫu thử không là mẫu mà trong đó chất thử nghiệm được thay bằng đệm.

Mẫu đối chứng là mẫu mà chất thử nghiệm, H₂O₂ và EDTA – Fe²⁺ được thay bằng đệm.

2.2. Hoạt tính độc tế bào

Thử nghiệm WST-1: Độc tính tế bào được khảo sát trên 2 dòng tế bào ung thư HeLa và A549, sử dụng muối tetrazolium WST-1 (phương pháp WST-1), phương pháp đo quang dựa trên sự khử tetrazolium thành formazan do các enzym dehydrogenase có trong tế bào còn sống.

Tiến hành:

- Giải đông nguồn tế bào ung thư bảo quản trong Nitơ lỏng, nuôi cấy tế bào: Dòng HeLa và A549 trong môi trường DMEM và RPMI có bổ sung 10 % FCS, ủ ở 37 °C, 5% CO₂ đến thế hệ thứ 4.

- Nuôi tế bào trong bình nuôi cấy đạt độ phủ khoảng 70 - 80%.

- Cho 90 µl dịch tế bào vào đĩa 96 giếng với lượng 1x10⁴ tế bào/giếng,

tiếp tục thêm 10 µl dịch mẫu thử với nồng độ gấp 10 lần nồng độ muốn thử và ủ trong 24h, đo độ hấp thu của mẫu tại bước sóng 450 nm. Sau đó thêm 10 µl WST-1, ủ thêm 2h và đo lại độ hấp thu lần nữa ở cùng bước sóng.

Thực hiện mỗi mẫu ở mỗi nồng độ 3 lần lặp lại.

Tỷ lệ % ức chế tăng sinh được tính theo công thức:

$$\% \text{ Ức chế} = \left(1 - \frac{\text{Mẫu thử} - \text{mẫu trắng}}{\text{Mẫu chứng} - \text{mẫu trắng}} \right) \times 100$$

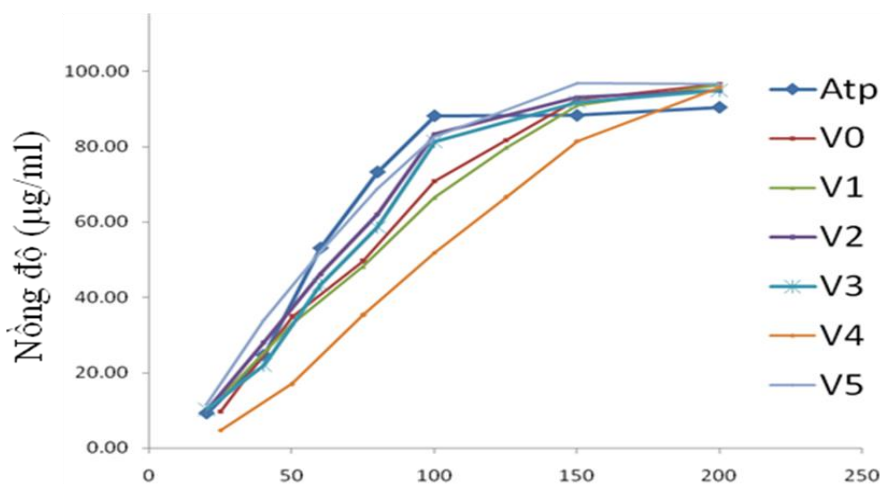
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Hoạt tính chống oxy hóa

Trong nghiên cứu hoạt tính chống oxy hóa *in vitro*, năm 2013, Md. Nur Alam và cộng sự đã tổng hợp lại có rất nhiều phương pháp khác nhau, với các cơ chế tạo tác nhân oxy hóa và gốc tự do cũng khác nhau. Nhóm tác giả cũng nhận định phương pháp tin cậy, hiệu quả và được sử dụng nhiều nhất qua thống kê các công bố trên tạp chí là quét gốc tự do DPPH, quét gốc hydroxyl tự do và β-caroten

linolat. Trong báo cáo này chúng tôi đã sử dụng hai phương pháp được áp dụng phổ biến nhất và kết quả thu được cho thấy aporphin alkaloid của Tơ xanh có tác dụng chống oxy hóa rõ, phù hợp với nhận định của các công bố của nhiều tác giả khác nhau về hoạt tính chống oxy hóa của nhóm alkaloid này [3,9,11,13,15].

Quét gốc hydroxyl tự do (Hydroxyl radical scavenging assay)



Hình 3. Biểu đồ so sánh % hoạt tính quét gốc hydroxyl tự do của các mẫu thử

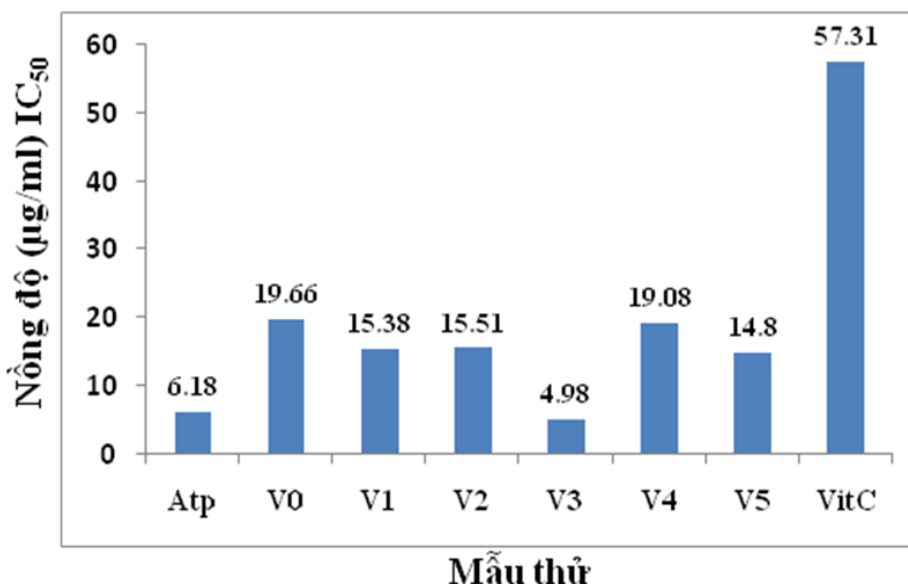
Kết quả thử hoạt tính chống oxy bằng thử nghiệm quét gốc hydroxyl tự do cho thấy các mẫu alkaloid tổng và các alkaloid tinh sạch có khoảng nồng độ có hoạt tính từ 25 đến 200 µg/ml,

so với chứng vitamin C là 200 – 1000 µg/ml. Có thể do cơ chế tác dụng lên gốc OH tự do trong mô hình thử nghiệm *in vitro* này mà các cấu trúc aporphin thể hiện hoạt tính rõ hơn

vitamin C, một cấu trúc có khả năng chống oxy hóa cao nhưng tính oxy hóa của nó mạnh hơn nhiều thể hiện ở khả năng bắt giữ O₂. Acid ascorbic bị oxy hóa thành acid dehydroascorbic.

Kết quả so sánh % hoạt tính ở đồ thị biểu diễn cho thấy Atp có độ độc hơn các mẫu khác cho thấy Atp có hoạt tính cao nhất, hoạt tính đạt cao nhất tại nồng độ 100 µg/ml trở lên.

V4 có hoạt tính thấp nhất trong các mẫu thử nghiên cứu. Hầu hết các mẫu có % hoạt tính cao nhất (khoảng 90%) tại nồng độ 200 µg/ml. Kết quả cũng cho thấy đối với hoạt tính chống oxy hóa, từng alkaloid đơn chất có hoạt tính thấp hơn hỗn hợp các alkaloid tách từ Tơ xanh (Hình 3). Hoạt tính quét gốc tự do DPPH.



Hình 4. Kết quả quét gốc tự do DPPH của các mẫu thử

Các mẫu thử có IC₅₀ trong khoảng 5-20 µg/ml so với vitamin C là 57,31 µg/ml. Có hoạt tính cao nhất là V3 và Atp, thấp nhất trong nhóm alkaloid này là V0 và V4 (Hình 4).

Hoạt tính độc tế bào

- Kết quả sàng lọc bước đầu khả năng gây độc tế bào của cao alkaloid

toàn phần (Atp), cao chiết MeOH và 2 alkaloid chiết tách được (V0 và V1):

Trong thí nghiệm, chúng dương được dùng là doxorubicin pha ở nồng độ 100 µg/ml để xác định độ ổn định của phương pháp.

Thí nghiệm lặp lại 3 lần, kết quả được trình bày trong Bảng 5.

Bảng 5. Tỷ lệ phần trăm gây độc tế bào của Atp, MeOH, V0 và V1

Dòng tế bào ung thư	Lần thử nghiệm	Tỷ lệ gây độc tế bào (%)			
		Mẫu MeOH	Mẫu Atp	Mẫu V0	Mẫu V1
Hela	1	31,1	98,21	92,67	71,35
	2	28,37	95,81	89,71	68,43
	3	29,19	92,48	90,41	73,67
	Trung bình ± SD	29,55 ± 1,40	95,50 ± 2,87	90,93 ± 1,54	71,15 ± 2,62
A549	1	4,01	99,33	101,18	110,94
	2	6,23	100,33	98,52	102,12
	3	5,01	99,40	106,50	109,17
	Trung bình ± SD	5,08 ± 1,11	99,68 ± 0,558	102,06 ± 4,06	107,41 ± 4,66

Kết quả sàng lọc sơ bộ trên 2 dòng A549 và HeLa cho thấy các mẫu có hoạt tính mạnh, ức chế gần như tối đa 100% ở nồng độ 100 µg/ml. Chỉ riêng mẫu chiết toàn phần MeOH có hoạt tính yếu hơn, và trên dòng tế bào ung thư phổi A549 hoạt tính ức chế rất yếu. Như vậy các alkaloid V0, V1 và alkaloid tổng có khả năng ức chế sự phát triển của tế bào ung thư *in vitro* tại nồng độ 100 µg/ml, riêng mẫu

MeOH không thể hiện rõ, có thể giải thích vì đây là cao chiết tổng, chứa ngoài các alkaloid có hoạt tính còn những thành phần khác không thể hiện hoạt tính. Từ kết quả đánh giá sơ bộ, chúng tôi tiếp tục khảo sát IC50 của các mẫu trên 2 dòng A549 và HeLa bằng phương pháp WST-1.

- Đánh giá khả năng gây chết 50% tế bào tế bào Hela của MeOH, Atp, V0 và V1:

+ Trên dòng A549

Bảng 6. IC₅₀ của mẫu Atp, V0 và V1 trên dòng A549 (Phương pháp WST-1)

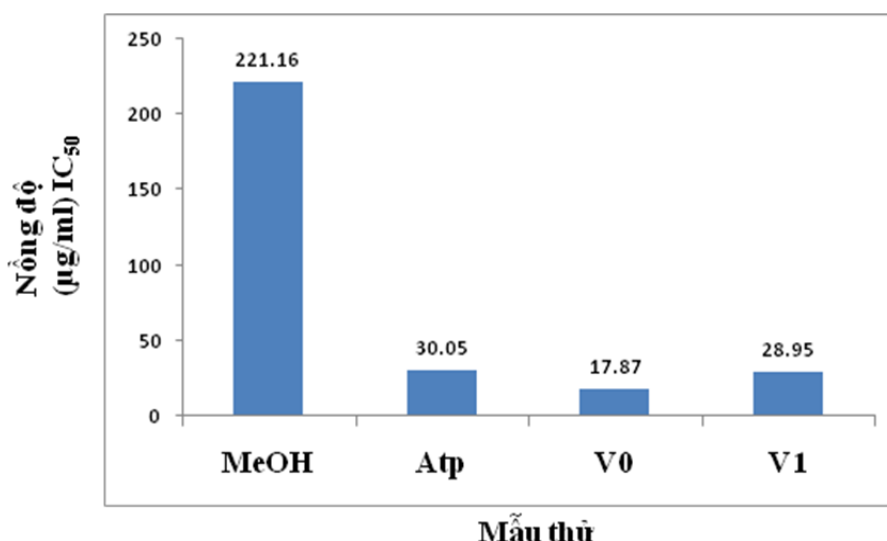
Mẫu Atp	% Ức chế				
Nồng độ (µg/ml)	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Trung bình	SD
50	79,813	78,179	77,946	78,646	1,01
40	65,24	67,073	65,243	65,853	1,05
30	56,772	54,966	56,207	55,981	0,92
20	42,840	46,818	49,659	46,439	3,42
10	33,560	34,693	29,138	32,464	2,93
IC50	25,09	24,09	25,02	24,32	0,55
Mẫu V0	% Ức chế				
Nồng độ (µg/ml)	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Trung bình	SD
70	75,380	71,394	69,856	72,21	2,85
60	62,459	58,937	64,869	62,08	2,98
50	46,324	47,491	47,374	47,063	0,64
40	38,780	41,951	42,804	41,178	2,12
30	30,795	28,863	35,568	31,74	3,45
IC50	49,35	50,29	47,71	49,12	1,30
Mẫu V1	% Ức chế				
Nồng độ (µg/ml)	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Trung bình	SD
50	76,312	80,046	80,046	78,802	2,15
40	69,024	71,097	72,560	70,894	1,77
30	61,399	61,625	68,284	63,769	3,91
20	57,954	53,977	61,250	57,727	3,64
10	38,775	40,136	41,723	40,211	1,47
IC50	17,59	18,27	13,21	16,36	2,74

- Trên dòng HeLa

Bảng 7. IC₅₀ của mẫu MeOH, Atp, V0 và V1 trên dòng HeLa (Phương pháp WST-1)

Mẫu MeOH	% Ức chế				
Nồng độ (µg/ml)	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Trung bình	SD
400	94,007	94,863	95,486	94,785	0,74
200	48,127	39,754	37,441	41,774	5,62
100	28,278	29,230	29,377	28,962	0,59
50	1,191	-3,052	5,956	1,365	4,50
IC50	216,46	226,09	220,93	221,16	4,82
Mẫu Atp	% Ức chế				
Nồng độ (µg/ml)	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Trung bình	SD
50	91,502	92,103	92,361	91,989	0,44
40	73,947	67,489	69,495	70,310	3,30
30	48,358	56,274	51,495	52,042	3,98
20	25,357	24,584	29,429	26,457	2,60
10	9,725	9,358	6,972	8,685	1,49
IC50	30,108	30,014	30,028	30,05	0,05
Mẫu V0	% Ức chế				
Nồng độ (µg/ml)	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Trung bình	SD
50	102,356	99,347	93,441	98,372	4,53
40	88,152	82,123	84,253	84,841	3,05
30	70,455	72,966	73,974	72,464	1,81
20	59,193	57,162	55,631	57,321	1,78
10	30,931	28,879	38,142	32,668	4,87
IC50	18,23	19,10	16,29	17,87	1,43
Mẫu V1	% Ức chế				

Nồng độ (µg/ml)	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Trung bình	SD
50	80,344	85,737	81,469	82,517	2,84
40	58,370	65,458	62,451	62,093	3,55
30	53,266	60,804	58,794	57,621	3,90
20	39,086	43,147	45,178	42,470	3,10
10	12,371	14,948	13,918	13,746	1,29
IC50	30,852	27,563	28,465	28,95	1,69



Hình 6. Kết quả WST-1 của các mẫu thử

Kết quả xác định IC₅₀ trên dòng HeLa và A549 bằng phương pháp WST-1 cho thấy các mẫu có hoạt tính gây độc với giá trị IC₅₀ trong khoảng 10 – 50 µg/ml, Cao nhất là mẫu V0 17,87 µg/ml, riêng mẫu MeOH yếu hơn 221,16 µg/ml trên dòng HeLa và trên 250 µg/ml đối với dòng A549 (kết quả không trình bày trong bảng), kết quả này củng cố chắc chắn hơn trong nhận định là: Các mẫu khảo sát (với thành phần hoạt chất chính là alkaloid) có hoạt tính gây độc trên dòng tế bào ung thư HeLa và A549 (Bảng 6, 7 và Hình 6), kết quả cũng phù hợp với công bố của tác giả C. Stevigny và cộng sự về hoạt tính của các alkaloid trong Tơ xanh [14].

4. KẾT LUẬN

Hoạt tính chống oxy hóa: Trong thử nghiệm quét gốc hydroxyl tự do, hầu hết chất được thử có nồng độ % hoạt tính chống oxy hóa tối thiểu là

25 µg/ml và hoạt tính tối đa là 200 µg/ml. Trong thử nghiệm quét gốc tự do DPPH thì giá trị IC₅₀ của các mẫu thử trong khoảng 5-20 µg/ml, cao nhất là Atp (alkaloid toàn phần) và V3 (1,2;10,11-methylen dioxiđ – 3 methoxy -4-en aporphin) với giá trị lần lượt là 6,18 µg/ml và 4,98 µg/ml. Kết quả cho thấy hỗn hợp các alkaloid cho hoạt tính cao nhất so với các alkaloid đơn chất.

Thử nghiệm WST-1 trên hai dòng tế bào A549 và HeLa cũng cho thấy cao chiết MeOH có hoạt tính thấp với giá trị IC₅₀ > 200 µg/ml. Các mẫu thử nghiệm V0, V1 và Atp có giá trị IC₅₀ trong khoảng 20-40 µg/ml.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bùi Thế Vinh, Trần Công Luận, 2016. Khảo đặc điểm vi học và hợp chất alkaloid của cây tơ xanh (*Cassytha filiformis* L.), Y học Tp. HCM, 1, pp. 168.
2. Bùi Thế Vinh, Đoàn Nam Trung, Trần Công Luận, 2016. Phân lập, xác định cấu trúc các aporphine alkaloid từ cây tơ xanh (*Cassytha filiformis* L.), Y học Tp. HCM, 1, pp. 273.
3. Cassels B.K., Asencio M., Conget P., Speisky H., Videla L.A., Lissi E.A., 1995. Structure-antioxidative activity relationships in benzyloquinoline alkaloids, *Pharmacol. Res.*, 31(2), pp. 103-7.
4. Garcez F.R., Francisca da Silva A.G., Garcez W.S., Linck G., de Fatima Matos M.C., Santos E.C., Queiroz L.M., 2011. Cytotoxic aporphin alkaloids from *Ocotea acutifolia*, *Planta Med.*, 77(4), pp. 383-387.
5. Gören A.C., Zhou B.N., Kingston D.G., 2003. Cytotoxic and DNA damaging activity of some aporphin alkaloids from *Stephania dinklagei*, *Planta Med.*, 69(9), pp. 867-8.
6. Hoet S., Stevigny C., Block S., Opperdoes S., Colson P., Baldeyrou B., Lansiaux A., Bailly C. and Quetin-Leclercq J., 2004. Alkaloid from *Cassytha filiformis* and related aporphins: antitrypanosomal activity, Cytotoxicity and interaction with DNA and topoisomerases. *Planta Med*, 70, pp. 407-413.
7. Indra B., Matsunaga K., Hoshino O., Suzuki M., Ogasawara H., Muramatsu I., Taniguchi T., Ohizumi Y., 2002. (+/-)-Domesticine, a novel and selective alpha1D-adrenoceptor antagonist in animal tissues and human alpha 1-adrenoceptors. *Eur. J. Pharmacol.*, 7, 445(1-2), pp. 21-9.
8. Indra B., Matsunaga K., Hoshino O., Suzuki M., Ogasawara H., Ohizumi Y., 2002. Structure-activity relationship studies with (+/-)-nantenine derivatives for alpha1-adrenoceptor antagonist activity, *Eur. J. Pharmacol.*, 22, 437(3), pp. 173-8.
9. Martínez L.A., Ríos J.L., Payá M., Alcaraz M.J., 1992. Inhibition of nonenzymic lipid peroxidation by benzyloquinoline alkaloids, *Free Radic. Biol. Med.*, 12(4), pp. 287-92.

10. Manske R. H. F., 1973. The alkaloids: Chemistry and physiology, Adecamic press, vol. 14, pp. 240.

11. Milián L., Estellés R., Abarca B., Ballesteros R., Sanz M.J., Blázquez M.A., 2004. Reactive oxygen species (ROS) generation inhibited by aporphin and phenanthrene alkaloids semi-synthesized from natural boldine, *Chem. Pharm. Bull.*, 52(6), pp. 696-9.

12. Orallo F., 2004. Acute cardiovascular effects of (+)-nantenine, an alkaloid isolated from *Platycapnos spicata* in anaesthetised normotensive rats, *Planta Med.*, 70(2), pp. 117-126.

13. Santanam N., Penumetcha M., Speisky H., Parthasarathy S., 2004. A novel alkaloid antioxidant, Boldine and synthetic antioxidant, reduced form of RU486, inhibit the oxidation of LDL *in vitro* and atherosclerosis *in vivo* in LDLR(-/-) mice, *Atherosclerosis.*, 173(2), pp. 203-210.

14 . Stevigny C., Block S., De Pauw-Gillet M.C., De Hoffmann E., Liabres G., Adjakidje V. and Quetin-Leclercq J., 2002. Cytotoxic Aporphin Alkaloid from *Cassytha filiformis*. *Planta Med*, 68, pp. 1042-1044.

15. Ubeda A., Montesinos C., Payá M., Alcaraz M.J., 1993. Iron-reducing and free-radical-scavenging properties of apomorphine and some related benzylisoquinolines, *Free Radic. Biol. Med.*, 15(2), pp. 159-67. 16 . Viện dược liệu, 2006. Phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lý của thuốc từ dược thảo. NXB Khoa học & Kỹ thuật, trg. 279-293.

17 . Viện dược liệu-Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam (tập2) (2003). NXB Khoa học kỹ thuật, trg. 978.

18. Wu Y.C., Chao Y.C., Chang F.R. and Chen Y.Y., 1997. Alkaloids from *Cassytha filiformis*. *Phytochemistry*, 46(1), pp. 181-184.

STUDIES ON THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF APORPHINOID ALKALOID FROM CASSYTHA FILIFORMIS L.

Bui The Vinh^{1,2}, Nguyen Thi Cam Duyen⁴

Vo Thi Ngoc My⁴, Tran Cong Luan³.

¹*Research Center of Ginseng and Medicinal Materials;*

²*University of Science-Vietnam National University Ho Chi Minh City;*

³*Tay Do University;* ⁴*Nguyen Tat Thanh University.*

ABSTRACT

Cassytha filiformis L. (Lauraceae) is a herbal remedy used for the treatment of many diseases. In which the aporphin alkaloids from Cassytha filiformis was studied on the antiplatelet, vasorelaxant, antitrypsosomal and other important activities. This study was made to explore the biological abilities of alkaloid compounds from Cassytha filiformis contributing the further investigate on this plant. The free radical scavenging and cytotoxic activities were evaluated. The results showed that free radical scavenging activity of isolated alkaloid with IC₅₀ ranged in 5-20 µg/ml, the highest activity is Cassmedine with the IC₅₀ 4,98 µg/ml. In the cytotoxic activity against A549 and HeLa cancer cell line, IC₅₀ of isolated alkaloid (V0, V1 and Atp) exhibited the cytotoxic potent in range 20-40 µg/ml.

Keywords: *Cassytha filiformis L., aporphinoid alkaloid.*